

中华人民共和国农业行业标准

《直接饲喂微生物饲料添加剂和发
酵制品类饲料添加剂生产菌株鉴定
第1部分：细菌菌种鉴定 分子生物
学方法》（征求意见稿）

编制说明

承担单位：中国食品发酵工业研究院有限公司
全国畜牧总站

二零二二年六月

目 录

一、标准制定背景及任务来源.....	1
(一) 标准制定背景.....	1
(二) 国内外相关标准指南和权威文献.....	2
(三) 任务来源.....	5
二、主要工作过程.....	5
三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....	5
(一) 标准编制原则.....	5
(二) 主要技术内容的确定.....	6
1、标准的范围.....	6
2、术语和定义.....	9
3、待鉴定菌株基因组 DNA 提取方法.....	10
4、全基因组序列质控参数.....	11
6、方法中结果判定阈值的依据.....	11
7、方法准确性.....	12
8、方法重复性.....	15
9、方法适用性.....	18
10、方法再现性/实验室间比对.....	22
(三) 标准征求意见.....	24
(四) 标准预审.....	24
四、采用的国际标准.....	25
五、与现行法律法规和强制性标准的关系.....	25
六、重大分歧意见的处理经过和依据.....	25
七、标准作为强制性或推荐性国家标准的意见.....	25
八、贯彻标准的要求和措施建议.....	25
九、废止现行有关标准的建议.....	25
十、其他应予说明的事项.....	25

农业行业标准《直接饲喂微生物饲料添加剂和发酵制品类饲料添加剂生产菌株鉴定 第1部分：细菌菌种鉴定 分子生物学方法》编制说明（征求意见稿）

一、标准制定背景及任务来源

（一）标准制定背景

近年来，我国微生物相关饲料添加剂产业蓬勃发展，在保障养殖动物健康方面发挥重要作用。在抗生素“禁用”和畜牧业绿色发展的政策背景下，越来越多的微生物被开发，用于饲料和饲料添加剂的生产。直接饲喂微生物和发酵制品类饲料添加剂生产菌株是微生物相关饲料添加剂产品的核心，其质量关系饲料产品安全和动物源食品安全。对微生物菌种的准确鉴定是产品质量安全的基本保障。

目前我国对直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株主要以名单形式在种水平上进行管理。《新饲料添加剂申报材料要求》（2019年农业农村部第226号公告）亦明确规定应通过菌株的形态学、生理生化特性、分子生物学特性等方法，提供鉴定至少到种或亚种的报告。2021年11月农业农村部发布了《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》，为新饲料添加剂评审和已经批准使用的饲料添加剂再评价开展的微生物鉴定和安全性评价提供了系统的方法指导。对于“微生物鉴定”，指南要求“直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株应明确鉴定至少到种或亚种水平”，并规定了鉴定方法。其中“分子生物学分析”是重要的微生物鉴定方法，但目前缺少配套的微生物鉴定方法标准，企业、检测机构无鉴定标准可依，行业存在饲料用途微生物菌株名称不准确、不规范等情况，不利于政府有效监管，也为行业健康发展带来隐患。

传统的微生物鉴定主要通过形态学和生理生化特性等表型特征分析进行。随着分子生物学技术的发展和广泛应用，微生物鉴定已从表型特征分析深入到基因型特征分析。基于16S rRNA、*pheS*、*gyrB*等基因序列分析的方法已成为微生物鉴定的常规方法，可用于常见的直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株中的细菌（如嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*、戊糖片球菌 *Pediococcus pentosaceus*、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis* 等）的种水平鉴定。随着高通量测

序技术和生物信息学分析方法的快速发展，细菌全基因组测序（WGS）和分析已比较成熟，基于 WGS 的平均核苷酸序列一致性（ANI）分析可实现微生物种水平的准确鉴定。2018 年，欧盟发布的《用作饲料添加剂和生产菌株的微生物特征描述指南》亦要求通过 WGS 对申请上市的饲料添加剂菌株进行种水平鉴定。

（二）国内外相关标准指南和权威文献

细菌菌种鉴定相关的国内标准主要以形态学、生理生化特性为主。近年 rRNA 基因分析、特异 PCR 方法、全基因序列分析等分子生物学方法也逐渐被列入行业标准、团体标准（见表 1）。

表 1 细菌分子生物学菌种鉴定相关国内标准

序号	标准编号	标准名称	方法
1	GB 4789.35-2016	食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验	形态学、生化
2	GB 4789.35-20 XX	食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验（征求意见稿）	形态学、生化；荧光 PCR
3	GB 4789.34-2016	食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验	形态学、生化
4	GB/T 34224-2017	生物产品中功能性微生物检测	形态学和生理生化
5	GB/T 26428-2010	饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测	形态学和生理生化
6	GB/T 20191-2006	饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验	形态学和生理生化
7	NY/T 2131-2012	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	形态学和生理生化
8	NY/T 1461-2007	饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌	形态学和生理生化
9	NY/T 1736-2009	微生物肥料菌种鉴定技术规范	形态学、生理生化、16S rRNA 基因
10	SN/T 2728-2010	枯草芽孢杆菌检测鉴定方法	形态学、生理生化、特异 PCR 和荧光 PCR
11	SN/T 4624.15-2016	入境环保用微生物菌剂检测方法 第 15 部分：解淀粉芽孢杆菌	形态学、生理生化、特异 PCR
12	SN/T 4624.2-2016	入境环保用微生物菌剂检测方法 第 2 部分：短小芽孢杆菌	形态学、生理生化、特异 PCR
13	SN/T 4624.1-2016	入境环保用微生物菌剂检测方法 第 1 部分：地衣芽孢杆菌	形态学、生理生化、特异 PCR
14	T/CSWSL 005-2018	饲料添加剂 植物乳杆菌	形态学、生理生化和 16S rRNA 基因
15	T/CSWSL022-2020	饲料添加剂 凝结芽孢杆菌	形态学、生理生化、16S rRNA 基因
16	T/CSWSL 016-2019	水产动物饲用乳酸菌筛选标准	形态学、生理生化、16S rRNA 基因、WGS ANI
17	T/CSWSL 017-2019	水产动物饲用芽孢杆菌筛选标准	形态学、生理生化、16S rRNA 基因、WGS

序号	标准编号	标准名称	方法
18	QB/T 5165-2017	食品用乳酸菌鉴定技术指南	ANI 形态学、生理生化、 PCR (基因)
19	DB21/T 3278-2020	饲用微生物制剂中凝结芽孢杆菌的检测	形态学、生理生化、特 异 PCR

此外,《保健食品原料用菌种安全性检验与评价技术指导原则(2020年版)》、《食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序(征求意见稿)》和《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》(农办牧〔2021〕43号)均要求提供拟评价菌株的全基因组序列数据信息。基于全基因组序列的分析逐渐成为菌种鉴定的重要方法。

饲料用途微生物细菌菌种鉴定相关的国际标准、指南主要以分子生物学方法为主,近年来 WGS 方法在联合国粮农组织/世界卫生组织 (FAO/WHO)、美国食品药品监督管理局 (FDA)、欧洲食品安全局 (EFSA)、美国食品化学法典 (FCC) 和国际乳品联合会发布的饲料、食品微生物相关的指南中被广泛采用,如下表 2 所示。

表 2 国外微生物细菌种水平鉴定相关文件列表

序号	机构	文件名称	方法	年份
1	FAO/WHO	FAO/WHO Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food	rRNA 基因等	2002
2	FDA	Generally Recognized as Safe (GRAS) Determination for the Use of the Probiotics <i>Lactobacillus helveticus</i> Rosell®-52 (R0052), <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>infantis</i> Rosell®-33 (R0033), and <i>Bifidobacterium bifidum</i> Rosell®-71 (R0071)	rRNA 基因等	2018
3	FDA	Generally Recognized as Safe (GRAS) Determination for the Intended Use of <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12®	rRNA 基因等	2019
4	FDA	Generally Recognized as Safe (GRAS) COMPREHENSIVE GRAS ASSESSMENT of <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	rRNA 基因等	2019
5	EFSA	Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms	WGS	2018
6	EFSA	Characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes	WGS	2019
7	EFSA	EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain	WGS	2021
8	FCC	FCC 12 APPENDIX XV: MICROBIAL FOOD CULTURES INCLUDING	rRNA 基因等	2020
9	IDF	Bulletin of the IDF N°513/2021: Identification of Probiotics at the strain level - Guidance Document	rRNA 基因、 WGS	2021

