

饲用微生物制剂中粪肠球菌的检测方法

Method for detection of *Enterococcus faecalis* in feeding microbial preparations

地方标准信息服务平台

2018 - 10 - 30 发布

2018 - 11 - 30 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2015给出的规则起草。

本标准由辽宁省畜牧兽医局提出并归口。

本标准起草单位：辽宁省兽药饲料畜产品质量安全检测中心。

本标准主要起草人：李欣南、武凤娇、韩镛竹、高铎、田晓玲。

地方标准信息服务平台

饲用微生物制剂中粪肠球菌的检测方法

1 范围

本标准规定了饲用微生物制剂中粪肠球菌的检验方法。

本标准适用于含有益微生物粪肠球菌的各种饲料添加剂中粪肠球菌的检测和计数。

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，仅所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 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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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 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 稀释液、培养基及试剂

实验用水的电导率在25℃时不应超过25 μ S/cm(相当于电阻率 $\geq 0.4\text{M}\Omega\text{cm}$)，除非另有规定要求。水的微生物污染不超过 10^3CFU/mL 。应按GB 4789.2执行，采用平板计数琼脂培养基，在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 进行定期检查微生物污染。

3.1 0.85%灭菌生理盐水。

3.2 粪肠球菌琼脂培养基：见附录A中A.1。

3.3 哥伦比亚血琼脂培养基：见附录A中A.2。

3.4 革兰氏染色液：见附录A中A.3。

3.5 革兰氏阳性菌鉴定卡或生化鉴定试剂。

3.6 PCR 鉴定试剂盒。

4 标准菌株 粪肠球菌 ATCC29212。

5 设备和玻璃器皿

5.1 恒温培养箱：精度 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.2 高压灭菌锅：使用温度为 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

- 5.3 微生物鉴定仪。
- 5.4 涡旋仪：0r~2500r/min。
- 5.5 麦氏比浊仪：量程 0 MCF~5 MCF。
- 5.6 显微镜：放大倍数 400 以上。
- 5.7 无菌采样袋/瓶。
- 5.8 天平：0.00g~410.00g。
- 5.9 冰箱：2℃~8℃。
- 5.10 离心管：装量为 50mL。
- 5.11 玻璃或塑料平皿：直径为 90 mm。
- 5.12 L 形玻璃或塑料涂布棒。
- 5.13 吸管或移液器：容量为 0.1mL、1mL、10mL。
- 5.14 广口瓶或三角瓶：容量为 500mL。

6 采样

实验室样品具有真实性和代表性。采样人应佩戴无菌手套和口罩。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2℃~8℃环境内冷藏保存。采样数量和方式按 GB/T 14699.1 执行。

7 试样的制备

按 GB/T 20195 执行。

8 操作步骤

8.1 检样制备及稀释

在超净工作台中称取试样 25g (mL)，加入盛有 225mL 0.85% 灭菌生理盐水的三角瓶中（瓶内预置适当数量的玻璃珠）。置振荡器上，振荡 30min。经充分振摇后，采用 0.85% 灭菌生理盐水进行 1:10 的稀释。用灭菌吸管吸取 1:10 的均匀稀释液 1mL，置于灭菌的 9mL 0.85% 灭菌生理盐水离心管中，密封，涡旋仪涡旋 10 s，经充分混匀后制成 1:100 的稀释液。根据样品含菌量，按上述稀释次序递次稀释至相应要求的稀释倍数。

8.2 接种和培养

选择 2 个或者 3 个适宜的稀释度，用灭菌吸管分别吸取 0.1mL，接种到粪肠球菌琼脂平皿（3.2）上，每个浓度接种两个平皿，使用无菌的涂布棒快速、准确地涂布接种于培养基表面。涂布棒不得接触平皿边缘。每个平皿用一支无菌涂布棒。涂布好的平皿盖上平皿盖后，室温放置 15 min，使接种物完全被培养基吸收为止。翻转上述平皿置 36℃ ± 1℃ 恒温培养箱（4.1）中培养 48h ± 1h。

8.3 菌落计数及筛选

培养后，选取典型菌落数在30个~300个之间的平板计数。典型粪肠球菌菌落呈圆形，表面光滑、隆起，菌落呈黑色或淡黑色，直径在0.5 mm~2.0 mm大小的菌落。然后从中选出5个特征菌落进行确证试验。

8.4 鉴定试验

8.4.1 菌种制备

自平板上挑取单菌落，划线转接培养于哥伦比亚血琼脂培养基（3.3）上，36℃±1℃培养48 h±2 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，进行生化确证试验。

