

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—20XX
代替 NY/T 2131-2012

饲料添加剂 枯草芽孢杆菌

Feed additives—*Bacillus subtilis*

(公开征求意见稿)

20XX - XX - XX 发布

20XX - XX - XX 实施

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。

本文件代替NY/T 2131-2012《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》，与NY/T 2131-2012相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了对原料的要求（见4.1）；
- 将卫生指标中的“金黄色葡萄球菌”更改为“凝固酶阳性葡萄球菌”（见4.5表2，2012年版的4.6表2）；
- 更改了卫生指标“黄曲霉毒素”的适用产品（见4.5表2，2012年版的4.6表2）；
- 增加微生物采样标准（见5，2012年版的5.1）；
- 更改了枯草芽孢杆菌活菌数检测的检测方法（见6.2，2012年版的5.5）；
- 更改了黄曲霉毒素B1检测方法（见6.9，2012年版的5.6.1）；
- 增加了组批要求（见7.1）；
- 更改了需要型式检验时的情况（见7.3，2012年版的6.2）；
- 增加了除微生物之外各指标的极限数值判定执行标准（见7.4.3）；
- 更改了保质期要求（见8.5，2012年版的8.5）。

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：广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）。

本文件主要起草人：羊宋贞、刘阳、冯广达、郑湘玲、章俊、陈伟鸿、张莹莹、陆雪影、陈艳、李燕旋、段锦梅、陈家舒、朱红惠。

本文件所代替标准的历次版本发布情况为：

- 2012年首次发布为NY/T 2131-2012；
- 本次为第一次修订。

饲料添加剂 枯草芽孢杆菌

1 范围

本文件界定了枯草芽孢杆菌的术语和定义，规定了饲料添加剂枯草芽孢杆菌技术要求、采样、试验方法、检验规则、标签、包装、运输、贮存和保质期。

本文件适用于以枯草芽孢杆菌为菌种，经液态或固态发酵、干燥等工艺制得的饲料添加剂产品。

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 5917.1 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法

GB/T 6435 饲料中水分的测定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 8381.2 饲料中志贺氏菌的检测方法

GB 10648 饲料标签

GB 13078 饲料卫生标准

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

GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定

GB/T 13092 饲料中霉菌总数测定方法

GB/T 14699 饲料 采样

GB/T 18869 饲料中大肠菌群的测定

GB/T 23743 饲料中凝固酶阳性葡萄球菌的微生物学检验 Baird-Parker 琼脂培养基计数法

GB/T 42959 饲料微生物检验 采样

NY/T 2071 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*

属于芽孢杆菌科、芽孢杆菌属。为革兰氏阳性杆菌，单个细胞大小(0.7~0.8) $\mu\text{m} \times (2\sim 3)\mu\text{m}$ ；有芽孢，芽孢椭圆形至柱形，中生或偏端生。

4 技术要求

4.1 原料

载体和稀释剂品种来自《饲料原料目录》，并符合相关标准要求。

4.2 外观与性状

产品为粉末或颗粒，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味。

4.3 菌种

应符合附录 B 中枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的形态、生理生化特性和分子生物学特性。

4.4 质量指标

应符合表 1 的要求。

表1 质量指标

项 目	指 标
枯草芽孢杆菌活菌数/ (CFU/g)	$\geq 1.0 \times 10^9$
粒度 (SSW 0.400/0.250mm 试验筛通过率) / (%)	≥ 100
水分/ (%)	≤ 9.0
注：粒度指标仅适用于粉状产品。	

4.5 卫生指标

应符合表2的要求。

表2 卫生指标

项 目	指 标
砷 (以总砷计) / (mg/kg)	≤ 2.0
铅 (以 Pb 计) / (mg/kg)	≤ 5.0
汞 (以 Hg 计) / (mg/kg)	≤ 0.1
镉 (以 Cd 计) / (mg/kg)	≤ 0.5
黄曲霉毒素 B ₁ ^a / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	≤ 10
霉菌总数/ (CFU/g)	$\leq 2.0 \times 10^4$
大肠菌群/ (MPN/100 g)	$\leq 1.0 \times 10^4$

沙门氏菌/（25 g）	不得检出
志贺氏菌/（25 g）	不得检出
凝固酶阳性葡萄球菌/（25 g）	不得检出
注：1. 除微生物指标外，表中所列允许量均以干物质含量为 88%计算； 2. ° 指标仅适用于植物性载体生产的产品。	

