



# 中华人民共和国国家标准

GB ××××—××××

## 饲料添加剂 第5部分：微生物 植物乳杆菌

Feed additive — Part 5: Live microorganisms — *Lactobacillus plantarum*

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会

发布

## 前 言

GB 7300《饲料添加剂》按产品分为若干部分：

本文件为 GB 7300 的第 503 部分。

本文件按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出并归口。

本文件起草单位：国家粮食局科学研究院。

本文件主要起草人：张晓琳、韩伟、李爱科、魏永刚、李晓敏、赵晨、黄颖、郝淑红。

# 饲料添加剂 第5部分：微生物 植物乳杆菌

## 1 范围

GB 7300 的本部分规定了饲料添加剂植物乳杆菌的术语和定义、产品要求、试验方法、检测规则、标签、包装、运输、储存、保质期的要求。

本文件适用于仅含植物乳杆菌的饲料添加剂。

## 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 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 4789.3	食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群测定
GB/T 4789.5	食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验
GB/T 4789.10	食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验
GB/T 4789.15	食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数
GB/T 6435	饲料中水分的测定
GB/T 8170	数值修约规则与极限数值的表示和判定
GB/T 10648	饲料标签
GB/T 13079	饲料中总砷的测定
GB/T 13080	饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
GB/T 13081	饲料中汞的测定
GB/T 13082	饲料中镉的测定方法
GB/T 13091	饲料中沙门氏菌的测定
GB/T 14699.1	饲料 采样
GB/T 17480	饲料中黄曲霉毒素 B1 的测定 酶联免疫吸附法

## 3 术语和定义

植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*

属于乳杆菌科、乳杆菌属，革兰氏阳性，菌体杆状，无芽孢，模式菌株为 ATCC 14917。

## 4 要求

## 4.1 微生物学指标

## 4.1.1 菌体形态

菌体细胞呈圆端直杆状，通常  $0.9\mu\text{m}\sim 1.2\mu\text{m}$  宽， $3\mu\text{m}\sim 8\mu\text{m}$  长，单个、成对或成短链。

## 4.1.2 菌落形态

植物乳杆菌在改良 TJA、改良 MC 或 MRS 培养基上菌落生长形态特征如表 1。

表 1 植物乳杆菌在不同培养基上菌落特征

改良 TJA	改良 MC	MRS
平皿底为黄色，菌落中等大小，微白色，湿润，边缘不整齐，直径 $3\text{mm}\pm 1\text{mm}$ ，如棉絮团状菌落	平皿底为粉红色，菌落较小，圆形，红色，边缘似星状，直径 $2\text{mm}\pm 1\text{mm}$ ，有淡淡的晕	菌落为白色，较大，直径 $3\text{mm}\pm 1\text{mm}$

## 4.1.3 生理生化特征

在改良 TJA、改良 MC 或 MRS 琼脂斜面上，于  $36\text{℃}\pm 1\text{℃}$ ， $24\text{h}\sim 48\text{h}$  培养，刮取菌苔，进行表 2 中试验，以验证植物乳杆菌生理生化特征。

表 2 植物乳杆菌生理生化特征

特征	结果	特征	结果
革兰氏染色	+	蔗糖	+
4%牛磺胆酸钠	+	麦芽糖	+
精氨酸产氨	-	甘露醇	+
碳水化合物反应		水杨苷	+
七叶苷	+	山梨醇	+
纤维二糖	+	棉籽糖	+
注：+为阳性反应；-为阴性反应。			

## 4.2 感官指标

产品性状应符合包装上标明的产品固有的形状、色泽、气味、均匀程度、杂质等，无异臭味。

#### 4.3 水分

不高于 8.0%。

#### 4.4 活菌数

植物乳杆菌活菌数 $\geq 1.0 \times 10^9$  CFU/g。

注：活菌数以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。

#### 4.5 卫生标准

植物乳杆菌饲料添加剂应符合表 3 的要求。

表 3 植物乳杆菌饲料添加剂卫生指标

项目	指标	
杂菌率，%	≤	1.0
黄曲霉毒素 B1， $\mu\text{g}/\text{kg}$	≤	10.0
砷的允许量， $\text{mg}/\text{kg}$	≤	2.0
铅的允许量， $\text{mg}/\text{kg}$	≤	5.0
汞的允许量， $\text{mg}/\text{kg}$	≤	0.1
镉的允许量， $\text{mg}/\text{kg}$	≤	0.5
大肠菌群的允许量，CFU/100g	≤	400
霉菌和酵母总数的允许量，CFU/g	<	$1.0 \times 10^4$
致病菌（志贺氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌）	不得检出	

