中华人民共和国农业行业标准

《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》编制说明

（公开征求意见稿）

承担单位：广东省科学院微生物研究所

（广东省微生物分析检测中心）

二〇二四年一月

目 录

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、工作过程等.....1-5
（一）任务来源.....1
（二）标准制定的背景与意义.....1-2
（三）主要工作过程.....2-3
1 确定标准修订小组，搜集样品、模式菌株及资料.....2
2 确定技术路线，进行实验及验证.....2-3
3 定向征求意见.....3
4 预审.....3
5 公开征求意见.....
6 终审.....
7 报批.....
二、标准编制原则、修订前后技术内容的对比、主要内容及其确定依据.....3-9
（一）标准修订原则.....3
（二）主要修订内容（修订前后技术内容对比）.....3-4
（三）主要技术内容及其确定依据.....4-9
1 国内外标准情况.....4-5
2 企业标准情况.....5-8
3 枯草芽孢杆菌及相近模式菌株收集情况.....9
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益及生态效益100-32
（一）枯草芽孢杆菌检测方法的确定.....10-25
（二）饲料添加剂枯草芽孢杆菌主含量的确定.....25-31
（三）技术经济论证和预期的经济效益、社会效益及生态效益.....31-32
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况.....32
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准.....32
六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系.....32
七、重大分歧意见的处理经过和依据.....32
八、涉及专利的有关说明.....32
九、贯彻农业行业标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议.....32
十、其他应当说明的事项.....33

农业行业标准《饲料添加剂》编制说明

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、工作过程等

（一）任务来源

本文件修订任务由农业农村部农产品质量安全监管司《关于下达2023年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函〔2023〕51号），项目编号NYB-23082，由广东省科学院微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）羊宋贞主持承担《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》NY/T 2131-2012的修订工作。

（二）标准制定的背景

近年来随着国家减肥减药、养殖替抗等政策的大力实施，微生物在农业生产领域的应用日趋广泛深入，农业生态系统中微生物功能的最大化已经成为现代农业领域展的重要方向。大量研究发现微生态制剂对机体免疫、繁殖性能、生产性能等方面有重要促进和改善作用，兼具绿色、生态、无毒、不产生耐药性等优点，是目前农业生产中替代抗生素使用的理想材料，在提升动物健康水平和养殖生产效率方面发挥了至关重要的作用。由于自然界中微生物种类繁多，为规范和确保微生物类饲料产品的质量安全和产业的健康有序发展，我国农业农村部于2013年制定了《饲料添加剂品种目录（2013）》（公告第2045号），并于2021年又对其进行了修订（公告第356号），目录中允许添加的微生物共有36种，枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）是其中允许添加的最为常见且应用最为广泛的菌种之一。枯草芽孢杆菌具有调节和改善动物肠道菌群平衡、提高动物机体免疫力、提高饲料转化率和利用率、促进动物生长发育等重要功能，已经成为微生态制剂生产中应用最为广泛的重要功能菌种。尽管如此，由于芽孢杆菌属（*Bacillus*）内的种类多达100多个，高度同源的一些类群采用常规技术区分难度较大，这也直接或间接导致市场上急剧增加的该类型微生物制剂产品质量参差不齐，一些产品中实际标注和使用的“枯草芽孢杆菌”存在近缘种混用、误用，超出国家允许添加使用的安全菌种范围，实际数量与产品标识不符等系列问题，造成的潜在生物安全风险不断增加，严重阻碍了我国微生物饲料产业的健康可持续发展。

国内生产厂家大多采用液体深层发酵工艺生产枯草芽孢杆菌，产品以固态为主。生产工艺流程如下：斜面培养→摇瓶培养→种子罐→发酵罐→载体吸附→喷

雾干燥→成品包装。枯草芽孢杆菌菌种经过斜面活化培养、摇瓶增菌培养后转至种子罐培养，在种子罐培养至适宜阶段转移到发酵罐中，发酵过程严格控制发酵温度、pH 值、溶解氧、搅拌转速、泡沫、罐压等指标，待发酵罐中菌体生长至芽孢生成率达到一定比例停止发酵。发酵液经一定处理后添加载体后进行喷雾干燥处理，按要求计量、包装。

