

中华人民共和国国家标准
《饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验》
编制说明（征求意见稿）

承担单位：

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

二零二四年十二月三十日

目录

一、工作简况

- (一) 任务来源
- (二) 标准修订背景和意义
- (三) 主要起草过程

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

- (一) 国家标准编制原则
- (二) 主要技术内容的确定
- (三) 修订前后技术内容的对比

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

- (一) 试验验证分析
- (二) 预期的经济效益、社会效益和生态效益

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

七、重大分歧意见的处理经过和依据

八、涉及专利的有关说明

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

十、其他应当说明的事项

国家标准《饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验》

编制说明（征求意见稿）

一、工作简况，包括任务来源、修订背景、起草过程等

（一）任务来源

本任务来源于国家市场监督管理总局国家标准化委员会，由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC76）归口上报，计划号：20232843-T-469，由陈晓峰主持国家标准《饲用微生物制剂中嗜酸乳杆菌的测定》的修订工作；由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共同承担该项国家标准的修订工作。

（二）标准修订背景和意义

1、嗜酸乳杆菌概述

嗜酸乳杆菌属于乳杆菌属的一个种，其特性为：杆菌，两端圆，不运动，无鞭毛，接触酶阴性，和苦杏仁苷、纤维二糖、七叶灵、果糖、半乳糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、水杨苷、蔗糖反应为阳性，阿拉伯糖、葡糖酸盐、甘露醇、松三糖、鼠李糖、核糖、山梨糖、木糖反应为阴性。

由于嗜酸乳杆菌在生长中可以产生一些抑菌物质，如有机酸、细菌素及类细菌素，可以抑制肠道中有害微生物生长繁殖，起到平衡肠道菌群的作用，并能产生B族维生素，包括各种叶酸、生物素、维生素B6和维生素K等。嗜酸乳杆菌可产生大量的免疫球蛋白，从而激活机体的免疫细胞，使得外在菌难以留存体内，达到免疫调节作用。近

年来，嗜酸乳杆菌的生产量逐渐增加，建立嗜酸乳杆菌的检测方法及产品标准对于生产和管理非常必要，并具有重要的意义。

2、关于嗜酸乳杆菌相关的标准情况

GB/T 20191-2006方法主要参考GB/T 16347-1996《乳酸菌饮料中乳酸菌的微生物学检验》，结合我国饲料中允许使用的乳酸菌的种类，以及参考乳酸菌的分类鉴定过程修订出来的。目前GB/T 16347-1996已废止，近几年依次被GB/T 4789.35-2003，GB/T 4789.35-2008，GB/T 4789.35-2010，GB/T 4789.35-2016及GB/T 4789.35-2023取代。目前现行标准是GB/T 4789.35-2023，于2024年3月实施，标准里增加了荧光PCR方法为选做方法。

GB/T 7300.504-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 嗜酸乳杆菌》于2024年6月1日实施，其中规定了饲料添加剂嗜酸乳杆菌的技术要求、采样、检验规则、标签、包装、运输和贮存，而检验规则是参考GB/T 20191。

行业标准方面，中华人民共和国出入境检验检疫行业标准SN/T 5642.6-2023《出口乳制品中乳酸菌检测方法 数字PCR计数法 第6部分：嗜酸乳杆菌》中规定了出口乳制品中嗜酸乳杆菌的微滴式数字PCR计数方法。

企业标准中都是嗜酸乳杆菌产品的标准，包括理化指标和卫生指标等。其中涉及检验的部分均是参考GB/T 20191。

国际标准方面，对于嗜酸乳杆菌的相关标准包括 EN 15787:2009《Animal feeding stuffs - Isolation and enumeration of *Lactobacillus* spp.》介绍了对饲料添加剂、预混料和饲料原料的乳酸杆菌的检测方法标准，ISO 20128《Milk products -Enumeration of presumptive *Lactobacillus*

acidophilus on a selective medium-Colony-count technique at 37°C》适用于发酵和非发酵牛奶、奶粉和婴儿配方食品的检测方法标准。

3、立项的必要性及意义

产业发展的需求：从2006年《饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验》颁布以来，饲料行业发生了很大的变化，对嗜酸乳杆菌作为饲料添加剂的质量和安全性要求也在提高，乳酸杆菌的数量在不断扩大。修订标准可以更好地适应产业发展的新需求，要求对嗜酸乳杆菌菌种的纯度鉴定等有更科学合理的规定，以保障饲料产品的质量和效果，促进饲料产业的健康发展。

技术进步的需求：随着科学技术的不断发展，微生物学检验领域出现了新的技术、方法和设备。修订标准在常规生理生化特性鉴定的基础上，纳入分子生物学方法，更先进、更准确、更高效，提高检验结果的可靠性和精确性，更灵敏地检测出嗜酸乳杆菌及其相关特性。

（三）主要起草过程

1、起草阶段

确定编制小组：2024年2月-2024年5月，形成起草小组，收集查阅与嗜酸乳杆菌相关国内外标准、企业标准及相关资料，搜集含有嗜酸乳杆菌的饲料样品。

召开启动会，确定技术路线：2024年5月7日，邀请深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心吕敬章主任技师、广东省科学院微生物研究所羊宋贞研究员、武汉新华扬生物股份有限公司研发总监徐丽作为专家和起草组成员共同召开了标准修订启动与研讨会，对技术路线进行了制定，并进行任务分工。

试验研究：2024年5月-2022年7月，对嗜酸乳杆菌检测培养基、好氧性、干扰性等技术内容进行试验，确定检测方法；

标准文本起草：2024年8月，起草小组讨论修改，进一步完善标准草案，并按照 GB/T 1.1-2020 形成征求意见稿。

2024年10月进行定向征求意见，发函单位25家，回函单位22家，提出意见单位22家。共提出意见87条，采纳78条，部分采纳1条，不采纳8条，对未采纳意见进行了说明，详情见《征求意见稿汇总处理表》。回函单位包括大专院校8家，科研院所4家、饲料企业4家、管理部门1家，第三方检测5家。对意见汇总后进行修改。

