

T/SHAAV

团体标准

T/SHAAV 006—2021

微生物饲料添加剂中粪肠球菌的测定

Determination of Enterococcus Faecalis in microbial feed additives

2021-04-08 发布

2021-04-08 实施

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。

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。

本文件由上海市畜牧兽医学学会提出并归口。

本文件起草单位：上海市动物疫病预防控制中心、上海市金山区动物疫病预防控制中心、上海市松江区食用农产品安全监督检测中心。

本文件主要起草人：姜芹、张文刚、孙冰清、顾欣、黄士新、商军、曹莹、张好、卢春光、金一春、李守富、潘旭东、曹向英、许柯。

本文件首批承诺执行单位名单：上海市动物疫病预防控制中心、上海市金山区动物疫病预防控制中心、上海市松江区食用农产品安全监督检测中心、上海国龙生物科技有限公司、上海欧耐施生物技术有
限公司。

微生物饲料添加剂中粪肠球菌的测定

1 范围

本文件规定了微生物饲料添加剂中粪肠球菌的菌种鉴定和活菌计数方法。
本文件适用于含有粪肠球菌的单一或复合型饲料添加剂中粪肠球菌的测定。

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 19489 实验室生物安全通用要求
GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微生物饲料添加剂 microbial feed additives

允许在饲料中添加或直接饲喂给动物的，具有促进动物健康、或促进动物生长、或提高饲料转化率等功能的微生物制剂。

4 试剂或材料

4.1 要求

除另有规定外，所有试剂仅为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的三级水，试剂或培养基按附录配制或用商品化产品。

4.2 试剂

- 4.2.1 灭菌生理盐水：称取 8.5 g 氯化钠，加入适量水溶解后，定容至 1000 mL，在 121℃ 灭菌 15 min。
- 4.2.2 革兰氏染色液：按照附录 A 的 A.1 执行。
- 4.2.3 细菌生化鉴定试剂盒。
- 4.2.4 2×Premix Type：含 Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、dNTPs、Mg²⁺等（适用于 TaqmanqPCR 方法）。
- 4.2.5 引物和探针：上游引物：5'-CCAGCATTTGGTGCCATAATT-3'；下游引物：5'-AGATATCCGTACTGCCGTTCT-3'；探针：5'-FAM-TTTGCGTGACCGCCACCATTGT-BHQ1-3'。

4.3 培养基

- 4.3.1 胆汁七叶苷叠氮钠琼脂培养基：按照附录 A 的 A.2 执行。
- 4.3.2 胰酪大豆琼脂培养基（TSA）：按照附录 A 的 A.3 执行。

4.4 标准菌株

粪肠球菌：ATCC 29212或BNCC 186300。

4.5 材料

T/SHAAV 006—2021

- 4.5.1 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 4.5.2 接种环：1 μ L。
- 4.5.3 无菌离心管：1.5 mL，15 mL。
- 4.5.4 无菌锥形瓶：500 mL，或无菌均质袋。

5 仪器设备

- 5.1 恒温培养箱：36 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C。
- 5.2 冰箱：-20 $^{\circ}$ C，0 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ C。
- 5.3 离心机： \geq 12 000 r/min。
- 5.4 天平：感量 0.01 g。
- 5.5 微量移液器：10 μ L，100 μ L，1 000 μ L。
- 5.6 移液器：10 mL。
- 5.7 显微镜：40 倍~1 000 倍，精度 0.05 μ m。
- 5.8 pH 计或精密 pH 试纸：测量范围 pH 0~14，精度 0.1 pH 单位。
- 5.9 二级生物安全柜或超净工作台。
- 5.10 恒温水浴锅。
- 5.11 振荡器。
- 5.12 微生物生化鉴定仪。
- 5.13 实时荧光定量 PCR 仪。

