《饲料添加剂 植物乳杆菌》

标准编制说明

（送审稿）

目 录

[一、标准制定背景及任务来源](#_Toc32413_WPSOffice_Level1) [3](#_Toc32413_WPSOffice_Level1)

[二、主要工作过程](#_Toc15490_WPSOffice_Level1) [4](#_Toc15490_WPSOffice_Level1)

[三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据](#_Toc3764_WPSOffice_Level1) [6](#_Toc3764_WPSOffice_Level1)

[四、采用国际标准](#_Toc20270_WPSOffice_Level1) [28](#_Toc20270_WPSOffice_Level1)

[五、与现行法律法规和强制性标准的关系](#_Toc28417_WPSOffice_Level1) [28](#_Toc28417_WPSOffice_Level1)

[六、重大分歧意见的处理经过和依据](#_Toc6254_WPSOffice_Level1) [28](#_Toc6254_WPSOffice_Level1)

[七、标准作为强制性或推荐性标准的意见](#_Toc15208_WPSOffice_Level1) [29](#_Toc15208_WPSOffice_Level1)

[八、贯彻标准的要求和措施建议](#_Toc1773_WPSOffice_Level1) [29](#_Toc1773_WPSOffice_Level1)

[九、废止现行有关标准的建议](#_Toc4209_WPSOffice_Level1) [29](#_Toc4209_WPSOffice_Level1)

[十、其他应予说明的事项](#_Toc21334_WPSOffice_Level1) [29](#_Toc21334_WPSOffice_Level1)

[附 件](#_Toc16710_WPSOffice_Level1) [30](#_Toc16710_WPSOffice_Level1)

[附件1 植物乳杆菌--分子生物学方法计数活菌 结果报告](#_Toc5324_WPSOffice_Level1) [31](#_Toc5324_WPSOffice_Level1)

[附件2 其它乳酸菌计数方法的结果报告](#_Toc16043_WPSOffice_Level1) [42](#_Toc16043_WPSOffice_Level1)

[附件3 企业标准清单](#_Toc7782_WPSOffice_Level1) [54](#_Toc7782_WPSOffice_Level1)

[附件4 预审稿，预审会的审查意见、专家意见处理汇总表和专家签字单](#_Toc18206_WPSOffice_Level1) [60](#_Toc18206_WPSOffice_Level1)

[附件5 上次终审稿，审查意见、专家意见处理汇总表和专家签字单](#_Toc5480_WPSOffice_Level1) [80](#_Toc5480_WPSOffice_Level1)

[附件6 网上公开征求意见处理汇总表](#_Toc12456_WPSOffice_Level1) [96](#_Toc12456_WPSOffice_Level1)

[附件7 借鉴的国内其他标准](#_Toc28226_WPSOffice_Level1) [97](#_Toc28226_WPSOffice_Level1)

**一、标准制定背景及任务来源**

**1. 任务来源**

本标准由中华人民共和国农业农村部提出并归口；项目编号：20110867-Q-469，由国家粮食和物资储备局科学研究院、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所承担该项目的制定工作。

**2. 制定背景**

随着人们生活质量的提高以及全球经济一体化，动物性食品安全已成为一个世界性的挑战和全球重要的公共卫生问题。其中，抗生素残留问题是影响动物性食品安全的重要因素之一。基于对抗生素危害性的认识，“安全、绿色、环保”的新型饲用抗生素替代产品已成为饲料行业的重点发展方向。微生物饲料添加剂由于不仅具有与抗生素饲料添加剂相似的有益作用，而且还具有无毒、无副作用、无残留、无抗药性，同时也不污染环境等优点，已逐步发展成为最具有应用前景的抗生素替代产品。

植物乳杆菌，作为较早被人们利用和进入工业化的乳酸菌菌种之一，是我国允许作为饲料添加剂使用的微生物菌种之一。其自身的优良性能在饲料添加剂中得以体现：大量的动物实验表明，植物乳杆菌具有良好的生物安全性，同时具有促进动物生长、调整肠道菌群结构、抑制有害病原菌生长、减少疾病发生、降低仔猪腹泻率等优良特性。因此，植物乳杆菌饲料添加剂的使用能够部分或全部替代饲用抗生素，以期得到更加安全与优质的动物产品。但植物乳杆菌类产品也存在一些问题，如菌株的纯化与传代、安全性评价、存储过程中抗逆性差、货架期短、检测方法不统一，导致产品稳定性和益生特性差异大。我国目前没有相应的产品标准。当前国内市场比较混乱，例如，从我们在标准研制3年中的采样结果来看，作为主要品质检测指标的有效活菌数，超过50%的样品与产品标识不符。因此，制定饲料添加剂植物乳杆菌标准对促进微生物饲料添加剂产业的可持续健康发展，加强微生物类产品有效管理，以及对今后产品的规范化生产非常必要，对提高动物食品安全水平具有特别重要的意义。

1. **主要工作过程**

本标准立足于本行业发展现状，同时关注行业发展趋势。首先在对我国历年微生物类国标、行标、地方标准及企标汇总分析的基础上，又参考了ISO、欧盟、台湾等的有关产品和检测标准，以使制订的标准能与最先进标准接轨。另外，本项标准制订单位分别对内蒙古、山东、上海、河南、河北等代表性厂家生产的植物乳杆菌代表性产品进行采样，并对主要指标进行检测及分析，同时我们也统计了相关质量分析数据，从有关文献及部分饲料厂汇集了一批近年的植物乳杆菌产品卫生指标及动物应用效果分析结果，以使我们制订的标准具有实用性。在此基础上形成了《饲料添加剂 植物乳杆菌》国家标准征求意见稿。

标准研制过程所处阶段和进度如下：

表1 标准研制工作-进度表

|  |  |
| --- | --- |
| 时间区段 | 工作内容 |
| 2011.7.20 | 成立工作小组，进行具体分工。 |
| 2011.8.1-2012.1.30 | 收集、查阅国内外相关资料、标准信息。 |
| 2012.2.1-2012.8.30 | 走访企业、消费者、相关专家学者，初步确定重点指标和研究思路，并重点确定标准采用的新方法及涉及新仪器，组织实验。 |
| 2012.8.22 | 第一次专家论证会 |
| 2011.8.1-2013.3.30 | 采样阶段，采国内外的乳酸菌产品，并抽取国内有代表性的生产企业的样品。 |
| 2012.2.1-2014.5.30 | 试验论证和验证阶段。 |
| 2013.5.4-2013.8.30 | 结合试验验证、数据分析和专家意见，逐步确定标准重点考量指标。 |
| 2012.11.5-2014.4.30 | 广泛征求科研、生产、经营、质检及消费者的意见。 |
| 2014.6.15-2014.7.15 | 修改标准文本草稿，形成征求意见稿。新方法尝试。 |
| 2014.8.14-2015.4.23 | 再次国外内资料收集，企业电话访问。形成4次修改稿。 |
| 2015.5.1-2015.11.30 | 形成征求意见稿。第二次专家论证会。 |
| 2015.12.1-2017.5.30 | 征求意见，完善标准内容等。 |
| 2017.11.30 | 召开标准预审会。 |
| 2018.4.27 | 第一次终审，共邀请14位专家对送审稿进行了审查，提出13项修改意见，意见主要是关于补充实验数据等问题，标准起草人采纳全部意见，并据此对送审稿进行修改，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处后再次审查。 |
| 2018.4.27-2019.4.12 | 根据专家意见补充试验数据，完善标准内容。 |
| 2018.9.5 | 召开专家论证会。补充安全性及保质期相关材料 |
| 2018.4.28-2019.3.26 | 根据专家意见补充试验数据，完善标准内容。 |