3、验证阶段

2024年11月-12月，委托河南省农畜水产品检验技术研究院、辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院、陕西秦云农产品检验检测股份有限公司三家单位进行标准验证。

4、标准预审

根据反馈意见修改形成送审稿后，上报全国饲料工业标准化技术委员会，申请预审。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据，修订国家标准时，还包括修订前后技术内容的对比

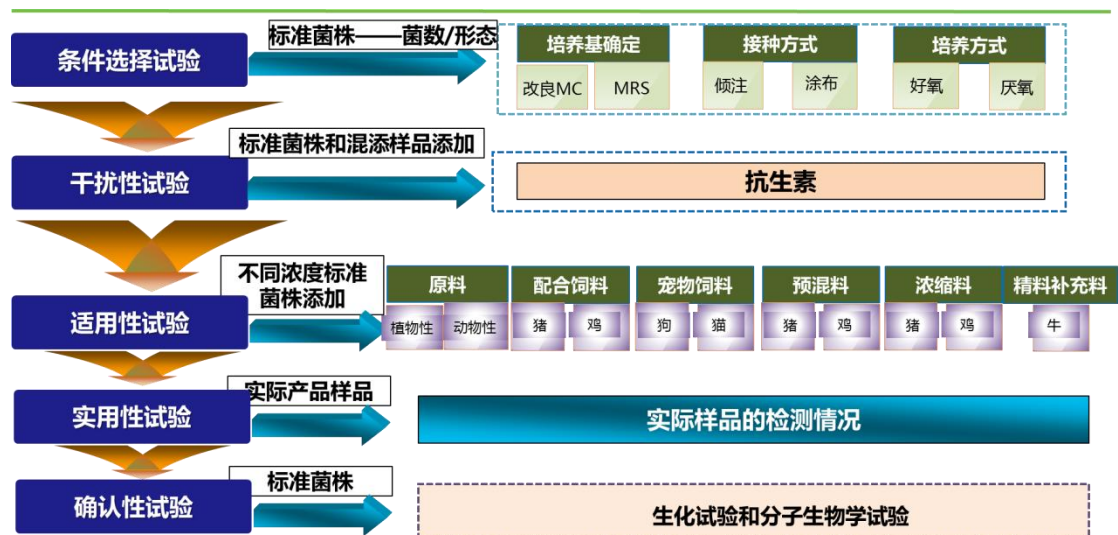
（一）国家标准编制原则

本标准遵循市场相关性原则、协商一致性和普遍适用性原则，根据 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》的规定进行制定。

（二）主要技术内容的确定

1、研究技术路线

图2：标准编制技术路线图



起草组按照条件选择、干扰性试验、适用性试验、实用性试验以及确认性试验，制定技术路线并开展标准研制工作。

2、技术内容及确定的依据

2.1 检测培养基的选择

2.1.1 常用培养基的比较与说明

表1：不同标准中检测乳杆菌使用的培养基

标准名称	培养基
GB/T 20191-2006	改良MC
GB 4789.35-2023	MRS
ISO 20128:2006	MRS/克林霉素/环丙沙星琼脂
BS EN 15787:2009	(1) MRS 培养基 (2) 补充有氯化三苯基四唑 (TTC) 的 MRS 培养基 (3) 酸化MRS琼脂 (AMRSA) (4) 含万古霉素和溴甲酚绿的乳酸杆菌厌氧MRS培养基 (LAMVAB)

GB/T 4789.35从2008年乳杆菌属的培养基改成MRS琼脂或MC琼脂，2010年、2016年和2023年定为MRS琼脂。原标准使用的改良MC培养基，GB 4789.35-2023食品标准采用的是MRS培养基，ISO 20128:2006奶制

品采用的是MRS/克林霉素/环丙沙星琼脂（MRS/CL/CIP 琼脂）培养基，BS EN 15787:2009饲料中分别在不同情况下可以选用MRS 培养基、补充有氯化三苯基四唑(TTC)的 MRS 培养基、酸化MRS琼脂、含万古霉素和溴甲酚绿的乳酸杆菌厌氧MRS培养基(LAMVAB)这四种培养基，这四种培养基的选择是基于已知菌种和菌数的前提下，其选择本身就具有一定的风险。以下对这几种培养基进行逐项说明或验证

2.1.1.1 酸化MRS琼脂(AMRSA)

AMRSA培养基选择性相对较弱，在检测饲料中的嗜酸乳杆菌时，饲料中的其他微生物，如酵母菌、霉菌、大肠杆菌等，可能会在该培养基上生长，与嗜酸乳杆菌形成竞争关系，干扰对嗜酸乳杆菌的鉴定和计数。AMRSA培养基pH值因酸化处理较低，与嗜酸乳杆菌在饲料中的实际生存环境以及最适生长pH值范围存在差异，可能导致嗜酸乳杆菌在该培养基上生长受限，影响检测结果的可靠性。在通用性与标准化方面，而AMRSA培养基使用相对较少，缺乏统一的标准和规范。

2.1.1.2 含万古霉素和溴甲酚绿的乳酸杆菌厌氧MRS培养基(LAMVAB)

LAMVAB是乳杆菌的选择性培养基。然而，有些乳杆菌如保加利亚乳杆菌*Lactobac delbrueckii*、瑞士乳杆菌*Lactobacillus helveticus*以及一些嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus*菌株，在LAMVAB上生长不良或根本不生长。因此，LAMVAB不适合用于嗜酸乳杆菌的检测。

2.1.1.3 补充有氯化三苯基四唑(TTC)的 MRS 培养基

氯化三苯四唑是一种氧化还原指示剂，会使具有较强还原能力的微生物菌落呈现红色等颜色变化，这可能导致一些非嗜酸乳杆菌的微生物也能产生类似的颜色反应，从而干扰对嗜酸乳杆菌的准确鉴定，降低了检测的特异性。氯化三苯四唑本身并非嗜酸乳杆菌生长所必需

