

# DB21

辽宁省地方标准

DB 21/ XXXXX—XXXX

## 饲用微生物制剂中凝结芽孢杆菌的检测

Method for determination of *Bacillus coagulans* in feeds

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(送审稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

辽宁省市场监督管理局 发布

## 目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 培养基和材料.....	1
4 主要仪器设备和玻璃器皿.....	1
5 检验程序.....	2
6 采样.....	3
7 试样的制备.....	3
8 试验步骤.....	3
9 结果与报告.....	5
附录 A（规范性附录） 培养基和试剂.....	7

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则编写。

本标准由辽宁省农业农村厅提出并归口管理。

本标准起草单位：大连三仪动物药品有限公司、江苏三仪生物工程有限公司、大连工业大学、开原市检验检测认证服务中心。

本标准主要起草人：江国托、刘艳、单春乔、李娟、林洋、王效禹、刘秋晨、马大川、钱方、牟光庆、刘恩、翟宏旭、曹艳子、顾艳丽、张英雪、杨乔乔、李晶晶、陆继爽、刘星、冷寒冰、曾楠。

本标准发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862

标准起草单位通讯地址：辽宁省大连市甘井子区营城子镇营旭路9号，联系电话：0411-66886298

# 饲用微生物制剂中凝结芽孢杆菌的检测

## 1 范围

本标准规定了饲用微生物制剂中凝结芽孢杆菌的检测方法。

本标准适用于含有益微生物凝结芽孢杆菌的各种饲料添加剂中凝结芽孢杆菌的检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 6682-2008/ISO 3696: 1987, MOD)

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 14699.1 饲料采样 (GB/T 14699.1-2005/ISO 6497: 2002, IDT)

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备 (GB/T 20195-2006/ISO 6498: 1998, IDT)

## 3 培养基和材料

实验用水参照标准: 分析实验室用水规格和试验方法 (GB/T 6682-2008/ISO 3696: 1987, MOD)