6 试样制备

试样制备按照 GB/T 20195 执行，样品制备后应尽快检测。

7 测定流程

微生物饲料添加剂中粪肠球菌的测定流程见图1。

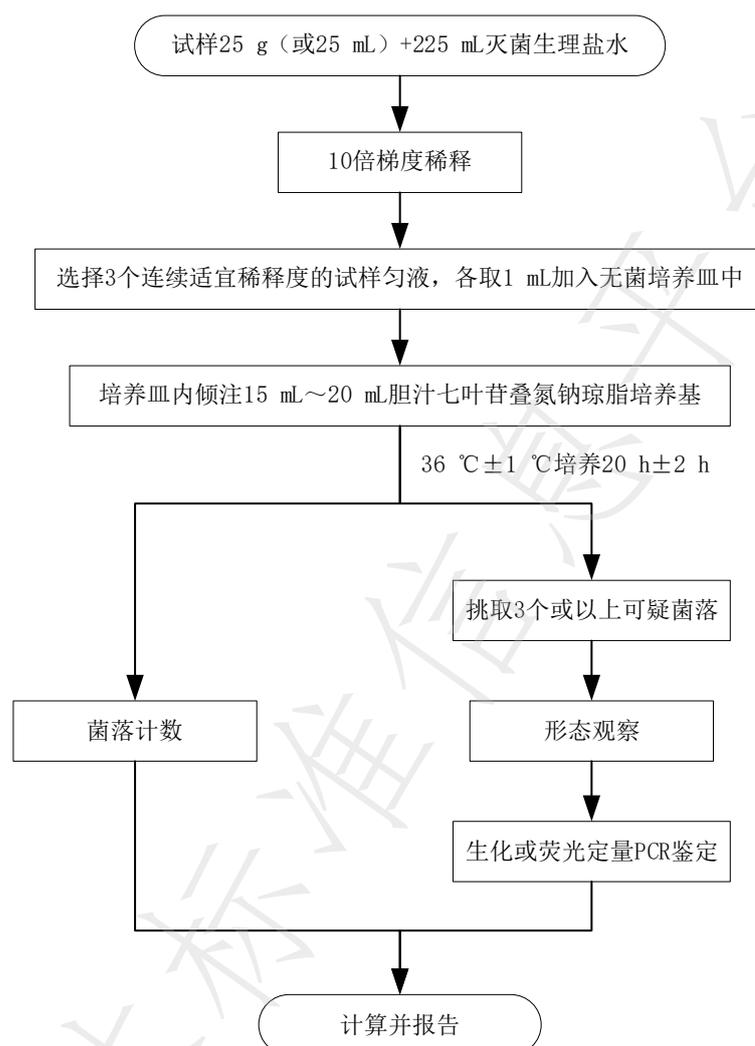


图1 微生物饲料添加剂中粪肠球菌测定流程图

8 活菌计数

8.1 试样稀释

以无菌操作称取充分混匀的试样25 g (或25 mL)，加入225 mL灭菌生理盐水中，制成1:10的稀释液。置振荡器中，振荡2 min~3 min，至均匀。取1 mL 1:10的试样匀液，加入9 mL灭菌生理盐水中，制成1:100的试样匀液。根据样品标示含菌量进行系列10倍梯度稀释。

8.2 接种培养

根据待检样品标示含菌量对试样实际含菌量进行估计，选择3个连续的适宜稀释度的试样匀液。分别取1 mL加入无菌培养皿中，加入15 mL~20 mL冷却至46 °C ± 1 °C的胆汁七叶苷叠氮钠琼脂培养基，每个稀释度做2个重复。同时以1 mL灭菌生理盐水作空白对照。小心转动充分混匀，待培养基凝固后，36 °C ± 1 °C倒置培养20 h ± 2 h。

示例：

当样品标示含菌量 $\geq 10^8$ CFU/g，选择 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 3个稀释度进行接种培养。

8.3 菌落计数

8.3.1 选取特征菌落数在30 CFU~300 CFU之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于30 CFU的平板记录具体菌落数，大于300 CFU的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

8.3.2 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；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，代表一个平板菌落数。