农业农村部于 2012 年发布的农业行业标准 NY/T 2131-2012 《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》，在过去 10 年中为饲料添加剂产品的质量控制提供了重要的指导。随着近年来农业微生物制剂产品种类的快速增加，以及枯草芽孢杆菌近缘物种的不断被发现，如 *Bacillus nakamurai* (2016)、*Bacillus halotolerans* (2017)、*Bacillus inaquosorum* (2020)、*Bacillus cabrialesii* (2019)、*Bacillus stercoris* (2020)、*Bacillus spizizenii* (2020)等，与已有的近缘种如解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）、贝莱斯芽孢杆菌（*Bacillus velezensis*）、暹罗芽孢杆菌（*Bacillus siamensis*）等类群相交织，使得近缘类群日趋庞大复杂，现有行业标准中主成分项目“枯草芽孢杆菌活菌数检测”的检测方法引用了国标 GB/T 26428-2010《饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测》，该方法现已无法实现高效的区分。国外尚没有关于饲料添加剂枯草芽孢杆菌的具体标准可以查询，只有关于饲料添加剂芽孢杆菌的检测和计数的欧洲标准 BS EN 15784-2021（Animal feeding stuffs:Methods of sampling and analysis-Detection and enumeration of Bacillus spp.used as feed additive）。因此，急需针对标准 NY/T 2131-2012《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》中 5.5/枯草芽孢杆菌检测的方法作出修订。

（三）主要工作过程

1 确定标准修订小组，搜集样品、模式菌株及资料。

2023 年 4 月～5 月：查阅枯草芽孢杆菌相关的国内外标准、搜集枯草芽孢杆菌饲料添加剂样品及枯草芽孢杆菌与相近菌种模式菌株。

2 确定技术路线，进行实验

2023 年 6 月～8 月：确定技术路线，进一步进行相关试验后对标准草案拟修订内容进行完善并按照 GB/T 1.1-2020 形成标准初稿。

3 实验验证

2023 年 9 月：由国家饲料质量检验检测中心（北京）、中国广州分析测试

中心、广电计量检测集团股份有限公司对修订的枯草芽孢杆菌检测方法进行不同实验室间方法验证，根据方法验证结果确定标准征求意见稿。

4 定向征求意见

2023 年 10 月 8 日~10 月 25 日，本标准定向征求意见发函单位 35 个，回函单位 21 个，其中来自科研院所和高校的 11 份、第三方检测机构的 6 份、饲料添加剂生产使用企业的回函 4 份。共收到意见 130 条，采纳 93 条，部分采纳 9 条，不采纳 28 条，对未采纳意见进行了说明，详情见《征求意见汇总处理表》。

5 依据反馈意见对标准进行完善

2023 年 11 月~12 月：根据反馈意见，对定向征求意见进行修改，完善标准正文和编制说明。

6 申请预审

根据反馈意见修改形成送审稿后，上报全国饲料工业标准化技术委员会，申请预审。

7 通过预审

2024 年 1 月 23 日，通过预审，预审会共邀请 8 位专家对本标准进行了审查，提出 3 项修改意见。根据意见对标准进行了修改，形成公开征求意见稿，送全国饲料工业标准化技术委员会。

二、标准编制原则、修订前后技术内容的对比、主要内容及其确定依据

（一）标准修订原则

本文件遵循市场相关性原则、协商一致性和普遍适用性原则，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》、GB/T 20001.10-2014《标准编写规则 第 10 部分：产品标准》的规定进行修订。

（二）主要修订内容（修订前后技术内容的对比）

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，主要技术变化如表 1 所示。

表 1 新旧标准主要技术变化

序号	更改内容	原章节	现章节

1	增加了对原料的要求		4.1
2	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”	4.6 表 2	4.5 表 2
3	更改了卫生指标“黄曲霉毒素”的适用产品	4.6 表 2	4.6 表 2
4	增加微生物采样标准	5.1	5
5	更改了枯草芽孢杆菌活菌数检测的检测方法	5.5	6.2
6	更改了黄曲霉毒素 B1 检测方法	5.6.1	6.9
7	增加了组批要求		7.1
8	更改了需要型式检验时的情况	6.2	7.3
9	增加了除微生物之外各指标的极限数值判定执行标准		7.4.3
10	更改了保质期要求	8.5	8.5

（三）主要技术内容及其确定依据

本文件主要技术内容说明如下：

1. 国内外标准情况

目前国内在国家标准中，尚无枯草芽孢杆菌的产品标准。针对饲料添加剂枯草芽孢杆菌的只有农业行业产品标准 NY/T 2131-2012 《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》及国家检测方法标准 GB/T 26428-2010《饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测》。其他产品的标准有生物产品国家检测方法标准 GB/T 34224-2017《生物产品中功能性微生物检测》，细菌微生物农药的农业行业产品标准 NY/T 2293.1-2012《细菌微生物农药 枯草芽孢杆菌 第 1 部分 枯草芽孢杆菌母药》、农用微生物菌剂产品的农业检测方法标准 NY/T 3264-2018《农用微生物菌剂中芽孢杆菌的测定》，进出口标准 SN/T 2728-2010《枯草芽孢杆菌检测鉴定方法》及地方标准 DB32/T 2583-2013《饲料中饲用芽孢杆菌的测定》；国外标准有欧洲标准 BS EN 15784-2021《Animal feeding stuffs:Methods of sampling and analysis-Detection and enumeration of Bacillus spp.used as feed additive》（表 2）。

