



中华人民共和国国家标准

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

2006-05-17 发布

2006-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本方法主要参考 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制定的。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：国家饲料质量监督检验中心（北京）。

本标准主要起草人：饶正华、李丽蓓、杨曙明、苏晓鸥。

饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验

1 范围

本标准规定了饲料中嗜酸乳杆菌数的测定及鉴定方法。

本标准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。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 14699.1 饲料 采样

3 设备和材料

- 3.1 恒温培养箱: $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.2 冰箱: $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.3 恒温水浴: $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 3.4 电炉:可调式。
- 3.5 吸管:容量为 1 mL、10 mL、25 mL。
- 3.6 广口瓶或三角瓶:容量为 500 mL。
- 3.7 平皿:直径为 9 cm。
- 3.8 试管:18 mm×180 mm。
- 3.9 显微镜:400 倍。
- 3.10 高压灭菌锅:使用温度为 121°C 。
- 3.11 烘箱:使用温度为 160°C 。

4 培养基和试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂、蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

- 4.1 改良 MC 培养基(modified chalmers 培养基)(见第 A.1 章)。
- 4.2 氯化钠。
- 4.3 革兰氏染色液(见第 A.6 章)。
- 4.4 3%过氧化氢溶液。
- 4.5 靛基质试剂(见第 A.4 章)。
- 4.6 硝酸盐培养基、硝酸盐试剂。
- 4.7 明胶培养基(见第 A.5 章)。
- 4.8 乳酸杆菌糖发酵管(见第 A.2 章)。
- 4.9 七叶苷培养基(见第 A.3 章)。

5 采样与试样制备

- 5.1 采样工具,如探子、铲子、匙、采样器、试管、广口瓶、剪子等,应是灭菌的。
- 5.2 样品包装为袋、瓶或罐装者,取完整未开封的。样品是固体粉末,应边取边混合;样品是流体,通过

振摇即可混匀。样品送到微生物检验室应越快越好，一般应不超过 3 h。如果路途遥远，可将试样于 0℃~5℃ 中保存(如冰壶)。

5.3 采样数量和方式按 GB/T 14699.1 执行。

6 嗜酸乳杆菌数的测定

6.1 检验程序

嗜酸乳杆菌数检验程序如图 1：

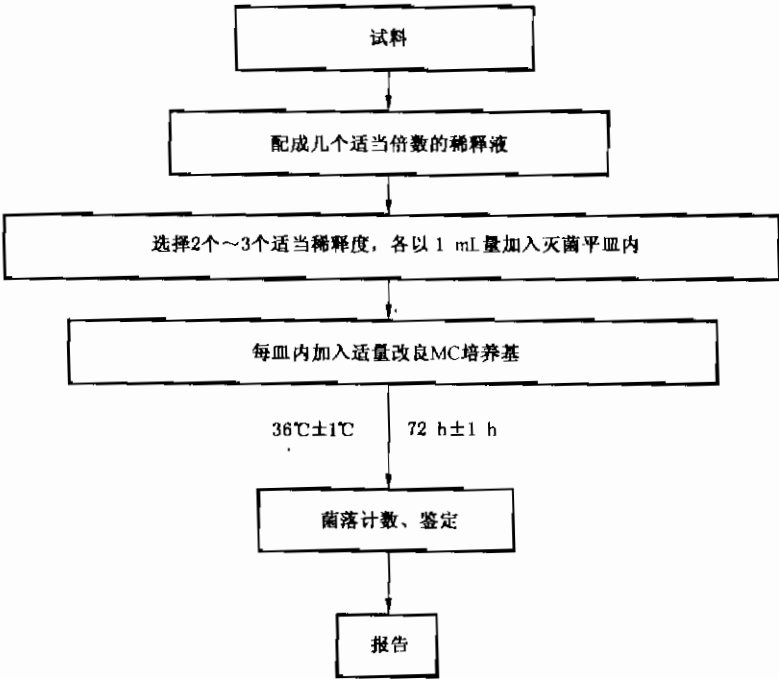


图 1 嗜酸乳杆菌数检验程序

6.2 操作步骤

6.2.1 以无菌操作将经过充分摇匀的试料 25 g(或 25 mL)放入含有 225 mL 灭菌生理盐水(见第 A.7 章)的灭菌广口瓶内配成 1 : 10 的均匀稀释液。

6.2.2 用 1 mL 灭菌吸管吸取 1 : 10 稀释液 1 mL,沿管壁徐徐注入含有 9 mL 灭菌生理盐水(见第 A.7 章)的试管内(注意吸管尖端不要触及管内稀释液)。

6.2.3 另取 1 mL 灭菌吸管,按上述操作顺序,作 10 倍递增稀释液,如此每递增一次,即换用 1 支 1 mL 灭菌吸管。

6.2.4 选择 2 个~3 个以上适宜稀释度,分别在作 10 倍递增稀释的同时,即以吸取该稀释度的吸管移 1 mL 稀释液于灭菌平皿(3.7)内,每个稀释度作两个平皿。

6.2.5 稀释液移入平皿后,应即时将冷至 50℃ 的改良 MC 培养基(4.1)注入平皿约 15 mL,并转动平皿使混合均匀。同时将计数培养基倾入加有 1 mL 稀释液试料用的灭菌生理盐水的灭菌平皿内作空白对照,以上整个操作自培养物加入培养皿开始至接种结束须在 20 min 内完成。

6.2.6 待培养基凝固后,翻转平板,置 36℃±1℃ 恒温培养箱(3.1)内培养 72 h±1 h 取出,观察菌落特征,选取菌落数在 30~300 之间的平板进行计数。

