**《生物产品中光合细菌测定》国家标准**

**编制说明**

（征求意见稿）

**一、任务来源**

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会2017年第二批国家标准制修订计划，项目编号“20180927-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2019年完成。本标准起草工作组由湖南农业大学等单位共同组成。

**二、标准制定目的及意义**

生物产品是指应用传统技术或现代生物技术制备的，利用其中微生物发挥相对有益作用的相关产品。生物产品在农林种植、畜禽养殖、水产养殖和环境保护等方面的应用越来越广泛，并取得了显著的效果，引起了广泛的关注。

光合细菌属于原核生物界细菌门真细菌纲的红螺菌目，在自然界中尤其水体中有着广泛分布。由于光合细菌集光能自养、光能异养、化能自养和化能异养于一身，因而在水产及家畜养殖、污水处理、食用色素提取等领域得到广泛应用。目前我国已有许多厂家生产光合细菌菌剂。在2002年颁布实施的《NY 527-2002光合细菌菌剂》标准中对菌剂中有效活菌数进行了规定，但标准中所附检测方法无菌种鉴定步骤，无法确定产品中所含光合细菌的属种。2013年发布的《SN/T 3542-2013 光合细菌菌剂中沼泽红假单胞菌计数方法》标准中仅对沼泽红假单胞菌计数方法进行了规范，但对沼泽红假单胞菌的检测采用的是常规的生理生化鉴定，该方法存在一定的误差。

常规的微生物鉴定以生理生化鉴定为主，要准确确定一种菌株通常需要利用鉴定管进行大量的鉴定实验，不但需要较长的验证和鉴定时间，而且实验过程中易出现结果不易判定的情况，影响鉴定结果。近年来，随着分子生物学技术的发展，给菌种鉴定带来了便利。利用核糖体RNA（原核生物16S RNA和酵母的18S RNA）进行菌种鉴定具有检测周期短、成本低，区分准确等优点。但分子生物学技术无法实现菌株的分离，如直接对样品进行DNA提取和检测，无法区分产品中菌体的状态也不能实现准确定量。因此，本次标准制定中将两种方法有效结合，利用常规微生物方法进行菌株的分离和定量，利用分子生物学方法进行菌种鉴定，同时辅以生理生化鉴定对检测结果进行确证，不仅可以提高检测效率而且可以保障检测的准确度。

为了防止少数生产厂家利用添加非法添加剂冒充光合细菌菌剂，同时提高市场上光合菌剂产品中光合细菌的检测效率，故制定本标准。

**三、标准编制原则和依据**

本标准遵循GB/T1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》和GB/T20001.4-2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》的编写规则。

**四、主要工作过程**

（1）2017年1月20日-21日在北京召开课题实施方案论证会，就《生物产品中光合细菌测定》标准的草案进行讨论；

（2）2017年5月10日-28日 就标准中光合细菌的测定方法进行企业调研；

（3）2017年11月22日-24日在北京召开标准制订中期研讨会，就《生物产品中光合细菌测定》标准草案的修改制订情况、项目经费使用情况进行汇报；

（4）2018年12月29日在长沙召开《生物产品中光合细菌测定》标准专家研讨会，将标准讨论稿提交专家组讨论；

（5）2019年3月形成《生物产品中光合细菌测定》征求意见稿。

**五、主要技术内容**

（一）试验菌株的选择

目前应用范围较广的光合细菌主要是红螺菌科的光合细菌，该科包括红螺菌属、红假单胞菌属、红微菌属等3个属，共计12个种。红螺菌科的大多数光合细菌富含类胡萝卜素，因而其培养物通常呈现褐色至红色，因而很容易地与其他微生物区别开来。考虑到目前行业中常用的光合细菌主要是沼泽红假单胞菌、荚膜红假单胞菌、球形红假单胞菌，国内微生物菌种保藏中心缺少红螺菌科其他属种的标准菌株，所以本标准在编制过程中主要研究了沼泽红假单胞菌、荚膜红假单胞菌、球形红假单胞菌等三种光合细菌。本研究首先从中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC）购买了3株模式菌株，具体菌株信息见表1。