的营养物质，其加入可能会改变培养基的营养成分平衡或理化性质，反而不利于嗜酸乳杆菌的生长和代谢，进而影响检测结果的可靠性。此外，补充氯化三苯四唑的MRS培养基使用相对较少，其配制方法、质量控制等方面可能存在差异，导致检测结果的可比性和重复性较差。

2.1.1.4 MRS培养基与改良MC培养基之间的选择

2.1.1.4.1 菌数比较

将嗜酸乳杆菌（CICC 6086）制成不同浓度的菌悬液后，分别在MRS培养基和改良MC培养基上涂布后培养，计算菌数。

表2：嗜酸乳杆菌在MRS培养基和改良MC培养基上生长情况

培养基名称	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4
MRS培养基	9.3×10^4	2.3×10^7	3.1×10^7	5.7×10^{10}
改良MC培养基	1.1×10^5	2.1×10^7	3.8×10^7	5.5×10^{10}

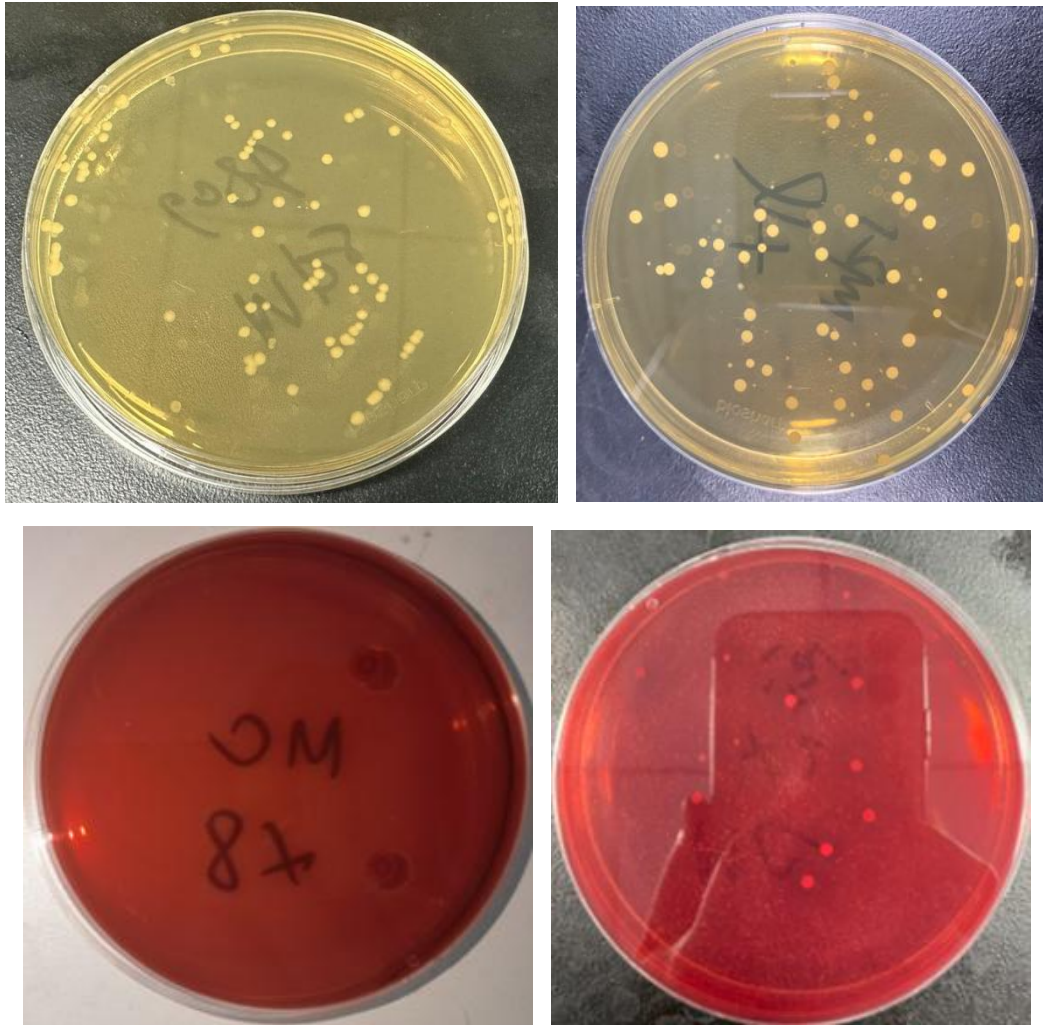
从表4可以看出，在低浓度的时候，改良MC培养基上菌数略高于MRS培养基上菌数，在高浓度上MRS培养基上菌数略高于改良MC培养基，总体而言，二者差别不显著。

2.1.1.4.3 菌落特征比较

表3：乳杆菌属在不同培养基上菌落特征

改良MC	MRS琼脂
平皿底为粉红色，菌落较小，红色，圆形，边缘似星状，直径 $2 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ ，可有淡淡的晕	菌落呈圆形，中等大小，凸起，微白色，湿润，边缘整齐，直径 $3 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ ，菌落背面为黄色

图3：嗜酸乳杆菌在MRS和MC琼脂培养基上的菌落特征



BS EN 15787:2009中提供了四种培养基的选择，这基于对样品的种类和数量提前预知的前提下。但在实际检测过程中，往往并不知道样品里微生物的种类和数量。同时，过多培养基的选择有可能让检测人员无从选择，不同的检测人员有可能选择不同的培养基造成结果相差较大。

通过对MRS培养基与改良MC培养基菌数、菌落特征的比较，可以得知，MRS培养基在菌数上与改良MC差距不大，菌落特征上在MRS上略大于改良MC上，更为直观。同时，也为了保持与其它标准的协调性和一致性，因此，选用MRS培养基作为嗜酸乳杆菌的检测培养基。

2.2 培养条件的选择

2.2.1 需氧条件

表4：不同标准中嗜酸乳杆菌培养需氧情况的要求

标准名称	需氧情况
GB/T 20191-2006	好氧
GB 4789.35-2023	厌氧
ISO 20128:2006	厌氧
BS EN 15787:2009	厌氧

