

马肠道乳酸菌的筛选及鉴定技术规程

Code of practice for screening and identification of lactic acid
bacteria in equine gut

2025-04-30 发布

2025-05-30 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。

本文件由内蒙古自治区畜牧业标准化技术委员会（SAM/TC 19）归口。

本文件起草单位：内蒙古农牧业科学院、内蒙古草原御驴科技牧业有限公司、内蒙古农业大学、杭锦旗农牧技术推广中心、内蒙古医科大学、内蒙古自治区农牧业技术推广中心、内蒙古自治区农畜产品质量安全中心、乌拉特中旗畜牧和水产服务中心。

本文件主要起草人：苏少锋、吴海青、赵一萍、耿傲盼、李建、张心壮、薄素玲、黄瑶、乔健敏、高天、白晋宇、张勇伟、陈越、孙培陪、史艳英、罗杰、余彪、聂丽珍、王宇胜、乌仁塔娜、贾军、海旭冉、刘永、武玉平、郝治华、徐超、郝海忠、周佩诺、王春浩、马晓彤、赵娜。

马肠道乳酸菌的筛选及鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了马肠道乳酸菌的筛选及鉴定的材料和技术要求。
本文件适用于马肠道乳酸菌的筛选及鉴定。

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 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定
- GB 4789.28-2024 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求
- GB 4789.35-2023 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验
- GB 7300.502-2023 饲料添加剂 第5部分：微生物 植物乳杆菌
- GB/T 38483 微生物源抗生素类次生代谢产物抗细菌活性测定 抑菌圈法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 材料与设备

4.1 材料

4.1.1 试验菌株

从马肠道的内容物与黏膜中分离的乳酸菌。

4.1.2 指示菌株

伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium* CMCC (B) 50071）、大肠埃希氏菌（*Escherichia coli* ATCC 25922）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus* CMCC (B) 26003）。

4.2 仪器设备

实验中用到的仪器设备按照附录A中A.1执行。

4.3 试剂与耗材

4.3.1 试剂

实验中用到的试剂按照附录A中A.2执行。

试剂质量和培养基制备质量标准按照GB 4789.28执行。

4.3.2 耗材

实验中用到的耗材按照附录A中A.3执行。

4.4 溶液配制

按照附录A中A.4执行。

5 乳酸菌的筛选

5.1 乳酸菌的分离、纯化

5.1.1 取样部位

马盲肠、结肠或直肠。

5.1.2 分离方法

5.1.2.1 样品制备按照 GB 4789.35-2023 中 6.1.4 部分执行。

5.1.2.2 稀释按照 GB 4789.35-2023 中 6.2.1 和 6.2.2 部分执行。

5.1.2.3 分别吸取 $200\ \mu\text{L} 10^{-5}\ \text{g/mL} \sim 10^{-7}\ \text{g/mL}$ 稀释液，涂布在 MRS 琼脂培养基（含有溴甲酚紫）上， $37\ ^\circ\text{C}$ 厌氧培养 24 h~36 h，挑取产酸变黄的单菌落进行纯化。

5.1.3 纯化

按照GB 4789.35-2023中8.1.1部分执行。

5.2 复筛

5.2.1 石蕊牛奶显色

使用96孔板，吸取麦氏浊度为0.5的菌悬液 $20\ \mu\text{L}$ 于 $200\ \mu\text{L}$ 石蕊牛奶培养基中， $37\ ^\circ\text{C}$ 厌氧培养24 h，挑选使培养基呈粉色凝乳状态的菌株。

5.2.2 工作菌液的制备

吸取麦氏浊度为0.5的菌悬液，以1 : 10 (v : v) 加入MRS肉汤培养基中，制备成工作菌液。

5.2.3 产酸性能

吸取工作菌液， $37\ ^\circ\text{C}$ 厌氧培养，测定0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、16 h、24 h和36 h的pH值，选择 $\text{pH} \leq 4.5$ 的菌株。

5.2.4 生长曲线

吸取工作菌液， $37\ ^\circ\text{C}$ 厌氧培养，在0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、16 h、24 h和38 h使用酶标仪测定OD600值，绘制生长曲线。