### 5 试验方法

#### 5.1 抽样

按 GB/T 14699.1 进行样品的采集。采样时应特别注意样品的代表性和避免采样时的污染。首先准备好灭菌容器和采样工具，如灭菌牛皮纸袋、均质袋或广口瓶、金属勺和刀。在卫生学调查基础上，采取有代表性的样品，样品采集后应立即进行检验。

#### 5.2 感官检验

取一定量（250g）的样品于无色玻璃杯中，自然光线下采用目测、鼻嗅的方法进行检验。

#### 5.3 水分测定

按 GB/T 6435 检测。

## 5.4 植物乳杆菌检测

### 5.4.1 检验程序

植物乳杆菌检验程序流程图如图 1。

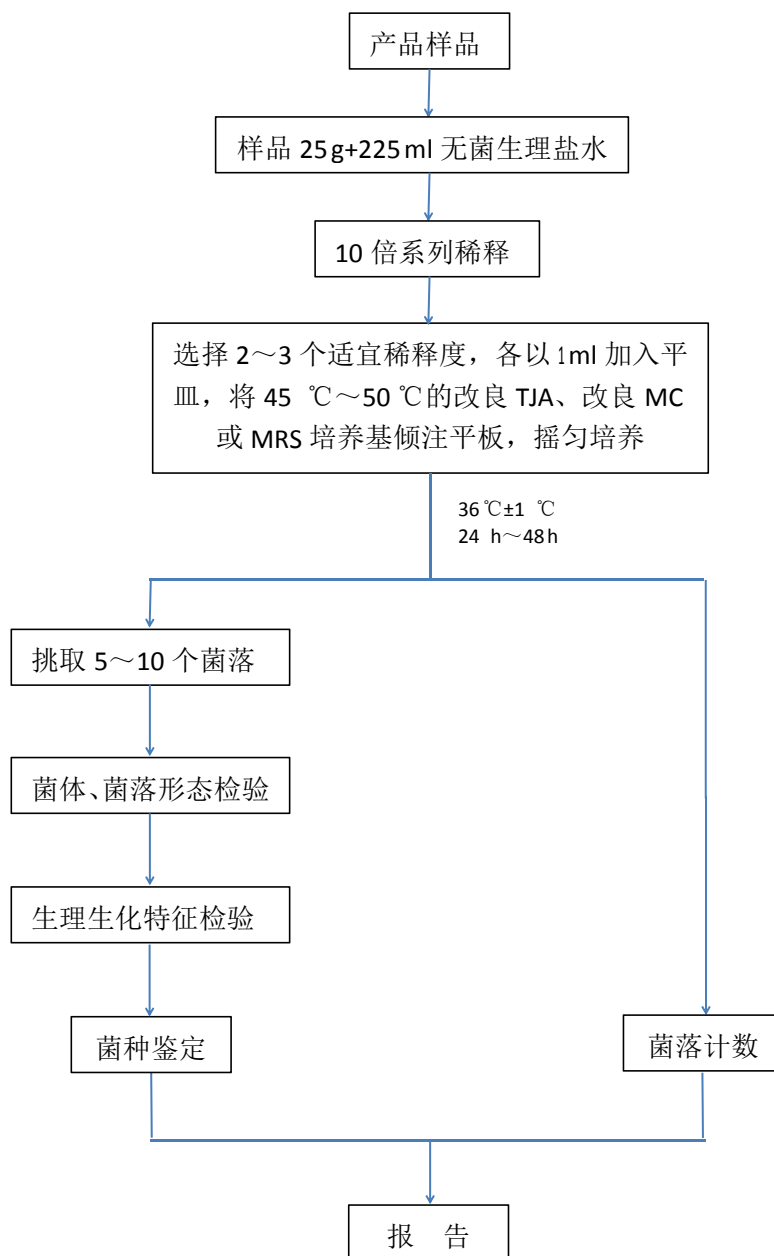


图 1 植物乳杆菌检验程序流程图

### 5.4.2 菌种鉴定

#### 5.4.2.1 样品制备

在按照 GB/T 14699.1 进行采样基础上，称取  $25.0\text{g}\pm 0.01\text{g}$  样品，加入 225 ml 无菌生理盐水中均质，待均匀后，再将样品用无菌生理盐水按十倍稀释法制成不同浓度稀释液。取 1.0ml 合适浓度稀释液，注

