

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4686—2025

直接饲喂微生物和发酵制品类饲料 添加剂生产菌株 细菌菌种鉴定 分子生物学方法

Identification of direct-fed microorganisms and production strains of fermented-
products for feed additives—Bacteria species identification—
Molecular biological methods

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 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这些专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本文件起草单位：中国食品发酵工业研究院有限公司、全国畜牧总站、深圳华大智造科技股份有限公司、北京首钢朗泽科技股份有限公司。

本文件主要起草人：姚粟、胡广东、丁健、程坤、曹艳花、刘艺茹、王荃、张欣、蒋慧、邹方起、张娜、葛媛媛、孙思佳、冯会粉、刘蕊、刘红强、杨自飞、李重阳、蒋晓莹。



直接饲喂微生物和发酵制品类饲料添加剂 生产菌株 细菌菌种鉴定 分子生物学方法

1 范围

本文件描述了直接饲喂微生物饲料添加剂菌株和发酵制品类饲料添加剂生产菌株中细菌菌种的分子生物学鉴定方法,包括平均核苷酸一致性(ANI)鉴定法和基因序列鉴定法。

本文件平均核苷酸一致性(ANI)鉴定法适用于已批准或拟申报的直接饲喂微生物饲料添加剂菌株和发酵制品类饲料添加剂生产菌株中细菌菌种的鉴定。基因序列鉴定法适用于附录 A 中所列细菌菌种的鉴定。

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 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测
- GB/T 37874—2019 核酸提取纯化方法评价通则

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

直接饲喂微生物饲料添加剂 **direct-fed microorganisms feed additives**
在饲料中添加或直接饲喂给动物的活的微生物饲料添加剂。

3.1.2

发酵制品类饲料添加剂 **fermented products for feed additives**
微生物在受控制条件下,通过生命活动生产的特定代谢产物经分离、提取、纯化、精制和干燥等工艺制成的饲料添加剂,如氨基酸、维生素、酶制剂等。

3.1.3

菌种鉴定 **species identification**
通过分析菌株的分子特征,确定菌株分类地位的过程。

3.1.4

测序深度 **depth of sequencing**
菌株基因组中某个指定的核苷酸被检测的次数。

3.1.5

叠连群 **contig**
测序得到的 DNA 片段,根据相互间的重叠性,构成的一个长的无缺失的 DNA 片段。
[来源:GB/T 29859—2013,2.4.14]

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ANI:平均核苷酸一致性(Average Nucleotide Identity)

bp:碱基对(base pair)

DDBJ:日本 DNA 数据库(DNA Data Bank of Japan)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

EMBL:欧洲分子生物学实验室(European Molecular Biology Laboratory)

gyrB:DNA 旋转酶 B 亚基编码基因(DNA gyrase subunit B encoding gene)

ICNP:原核生物国际命名法规(International Code of Nomenclature of Prokaryotes)

NCBI:美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

pheS:苯丙氨酸 tRNA 合成酶 α 亚基编码基因(phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit encoding gene)

rRNA:核糖体核糖核酸(ribosomal RNA)

4 试剂或材料

4.1 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

4.2 文库制备试剂。

4.3 高通量测序试剂。

4.4 TE 缓冲液。

4.5 PCR 扩增试剂盒。

4.6 $2\times$ PCR 预混液。

4.7 引物:引物序列见 7.2.2.1 和 7.2.3.2。

4.8 无菌双蒸水。

4.9 琼脂糖。

4.10 $1\times$ TAE 缓冲液。

4.11 荧光核酸染料。

4.12 DNA 分子量标记物(100 bp~2 000 bp)。

4.13 阳性对照菌株:枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* CICC 10498^T(=ACCC 10243^T)、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* CICC 6096^T(=ACCC 19940^T)。

5 仪器设备

试验设施和设备应符合 GB 19489 的规定,试验环境条件应按 GB/T 27403 的规定执行。

5.1 生物安全柜。

5.2 核酸定量仪。

5.3 高通量基因测序仪。

5.4 恒温水浴锅: $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $55\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.5 离心机:最高转速 15 000 r/min。

5.6 PCR 仪。

5.7 核酸电泳仪。

5.8 凝胶电泳成像系统。

6 平均核苷酸一致性(ANI)鉴定法

6.1 原理

采用高通量测序技术测定菌株基因组序列,并与近缘模式菌株基因组序列进行比对,计算 ANI 值,实

现菌株的鉴定。

6.2 试验步骤

6.2.1 待鉴定菌株基因组 DNA 提取

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取待鉴定菌株基因组 DNA。DNA 的纯度应符合 GB/T 37874 的要求, DNA 的浓度和总量应符合文库构建的相关要求。提取的基因组 DNA 于 -20°C 保存, 备用。

