



团 体 标 准

T/GDAAV XXXX—XXXX

抗鸡源产气荚膜梭菌的益生菌筛选 及深度鉴评技术规范

Technical Specification for Screening and Evaluation of
Probiotics Against Chicken-derived *Clostridium Perfringens*

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

广东省畜牧兽医学会 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 XXXX 提出。

本文件由广东省畜牧兽医学会归口。

主要起草单位：XXXX。

本文件主要起草人：XXXX。

。

抗鸡源产气荚膜梭菌的益生菌筛选及深度鉴评技术规范

1 范围

本文件规定了抗鸡源产气荚膜梭菌的益生菌筛选与鉴评的术语和定义、益生菌的分离与纯化、体外拮抗能力测定、安全性评价、抗逆性分析、益生菌体内效能验证的技术要求。

本文件适用于从鸡源样品中分离获得的乳酸杆菌、芽孢杆菌、肠球菌等候选益生菌的筛选，以及其抗鸡源产气荚膜梭菌功能的综合评价。

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 4789.28-2024 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/T 18869-2019 饲料中大肠菌群的测定
- GB/T 20191-2006 饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验
- GB/T 26426-2010 饲料中产气荚膜梭菌的检测
- NY/T 1442-2007 饲料添加剂微生物嗜酸乳杆菌
- NY/T 4656-2025 动物源产气荚膜梭菌分离与鉴定技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

益生菌 probiotics

本标准中益生菌特指拟用于鸡肠道健康调控的活菌制剂。

3.2

产气荚膜梭菌 *clostridium perfringens*

一种革兰氏阳性、厌氧、能形成芽孢的条件致病菌，是引起鸡坏死性肠炎的主要病原体。

3.3

抑菌圈 inhibition zone

在琼脂扩散试验（如牛津杯法）中，因益生菌或其代谢产物抑制指示菌生长而形成的透明区域或生长受抑区域。

3.4

深度鉴评 depth evaluation

综合运用表型试验、基因型分析和动物试验对益生菌的功能性、安全性和稳定性进行的全面评估。

4 符号与缩略词

下列符号和缩略词适用于本文件。

BHI: 脑心浸液 (Brain Heart Infusion)

TSB: 胰酪大豆胨肉汤 (Tryptic Soy Broth)

CFU: 菌落形成单位 (Colony-Forming Units)

MRS: 乳酸细菌培养基 (de Man, Rogosa and Sharpe Agar)

FTG: 流体硫乙醇酸盐培养基 (Fluid Thioglycollate Medium)

MIC: 最低抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration)

5 益生菌的分离与纯化

5.1 样品采集

采集健康鸡的新鲜粪便或盲肠内容物, 置于无菌采样管中, 4℃保存, 24小时内送检。

5.2 菌株分离

取样品进行10倍梯度稀释, 选择合适稀释度 (如 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6}), 取100 μL涂布于相应培养基平板。乳酸菌分离用MRS, 37℃厌氧培养48小时; 芽孢杆菌分离用营养琼脂, 37℃需氧培养24 h; 肠球菌分离用肠球菌琼脂 (或胆汁七叶苷琼脂), 37℃需氧培养24小时~48小时。根据菌落形态 (乳酸菌: 圆形、凸起、乳白色; 芽孢杆菌: 干燥、不透明、边缘不规则; 肠球菌: 灰白色、针尖状、光滑) 挑取典型单菌落, 连续划线纯化3次, 获得纯培养物。纯化后应进行16S rRNA基因测序或MALDI-TOF质谱鉴定, 鉴定到种水平, 并记录序列或图谱信息。

6 体外拮抗能力测定

6.1 指示菌的活化

将鸡源产气荚膜梭菌标准株或临床分离株接种于FTG培养基或TSB厌氧肉汤中, 37℃厌氧培养16小时~20小时, 调整浓度至约 1×10^8 CFU/mL, 备用。

6.2 牛津杯法

将融化并冷却至45℃的BHI半固体琼脂与产气荚膜梭菌菌液 (终浓度约 10^6 CFU/mL) 混匀后倾注平板。待凝固后, 放置无菌牛津杯, 向杯中加入150 μL待测益生菌发酵上清液。4℃扩散2 h后, 37℃厌氧培养18小时~24小时, 测定抑菌圈直径。抑菌圈直径 ≥ 15 mm判定为强拮抗活性。

6.3 抑菌物质稳定性分析

将具有抑菌活性的发酵上清液分别进行以下处理:

(1) 调节pH至2.0、4.0、7.0、8.0;

(2) 加热至60℃、80℃、100℃处理30分钟;