表 2 国内外相关标准情况

序号	标准号	名称
1	GB/T 26428-2010	饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测
2	GB/T 34224-2017	生物产品中功能性微生物检测
3	NY/T 2293.1-2012	细菌微生物农药 枯草芽孢杆菌 第 1 部分 枯草芽孢杆菌母药
4	NY/T 3264-2018	农用微生物菌剂中芽孢杆菌的测定

5	SN/T 2728-2010	枯草芽孢杆菌检测鉴定方法
6	DB32/T 2583-2013	饲料中饲用芽孢杆菌的测定
7	BS EN 15784-2021	Animal feeding stuffs:Methods of sampling and analysis-Detection and enumeration of Bacillus spp.used as feed additive

2. 企业标准情况

目前现行有效的企业标准有 50 多项，由生产企业起草制定（表 3）

表 3 枯草芽孢杆菌部分企业标准号

序号	起草单位	标准号
1	安琪酵母股份有限公司	Q/YB.J02.62-2022
2	中粮生物科技股份有限公司	Q/ZSHA 006-2023
3	云南博仕奥生物技术有限公司	Q/YBS 010-2023
4	安琪酶制剂（宜昌）有限公司	Q/AQMZJ 0030-2023
5	山西晟禾生物科技有限公司	Q/YSH1.1-2023
6	山西大禹生物工程股份有限公司	Q/DYSW 025-2023
7	山东泽生生物科技有限公司	Q/370923DZS 008-2023
8	山东蔚蓝生物科技有限公司	Q/371621SLH 010-2022
9	青岛尚德生物技术有限公司	Q/370214SDS 001-2021
10	昆明爱科特生物科技有限公司	Q/KAK 25-2022
11	济南百斯杰生物工程有限公司	Q/370126BSJ 058-2022
12	北京华美源生物科技有限公司	Q/BHMY 029-2022
13	朝阳华星生物工程有限公司	Q/CYHX045-2020
14	高唐华农生物工程有限公司	Q/371526GHS 001-2022
15	广东碧德生物科技有限公司	Q/BD 17-2019
16	广东海纳川生物科技股份有限公司	Q/(GD)HNC12-2021
17	海南天合祥农生态生物科技有限公司文昌分公司	Q/XN SW 05-2022
18	河南德邻生物制品有限公司	Q/HDS 010-2016
19	河南炎黄生物工程有限公司	Q/HYH T006-2021
20	河南亿万中元生物技术有限公司	Q/HYS 005-2023

表 4 饲料添加剂枯草芽孢杆菌产品企业标准及现有标准中各技术指标要求汇总分析

序号	标准号	外观与性状	粒度	水分（%）	总砷（mg/kg）	铅（mg/kg）	汞（mg/kg）	镉（mg/kg）	黄曲霉毒素 B1（μg/kg）	霉菌总数 (CFU/g)	大肠菌群 (MPN/100g)	沙门氏菌(25g)	志贺氏菌(25g)	凝固酶阳性葡萄球菌(25g)	保质期 (月)
1	Q/YB.J02.62-2022	粉状，淡棕黄色或暗白色，略带腥味，无肉眼可见外来杂质	-	≤8.0	≤10.0	≤40.0	-	-	-	-	-	不得检出	-	-	24
2	Q/ZSHA 006-2023	粉末或颗粒状，白色至黄色、黄褐色，无发霉、结块及异物、异臭	-	≤12.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤30.0	$<4.0\times10^4$	-	不得检出	-	-	12
3	Q/YBS 010-2023	粉末或颗粒状，白色至黄褐色，无结块、潮解现象、无异味，有特殊发酵气味	通过 0.85mm 孔径筛≥95.0	≤10.0	≤2.0	≤5.0	-	≤0.5		$<2.0\times10^4$	$\leq1.0\times10^4$	不得检出		-	12
4	Q/AQMZJ 0030-2023	粉末或颗粒，黄色至黄褐色，无霉变潮解、结块，无异味	1.19mm 分析筛全部通过，0.59mm 筛上物不大于 10%	≤10.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	$<2.0\times10^4$	$\leq1.0\times10^4$	不得检出	不得检出	不得检出	12
5	Q/YSH1.1-2023	符合固有形态、色泽、气味、均匀度和杂质等要求，无异臭味、无异物	粉剂应通过 SSW0.400/0.250mm 试验筛	≤9.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10	$<2.0\times10^4$	$\leq1.0\times10^4$	不得检出	不得检出	不得检出	12
6	Q/DYSW 025-2023	粉末状，无变质、结块及异味、异嗅	全部通过 0.90mm 分析筛，0.60mm 分析筛上物不大于 20%	≤12.0	≤10.0	≤40.0	≤0.1	≤0.5	≤10	$<2.0\times10^4$	$\leq1.0\times10^4$	不得检出	不得检出	不得检出	12
7	Q/370923DZS 008-2023	黄色或深棕色粉末，无变质、结块及异味，无味或稍有酸涩味	粉剂通过 SSW0.400/0.250mm 试验筛	≤8.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	$<2.0\times10^4$	$\leq3.0\times10^3$	不得检出	不得检出	不得检出	12
8	Q/371621SLH 010-2022	灰白色至黄褐色粉末，无变质、结块及异味、导嗅。	全部通过 0.90mm 分析筛，0.60mm 分析筛上物不大于 10%	≤12.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	$<2.0\times10^4$	$\leq1.0\times10^4$	不得检出	不得检出	不得检出	12