6.2.2 基因组测序和序列质控

采用第二代测序技术, 或第二代和第三代测序技术相结合, 测定待鉴定菌株基因组序列, 获得基因组框架图或完成图。原始序列经分析软件比对和组装, 获得待鉴定菌株的基因组序列。

6.2.2.1 基因组序列应从测序深度、叠连群(contig)数量和序列总长度三方面进行质控, 并同时满足以下条件, 否则应重新进行测序。

- a) 测序深度 $\geq 50\times$;
- b) 叠连群(contig)数量不超过 500 个;
- c) 基因组序列总长度与最大相似度模式菌株基因组序列大小的差异 $\leq 20\%$ 。

6.2.3 ANI 分析

6.2.3.1 从待鉴定菌株基因组序列中获得其 16S rRNA 基因序列并与核酸序列数据库(如 NCBI、EMBL、DDBJ 等)中近缘种模式菌株的 16S rRNA 基因序列进行比对, 获得序列相似性。数值按 GB/T 8170 的修约值比较法执行。

6.2.3.2 从 NCBI 等公共数据库下载与待鉴定菌株 16S rRNA 基因序列相似性大于 98.65% 的近缘种模式菌株基因组序列。利用 ANI 分析软件, 计算待鉴定菌株与近缘种模式菌株之间基因组序列的 ANI 值。

6.3 结果判定

根据 6.2.3.2 计算所得的 ANI 值进行如下结果判定:

- a) 当待鉴定菌株与某种近缘种模式菌株之间基因组序列的 ANI 值大于 96% 时, 判定待鉴定菌株与该近缘种模式菌株为同一种;
- b) 当待鉴定菌株与所有近缘种模式菌株之间基因组序列的 ANI 值都小于 95% 时, 则待鉴定菌株无法判定为已知菌株;
- d) 当待鉴定菌株与近缘种模式菌株之间基因组序列的 ANI 值在 95%~96% 时, 则宜结合本文件之外的其他方法(如数字 DNA—DNA 杂交、表型分析等)进行综合判定。

7 基因序列鉴定法

7.1 原理

细菌菌株首先通过 PCR 获得 16S rRNA 基因序列, 与近缘种模式菌株基因序列进行比对, 根据序列相似性及系统发育分析, 对菌株进行鉴定。通过 16S rRNA 基因序列无法鉴定至种水平的菌株, 应进一步进行 *gyrB* 或 *pheS* 基因序列分析, 并结合 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列, 或 16S rRNA 和 *pheS* 基因序列实现种水平鉴定。

7.2 试验步骤

7.2.1 待鉴定菌株基因组 DNA 提取

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取待鉴定菌株基因组 DNA。也可采用手工提取的方法: 取新鲜培养的菌液 1 mL, $10\,000\text{ r/min}$ 离心 2 min。沉淀用 TE 缓冲液 100 μL 重悬, 加入 10 mg/mL 溶菌酶 100 μL , 37°C 温育 30 min, $12\,000\text{ r/min}$ 离心 2 min。沉淀用 TE 缓冲液 600 μL 重悬, 加入 15 mg/mL 蛋白酶 K 25 μL , 55°C 温育 1 h 后, 沸水浴 10 min, $12\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 上清液用于 PCR 扩增。DNA 质量应符合 GB/T 37874—2019 中 5.3 的要求。提取的基因组 DNA 于 -20°C 保存, 备用。

7.2.2 16S rRNA 基因序列鉴定

7.2.2.1 PCR 扩增引物

正向引物(27F): $5'-\text{AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG}-3'$;

反向引物(1 492R):5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

目的片段长度:约 1 500 bp。

7.2.2.2 反应体系

PCR 扩增反应体系按表 1 配制,或采用等效的 PCR 扩增试剂盒。

表 1 PCR 反应体系

组分	体积,μL
2×PCR 预混液	25.0
10 μmol/L 正向引物	1.0
10 μmol/L 反向引物	1.0
待鉴定菌株基因组 DNA	2.0(50 ng~200 ng)
无菌双蒸水	21.0
总体积	50.0
注:反应体系中各试剂的量根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。	

7.2.2.3 对照设置

分别设置阳性对照和阴性对照:

