



中华人民共和国国家标准

GB 7300.506—2025

饲料添加剂 第5部分：微生物 德式乳杆菌乳酸亚种

Feed additives —Part 5: Live microorganisms—*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*

2025-12-31 发布

2027-01-01 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。

本部分为 GB 7300《饲料添加剂》的第 505 部分。GB 7300 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 L-苏氨酸(GB 7300.101)；
- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 甘氨酸(GB 7300.102)；
- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 蛋氨酸羟基类似物(GB 7300.103)；
- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 L-缬氨酸(GB 7300.104)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 L-抗坏血酸-2-磷酸酯盐(GB 7300.201)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 维生素 D₃油(GB 7300.202)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 甜菜碱(GB 7300.203)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 甜菜碱盐酸盐(GB 7300.204)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 核黄素(维生素 B₂)(GB 7300.205)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 氯化胆碱(GB 7300.206)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 烟酰胺(GB 7300.207)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 L-抗坏血酸钙(GB 7300.208)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 氰钴胺(维生素 B₁₂)(GB 7300.209)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 碘化钾(GB 7300.301)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 亚硒酸钠(GB 7300.302)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 碘酸钾(GB 7300.303)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 甘氨酸铁络合物(GB 7300.304)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 碱式氯化铜(GB 7300.305)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 烟酸铬(GB 7300.306)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 甘氨酸锌(GB 7300.307)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 苏氨酸锌螯合物(GB 7300.308)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 乳酸亚铁(GB 7300.309)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 酵母硒(GB 7300.310)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 磷酸二氢钙(GB 7300.311)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 磷酸三钙(GB 7300.312)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 磷酸氢钙(GB 7300.313)；
- 第 4 部分：酶制剂 木聚糖酶(GB 7300.401)；
- 第 4 部分：酶制剂 植酸酶(GB 7300.402)；
- 第 4 部分：酶制剂 纤维素酶(GB 7300.403)；
- 第 4 部分：酶制剂 β -甘露聚糖酶(GB 7300.404)；
- 第 4 部分：酶制剂 α -半乳糖苷酶(GB 7300.405)；
- 第 5 部分：微生物 酿酒酵母(GB 7300.501)；
- 第 5 部分：微生物 植物乳杆菌(GB 7300.502)；
- 第 5 部分：微生物 屎肠球菌(GB 7300.503)；
- 第 5 部分：微生物 嗜酸乳杆菌(GB 7300.504)；

- 第5部分:微生物 凝结芽孢杆菌(GB 7300.505);
- 第5部分:微生物 德式乳杆菌乳酸亚种(GB 7300.506);
- 第5部分:微生物 粪肠球菌(GB 7300.507);
- 第6部分:非蛋白氮 尿素(GB 7300.601);
- 第6部分:非蛋白氮 磷酸氢二铵(GB 7300.602);
- 第8部分:防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 碳酸氢钠(GB 7300.801);
- 第8部分:防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 丙酸(GB 7300.802);
- 第8部分:防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 氯化铵(GB 7300.803);
- 第8部分:防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 苯甲酸(GB 7300.804);
- 第8部分:防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 乳酸(GB 7300.805);
- 第8部分:防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 甲酸钙(GB 7300.806);
- 第8部分:防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 柠檬酸钙(GB 7300.807);
- 第8部分:防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 双乙酸钠(GB 7300.808);
- 第9部分:着色剂 β -胡萝卜素粉(GB 7300.901);
- 第9部分:着色剂 β, β -胡萝卜素-4,4-二酮(斑蝥黄)(GB 7300.902);
- 第10部分:调味和诱食物质 谷氨酸钠(GB 7300.1001);
- 第10部分:调味和诱食物质 大蒜素(GB 7300.1002);
- 第10部分:调味和诱食物质 新甲基橙皮苷二氢查耳酮(GB 7300.1003);
- 第13部分:其他 胆汁酸(GB 7300.1301)。

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出并归口。



引 言

饲料添加剂是指在饲料加工、制作、使用过程中添加的少量或者微量物质,包括营养性饲料添加剂和一般饲料添加剂。为便于使用,按照产品类型,GB 7300《饲料添加剂》分为以下 13 个大类:

- 氨基酸、氨基酸盐及其类似物;
- 维生素及类维生素;
- 矿物元素及其络(螯)合物;
- 酶制剂;
- 微生物;
- 非蛋白氮;
- 抗氧化剂;
- 防腐剂、防霉剂和酸度调节剂;
- 着色剂;
- 调味和诱食物质;
- 粘结剂、抗结块剂、稳定剂和乳化剂;
- 多糖和寡糖;
- 其他。