8.3.3 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条链作为一个菌落计数。

9 鉴定

9.1 菌落挑选和纯培养

随机挑选胆汁七叶苷叠氮钠琼脂平板上3个或以上呈灰褐色至黑色、圆形、凸起、表面光滑、边缘整齐、直径约为1 mm的菌落分别划线接种于TSA平板上，36 ℃±1 ℃倒置培养24 h±2 h，刮取菌苔进行形态观察和菌株鉴定。

9.2 形态观察

革兰氏染色，镜检。粪肠球菌为革兰氏染色阳性球菌，呈圆形或椭圆形，直径0.5 μm~1.0 μm，单个，多成双或短链状排列，无芽孢。

9.3 菌株鉴定

9.3.1 方法选择

9.3.2与9.3.3任选其一。

9.3.2 生化鉴定

使用细菌生化鉴定试剂盒进行生化鉴定，或可采用微生物生化鉴定仪进行生化鉴定。同时设阴性对照（空白）和阳性对照（ATCC 29212或BNCC 186300）。粪肠球菌可发酵葡萄糖、半乳糖、麦芽糖；不发酵赤藓糖醇、L-阿拉伯糖；产精氨酸双水解酶；不产过氧化氢酶、β-半乳糖苷酶。粪肠球菌典型生化鉴定特征见表1。

表1 粪肠球菌典型生化鉴定特征

项目	结果
葡萄糖	+
半乳糖	+
麦芽糖	+
赤藓糖醇	—
L-阿拉伯糖	—
精氨酸双水解酶	+
过氧化氢酶	—
β-半乳糖苷酶（ONPG）	—
注1：“+”为阳性反应，“—”为阴性反应。	
注2：尿肠球菌的L-阿拉伯糖和ONPG反应结果为阳性。	

9.3.3 荧光定量 PCR 鉴定

9.3.3.1 DNA 模板制备

取9.1中菌苔适量，加入含200 μL双蒸水的离心管中，混合均匀。95 ℃加热10 min，冻融一次，12 000 r/min离心2 min，取上清为模板。同时设阴性对照（双蒸水）和阳性对照（ATCC 29212或BNCC 186300）。

9.3.3.2 荧光定量 PCR 扩增

荧光定量PCR扩增体系如下：

——反应体系：2×Premix Type 10 μL、DNA 模板 2 μL、上、下游引物及探针各 1 μL（10 μmol/L）、双蒸水 5 μL，共 20 μL；

——反应条件：95 °C 预变性 30 s；95 °C 变性 10 s，62 °C 延伸 20 s，40 个循环。荧光定量 PCR 反应条件随仪器和 Premix Type 不同而略有改变。

9.3.3.3 结果判断

阴性对照无Ct值且无扩增曲线，阳性对照Ct值<35且扩增曲线典型，试验结果成立。样品Ct值<35且扩增曲线典型，判断为阳性；Ct值≥35或无Ct值，判断为阴性。

10 结果计算

10.1 每块平板上粪肠球菌菌落数的计算

计算每块平板上的粪肠球菌菌落数，按公式（1）计算：

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

式中：

a ——每块平板上的粪肠球菌菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；

b ——挑取后经证实为粪肠球菌菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；

A ——挑取平板上用于验证的菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；

C ——平板上的所有典型菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）。

计算出的结果修约至整数。

示例：

若某平板上长有78 CFU典型菌落，从中选出的5 CFU中有4 CFU证实为粪肠球菌，则：

$$a = \frac{4}{5} \times 78 = 62.4$$

测定结果修约至整数，则得 a 为62 CFU。

10.2 菌落总数的计算

10.2.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间时，粪肠球菌菌落总数按公式（2）计算：

$$N_1 = \frac{a_1 + a_2}{2 \times d_1} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

N_1 ——样品中粪肠球菌菌落总数，单位为菌落形成单位每克（CFU/g）或每毫升（CFU/mL）；

a_1 ——第一块平板经确证后的粪肠球菌菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；

a_2 ——第二块平板经确证后的粪肠球菌菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；

d_1 ——稀释度的稀释因子（未经稀释的液体试样的 d 值为 1）。

计算出的结果保留至两位有效数字，具体按11.2.3的规定执行。

10.2.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间时，粪肠球菌菌落总数按公式（2）计算：

$$N_2 = \frac{\sum a}{(n_1 + 0.1n_2) \times d_2} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