3.1 0.85%灭菌生理盐水

3.2 自制改良营养琼脂培养基(NA): 参见附录 A 中的 A.1

3.3 革兰氏染色液: 参见附录 A 中的 A.2

3.4 细菌生化鉴定试剂盒

3.5 细菌基因组 DNA 提取试剂盒

3.6 标准菌株: 凝结芽孢杆菌 CICC21736

## 4 主要仪器设备和玻璃器皿

4.1 恒温培养箱:  $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

4.2 恒温水浴锅:  $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

4.3 普通冰箱

4.4 天平: 感量为 0.1 g、0.01 g、0.0001 g

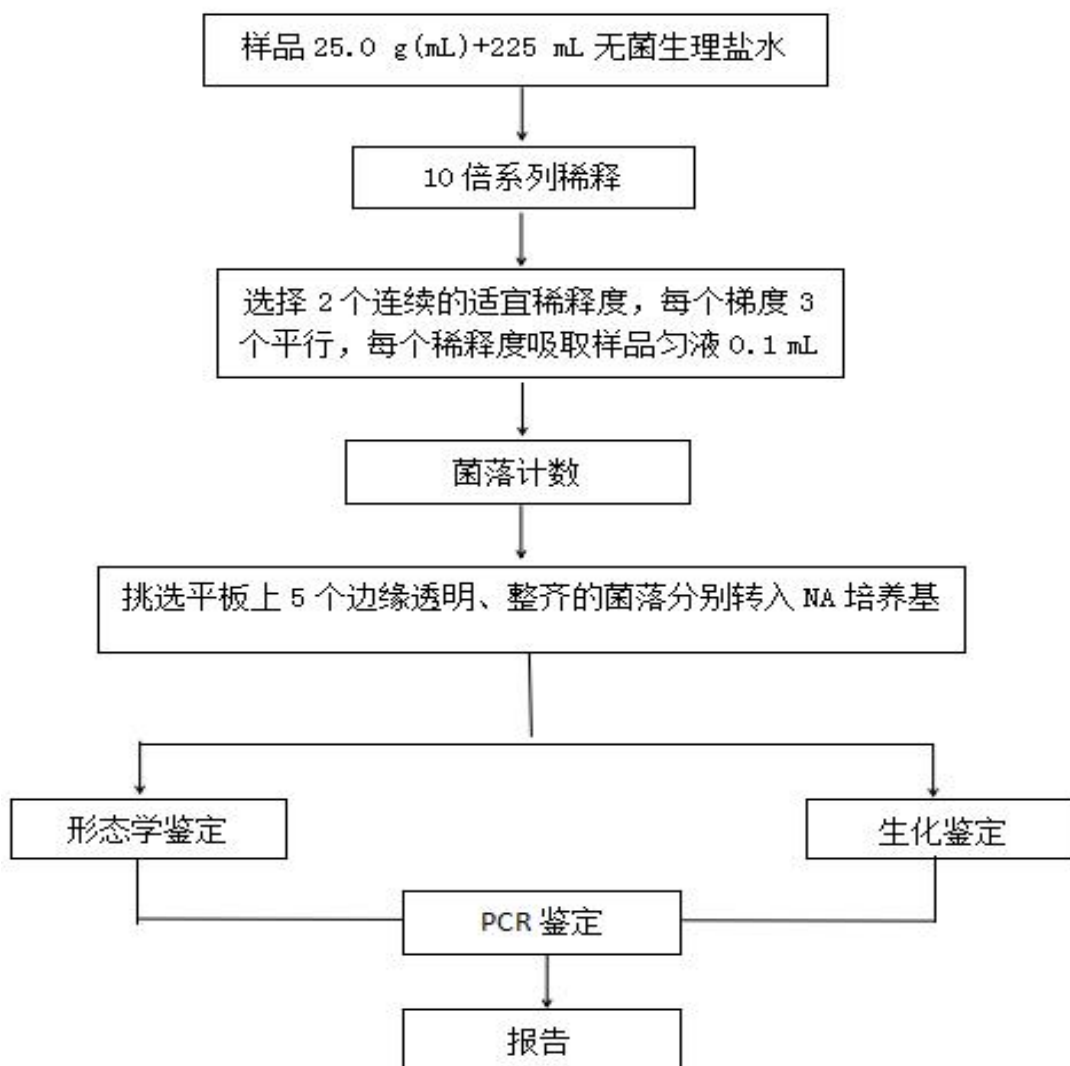
4.5 振荡器或漩涡混合器

4.6 显微镜: 1000 倍

- 4.7 pH计：精确度 0.1
- 4.8 无菌玻璃或塑料培养皿  $\Phi=90$  mm、无菌锥型瓶、无菌玻璃或塑料涂布棒
- 4.9 量筒：250 mL
- 4.10 PCR 仪
- 4.11 电泳仪
- 4.12 凝胶成像仪
- 4.13 移液器：量程 10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、1000  $\mu$ L、10000  $\mu$ L

## 5 检验程序

凝结芽孢杆菌检验程序见下图。



## 6 采样

采集样品真实，具有代表性。采样工具，如铲子、匙、采样器、试管、广口瓶、剪子等，应为无菌器皿。样品采集后置于4℃~8℃环境内保存，并应及时送到微生物检验室进行检测。采样数量和方式按GB/T14699.1执行。

## 7 试样的制备

按照GB/T 20195进行试样的制备，样品制备后应及时检验。

## 8 试验步骤

### 8.1 检样制备、初始悬液和10倍稀释

以无菌操作称取试样25.0 g(mL)，注入盛有225 mL 0.85%灭菌生理盐水的锥形瓶中。置振荡器上，设置参数37℃、185 r/min，振荡60 min，制成1:10的初始悬浮液，水浴80℃±1℃维持10 min。吸取1:10的初始悬浮液1 mL，加入9 mL 0.85%灭菌生理盐水，经充分混匀后制成1:100的稀释液。根据样品含菌量，按上述操作顺序做10倍递增稀释液。

### 8.2 接种和培养

选择2个适宜稀释度，每个梯度2个平行，用无菌移液器分别吸取0.1 mL稀释液，接种到自制改良营养琼脂培养基(NA)上。使用无菌的涂布棒快速、准确地涂布接种于培养基表面，涂布棒不应接触皿边缘。每个皿用一支无菌涂布棒。将涂布好的皿盖好，置室温中放置15 min，使菌液浸入培养基，倒置于50℃±1℃培养箱中培养24 h±1 h。

### 8.3 菌落计数

培养后，选取菌落数在30个~300个之间的平板计数。若平板中有较大片状菌落生长时，则不宜采用；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以2以代表全皿菌落数。典型的凝结芽孢杆菌菌落形状不规则，无隆起，呈灰白色，不透明。然后从中选出5个特征菌落进行确证试验。

### 8.4 确证试验

#### 8.4.1 概述

目前商品化的生化鉴定试剂盒或生化鉴定管，如果采用的培养基与本标准确证试验所用的培养基一致，可以按照商品说明书使用这些试剂盒或生化鉴定管以进行该项确证试验。目前商品化的细菌基因组DNA提取试剂盒，如果符合本标准确证试验的要求，可以按照商品说明书使用这些细菌基因组DNA提取试剂盒或常用方法以进行该项确证试验。