1. **标准编制原则和主要技术内容确定的依据**

**1. 标准编制原则**

本标准是按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构与编写规则》、GB/T 20001.10-2015《标准编写规则第 10 部分：产品标准》的规定进行的编制。

**2. 主要技术内容确定的依据**

本标准在编制过程中主要参考相关标准：《微生物饲料添加剂技术通则》（NY/T 1444-2007）、《Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods》（ISO 16140）、《食品微生物指标制定和应用的原则》（GB/T 23784-2009）、《食品微生物学检验 乳酸菌检验》（GB 4789.35-2010）、《饲料添加剂 嗜酸乳杆菌》（报批稿）等标准中就有关术语和定义、技术要求、试验方法和检验原则等相一致的原则和方法，并参考生产企业的企业标准等相关资料制定了本标准。

**（1）饲料添加剂 植物乳杆菌-采样和检测依据**

根据农业部批准的获得（植物乳杆菌）饲料添加剂生产许可证的企业名单和市场直接购买方式、进行采样，共68个样品（包括同一公司不同品牌产品），如表2。其中，9个样品生产企业已停止生产或暂时不生产该类产品，8个样品生产企业联系不到。采集样品经登记、编号、取/留样、盲样跟踪等步骤后、进行初步筛选，筛选原则为：①信息有追溯性；②样品标签上明确标识“植物乳杆菌”并在实物中确实含有植物乳杆菌；③活菌数量 ≥ 产品标识活菌数；④市场上有售，并具一定代表性。经过样品的初步检验，筛选出部分样品为跟踪检测和评价的样品。同时，我们统计了企业标准信息公共服务平台上的绝大部分植物乳杆菌产品基本信息作为参考（详见附件3）。

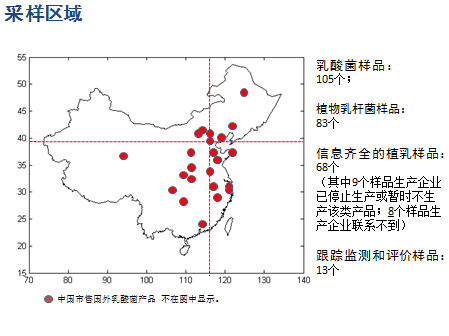


图1 植物乳杆菌采样区域

**（2）饲料添加剂 植物乳杆菌-范围、术语和定义的编制依据**

① 基于饲料添加剂类产品的要求及微生物和植物乳杆菌的特性，本标准规定了饲料添加剂植物乳杆菌的术语和定义、技术要求、样品、试验方法、检验规则、标签、包装、运输、储存、保质期的要求。

② 综合考虑工艺特点、载体和稀释剂安全性等，本标准适用于经过发酵工艺仅含植物乳杆菌的饲料添加剂产品。另一方面，个别企业虽然有液态产品的标准，但并没有产品，我们并未收集到单纯植物乳杆菌的液态产品；再加上液态样品不便于运输和保存，因此，本标准只适用于固态饲料添加剂植物乳杆菌。

③ 主要参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》（R.E.布坎南，N.E.吉本斯等）、《常见细菌系统鉴定手册》（东秀珠、蔡妙英等）相关植物乳杆菌的鉴定部分。

**（3）饲料添加剂 植物乳杆菌-活菌数的编制依据**

主要参考《食品微生物学检验 乳酸菌检验》（GB4789.35）对植物乳杆菌产品活菌数进行检测。由21个样品的产品标识活菌数和实际初次检验活菌数（表2）可知，全部样品的标识浓度均 ≥ 1×108 CFU/g，且仅有2个样品（占比9.5%）的初检活菌数低于1×108 CFU/g。从收集到的13个企业标准（附件1）来看，除1家未对产品活菌数未做要求外，所有企业均要求产品活菌数 ≥ 1×108 CFU/g。其余有6家（占比46%）要求产品活菌数 ≥ 1×108 CFU/g，有4家（占比31%）企业标准要求活菌数 ≥ 1×109 CFU/g，另外各有1家（8%）分别要求活菌数≥ 1×1010 CFU/g和≥ 1×1011 CFU/g。所以，考虑到行业平均加工水平和市场实际情况，我们认为将植物乳杆菌活菌数规定为 ≥ 1.0×108 CFU/g是合适的。因此，将植物乳杆菌活菌数指标设置为 ≥ 1.0×108CFU/g。

表2 饲料添加剂 植物乳杆菌产品的标识活菌数和初检活菌数（CFU/g）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 编号 | 产品标识活菌数 | 初检活菌数\* |
| 5 | ≥ 1×109 | 1.0×108 |
| 11 | ≥ 1.51×1013 | 1.0×1010 |
| 16 | ≥ 2.0×108 | 1.0×106 |
| 17 | 2.0×1010 | 2.3×1010 |
| 19 | 2.0×1010 | 5.9×109 |
| 20 | 1.0×1010 | 1.1×1010 |
| 22 | 1.0×109 | 3.0×109 |
| 26 | 1.0×109 | 2.62×109 |
| 29 | 2.0×1010 | ≥ 2.0×1010 |
| 32 | ≥ 1.5×109 | ≥ 5.0×109 |
| 33 | ≥ 1.0×109 | 2.5×109 |
| 34 | ≥ 1.0×1011 | 2.3×1010 |
| 35 | 1.0×1011 | 1.5×109 |
| 36 | 3.0×1011 | ≥ 3.0×1011 |
| 37 | 1.0×1011 | ≥ 1.0×1011 |
| 38 | 4.0×1011 | ≥ 4.0×1011 |
| 39 | 1.0×1011 | ≥ 1.0×1011 |
| 40 | 1.0×1010 | 5.0×109 |
| 41 | 2.0×1010 | ≥ 2.0×1010 |
| 42 | 1.0×108 | 8.0×107 |
| 43 | 1.0×1011 | ≥ 1.0×1011 |

注：\*初检活菌数为采样后3天内检测的结果。

**（4）饲料添加剂 植物乳杆菌-水分和粒度的编制依据**

《微生物饲料添加剂技术通则》（NY/T 1444-2007）中未对水分和粒度允许量做要求。我们根据《饲料中水分和其他挥发性物质含量的测定》（GB/T 6435-2006）、《饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法》（GB/T 5917.1-2008）对14个样品中的水分和粒度（见表3）进行了测定。结果表明：所收集的完整包装的固态样品的水分含量在4.0%-7.6%区间内。同时，参考附件1企业标准，在13个企业标准中，除2家企业对水分没有要求外，其余有5家企业要求水分 ≤ 12%，4家企业要求水分 ≤ 10%；综合考虑产品实测水分值和企业标准要求值，我们认为，水分含量指标设置为 ≤ 10%是合适的。

另外，在13个企业标准中，5家企业对粒度没有要求；1家企业（占比8%）要求2.5 mm（8目）筛通过率100%，2家企业（占比15%）要求1.25 mm（16目）筛通过率100%，3家企业（占比23%）要求0.9 mm（20目）筛通过率100%。综合考虑产品实测粒度值和企业标准要求值，我们认为，粒度要求设置为2.0 mm标准筛通过率 ≥ 95%（仅适用于粉状产品）的要求是合适的。

表3 饲料添加剂植物乳杆菌产品水分和粒度实际检测值

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项目  编号 | 水分（%） | 粒度（2.0 mm标准筛通过率） |
| 5 | 6.15 | 100% |
| 11 | 5.82 | 100% |
| 16 | 4.86 | -- |
| 17 | 5.55 | 100% |
| 19 | 6.11 | 100% |
| 20 | 7.15 | 100% |
| 22 | 4.05 | -- |
| 26 | 6.05 | 100% |
| 29 | 7.56 | 100% |
| 34 | 7.03 | 100% |