**表1 试验用菌株**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 菌株名称 | 拉丁名 | 菌株编号 |
| 沼泽红假单胞菌 | *Rhodopseudomonas palustris* | 1.2180 |
| 荚膜红假单胞菌 | *Rhodobacter capsulatus* | 1.3366 |
| 球形红假单胞菌 | *Rhodobacter sphaeroides* | 1.3368 |

（二）培养基的确定

本标准的选择性增菌培养基采用Johannes F. Imhoff教授在《伯杰氏系统细菌学手册》及《The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses》中推荐的AT培养基。（注：Imhoff教授是当今光合细菌分类学领域的权威学者，手册中光合细菌方面的首席编辑）。AT培养基适宜绝大多数紫色非硫细菌的生长。

光合细菌分离培养基是一款广泛使用的适合包括沼泽红假单胞菌在内多种紫色非硫细菌快速生长的培养基。与多种常见培养基比较，紫色非硫细菌在该培养基上长得快，尤其特别适合红假单胞菌属细菌的培养。

（三）培养温度的确定

《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰细菌鉴定手册第八版》记载，红螺菌科细菌的最适生长温度为30~37℃，同时参考其他行业标准（《SN/T 3542-2013 光合细菌菌剂中沼泽红假单胞菌计数方法》等）中的规定，本标准中统一采用30 ℃±1 ℃作为光合细菌的培养温度。

（四）AT培养基验证

先将沼泽红假单胞菌、荚膜红假单胞菌、球形红假单胞菌用各自适宜的培养基活化，再分别接种至AT培养液，并培养。结果如表2所示。结果表明三株菌均能在AT培养基中生长，菌液呈现红棕色。

**表2 不同菌种在AT培养基中培养的结果**

|  |  |
| --- | --- |
| 菌种编号 | AT |
| 1.2180 | ＋ |
| 1.3366 | ＋ |
| 1.3368 | ＋ |

注：＋表示培养基变红色，－表示培养基不变色。



**图1 沼泽红假单胞菌1.2180的生长形态**

（五）生理生化特征

参考《常见细菌系统鉴定手册》、《伯杰细菌鉴定手册第八版》中光合细菌的典型特征，制定了标准中的生理生化特征表。通过生理生化试验，可以将沼泽红假单胞菌、荚膜红假单胞菌、球形红假单胞菌进行区分（结果见表3~5）。

**表3 沼泽红假单胞菌生理生化特征**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 鉴定项目特征 | **沼泽红假单胞菌** | 鉴定项目特征 | **沼泽红假单胞菌** |
| pH 5.5 | + | 柠檬酸 | + |
| 37℃ | + | 硫代硫酸钠 | + |
| 葡萄糖 | - | 触酶 | + |
| 苯甲酸 | + | 氢化酶 | + |
| 酒石酸 | + | 甲酸脱氢酶 | + |
| 乙醇 | + |  |  |

注：+表示不小于90%阳性, -表示阴性

**表4 荚膜红假单胞菌生理生化特征**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 鉴定项目特征 | 荚膜红假单胞菌 | 鉴定项目特征 | 荚膜红假单胞菌 |
| pH 5.5 | + | 山梨醇 | - |
| 25℃ | + | 亮氨酸 | - |
| 果糖 | - | 硫代硫酸钠 | - |
| 葡萄糖 | + | 甘油 | - |
| 甘露醇 | - | 氢化酶 | + |
| 乙醇 | - | 甲酸脱氢酶 | + |

注：+表示不小于90%阳性，-表示阴性，d表示11%~89%菌株阳性

**表5 球形红假单胞菌生理生化特征**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 鉴定项目特征 | 球形红假单胞菌 | 鉴定项目特征 | 球形红假单胞菌 |
| pH 6.0 | + | 山梨醇 | + |
| 25℃ | + | 乙醇 | + |
| 果糖 | + | 苯甲酸钠 | - |
| 葡萄糖 | + | 硫代硫酸钠 | - |
| 甘露糖 | + | 氢化酶 | + |
| 甘露醇 | + | 甲酸脱氢酶 | + |
| 甘油 | + |  |  |