从表6得知，目前只有原版标准没有采用厌氧要求，其他标准均提出了厌氧要求，对比试验（表7）表明，在厌氧条件下，菌数高于好氧条件下生长的菌数。同时为保证与其他标准的协调一致性，本标准对需氧情况规定为厌氧培养。

表5：不同氧气条件下培养的菌数（MRS琼脂）

氧气条件	1	2	3
好氧	1.1×10^4	4.2×10^7	4.4×10^{10}
厌氧	1.6×10^4	4.5×10^7	4.8×10^{10}

2.2.2 培养时间

表6：不同标准中嗜酸乳杆菌培养时间的要求

标准名称	培养时间
GB/T 20191-2006	72 h ± 1 h
GB 4789.35-2023	48 h ~ 72 h
ISO 20128:2006	72 h ± 3 h
BS EN 15787:2009	48 h ~ 72 h

GB/T 20191-2006和ISO 20128:2006标准规定培养时间为72 h，GB 4789.35-2023和BS EN 15787:2009标准规定培养时间为48 h ~ 72 h。实际检测过程中发现，在大多数情况下48 h时菌落已经生长良好，有时候48 h生长并不良好，在72 h的时候，会有菌落扩散的情况。在对

实际产品进行检测时，有时候48 h生长并不良好。因此，本标准借鉴 GB 4789.35-2023的表述“一般选择培养48 h，若菌落无生长或生长较小可选择培养至72 h”。

2.2.3 培养温度

表7：不同标准中嗜酸乳杆菌培养温度的要求

标准名称	培养温度
GB/T 20191-2006	36°C ± 1°C
GB 4789.35-2023	36°C ± 1°C
ISO 20128:2006	37°C
BS EN 15787:2009	37°C ± 1°C

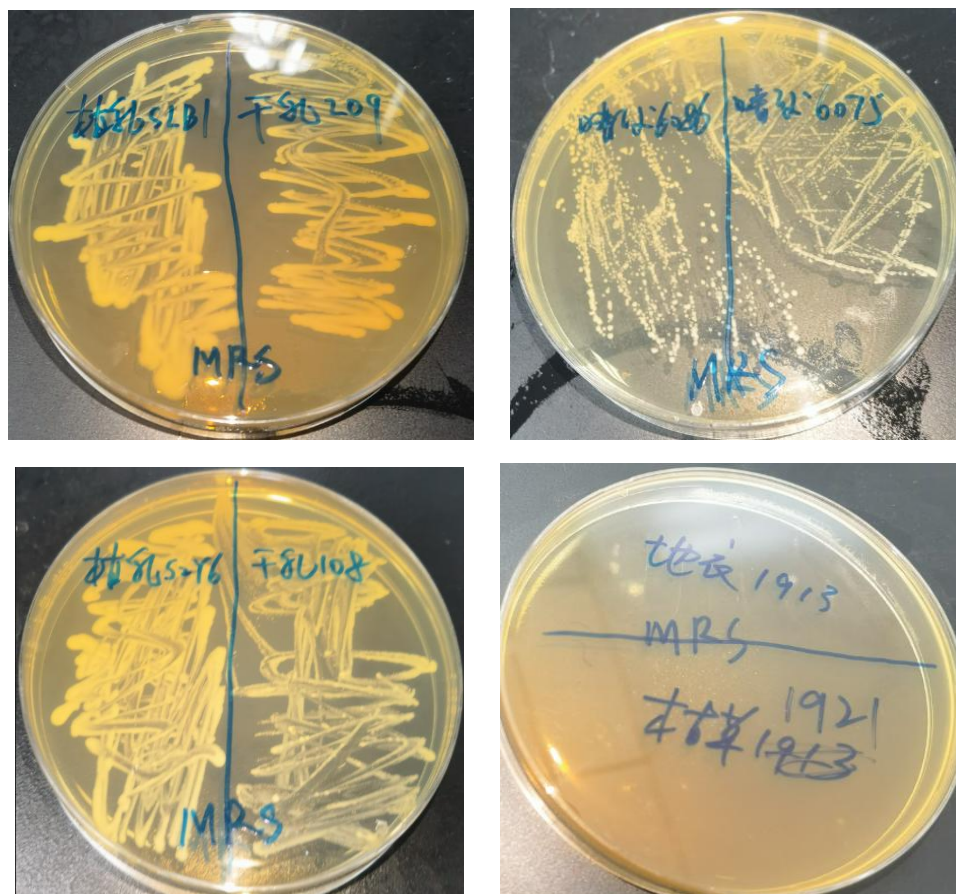
国内GB/T 20191-2006和GB 4789.35-2023两项标准均要求培养温度36°C，ISO 20128:2006和BS EN 15787:2009均要求培养温度37°C。两个温度在菌数和菌落特征方面并不会产生区别，为保持与原标准的连续性以及国内在培养温度上的一致性，培养温度仍要求为“36°C ± 1°C”。

2.3 干扰性试验

MRS 琼脂培养基提供了一个微酸性的环境，有利于乳杆菌的生长，同时含有特定的成分如硫酸镁和硫酸锰，这些成分提供了代谢必需的离子，而吐温 80 作为一种非离子型表面活性剂，辅助乳杆菌对营养物质的利用。这些特性使得 MRS 琼脂培养基成为研究乳杆菌的理想选择。通过使用菌种：嗜酸乳杆菌 CGMCC 1.1878、嗜酸乳杆菌 CICC 6086、嗜酸乳杆菌 CICC 6075、枯草芽孢杆菌 SCK-6、枯草芽孢杆菌 PSGP 1622、解淀粉芽孢杆菌 1927、枯草芽孢杆菌 1921、地衣芽孢杆菌 1913 菌株

