

ICS 65.120
CCS B 46

团 体 标 准

T/CFIAS 6019—2025

微生物饲料添加剂中丁酸梭菌的测定

Determination of Clostridium butyricum in microbial feed additives

2025-8-1 发布

2025-9-1 实施

中国饲料工业协会 发 布

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。

本文件由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：上海市兽药饲料检测所、江苏远山生物技术有限公司、安徽省畜牧技术推广总站、安徽省农业科学院农业工程研究所。

本文件主要起草人：姜芹、张好、黄士新、张莉、孙冰清、张亦菲、商军、张文刚、曹莹、顾欣、吴雨珊、胡浩、柴虹、刘祚军、卢亚洲、尹强、李瑞、李娟、方雅红。

微生物饲料添加剂中丁酸梭菌的测定

1 范围

本文件描述了微生物饲料添加剂中丁酸梭菌的计数和鉴定的方法。

本文件适用于微生物饲料添加剂中丁酸梭菌的测定。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试剂或材料

4. 1 水：GB/T 6682，三级。
4. 2 灭菌生理盐水：按照附录 A 中 A. 1 的规定执行。
4. 3 标准菌株：丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum*)。
4. 4 亚硫酸铁培养基：按照附录 A 中 A. 2 的规定执行。
4. 5 强化梭菌培养基：按照附录 A 中 A. 3 的规定执行。
4. 6 革兰氏染色液：按照附录 A 中 A. 4 的规定执行。
4. 7 细菌生化鉴定商品化试剂。
4. 8 10×PCR 反应液。
4. 9 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTPs) 混合液：含脱氧腺苷三磷酸 (dATP)、脱氧胸苷三磷酸 (dTTP)、脱氧鸟苷三磷酸 (dGTP) 和脱氧胞苷三磷酸 (dCTP) 各 2.5 mmol/L。
4. 10 *Taq* DNA 聚合酶：5 U/μL。

5 仪器设备

5. 1 天平：精度为 0.01 g。
5. 2 拍击式均质器或振荡器。
5. 3 厌氧罐：2.5 L 或 5 L（配厌氧产气袋）或相当性能的厌氧装置。
5. 4 恒温培养箱：36 °C ± 1 °C。
5. 5 显微镜：40×～1 000×。
5. 6 离心机：转速不低于 10 000 r/min。
5. 7 微量移液器：2.5 μL, 10 μL, 100 μL, 1 000 μL。

5.8 无菌培养皿：直径为90 mm。

5.9 PCR扩增仪或荧光定量PCR仪。

6 样品

实验室收到样品后，应采取必要措施防止样品中微生物数量的变化，并尽快测定。

7 试验步骤

7.1 活菌计数

7.1.1 试样稀释

无菌条件下称取试样25 g（或量取25 mL），加入装有225 mL灭菌生理盐水的无菌均质袋或无菌锥形瓶中，均质拍打2 min~3 min或200 r/min振荡30 min，制成1:10稀释液。用无菌吸管或微量移液器移取上述稀释液1 mL，注入9 mL灭菌生理盐水中，充分混匀，制成1:100稀释液。按上述操作方法，制备10倍递增系列稀释液，每递增稀释一次换用1次1 mL无菌吸管或吸头。

7.1.2 接种培养

选择3个适宜稀释度，用无菌吸管或微量移液器移取0.1 mL稀释液加至干燥后的亚硫酸铁培养基平板表面，用灭菌涂布棒将稀释液均匀涂于表面。每个稀释度涂布两个平板，同时吸取0.1 mL灭菌生理盐水作空白对照。待稀释液吸收后，再倾注5 mL~7 mL冷却至45 °C~50 °C的亚硫酸铁培养基，均匀覆盖在平板表面，凝固后倒置，36 °C±1 °C厌氧培养18 h±2 h。

7.1.3 菌落计数

亚硫酸铁培养基中，典型的丁酸梭菌菌落呈圆形，中心为黑色实心。选择菌落数在30个~300个之间的平板进行计数。

7.2 形态观察与鉴定

7.2.1 菌落挑选和纯培养

随机挑选亚硫酸铁培养基平板上3个或以上典型菌落分别划线接种于强化梭菌培养基平板上，倒置，36 °C±1 °C厌氧培养18 h±2 h。

7.2.2 形态观察

强化梭菌培养基上，典型的丁酸梭菌菌落呈乳白色至浅黄色，圆形或不规则，稍凸，直径约1 mm~6 mm。

挑取典型菌落进行革兰氏染色。丁酸梭菌为革兰氏阳性菌，大小 $(0.6\text{ }\mu\text{m}\sim1.2\text{ }\mu\text{m})\times(3.0\text{ }\mu\text{m}\sim7.0\text{ }\mu\text{m})$ ，直杆状，端圆，单个、成对、短链、偶呈长丝状。孢子卵圆，偏心或次端生，无孢子外壁和附属丝。