注：+表示不小于90%阳性, -表示阴性

（六）实际样品中活菌数测定

我们从各地购买了一些含光合细菌产品，按照标准草案中传统计数方法进行活菌数检测，检测结果见表6。

**表6 几种商品化光合细菌菌剂平板计数**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品 | 活菌数 | 样品 | 活菌数 |
| 样品1（液体） | 1.6×108  CFU/mL | 样品4（固体） | 2.7×108 CFU/g |
| 样品2（液体） | 2.8×108 CFU/mL | 样品5（固体） | 2.5×108 CFU/g |
| 样品3（液体） | 4.3×108 CFU/mL | 样品6（固体） | 7.8×107 CFU/g |

通过运用传统菌落计数方法检测市场上的光合细菌产品，可有效对产品中的活菌数进行计数。

（七）MNP标记筛选

在标记筛选中，遵守扩增区多态性高、引物区保守、扩增区尽量选择单拷贝区域、在不同样品中的缺失率低等引物筛选的通用原则；引物在参考基因组上的扩增长度不超过250 bp，以满足现有的大部分高通量测序仪测序长度的要求；扩增区GC含量在30%到70%之间时，以保证数据均匀度好；扩增区碱基组成简单、扩增区无简单重复序列等，以避免对生物信息学的比对造成混乱；“扩增区在单个个体中等位基因型数目尽量低”，以尽量简化软件处理的流程，减少不确定信息。

（八）MNP标记多态性与光合细菌区分能力

每个MNP标记位点均为一种特定光合细菌所拥有，且每个标记位点区分到单个碱基，因此，每个MNP标记具有极高的光合细菌的鉴定能力，每一种光合细菌鉴定了10个以上的标记位点，进一步增强了光合细菌的鉴定能力。

我们利用本标准的方法，对6个光合细菌的标准样品进行了鉴定，判定结论均为“待测样品中存在该光合细菌”，与光合细菌标准样品的标识一致，成功率100%（表7）。

**表7 六种光合细菌的标准样品的高通量测序检测情况**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标准品种编号 | 标准品种包含的光合细菌的名称 | 总的测序片段的数目 | 成功比对到标记位点的测序片段 | | 鉴定的光合细菌的名称 | 鉴定是否正确 |
| 数目 | 比例 |
| Pb-1 | 沼泽红假单胞菌 | 16,912,598 | 8,185,057 | 48.40% | 沼泽红假单胞菌 | 正确 |
| Pb-2 | 沼泽红假单胞菌 | 11,498,714 | 5,616,757 | 48.85% | 沼泽红假单胞菌 | 正确 |
| Pb-3 | 荚膜红假单胞菌 | 16,087,212 | 8,102,039 | 50.36% | 荚膜红假单胞菌 | 正确 |
| Pb-4 | 荚膜红假单胞菌 | 11,741,920 | 5,737,591 | 48.86% | 荚膜红假单胞菌 | 正确 |
| Pb-5 | 球形红假单胞菌 | 11,507,878 | 5,888,085 | 51.17% | 球形红假单胞菌 | 正确 |
| Pb-6 | 球形红假单胞菌 | 20,955,848 | 10,499,404 | 50.10% | 球形红假单胞菌 | 正确 |

（九）多重PCR扩增循环数

根据的我们的大量实验的结果，PCR循环数≦20个时，等位基因型的比例在重现性实验中保持稳定，避免了由于等位基因型消失造成的实验不可重现性，因此，本标准草案规定多重PCR循环数≦20个。

1. **验证情况及结果分析**

将《生物产品中光合细菌测定》标准征求意见稿中光合细菌的测定方法，分别在浙江工商大学、河北科技大学、江汉大学进行了方法的验证，验证结果见表8，验证结果表明测定方法简单快捷，测定结果可靠。

**表8 生物产品中光合细菌检验验证报告**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 验证项目 | 生理生化鉴定结果 | MNP鉴定结果 | 菌落数平均值 |
| 样品1（沼泽红假单胞菌） | 阳性 | 阳性 | 3.2×108 CFU/mL |
| 样品2（荚膜红假单胞菌） | 阳性 | 阳性 | 2.5×108 CFU/g |
| 样品3（球形红假单胞菌） | 阳性 | 阳性 | 4.5×108 CFU/g |

1. **与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求。本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

1. **标准属性建议**

本标准为推荐性国家标准。

1. **贯彻国家标准的要求和措施建议**

标准发布实施后，建议由标准编制单位组织有关生产、检验、设计等单位进行宣传贯彻。

1. **其他应予说明的事项**

无其他事项说明。