**（5）饲料添加剂 植物乳杆菌-卫生标准的编制依据**

主要参考《饲料卫生标准》（GB 13078-2017）、《微生物饲料添加剂技术通则》（NY/T 1444-2007）、《饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌》（NY/T 1461-2007）、《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》（2131-2012）、《饲料添加剂 嗜酸乳杆菌（报批稿）》中关于卫生标准的相关规定，对产品卫生指标进行了限定（表4、表5）。

我们根据《饲料中总砷的测定》（GB/T 13079-2006）、《饲料中铅的测定 原子吸收法》（GB/T 13080）、《饲料中镉的测定方法》（GB/T 13082）、《饲料中沙门氏菌的检测方法》（GB/T 13091）、《饲料中霉菌总数测定方法》（GB/T 13092）、《饲料中黄曲霉毒素B1的测定 酶联免疫吸附法》（GB/T 17480）、《饲料中大肠菌群的测定》（GB/T 18869）、《饲料中玉米赤霉烯酮的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》（GB/T 28726）、《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》（GB/T 30956）对8个样品的重金属及霉菌毒素含量的指标进行检测，并对13个样品的霉菌总数、大肠菌群及沙门氏菌等相应指标进行检测，具体数据见表4、表5。由表4可见，8个样品中只有1个样品的铅含量高于标准限定值。13个样品中，仅有1个样品的霉菌总数超过标准限定值，1个样品的大肠菌群数超过标准限定值。综合考虑其他相关标准和产品的实际检测值数据，我们认为，本标准中卫生指标的设定值是合适的。

表4 饲料添加剂植物乳杆菌产品的重金属和霉菌毒素含量实际检测值

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 砷，mg/kg | 铅，mg/kg | 汞，mg/kg | 镉，mg/kg | 黄曲霉毒素，µg/kg | 呕吐毒素，mg/kg | 玉米赤霉烯酮，mg/kg |
| 5 | 0.12 | < 1 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 17 | 0.01 | < 1 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 19 | 0.07 | < 1 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 20 | < 0.01 | < 1 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 22 | 0.76 | 3.85 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 29 | < 0.01 | < 1 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 32 | 0.72 | 22.08 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 33 | < 0.01 | < 1 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 本标准设定值 | ≤ 2.0 | 5.0 | 0.1 | 0.5 | 10 | 1 | 0.1 |

表5 饲料添加剂植物乳杆菌产品的霉菌、致病菌的检测结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 霉菌总数，CFU/g | 沙门氏菌，  25 g | 大肠菌群，CFU/g | 金黄色葡萄球菌，25 g | 志贺氏菌，25 g |
| 34 | 2.5×102 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 35 | 5.0×10 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 39 | 3.4×103 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 36 | 2.5×102 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 37 | 5.0×10 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 38 | 7.7×103 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 39 | 4.7×103 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 40 | < 10 | 未检出 | 2×104 | 未检出 | 未检出 |
| 41 | 4.4×105 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 42 | < 10 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 43 | 2.5×102 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 44 | 4.0×102 | 未检出 | ＜10 | 未检出 | 未检出 |
| 45 | < 10 | 未检出 | ＜10 | 未检出 | 未检出 |
| 本标准设定值 | ≤ 1.0×104 | 不得检出 | 100 | — | — |

注：金黄色葡萄球菌、志贺氏菌检测未写入本标准。

**（6）饲料添加剂 植物乳杆菌-贮存和保质期的编制依据**

益生菌是一类对[宿主](https://baike.baidu.com/item/%E5%AE%BF%E4%B8%BB/11528" \t "_blank)有益的[活性](https://baike.baidu.com/item/%E6%B4%BB%E6%80%A7" \t "_blank)[微生物](https://baike.baidu.com/item/%E5%BE%AE%E7%94%9F%E7%89%A9" \t "_blank)，是[定植](https://baike.baidu.com/item/%E5%AE%9A%E6%A4%8D/9548141" \t "_blank)于人体[肠道](https://baike.baidu.com/item/%E8%82%A0%E9%81%93/6912371" \t "_blank)、[生殖](https://baike.baidu.com/item/%E7%94%9F%E6%AE%96" \t "_blank)系统内，能产生确切[健康](https://baike.baidu.com/item/%E5%81%A5%E5%BA%B7/352662" \t "_blank)功效从而改善宿主微[生态](https://baike.baidu.com/item/%E7%94%9F%E6%80%81" \t "_blank)[平衡](https://baike.baidu.com/item/%E5%B9%B3%E8%A1%A1/75238" \t "_blank)、发挥有益作用.的活[微生物](https://baike.baidu.com/item/%E5%BE%AE%E7%94%9F%E7%89%A9/147527" \t "_blank)的总称。杆菌的抗逆性较差，如果不经过有效活性保护，植物乳杆菌生产、销售、储存、使用等流通过程中，如在仓库储藏过程中，在添加到饲料以后、以及在制成颗粒饲料后的储存过程中，活菌死亡将会非常严重，**因此储存条件和保质期对产品质量的保证非常重要**。

卫生部发布《预包装食品标签标准》中，对产品保质期进行了定义：“预包装食品在标签指明的贮存条件下，保持品质的期限”。在本标准中，我们将符合产品标识活菌数的期限定义为保质期。并且参考《中华人民共和国药典》规定，标准中提到的常温条件系指10~30°C，低温条件系指10°C以下。13份企业标准中，除3家企业要求贮存条件为≤ 20°C外，其余企业标准均要求贮存条件为阴凉、干燥。对这13家生产企业的企业标准进行统计，有10家企业规定了保质期。其中，1家企业规定保质期4个月，1家企业规定保质期6个月，其余8家均规定保质期12个月（见附件1）。但根据我们对植物乳杆菌产品为期6个月的跟踪检测，发现：a. 所有收集产品中植物乳杆菌的活菌数随时间延长而降低；b. 在阴凉、干燥的常温条件下储存，活菌数在产品标识的保质期内均无法满足标签含量；c. 冷藏储存效果显著好于常温储存。因此，乳酸菌的储藏条件对产品保质期影响极大，是影响产品质量的首要因素。

在常温和低温储存条件下持续跟踪检测植物乳杆菌样品共9个，其中，只有7个样品活菌数初始检测值达到标签含量。我们分别在常温（10-30°C）和低温（4°C）储存条件下，跟踪了这7个样品在储存过程中的植物乳杆菌存活率情况，结果见表6和表7。在常温储存（表6）1个月和2个月时，有4个样品（在合格样品中占比57%）活菌数能够达到标签值，这些样品活菌数存活率分别为60%~87%和44%~87%；常温储存3个月时，仅有1个样品（在合格样品中占比14%）活菌数达到标签值，存活率为66%；常温储存4个月时，没有样品活菌数符合标签。

另一方面，在低温（4°C）储存条件下（表7），储存3个月时，仍有5个样品（在合格样品中占比71%）活菌数达到标签值；保存4个月时，仅有3个样品（在合格样品中占比43%）活菌数达到标签值，这些样品活菌数存活率为19%~83%；保存5个月时，仅有2个样品（在合格样品中占比29%）活菌数达到标签值，这些样品植物乳杆菌存活率为44~83%；保存6个月时，仅有1个样品（在合格样品中占比14%）活菌数达到标签值，存活率为31%。