7.2.3 菌株鉴定

丁酸梭菌生理生化特征和分子生物学鉴定按照附录B执行。若菌株形态符合7.2.2的描述，且符合附录B.1的生理生化特征或附录B.2的分子生物学鉴定结果，可确认为丁酸梭菌。

8 结果与报告

8.1 菌落总数的计算

根据菌落计数结果和证实为丁酸梭菌的菌落数，计算出样品中的丁酸梭菌数，以A计，单位为菌落形成单位每克或每毫升（CFU/g或CFU/mL），按式（1）计算：

式中：

B ——丁酸梭菌疑似菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；
 C ——确认为丁酸梭菌的菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；
 N ——选出的丁酸梭菌疑似菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；
 f ——稀释度，单位为每克或每毫升（/g 或/mL）。

8.2 报告

计算结果保留2位有效数字，用10的指数形式表示。

附录 A
(规范性)
试剂和培养基

试剂和培养基按照A. 1~A. 4配制或用商品化产品。

A. 1 灭菌生理盐水

A. 1. 1 成分

氯化钠	8.5 g
水	1000 mL

A. 1. 2 制法

取氯化钠完全溶于水中，在121 °C灭菌15 min。

A. 2 硫酸亚铁培养基

A. 2. 1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
偏重亚硫酸钠	1.0 g
柠檬酸铁铵	1.0 g
琼脂	20.0 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 °C的pH值为7.6±0.1，加入琼脂，加热溶化，在121 °C灭菌15 min。

A. 3 强化梭菌培养基

A. 3. 1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	10.0 g
酵母粉	3.0 g
葡萄糖	5.0 g
可溶性淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0 g
醋酸钠	3.0 g
L-半胱氨酸盐酸盐	0.5 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 °C的pH值为6.8±0.1，加入琼脂，加热溶化，在121 °C灭菌15 min。

A. 4 革兰氏染色液

A. 4. 1 结晶紫染色液

A. 4. 1. 1 成分

结晶紫	1.0 g
-----	-------

95%乙醇	20 mL
1%草酸铵溶液	80 mL

A. 4. 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. 4. 2 革兰氏碘液

A. 4. 2. 1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
水	300 mL

A. 4. 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. 4. 3 沙黄染色液

A. 4. 3. 1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
水	90 mL

A. 4. 3. 2 制法

将沙黄溶解于95%乙醇中，然后加入水稀释，混匀。

附录 B
(规范性)
生理生化特征和分子生物学鉴定

B. 1 生理生化特征

使用细菌生化鉴定试剂盒进行生化鉴定,同时设阴性对照(空白)和阳性对照(丁酸梭菌标准菌株)。丁酸梭菌生理生化特征应符合表B.1的规定。

表A. 1 丁酸梭菌生理生化特征

项目	结果
葡萄糖产酸	+
乳糖产酸	+
木糖产酸	+
棉籽糖产酸	+
水杨苷产酸	+
淀粉水解	+
明胶液化	-
硝酸盐还原	-

注：“+”表示不小于90%的菌株呈阳性反应，“-”表示不小于90%的菌株呈阴性反应。

B. 2 分子生物学鉴定

B. 2. 1 方法选择

B.2.3和B.2.4可任选其一。

B. 2. 2 细菌模板DNA提取

取纯化后的细菌培养物适量,加入含200 μL灭菌水的离心管中,混合均匀。99 °C加热10 min, -20 °C或以下冻融一次,12 000 r/min离心2 min,取上清为模板。也可使用商品化细菌基因组DNA提取试剂盒,具体操作参照说明书进行。同时设空白对照(灭菌水)、阴性对照(非丁酸梭菌细菌)和阳性对照(丁酸梭菌标准菌株)。

B. 2. 3 PCR测序

B. 2. 3. 1 引物序列

引物系列为:

——上游引物 27F: 5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ;
下游引物1492R: 5' -GGTTACCTTGTACGACTT-3' 。