本文件的产品德式乳杆菌乳酸亚种属于第 5 大类微生物,因德式乳杆菌乳酸亚种是此大类第 6 个发布的产品标准,所以本文件以 GB 7300. 506 编号,作为 GB 7300 的第 506 部分。

饲料添加剂 第5部分：微生物

德式乳杆菌乳酸亚种

1 范围

本文件规定了饲料添加剂德式乳杆菌乳酸亚种的技术要求、取样、检验规则、标签、包装、运输、贮存和保质期，描述了相应的试验方法。

本文件适用于以德式乳杆菌乳酸亚种为菌种，经液态发酵、分离、添加或不添加载体、干燥等工艺后制得的固态饲料添加剂产品。

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 5917.1 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法
- GB/T 6435 饲料中水分的测定
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定
- GB 10648 饲料标签
- GB/T 13079 饲料中总砷的测定
- GB/T 13080 饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
- GB/T 13081 饲料中汞的测定
- GB/T 13082 饲料中镉的测定
- GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定
- GB/T 13092 饲料中霉菌总数的测定
- GB/T 14699 饲料 采样
- GB/T 18869 饲料中大肠菌群的测定
- GB/T 28716 饲料中玉米赤霉烯酮的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法
- GB/T 30956 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法
- GB/T 42959 饲料微生物检验 采样
- NY/T 2071 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

德式乳杆菌乳酸亚种 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*

属于细菌界、厚壁菌门、芽孢杆菌纲、乳杆菌目、乳杆菌科、乳杆菌属。

注：革兰氏阳性杆菌，菌体长杆状，趋向于呈线性；不运动。厌氧或兼性厌氧，化能异养，同型发酵产生 D-乳酸。

4 原料和菌种

4.1 原料

来源于《饲料原料目录》和(或)《饲料添加剂品种目录》所列品种。

4.2 菌种

菌种为德式乳杆菌乳酸亚种。

5 技术要求

5.1 外观与性状

粉末或颗粒,形态、色泽均匀一致,无结块,无霉变,无异臭味。

5.2 德式乳杆菌乳酸亚种鉴别

应符合附录 A 中所述的形态特征、生理生化特征及分子生物学结果。

5.3 质量指标

应符合表 1 的要求。

表 1 质量指标

项目	指标
德式乳杆菌乳酸亚种活菌数/(CFU/g)	$\geq 1.0 \times 10^8$
水分/%	≤ 10
粒度 ^a (2.0 mm 标准筛通过率)/%	≥ 95
^a 仅适用于粉状产品。	

5.4 卫生指标

应符合表 2 的要求。

表 2 卫生指标

项目	指标
总砷(以 As 计)/(mg/kg)	≤ 2
铅(Pb)/(mg/kg)	≤ 5
汞(Hg)/(mg/kg)	≤ 0.1
镉(Cd)/(mg/kg)	≤ 0.5
黄曲霉毒素 B ₁ ^a /(μg/kg)	≤ 10
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 ^a /(mg/kg)	≤ 1
玉米赤霉烯酮 ^a /(mg/kg)	≤ 0.1

表 2 卫生指标 (续)

项目	指标
大肠菌群/(MPN/g)	≤100
霉菌总数/(CFU/g)	≤1.0×10 ⁴
沙门氏菌/(25 g)	不应检出
注：表中所列限量,除特别注明外均以干物质含量 88%为基础计算(大肠菌群、霉菌总数、沙门氏菌除外)。	
* 此类指标仅适用于植物性载体生产的产品。	

6 取样

以微生物检验为目的的采样按照 GB/T 42959 执行,以其他指标检验为目的的采样按照 GB/T 14699 执行。

7 试验方法

7.1 外观与性状

取适量试样置于干净白色纸片上,在自然光下观察其形态、色泽、有无异物,嗅其气味。

7.2 德式乳杆菌乳酸亚种鉴定

按附录 A 规定的方法测定。

7.3 德式乳杆菌乳酸亚种活菌计数

按附录 B 规定的方法测定。

7.4 水分

按 GB/T 6435 规定的方法测定。

7.5 粒度

按 GB/T 5917.1 规定的方法测定。

7.6 总砷(以 As 计)

按 GB/T 13079 规定的方法测定。

7.7 铅

按 GB/T 13080 规定的方法测定。

7.8 汞

按 GB/T 13081 规定的方法测定。

7.9 镉

按 GB/T 13082 规定的方法测定。

7.10 黄曲霉毒素 B₁

按 NY/T 2071 规定的方法测定。

7.11 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(呕吐毒素)