全价配合饲料厂或养殖户在配制饲料时，一方面都会提前采购饲料添加剂并保存一定时间，另一方面乳酸菌加入到配合饲料中后，也需要1-3个月才能使用完。因此，饲料添加剂植物乳杆菌产品生产厂家应按照产品活菌数存活性能，调整现有标识活菌数或提高产品初始活菌数量。综合考虑乳酸菌产品在实际饲料配制中的使用习惯以及现有市场上植物乳杆菌产品现状，我们建议饲料添加剂植物乳杆菌标准中有关保质期的表述为“低温（10°C）以下保质期为4个月以上，常温（10度以上）保存期为2个月以上”。同时，鉴于产品在常温和低温条件下植物乳杆菌存活率的明显差别，在对贮存条件的要求中提出：“建议使用10°C以下的冷藏条件” 、“防止长时间30℃以上高温”。

表6 饲料添加剂 植物乳杆菌产品常温（10-30°C）储存存活率（%）

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 标签含量（CFU/g） | 初始含量（CFU/g） | 存活率（%） | | | |
| 1个月 | 2个月 | 3个月 | 4个月 |
| 1 | 1.00E+10 | 2.15E+10 | 7.77 | 0.28 | 0.00 | - |
| 2 | 1.00E+09 | 2.10E+09 | 74.29 | 53.81 | 32.14 | - |
| 3 | 1.00E+09 | 9.00E+09 | 86.22 | 87.22 | 65.56 | 7.78 |
| 4 | 1.00E+10 | 7.15E+10 | 60.14 | 44.20 | 12.45 | 0.40 |
| 5 | 1.00E+10 | 5.75E+10 | 86.96 | 75.00 | 1.00 | - |
| 6 | 1.00E+11 | 2.20E+11 | 20.00 | 5.39 | 4.50 | 2.64 |
| 7 | 1.00E+10 | 4.15E+09 | 0.84 | 0.31 | 0.57 | - |
| 8 | 2.00E+10 | 2.72E+10 | 13.05 | 14.34 | 3.82 | 1.49 |
| 9 | 1.00E+08 | 9.30E+07 | 47.31 | 48.39 | 40.86 | 33.33 |

表7 饲料添加剂 植物乳杆菌产品4°C条件下储存存活率（%）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **样品编号** | 标签含量（CFU/g） | 初始含量（CFU/g） | 存活率（%） | | | | | |
| 1个月 | 2个月 | 3个月 | 4个月 | 5个月 | 6个月 |
| 1 | 2.00E+10 | 6.60E+10 | 89.39 | 40.76 | 33.86 | 18.71 | 17.73 | 0.23 |
| 2 | 1.00E+10 | 2.20E+11 | 21.00 | 11.95 | 17.73 | 5.45 | 4 | - |
| 3 | 2.00E+10 | 2.72E+10 | 16.73 | 11.40 | 17.65 | 5.20 | 2 | - |
| 4 | 1.00E+08 | 9.30E+07 | 75.81 | 50.54 | 46.24 | 46.77 | 47 | - |
| 5 | 2.00E+10 | 8450000000 | 59.17 | 15.86 | 5.80 | 4.44 | - | - |
| 6 | 1.00E+11 | 1.78E+11 | 81.46 | 77.25 | 20.51 | 0.56 | - | - |
| 7 | 2.00E+10 | 2.75E+10 | 98.12 | 94.28 | 84.38 | 68.93 | 53.2 | - |
| 8 | 1.00E+10 | 3.20E+10 | 97.37 | 72.76 | 46.84 | 43.82 | 34.37 | 31.25 |
| 9 | 1.00E+11 | 1.80E+11 | 100.00 | 92.02 | 83.23 | 83.29 | 72.22 | 51.11 |

**（7）饲料添加剂 植物乳杆菌鉴别编制依据**

① 菌体形态编制依据

参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》（R.E.布坎南，N.E.吉本斯等，809页）、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》（凌代文，6-16页），并经过对植物乳杆菌标准菌株和样品的革兰氏染色和显微观察，确定植物乳杆菌的菌体形态为：菌体细胞呈圆端直杆状，通常宽为0.9 μm~1.2 μm，长为3.0 μm~8.0 μm，单个、成对或成短链。具体数据见表8和图2。

表8 饲料添加剂 植物乳杆菌产品菌体形态特征描述

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 形态 | 革氏染色**\*** | 芽孢 | 荚膜 | 鞭毛 |
| 1 | 直杆、短链 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 2 | 直杆、单个 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 3 | 直杆、单个 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 4 | 直杆、单个 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 5 | 直杆、单个 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 6 | 直杆、短链 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 7 | 直杆、单个 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 8 | 直杆、单个 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 9 | 直杆、短链 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 10 | 直杆、单个 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 11 | 直杆、短链 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 12 | 直杆、单个 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 13 | 直杆、短链 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |

**注：\***革兰氏染色部分未放在标准中。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| E:\2011标准实施方案\实验结果\样品显微图片\12-杆菌.jpg | E:\2011标准实施方案\实验结果\样品显微图片\11杆菌.jpg | E:\2011标准实施方案\实验结果\样品显微图片\16-杆菌.jpg | E:\2011标准实施方案\实验结果\样品显微图片\17-杆菌.jpg |
| 5 | 6 | 7 | 8 |
| E:\2011标准实施方案\实验结果\样品显微图片\19-杆菌.jpg | E:\2011标准实施方案\实验结果\样品显微图片\20-杆菌.jpg | E:\2011标准实施方案\实验结果\样品显微图片\22-杆菌.jpg_meta (1).jpg | E:\2011标准实施方案\实验结果\样品显微图片\26-杆菌.jpg |
| 9 | 10 | 11 | 12 |
| C:\Documents and Settings\Administrator\Application Data\Tencent\Users\510979611\QQ\WinTemp\RichOle\GMBSCYW3J6YR(_9]A_9R%@A.jpg | C:\Documents and Settings\Administrator\Application Data\Tencent\Users\510979611\QQ\WinTemp\RichOle\FV`8HWH)GZ~O@`N8K%EEQ(9.jpg | C:\Documents and Settings\Administrator\Application Data\Tencent\Users\510979611\QQ\WinTemp\RichOle\}091B]1A(4SEUB35{HG8~FE.jpg | C:\Documents and Settings\Administrator\Application Data\Tencent\Users\510979611\QQ\WinTemp\RichOle\LNU@7}5L@FP{PT2MVB4N8BM.jpg |
| 13 |  | | |
| C:\Documents and Settings\Administrator\Application Data\Tencent\Users\510979611\QQ\WinTemp\RichOle\G4MLAPCEERIS8J67{AL{[AU.jpg |

图2 饲料添加剂 植物乳杆菌产品菌体显微形态

② 菌落形态编制依据

参考国家标准《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》（凌代文，6-16页）、《食品卫生微生物学检验 乳酸菌饮料中乳酸菌检验》（GB 4789.35）、《进出口食品中乳酸菌检验方法 第1部分：分离与计数方法》（SN/T 1941.1-2007）及数十篇乳酸菌文献，选用适合乳酸菌的培养基为本标准中分离用培养基，见表9。跟踪检测的样品在下述培养基上培养（37°C，24-48 h），菌落形态均符合典型特征，如图3。

表9 适合植物乳杆菌的培养基及相应菌落形态

|  |  |
| --- | --- |
| 培养基名称 | 植物乳杆菌菌落形态 |
| MRS | 平皿底为黄色，菌落中等大小，圆形，白色，湿润，凸起，边缘整齐，直径为3 mm ± 1 mm |