(3) 加入蛋白酶K (终浓度1 mg/mL)，37℃孵育1小时。以未处理样品为对照，同时设空白培养基对照 (未发酵的MRS/营养肉汤)。重复6.2步骤，观察抑菌活性变化。若经蛋白酶处理后抑菌活性明显降低或消失，提示抑菌物质可能含有蛋白质类成分。

7 安全性评价

7.1 溶血性

将待测菌划线接种于血琼脂平板，37℃培养24小时~48小时。若无溶血圈或呈现 α 溶血 (草绿色溶血环) 判定为安全；出现 β 溶血 (透明溶血环) 应判定为不安全，予以淘汰。

7.2 抗生素敏感性试验

采用纸片扩散法或MIC测定法，检测待测菌对氨苄西林、万古霉素、庆大霉素、红霉素、四环素、氯霉素等临床重要抗生素的敏感性。判定标准参照CLSI (美国临床和实验室标准协会) 或EUCAST (欧洲药敏试验委员会) 最新标准进行判定。若检出耐药基因，需结合药敏表型综合评估，具有可转移耐药基因的菌株不得选用。

8 抗逆性分析

将待测菌悬液 (约 10^8 CFU/mL) 加入pH 2.5的人工胃液中，37℃孵育2小时，测定活菌数 (采用平板倾注法或涂布法计数，每个稀释度做3个重复。同时设置空白对照扣除本底)。随后将胃液处理后的菌液转接至pH 8.0的人工肠液 (含胆盐0.3%) 中，37℃继续孵育4小时，测定活菌数。存活率 $>50\%$ 判定为耐受性良好。

9 益生菌体内效能验证

9.1 试验分组

选取1日龄健康雏鸡，随机分为5组：空白对照组、攻毒对照组、阴性菌株对照组 (无拮抗功能益生菌)、益生菌低剂量组 (10^6 CFU/只)、益生菌高剂量组 (10^8 CFU/只)。每组设3个重复，每个重复10只鸡。

9.2 模型建立与评价

于14日龄~18日龄期间，除空白对照组外，各组每日经口灌服产气荚膜梭菌悬液 (1×10^8 CFU/只)，连续3天。益生菌组自1日龄起连续饲喂或灌服待测菌株。试验期21天。测定指标：(1) 平均日增重、料肉比、死亡率；(2) 攻毒后第5天剖检，按附录B进行肠道病变记分 (0~4分)；(3) 采集盲肠内容物，采用qPCR法 (以cpa基因为靶标，制作标准曲线定量) 检测产气荚膜梭菌数量；(4) 取空肠组织HE染色，观察绒毛长度、隐窝深度和炎性细胞浸润。

10 判定标准

满足以下所有条件的菌株可判定为具有应用潜力的抗产气荚膜梭菌益生菌候选株：

(1) 体外抑菌圈直径 ≥ 15 mm，记录抑菌物质对蛋白酶、pH、热处理的敏感性特征，作为菌株背景信息感；

- (2) 无 β 溶血现象，不携带可转移的临床重要耐药基因；
- (3) 人工胃肠液存活率 $>50\%$ ；
- (4) 动物试验证实可显著降低肠道病变评分 ($P<0.05$) 或显著降低盲肠产气荚膜梭菌定植数量 ($P<0.05$)。

附 录 A
(规范性)
培养基与试剂配制

A. 1 MRS培养基（乳酸菌分离用）

A. 1. 1 成分

MRS培养基成分见表A1。

表A1 MRS培养基成分表

成分	含量（g/L）
蛋白胨	10.0g
牛肉膏	10.0 g
酵母膏	5.0 g
葡萄糖	20.0 g
乙酸钠	5.0 g
柠檬酸二铵	2.0 g
磷酸氢二钾	2.0 g
硫酸镁	0.2 g
硫酸锰	0.05 g
吐温-80	1.0 mL
琼脂粉	15.0 g（固体培养基用）

A. 1. 2 制法

取表A1中各成分，按比例加入蒸馏水中，加热搅拌至完全溶解，调节pH至6.2±0.2。121℃高压灭菌15分钟。用于液体培养时不加琼脂粉；用于固体培养时加入琼脂粉，灭菌后冷却至50℃左右倾注平板。

A. 2 营养琼脂培养基（芽孢杆菌分离用）

A. 2. 1 成分

营养琼脂培养基成分见表A2。

表A2 营养琼脂培养基成分表

成分	含量 (g/L)
蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂粉	15.0 g

A.2.2 制法

取表A2中各成分，按比例加入蒸馏水中，加热搅拌至完全溶解，调节pH至7.2±0.2。121℃高压灭菌15分钟，冷却至50℃左右倾注平板。

A.3 血琼脂平板（溶血性试验用）

A.3.1 成分

血琼脂平板成分见表A3。

表A3 血琼脂平板成分表

营养琼脂基础	按A.2.1配制
无菌脱纤维绵羊血	5% (v/v)