9	Q/370214SDS 001-2021	黄色粉末，无变质、结块及异味、异嗅	全部通过2.5mm 分析筛，1.25mm 分析筛筛上物不大于10%	≤10.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	≤2.0×10^4	≤100	不得检出	不得检出	不得检出	12
10	Q/KAK 25-2022	白色至浅黄色粉末，细度均匀，流散性好，无异物、有特有气味、无异臭味	20 目标准筛通过率 100%，40 目标准筛通过率≥90.0	≤10.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	≤2.0×10^4	≤1.0×10^4	不得检出	不得检出	不得检出	12
11	Q/370126BSJ 058-2022	浅棕色至棕色粉末，无变质、结块，无异味，无潮解现象，具有特殊发酵气味	-	≤10.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	≤2.0×10^4	≤1.0×10^4	不得检出	不得检出	不得检出	12
12	Q/BHMY 029-2022	色泽均匀一致，无结块、霉变、异味及异臭	通过 W=0.4mm 孔径试验 筛	≤10.0	≤2.0	≤5.0	-	-	-	-	-	不得检出	-	-	12
13	Q/CYHX045-2020	黄色至黄褐色粉末，色泽均匀，无发霉变质、结块有异味异嗅	90%以上的产品通过筛孔内径为 0.8mm 的标准筛	≤10.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	–	≤1.0×10^6	不得检出	不得检出	不得检出	12
14	Q/371526GHS 001-2022	淡黄色粉状物，无变质、结块，具有正常发酵香味	全部通过0.6mm 分析筛，0.45mm 分析筛筛上物不大于10%	≤12.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	≤2.0×10^4	≤1.0×10^4	不得检出	不得检出	不得检出	24
15	Q/BD 17-2019	黄褐色至浅黄色，有发酵香味的粉末	通过 SSW0.400/0.250mm 的试验筛	≤9.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	≤2.0×10^4	≤1.0×10^4	不得检出	-	-	12
16	Q/(GD)HNC 12-2021	类白色至黄色粉末	应通过 0.600mm 的试验 筛	≤9.0	≤2.0	≤5.0	–	–	–	–	–	-	-	-	12
17	Q/XN SW 05-2022	呈粉状和颗粒状均匀混合物，色泽一致，无异物，无霉变、结块及异味	全部通过2.5mm 分析筛，1.25mm 分析筛筛上物不大于10%	≤12.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	≤2.0×10^4	≤1.0×10^4	不得检出	不得检出	不得检出	18
18	Q/HDS 010-2016	粉状，白色至黄褐色，色泽一致，无发霉变质、结块	全部通过 3.0 分析筛	≤12.0	≤5.0	≤20.0	–	–	≤10.0	–	≤1.0×10^4	不得检出	不得检出	不得检出	12