此外,国际原核微生物分类鉴定的权威杂志《国际系统与进化微生物学杂志》(IJSEM)报道的常见饲料用途微生物细菌种水平鉴定相关的文献也主要以

分子生物学方法为主（见表 3）。16S rRNA 是细菌普遍采用的分类鉴定标记基因，*pheS* 基因常用于乳杆菌的鉴定，*gyrB* 基因常用于芽胞杆菌的鉴定。2018 年起 IJSEM 已要求新发现微生物物种发表时需要提交全基因组序列。利用全基因组序列分析的方法进行菌株的鉴定和特征分析已是必然趋势。

表 3 常见饲料用途微生物细菌种水平鉴定相关的权威文献列表

序号	文献名称	方法
1	Kim M , Oh H S , Park S C , et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2):346-351.	16S rRNA
2	Naser S M , Dawyndt P , Hoste B , et al. Identification of lactobacilli by <i>pheS</i> and <i>rpoA</i> gene sequence analyses[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2007, 57(Pt 12):2777-2789.	<i>pheS</i>
3	Wang L T, Lee F L, Tai C J, et al. Comparison of <i>gyrB</i> gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the <i>Bacillus subtilis</i> group[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(8):1846-1850.	16S rRNA <i>gyrB</i>
4	Ki J S, Zhang W, Qian P Y. Discovery of marine <i>Bacillus</i> species by 16S rRNA and <i>rpoB</i> comparisons and their usefulness for species identification[J]. J Microbiol Methods. 2009, 77(1):48-57.	16S rRNA
5	Bavykin S G, Lysov Y P, Zakhariyev V, et al. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and <i>gyrB</i> Gene Sequence Analysis To Determine Phylogenetic Relationships of <i>Bacillus cereus</i> Group Microorganisms[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(8):3711-3730.	16S rRNA <i>gyrB</i>
6	Duc M T L, Satomi M, Agata N, et al. <i>gyrB</i> as a phylogenetic discriminator for members of the <i>Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis</i> group[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3):383-394.	<i>gyrB</i>
8	Naser S M, Vancanneyt M, Snauwaert C, et al. Reclassification of <i>Lactobacillus amylophilus</i> LMG 11400 and NRRL B-4435 as <i>Lactobacillus amylophilus</i> sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(11):2523-2527.	<i>pheS</i>
9	Hoang V A, Kim Y J, Nguyen N L, et al. <i>Lactobacillus vespulae</i> sp. nov. isolated from gut of queen wasp (<i>Vespula vulgaris</i>)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(10).	<i>pheS</i>
10	Liou, J. S., Huang, C. H., Wang, et al. <i>Lactobacillus suantsaii</i> sp. nov., isolated from suan-tsai, a traditional Taiwanese fermented mustard green[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(5).	<i>pheS</i>
11	GORIS J, KONSTANTINIDIS K T, KLAPPENBACH J A, et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(1):81-91.	WGS
12	Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018, 68, 461-466.	WGS
13	Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., et al.. A taxonomic note on the genus <i>Lactobacillus</i> : Description of 23 novel genera, emended description of the genus <i>Lactobacillus</i> Beijerinck 1901, and union of <i>Lactobacillaceae</i> and <i>Leuconostocaceae</i> [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(4):2782-2858.	WGS

（三）任务来源

根据农质标函〔2021〕76号农业农村部农产品质量安全监管司关于下达2021年农业国家标准和行业标准制修订项目计划的通知，由中国食品发酵工业研究院有限公司主持承担《饲用微生物细菌分子生物学菌种鉴定方法》的制定工作，标准项目号：NYB-21233。

二、主要工作过程

2021年3月，收到标准制定任务后，成立标准起草组，制定实施方案。

2021年3月~6月，收集和整理国内外饲料用途微生物细菌鉴定有关的标准、指南、文献等资料。

2021年7月~9月，完成饲料用途微生物细菌分子生物学鉴定方法的建立，讨论并修改标准文本。根据鉴定数据确定方法的准确性、重复性等。

2021年10月~11月，整理标准方法的外部实验室间比对结果，验证标准方法。

2021年12月~2022年3月，召开标准专家研讨会，根据专家意见，对标准进行了多轮修改，形成《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株中的细菌鉴定分子生物学方法》标准初稿。广泛征求行业企业专家意见，收集到20位函审专家的103条意见反馈。根据专家意见进行讨论，修改完善标准，形成《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株 细菌菌种鉴定 分子生物学方法》（预审稿）。

2022年5月26日，召开标准预审会，与会专家一致同意标准起草单位按照专家意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

（一）标准编制原则

本标准根据2019年农业农村部第226号公告和2021年农业农村部发布的《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》（农办牧〔2021〕43号）中对微生物菌种鉴定的要求，依据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》进行编制。其中，《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》中对直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株要求应明确鉴定至少到种或亚种水平。细菌鉴定的分子生物学方法包括16S rDNA序列、持家基因序列或WGS等分析。用于新饲料添加剂

申报的，应利用 WGS 数据进行分析鉴定。

本标准主要以长期积累的微生物细菌菌种鉴定的数据为基础，参考国内外微生物鉴定的相关技术资料，结合微生物分子生物学鉴定工作中的经验，针对直接饲喂微生物和发酵制品类饲料添加剂生产菌株中的细菌菌种鉴定进行编制。

（二）主要技术内容的确定

1、标准的范围

本标准描述了直接饲喂微生物饲料添加剂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。依据 2019 年农业农村部第 226 号公告和农办牧〔2021〕43 号文件要求，本标准提供了两种用于直接饲喂微生物和发酵制品类饲料添加剂生产菌株中细菌菌种鉴定的分子生物学方法。根据我国农业部 2013 年第 2045 号公告（《饲料添加剂品种目录》）和农业农村部后续发布的相关公告，可作为直接饲喂微生物和发酵制品类饲料添加剂生产菌株使用的细菌菌种目前共计 31 个种（排除非科学名称、同物异名等情况），见表 4。其中，平均核苷酸一致性（ANI）鉴定法（第一法）适用于已批准或拟申报的直接饲喂微生物饲料添加剂和发酵制品类饲料添加剂生产菌株中细菌菌种纯培养物的鉴定。基因序列鉴定法（第二法）适用于已批准或拟申报的直接饲喂微生物饲料添加剂和发酵制品类饲料添加剂生产菌株中细菌菌种纯培养物的鉴定。第二法适用于标准附录 A 中 26 种细菌的菌种鉴定。其中长双歧杆菌、短双歧杆菌、动物双歧杆菌等推荐了 16S rRNA 基因鉴定，芽胞杆菌属的部分菌种推荐了 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因鉴定，乳杆菌属的部分菌种推荐了 16S rRNA 基因和 *pheS* 基因鉴定。细菌菌种纯培养物的鉴定。

表 4 批准的直接饲喂微生物和发酵制品类饲料添加剂生产菌株细菌名单及种水平鉴定方法

序号	批准的菌种名称	分类学名称/备注	第一法（ANI 鉴定法）	第二法（基因鉴定法）	
			可鉴定菌种至	16S rRNA 基因可鉴定菌种至	<i>gyrB/pheS</i> 基因可鉴定菌种至
1	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	种水平	属水平	<i>gyrB</i> 基因种水平
2	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	种水平	属水平	<i>gyrB</i> 基因种水平
3	迟缓芽胞杆菌 <i>Bacillus lentus</i>	<i>Lederbergia lenta</i>	种水平	种水平	—
4	短小芽胞杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	短小芽胞杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	种水平	属水平	<i>gyrB</i> 基因种水平
5	凝结芽胞杆菌 <i>Bacillus coagulans</i>	<i>Weizmannia coagulans</i>	种水平	种水平	—
6	解淀粉芽胞杆菌 <i>Bacillus</i>	解淀粉芽胞杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	种水平	属水平	<i>gyrB</i> 基因种水平