N_2 ——样品中粪肠球菌菌落总数，单位为菌落形成单位每克（CFU/g）或每毫升（CFU/mL）；

$\sum a$ ——所有平板经确证后的粪肠球菌菌落数的总和，单位为菌落形成单位（CFU）；

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_2 ——第一个稀释度的稀释因子（未经稀释的液体试样的 d_2 值为1）。

计算出的结果保留至两位有效数字，具体按11.2.3的规定执行。

11 报告

11.1 结果判定

若试样中菌落符合9.2的形态描述，且符合9.3.1的生化鉴定特征或9.3.2.2的荧光定量PCR鉴定结果阳性，可判定为粪肠球菌。

11.2 结果报告

11.2.1 所有稀释度（包括液体试样原液）平板均无粪肠球菌菌落，则以小于1乘以最低稀释倍数报告；

11.2.2 菌落总数小于100 CFU时，以整数报告；

11.2.3 菌落总数大于等于100 CFU时，对3位数字进行修约后，取前2位数字，后面用0代替位数；也可用10的指数形式来表示，采用两位有效数字。

示例1：

若只有一个稀释度（ 10^{-4} ）经证实含粪肠球菌菌落数分别为120和130，则：

$$N_1 = \frac{120+130}{2 \times 10^{-4}} = 1\ 250\ 000$$

计算结果经修约，报告每克或每毫升样品中粪肠球菌总数为1 200 000 CFU/g（mL）或 1.2×10^6 CFU/g（mL）。

示例2：

若第一个稀释度（ 10^{-3} ）经确证后的菌落数分别为168和215，第二个稀释度（ 10^{-4} ）经确证后的菌落数分别为34和55，则：

$$N_2 = \frac{168+215+34+55}{(2+0.1 \times 2) \times 10^{-3}} = 214\ 545$$

计算结果经修约，报告每克或每毫升样品中粪肠球菌总数为210 000 CFU/g（mL）或 2.1×10^5 CFU/g（mL）。

12 生物安全

实验室设施设备、人员防护及实验的安全操作、实验废弃物和菌株的处理应符合GB 19489的要求。

附录 A
(规范性)
试剂和培养基

A.1 革兰氏染色**A.1.1 结晶紫染色液****A.1.1.1 成分**

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

A.1.1.2 制法

将结晶紫完全溶于95%乙醇中，然后加入1%草酸铵溶液，混匀。

A.1.2 革兰氏碘液**A.1.2.1 成分**

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
水	300 mL

A.1.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合，加入少许水充分振摇，待完全溶解后，再加入水至300 mL，混匀。

A.1.3 沙黄染色液**A.1.3.1 成分**

沙皇	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
水	90.0 mL

A.1.3.2 制法

将沙皇溶解于95%乙醇中，然后加入水稀释，混匀。

A.1.4 染色方法

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15 s~30 s，直至染色液洗净，不可过分脱色，水洗；滴加沙皇染色液，复染1 min，水洗；待干、镜检。

A.2 胆汁七叶苷叠氮钠琼脂培养基**A.2.1 成分**

胰蛋白胨	17.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
酵母浸粉	5.0 g
牛胆粉	10.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸钠	1.0 g
七叶苷	1.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
叠氮化钠	0.25 g

T/SHAAV 006—2021

琼脂	13.5 g
水	1 000 mL

A. 2. 2 制法

除琼脂外，取上述成分混匀，微温溶解，调节pH使灭菌后在25 ℃的pH值为 7.1 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化，在121 ℃灭菌15 min。

A. 3 胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA）

A. 3. 1 成分

酪蛋白胨	15.0 g
大豆胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

A. 3. 2 制法

除琼脂外，取上述成分混匀，微温溶解，调节pH使灭菌后在25 ℃的pH值为 7.3 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化，在121 ℃灭菌15 min。
