



中华人民共和国国家标准

GB/T 20191—2025

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

2025-12-31 发布

2026-07-01 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) 更改了试样制备方法(见 7.1,2006 年版的 6.2.1)；
- c) 更改了嗜酸乳杆菌的培养条件及培养时间(见 7.3,2006 年版的 6.2.6)；
- d) 更改了试验数据处理方法(见第 8 章,2006 年版的第 8 章)；
- e) 更改了嗜酸乳杆菌培养基种类及制备方法(见 A.1,2006 年版的 A.1)；
- f) 增加了嗜酸乳杆菌分子生物学鉴定方法(见 B.2)。

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、湖北省兽药监察所、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、梁洛源、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*)的微生物学检验方法。
本文件适用于含有嗜酸乳杆菌的饲料中嗜酸乳杆菌活菌总数的计数及鉴定。

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 30989—2014 高通量基因测序技术规程
- GB/T 40664—2021 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求
- 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 6682,三级。
- 4.2 MRS 琼脂培养基:按附录 A 中 A.1 配制。
- 4.3 乳杆菌糖发酵管:按 A.2 配制。
- 4.4 七叶苷培养基:按 A.3 配制。
- 4.5 革兰氏染色液:按 A.4 配制。
- 4.6 生理盐水:按 A.5 配制。

5 设备和材料

- 5.1 培养箱:36℃±1℃。
- 5.2 天平:感量 0.1 g 和 0.01 g。
- 5.3 恒温振荡器。
- 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 250 mL、500 mL。

5.9 显微镜:1 000 倍。

5.10 菌株:嗜酸乳杆菌。

6 试样

按照 GB/T 42959 执行。

7 试验步骤

7.1 试样制备

以无菌操作称取饲料(饲料添加剂除外)试样 25 g 或以无菌吸管吸取 25 mL,置于装有 225 mL 灭菌生理盐水(4.6)的 500 mL 无菌三角瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中,制成 1:10 试样稀释匀液。在恒温振荡器 200 r/min 振荡 30 min。取 1 mL 1:10 或 1:100 试样稀释匀液注入含有 9 mL 灭菌生理盐水(4.6)的试管中,在旋涡混合器上混匀,此液为 1:100 或 1:1 000 的试样稀释匀液。同法制备 10 倍递增系列试样稀释匀液。每递增稀释一次,换用 1 支 1 mL 无菌吸管或吸头。

称量饲料添加剂 1 g 试样,置于装有 99 mL 灭菌生理盐水(4.6)的 250 mL 无菌三角瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中,制成 1:100 试样稀释匀液。

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

7.2 接种

选择 2 个~3 个适宜稀释级的试样稀释匀液,吸取 0.1 mL 该试样稀释匀液滴于预先灭菌并充分干燥的 MRS 琼脂培养基(4.2)平板上,使用无菌涂布棒快速地涂布均匀。每个稀释级涂布 2 个平板。同时吸取 0.1 mL 灭菌生理盐水(4.6)进行同样涂布,作为空白对照。从试样稀释后到平板涂布应在 15 min 内完成。

7.3 培养

涂布结束后水平放置 10 min,将平板倒置放入厌氧培养装置(5.6)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。

7.4 菌种鉴定

7.4.1 菌落形态观察

典型的嗜酸乳杆菌菌落微白色,圆形,凸起,表面湿润,边缘整齐。

7.4.2 菌种纯化

在同一稀释级内,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(4.2)平板,于 36 °C ± 1 °C、48 h ± 2 h 培养。从每一平板中选取至少 1 个良好分离的典型菌落,转接保存。

7.4.3 菌体镜检观察

挑取典型菌落进行革兰氏染色,在显微镜(5.9)下观察。嗜酸乳杆菌为革兰氏阳性、无芽孢杆菌。

7.4.4 生理生化试验

将挑选纯化的菌落进行生理生化试验,特征结果应符合附录 B 中表 B.1。

生理生化试验选用商品化生化鉴定试剂盒或微生物生化鉴定系统。

7.4.5 分子生物学鉴定

若形态学特征和生理生化试验不能确定为嗜酸乳杆菌,按 B.2 进行分子生物学鉴定。

7.5 菌落计数

选取典型菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间的平板,记录菌落总数。若选择的最高稀释级平板上的菌落数均大于 300 CFU,需选择更高稀释级重新测定;若选择的最高稀释级平板上的菌落数均小于 30 CFU,需选择更低稀释级重新测定。

8 试验数据处理

8.1 结果计算

8.1.1 若只有一个稀释级平板上的菌落数在 30 CFU~300 CFU 内,计算两个平板菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释因子,作为每克或每毫升试样中嗜酸乳杆菌活菌数结果。

8.1.2 若有两个连续稀释级的平板菌落数在 30 CFU~300 CFU 内,按公式(1)计算。

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

式中:

N —— 试样中嗜酸乳杆菌活菌数,单位为菌落形成单位每克(CFU/g)或菌落形成单位每毫升(CFU/mL);

C_1 —— 第一稀释级(低稀释倍数)平板证实为嗜酸乳杆菌的菌落数之和;

C_2 —— 第二稀释级(高稀释倍数)平板证实为嗜酸乳杆菌的菌落数之和;

n_1 —— 第一稀释级(低稀释倍数)平板个数;

n_2 —— 第二稀释级(高稀释倍数)平板个数;

d —— 稀释度(第一稀释级)。

8.1.3 若所有稀释级平板均无菌落生长,则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

8.2 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,报告单位以菌落形成单位每克(CFU/g)或菌落形成单位每毫升(CFU/mL)表示。