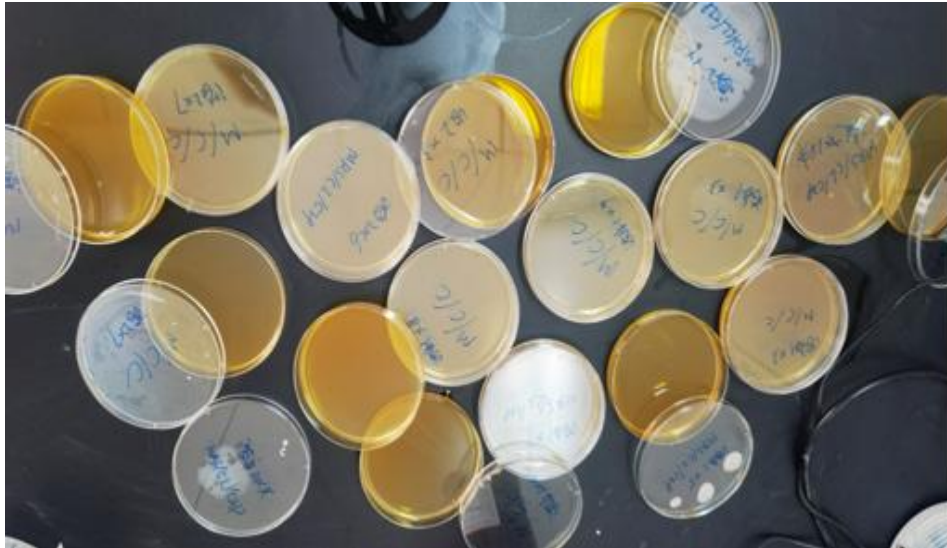
分别在 MRS 划线，试验表明乳杆菌均生长良好，芽孢杆菌类生长微弱或不生长。因此，MRS 培养基具有一定的选择性。

图 4：不同菌种在 MRS 琼脂培养基上划线的生长情况



按照ISO 20128:2006中的MRS/克林霉素/环丙沙星琼脂方法，按照MRS/CL/CIP 琼脂（MRS 琼脂和每升培养基添加0.1 mg克林霉素和10.0 mg环丙沙星）发现对嗜酸乳杆菌CICC 6086和CICC 6075两株嗜酸乳杆菌均有抑制，其它乳酸杆菌也未生长（图5）。

图5：按ISO 20128:2006配制的MRS/CL/CIP 琼脂上的生长情况



按照文献（蒋曙光，曹晓靓，梅雯芳，抗生素克林霉素在改良检测嗜酸乳杆菌的应用研究，食品工业，2013年第34卷第2期，163-166）以剂量分别为0.05、0.10、0.15、0.20、0.40 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 的克林霉素分别加入基础MRS琼脂中，发现嗜酸乳杆菌在上面生长良好，其它乳酸菌也同样生长良好，没有发现抑制作用（图6）。

图6：MRS培养基加入低浓度克林霉素的生长情况



综上所述，在MRS培养基上添加抗生素后，若抗生素浓度较高，在抑制其它乳杆菌的同时，也抑制嗜酸乳杆菌的生长；若抗生素浓度较低，抑制作用均不明显。MRS培养基本身就有一定的选择性，芽孢杆菌受到一定程度抑制。鉴于这些原因，本标准中不添加抗生素来进一步增加选择性。

2.4 不同种类饲料基质添加试验

对不同种类的饲料基质分别进行低、中、高浓度的添加，之后进行菌数检测。

表8：不同种类饲料基质添加试验（CFU/g）

种类	低浓度添加后 检测值	中浓度添加后检 测值	高浓度添加后 检测值
麦麸	1.5×10^4	5.2×10^7	6.1×10^9
豆粕	1.2×10^4	4.8×10^7	5.8×10^9
猪配合饲料	1.3×10^4	4.4×10^7	4.5×10^9
鸡配合饲料	1.4×10^4	5.6×10^7	5.4×10^9
宠物饲料	1.8×10^4	4.6×10^7	6.2×10^9
精料补充料	1.3×10^4	5.1×10^7	4.8×10^9
预混料	1.6×10^4	3.9×10^7	5.2×10^9
猪浓缩饲料	2.0×10^4	4.1×10^7	5.6×10^9
鸡浓缩饲料	1.6×10^4	5.4×10^7	6.2×10^9
对数统计STDEV	0.0720	0.0541	0.0497

在低、中、高浓度添加后检测的菌数，对数统计标准差（STDEV）值均小于0.01，从数据离散程度看，标准差衡量的是数据相对于平均值的分散状况。STDEV值小于0.01，表明微生物菌数对数的各个数据点非常接近平均值，意味着数据波动极小。从实验稳定性来讲，这说明微生物实验或检测过程具有较高的稳定性和可重复性。在培养微生物并计数时，如果菌数对数的标准差小，微生物生长状况相近，没有因为基质不同而出现较大的差异，说明本标准建立的方法适用于含不同浓度嗜酸乳杆菌的不同饲料基质。

2.5 实际样品的检测

共收集到23批次含有嗜酸乳杆菌的样品，其中保健类的2个，饲料类的21个，其中4批次样品未标识含量，因此，对17批次（来自17家企业）样品按标准方法进行检测，检测结果见表10。