B. 2. 3. 2 扩增体系和程序

扩增体系为:

——10×PCR 缓冲液 5 μL;
——dNTPs 4 μL;
——TaqDNA 聚合酶 0.4 μL;
——引物 (10 μmol/L) 各 1 μL;
——模板 DNA 2 μL;
灭菌水补足至50 μL。

注: 扩增体系或选用商品化试剂盒。

扩增程序为：94 °C/5 min；30个循环：94 °C/1 min，52 °C/1 min，72 °C/2 min；72 °C/10 min后4 °C保存。

B. 2. 3. 3 结果判断

产物进行测序，丁酸梭菌与标准菌株ATCC 19398的16S rRNA（16S 核糖体核糖核酸）基因序列进行比对，相似度不低于99%。标准菌株ATCC 19398的16S rRNA的基因序列见图B. 1。

```

GTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGTGCTTAACACATGCAAG
TCGAGCGATGAAGCTCTCGGGAGTGGATTAGCGCGGACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGGGGAATAGCCTTCGAAAGGAAGATT
AATACCGCATATAAGATTGTAGTACCGCATGGTACAGCAATTAAAGGAGTAATC
CGCTATGAGATGGACCCCGCGTCGCTAGTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTC
ACCAAGGGCAGCAGTGGCTAGCGGAGGGGAGATCGGACACATTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGC
ACAATGGGAAACCCGTATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGACTGTCTT
CGGATTNTAAANCTGTCTTAAAGGACGATAATNACGGTACCTAACGGAGG
AAGCCACGGCTAAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTGTCCGGATTACTGGCGCTAAAGGGAGCGTAGGTGGATATTAAAGT
GGGATGTGAAATACCCGGCTAACCTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGATA
TCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGGAGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATTAGGAAGAATACCAAGTGGCGAAGGGCCTTCTGGACTGTAAC
TGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGG
TAGTCCACGCCGTAACCGATGAATACTAGGGTAGGGGTTGTCTGACCTC
TGTGCGCCGCTAACCGATTAAAGTATTCCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAG
AATTAAAACCTCAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCMGCGGAGCATGT
GGTTAATTGCAAGCAACCGAAGAACCTTACACTAGACTTGACATCTCTG
AATTACTCTGAATGGAGGAAGCCACTTCGGTGGCAGGAAGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGGTTAAGTCCCAGCAAC
GAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCAGCTAGCGAG
ACTGCCGGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCCTATGCTAGGGTACACACGTGCTACAATGGTGGTACAATGAGATG
CAACCTCGCAGAGTGGAGCAAACATAAAACCGATCTCAGTTGGATTGT
AGGCTGAAACTCGCCATACATGAAGCTGGAGTTGCTAGTAATCGCGAATCAG
AATGTCGCGGTGAATACGTTCCGGGCTGTACACACCGCCGTCACACC
ATGAGAGTTGGCAATACCACAAGTTGAGCTAACCGCAAGAGGCAGCG
ACCTAAGGTAGGGTCAAGCGATTGGGTGAAT

```

注：登录号为NR_112170.1。

图A. 1 标准菌株 ATCC 19398 的 16S rRNA 基因序列

B. 2. 4 荧光定量PCR扩增

B. 2. 4. 1 引物和探针序列

引物和探针序列为：

——上游引物：5' -GAGGGCGGACAAATGGATGA-3'；

——下游引物：5' -ACAGATGCTCTACTGCTCTTACA-3'；

探针：5' -FAM-TGGCGGTGGTCAACCGCATGTTGAGCT-BHQ1-3'。

B. 2. 4. 2 扩增体系和程序

扩增体系为：

——10×PCR 缓冲液 2 μL；

——dNTPs 2 μL；

——TaqDNA 聚合酶 0.2 μL；

——引物和探针各 1 μL (10 μmol/L)；

——模板 DNA 2 μL；

灭菌水补足至20 μL。

注：扩增体系或选用商品化试剂盒。

根据不同型号实时荧光定量PCR仪和试剂情况，可适当调整体系用量。

扩增程序为：95 °C/30 s；95 °C/10 s，60 °C/20 s，40个循环。

B. 2. 4. 3 结果判断

阴性对照和空白对照无Ct值且无典型扩增曲线，阳性对照Ct值<35且扩增曲线典型，表明试验有效，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。

T/CFIAS 6019—2025