序号	批准的菌种名称	分类学名称/备注	第一法 (ANI 鉴定法)	第二法 (基因鉴定法)	
			可鉴定菌种至	16S rRNA 基因可鉴定菌种至	<i>gyrB/pheS</i> 基因可鉴定菌种至
	<i>amyloliquefaciens</i>				
7	侧孢短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	侧孢短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	种水平	属水平	<i>gyrB</i> 基因种水平
8	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳植物杆菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	种水平	属水平	<i>pheS</i> 基因种水平
9	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	种水平	种水平	——
10	干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>	干酪乳酪杆菌 <i>Lactocaseibacillus casei</i>	种水平	属水平	<i>pheS</i> 基因种水平
11	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	类干酪乳酪杆菌 <i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	种水平	属水平	<i>pheS</i> 基因种水平
12	德氏乳杆菌保加利亚亚种 德氏乳杆菌乳酸亚种	属同种： 德氏乳杆菌 <i>L. delbrueckii</i>	种水平	种水平	——
13	罗伊氏乳杆菌 <i>Lactobacillus reuteri</i>	罗伊氏粘液乳杆菌 <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	种水平	属水平	——
14	发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵粘液乳杆菌 <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	种水平	种水平	——
15	纤维二糖乳杆菌 <i>Lactobacillus cellobiosus</i>				
15	布氏乳杆菌 <i>Lactobacillus buchneri</i>	布氏迟缓乳杆菌 <i>Lentilactobacillus buchneri</i>	种水平	属水平	<i>pheS</i> 基因种水平
16	约氏乳杆菌 <i>Lactobacillus johnsonii</i>	约氏乳杆菌 <i>Lactobacillus johnsonii</i>	种水平	属水平	<i>pheS</i> 基因种水平
17	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	种水平	种水平	——
18	乳酸片球菌 <i>Pediococcus acidilactici</i>	乳酸片球菌 <i>Pediococcus acidilactici</i>	种水平	属水平	<i>pheS</i> 基因种水平
19	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	种水平	种水平	——
20	尿肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	尿肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	种水平	属水平	——
21	乳酸肠球菌 <i>Enterococcus lactis</i>	乳酸肠球菌 <i>Enterococcus lactis</i>	种水平	属水平	——
22	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	种水平	属水平	<i>pheS</i> 基因种水平
23	两歧双歧杆菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	两歧双歧杆菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	种水平	种水平	——
24	长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i>	同种：长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i>	种水平	种水平	——
25	婴儿双歧杆菌 <i>Bifidobacterium infantis</i>				
25	短双歧杆菌 <i>Bifidobacterium breve</i>	短双歧杆菌 <i>Bifidobacterium breve</i>	种水平	种水平	——
26	青春双歧杆菌 <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	青春双歧杆菌 <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	种水平	属水平	——
27	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i>	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i> (包括动物双歧杆菌动物)	种水平	种水平	——

序号	批准的菌种名称	分类学名称/备注	第一法 (ANI 鉴定法)	第二法 (基因鉴定法)	
			可鉴定菌种至	16S rRNA 基因可鉴定菌种至	<i>gyrB/pheS</i> 基因可鉴定菌种至
		亚种 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> 和动物双歧杆菌乳亚种 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>)			
28	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> 乳糖发酵短杆菌 <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	种水平	属或种水平	<i>gyrB</i> 基因种水平
29	沼泽红假单胞菌 <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	沼泽红假单胞菌 <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	种水平	属水平	—
30	产丙酸丙酸杆菌 <i>Propionibacterium acidipropionici</i>	<i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i>	种水平	种水平	—
31	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	种水平	种水平	—

随着原核生物分类学研究的深入，根据 IJSEM 的最新报道和 LPSN 的更新，部分微生物的分类学地位发生变迁，菌种名称随之变化。表 4 中已批准的菌种发生分类学名称变化的如下：

迟缓芽胞杆菌 *Bacillus lentus* 分类学名称变更为：*Lederbergia lenta* (Gupta RS, Patel S, Saini N, et al. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species[J]. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020; 70:5753-5798.)。

凝结芽胞杆菌 *Bacillus coagulans* 分类学名称变更为：*Weizmannia coagulans* (Gupta RS, Patel S, Saini N, et al. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020, 70:5753-5798.)。

纤维二糖乳杆菌 *Lactobacillus cellobiosus* 分类学名称变更为：发酵粘液乳杆菌 *Limosilactobacillus fermentum* (Dellaglio F, Torriani S, Felis GE. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, 54:809-

812. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020, 70:2782-2858)。

发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum*、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei*、副干酪乳杆菌 *Lactobacillus paracasei* 和布氏乳杆菌 *Lactobacillus buchneri* 分类学名称分别变更为：发酵粘液乳杆菌 *Limosilactobacillus fermentum*、植物乳植物杆菌 *Lactiplantibacillus plantarum*、干酪乳酪杆菌 *Lacticaseibacillus casei*）、类干酪乳酪杆菌 *Lacticaseibacillus paracasei*、布氏迟缓乳杆菌 *Lentilactobacillus buchneri* (Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020, 70:2782-2858.)。

产丙酸丙酸杆菌 *Propionibacterium acidipropionici* 分类学名称变更为：*Acidipropionibacterium acidipropionici* (Scholz CF, Kilian M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov.[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016, 66:4422-4432.)。

乳糖发酵短杆菌 *Brevibacterium lactofermentum* 分类学名称变更为：谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* (Liebl W, Ehrmann M, Ludwig W, Schleifer KH. Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297^T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137^T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1991, 41:255-260.)。

2、术语和定义

依据农办牧〔2021〕43号文件《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》中“直接饲喂微生物”和“发酵制品”的术语定义，标准中定义“直接饲喂微生物”为：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。定义“发酵制品类饲料添加剂”为：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。

参考 NY/T 1736-2009《微生物肥料菌种鉴定技术规范》、《微生物学》（沈萍著，2016年）和《伯杰氏系统细菌学手册》（Goodfellow, M 等著，2012年）中关于菌种鉴定的表述，结合本标准描述具体鉴定方法（分子生物学方法）的特点，定义“鉴定”为：通过分析菌株的分子特征，确定菌株分类地位的过程。

参考 GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程，定义“测序深度”为：菌株基因组中某个指定的核苷酸被检测的次数。“叠连群”的定义（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）来源于 GB/T 29859-2013 生物信息学术语。

3、待鉴定菌株基因组 DNA 提取方法

通过调研近年来发布的 PCR 扩增和测序相关标准，如 GB/T 38488-2021《微生物快速测定方法》、GB/T 40049-2021《鸡肠炎沙门氏菌 PCR 检测》、GB 4789.44-2020《食品安全国家标准 食品微生物学检验 创伤弧菌检验》、GB/T 40226-2021《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》等，细菌基因组 DNA 的试剂盒已经成为普遍采用的常规方法。细菌基因组 DNA 提取试剂盒方法技术成熟，成本可控，与传统有机试剂抽提的方法相比具有方便快捷、样品污染风险较低、对实验条件和操作人员的要求较低、安全性较高等优点，在各行业领域已广泛应用。因此，本标准亦采用了细菌基因组 DNA 提取试剂盒的方法提取待鉴定菌株基因组 DNA。另外，为尽可能保证标准的普适性，参考 SN/T 4624.1-2016《入境环保用微生物菌剂检测方法 第 1 部分：地衣芽孢杆菌》、SN/T 4624.15-2016《入境环保用微生物菌剂检测方法 第 15 部分：解淀粉芽孢杆菌》、SN/T 4624.20-2021《入境环保用微生物菌剂检测方法 第 20 部分：泛养副球菌》在第二法（基因序列鉴定法）中保留了手工提取的方法。GB/T 37874-2019《核酸提取纯化方法评价通则》中对 DNA 的完整性、纯度等质量参数有明确的标准。鉴于高通量测序对于基因组 DNA 的完整性和纯度有较高要求，且不同文库构建试剂盒对于基因组 DNA 的浓度和总量有相应要求，因此第一法规定提取基因组 DNA 的质量应符合 GB/T 37874-2019 的要求，DNA 的浓度和总量还应符合文库构建试剂盒的相关要求。而影响基因序列 PCR 扩增的主要