A.3.2 制法

按表A2配制营养琼脂培养基，121℃高压灭菌15 min，冷却至50℃左右，无菌加入5%脱纤维绵羊血，轻轻混匀（避免产生气泡），立即倾注平板，凝固后4℃冷藏保存备用。

A.4 人工胃液

A.4.1 成分

人工胃液成分见表A4。

表A4 人工胃液成分表

成分	含量 (g/L)
氯化钠	0.2 g
盐酸（1 mol/L）	适量
胃蛋白酶	0.3 g
蒸馏水	至100 mL

A. 4. 2 制法

将氯化钠溶于适量蒸馏水中，用1 mol/L盐酸调节pH至2.5，加入胃蛋白酶，搅拌溶解后定容至100 mL，现用现配。

A. 5 人工肠液

A. 5. 1 成分

人工肠液成分见表A5。

表A5 人工肠液成分表	
成分	含量（g/L）
磷酸二氢钾	0.68 g
胰蛋白酶	1.0 g
猪胆盐	0.3 g
蒸馏水	至100 mL

A. 5. 2 制法

将磷酸二氢钾溶于适量蒸馏水中，调节pH至8.0，加入胰蛋白酶和胆盐，搅拌溶解后定容至100 mL，现用现配。

A. 6 抗生素药敏纸片

A. 6. 1 推荐检测的抗生素

根据FAO/WHO及CLSI推荐，益生菌安全性评价应检测以下抗生素的敏感性：

- 氨苄西林（AMP，10 μg）
- 万古霉素（VA，30 μg）
- 庆大霉素（CN，10 μg）
- 红霉素（E，15 μg）
- 四环素（TE，30 μg）
- 氯霉素（C，30 μg）
- 克林霉素（DA，2 μg）

A. 6. 2 保存条件

药敏纸片应密封保存于-20℃冰箱，避免受潮。使用前取出室温平衡30分钟。

A. 7 PBS缓冲液（pH 7. 4）

A. 7. 1 成分

PBS缓冲液成分见表A6。

表A6 PBS缓冲液成分表

成分	含量（g/L）
磷酸二氢钾	0.27
磷酸氢二钠	1.42
氯化钠	8.0
氯化钾	0.2

附 录 B
(资料性)

产气荚膜梭菌肠道病变记分标准

B.1 肠道病变记分（0～4分）

参考国际通用的坏死性肠炎病变评分系统（Johnson & Reid改良法），剖检时观察小肠（尤其是空肠和回肠）的病变程度，标准记分见表B1。

表B1 标准记分表

病变分值	病理变化
0 分	无肉眼可见病变。肠壁正常，黏膜色泽均匀，无充血、出血或坏死。
1 分	轻度病变。肠壁轻度充血或点状出血，黏膜轻度水肿，肠腔内容物稀薄，可见少量黏液。
2 分	中度病变。肠壁增厚，可见散在的出血点和坏死灶，肠腔扩张，内含气体和褐色液体，黏膜粗糙，可见黄色或灰白色伪膜附着。
3 分	重度病变。肠壁显著增厚，呈“橡皮肠”样改变，广泛性出血、坏死，黏膜表面覆盖黄白色或灰绿色伪膜，肠腔内含大量气体和血性渗出物，有特殊腥臭味。
4 分	严重坏死/死亡。肠壁严重坏死，多处溃疡融合，可见肠管穿孔、腹膜炎或腹腔内恶臭渗出物。因产气荚膜梭菌感染死亡的鸡只也记为 4 分。

B.2 病变判定说明

B.2.1 判定原则

剖检时随机选取每只鸡的空肠中段和回肠，综合评估最严重病变部位进行记分。
每组至少剖检10只鸡，计算平均病变记分。

B.2.2 病变部位定位

空肠中段：十二指肠末端至卵黄囊憩室之间。回肠：卵黄囊憩室至盲肠扁桃体之间。

B.2.3 注意事项

剖检应在鸡只死亡后2小时内进行，避免自溶影响病变观察。
若鸡只因其他疾病（如球虫病）死亡，应另行记录，不纳入病变记分统计。

B.3 典型病变特征

病变判定的典型病变特征见表B2

表B2 典型病变特征表

病变分值	肉眼观察特征
0 分	肠道外观正常，肠壁薄而透明，无充血、出血
1 分	肠壁轻度充血，浆膜面可见散在针尖状出血点
2 分	肠壁增厚，黏膜表面可见坏死灶和伪膜，肠腔内有气泡
3 分	肠壁显著增厚呈橡皮状，广泛性出血坏死，伪膜明显
4 分	肠管穿孔，腹腔积液，严重恶臭，或因感染死亡