6.3 菌落特征

嗜酸乳杆菌在改良 MC 培养基(4.1)上菌落生长形态特征见表 1。

表 1 嗜酸乳杆菌在改良 MC 培养基上的菌落特征

菌种类型	菌落特征
杆菌	平皿底为粉红色,菌落较小,圆形,红色,边缘似星状,直径 2 mm±1 mm,可有淡淡的晕

7 嗜酸乳杆菌的鉴定

7.1 菌种制备:自平板上挑取单菌落,接种于改良 MC 培养基(4.1)斜面,于 36℃±1℃,24 h~48 h 培养,刮取菌苔,分别进行下列试验。

7.2 进行革兰氏染色,显微镜(3.9)检查,并做过氧化氢酶试验。嗜酸乳杆菌应为革兰氏阳性,无芽孢,过氧化氢酶阴性的杆菌。进一步鉴定需做硝酸盐还原、明胶液化、产碱基质、产硫化氢和碳水化合物发酵试验。嗜酸乳杆菌极少见还原硝酸盐,不液化明胶,不产生碱基质和硫化氢。

7.3 嗜酸乳杆菌的碳水化合物发酵试验结果及其与干酪乳杆菌和植物乳杆菌的区别,见表 2。

表 2 饲料中常用乳杆菌的碳水化合物发酵试验结果

菌种名称	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	+
干酪乳杆菌	+	+	d	+	+	+	-	d
植物乳杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+
注 1: +——阳性; -——阴性; d——有些菌株阳性,有些菌株阴性。 注 2: 本表中列出干酪乳杆菌与植物乳杆菌的碳水化合物发酵是为了与饲料中允许使用的其他乳杆菌相区别。 嗜酸乳杆菌与二者碳水化合物发酵试验的主要区别在于甘露醇和山梨醇试验。								

8 结果计算及表述

菌落计数后,随机挑取 5 个菌落进行鉴定(见第 7 章),根据证实为嗜酸乳杆菌菌落数计算出该皿内的此菌数,然后乘其稀释倍数即得每毫升样品中此菌数,按式(1)计算:

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

式中:

A——测定的嗜酸乳杆菌菌落数,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);

B——嗜酸乳杆菌的可疑菌落总数;

C——5 个鉴定的菌落中确认为嗜酸乳杆菌的菌落数;

f——稀释倍数。

例如含有嗜酸乳杆菌的试料中 10⁻⁶ 稀释液在改良 MC 培养基平板上,生成的嗜酸乳杆菌可疑菌落为 100 个,取 5 个鉴定,证实为嗜酸乳杆菌的是 4 个,则由 1 g 试料中含嗜酸乳杆菌菌数为:100× $\frac{4}{5}$ ×10⁶=8.0×10⁷。

附录 A
(规范性附录)
培养基及染色液

A.1 改良 MC 培养基**A.1.1 成分**

大豆蛋白胨	5 g	牛肉浸膏	5 g
酵母浸膏	5 g	葡萄糖	20 g
乳糖	20 g	碳酸钙	10 g
琼脂	15 g	1%中性红溶液	5 mL
水加至 1 000 mL			
硫酸粘杆菌素 B(酌情加)	10 万国际单位		

A.1.2 制法

将除了中性红溶液和硫酸粘杆菌素 B 以外的其他 7 种成分加入蒸馏水中,加热溶解,校正 pH6.0,加入中性红溶液。分装烧瓶,高压灭菌 121℃ 15 min~20 min。临用时加热熔化培养基,冷至 50℃,酌情加或不加硫酸粘杆菌素 B(样品中怀疑有杂菌污染时,可加硫酸粘杆菌素 B,混匀后使用)。

A.2 乳酸杆菌糖发酵管**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	1 000 mL		

A.2.2 制法

按 0.5%加入所需糖类,并分装小试管。

A.3 七叶苷培养基

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

A.4 靛基质反应培养基及试剂**A.4.1 蛋白胨水****A.4.1.1 成分**

胰蛋白胨	10 g	氯化钠	5 g
DL-色氨酸	1 g	蒸馏水	1 000 mL

A.4.1.2 制法

将上述各成分溶解于 100℃水中,过滤,校正 pH7.5,分装于小试管中,每支 5 mL,121℃高压灭菌 15 min。

A.4.2 柯凡克试剂**A.4.2.1 成分**

对二甲氨基苯甲醛	5 g	盐酸	25 mL
戊醇	75 mL		

A.4.2.2 制法

将对二甲氨基苯甲醛溶于戊醇中,然后缓缓加入浓盐酸。

A.5 明胶培养基

A.5.1 基础成分(pH7.0)

蛋白胨	1 g	酵母提取物	1.0 g
葡萄糖	0.1 g	盐溶液	4.0 mL
蒸馏水	100 mL		

A.5.2 盐溶液成分

无水 CaCl_2	0.2 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.48 g
K_2HPO_4	1.0 g	KH_2PO_4	1.0 g
NaHCO_3	10.0 g	NaCl	2.0 g

将 CaCl_2 与 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 混合溶解于 300 mL 蒸馏水中,再加 500 mL 水,一边搅拌一边缓慢加入其他盐类。继续搅拌直到全部溶解,加 200 mL 蒸馏水,混合后 4℃ 储藏备用。

A.5.3 制法

将拟分装的试管内加入明胶(0.6 g/管),再将上述配制煮沸后的培养基分装其中(5 mL/管)。113℃~115℃ 高压灭菌 15 min~20 min。

A.6 革兰氏染色液

A.6.1 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.6.2 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 80 mL 蒸馏水混匀即可。

A.6.3 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。

A.7 生理盐水

将蒸馏水加入 8.5 g 的氯化钠中做成 1 000 mL 的溶液。

在 121℃ 下灭菌 15 min。