表9：含有嗜酸乳杆菌样品的嗜酸乳杆菌含量（CFU/g）

样品编号	产品名称	标识	实测值
SSRGJ001	嗜酸乳杆菌	500 亿	5.4×10^{10}
SSRGJ002	嗜酸乳杆菌	100 亿	8.2×10^{10}
SSRGJ003	嗜酸乳杆菌	100 亿	6.5×10^{10}
SSRGJ004	嗜酸乳杆菌	100 亿	1.3×10^{10}
SSRGJ005	嗜酸乳杆菌	50 亿	7.7×10^8
SSRGJ006	嗜酸乳杆菌	1000 亿	6.5×10^{10}
SSRGJ007	嗜酸乳杆菌	1000 亿	8.3×10^{10}
SSRGJ008	饲料添加剂嗜酸乳杆菌	1000 亿	9.2×10^{10}
SSRGJ009	宠物营养补充剂益生菌	枯草芽孢杆菌>50 亿、地衣芽孢杆菌>50 亿、植物乳杆菌 ≥ 2 亿、嗜酸乳杆菌>1 亿、布拉氏酵母菌>1 亿	5.5×10^9
SSRGJ010	猫肠乐宝 251G	嗜酸乳杆菌 $>2.5 \times 10^9$ 、粪肠球菌 $>7.5 \times 10^7$ 、长双歧杆菌 $>2.5 \times 10^7$	2.7×10^9
SSRGJ011	产后律康 混合型饲料添加剂 嗜酸乳杆菌+地衣芽孢杆菌	嗜酸乳杆菌 $\geq 2 \times 10^8$ 、地衣芽孢杆菌 $\geq 2 \times 10^8$	1.8×10^8
SSRGJ012	强力乳酸菌素 混合型饲料添加剂 嗜酸乳杆菌	嗜酸乳杆菌 $\geq 2.00 \times 10^3$	2.2×10^3
SSRGJ013	嗜酸乳杆菌（畜禽饲料专用）	80 亿	8.0×10^7
SSRGJ014	嗜酸乳杆菌	500 亿	5.1×10^{10}
SSRGJ015	混合型饲料添加剂物嗜酸乳杆菌强效乳酸菌素	10 亿	1.2×10^9
SSRGJ016	嗜酸乳杆菌（水产专用）	80 亿	6.3×10^9
SSRGJ017	混合型饲料添加剂-嗜酸乳杆菌	100 亿	5.4×10^9
SSRGJ018	嗜酸乳杆菌	50 亿	6.6×10^9
SSRGJ019	嗜酸乳杆菌	10 亿	5.9×10^8

2.6 鉴定

2.6.1 生理生化鉴定

嗜酸乳杆菌的生理生化特征见表11。

表 10：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	d
甘露糖	-	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。

2.6.2 分子生物学鉴定

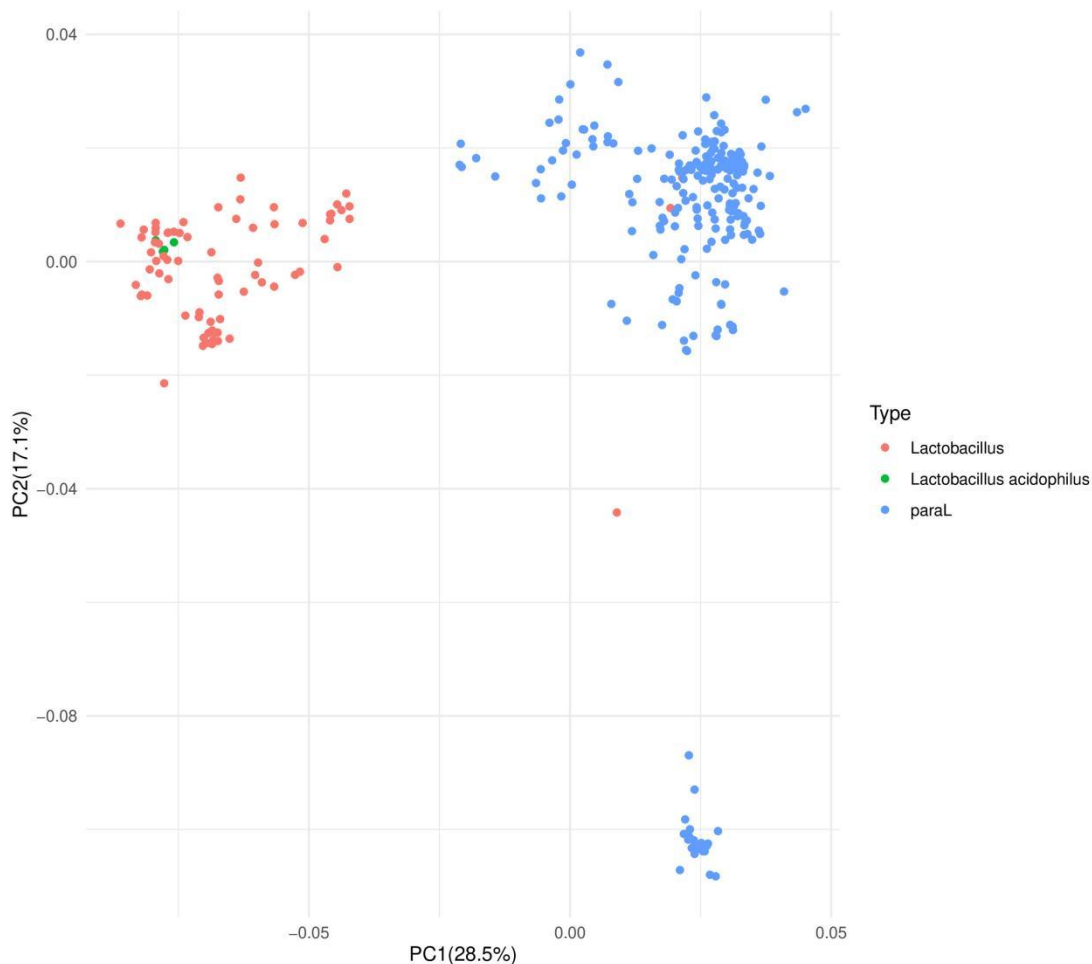
2.6.2.1 16s 鉴定标准同源性阈值问题

选取了ncbi中收录的16s数据库，将Lactobacillus属所有已报道标准菌株16s全长、Lactobacillus acidophilus标准菌株的16s序列下载；再将非Lactobacillus属，但是和该属较为接近的多种属（这个属最好列出表来，让大家知道比较了哪些属），其涵盖的所有16s下载。分别简称为：L.a组16s集合（共4株）；L组16s集合（76株，不含L.a组4株）；paraL组集合（共226株）。