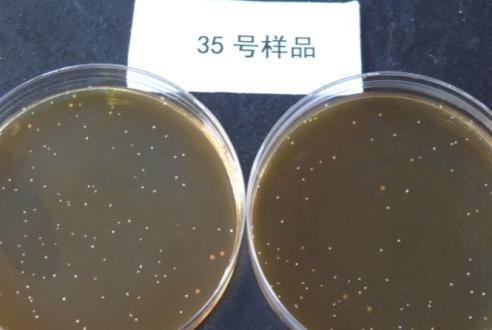


图3 样品典型菌落形态

③ 生理生化特征

主要参考API 50 CHL鉴定试纸条、BIOLOG鉴定系统、《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》（R.E.布坎南，N.E.吉本斯等，809-811页），标准中设定植物乳杆菌的生理生化特征如表10。在MRS琼脂斜面上，于36 ± 1°C，24 h~48 h培养，刮取菌苔，以验证植物乳杆菌生理生化特征，主要包括利用不同碳源实验，试验结果见表11。

表10 植物乳杆菌生理生化特征

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试验项目 | 结果 | 试验项目 | 结果 | 试验项目 | 结果 |
| 甘油 | - | 甘露醇 | + | 棉籽糖 | - |
| 赤藓醇 | - | 山梨醇 | - | 淀粉 | - |
| D-阿拉伯糖 | - | α-甲基-D-甘露糖甙 | - | 糖原 | - |
| L-阿拉伯糖 | + | α-甲基-D-葡萄糖甙 | - | 木糖醇 | - |
| 核糖 | + | N –乙酰-葡糖胺 | + | 拢牛儿糖 | + |
| D-木糖 | - | 苦杏仁甙 | + | D-松二糖 | + |
| L-木糖 | - | 熊果甙 | + | D-来苏糖 | - |
| 阿东醇 | - | 七叶灵 | + | D-塔格糖 | - |
| β-甲基-D-木糖甙 | - | 柳醇 | + | D-岩糖 | - |
| 半乳糖 | + | 纤维二糖 | + | L-岩糖 | - |
| 葡萄糖 | + | 麦芽糖 | + | D-阿拉伯糖醇 | - |
| 果糖 | + | 乳糖 | - | L-阿拉伯糖醇 | - |
| 甘露糖 | + | 蜜二糖 | + | 葡萄糖酸盐 | + |
| 山梨糖 | - | 蔗糖 | + | 2-酮基-葡萄糖酸盐 | - |
| 鼠李糖 | - | 海藻糖 | + | 5-酮基-葡萄糖酸盐 | - |
| 卫矛醇 | - | 菊糖 | - |  | |
| 肌醇 | - | 松三糖 | + |
| 注：“+”表示为90％以上菌株为阳性反应，“-”表示90％以上菌株为阴性反应。 | | | | | |

表11 饲料添加剂 植物乳杆菌的生理生化结果描述

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号  碳源 | 5 | 11 | 16 | 17 | 19 | 20 | 22 | 26 | 29 | 32 | 33 | 34 | 35 |
| 甘油 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 赤藓醇 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-阿拉伯糖 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-阿拉伯糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 核糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-木糖 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-木糖 | - | - | - | - | - | **+** | - | - | - | - | - | - | - |
| 阿东醇 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β-甲基-D-木糖甙 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 半乳糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 葡萄糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 果糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 甘露糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 山梨糖 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 鼠李糖 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 卫矛醇 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 肌醇 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 甘露醇 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 山梨醇 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-甲基-D-甘露糖甙 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-甲基-D-葡萄糖甙 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| N -乙酰-葡糖胺 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 苦杏仁甙 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 熊果甙 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 七叶灵 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 柳醇 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 纤维二糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 麦芽糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 乳糖 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 蜜二糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 蔗糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 海藻糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 菊糖 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 松三糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 棉籽糖 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 淀粉 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 糖原 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 木糖醇 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 拢牛儿糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-松二糖 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-来苏糖 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| D-塔格糖 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D -岩糖 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L -岩糖 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-阿拉伯糖醇 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-阿拉伯糖醇 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 葡萄糖酸盐 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2-酮基-葡萄糖酸盐 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5-酮基-葡萄糖酸盐 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

**④ 菌种遗传特性**

依据《Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology》（《伯杰氏系统细菌学手册》）所列模式菌株ATCC 14917的16S rRNA（16S核糖体核糖核酸）基因全序列，将13个植物乳杆菌样品的16 S rRNA（16S核糖体核糖核酸）序列与美国国立生物信息中心（NCBI）中模式菌株ATCC 14917的16S rRNA（NR\_115764.1）进行比对，相似度在99%以上。具体结果见表12。

表12 跟踪检测样品的16S rRNA基因全序列比对

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| 相似度，% | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

**四、采用国际标准**

本标准未采用国际同类标准。

**五、与现行法律法规和强制性标准的关系**

本标准的制订可为饲料添加剂 植物乳杆菌质量安全的评价、相关质量标准指标的制订和贯彻执行提供直观的指导。

与有关的现行法律、法规和强制性国家标准没有冲突、矛盾和重复。

1. **重大分歧意见的处理经过和依据**

表13 重大分歧意见的处理经过和依据

|  |  |
| --- | --- |
| 重大分歧意见 | 处理情况和处理的主要依据 |
| 1.产品为复合菌（尤其是若干乳酸菌复配）产品情况，如何对每种菌进行定量评判？ | 在标准研制过程中，对复合菌剂（尤其是若干乳酸菌复配产品）的活菌定量问题做了大量研究。因本标准仅针对功能菌为植物乳杆菌的情况，故对植物乳杆菌的分子生物学计数方法进行了研究（附件2）。外标曲线的相关系数均在0.995以上，表明所建立的植物乳杆菌标准曲线符合RT-PCR定量的要求，该方法可以在复合菌的情况下定量检测植物乳杆菌。然而，此方法只能定量到数量级，而不能精确定量，在使用中具有一定局限性，故未加到标准中来。 |
| 2.保质期如何限定？ | 对10家企业规定了保质期，其中8家均规定保质期12个月。但根据我们对植物乳杆菌产品常温和低温条件下储存的活菌数跟踪检测数据，发现在常温保存1个月和2个月时，有57%的样品活菌数能够达到标签值，常温储存3个月时，仅有1个样品（占比14%）活菌数达到标签值；常温储存4个月时，没有样品活菌数符合标签。在低温（4°C）储存条件下，储存3个月时，有71%样品活菌数达到标签值；保存4个月时，仅43%活菌数达到标签值。  综合考虑乳酸菌产品在实际饲料配制中的使用习惯以及现有市场上植物乳杆菌产品现状，我们建议饲料添加剂植物乳杆菌标准中有关保质期的表述为“低温（10°C）以下保质期为4个月以上，常温（10°C以上）保存期为2个月以上”。同时，鉴于产品在常温和低温条件下植物乳杆菌存活率的明显差别，在对贮存条件的要求中提出：“建议使用10°C以下的冷藏条件”。 |

**七、标准作为强制性或推荐性标准的意见**

本标准应作为强制性标准。

近年我国微生物饲料添加剂发展非常迅速，而植物乳杆菌等乳酸菌产品需求和产值也逐年迅猛提高，亟需形成一个完善的管理机制，尤其是针对植物乳杆菌产品标准。因此，相关国家标准的制订和实施，将促进微生物饲料添加剂产业的可持续健康发展，加强微生物类产品有效管理，提高动物食品安全水平具有重要意义。