因素为 DNA 纯度，因此，第二法规定提取基因组 DNA 的质量应符合 GB/T 37874-2019 中 5.3（核酸纯度）的要求，参考 SN/T 4624 的系列标准，规定了 PCR 反应体系中 DNA 模板量为约 50 ng~200 ng。

4、全基因组序列质控参数

参考欧盟 2021 年发布的食品链微生物全基因组序列分析要求的指南文件（EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain）和 IJSEM 杂志 2018 年发布的关于原核微生物分类鉴定的全基因组数据的最低标准的文章（Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018, 68:461-466.），标准中规定：经用第二代测序（或第二代结合第三代测序）获得的基因组序列的质量应满足：测序深度 $\geq 50\times$ ；叠连群数量 < 500 个；基因组序列总长度与预期基因组大小的差异 $\leq 20\%$ 。

5、PCR 扩增引物、反应条件和对照

第二法用于菌种鉴定的基因的选择、基因序列扩增的引物、反应条件参考了 IJSEM 发表的相关权威文献（见表 3）。此外，设置了阳性对照和阴性对照用于 PCR 质控。选择常见的直接饲喂微生物菌种或发酵制品类饲料添加剂生产菌种的模式菌株作为阳性对照菌株。16S rRNA 基因序列扩增时，选择枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* CICC 10498^T (=ACCC 10243^T)、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* CICC 6096^T (=ACCC 19940^T)。用于芽胞杆菌等菌种鉴定的 *gyrB* 基因进行 PCR 扩增时，选择枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 的模式菌株 CICC 10498^T (=ACCC 10243^T) 为阳性对照菌株。用于部分乳杆菌鉴定的 *pheS* 基因进行 PCR 扩增时，选择嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* 的模式菌株 CICC 6096^T (=ACCC 19940^T) 为阳性对照菌株。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 作为阴性对照。考虑到标准的普适性，阳性对照菌株也可用功能相当的其他产品代替。PCR 扩增所用的试剂也可使用等效的商业化的试剂，PCR 扩增反应体系按其说明配制。

6、方法中结果判定阈值的依据

依据微生物鉴定相关的国际指南（表 2）和微生物分类鉴定的权威文献（表 3），采用第一法进行菌种鉴定的种水平判定阈值为 ANI 值 95%~96%，采用第二法中 16S rRNA 基因鉴定的种水平判定阈值为 98.65%，*gyrB* 基因和 *pheS*

基因鉴定的种水平判定阈值为 97.0%。上述阈值设定最主要的依据见表 5。

表 5 标准中第一法和第二法种水平判定的阈值及重要依据

方法	种水平鉴定 阈值	重要依据
第一法 (ANI 鉴定)	95%~96%	Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018, 68:461-466.
第二法 (16S rRNA 基因序列鉴定)	98.65%	Kim M , Oh H S , Park S C , et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(2):346-351.
第二法 (<i>pheS</i> 基因序列鉴定)	97.0%	Naser S M , Dawyndt P , Hoste B , et al. Identification of lactobacilli by <i>pheS</i> and <i>rpoA</i> gene sequence analyses[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(12):2777-2789.
第二法 (<i>gyrB</i> 基因序列鉴定)	97.0%	Wang L T, Lee F L, Tai C J, et al. Comparison of <i>gyrB</i> gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the <i>Bacillus subtilis</i> group[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(8):1846-1850.

7、方法准确性

选择常见的分类学名称准确无误、来源明确的枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、凝结芽胞杆菌 *Bacillus coagulans*、解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*、发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum*、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei*、副干酪乳杆菌 *Lactobacillus paracasei*、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*、罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri*、嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus*、两歧双歧杆菌 *Bifidobacterium bifidum*、长双歧杆菌 *Bifidobacterium longum*、动物双歧杆菌 *Bifidobacterium animalis*、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*、丁酸梭菌 *Clostridium butyricum*、屎肠球菌 *Enterococcus faecium*、乳酸肠球菌 *Enterococcus lactis*、青春双歧杆菌 *Bifidobacterium adolescentis* 和沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* 菌株为测试菌株，采用第一法（ANI 鉴定法）进行鉴定，鉴定结果见表 6。测试菌株经第一法鉴定，结果均可鉴定至种水平，与菌株的种名一致，方法的正确度为 100%。

表 6 采用第一法对测试菌株的鉴定结果

序号	菌株	模式菌株及其基因组序列号	与模式菌株 ANI 值/%	与其他近缘种 ANI 值/ %	鉴定结果	结论
1	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> CICC 10498 ^T	NCTC 3610 (GCA_900445475.1)	99.96	≤95.16	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	一致
2	凝结芽胞杆菌 <i>Bacillus coagulans</i> CICC 20138	ATCC 7050 (GCA_000832905.1)	97.26	≤75.04	凝结芽胞杆菌 <i>Bacillus coagulans</i>	一致
3	解淀粉芽胞杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 13952	DSM 7 (GCA_000196735.1)	99.26	≤93.78	解淀粉芽胞杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	一致
4	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> CICC 6009	DSM 16365 (GCA_003641165.1)	98.99	≤95.77	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	一致
5	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i> CICC 6075 ^T	DSM 20079 (GCA_003047065.1)	100.00	≤81.17	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	一致
6	干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i> CICC 6117 ^T	ATCC 393 (GCA_000829055.1)	99.93	≤94.44	干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>	一致
7	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i> CICC 6263 ^T	JCM 8130 (GCA_000829035.1)	99.99	≤75.88	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	一致
8	德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CICC 6047	DSM 20074 (GCA_001908495.1)	99.30	≤79.78	德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	一致
9	罗伊氏乳杆菌 <i>Lactobacillus reuteri</i> CICC 6132	JCM 1112 (GCA_000010005.1)	99.99	≤64.27	罗伊氏乳杆菌 <i>Lactobacillus reuteri</i>	一致
10	发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i> CECT 5716	ATCC 14931 (GCA_000159215.1)	99.27	≤66.02	发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i>	一致
11	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	ATCC 19433 (GCA_000392875.1)	98.51	≤70.25	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	一致
12	屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i> CICC 20430	NCTC 7171 (GCA_900447735.1)	98.89	≤94.75	屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	一致
13	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i> CICC 6038	NCTC 12958 (GCA_900474985.1)	99.28	≤91.89	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	一致
14	两歧双歧杆菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i> CICC 6071 ^T	JCM 1255 (GCA_001025135.1)	100.00	≤81.40	两歧双歧杆菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	一致
15	长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i> CICC 6069 ^T	ATCC 15697 (GCA_000020425.1)	99.99	≤85.24	长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i>	一致
16	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i> Bi-07	ATCC 25527 (GCA_000260715.1)	99.99	≤78.77	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i>	一致
17	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> CICC 20213 ^T	ATCC 13032 (GCA_000011325.1)	100.00	≤84.51	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	一致
18	青春双歧杆菌 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20087	ATCC 15703 (GCA_000010425.1)	96.93	≤87.50	青春双歧杆菌 <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	一致
19	乳酸肠球菌 <i>Enterococcus lactis</i> CICC 20089	LMG 25958 (GCA_015904215.1)	97.89	≤94.24	乳酸肠球菌 <i>Enterococcus lactis</i>	一致
20	沼泽红假单胞菌 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5	DSM 123 (jgi.1102342.1)	98.50	≤83.96	沼泽红假单胞菌 <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	一致