入无菌平板，每个稀释度做 3 次重复。将融化并冷却至 45℃～50℃的改良 TJA、改良 MC 或 MRS 培养基，向每个培养皿中倒入约 15 ml～20 ml，摇匀并凝固，制成相应培养基的琼脂平板。36℃±1℃倒置培养 24 h～48 h。

5.4.2.2 菌落选择：用接种针或接种环随机挑取 5～10 个菌落。

5.4.2.3 菌体形态检验：涂片染色，用光学显微镜观察菌体形态。

5.4.2.4 菌落形态检验：观察菌落颜色、形态。

5.4.2.5 生理生化特征检验：接种并进行 4.1.3 表 2 中各项试验。

### 5.4.3 菌落计数

#### 5.4.3.1 植物乳杆菌计数

5.4.2.1 项中菌落总数减去杂菌数之差，即得植物乳杆菌计数结果。

#### 5.4.3.2 稀释度

选取适宜的稀释度，菌落在 30～300 之间的平板进行计数。

#### 5.4.3.3 计算方法

计算方法见公式（1）。

$$N = \frac{\sum C}{[V(n_1 + 0.1n_2)d]} \dots\dots\dots (1)$$

式中：N——样品中菌落总数

$\sum C$ ——两个连续稀释度全部平板上菌落数总和

V——每个平板上接种的体积，ml

$n_1$ ——第 1 个稀释度（低稀释倍数）平板个数

$n_2$ ——第 2 个稀释度（高稀释倍数）平板个数

d——相对第 1 稀释度的稀释因数

结果为每克产品微生物菌落数，以科学计数法表示结果。

具体结果输出实例应参考 GB/T 4789.2-2010。

#### 5.4.3.4 允许差

两次平行测定结果的相对偏差不大于 2%。

### 5.5 卫生检验

#### 5.5.1 杂菌率检测

$$\text{杂菌率} = \frac{\text{杂菌数}}{(\text{植物乳杆菌活菌数} + \text{杂菌数})} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

#### 5.5.2 黄曲霉素 B1 检验

按照 GB/T 17480 执行。

#### 5.5.3 砷含量测定

按照 GB/T 13079 执行。

#### 5.5.4 汞含量测定

按照 GB/T 13081 执行。

#### 5.5.5 镉含量测定

按照 GB/T 13082 执行。

#### 5.5.6 铅含量测定

按照 GB/T 13080 执行。

#### 5.5.7 霉菌和酵母总数检测

按照 GB/T 4789.15 执行。

#### 5.5.8 大肠菌群检测

按照 GB/T 4789.3 执行。

#### 5.5.9 致病菌检测

按照 GB/T 4789.5、GB/T 4789.10、GB/T 13091 执行。

### 6 检验规则

#### 6.1 出厂检验（交收检验）

感官指标、水分、微生物含量（包括活菌数和杂菌）为出厂检验项目，由生产厂家或公司的质检部门进行检验，检验合格并签发质量合格证的产品方可出厂。

#### 6.2 型式检验（例行检验）

##### 6.2.1 一般情况下，企业一年进行一次型式检验，下列检验项应包括：

- a) 菌种遗传特征检验；与《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)基因全序列进行比对，相似度在 99%以上。
- b) 国家质量监督机构要求的其它型式检验。

##### 6.2.2 但有下列情况之一时，企业半年进行一次型式检验，下列检验项应包括：

- a) 更改主要原辅材料和关键生产工序；
- b) 新试制的产品或正常生产的产品停产 3 个月以上（或半年），重新恢复生产时；
- c) 国家质量监督机构提出要求进行型式检验。