8.4.2 形态观察

将挑选纯化的菌落做革兰氏染色（3.4）镜检。粪肠球菌细胞应为球形，可顺链的方向延长，直径0.5μm~1.0μm，单个、大多数成双或短链状排列，革兰氏染色阳性，无芽孢，不染色悬滴或压滴标本片下通常不运动。

8.4.3 生化鉴定试验

挑取纯化的菌落用麦氏比浊仪调节菌浓至0.5MFC。使用生化鉴定试剂盒、生化鉴定管或者微生物鉴定仪按说明进行鉴定试验。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进行该项确证试验。如果采用的培养基与本标准确证试验所用的培养基一致，可以使用其他鉴定仪器。如微生物鉴定仪也可进行该确证试验。

粪肠球菌的主要生化特性见表1。

表1 粪肠球菌的主要生化特性

菌名	半乳糖	麦芽糖	葡萄糖	乳糖	棉籽糖	甘露醇	H ₂ S	吲哚	甲基红	硝酸盐还原
粪肠球菌	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-

8.4.4 PCR 鉴定试验

引物：F:5'-TGCCGCATGGCATAAGAG-3' R:5'-TGCATCACCTCGCGGTCTAG-3'。

预计扩增产物大小为1097bp。反应体系见表2。

表2 PCR 反应体系

试剂	使用量 (uL)
2×PCRMix 缓冲液	30
上游引物 (20μM)	1
下游引物 (20μM)	1
模板 (100ng/μL)	2
ddH ₂ O	适量
总体积	50

程序设定如下：①预变性：95℃5min；②变性：95℃45s；③退火：48℃45s；④延伸：72℃45s；⑤保温：4℃30min。步骤②至④的循环数设为30。

9 检测结果

9.1 计算每块板上粪肠球菌菌落数

计算每块平板上的粪肠球菌菌落数a，使用式(1)计算

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

式中：

a——计算每块平板上的粪肠球菌菌落数；

b——挑取后经证实为粪肠球菌的菌落数；

A——挑取平板上用于验证的菌落数；

C——平板上的所有特征菌落数

最终结果按照GB/T8170数值修约规则修约至整数。

例如若某平板上有100个典型菌落，取5个鉴定，证实为粪肠球菌的是4个，则：

$$a = \frac{4}{5} \times 100 = 80$$

9.2 样品中粪肠球菌菌数的计算方法及报告

选择两个连续稀释度平板(每个稀释度至少有一块平板，其上经确证后的粪肠球菌菌数介于30~300之间)，通过式(2)计算，即为1mL或1g样品中的粪肠球菌菌数N：

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

N -----样品中粪肠球菌菌落数；

$\sum a$ -----所有平板经确证后的粪肠球菌菌数的总和；

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）。

按GB/T 8170执行。将计算出的结果保留至两位有效数字，也可将样品的粪肠球菌菌落数记录为1.0~9.9乘以10的指数幂表示。

报告每mL或每g样品的粪肠球菌估计数，单位CFU/g（mL）。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 粪肠球菌培养基

A.1.1 成分 (g/L)

胨	10.0
麦芽糖	20.0
酵母浸粉	10.0
甘油磷酸钠	10.0
氯化钠	5.0
乳糖	1.0
溴甲酚紫	0.015
叠氮钠	0.4
TTC	0.1
琼脂	13.0

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25℃时为7.2±0.2。煮沸使用。

A.2 哥伦比亚琼脂培养基

A.2.1 成分 (g/L)

酪蛋白胰酶消化物	10.0
心胰酶消化物	3.0
玉米淀粉	1.0
琼脂	13.0~15.0
肉胃酶消化物	5.0
酵母浸出粉	5.0
氯化钠	5.0

A.2.2 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20℃~25℃时为7.3±0.2。121℃灭菌15min~20min。

A.3 革兰氏染色

A.3.1 结晶紫染色液

A.3.1.1 成分

结晶紫	1g
95%乙醇	20mL
1%草酸铵水溶液	80mL

A.3.1.2 制法

将结晶紫溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.3.2 革兰氏碘液

A.3.2.1 成分

碘	1g
碘化钾	2g
蒸馏水	300mL

A.3.2.2 制法

将碘化钾先进行混合，加入蒸馏水少许，充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至300mL。

A.3.3 沙黄复染液

A.3.3.1 成分

沙黄	0.25g
95%乙醇	10mL
蒸馏水	90mL

A.3.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.3.4 染色法

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

地方标准信息服务平台