注：NCTC——英国国家典型菌种保藏中心（National Collection of Type Cultures）；ATCC——美国典型菌种保藏中心（American Type Culture Collection）；BCCM/LMG——比利时细菌菌种保藏中心（Belgian Coordinated Collections of Microorganisms）；DSMZ——德国微生物菌种保藏中心（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen）；JCM——日本微生物菌种保藏中心（Japan Collection of Microorganisms）。

选择常见的饲料用途的、分类学名称无误（如经表型方法鉴定确认其分类学名称无误的菌株，或保藏的模式菌株等同编号的菌株）的迟缓芽胞杆菌 *Bacillus lentus*、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis*、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*、发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum*、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei*、副干酪乳杆菌 *Lactobacillus*

paracasei、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*、两歧双歧杆菌 *Bifidobacterium bifidum*、长双歧杆菌 *Bifidobacterium longum*、短双歧杆菌 *Bifidobacterium breve*、动物双歧杆菌 *Bifidobacterium animalis*、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*、丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* 菌株作为测试菌株，采用第二法（基因鉴定法）进行鉴定，鉴定结果见表 7。测试菌株经第二法鉴定，结果均可鉴定至种水平，与模式菌株原种名一致，方法的正确度为 100%。

表 7 采用第二法对测试菌株的鉴定结果

序号	菌株	基因	模式株及其基因序列登录号	与模式株序列相似性%	与其他近缘种序列相似性%	鉴定结果	结论
1	迟缓芽胞杆菌 <i>Bacillus lentus</i> CICC 10365 ^T	16S rRNA	NBRC 16444 ^T (BCVC01000020)	100.00	≤97.01	<i>Lederbergia lenta</i> (原迟缓芽胞杆菌 <i>Bacillus lentus</i>)	一致
2	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i> CICC 6096 ^T	16S rRNA	CIP 76.13 ^T (CBLQ010000054)	100.00	≤98.52	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	一致
3	发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i> CICC 24209 ^T	16S rRNA	CECT 562 ^T (AJ575812)	99.85	≤98.14	发酵粘液乳杆菌 <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (原发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i>)	一致
4	德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CICC 6103 ^T	16S rRNA	ATCC 11842 ^T (CR954253) DSM 20072 ^T (AEXU01000148) JCM 17838 ^T (LGHR01000024) JCM 15610 ^T (LGAS01000062) DSM 20074 ^T (CP018615) ZN7a-9 ^T (ALPY01000052)	99.79 99.58 99.58 99.50 99.43 99.43	≤95.47	德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	一致
5	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> CICC 10396 ^T	16S rRNA	ATCC 19433 ^T (ASDA01000001)	100.00	≤98.45	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	一致
6	两歧双歧杆菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i> CICC 6071 ^T	16S rRNA	ATCC 29521 ^T (KE993182)	100.00	≤95.94	两歧双歧杆菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	一致
7	长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i> CICC 6186 ^T	16S rRNA	JCM 1217 ^T (AP010888) LMG 21814 ^T (JGZA01000002) ATCC 15697 ^T (CP001095) Su 851 ^T (AB924514)	99.93 99.57 99.20 99.20	≤97.25	长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i>	一致
8	短双歧杆菌 <i>Bifidobacterium breve</i> CICC 6079 ^T	16S rRNA	DSM 20213 ^T (ACCG01000002)	100.00	≤97.47	短双歧杆菌 <i>Bifidobacterium breve</i>	一致
9	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i> CICC 6250 ^T	16S rRNA	ATCC 25527 ^T (CP002567) DSM 10140 ^T (CP001606)	99.93 98.91	≤97.53	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i>	一致
10	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i> CICC 10390 ^T	16S rRNA	DSM 10702 ^T (AQQF01000149)	99.93	≤97.92	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	一致
11	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> CICC	16S rRNA	BCRC 11702 ^T (DQ309295)	99.8	≤95.5	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	一致

序号	菌株	基因	模式株及其 基因序列登录号	与模式株序 列相似性%	与其他近缘种 序列相似性%	鉴定结果	结论
	10101 ^T	和 <i>gyrB</i>					
12	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> CICC 10498 ^T	16S rRNA 和 <i>gyrB</i>	BCRC 10255 ^T (DQ309293)	100.0	≤95.1	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	一致
13	干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i> CICC 6117 ^T	16S rRNA 和 <i>pheS</i>	LMG 6904 ^T (AM087682)	100.0	≤92.3	干酪乳杆菌 <i>Lacticaseibacillus casei</i> (原干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>)	一致
14	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i> CICC 6263 ^T	16S rRNA 和 <i>pheS</i>	LMG 13087 ^T (AM087710) LMG 9191 ^T (AM087711)	99.39 99.64	≤83.66	类干酪乳杆菌 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (原类干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i> 中文译名又称副干酪乳杆菌)	一致
15	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> CICC 6240 ^T	16S rRNA 和 <i>pheS</i>	LMG 6907 ^T (AM087714)	100.0	≤90.5	植物乳杆菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (原植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>)	一致
16	约氏乳杆菌 <i>Lactobacillus johnsonii</i> CICC 6252 ^T	16S rRNA 和 <i>pheS</i>	LMG 9436 ^T (AM087701)	99.7	≤91.7	约氏乳杆菌 <i>Lactobacillus johnsonii</i>	一致
17	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i> CICC 20366	16S rRNA 和 <i>pheS</i>	LMG 6896 ^T (AM269543)	99.75	≤96.5	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	一致
18	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> CICC 20190	16S rRNA 和 <i>gyrB</i>	JCM 1318 ^T (AB014285)	99.35	≤88.0	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	一致

注：NBRC——日本国立技术与评估研究所菌种生物资源中心（Culture Collection Division Biological Resource Center）；CIP——法国巴斯德研究所菌物保藏中心（Collection de L'Institut Pasteur Of Institut Pasteur）；CECT——西班牙菌种保藏中心(Colección Española de Cultivos Tipo)；BCRC——台湾生物资源保存及研究中心（Bioresources Collection and Research Center）。

8、方法重复性

采用第一法对枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* CICC 10498、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* CICC 10136R、德氏乳杆菌 *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20072、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212、布氏乳杆菌 *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005、动物双歧杆菌 *Bifidobacterium animalis* Bi-07、罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* I49、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* CICC 20213、屎肠球菌 *Enterococcus faecium* ATCC 8459 和青春双歧杆菌 *Bifidobacterium adolescentis* JCM 1275 分别进行多次重复性鉴定试验，重复鉴定结果见表 8。每株菌的重复鉴定结论完全一致，第一法的重复性良好。

表 8 采用第一法对菌株的重复鉴定结果

序号	菌株	重复次数	模式菌株及其基因组序列号	与模式菌株ANI值/%	与其他近缘种ANI值/%	重复鉴定结果	结论
1	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> CICC 10498	10	NCTC 3610 (GCA_900445475.1)	99.96 99.96 99.96 99.96 99.96 99.93 99.96 99.96 99.96 99.96	≤95.16	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	一致
2	干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i> CICC 10136R	5	ATCC 393 (GCA_000829055.1)	99.95 99.95 99.95 99.96 99.95	≤94.96	干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>	一致
3	德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSM 20072	2	DSM 20074 (GCA_001908495.1)	97.566 96.5086	≤82.33	德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	一致
4	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2	ATCC 19433 (GCA_000392875.1)	98.51 98.53	≤79.13	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	一致
5	布氏乳杆菌 <i>Lactobacillus buchneri</i> ATCC 4005	3	ATCC 4005 (GCA_009495475.1)	99.92 100.00 99.88	≤79.40	布氏乳杆菌 <i>Lactobacillus buchneri</i>	一致
6	尿肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 8459	2	NCTC 7171 (GCA_900447735.1)	99.55 99.50	≤82.02	尿肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	一致
7	青春双歧杆菌 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM 15918	2	ATCC 15703 (GCA_000010425.1)	97.81 97.80	≤89.30	青春双歧杆菌 <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	一致
8	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i> Bi-07	2	DSM_10140 (GCA_000022965.1)	99.99 99.99	≤81.46	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i>	一致
9	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i> CFH	2	DSM 20079 (GCA_003047065.1)	99.95 99.87	≤82.21	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	一致
10	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> CICC 20213	12	ATCC 13032 (GCA_000011325.1)	100.00 100.00 100.00 100.00 100.00 100.00 100.00 100.00 100.00 100.00 100.00	≤84.51	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	一致