- a) 阳性对照:PCR 扩增反应体系中使用枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* CICC 10498^T(=ACCC 10243^T)、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* CICC 6096^T(=ACCC 19940^T)基因组 DNA 代替待鉴定菌株基因组 DNA,其他同 7.2.2.2;
- b) 阴性对照:PCR 扩增反应体系中使用无菌双蒸水代替待鉴定菌株基因组 DNA,其他同 7.2.2.2。

7.2.2.4 反应条件

94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min 30 s,30 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物于 4℃保存。

7.2.2.5 PCR 扩增产物检测

用 1×TAE 缓冲液配置 1%的琼脂糖凝胶(55℃~65℃时加入荧光核酸染料)。取 5 μL 的 PCR 扩增产物进行电泳检测,3 V/cm~5 V/cm 恒压电泳 20 min~40 min,用 DNA 分子量标记物(100 bp~2 000 bp)作参照。使用凝胶电泳成像系统观察检测结果。

7.2.2.6 PCR 扩增质量控制

当待鉴定菌株和阳性对照菌株 PCR 扩增产物检测到目的条带,且阴性对照未检测到条带时,表明 PCR 扩增合格。否则应重新进行 PCR 扩增。

7.2.2.7 序列测定和比对

将待鉴定菌株 PCR 扩增产物进行序列测定,原始序列经 DNA 分析软件拼接、校对,获得待鉴定菌株 16S rRNA 基因序列。将待鉴定菌株与核酸序列数据库(如 NCBI、EMBL、DDBJ 等)中的模式菌株进行 16S rRNA 基因序列同源性比对,获得序列相似性。数值按 GB/T 8170 的修约值比较法执行。

7.2.2.8 系统发育树构建

选取与待鉴定菌株 16S rRNA 基因序列相似性最高的前 10 个种为近缘种。以近缘种的模式菌株为内群,选取与待鉴定菌株同科不同属的 1 株模式菌株作为外群,采用系统发育分析软件,通过邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,自举值不低于 1 000 次。

7.2.2.9 结果判定

近缘种中仅有一个种的模式菌株与待鉴定菌株 16S rRNA 基因序列相似性大于 98.65%,且系统发育分析显示该种模式菌株与待鉴定菌株位于同一分支时,判定待鉴定菌株与该模式菌株为同一种。除此之外,待鉴定菌株鉴定至属或属以上水平。

7.2.3 gyrB 或 pheS 基因序列鉴定

7.2.3.1 基因的选择

通过 16S rRNA 基因无法鉴定至种水平的菌种,应进一步进行 *gyrB* 或 *pheS* 基因序列鉴定。

7.2.3.2 PCR 扩增引物

PCR 扩增引物,见表 2。

表 2 PCR 扩增引物

基因名称	引物	目的片段长度
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -F:5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3'	约 1 200 bp
	<i>gyrB</i> -R:5'-AGCAGGATACGGATGTGCGAGCCRTCNACRTCNGCRTCNGTCAT-3'	
<i>pheS</i>	<i>pheS</i> -F:5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3'	约 450 bp
	<i>pheS</i> -R:5'-GGRTGRACCATVCCNGCHCC-3'	

7.2.3.3 反应体系

同 7.2.2.2。

7.2.3.4 对照设置

gyrB 基因扩增时,阳性对照菌株使用枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* CICC 10498^T(=ACCC 10243^T)。*pheS* 基因扩增时,阳性对照菌株使用嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* CICC 6096^T(=ACCC 19940^T)。其他同 7.2.2.3。

7.2.3.5 反应条件

gyrB 基因扩增时,退火温度为 50 ℃。*pheS* 基因扩增时,退火温度为 48 ℃。其他同 7.2.2.4。

7.2.3.6 PCR 扩增产物检测

同 7.2.2.5。

7.2.3.7 PCR 扩增质量控制

同 7.2.2.6。

7.2.3.8 序列测定和比对

将待鉴定菌株 PCR 扩增产物进行序列测定,原始序列经 DNA 分析软件拼接、校对,获得待鉴定菌株 *gyrB* 或 *pheS* 基因序列。将待鉴定菌株与 7.2.2.8 中选取的近缘种的模式菌株进行 *gyrB* 或 *pheS* 基因序列同源性比对,获得序列相似性。数值按 GB/T 8170 的修约值比较法执行。