5.2.5 耐酸性及耐胆盐

5.2.5.1 耐酸性：调节工作菌液 pH=2.0、pH=3.0、pH=4.0，37℃厌氧培养，在0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、16 h、24 h、32 h、48 h，使用酶标仪测定 OD600 值。

5.2.5.2 耐胆盐：调节工作菌液胆盐浓度为 0.2 g/L、0.3 g/L、0.4 g/L，37℃厌氧培养，在0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、16 h、24 h、32 h、48 h，使用酶标仪测定 OD600 值。

5.2.6 模拟人工消化液测试

吸取麦氏浊度为0.5的菌悬液，以1:10 (v:v) 分别加入到无菌人工胃液和肠液中，37℃、150 rpm 厌氧培养2 h。平板计数，按照GB 4789.2执行。

5.2.7 耐热试验

吸取麦氏浊度为0.5的菌悬液，分别置于37℃、42℃、50℃、55℃、60℃、65℃水浴锅中加热10 min。平板计数，按照GB 4789.2执行。

综合以上数据，挑选综合性能最好的菌株进行下一步实验。

5.3 安全性评价

5.3.1 溶血性

将麦氏浊度为0.5的菌悬液均匀地点种或划线接种到哥伦比亚血平板表面，37℃厌氧培养24 h，观察是否有溶血现象。溶血试验结果为阴性的，可通过；否则，应放弃使用。

5.3.2 抗生素敏感性

将麦氏浊度为0.5的菌悬液均匀涂布于MRS琼脂培养基上，采用纸片扩散法，将抗生素药片（按照附录A中A.2执行）放置于MRS琼脂培养基上，37℃厌氧培养24 h，观察并测量抗菌圈直径大小。

6 乳酸菌的鉴定

6.1 形态学鉴定

使用革兰氏染色方法，按照GB 4789.35-2023中附录A中A.7部分执行，在显微镜下观察菌株形态并进行描述分析。镜下菌体形态多样，呈球状或杆状，无芽孢，革兰氏染色阳性。

6.2 生化鉴定

使用乳酸菌成套生化鉴定管，结合《伯杰细菌鉴定手册》（第九版）判定乳酸菌种属。鉴定管成分按照附录A中A.2执行。

6.3 分子生物学鉴定

按照GB 7300.502-2023中附录A中A.3部分执行。

6.4 抑菌性能

按照GB/T 38483执行。

指示菌株标准株：伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* CMCC (B) 50071)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CMCC (B) 26003)。

6.5 抗氧化性

6.5.1 细胞外发酵上清液（EFS）：菌株生长到对数生长期（OD₆₀₀ 约为 1.0），4000 rpm、4 ℃离心 10 min，收集上清液。

6.5.2 完整细胞（IC）：菌体用 1×PBS 溶液（pH=7.4）洗涤，重悬于等体积的 1×PBS 溶液中。

6.5.3 细胞内提取物（ICE）：菌体用 1×PBS 溶液洗涤，送入低温超声波破坏（400 W，工作时间 5 s，间隔 5 s，80 次）、8000 rpm 离心 20 min，收集上清液。

6.5.4 以上得到的溶液用于 DPPH 自由基清除能力测试。

7 乳酸菌的保藏

可选择使用冻干保藏，超低温（不高于-70 ℃）冷冻保藏或其他有效的保藏方法。

附 录 A
(规范性)

所需仪器、试剂和耗材及培养基配置方法

A.1 所需仪器如下：

- a) 超净工作台；
- b) 天平：感量为 0.001 g；
- c) 振荡器；
- d) 移液器：量程 0 μL~100 μL、0 μL ~200 μL、0 μL ~1000 μL；
- e) 厌氧培养装置；
- f) 恒温装置：37 ℃±2 ℃；
- g) 恒温水浴锅：37 ℃~65 ℃；
- h) 酶标仪；
- i) 细菌麦氏浊度仪；
- j) pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸；
- k) 正置显微镜：最大放大倍数 1000 倍；
- l) 高速离心机:温度≤4 ℃，转速≥8000 rpm；
- m) PCR 仪；
- n) 电泳系统:包括电泳仪、电泳槽、制备凝胶模具套装、凝胶成像系统；
- o) 超声波细胞破碎仪。