## 7 判定规则

7.1 所验项目全部合格，判定为该批次产品合格。

7.2 检验结果中有任何指标不符合本部分规定时，可自同批产品中重新加倍取样进行复检。复检结果即使有一项指标不符合本部分规定，则判定该批产品不合格。

7.3 各项目指标的极限数值判定按 GB/T 8170 中全数值比较法执行。

## 8 标签、包装、运输、储存、保质期

### 8.1 标签

8.1.1 采用鲜明的标签贴于外包装显著位置；

8.1.2 标签内容应符合 GB 10648 的要求；

8.1.3 标签应标明所添加微生物的学名和数量。

### 8.2 包装

应采用符合国家相关标准的、无毒的包装材料。

### 8.3 运输

运输中应避免日晒，搬运装卸时小心轻放，不得与有毒物质混装混运。

### 8.4 储存

应保存于干燥、阴凉、通风的仓库中，避免直接日晒和高温地表放置，防止长时间 30℃ 以上高温，不得和有毒、有害物质一起堆放，严防污染。建议使用 10℃ 以下的冷藏条件。

### 8.5 保质期

本产品保质期为 6 个月。

附录 A  
(资料性附录)  
专用培养基及试剂

### A.1 改良番茄琼脂培养基（改良 TJA 培养基）

#### A.1.1 成分

番茄汁	50.0 ml
酵母抽提液	5.0 g
牛肉膏	10.0 g
乳糖	20.0 g
葡萄糖	2.0 g
磷酸氢二钾	2.0 g
吐温-80	1.0 g
乙酸钠	0.5 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	加至 1000 ml

pH 6.8±0.2

#### A.1.2 制法

番茄汁的制作：将新鲜番茄洗净，切碎（切勿捣碎），放入锥形瓶，置 4℃ 冰箱 8h~12h，取出后用纱布过滤。如一次使用不完，可将其置入 0℃ 冰箱，可保存四个月。使用时让其常温下自然溶解。

制法：将所有成分加入蒸馏水中，加热溶解，校正 pH6.8±0.2。分装，121℃ 高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热熔化琼脂，冷至 45℃~50℃ 时使用。

### A.2 改良 MC 培养基

#### A.2.1 成分

大豆蛋白胨	5.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
葡萄糖	20.0 g

乳糖	20.0g
碳酸钙	10.0g
琼脂	18.0g
1%中性红溶液	5ml
硫酸多粘菌素 B（酌情而加）	10 万 IU
蒸馏水	加至 1000ml
pH6.0	

#### A.2.2 制法

将前面 7 种成分加入蒸馏水中，加热溶解，校正 pH 6.0，加入中性红溶液。分装烧瓶，121℃ 高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热融化琼脂，冷至 45℃~50℃ 时使用，酌情加或不加硫酸多粘菌素 B（疑有杂菌污染时，可加多粘菌素 B，混匀后使用）。

#### A.3 MRS 培养基

##### A.3.1 成分

蛋白胨	10.0g
牛肉浸膏	10.0g
酵母浸膏	5.0g
葡萄糖	20.0g
吐温-80	1.0g
柠檬酸铵	2.0g
乙酸钠	5.0g
硫酸镁	0.1g
硫酸锰	0.05g
磷酸氢二钾	2.0g
琼脂	18.0g
蒸馏水	加至 1000ml
pH 7.3±0.2	

##### A.3.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，加热不断搅拌，煮沸使琼脂完全溶解，115℃ 高压灭菌 25 min~30 min。

#### A.4 营养琼脂培养基

#### A.4.1 成分

蛋白胨	10.0g
牛肉膏	3.0g
氯化钠	5.0g
琼脂	18.0g
蒸馏水	加至 1000ml

pH 7.0±0.2

#### A.4.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，加热不断搅拌，煮沸使琼脂完全溶解，121℃高压灭菌 25 min~30 min。

#### A.5 生理盐水

##### A.5.1 成分

氯化钠	8.5g
蒸馏水	加至 1000ml

##### A.5.2 制法

将氯化钠加入蒸馏水中，搅拌溶解，分装，121℃高压灭菌 15 min。

#### A.6 革兰氏染色液

##### A.6.1 结晶紫染色液

###### A.6.1.1 成分

结晶紫	8.5g
95%乙醇	20ml
1%草酸铵水溶液	80ml

###### A.6.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

##### A.6.2 革兰氏碘液

###### A.6.2.1 成分

碘	1.0g
碘化钾	2.0g
蒸馏水	300ml

###### A.6.2.2 制法

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

### A.6.3 沙黄复染液

#### A.6.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 ml
蒸馏水	90 ml

#### A.6.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

### A.6.4 染色法

A.6.4.1 将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

A.6.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A.6.4.3 滴加 95%乙醇脱色，约 15 s~30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。