#### 8.4.2 菌种制备

自凝结芽孢杆菌菌落计数平板上挑取不透明，灰白色单菌落，划线转接培养于自制改良营养琼脂培养基(NA)(A.1)上，50℃±1℃培养24 h±1 h。从每一平板中选取至少1个良好分离的特征菌落，转接保存，进行确证试验。

### 8.4.3 形态观察

将挑选纯化的菌落做革兰氏染色(A.2)镜检。凝结芽孢杆菌细胞应为蓝紫色，杆状，有芽孢时，芽孢端生椭圆形，芽孢囊不明显膨大。

### 8.4.4 生理生化确证试验

将挑选纯化的单一菌落，用生化鉴定试剂盒或者生化鉴定管或者微生物鉴定仪按说明进行鉴定试验。

### 8.4.5 生理生化确证结果

凝结芽孢杆菌的主要生化特性见表1。

表1 凝结芽孢杆菌与其他类似芽孢杆菌的鉴别特征

项目		凝结芽孢杆菌 <i>B. coagulans</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>	侧孢短芽孢杆菌 <i>B. laterosporus</i>	短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>
厌氧生长		+	-	+	+	-
硝酸盐还原		d	+	+	+	-
淀粉水解		+	+	+	-	-
明胶液化		-	+	+	+	+
利用	丙酸盐	-	-	+		-
	柠檬酸盐	d	+	+	-	+
产酸	D-木糖	d	+	+	-	+
	L-阿拉伯糖	d	+	+	-	+
	D-甘露醇	d	+	+	+	+
7%氯化钠生长		-	+	+		+

注：+：阳性；-：阴性；d：部分菌株为阳性。

### 8.4.6 PCR 确证试验

#### 8.4.6.1 DNA 提取

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒或常用提取方法（参见附表 A.3）提取试样 DNA，并设置阴性、阳性对照。

#### 8.4.6.2 扩增引物序列

上游引物：F 5' -ACGGCATTGGCAAGTATCA-3' ；

下游引物：R 5' -GACATGATTTGGTTTCCA-3' 。

PCR 反应体系如表 2 所示。

预计扩增产物大小为 555 bp。

#### 8.4.6.3 PCR 反应

反应体系见表2。

表 2 表 2PCR 反应体系

试剂	使用量 (μL)
2×Es Taq MasterMix	5
上游引物 (20 μM)	0.5
下游引物 (20 μM)	0.5
模板 (20 ng/μL~100 ng/μL)	1
dd H <sub>2</sub> O	3
总体积	10

程序设定如下：①预变性：95℃ 5 min；②变性：95℃ 30 s；③退火：60℃ 30 s；④延伸：72℃ 30 s；⑤终延伸：72℃:10 min；⑥保温：4℃ 30 min。步骤②至④的循环数设为 25。

#### 8.4.6.4 电泳

用电泳缓冲液(1×TAE)制备 1.0%琼脂糖凝胶，加入 Gelred 染料。取 5 μL PCR 扩增产物，进行点样。用 DNA 分子量标记物做参照。3V/cm~5V/cm 恒压电泳，电泳 30 min，电泳检测结果用凝胶成像仪记录并保存。

#### 8.4.6.5 确证结果

当阳性对照孔出现 555 bp 扩增带，阴性对照孔未出现目的条带时，试验结果成立。

被检样品出现555 bp扩增带，凝结芽孢杆菌阳性；未出现相应扩增带的样品判为阴性。

## 9 结果与报告

### 9.1 计算每块平板上凝结芽孢杆菌菌落数

计数每块平板上的凝结芽孢杆菌菌落数  $a$ ，使用式(1)计算：

$$a = \frac{b}{A} \times C \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$a$ ——计数每块平板上的凝结芽孢杆菌的菌落数；

$b$ ——挑取后经证实为凝结芽孢杆菌的菌落数；

$A$ ——挑取平板上用于验证的菌落数；

$C$ ——平板上所有特征菌落数。

最终结果按照 GB/T 8170 数值修约规则修约至整数。

示例：

若某板上长有 78 个典型菌落，从中选出做确证实验的 5 个菌落中有 4 个证实为凝结芽孢杆菌，则：



按照 GB/T 8170 数值修约规则得  $a$  为 62。

## 9.2 样品中凝结芽孢杆菌数的计算方法与报告

选择两个连续稀释度平板(每个稀释度至少有一块平板,其上经确证后的凝结芽孢杆菌菌数介于 30 个~300 个之间),通过式(2)计算,即为 1 mL 或 1 g 样品中含有凝结芽孢杆菌的菌数  $N$ :

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + n_2)d} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$N$ ——样品中凝结芽孢杆菌菌数;