A.2 所用试剂及规格见表 A.1。

表A.1 菌株筛选和鉴定所需试剂及规格

试剂	规格及要求
DPPH自由基清除试剂盒	按说明书使用
成套抗生素纸片	头孢呋辛、头孢他定、新霉素、万古霉素、四环素、头孢曲松、青霉素、苯唑西林、丁胺卡那、羧苄西林、氨苄西林、多糖霉素、哌拉西林、红霉素、麦迪霉素、头孢氨苄、诺沙星氟、环丙沙星、复方新诺明、头孢唑林、头孢氨苄、头孢哌酮、卡那霉素、诺氟沙星、多西环素、米诺环素、庆大霉素、克林霉素、呋喃唑酮、氨基霉素共30种抗生素药片
乳酸菌成套生化鉴定管	七叶苷、纤维二糖、麦芽糖、甘露醇、水杨苷、山梨醇、蔗糖、棉子糖、菊糖、乳糖、1%马尿酸钠

A.3 所用耗材及规格见表 A.2。

表A.2 菌株筛选和鉴定所需耗材及规格

试剂	规格及要求
微孔板	48孔或96孔
滤膜	0.22 μm
牛津杯	不锈钢
移液器吸头	10 μL 200 μL 1000 μL
离心管	200 μL 2 mL 50 mL
无菌培养皿	90 mm

A.4 所用试剂配置方法见表 A.3。除另有规定外，试剂均为分析纯或生化试剂，试验用水为灭菌的双蒸水或蒸馏水。

表A.3 培养基配制方法

培养基名称	成分	制备
MRS肉汤培养基	按照 GB 7300.502-2023 中附录 A 中 A.1.1 部分执行	按照 GB 7300.502-2023 中附录 A 中 A.1.1 部分执行
MRS琼脂培养基	按照GB 4789.28-2024中附录E中E.2 部分执行	按照GB 4789.28-2024中附录E中E.2 部分执行
血琼脂平板	酪蛋白胰酶消化物，心胰酶消化物，玉米淀粉，琼脂，肉胃酶消化物，酵母浸出粉，氯化钠，羊血或马血	酪蛋白胰酶消化物10.0 g、心胰酶消化物3.0 g、玉米淀粉1.0 g、琼脂14.0 g、肉胃酶消化物5.0 g、酵母浸出粉5.0 g、氯化钠5.0 g、加蒸馏水至930 mL，121 ℃高压灭菌15 min，冷却后加入脱纤羊血或马血70 mL混匀倒板
1 × PBS缓冲液	磷酸二氢钾，磷酸氢二钠，氯化钠，氯化钾	磷酸二氢钾0.27 g, 磷酸氢二钠1.42 g, 氯化钠8 g, 氯化钾0.2 g, 加入约800 mL去离子水充分搅拌溶解，滴加浓盐酸将pH调节至7.4，最后定容到1 L，121 ℃高压灭菌15 min，稀释10倍备用
溴甲酚紫显色MRS培养基	溴甲酚紫，MRS琼脂培养基	100 mL MRS琼脂培养基加上0.31 mL溴甲酚紫溶液，高压灭菌锅灭菌121 ℃、10 min
石蕊牛奶培养基	石蕊、MRS肉汤培养基	1.67 g/L石蕊，100.00 g/L脱脂奶粉，调整pH至6.0
人工胃液	NaCl，胃蛋白酶，HCl	0.20% NaCl，0.30%胃蛋白酶，1 M HCl 调pH至3.0，过滤除菌，4 ℃保存
人工肠液	胰蛋白酶，胆盐，NaOH	0.10%胰蛋白酶，调节pH至8；1.80%胆盐，调节pH至8.0，过滤除菌备用。将胰腺液和胆液以2:1混合即为人工肠液