5 采样

以微生物检验为目的的采样按照GB/T 42959执行，以其它指标检验为目的的采样按照GB/T 14699执行。

6 试验方法

6.1 外观与性状

取适量样品于无色容器中，采用目测、鼻嗅的方法进行检验。

6.2 枯草芽孢杆菌活菌数

6.2.1 枯草芽孢杆菌活菌数计数

按附录 A 执行

6.2.2 枯草芽孢杆菌菌种鉴定

按附录 A、附录 B 执行。

6.3 粒度

按 GB/T 5917.1 规定执行。

6.4 水分

按 GB/T 6435 规定执行。

6.5 总砷

按 GB/T 13079 规定执行。

6.6 铅

按 GB/T 13080 规定执行。

6.7 汞

按 GB/T 13081 规定执行。

6.8 镉

按 GB/T 13082 执行。

6.9 黄曲霉毒素 B1

按 NY/T 2071 执行。

6.10 霉菌总数

按 GB/T 13092 执行。

6.11 大肠菌群

按 GB/T 18869 执行。

6.12 沙门氏菌

按 GB/T 13091 执行。

6.13 志贺氏菌

按 GB/T 8381.2 执行。

6.14 凝固酶阳性葡萄球菌

按 GB/T 23743 执行。

7 检验规则

7.1 组批

以相同菌株、相同的发酵工艺、相同生产条件、连续生产或同一班次生产的产品为一批，但每批产品不应超过 50 t。

7.2 出厂检验

出厂检验项目为外观与性状、水分、粒度及枯草芽孢杆菌活菌数。

7.3 型式检验

型式检验项目为 4.2~4.5，在正常生产情况下，每半年至少进行 1 次型式检验。在有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

- a) 产品定型投产时；
- b) 生产工艺、主要设备、配方或主要原料来源有较大改变，可能影响产品质量时；
- c) 停产 3 个月以上，重新恢复生产时；
- d) 出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时；
- e) 饲料行政管理部门提出检验要求时。

7.4 判定规则

7.4.1 所验项目全部合格，判定为该批次产品合格。

7.4.2 检验结果中有任何指标不符合本文件规定时，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文件规定，则判定该批产品不合格。卫生指标中的微生物指标不得复检。

7.4.3 除微生物指标外，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、贮存和保质期

8.1 标签

按 GB 10648 的规定执行。

8.2 包装

包装材料应无毒、无害、防潮。

8.3 运输

运输中防止包装破损、日晒、高温、雨淋，不得与有毒有害物质共运。

8.4 贮存

阴凉贮存，仓库应通风、干燥、能防暴晒、防雨淋，有防虫、防鼠设施，不得与有毒有害的物质混贮。

8.5 保质期

未开启包装的产品，在规定的运输、储存条件下，产品保质期应与标签中标明的保质期一致。

附录A (规范性)

枯草芽孢杆菌活菌数计数

A.1 试剂或材料

除非另有说明，仅使用分析纯试剂。

- A.1.1 水：GB/T 6682，三级。
- A.1.2 0.85%灭菌生理盐水。
- A.1.3 营养琼脂（NA）培养基。

A.2 仪器设备

- A.2.1 天平：感量为0.01 g。
- A.2.2 恒温培养箱：36 °C±1 °C。
- A.2.3 显微镜：1000倍。
- A.2.4 高压灭菌锅。
- A.2.5 拍击式均质器及均质袋。
- A.2.6 无菌吸管（容量为0.1 mL、1 mL、10 mL）或相当规格的移液器以及配套的无菌吸头。
- A.2.7 三角瓶：容量为500 mL。
- A.2.8 玻璃或塑料涂布棒。
- A.2.9 玻璃或塑料培养皿：直径为90 mm。
- A.2.10 试管：18 mm×180 mm。

A.3 试验步骤

A.3.1 试样制备

无菌条件下称取试样5 g，加入装有495 mL 0.85%灭菌生理盐水稀释液的均质袋中，用均质器均质1 min~2 min，制成1:100的初始悬浮液（亦可用其他具有同等效果的均质方式）。用无菌吸管或微量移液器移取上述1:100的初始悬浮液1 mL，注入含有9 mL 0.85%灭菌生理盐水的试管中，经充分混匀后制成1:1000的稀释液。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。