$\sum a$ ——所有平板经确证后的凝结芽孢杆菌菌数的总和;

$V$ ——平板的接种体积,单位为毫升(mL);

$n_1$ ——第一个稀释度的平板数;

$n_2$ ——第二个稀释度的平板数;

$d$ ——第一个稀释度的稀释因子(未经稀释的液体样品的  $d$  值为 1)。

按照 GB/T8170 数值修约规则将计算出的结果保留至两位有效数字,也可将样品的凝结芽孢杆菌菌落数记录为 1.0~9.9 乘以 10 的指数幂表示。

报告每 mL 或每 g 样品的凝结芽孢杆菌估计数,单位 CFU/g (mL)。

### 示例 1:

若第一个稀释度 ( $10^{-4}$ ) 经确证后的菌落数为 170、166 和 238,第二个稀释度 ( $10^{-5}$ ) 经确证后的菌落数为 50、75 和 80,则:

$$N = \frac{170 + 166 + 238 + 50 + 75 + 80}{0.1 \times (3 + 0.1 \times 3) \times 10^{-4}} = \frac{780}{0.000033} = 23\ 636\ 364$$

按照 GB/T8170 数值修约规则得出每 mL 或每 g 样品中含凝结芽孢杆菌估计数为 24 000 000 CFU/g (mL) 或  $2.4 \times 10^7$  CFU/g (mL)。

### 示例 2:

若只有最后一个稀释液 ( $10^{-5}$ ) 经证实含凝结芽孢杆菌菌落数为 150、160 和 180,则:

$$N = \frac{150 + 160 + 180}{0.1 \times 3 \times 10^{-5}} = \frac{490}{0.000003} = 163\ 333\ 333$$

按照 GB/T8170 数值修约规则得出每 mL 或每 g 样品中含凝结芽孢杆菌估计数为 160 000 000 CFU/g (mL) 或  $1.6 \times 10^8$  CFU/g (mL)。

附 录 A  
(规范性附录)  
培养基和试剂

A.1 自制改良营养琼脂培养基(NA)

A.1.1 成分

$K_2HPO_4$	1 g
乙酸钠	2.5 g
$MgSO_4$	0.1 g
$MnSO_4$	0.025 g
半胱氨酸	0.25 g
大豆蛋白胨	5 g
酵母粉	2 g
葡萄糖	5 g
溴甲酚紫	0.032 g
琼脂粉	20 g
蒸馏水	1000 mL

A.1.2 制法

溶解各成分于水中，必要时加热。调整pH值，使培养基pH值在室温时为5.5，121℃灭菌20 min。

A.2 革兰氏染色

A.2.1 结晶紫染色液

A.2.1.1 成分

结晶紫	1 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

A.2.1.2 制法

将结晶紫溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.2.2 革兰氏碘液

#### A. 2. 2. 1 成分

碘	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

#### A. 2. 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. 2. 3 沙黄复染液

##### A. 2. 3. 1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

##### A. 2. 3. 2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

#### A. 2. 4 染色法

将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染色1 min，水洗；滴加革兰氏碘液，媒染1 min，水洗；滴加95%乙醇脱色，约30 s，水洗；滴加沙黄复染液，复染1 min，水洗，待干，镜检。

### A. 3 细菌DNA提取步骤

#### A. 3. 1 细菌培养

细菌接种于5 mL 液体培养基中，37℃摇床（300 rpm/min）培养过夜。

#### A. 3. 2 细菌收集

取1 mL 培养物于1.5 mL 无菌EP管中，室温8000 rpm/min离心5 min，弃上清，沉淀重新悬浮于1 mL TE (pH8.0) 中或用ddH<sub>2</sub>O。

#### A. 3. 3 菌体裂解

加入6 μL 50mg/mL 的溶菌酶，37℃作用2h。再加2 mol/L NaCl 50 μL，10%SDS 110 μL，20 mg/mL 的蛋白酶K 3 μL，50℃作用3 h或37℃过夜（此时菌液应为透明粘稠液体）。

#### A. 3. 4 抽提

菌液均分到两个1.5 mL 无菌EP管，加等体积的酚：氯仿：异戊醇(25：24：1)，混匀，室温放置5~10 min，12000 rpm/min离心10 min，抽提两次（上清很粘稠，吸取时应小心）。

#### A. 3. 5 沉淀

加0.6倍体积的异丙醇，混匀，室温放置10 min，12000 rpm/min离心10 min。

A.3.6 洗涤

沉淀用 75%的乙醇洗涤。

A.3.7 稀释

抽（凉）干后，溶于 50  $\mu$  LddH<sub>2</sub>O 中，取适量作为 PCR 模板。

---