按 GB/T 30956 规定的方法测定。

7.12 玉米赤霉烯酮

按 GB/T 28716 规定的方法测定。

7.13 霉菌总数

按 GB/T 13092 规定的方法测定。

7.14 大肠菌群

按 GB/T 18869 规定的方法测定。

7.15 沙门氏菌

按 GB/T 13091 规定的方法测定。

8 检验规则

8.1 组批

以相同材料、相同的生产工艺,经连续生产或同一班次生产的同一规格的产品为一批,每批产品不应超过 50 t。

8.2 出厂检验

出厂检验项目为外观与性状、水分、德式乳杆菌乳酸亚种活菌数。

8.3 型式检验

型式检验项目为第 5 章规定的所有项目。在正常生产情况下,每年至少进行一次型式检验。有下列情况之一时,亦应进行型式检验:

- a) 产品定型投产时;
- b) 生产工艺、配方或主要原料来源有较大改变,可能影响产品质量时;
- c) 停产 3 个月以上,重新恢复生产时;
- d) 出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时;
- e) 管理部门提出检验要求时。

8.4 判定规则

8.4.1 所验项目全部合格,判定为该批次产品合格。

8.4.2 检验结果中有任何指标不符合本文件规定时,可自同批产品中重新加倍取样进行复检。复检结

果即使有一项指标不符合本文件规定,则判定该批产品不合格。卫生指标中的微生物指标不得复检。

8.4.3 除微生物指标外,各项目指标的极限数值判定按 GB/T 8170 中全数值比较法执行。

9 标签、包装、运输、贮存、保质期

9.1 标签

标签应符合 GB 10648 的规定。

9.2 包装

包装材料应清洁卫生、并能防污染、防潮湿、防泄漏。

9.3 运输

运输工具应清洁卫生、能防暴晒、防雨淋,不应与有毒有害的物品混装混运。

9.4 贮存

应贮存于干燥、阴凉、通风处,防止日晒、雨淋,不应与有毒有害物质混贮。

9.5 保质期

未开启包装的产品,在规定的运输、贮存条件下,产品保质期与标签中标明的保质期一致。

附录 A

(规范性)

德式乳杆菌乳酸亚种菌种鉴别方法

A.1 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

A.1.1 MRS 培养基:酪蛋白胨 10.0 g、牛肉膏 10.0 g、酵母提取物 5.0 g、葡萄糖 5.0 g、乙酸钠 5.0 g、柠檬酸二胺 2.0 g、吐温 80 1.0 g、 K_2HPO_4 2.0 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 g、 $CaCO_3$ 20.0 g、琼脂粉 15.0 g、蒸馏水 1 000 mL,pH 调至 6.8(25 ℃),121 ℃ 高压灭菌 15 min。也可使用相同成分商品化培养基,按使用说明配制。

A.1.2 DNA 分子量标准物(DNA marker)。

A.1.3 革兰氏染色液。

A.1.4 细菌生理生化鉴定试剂。

A.1.5 细菌基因组提取试剂盒。

A.1.6 聚合酶链式反应试剂盒(PCR 试剂盒)。

A.1.7 琼脂糖。

A.2 仪器设备

A.2.1 PCR 仪。

A.2.2 电泳仪。

A.2.3 凝胶成像分析系统。

A.2.4 显微镜:×100 倍油镜。

A.2.5 离心机。

A.2.6 生化培养箱:36 ℃±1 ℃。

A.2.7 超微量分光光度计。

A.2.8 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。

A.3 试验步骤

A.3.1 菌种纯化

在同一稀释度内,挑取 5 个德式乳杆菌乳酸亚种典型菌落(B.3.2),分别划线转接至 MRS 琼脂培养基上,36 ℃±1 ℃ 厌氧培养 24 h~48 h。选取至少 1 个良好分离的特征菌落,转接保存,备用。

A.3.2 形态观察

A.3.2.1 菌落形态

观察典型菌落形态,呈乳白色到浅灰色,圆形、边缘整齐、表面光滑,直径 3.0 mm±1.0 mm。

A.3.2.2 菌体形态

挑选典型菌落(A.3.2.1),进行革兰氏染色,结果呈阳性,菌体细胞呈长杆状,趋向于成线状,幼龄时单个或成对。

A.3.3 生理生化确证

挑选典型菌落(A.3.2.1)进行生理生化试验,特征应符合表 A.1。

表 A.1 德式乳杆菌乳酸亚种碳水化合物发酵试验结果

试验项目	结果	试验项目	结果
七叶苷	+	水杨苷	+
纤维二糖	+	苦杏仁苷	+
乳糖	+	蔗糖	+
麦芽糖	+	棉子糖	+
注：“+”表示为 90% 以上的菌株为阳性反应。			