**八、贯彻标准的要求和措施建议**

新版行业标准颁布后，首先统一思想认识，努力增强做好标准落实工作的责任感，在饲料行业、食品行业等大力宣传，组织培训学习新版行业标准，使其尽快深入人心。

**九、废止现行有关标准的建议**

无。

**十、其他应予说明的事项**

无。

**附 件**

**附件1 饲料添加剂植物乳杆菌产品企业标准清单；**

**附件2 植物乳杆菌--分子生物学方法计数活菌 结果报告；**

**附件3 预审稿，预审会的审查意见、专家意见处理汇总表和专家签字单；**

**附件4 第一次终审稿，终审会的审查意见、专家意见处理汇总表和专家签字单；**

**附件5 网上公开征求意见处理汇总表；**

**附件6 借鉴的国内其他标准。**

附件1 饲料添加剂 植物乳杆菌产品企业标准清单

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 公司名称 | 标准名称 | 菌种名称 | 活菌数 | 水分（%） | 保质要求 | 粒度（mm，通过率100%） | 保质期 |
| 厦门渔悦丰生物科技有限公司 | Q/0902SBL020-2013《植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 无 | 无 | 无 | 无 | 无 |
| 江苏祥豪实业有限公司 | Q/320831 XHS012-2016《植物乳杆菌制剂》 | 植物乳杆菌制剂 | 20-200×108 | 无 | ≤ 20°C | 粉末或颗粒剂 | 无 |
| 山东宝益泽生物工程有限公司 | 《饲料添加剂 植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 0.5-1×1011 | ≤ 12 | 阴凉、干燥、 | 1.25 | 12个月 |
| 山东宝来利来生物工程股份有限公司 | 《饲料添加剂 植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 1.00×109-11 | ≤ 10 | 阴凉、干燥、 | 0.9 | 12个月 |
| 高唐华农生物工程有限公司 | 《饲料添加剂 植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 1-5×109 | ≤ 12 | 阴凉、干燥、 | 0.6 | 4个月 |
| 山东百德生物科技有限公司 | 《饲料添加剂 植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 1.00×108-10 | ≤ 12 | 阴凉、干燥、 | 1.25 | 12个月 |
| 山东鼎创生物科技有限公司 | 《饲料添加剂植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 1×1011 | ≤ 20 | 阴凉、干燥、 | 0.56 | 6个月 |
| 青岛根源生物技术集团有限公司 | 《饲料添加剂 植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 1-5×108-10 | ≤ 10 | 阴凉、干燥、 | 2.5 | 12个月 |
| 济宁滨阳生物科技有限公司 | 《饲料添加剂 植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 1.00×108-9 | 无 | 阴凉、干燥、 | 无 | 12个月 |
| 山东蔚蓝生物科技有限公司 | 《饲料添加剂 植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 1-5×108-11 | ≤ 12 | 阴凉、干燥、 | 0.90 | 12个月 |
| 宜春强微生物科技有限公司 | 《饲料用添加剂 植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 20-200×108 | ≤ 12 | 阴凉、干燥、 | 无 | 18个月 |
| 天津市育琪生物技术有限公司 | Q/12XQ0720-2016《微生物饲料添加剂 植物乳杆菌》 | 植物乳杆菌 | 1×108 | ≤ 9 | ≤ 20°C | 0.9 | 12个月 |
| 无锡市中意生物技术有限公司 | Q/320282PDA016-2016《植物乳杆菌制剂》 | 植物乳杆菌 | 1-20×108 | ≤ 8 | ≤ 20°C | 无 | 无 |

附件2 植物乳杆菌--分子生物学方法计数活菌 结果报告

**一、实验方法**

1 RNA定量

1.1 RNA的提取及纯化

1）称取饲料品约5 g悬浮于15 mL PBS中，振荡使之充分混匀后静置1 min，而后400 rpm 4°C 离心1 min，取上浊约7 mL于离心管中，8000 rpm 4°C 离心10 min，弃上清；加入5 mL PBS，振荡使之充分混匀，8000 rpm 4°C离心10 min，弃上清；

2）加入200 µL水和400 µL酸酚，并加入适量酸洗玻璃珠，悬浮沉淀。置于组织研磨仪上，1800 Hz下研磨30 min。

3）14, 000 × g，4°C离心10 min，将水相（约400 µL）转移到一个新的2 mL离心管，加入1 mL TRIZOL,剧烈混匀15 s，在室温中放置5 min。

4）加入预冷的200 µL氯仿，剧烈混匀15 s，在室温中放置3 min，12, 000 × g，4°C离心15 min,将水相转移到一个新的1.5 mL离心管。

5）重复6-7步骤两次。

6）12, 000 × g，4°C离心15 min，将水相转移到两个新的1.5 mL离心管（每个离心管约400 µL），毎管加入500 µL预冷异丙醇,轻轻上下颠倒5、6下，在室温中放置10 min，15, 000 × g，4°C离心10min，弃去上清。

1. 加入1 mL预冷75%乙醇，轻摇2下，在7, 500 × g，4°C离心5 min，弃去上清，让沉淀在空气中吹干，用100 µL去离子（DEPC）水溶解沉淀（在60°C中水浴10 min,每2-3 min拍打一次，拍打后稍微离心后继续水浴），获得RNA溶液，测其浓度后于-80°C保存。

1.2 跑胶

用1%琼脂糖凝胶，一个孔只放蓝作为参照，1 µg RNA样品用水补足至5 µL，加1 µL 6 × Loading buffer跑胶。120V，15-20 min。所有缓冲液用DEPC水配制。

1.3 DNase处理

1）取10 µg RNA用于Dnase处理。

2）10 µg RNA，0.5 µL Rnase Inhibitor，5 µL 10 × Dnase Buffer，1 µL Turbo Dnase（Ambion），加水补足到50 µL。

3）在37度温育45 min后加入0.5 µL Turbo Dnase（Ambion），继续37°C温育45 min，冷却至室温。

1.4 Dnase失活

1）加50 µL水补到100 µL。

2）加入100 µL酚/氯仿/异戊醇25:24:1，剧烈震荡15 s，室温静置2 min，室温12, 000 rpm离心5 min，吸取水相至新离心管（约100 µL），不要碰中间及下层。

3）加入100 µL氯仿/异戊醇24:1，剧烈震荡15 s，室温静置2 min。

4）室温12, 000 rpm离心5 min，吸取水相至新离心管（约70-100 µL），不要碰中间及下层。

5）加入1/10体积的醋酸钠和2.5倍体积的预冷无水乙醇，轻轻颠倒5次，-20°C静置30 min。

6）4°C 12, 000 rpm离心10 min，去掉上清，倒掉之后用枪头吸出，不要碰到沉淀。

7）加入1 mL 70%乙醇，稍剧烈摇10 s, 4°C 12, 000 rpm离心10 min，去掉上清，倒掉之后用枪头吸出，不要碰到沉淀。

8）室温干燥，一般10 min左右，用Rnase-free水（15 µL左右）。60°C水浴悬浮RNA 10 min。每3 min轻轻敲打管壁益于悬浮。溶解后冷却至室温后置于冰上，测浓度。

1.5 RNA验证

取0.5 µg RNA用于PCR验证，PCR扩增*epi*基因（40个循环），若无条带则无DNA残留。gDNA作为阳性参照，DEPC水为阴性对照。

1.6 反转录

取2 µg RNA进行cDNA合成。具体步骤参照反转录酶SuperScript III Reverse Transcriptase试剂盒说明书进行。设置DEPC水阴性对照组。

1.7 RT-PCR

将反转录后的cDNA做10倍和100倍的稀释，而后和外标品一起进行定量PCR检测。选择10倍和100倍稀释cDNA中线性关系较好的结果为最终定量结果。而后依据RNA的浓度推算回去。