将其多序列比对，之后计算16s距离矩阵，由于全长头尾参差不齐，故计算有一定误差。我们采用2种方法计算：分别精确到1%，和精确到万分之一。

计算16s之间同源性矩阵，之后转换为非同源矩阵，使用pca分析，进行数据可视化，如图：

图7：pca分析图



图中每个点表示每株参考菌株。距离越远表示16s差异越大。颜色表示分组。

蓝色为与Lactobacillus属较为接近的其他属，和红色lactobacillus属少有交叉。

绿色为嗜酸乳杆菌，和同属内其他种距离非常接近。这说明该物种使用97%或98%做判定标准不合适。

结合精确到1%的误差结果，在>1%情况下即有其他种出现，如表11：

表11：乳杆菌属Lactobacillus主要种16S序列距离统计表

参考菌株	NR_117062.1 Lactobacillus acidophilus strain VPI 6032 16S ribosomal RNA, partial sequence	NR_043182.1 Lactobacillus acidophilus strain BCRC10695 16S ribosomal RNA, partial sequence	NR_117812.1 Lactobacillus acidophilus strain JCM 1132 16S ribosomal RNA, partial sequence	NR_113638.1 Lactobacillus acidophilus strain NBRC 13951 16S ribosomal RNA, partial sequence
NR_117062.1 Lactobacillus acidophilus strain VPI 6032 16S ribosomal RNA, partial sequence	0%	0%	0%	0%
NR_043182.1 Lactobacillus acidophilus strain BCRC10695 16S ribosomal RNA, partial sequence	0%	0%	0%	0%
NR_117812.1 Lactobacillus acidophilus strain JCM 1132 16S ribosomal RNA, partial sequence	0%	0%	0%	0%
NR_113638.1 Lactobacillus acidophilus strain NBRC 13951 16S ribosomal RNA, partial sequence	0%	0%	0%	0%
NR_024813.1 Lactobacillus kitasatonis strain JCM 1039 16S ribosomal RNA, partial sequence	1%	1%	2%	1%
NR_113261.1 Lactobacillus gallinarum strain JCM 2011 16S ribosomal RNA, partial sequence	1%	1%	2%	1%
NR_117061.1 Lactobacillus gallinarum strain ATCC 33199 16S ribosomal RNA, partial sequence	1%	1%	2%	1%
NR_041800.1 Lactobacillus crispatus strain ATCC 33820 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	2%	2%	2%
NR_042439.1 Lactobacillus helveticus DSM 20075 = CGMCC 1.1877 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	2%	2%	2%
NR_042111.1 Lactobacillus gallinarum strain ATCC 33199 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	1%	2%	1%
NR_117060.1 Lactobacillus helveticus DSM 20075 = CGMCC 1.1877 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	2%	2%	2%
NR_117063.1 Lactobacillus crispatus strain DSM 20584 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	2%	2%	2%
NR_117064.1 Lactobacillus amylovorus DSM 20531 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	2%	2%	2%
NR_117065.1 Lactobacillus ultunensis strain CCUG 48460 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	2%	3%	2%
NR_117067.1 Lactobacillus kefiranofaciens subsp. kefirgranum strain JCM 8572 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	3%	3%	2%
NR_043287.1 Lactobacillus amylovorus DSM 20531 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	2%	2%	2%
NR_042802.1 Lactobacillus ultunensis strain Kx146C1 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	2%	3%	2%
NR_113719.1 Lactobacillus helveticus strain NBRC 15019 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	2%	2%	2%
NR_119274.1 Lactobacillus crispatus strain DSM 20584 16S ribosomal RNA, partial sequence	2%	2%	2%	2%
NR_114903.1 Lactobacillus kefiranofaciens strain LMG 19149 16S ribosomal RNA, partial sequence	3%	3%	3%	3%
NR_117066.1 Lactobacillus kefiranofaciens strain ATCC 43761 16S ribosomal RNA, partial sequence	3%	3%	3%	3%

NR_117068.1 <i>Lactobacillus hamsteri</i> strain JCM 6256 16S ribosomal RNA, partial sequence	3%	3%	4%	3%
NR_117069.1 <i>Lactobacillus amylolyticus</i> strain CCUG 39901 16S ribosomal RNA, partial sequence	3%	3%	3%	3%
NR_117071.1 <i>Lactobacillus intestinalis</i> strain TH4 16S ribosomal RNA, partial sequence	3%	4%	4%	4%
NR_025448.1 <i>Lactobacillus hamsteri</i> strain DSM 5661 16S ribosomal RNA, partial sequence	3%	3%	4%	3%
NR_042440.1 <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> strain WT-2B 16S ribosomal RNA, partial sequence	3%	3%	3%	3%
NR_042441.1 <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> strain DSM 10550 16S ribosomal RNA, partial sequence	3%	3%	3%	3%
NR_114722.1 <i>Lactobacillus gallinarum</i> strain ATCC 33199 16S ribosomal RNA, partial sequence	3%	3%	3%	3%
NR_117057.1 <i>Lactobacillus gigeriorum</i> DSM 23908 = CRBIP 24.85 16S ribosomal RNA, partial sequence	4%	4%	4%	4%

表注：2%表示两者距离差异，即两者序列同源性的 $100\% - 2\% = 98\%$ 。

因此我们选取16s全长同源性应> 99% 以上。

2.6.2.2 ANI 值做嗜酸乳杆菌物种分类的考虑

对超过100余株嗜酸乳杆菌，已报道基因组序列的比对，我们发现其ANI值变异非常大，从82%~99.9%，这对于物种鉴定是致命的。说明这个物种存在较大异质性。所以用ANI做该种的鉴定，个人不推荐。