采用第二法对凝结芽胞杆菌 *Bacillus coagulans* CICC 21736、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074、丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* CICC 10390、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* CICC 20427、地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis* CICC 10101、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* CICC 20872、植物乳

杆菌 *Lactobacillus plantarum* CICC 21790、布氏乳杆菌 *Lactobacillus buchneri* CICC 20293、乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* CICC 10146 和干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* CICC 6117 分别进行多次重复性鉴定试验，重复鉴定结果见表 9。每株菌的重复鉴定结论完全一致，第二法的重复性良好。

表 9 采用第二法对菌株的重复鉴定结果

序号	菌株	重复次数	模式株及其基因序列登录号	与模式株序列相似性%	与其他近缘种序列相似性%	重复鉴定结果	结论
1	凝结芽胞杆菌 <i>Bacillus coagulans</i> CICC 21736	10	IAM 12463 ^T (D16267)	98.98 98.98 98.98 99.11 99.11 99.11 99.11 99.11 99.71 99.71	≤97.17 ≤97.17 ≤97.17 ≤97.24 ≤97.24 ≤97.24 ≤97.24 ≤97.24 ≤97.07 ≤97.07	<i>Weizmannia coagulans</i> (原凝结芽胞杆菌 <i>Bacillus coagulans</i>)	一致
2	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i> CICC 6074	3	CIP 76.13 ^T (CBLQ010000054)	100.0 100.0 100.0	≤98.59 ≤98.59 ≤98.59	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	一致
3	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i> CICC 10390	10	DSM 10702 ^T (AQQF01000149)	99.71 99.71 99.71 99.71 99.71 99.71 99.71 99.71 99.71 99.93	≤97.73 ≤97.73 ≤97.73 ≤97.73 ≤97.73 ≤97.73 ≤97.59 ≤97.38 ≤97.38 ≤97.38 ≤97.72	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	一致
4	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> CICC 20427	8	ATCC 19433 ^T (ASDA01000001)	99.86 99.86 99.86 99.86 99.86 99.86 99.86 99.72	≤98.33 ≤98.33 ≤98.33 ≤98.33 ≤98.33 ≤98.33 ≤98.33 ≤98.19	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	一致
5	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> CICC 10101	10	BCRC 11702 ^T (DQ309295)	99.8 99.8 99.8 99.8 99.8 99.8 99.8 99.8 99.8 99.8	≤90.3 ≤90.2 ≤90.2 ≤90.2 ≤90.2 ≤90.2 ≤90.2 ≤90.2 ≤90.2 ≤90.2	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	一致
6	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> CICC 20872	10	BCRC 10255 ^T (DQ309293)	99.0 99.0 99.0 99.0 99.0 99.0 99.0 99.0 99.0 99.0	≤95.7 ≤95.7 ≤95.7 ≤95.7 ≤95.7 ≤95.7 ≤95.7 ≤95.7 ≤95.7 ≤95.7	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	一致

序号	菌株	重复次数	模式株及其基因序列登录号	与模式株序列相似性%	与其他近缘种序列相似性%	重复鉴定结果	结论
7	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> CICC 21790	10	CIP 103151 ^T (FR775943)	99.6 99.7 99.7 99.7 99.7 99.7 99.7 99.7 99.7 100.0	≤91.1 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤90.1	植物乳植物杆菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (原植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>)	一致
8	布氏乳杆菌 <i>Lactobacillus buchneri</i> CICC 20293	8	LMG 6892 ^T (AM087681)	100.0 100.0 100.0 100.0 100.0 100.0 100.0 100.0	≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9 ≤89.9	布氏迟缓乳杆菌 <i>Lentilactobacillus buchneri</i> (原布氏乳杆菌 <i>Lactobacillus buchneri</i>)	一致
9	乳酸片球菌 <i>Pediococcus acidilactici</i> CICC 10146	3	DSM 20284 ^T (GL397069)	99.72 99.79 99.79	≤98.29 ≤98.36 ≤98.36	乳酸片球菌 <i>Pediococcus acidilactici</i>	一致
10	干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i> CICC 6117	4	LMG 6904 ^T (AM087682)	100.0 100.0 100.0 100.0	≤96.3 ≤96.3 ≤96.3 ≤96.3	干酪乳酪杆菌 <i>Lactocaseibacillus casei</i> (原干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>)	一致

注：IAM——日本应用微生物研究所 (Institute of Applied Microbiology)；CICC——中国工业微生物菌种保藏管理中心 (China Center of Industrial Culture Collection)。

9、方法适用性

采用建立的标准方法，对批注的直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株细菌菌种迟缓芽胞杆菌 *Bacillus lentus*、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis*、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*、发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum*、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei*、副干酪乳杆菌 *Lactobacillus paracasei*、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*、两歧双歧杆菌 *Bifidobacterium bifidum*、长双歧杆菌 *Bifidobacterium longum*、短双歧杆菌 *Bifidobacterium breve*、动物双歧杆菌 *Bifidobacterium animalis*、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*、丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* 等的多个不同来源菌株分别进行鉴定，鉴定结果见表 10 和表 11。第一法对 31 种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不同来源的菌株均可鉴定至种水平，第二法对 26 种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不同来源的菌株可鉴定至种水平，方法的适用性良好。

表 10 采用标准第一法对不同来源菌株的鉴定结果

序号	菌种	菌株	模式菌株及其基因组序列号	与模式菌株ANI值/%	与其他近缘种ANI值/%	鉴定结果
1	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	DSM 30615 (GCA_007831295.1)	ATCC 14580 (GCA_006094335.1)	99.69	≤95.72	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>
2	枯草芽胞杆菌 <i>B. subtilis</i>	CICC 20474	NCTC 3610 (GCA_900445475.1)	98.27	≤95.33	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
3	迟缓芽胞杆菌 <i>B. lentus</i>	NBRC 16444 (GCA_001591545.1)	NCTC 4824 (GCA_900478165.1)	100.00	≤66.48	迟缓芽胞杆菌 <i>B. lentus</i>
4	短小芽胞杆菌 <i>B. pumilus</i>	ATCC 7061 (GCA_000172815.1)	NCTC 10337 (GCA_900186955.1)	99.99	≤91.77	短小芽胞杆菌 <i>B. pumilus</i>
5	凝结芽胞杆菌 <i>Bacillus coagulans</i>	CICC 20138	ATCC 7050 (GCA_000832905.1)	97.26	≤75.04	凝结芽胞杆菌 <i>B. coagulans</i>
6	解淀粉芽胞杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	ATCC 13952	DSM 7 (GCA_000196735.1)	99.26	≤93.77	解淀粉芽胞杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>
7	侧孢短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	DSM 25 (GCA_000374385.1)	DSM 25 (GCA_002706795.1)	100.00	≤63.05	侧孢短芽胞杆菌
8	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	CICC 6009	ATCC 14917 (GCA_000143745.1)	98.99	≤95.77	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>
9	发酵乳杆菌 <i>L. fermentum</i>	CECT 5716	ATCC 14931 (GCA_000159215.1)	99.27	≤66.02	发酵乳杆菌 <i>L. fermentum</i>
10	嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	CICC 6081	DSM 20079 (GCA_003047065.1)	99.99	≤81.41	嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>
11	德氏乳杆菌 <i>L. delbrueckii</i>	CICC 6100	ATCC_11842 (GCA_000056065.1)	99.97	≤79.57	德氏乳杆菌 <i>L. delbrueckii</i>
12	干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>	CICC 10036R	ATCC 393 (GCA_000829055.1)	99.93	≤94.44	干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>
13	类干酪乳杆菌 <i>L. paracasei</i>	CICC 6104	JCM 8130 (GCA_000829035.1)	98.58	≤78.12	类干酪乳杆菌 <i>L. paracasei</i>
14	罗伊氏乳杆菌 <i>L. reuteri</i>	CICC 10075R	JCM 1112 (GCA_000010005.1)	99.98	≤64.35	罗伊氏乳杆菌 <i>L. reuteri</i>
15	布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i>	NRRL B-30929 (GCA_000211375.1)	ATCC 4005 (GCA_009495475.1)	99.44	≤63.66	布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i>
16	约氏乳杆菌 <i>L. johnsonii</i>	ATCC 33200 (GCA_000159355.1)	ATCC 33200 (GCA_000159355.1)	100.00	≤86.29	约氏乳杆菌 <i>L. johnsonii</i>
17	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i>	HN019	DSM 10140 (GCA_00022965.1)	99.9925	≤78.96	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i>
18	两歧双歧杆菌 <i>B. bifidum</i>	JCM 1254 (GCA_001311705.1)	JCM 1255 (GCA_001025135.1)	98.53	≤81.46	两歧双歧杆菌 <i>B. bifidum</i>
19	长双歧杆菌 <i>B. longum</i>	CICC 6186	JCM 1217 (GCA_000196555.1)	100.00	≤85.11	长双歧杆菌 <i>B. longum</i>
20	短双歧杆菌 <i>B. breve</i>	JCM 7019 (GCA_000569015.1)	NCTC 11815 (GCA_90063714)	97.41	≤86.06	短双歧杆菌 <i>B. breve</i>