A.3.4 分子生物学鉴定

A.3.4.1 16S rRNA 测序

A.3.4.1.1 基因组 DNA 提取

用细菌基因组提取试剂盒提取德式乳杆菌乳酸亚种基因组 DNA,于-20℃条件下保存备用。

A.3.4.1.2 PCR 扩增

PCR 推荐扩增程序如下。

- a) 引物
见表 A.2。

表 A.2 引物序列

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

- b) PCR 反应体系
见表 A.3。

表 A.3 PCR 扩增反应体系

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/ μ L)	1.5 μ L	—	1.5 μ L
10×Buffer	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L
DNA 聚合酶	0.5 μ L	0.5 μ L	0.5 μ L
dNTP (10 mmol/L)	3.5 μ L	3.5 μ L	3.5 μ L
27F 引物(10 μ mol/L)	1 μ L	1 μ L	1 μ L
1492R 引物(10 μ mol/L)	1 μ L	1 μ L	1 μ L
无菌水	15 μ L	16.5 μ L	15 μ L
总体积	25 μ L	25 μ L	25 μ L

PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,35 个循环;72 °C 终延伸 10 min。

c) PCR 扩增产物电泳

用电泳缓冲液制备 1.0%琼脂糖凝胶,5 μL PCR 扩增产物点样,核酸染料染色,DNA marker 做参照,120 V 电泳 30 min。

d) PCR 扩增产物测序

根据 DNA Marker 条带的指示,待测样本和阳性对照样本的目的片段均应出现在 1 500 bp 左右,同时阴性对照应无条带。对符合要求的阳性 PCR 产物,进行 PCR 产物测序。

A.3.4.1.3 测序结果比对

序列结果与 GenBank 数据库基因序列进行比较,与德式乳杆菌乳酸亚种模式菌株 CGMCC 1.213 2^t 的基因一致性在 99%以上。

德式乳杆菌乳酸亚种菌 16S rRNA 基因序列长度约 1506 bp,模式菌株 CGMCC 1.2132t 参考序列:

```
GTTTGATCCTGGCTCAGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGC  
TGAATTCAAAGATTCCTTCGGGRTGATTTGTTGGACGCTAGCGGCGGATGGGTGAGTAAC  
ACGTGGGCAATCTGCCCTAAAGACTGGGATACCACTTGAAACAGGTGCTAATACCGGA  
TAACAACATGAATCGCATGATTCAAGTTTAAAGGCGGCGCAAGCTGTCACCTTTAGGATG  
AGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCAATGATGCGTAGC  
CGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTG  
AAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGCAGTAACTG  
GTCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG  
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGAA  
TGATAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAAGTGCATCGGAAACTGTCATT  
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATG  
GAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGC  
ATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGCGCTAGG  
TGTTGGGGACTTTCGGTCCCTCAGTGCCGAGCAAACGCATTAAGCGCTCCGCCTGGGGA  
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA  
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTGCGCTACAC  
CTAGAGATAGGTGGTTCCCTTCGGGGACGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGC  
TCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGCTTTAGTTGCC  
ATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  
ACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGGCAGTACA  
ACGAGAAGCGAACCCGCGAGGGTAAGCGGATCTCTTAAAGCTGCTCTCAGTTCCGACTGC  
AGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCG  
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAAGTCTGCAATGCC  
CAAAGTCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGTCAGCCGCTAAGGCAGGGCAGATGACTGGG  
GTAAGT
```

A.3.4.2 特征序列扩增

A.3.4.2.1 基因组 DNA 提取

用细菌基因组提取试剂盒提取德式乳杆菌乳酸亚种基因组 DNA。

A.3.4.2.2 PCR 扩增

PCR 推荐扩增程序如下。

- a) 特征引物
见表 A.4。

表 A.4 特征引物序列

靶基因名称	扩增引物序列
Ser/Thr protein kinase	Lactis-F:5'_TTGTGCAAGAGCCAGCTGAA-3'
	Lactis-R:5'_CCGCCATTACTGAAGTGGA-3'

- b) PCR 反应体系

PCR 扩增体系 (25 μL) 包括: 无菌水 15 μL , 10 \times Buffer 2.5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 3.5 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.0 μL , DNA 聚合酶 0.5 μL , DNA 模板 1.5 μL 。

PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。

- c) PCR 扩增产物电泳

用电泳缓冲液制备 1.0% 琼脂糖凝胶, 5 μL PCR 扩增产物点样, 核酸染料染色, DNA marker 做参照, 120 V 电泳 30 min。

- d) PCR 扩增产物测序

根据 DNA Marker 条带的指示, 将获得的 PCR 产物测序。

A.3.4.2.3 测序结果比对

序列结果与 GenBank 数据库基因序列进行比较, 与丝/苏氨酸蛋白激酶 (Ser/Thr protein kinase) 序列基因一致性在 99% 以上。参考序列为:

GCCGCCATTACTGAAGTGAGGGCCCTTGATCTGGTAAGCAGTTAATTTGCTGATCTC
TGCTCCTTTAACTTGAAAGTTATCTCTTACTAGTTCAGCTGGCTCTTGACAAA

附录 B

(规范性)

德式乳杆菌乳酸亚种活菌计数

B.1 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

B.1.1 水

GB/T 6682,三级。

B.1.2 培养基

见 A.1.1。

B.1.3 稀释液

称取 8.5 g 氯化钠、1.0 g 吐温 80 溶于 1 000 mL 水中,121 °C 灭菌 15 min 后备用。

B.2 仪器设备

B.2.1 天平:精度为 0.001 g 和 0.1 g。

B.2.2 生化培养箱:36 °C ± 1 °C。

B.2.3 恒温振荡器:精度 ± 1 °C。

B.2.4 涡旋混合器。

B.2.5 高压灭菌锅。

B.3 试验步骤

B.3.1 试样制备

称量 1.0 g 试样,精确至 0.001 g,置于 250 mL 无菌三角瓶(内含 20 颗~25 颗直径 1 mm~2 mm 玻璃珠),加入 99 mL 稀释液(B.1.3),恒温振荡器 200 r/min 振荡 30 min,制成 1 : 100 菌悬液。准确移取 1 : 100 菌悬液 1.0 mL,加入装有 9.0 mL 稀释液(B.1.3)的试管中,涡旋混匀,制成 1 : 1 000 稀释菌液。同法制成适宜稀释度的系列稀释菌液。

B.3.2 接种和培养

选择上述合适的 1 个~3 个稀释度的稀释菌液,准确移取 0.1 mL 稀释菌液,加至 MRS 培养基平板中,用无菌涂布棒均匀涂于表面。每个稀释度做两个平行。同时吸取 0.1 mL 稀释液(B.1.3)进行同样涂布,作为空白对照。从样品稀释后到平板涂布要在 15 min 内完成。将平板倒置,36 °C ± 1 °C 厌氧培养 24 h~48 h。

B.3.3 菌落计数

选取典型菌落在 30 CFU~300 CFU 之间的平皿,直接记录菌落总数。若菌落数均不在 30 CFU~300 CFU,调整稀释度后重新测定。

若菌落形态符合德式乳杆菌乳酸亚种典型特征且菌种来源清晰¹⁾,按 B.4.1 进行结果计算;若菌落

形态不符合德式乳杆菌乳酸亚种典型特征,按附录 A 进行鉴定。

B.4 试验数据处理

B.4.1 结果计算

B.4.1.1 若只有一个稀释级平皿上的菌落数在 30 CFU~300 CFU 内,计算两个平皿菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释因子,作为每克样品中德式乳杆菌乳酸亚种结果。

B.4.1.2 若有两个连续稀释级的平皿菌落数在 30 CFU~300 CFU 内,按式(B.1)计算。

$$N = \frac{C_1 + C_2}{(n_1 + 0.1n_2) \times d} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

N —— 试样中德式乳杆菌乳酸亚种活菌数,单位为菌落形成单位每克(CFU/g);

C_1 —— 第一稀释级(低稀释倍数)平皿菌落数之和;

C_2 —— 第二稀释级(高稀释倍数)平皿菌落数之和;

n_1 —— 第一稀释级(低稀释倍数)平皿个数;

n_2 —— 第二稀释级(高稀释倍数)平皿个数;

d —— 稀释度(第一稀释级)。

B.4.1.3 若所有稀释级平皿均无菌落生长,则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

B.4.2 结果表示

采用两位有效数字,在两位有效数字后面的数值,以四舍五入方法修约,以 10 的指数表示。

根据菌落计数结果出具报告,报告单位以 CFU/g 表示。

1) 如菌种来源证明。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国农业农村部.饲料原料目录.
 - [2] 中华人民共和国农业农村部.饲料添加剂品种目录.
-