反应体系如下：

2 × Power SYBR green PCR master mix 10 µL

Primer 1 0.5 µL

Primer 2 0.5 µL

cDNA 9 µL

程序为：预变性95°C 10 min，变性95°C 15 s，退火延伸60°C 1 min，40个循环。

2 DNA定量

2.1 宏基因组DNA的提取

1）称取样品约5 g悬浮于15 mL PBS中，振荡使之充分混匀后静置1 min，而后400 rpm 4°C 离心1 min，取上浊约7 mL于离心管中，8, 000 rpm 4°C 离心10 min，弃上清。

2）加入5 mL PBS，振荡使之充分混匀，8, 000 rpm 4°C离心10 min，弃上清。

3）依菌体量多少不同加入TE缓冲液，振荡使之充分混匀。

4）取约800 µL加入装有0.5 g直径为0.1 mm玻璃珠的离心管中，置于组织研磨仪上，1800Hz下研磨30 min。

5）于离心管中加入100 µL SDS（10%），混匀后冰浴10 min，13, 000 rpm 4°C离心10 min，取上清于另一离心管中。

6）加入100 µL NaCl（5 mol/L）和65°C预热好的80 µL CTAB/NaCl溶液（10% CTAB，0.7 mol/L NaCl）混匀后65°C水浴20 min，加入等体积的酚/氯仿/异戊醇（25:24:1），颠倒混匀，13, 000 rpm 4°C离心10 min，取上清。

7）加入等体积的氯仿/异戊醇，颠倒混匀，13, 000 rpm 4°C离心10 min，取上清，加入50 µL醋酸钠（3 mol/L）和500 µL预冷异丙醇，混匀后冰浴30 min，13, 000 rpm 4°C离心10 min，弃上清。

8）沉淀用70 %乙醇洗涤，自然干燥后依DNA多少不同溶于50-100 μL TE缓冲液。

9）取2 µL DNA在ND-1000型微量紫外分光光度计下测定其浓度及OD260/280值，将DNA样品-20°C保存备用。

2.2 RT-PCR检测

将外标准品进行10倍梯度稀释（一般稀释6-8个梯度），而后将外标准品和样品（样品的DNA原液和稀释液需要一起上样）一起进行荧光定量PCR扩增（标品和未知样品分别作3个重复），扩增程序和扩增体系如下所示：

2 × Power SYBR green PCR master mix 10 µL

Primer 1 0.5 µL

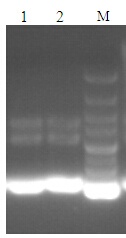
Primer 2 0.5 µL

cDNA 9 µL

程序为：预变性95°C 10 min，变性95°C 15 s，退火延伸60°C 1 min，40个循环。

**二、实验结果**

提取样品1和2的RNA经过跑胶以后如下图所示：



泳道1：样品1所提取的RNA；泳道2：样品2所提取的RNA；M：Marker。

1 第一次RT-PCR结果

外标质粒浓度为156 ng/μL，对应的拷贝数为156×10-9×6.02×1023/（144+2692）×345=9.6×1010，将外标准品进行102-109倍稀释上样，样品1和样品2的cDNA经过10倍、100倍和1000倍稀释后上样，样品1和样品2的DNA经过104-108倍稀释后上样，每个稀释度3个重复。

1.1 外标曲线的制作

以外标质粒稀释后拷贝数的对数为横坐标，相应的达到检测阈值的循环数（CT值）为纵坐标绘制外标曲线，对应的稀释度与横坐标如下表，标准曲线如下图所示：

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 质粒稀释倍数 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 |
| 对应拷贝数 | 9.6×107 | 9.6×106 | 9.6×105 | 9.6×104 | 9.6×103 | 9.6×102 | 9.6×101 |
| 横坐标 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 |

外标曲线：

1.2 样品菌数的计算

1）4 g样品1中提取总DNA 48.45 μg，取其中2 μg DNA做RT-PCR

样品1的DNA稀释是105时，CT= 21.4084339141845对应线性关系中拷贝数的对数为4.6，则对应拷贝数为104.6×105=109.6，对应1 g样品中含有的拷贝数为48.45/2\*109.6/4=6×109.6。

样品1的DNA稀释是106时，CT= 25.8528900146484对应线性关系中拷贝数的对数为3.4，则对应拷贝数为103.4×106=109.4，对应1 g样品中含有的拷贝数为48.45/2\*109.4/4=6×109.4，而实际1 g样品中活菌数为2.1×1011。

2）4 g样品2中提取总DNA 17.85 μg，取其中2 μg DNA做RT-PCR

样品2的DNA稀释是105时，CT= 23.5404567718505对应线性关系中拷贝数的对数为4.0，则对应拷贝数为104×105=109，对应1 g样品中含有的拷贝数为17.85/2\*109/4=2.2×109。

样品2的DNA稀释是106时，CT= 27.0955142974853对应线性关系中拷贝数的对数为3.0，则对应拷贝数为103×106=109，1 g样品中含有的拷贝数为17.85/2\*109/4=2.2×109，而实际活菌数为2.1×1010。

3）15 g样品1中提取总RNA 767 μg，取其中40 μg纯化后为21.6 μg，反转录后取其中2 μg cDNA做RT-PCR。

样品1中cDNA没有稀释时，CT= 22.9668025970458对应线性关系中拷贝数的对数为4.2，则对应拷贝数为104.2。由此可知1 g样品中含有的拷贝数为（767\*21.6/40\*104.2/2）/15=1.4×105.2。

样品1中cDNA稀释103倍，CT= 22.4812622070312对应线性关系中拷贝数的对数为4.3，则对应拷贝数为104.3×103=107.3，1 g样品中含有的拷贝数为（767\*21.6/40\*107.3/2）/15=1.4×108.3，而实际活菌数为2.1×1011。

4）15 g样品2中提取总RNA 1025μg，取其中40 μg纯化后为15.45 μg，反转录后取其中2 μg cDNA做RT-PCR。

样品2中cDNA没有稀释时，CT= 19.7815170288085对应线性关系中拷贝数的对数为5.0，则对应拷贝数为105，由此可知1 g样品中含有的拷贝数为（1025\*15.45/40\*105/2）/15=1.3×106。

样品2中cDNA稀释103倍，CT= 22.4812622070312对应线性关系中拷贝数的对数为4.3，则对应拷贝数为104.3×103=107.3，1 g样品中含有的拷贝数为（1025\*15.45/40\*107.3/2）/15=1.3×108.3，而实际活菌数为2.1×1010。

**小结**：由于提取DNA、RNA的样品和活菌计数所用的样品不是来自于同一个混合样品中，同时，提取时样品为溶解在液体中的，单纯还原到1 g样品中也会造成结果的误差。因此，对实验进行了改进，同时对比了溶解样品后离心取上清液提取DNA、RNA、活菌计数和溶解样品后混合均匀取浑浊液提取DNA、RNA和活菌计数的区别。

2 第二次RT-PCR结果

**实验方法改进**：称取7.5 g样品溶解在22.5 mL灭菌水中，摇匀充分溶解后离心，取12 mL上清液，其中8 mL提取RNA，2 mL提取DNA，1 mL活菌计数。RT-PCR结果见附件2。

2.1 外标曲线的制作

外标质粒浓度340 ng/μL，对应拷贝数为340×10-9×6.02×1023/[ (144+2692) ×345 ]=2.09×1011

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 质粒稀释倍数 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 |
| 对应拷贝数 | 2.1×108 | 2.1×107 | 2.1×106 | 2.1×105 | 2.1×104 | 2.1×103 | 2.1×102 |
| 横坐标 | 8.32 | 7.32 | 6.32 | 5.32 | 4.32 | 3.32 | 2.32 |