序号	菌种	菌株	模式菌株及其基因组序列号	与模式菌株ANI值/%	与其他近缘种ANI值/%	鉴定结果
)	5.1)			
21	青春双歧杆菌 <i>B. adolescentis</i>	JCM 15918 (GCA_000771705.1)	ATCC 15703 (GCA_000010425.1)	96.66	≤87.55	青春双歧杆菌 <i>B. adolescentis</i>
22	屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	NRRL B-2354 (GCA_000336405.1)	NCTC 7171 (GCA_900447735.1)	99.70	≤94.72	屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>
23	粪肠球菌 <i>E. faecalis</i>	ATCC 29212 (GCA_000742975.1)	ATCC 19433 (GCA_000392875.1)	98.51	≤70.25	粪肠球菌 <i>E. faecalis</i>
24	乳酸肠球菌 <i>E. lactis</i>	CICC 10840 (GCA_009735445.1)	LMG 25958 (GCA_015904215.1)	97.88	≤94.24	乳酸肠球菌 <i>E. lactis</i>
25	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	NCTC 8066 (GCA_900454755.1)	DSM 20336 (GCA_001437285.1)	98.42	≤74.82	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>
26	乳酸片球菌 <i>P. acidilactici</i>	DSM 19927 (GCA_001437115.1)	DSM 20284 (GCA_000146325.1)	96.5179	≤71.9263	乳酸片球菌 <i>P. acidilactici</i>
27	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	CICC 6035	NCTC 12958 (GCA_900474985.1)	99.25	≤91.58	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>
28	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	CICC10064 (GCA_007833335.1)	ATCC 13032 (GCA_000011325.1)	98.19	≤85.14	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>
29	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	NBRC 3858 (GCA_007992875.1)	NBRC 13949 (GCA_006742065.1)	96.87	≤73.57	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>
30	产丙酸丙酸杆菌 <i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i>	ATCC 55737 (GCA_001602115.1)	CGMCC 1.2230 (GCA_001441165.1)	98.16	≤87.07	产丙酸丙酸杆菌 <i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i>
31	沼泽红假单胞菌 <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	BisB5 (GCA_000013685.1)	DSM 123 (jgi.1102342.1)	98.50	≤83.96	沼泽红假单胞菌 <i>Rhodopseudomonas palustris</i>

注：NRRL——美国农业菌种保藏中心/美国农业部北方地区研究实验室（Northern Regional Research Laboratory）

表 11 采用标准第二法对不同来源菌株的鉴定结果

序号	菌种	菌株	模式株及其基因序列登录号	与模式株序列相似性%	与其他近缘种序列相似性%	鉴定结果
1	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	CICC 10037	BCRC 11702 ^T (DQ309295)	99.8	≤95.6	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>
2	枯草芽胞杆菌 <i>B. subtilis</i>	CICC 20030	BCRC 10255 ^T (DQ309293)	99.1	≤95.7	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
3	迟缓芽胞杆菌 <i>B. lentus</i>	CICC 10365	NBRC 16444 ^T (BCVC01000020)	100.00	≤97.01	<i>Lederbergia lenta</i> （原迟缓芽胞杆菌 <i>Bacillus lentus</i> ）

序号	菌种	菌株	模式株及其 基因序列登录号	与模 式株 序列 相似 性%	与 其 他 近 缘 种 序 列 相 似 性%	鉴定结果
4	短小芽胞杆菌 <i>B. pumilus</i>	CICC 22684	ATCC 7061 ^T (JN575338)	97.50	≤92.21	短小芽胞杆菌 <i>B. pumilus</i>
5	凝结芽胞杆菌 <i>B. coagulans</i>	CICC 21736	ATCC 7050 ^T (CP009709)	99.71	≤97.07	<i>Weizmannia coagulans</i> (原凝结芽胞杆菌 <i>Bacillus coagulans</i>)
6	解淀粉芽胞杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	CICC 10035	BCRC 11601 ^T (DQ309294)	100.0	≤95.7	解淀粉芽胞杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>
7	侧孢短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	CICC 21185	DSM 25 ^T (NZ_KB894292)	99.6	≤93.1	侧孢短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus laterosporus</i>
8	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	CICC 20261	LMG 6907 ^T (AM087714)	99.4	≤90.6	植物乳植物杆菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (原植物乳 杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>)
9	发酵乳杆菌 <i>L. fermentum</i>	CICC 22704	CECT 562 ^T (AJ575812)	99.72	≤98.06	发酵粘液乳杆菌 <i>Limosilactobacillus fermentum</i> (原发酵乳 杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i>)
10	嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	CICC 20248	CIP 76.13 ^T (CBLQ01000054)	99.93	≤98.53	嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>
11	德氏乳杆菌 <i>L. delbrueckii</i>	CICC 6103	ATCC 11842 ^T (CR954253) DSM 20072 ^T (AEXU01000148) JCM 17838 ^T (LGHR01000024) JCM 15610 ^T (LGAS01000062) DSM 20074 ^T (CP018615) ZN7a-9 ^T (ALPY01000052)	99.79 99.58 99.58 99.50 99.43 99.43	≤95.47	德氏乳杆菌 <i>L. delbrueckii</i>
12	干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>	CICC 23185	LMG 6904 ^T (AM157781)	99.7	≤92.3	干酪乳酪杆菌 <i>Lacticaseibacillus casei</i> (原干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i>)
13	类干酪乳杆菌 <i>L. paracasei</i>	CICC 20290	LMG 9191 ^T (AM087711) LMG 13087 ^T (AM087710)	99.3 99.3	≤82.2	类干酪乳酪杆菌 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> (原副干酪乳 杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>)
14	布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i>	CICC 20294	LMG 6892 ^T (AM087681) SG162 ^T (BJOS01000003)	100.0 100.0	≤90.6	布氏迟缓乳杆菌 <i>Lentilactobacillus buchneri</i> (原布氏乳杆 菌 <i>Lactobacillus buchneri</i>)
15	约氏乳杆菌 <i>L. johnsonii</i>	CICC 6252	LMG 9436 ^T (AM087701)	99.7	≤91.4	约氏乳杆菌 <i>L. johnsonii</i>
16	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i>	CICC 6250	ATCC 25527 ^T (CP002567) DSM 10140 ^T (CP001606)	99.93 98.69	≤97.25	动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i>
17	两歧双歧杆菌 <i>B.</i>	CICC 6168	ATCC 29521 ^T	100.00	≤96.03	两歧双歧杆菌 <i>B.</i>