A.3.2 接种和培养

选择3个适宜稀释度，用吸管或微量移液器移取0.1 mL稀释液加至干燥后的营养琼脂平板表面，用无菌涂布棒将稀释液均匀涂于表面。每个稀释度涂布2个平板，同时吸取0.1 mL 0.85%灭菌生理盐水稀释液作空白对照。待稀释液吸收后，倒置平皿放入36 °C±1 °C培养箱中培养16 h~24 h。

A.3.3 菌落计数

选取菌落数在20个~200个之间的平板计数。典型枯草芽孢杆菌菌落表面粗糙，不透明，不闪光，边缘扩张，圆形或蔓延成波浪形、不规则形，灰白色或微黄色。从同一稀释度的平板中选出5个具有上述典型菌落特征的枯草芽孢杆菌疑似菌落进行确证试验。

A.3.4 菌种确证试验

按附录B执行。

A.3.5 试验数据处理

根据菌落计数结果和证实为枯草芽孢杆菌的菌落数，计算出平板内的菌数，然后乘其稀释倍数即得每克样品中枯草芽孢杆菌活菌数A，按公式（A.1）计算。

$$A = \frac{B \times C \times f}{5} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

A ——每克样品中枯草芽孢杆菌活菌数的数值，单位为菌落形成单位每克（CFU/g）；

B ——枯草芽孢杆菌疑似菌落数的数值，单位为菌落形成单位（CFU）；

C ——5个鉴定的菌落中确认为枯草芽孢杆菌菌落数的数值，单位为菌落形成单位（CFU）；

f ——稀释倍数的数值，单位为每克（g⁻¹）；

5 ——选出的枯草芽孢杆菌疑似菌落的数值，单位为菌落形成单位（CFU）。

附录B (规范性)

枯草芽孢杆菌菌种鉴定

B.1 试剂或材料

- B.1.1 革兰氏染色液。
- B.1.2 7%NaCl。
- B.1.3 V-P试验培养基。
- B.1.4 硝酸盐还原培养基。
- B.1.5 D-甘露醇发酵培养基。
- B.1.6 丙酸盐利用培养基。
- B.1.7 阳性对照菌株（枯草芽孢杆菌模式菌株：GDMCC 1.2498=ATCC 6051）
- B.1.8 阴性对照菌株（解淀粉芽孢杆菌模式菌株：GDMCC 1.3155=ATCC 23350）
- B.1.9 10×PCR缓冲液
- B.1.10 10.0 mM dNTP
- B.1.11 2.5 U/μL Taq DNA聚合酶
- B.1.12 琼脂糖
- B.1.13 PCR反应管
- B.1.14 DNA marker
- B.1.15 0.5×TBE

B.2 仪器设备

- B.2.1 PCR仪
- B.2.2 电泳仪
- B.2.3 凝胶分析成像系统
- B.2.4 超净工作台
- B.2.5 小型离心机
- B.2.6 微量可调移液器（量程分别为2.5 μL、10 μL、100 μL、1000 μL）

B.3 试验步骤

B.3.1 菌种纯化

自平板上挑取单菌落，划线转接培养于营养琼脂平板上，36℃±1℃培养16h~24h。从每一平板中选取至少1个良好分离的特征菌落，转接保存，进行确证试验。

B.3.2 形态观察

将挑选纯化的菌落作革兰氏染色镜检。枯草芽孢杆菌细胞应为杆状，有芽孢，芽孢椭圆形，中生或近中生，芽孢囊不明显膨大。

B.3.3 生理生化确证试验

将挑选纯化的菌落进行7%NaCl生长、V-P测定、硝酸盐还原、D-甘露醇发酵和丙酸盐利用试验。枯草芽孢杆菌与类似芽孢杆菌的鉴别特征见表B.1。

表B.1 枯草芽孢杆菌与其它类似芽孢杆菌的鉴别特征

项目	枯草芽孢杆菌 <i>B.subtilis</i>	地衣芽孢杆菌 <i>B.licheniformis</i>	贝莱斯芽孢杆菌 <i>B.velezensis</i>	凝结芽孢杆菌 <i>B.coagulans</i>	解淀粉芽孢杆菌 <i>B.amyloliquefaciens</i>	暹罗芽孢杆菌 <i>B.siamensis</i>	巨大芽孢杆菌 <i>B.megaterium</i>	短小芽孢杆菌 <i>B.pumilus</i>
V-P测定	+	+	+	+	+	+	-	+
硝酸盐还原	+	+	+	+/-	+	+	+/-	-
利用丙酸盐	-	+	-	-	-	-	ND	-
D-甘露醇发酵	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+
7%NaCl生长	+	+	+	-	+	+	+/-	+