2.2 样品菌数的计算

1）8 mL离心样品1提取总RNA是534 μg，取40 μg进行纯化，纯化后的总量是11.025 μg，反转录后取其中0.9 μg cDNA做RT-PCR

样品1中cDNA稀释102倍，CT= 21.7654266357421对应线性关系中拷贝数的对数为4.4，则对应拷贝数为104.4×102=106.4，1 mL离心上清液中含有的拷贝数是（534\*11.025/40\*106.4/0.9）/8=2×107.4，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是1×109。

样品1中cDNA稀释103倍，CT= 26.2081508636474对应线性关系中拷贝数的对数为3.3，则对应拷贝数为103.3×103=106.3，1 mL离心上清液中含有的拷贝数是（534\*11.025/40\*106.3/0.9）/8=2×107.3，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是1×109。

2）2 mL离心样品1提取总DNA700 μg，取其中41.94 μg DNA做RT-PCR

样品1的DNA稀释是105时，CT= 20.1129512786865对应线性关系中拷贝数的对数为4.9，则对应拷贝数为104.9×105=109.9，对应1 mL样品中含有的拷贝数为700/41.94\*109.9/2=8.3×109.9，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是1×109。

样品1的DNA稀释是106时，CT= 24.5317325592041对应线性关系中拷贝数的对数为3.7，则对应拷贝数为103.7×106=109.7，对应1 mL样品中含有的拷贝数为700/41.94\*109.7/2=8.3×109.7，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是1×109。

3）样品2提取总RNA是862 μg，取40 μg进行纯化，纯化后的总量是14.85 μg，反转录后取其中0.9 μg cDNA做RT-PCR

样品2中cDNA稀释102倍，CT= 19.9114685058593对应线性关系中拷贝数的对数为4.9，则对应拷贝数为104.9×102=106.9，1 mL离心上清液中含有的拷贝数是（862\*14.85/40\*106.9/0.9）/8=4.4×107.9，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是3×108。

样品2中cDNA稀释103倍，CT= 24.5048999786376对应线性关系中拷贝数的对数为3.7，则对应拷贝数为103.7×103=106.7，1 mL离心上清液中含有的拷贝数是（862\*14.85/40\*106.7/0.9）/8=4.4×107.7，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是3×108。

4）2 mL离心样品2提取总DNA是333 μg，取其中29.97 μg DNA做RT-PCR

样品2的DNA稀释是105时，CT= 18.6066036224365对应线性关系中拷贝数的对数为5.3，则对应拷贝数为105.3×105=1010.3，对应1 mL样品中含有的拷贝数为333/29.97\*1010.3/2=5.6×1010.3，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是3×108。

样品2的DNA稀释是106时，CT=23.5918350219726对应线性关系中拷贝数的对数为4.0，则对应拷贝数为104.0×106=1010，对应1 mL样品中含有的拷贝数为333/29.97\*1010/2=5.6×1010，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是3×108。

3 第三次RT-PCR结果

**实验方法改进**：称取7.5 g样品溶解在22.5 mL灭菌水中，溶解后充分摇匀，取12 mL液体，其中8 mL提取RNA，2 mL提取DNA，1 mL活菌计数。RT-PCR结果见附件3。

3.1外标曲线的制作

外标质粒浓度340 ng/μL，对应拷贝数为340×10-9×6.02×1023/[(144+2692)×345] =2.09×1011

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 质粒稀释倍数 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 |
| 对应拷贝数 | 2.1×108 | 2.1×107 | 2.1×106 | 2.1×105 | 2.1×104 | 2.1×103 | 2.1×102 |
| 横坐标 | 8.32 | 7.32 | 6.32 | 5.32 | 4.32 | 3.32 | 2.32 |

3.2 样品菌数的计算

1）8 mL样品1提取总RNA是901.5 μg，取40 μg进行纯化，纯化后的总量是13.95 μg，反转录后取其中0.9 μg cDNA做RT-PCR

样品1中cDNA稀释102倍，CT=20.234619140625对应线性关系中拷贝数的对数为4.3，则对应拷贝数为104.3×102=106.3，1 mL菌液中含有的拷贝数是（901.5\*13.95/40\*106.3/0.9）/8=3.49×108.3，而经过菌落计数测的1 mL菌液中含有的活菌数是1.6×109。

样品1中cDNA稀释103倍，CT=24.6784973144531对应线性关系中拷贝数的对数为3，则对应拷贝数为103×103=106，1 mL菌液中含有的拷贝数是（901.5\*13.95/40\*106/0.9）/8=3.49×108，而经过菌落计数测的1 mL菌液中含有的活菌数是1.6×109。

2）2 mL样品1提取总DNA是444 μg，取其中23.4 μg DNA做RT-PCR

样品1的DNA稀释是105时，CT= 17.2678394317626对应线性关系中拷贝数的对数为5.2，则对应拷贝数为105.2×105=1010.2，对应1 mL样品中含有的拷贝数为444/23.4\*1010.2/2=9.5×1010.2，而经过菌落计数测的1 mL菌液中含有的活菌数是1.6×109。

样品1的DNA稀释是106时，CT= 21.8793087005615对应线性关系中拷贝数的对数为3.8，则对应拷贝数为103.8×106=109.8，对应1 mL样品中含有的拷贝数为444/23.4\*109.8/2=9.5×109.8，而经过菌落计数测的1 mL菌液中含有的活菌数是1.6×109。

3）样品2提取总RNA是1194 μg，取40 μg进行纯化，纯化后的总量是15 μg，反转录后取其中0.9 μg cDNA做RT-PCR

样品2中cDNA稀释102倍，CT= 20.6233825683593对应线性关系中拷贝数的对数为4.2，则对应拷贝数为104.2×102=106.2，1 mL菌液中含有的拷贝数是（1194\*15/40\*106.2/0.9）/8=3.3×107.2，而经过菌落计数测的1 mL菌液中含有的活菌数是5×108。

样品2中cDNA稀释103倍，CT=24.7630672454833对应线性关系中拷贝数的对数为3，则对应拷贝数为103×103=106，1 mL菌液中含有的拷贝数是（1194\*15/40\*106/0.9）/8=3.3×107，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是5×108。

4）2 mL离心样品2提取总DNA是1205 μg，取其中43.83 μg DNA做RT-PCR

样品2的DNA稀释是105时，CT=16.4806880950927对应线性关系中拷贝数的对数为5.4，则对应拷贝数为105.4×105=1010.4，对应1 mL样品中含有的拷贝数为1205/43.83\*1010.4/2=1.4×1011.4，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是5×108。

样品2的DNA稀释是106时，CT=20.4862918853759对应线性关系中拷贝数的对数为4.2，则对应拷贝数为104.2×106=1010.2，对应1 mL样品中含有的拷贝数为1205/43.83\*1010.2/2=1.4×1011.2，而经过菌落计数测的1 mL离心上清液中含有的活菌数是5×108。

**总结：**

1、外标曲线的相关系数均在0.995以上，表明所建立的植物乳杆菌标准曲线符合RT-PCR定量的要求，而样品中十倍稀释关系也可以通过RT-PCR结果表现出来。

2、利用DNA为模版通过RT-PCR计算得到的菌数结果比实际活菌数数量级大，与DNA无法区分死菌与活菌有关，而利用RNA为模版通过RT-PCR计算得到的菌数结果比实际活菌数数量级小，则可能是因为RNA不稳定易降解，同时提取过程和操作过程RNA有无法避免的损失。另外，分子生物学方法只能计数到某一数量级，而不能精确定量。