序号	菌种	菌株	模式株及其基因序列登录号	与模式株序列相似性%	与其他近缘种序列相似性%	鉴定结果
	<i>bifidum</i>		(KE993182)			<i>bifidum</i>
18	长双歧杆菌 <i>B. longum</i>	CICC 6200	ATCC 15697 ^T (CP001095) Su 851 ^T (AB924514) JCM 1217 ^T (AP010888) LMG 21814 ^T (JGZA01000002)	100.00 100.00 99.28 99.21	≤97.42	长双歧杆菌 <i>B. longum</i>
19	短双歧杆菌 <i>B. breve</i>	CICC 6184	DSM 20213 ^T (ACCG01000002)	99.56	≤97.14	短双歧杆菌 <i>B. breve</i>
20	粪肠球菌 <i>E. faecalis</i>	CICC 20398	ATCC 19433 ^T (ASDA01000001)	99.86	≤98.34	粪肠球菌 <i>E. faecalis</i>
21	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	CICC 22734	DSM 20336 ^T (JQBF01000022)	100.00	≤98.46	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>
22	乳酸片球菌 <i>P. acidilactici</i>	CICC 10344	LMG 11384 ^T (AM899818)	99.4	≤78.4	乳酸片球菌 <i>P. acidilactici</i>
23	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	CICC 20366	LMG 6896 ^T (AM269543)	99.7	≤96.5	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>
24	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	CICC 20908	ATCC 13032 ^T (CP025533)	99.4	≤88.2	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>
25	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>	CICC 23847	DSM 10702 ^T (AQQF01000149)	99.93	≤97.78	丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>
26	产丙酸丙酸杆菌 <i>Propionibacterium acidipropionici</i>	CICC 24923	CGMCC 1.2230 ^T (CP013126)	99.93	≤98.12	<i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i> (原产丙酸丙酸杆菌 <i>Propionibacterium acidipropionici</i>)

10、方法再现性/实验室间比对

根据检测标准的验证要求，本标准经中国工业微生物菌种保藏管理中心与中国农业微生物菌种保藏管理中心、广东省微生物分析检测中心、中国普通微生物菌种保藏管理中心、上海美吉生物医药科技有限公司和北京奥维森基因科技有限公司等单位进行了方法比对验证。方法比对结果见表 12 和表 13，比对结果均一致。验证结果满意，验证报告详见附件。

表 12 标准第一法的实验室比对结果

菌株	实验室	模式菌株及其基因组序列号	与模式菌株 ANI 值/%	结果	结论
CICC_20213	中国工业微生物菌种保藏管理中心	ATCC 13032 (GCA_000011325.1)	100	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	比对结果一致
	上海美吉生物医药科技有限公司	ATCC 13032 (GCA_000011325.1)	99.99	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
	北京奥维森基因科技有限公司	ATCC 13032 (GCA_000011325.1)	99.98	谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	

菌株	实验室	模式菌株及其基因组序列号	与模式菌株ANI值/%	结果	结论
CICC_6038	中国工业微生物菌种保藏管理中心	ATCC_19258 (GCA_010120595.1)	99.43	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	比对结果一致
	北京诺禾致源科技股份有限公司	ATCC_19258 (GCA_010120595.1)	99.40	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	
	北京奥维森基因科技有限公司	ATCC_19258 (GCA_010120595.1)	99.54	嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	

表 13 标准第二法的实验室比对结果

菌株	比对实验室	比对模式株及其基因组序列号	与模式株序列相似性 %	与其他近缘种相似性%	结果	结论
23825	中国工业微生物菌种保藏管理中心	<i>Brachybacterium phenoliresistens</i> phenol-A ^T (DQ822566)	100.00	≤97.46	抗酚小短杆菌 <i>Brachybacterium phenoliresistens</i>	比对结果一致
	中国农业微生物菌种保藏管理中心	<i>Brachybacterium phenoliresistens</i> phenol-A ^T (DQ822566)	99.93	≤97.46	抗酚小短杆菌 <i>Brachybacterium phenoliresistens</i>	
	广东省微生物分析检测中心	<i>Brachybacterium phenoliresistens</i> phenol-A ^T (NR_043966)	99.4	<97	抗酚小短杆菌 <i>Brachybacterium phenoliresistens</i>	
10101	中国工业微生物菌种保藏管理中心	<i>Bacillus licheniformis</i> BCRC 11702 ^T (DQ309295)	99.8	≤90.3	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	比对结果一致
	中国农业微生物菌种保藏管理中心	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T (CP000002)	99.6	<75.6	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	
	中国普通微生物菌种保藏管理中心	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T (CP000002)	99.5	<75.6	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	
6081	中国工业微生物菌种保藏管理中心	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 ^T (AM087677)	100.0	≤88.0	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	比对结果一致
	中国农业微生物菌种保藏管理中心	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 ^T (AM087677)	100.0	<88.4	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	中国普通微生物菌种保藏管理中心	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LMG 9433 ^T (AM087677)	100.0	<88.8	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	
CICC 21865	中国工业微生物菌种保藏管理中心	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336 ^T (JQBF01000022)	99.79	≤98.25	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	比对结果一致
	生工生物工程(上海)股份有限公司	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336 ^T (JQBF01000022)	100.00	<98.38	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	
	北京奥维森基因科技有限公司	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336 ^T (JQBF01000022)	99.24	<98.09	戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	

菌株	比对实验室	比对模式株及其基因序列号	与模式株序列相似性 %	与其他近缘种相似性%	结果	结论
CICC 21095	中国工业微生物菌种保藏管理中心	<i>Bacillus subtilis</i> BCRC 10255 ^T (DQ309293)	100.0	≤96.2	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	比对结果一致
	生工生物工程(上海)股份有限公司	<i>Bacillus subtilis</i> BCRC 10255 ^T (DQ309293)	99.9	<95.2	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	
	北京奥维森基因科技有限公司	<i>Bacillus subtilis</i> BCRC 10255 ^T (DQ309293)	99.0	<93.8	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	
CICC 23108	中国工业微生物菌种保藏管理中心	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LMG 6907 ^T (AM087714)	100.0	≤90.6	植物乳植物杆菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (原植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>)	比对结果一致
	生工生物工程(上海)股份有限公司	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LMG 6907 ^T (AM087714)	99.5	<90.0	植物乳植物杆菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (原植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>)	
	北京奥维森基因科技有限公司	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LMG 6907 ^T (AM087714)	99.7	<90.6	植物乳植物杆菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (原植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>)	

(三) 标准征求意见

标准起草组邀请了 20 位行业企业专家对标准进行了函审，共收集到 103 条意见反馈，经整理和讨论专家提出的意见，对标准文本和编制说明进行修改，形成标准预审稿。

(四) 标准预审

2022 年 5 月 26 日，中国食品发酵工业研究院有限公司组织专家对中国食品发酵工业研究院有限公司、全国畜牧总站等单位起草的农业行业标准《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》(预审稿)进行了认真审查。专家组由李祥明、徐进、窦玮、曹云鹤、王建华、钟瑾、饶正华、羊宋贞组成。列席企业代表有安琪酵母股份有限公司覃先武、诺维信(中国)投资有限公司刁永朝、安迪苏生命科学制品(上海)有限公司杨宇翔。在听取起草专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出修改意见。与会专家一致同意标准起草单位按照专家意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

四、采用的国际标准

无。

五、与现行法律法规和强制性标准的关系

本标准与现行法律法规和强制性标准没有冲突。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

七、标准作为强制性或推荐性标准的意见

该标准经制定后建议作为推荐性标准发布。

八、贯彻标准的要求和措施建议

组织学习国家标准，加大对标准的宣传及贯彻力度，标准委员会作为企业之间的桥梁，做好沟通桥梁，推进行业的进一步发展。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。