注：+：阳性；-：阴性；+/-：部分菌株为阳性；ND：未测定。

B.3.4 PCR扩增验证

B.3.4.1 待测菌株的准备

a) 待测菌株纯度检测

经菌落培养确定为单一菌落、染色镜检观察菌体形态一致者，确定培养物符合要求。

b) 待测菌株增菌培养

将纯度检验合格的菌株接种于营养琼脂培养基中，在36℃±1℃条件下培养16 h~24 h。

B.3.4.2 待测菌株DNA的提取

可使用酚氯仿提取法或商业化的细菌DNA提取试剂盒并按其说明提取制备模板DNA。

B.3.4.3 PCR反应的质量控制

a) 每个PCR反应均应设立两个平行实验。

b) 应设置空白对照、阳性对照和阴性对照，空白对照的PCR反应体系中以水代替DNA模板，阳性对照使用与目标菌株同种的模式菌株或参比菌株的DNA为模板，阴性对照采用不含目标序列的DNA为模板。

B.3.4.4 PCR扩增

a) 引物：见表B.2引物序列。

表 B. 2 引物序列

靶基因扩增引物名称	扩增引物序列
BSSM-F	5'-GTTTTTCTGTACTGGCTCAACT-3'
BSSM-R	5'-ACCAGTCCAAGTAGACCTATTA-3'

b) PCR反应体系：见表B.3 每25 μL反应体积所含组分。

表B.3 每25 μL反应体积所含组分

成分	实际用量
10×Buffer	2.50 μL
10.0 mM dNTP	0.50 μL
2.5 U/μL Taq DNA聚合酶	0.25 μL
上游引物 (10 μM)	0.50 μL
下游引物 (10 μM)	0.50 μL
DNA模板	1.00 μL
无菌双蒸水	将反应体积补足至25 μL
注：空白对照中应含有除模板核酸外的所有组分。	

c) PCR反应参数

94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s；61 ℃退火30 s；72 ℃延伸12 s，进行30个循环；72 ℃延伸10min，4 ℃保存反应产物。

B.3.4.5 PCR 扩增产物的电泳检测

用电泳缓冲液(0.5×TBE)制备1.0%琼脂糖凝胶，5 μL PCR扩增产物点样，核酸染料染色，DNA marker (100 bp DNA ladder) 做参照，120 V电泳20 min。电泳检测结果采用凝胶成像分析系统检测。

B.3.4.6 PCR 扩增产物的测序验证

电泳结束后，根据DNA Marker条带的指示，对目的条带进行胶回收，获得的产物，利用靶基因扩增引物BSSM-F和BSSM-R进行测序。枯草芽孢杆菌模式菌株 (GDMCC 1.2498^T = ATCC 6051^T) 的靶基因序列如下：

```

1      GTTTTTTCTG TACTGGCTCA ACTGTTTGCG GTTATAGATG ACTCTTACAC TTTGGGGAAT
61     TTATGGTTTT TAGGTGCTTT GCGGGAATT ATAACCATGC TTGCTTCAAT CCAGACAAAT
121    AATAAACCCAG TCTTCAGCAT ATTATTAATT GCTAGTTCAG TAATAGGTCT ACTTGGAAct
181    GGT

```

B.3.4.7 结果判定

枯草芽孢杆菌的目的片段为183 bp，如能扩增出相同大小单一的目的条带，且阴性对照菌株无扩增条带，则目标菌为枯草芽孢杆菌。

出现以下情况之一，则判定本次鉴定的结果无效，应重新进行实验。

- 两份平行测试样品的结果不一致；
- 空白对照或阴性对照出现条带；
- 阳性对照未出现预期大小的扩增条带。

B.3.5 鉴定结果

枯草芽孢杆菌菌落表面粗糙，不透明，灰白色或微黄色，细胞杆状，有芽孢，芽孢椭圆形中生或近中生，芽孢囊不膨大；在7%NaCl中生长，V-P测定阳性，硝酸盐还原阳性，能发酵D-甘露醇产酸，不利用丙酸盐；PCR扩增验证，能扩增出PCR产物大小为183 bp的特异性目的条带。符合以上形态、生理生化试验及PCR扩增验证结果则可判为枯草芽孢杆菌。

参 考 文 献

- [1] 饲料原料目录（中华人民共和国农业农村部公告）
 - [2] 饲料添加剂品种目录（中华人民共和国农业农村部公告）
-