2.6.2.3 使用 rMLST 方法

首先，传统的MLST分型管家基因方法，没有收录该种。这说明该种只靠<10个以下的管家基因，可能非常难以区分。

考虑到核糖体保守性最好，故我们选择核糖体MLST，即rMLST方法，拿所有编码核糖体大小亚基的基因序列，去和rMLST公开数据库比对即可。

这种方法需要二代测序，拿到草图就行了。也不需要其他太复杂的分析。而且结果理论是最准确的。

（三）修订前后技术内容的对比

——范围：原标准范围适用于含有有益微生物嗜酸乳杆菌的各种饲料中嗜酸乳杆菌数量的测定；修订为“含有嗜酸乳杆菌的配合饲料、饲料添加剂、浓缩饲料、预混合饲料、精料补充料和宠物饲料中嗜酸乳杆菌菌数的测定”，进一步明确了标准的适用范围。

——规范性引用文件：原标准采用的GB/T14699.1饲料 采样，该标准并不适用于微生物的采样，因此，本标准修订为GB/T 42959 饲料微生物检验 采样；并增加了GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

——培养基和试剂：原标准采用的是改良MC培养基，本标准修订为MRS琼脂培养基。

——嗜酸乳杆菌的鉴定：原标准没有分子生物学鉴定部分，本标准增加了分子生物学鉴定部分。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

（一）试验验证分析

表12：验证结果表

	辽宁	河南	陕西	起草组	STDEV
SSRGJ018	3.63E+09	8.42E+09	5.38E+09	6.64E+09	
Log10	9.56	9.93	9.73	9.82	0.16
SSRGJ019	6.58E+08	4.42E+08	5.40E+08	5.93E+08	
Log10	8.82	8.65	8.73	8.77	0.07

验证结果根据ISO 22117:2010《Microbiology of food and animal feeding stuffs-Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison》，微生物实验室质量控制要求重复计数不超过0.5对数单位，符合该要求表明质量控制良好。当使用平板菌落计数方法时，围绕平均菌落计数值的95%置信区间通常不超出±0.5对数单位。将这一质量控制标准引入定量微生物能力验证统计评价，参加者结果在对数中位值±0.5范围内可认为是满意结果。因此，以上试验结果均符合此条件，表明此方法具有较好的实验室间重复性。

（二）预期的经济效益、社会效益和生态效益

2023年，全国饲料工业总产值14018.3亿元，总产量32162.7万吨。其中，配合饲料产量29888.5万吨。全国饲料添加剂总产量1505.6万吨。其中，微生物类产品产量增长10.8%。随着畜牧养殖业的稳定发展和无抗养殖的进程加快，嗜酸乳杆菌应用在饲料添加剂中越来越广泛，而且显示出不可限量的应用前景。按照配合饲料饲用嗜酸乳杆菌0.1%添加量预测推算，全国对嗜酸乳杆菌潜在的年需求量为29.9万吨。

养殖业的发展直接影响国民健康和经济发展，“无抗化”是大势所趋，养殖行业、饲料行业、兽医兽药行业及相关行业都必须适应趋势的发展，在维持动物肠道菌群平衡、提供营养物质、提高动物生产性能、提高饲料转化率等方面有很好的应用价值，畜禽养殖中有着广泛的应用。（1）提升畜禽养殖效率：有助于改善动物的健康状况，提高饲料的利用率，减少资源浪费，为养殖业提供一种更加环保、高效、健康的发展模式，有助于产业的长期稳定发展。（2）保障饲料安全：使用微生物饲料添加剂可以减少化学药物和抗生素在养殖中的使用，降低药物残留的风险，提高养殖环节的安全性，保障公众的健康。（3）促进豆粕减量替代行动：微生物饲料添加剂可以提高饲料的转化效率，间接减少对粮食作为饲料的需求，减少对豆粕的使用，有利于保障粮食在其他领域的供应。（4）促进就业和相关产业发展：带动微生物研究、饲料工业等相关领域的技术进步和产业升级，从研发、生产到销售和技术服务等环节，为社会创造了一系列的就业岗位。

在国家“饲料无抗化”及“养殖减抗、限抗”的背景下，通过本标准的实施，进一步减少环境污染：能够降低氮、磷等污染物的排放，减轻养殖业对环境的压力，保护生态平衡，减少抗生素等药物的用量（减少30%以上），有效减少养殖污染和化学药物的二次污染，减少碳排放，推动我国畜牧业的绿色、健康、无污染、可持续发展，具有显著的生态效益。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

BS EN 15787:2009中提供了四种培养基的选择，这基于对样品的种类和数量提前预知的前提下。但在实际检测过程中，往往并不知道

样品里微生物的种类和数量。同时，过多培养基的选择有可能让检测人员无从选择，不同的检测人员有可能选择不同的培养基造成结果相差较大，因此，本标准未考虑由检测人员在实验室现场去选择培养基。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

本标准未引用和采用国际标准，因为ISO 20128:2006《Milk products -Enumeration of presumptive Lactobacillus acidophilus on a selective medium-Colony-count technique at 37°C》的适用范围是针对发酵和非发酵牛奶、奶粉和婴儿配方食品的，不适用于饲料。EN 15787:2009《Animal feeding stuffs - Isolation and enumeration of Lactobacillus spp.》适用范围是饲料添加剂、预混料和饲料原料，但其检测对象是乳酸杆菌属，本标准中的嗜酸乳杆菌为乳酸杆菌属的一个种，范围过大。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准编制过程中严格遵守国家有关方针、政策、法律法规，严格执行强制性国家标准和行业标准，与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调性原则。

本标准编制过程遵循《中华人民共和国标准化法》、《国家标准化管理办法》等法律法规的要求，与强制性标准协调一致、没有冲突，同时满足《饲料和饲料添加剂管理条例》、《新饲料添加剂申报材料要求》的相关要求。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

无相关授权专利。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和 实施日期的建议等措施建议

本标准发布后，建议加强标准的宣贯，保证嗜酸乳杆菌产品质量和市场规范。经过严谨、系统的研究工作，建立了饲用微生物制剂中嗜酸乳杆菌的检测方法，使饲料中嗜酸乳杆菌的测定有据可依，有法可循。本标准具有较强的科学性、经济性和广泛的应用前景，便于推广。

建议将《饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验》作为国家标准批准发布。

十、其他应当说明的事项

无。