附 录 A
(规范性)
培养基及试剂

A.1 MRS 琼脂培养基

A.1.1 MRS 琼脂培养基组成成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	10.0 g
酵母浸粉	5.0 g
柠檬酸三铵	2.0 g
葡萄糖	20.0 g
吐温 80	1.0 mL
乙酸钠($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	5.0 g
磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 g
硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.05 g
琼脂	15 g

A.1.2 制法

将上述成分加入 1 000 mL 蒸馏水中,加热溶解,调整 pH 至 6.2 ± 0.2 ,分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 乳杆菌糖发酵管

A.2.1 成分

牛肉浸粉	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸粉	5.0 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	1 000 mL

A.2.2 制法

按 0.5% 加入所需糖类,并分装小试管,121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 七叶苷发酵管

A.3.1 成分

蛋白胨	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
七叶苷	3.0 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

A.3.2 制法

将上述成分加入蒸馏水中,加热溶解,121 °C高压灭菌 15 min。

A.4 革兰氏染色液

A.4.1 结晶紫染色液

A.4.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

A.4.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.4.2 革兰氏碘液

A.4.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.4.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.4.3 沙黄复染液

A.4.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

A.4.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.5 生理盐水

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,加热溶解,分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。



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 嗜酸乳杆菌的主要生化反应

菌种	七叶苷	纤维二糖	麦芽糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	棉籽糖	蔗糖
嗜酸乳杆菌	+	+	+	—	+	—	d	+
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 rRNA 基因鉴定****B.2.1.1 仪器**

B.2.1.1.1 PCR 仪：可设定反应程序。

B.2.1.1.2 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。

B.2.1.1.3 离心机：离心力大于 15 000g。

B.2.1.1.4 天平：感量 0.01 g。

B.2.1.1.5 微量移液器和灭菌吸头。

B.2.1.1.6 恒温水浴锅：PT-100 ℃±1 ℃，温度波动不大于 0.5 ℃。

B.2.1.1.7 涡旋振荡仪：可调速。

B.2.1.1.8 电泳仪及配套电泳槽、制胶设备。

B.2.1.1.9 超微量分光光度计。

B.2.1.1.10 紫外凝胶成像仪或蓝光切胶仪。

B.2.1.2 试剂

B.2.1.2.1 琼脂糖：纯度大于 99.5%。

B.2.1.2.2 商业化琼脂糖凝胶电泳缓冲液 TAE，按说明书使用。

B.2.1.2.3 商业化上样缓冲液。

B.2.1.2.4 核酸凝胶染色剂：溴化乙锭或吖啶橙。

B.2.1.2.5 分子质量标准物(2 kb)。

B.2.1.3 试验步骤**B.2.1.3.1 DNA 模板制备**

取纯化培养 24 h~48 h 后的平板，刮取 1 个~2 个接种环菌苔加入 200 μL 灭菌水，涡旋振荡充分混匀。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，

OD260/OD280 值为 1.7~2.0,放于-20 °C 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,序列和条件见表 B.2 和表 B.3。

反应体系采用商业化 PCR 预混液,操作时需遵循其配套说明书的要求;表中的阳性对照体系,使用的是嗜酸乳杆菌菌株的基因组 DNA。

表 B.2 引物序列

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



表 B.3 PCR 扩增反应体系

PCR 试剂	试验体系	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 mmol/L Mg ²⁺)	5.0 μL	5.0 μL	5.0 μL
Taq 酶(5 U/μL)	0.25 μL	0.25 μL	0.25 μL
dNTP(10 mmol/L)	2.0 μL	2.0 μL	2.0 μL
27F 引物(10 μmol/L)	1 μL	1 μL	1 μL
1492R 引物(10 μmol/L)	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

向离心管内依次加入各组分,涡旋振荡后瞬时离心,以收集管壁上的液滴至管底,在 PCR 扩增仪上进行 PCR 反应。PCR 扩增程序:95 °C 预变性 60 s;95 °C 变性 35 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,30 个循环;72 °C 终延伸 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 90 V~150 V 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胶板下观察,待测样本和阳性对照样本的目的片段均应出现在约 1 480 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 试验结果处理

拼接后的 16S rRNA 基因序列,应满足峰图清晰,无重叠峰区域碱基数应不低于 1 200 bp,与 DNA 序列数据库中收录的模式菌株 *Lactobacillus acidophilus* Scav 株 16S rRNA 序列(NR_113638.1) 进行比对,一致性(identity)值不小于 99%,确认为嗜酸乳杆菌;不大于 97%则排除该菌可能。若一致性值在 97%~99%之间,需要按 B.2.2 进一步鉴定。

B.2.2 基于二代高通量测序技术的全基因组 ANI 值方法鉴定

B.2.2.1 DNA 模板制备

按 B.2.1.3.1 进行制备。核酸质量应满足 GB/T 40664—2021 的 4.2 要求。

B.2.2.2 文库制备和测序

采用二代高通量测序仪,按照仪器配套要求进行相应的文库制备及测序。测序技术要求指标按 GB/T 30989—2014 的 6.1 执行。

B.2.2.3 ANI 值分析

对 B.2.2.2 获得的数据进行组装,得到基因组序列。计算该序列与嗜酸乳杆菌模式菌株 Scav 株 (genbank 登录号:GCA_001591845.1)基因组的平均核苷酸相似性(ANI)值,大于 95%判定为嗜酸乳杆菌;否则,判定为非嗜酸乳杆菌。