7.2.3.9 系统发育树构建

以近缘种的模式菌株为内群,选取与待测菌株同科不同属的 1 株模式菌株作为外群。采用系统发育分析软件,通过邻接法(Neighbor-Joining)构建 *gyrB* 或 *pheS* 基因序列系统发育树,自举值不低于 1 000 次。

7.2.3.10 结果判定

近缘种中仅有一个种的模式菌株与待鉴定菌株的 *gyrB* 或 *pheS* 基因序列相似性大于 97.0%,且系统发育分析显示待鉴定菌株与该模式菌株位于同一分支时,判定待鉴定菌株与该模式菌株为同一种。此外,则待鉴定菌株鉴定至属或属以上水平。

8 结果报告

8.1 平均核苷酸一致性(ANI)鉴定法

根据结果判定,报告待鉴定菌株的鉴定结果,报告中至少应包括:

- a) 待鉴定菌株的属名、种名(包括中文学名、拉丁学名等),分类学名称应符合原核生物国际命名法规(ICNP)要求;
- b) 待鉴定菌株的全基因组测序结果及其近缘种模式菌株的基因组序列(或序列登录号);
- c) 待鉴定菌株与近缘种模式菌株基因组序列的 ANI 值。

待鉴定菌株无法判定至已知种时,报告待鉴定菌株与其近缘种模式菌株基因组序列的 ANI 值。

8.2 基因序列鉴定法

根据结果判定,报告待鉴定菌株的鉴定结果,报告中至少应包括:

- a) 待鉴定菌株的属名、种名(包括中文学名、拉丁学名等),分类学名称应符合原核生物国际命名法规(ICNP)要求;
- b) 待鉴定菌株的基因序列、序列相似性和系统发育树。

待鉴定菌株无法判定至已知种时,报告待鉴定菌株与其近缘种模式菌株的基因序列相似性。

附 录 A
(资料性)

适用于基因序列鉴定法的细菌菌种

表 A.1 给出了基因序列鉴定法可鉴定至种水平的细菌菌种。

表 A.1 适用于基因序列鉴定法的细菌菌种

类别	菌种名称
通过 16S rRNA 基因可鉴定至种水平的细菌菌种	凝结芽孢杆菌 <i>Bacillus coagulans</i> (分类学名称: 凝结魏茨曼氏菌 <i>Weizmannia coagulans</i>)、迟缓芽孢杆菌 <i>Bacillus lentus</i> (分类学名称: <i>Lederbergia lenta</i>)、两歧双歧杆菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i> 、长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i> 、短双歧杆菌 <i>Bifidobacterium breve</i> 、动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i> 、粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> 、戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i> 、嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i> 、发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i> (分类学名称: 发酵黏液乳杆菌 <i>Limosilactobacillus fermentum</i>)、纤维二糖乳杆菌 <i>Lactobacillus cellobiosus</i> (分类学名称: 发酵黏液乳杆菌 <i>Limosilactobacillus fermentum</i>)、德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 、产丙酸丙酸杆菌 <i>Propionibacterium acidipropionici</i> (分类学名称: 产丙酸丙酸菌 <i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i>)、丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>
通过 16S rRNA 基因和 <i>gyrB</i> 基因可鉴定至种水平的细菌菌种	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> 、地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> 、解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 、短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i> 、侧孢短芽孢杆菌 <i>Brevibacillus laterosporus</i> 、谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> 、乳糖发酵短杆菌 <i>Brevibacterium lactofermentum</i> (分类学名称: 谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>)
通过 16S rRNA 基因和 <i>pheS</i> 基因可鉴定至种水平的细菌菌种	乳酸片球菌 <i>Pediococcus acidilactici</i> 、干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i> (分类学名称: 干酪乳酪杆菌 <i>Lacticaseibacillus casei</i>)、植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> (分类学名称: 植物乳植杆菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>)、布氏乳杆菌 <i>Lactobacillus buchneri</i> (分类学名称: 布赫纳氏慢生乳杆菌 <i>Lentilactobacillus buchneri</i>)、副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i> (分类学名称: 副干酪乳酪杆菌 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>)、约氏乳杆菌 <i>Lactobacillus johnsonii</i> 、嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i> (分类学名称: 唾液链球菌嗜热亚种 <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>)
注: 基因序列鉴定法也适用于其它经过验证的细菌菌种的鉴定。	

参 考 文 献

- [1] GB/T 29859—2013 生物信息学术语
 - [2] European Food Safety Authority (EFSA). EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain. EFSA Journal 2021;19 (7):6506. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6506>
-