A.6.4.4 滴加复染液，复染 1 min。水洗、待干、镜检。

### A.7 4%牛磺胆酸钠或糖发酵管

#### A.7.1 基础成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
吐温 80	0.5 ml
琼脂	1.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 ml
蒸馏水	1000 ml

#### A.7.2 制法

按 4%加入牛磺胆酸钠或按 0.5%加入所需糖类，并分装小试管，121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

### A.8 精氨酸产氨

#### A.8.1 PY 基础培养基

##### A.8.1.1 成分

蛋白胨	0.5 g
胰酶解酪朊	0.5 g

酵母提取物	1.0g
盐溶液	4.0ml
蒸馏水	100ml

#### A.8.1.2 盐溶液

无水氯化钙	1.0g
七水硫酸镁	0.48g
磷酸氢二钾	1.0g
磷酸二氢钾	1.0g
碳酸氢钠	10.0g
氯化钠	2.0g
蒸馏水	1000ml

#### A.8.1.3 制法

A.8.1.4.1 将无水氯化钙和七水硫酸镁混合溶解于 300ml，再加 500ml 水，一边搅拌一边加入其它盐类，直至全部溶解，加入 200ml 水，混合均匀，即为盐溶液；存于 4℃，备用。

A.8.1.4.2 将 4.0ml 盐溶液加至 A.8.1.1 中其它成分组成的溶液，121℃ 高压灭菌 15min~20min。

#### A.8.2 精氨酸溶液

##### A.8.2.1 成分

L-精氨酸	1.5g
半胱氨酸（1g/10ml H <sub>2</sub> O）	0.05ml
蒸馏水	10ml
pH 7.0±0.2	

##### A.8.2.2 制法

将 3 滴精氨酸溶液滴入 3ml PY 培养基中。

#### A.8.3 奈氏试剂

##### A.8.3.1 配方

###### A 液

氢氧化钾	20g
蒸馏水	50ml

###### B 液

碘化钾	5g
碘化汞	10g
蒸馏水	50ml

#### A.8.3.2 制法

将 A 液、B 液混合、过滤，贮存于暗色瓶中。

#### A.8.4 接种和培养

接种试验菌至含精氨酸的培养基中，并同时接种于不含精氨酸的培养基作为对照。至室温培养 24 h~72h。

## 附录 B

(资料性附录)

## 模式菌株 ATCC 14917 的 16 S rRNA 基因序列

```

1  gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg aacgaactct ggtattgatt ggtgcttgca
61  tcatgattta catttgagtg agtggcgaac tggtgagtaa cacgtgggaa acctgcccag
121 aagcggggga taacacctgg aaacagatgc taataccgca taacaacttg gaccgcatgg
181 tccgagtttg aaagatggct tcggctatca cttttggatg gtcccgcggc gtattagcta
241 gatggtgggg taacggctca ccatggcaat gatacgtagc cgacctgaga gggtaatcgg
301 ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc
361 acaatggacg aaagtctgat ggagcaacgc cgcgtgagtg aagaagggtt tccggctcgta
421 aaactctgtt gttaaagaag aacatatctg agagtaactg ttcaggattt gacggtatth
481 aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgagg taatacgtag gtggcaagcg
541 ttgtccggat ttattggggc taaagcgagc gcaggcgggt ttttaagtct gatgtgaaag
601 ccttcggctc aaccgaagaa gtgcatcggg aactgggaaa cttgagtgca gaagaggaca
661 gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcy tagatataat gaagaacacc agtggcgaag
721 gcggctgtct ggtctgtaac tgacgctgag gctcgaagt atgggtagca aacaggatta
781 gataccctgg tagtccatac cgtaaacgat gaatgctaag tgttgagggg tttccgcctt
841 tcagtgtctg agctaacgca ttaagcattc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa
901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtgaggca tgtgggttaa ttcgaagcta
961 cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatac tatgcaaata taagagatta gacgttccct
1021 tccgggacat ggatacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt atcagttgcc agcattaagt tgggcaactct
1141 ggtgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaata atcatgcccc
1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggatggtaca acgagttgcy aactcgcgag
1261 agtaagctaa tctcttaaag ccattctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat
1321 gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcy gtgaatacgt tcccgggcct
1381 tgtacacacc gcccgtcaca ccatgagagt ttgtaacacc caaagtcggt ggggtaacct
1441 tttaggaacc agccgcctaa ggtggacaga tgat

```