19	Q/HYH T006-2021	粉状，色泽一致，无发霉变质、异味	全部通过2.0mm的分析筛	≤13.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	≤2.0×10^4	≤1.0×10^4	不得检出	不得检出	不得检出	18
20	Q/HYS 005-2023	浅黄色至浅灰色粉末，具有发酵臭味，无霉变、无结块	100%通过0.90mm分析筛	≤10.0	≤5.0	≤20.0	-	≤1.0	≤10.0	-	-	-	-	-	24
21	NY/T 2131-2012	符合包装上标示的产品固有形态、色泽、气味、均匀度和杂质等要求，无异臭味，无异物。	粉剂应通过SSW0.400/0.250mm的试验筛	≤9.0	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10.0	≤2.0×10^4	≤1.0×10^4	不得检出	不得检出	不得检出	12
				≤8-12	≤2-10	≤5-40	≤0.1	≤0.5	≤10.0-30.0	≤2.0×10^4	≤1.0×10^2~1.0×10^6	不得检出	不得检出	不得检出	12-24

2. 枯草芽孢杆菌及相近模式菌株收集情况

收集市场上用于生产的菌株及相近菌种模式菌株，共 37 株（表 5）。预审会时专家提出各菌株编号都来源于同一保藏中心的编号，为了更好显示菌种来源的权威性，进一步补充了各菌株原始来源的保藏中心编号。

表 5 试验枯草芽孢杆菌及相近菌种模式菌株

序号	菌株	编号	来源	原始来源的保藏中心编号
1	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 1.2498^T	广东省微生物菌种保藏中心	CGMCC 1.4255
2	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 1.427	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物研究所
3	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 810525	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物菌种保藏中心 976-1K
4	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 1.1357	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物研究所农用生物产品实验室 20180327BSU06
5	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 1.2586	广东省微生物菌种保藏中心	华南理工大学
6	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 1.22	广东省微生物菌种保藏中心	CGMCC 1.421
7	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 1.372	广东省微生物菌种保藏中心	ACCC 11089
8	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 1.1490	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物研究所 LB5
9	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 1.131	广东省微生物菌种保藏中心	CGMCC 1.921
10	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 810444	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物菌种保藏中心 H062
11	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 811704	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物研究所
12	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	79703B	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物研究所
13	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 800594	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物菌种保藏中心 RBB115
14	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 806729	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物菌种保藏中心 EC142C
15	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 1.258	广东省微生物菌种保藏中心	CGMCC 1.1390
16	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 1.1976	广东省微生物菌种保藏中心	青海省农林科学院 C30101
17	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 810496	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物菌种保藏中心

18	枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）	GDMCC 803523	广东省微生物菌种保藏中心	广东省微生物菌种保藏中心 699K
19	解淀粉芽孢杆菌（*B. amyloliquefaciens*）	GDMCC 1.3155^T	广东省微生物菌种保藏中心	ATCC 23350
20	黑棕色芽胞杆菌（*B. atrophaeus*）	GDMCC 1.4066^T	广东省微生物菌种保藏中心	LMG 16797
21	酱豆芽孢杆菌（*B. glycinifermentans*）	GDMCC 1.4031^T	广东省微生物菌种保藏中心	KACC 18425
22	耐盐芽孢杆菌（*B. halotolerans*）	GDMCC 1.4092^T	广东省微生物菌种保藏中心	DSM 8802
23	海氏芽孢杆菌（*B. haynesii*）	GDMCC 1.4074^T	广东省微生物菌种保藏中心	CCUG 70178
24	缺水芽孢杆菌（*B. inaquosorum*）	GDMCC 1.4078^T	广东省微生物菌种保藏中心	KCTC 13429
25	地衣芽孢杆菌（*B. licheniformis*）	GDMCC 1.362^T	广东省微生物菌种保藏中心	ACCC 10236
26	莫哈维芽孢杆菌（*B. mojavensis*）	GDMCC 1.4069^T	广东省微生物菌种保藏中心	LMG 17797
27	中村芽孢杆菌（*B. nakamurai*）	GDMCC 1.4073^T	广东省微生物菌种保藏中心	CCUG 68786
28	副地衣芽孢杆菌（*B. paralicheniformis*）	GDMCC 1.4032^T	广东省微生物菌种保藏中心	KACC 18426
29	褶皱芽孢杆菌（*B. rugosus*）	GDMCC 1.4071^T	广东省微生物菌种保藏中心	CICC 24827
30	暹罗芽孢杆菌（*B. siamensis*）	GDMCC 1.3633^T	广东省微生物菌种保藏中心	LMG 27594
31	索诺拉芽孢杆菌（*B. sonorensis*）	GDMCC 1.4093^T	广东省微生物菌种保藏中心	DSM 13779
32	斯氏芽孢杆菌（*B. spizizenii*）	GDMCC 1.4067^T	广东省微生物菌种保藏中心	LMG 19156
33	堆肥芽孢杆菌（*B. stercoris*）	GDMCC 1.4076^T	广东省微生物菌种保藏中心	KCTC 33554
34	斯威齐芽孢杆菌（*B. swezeyi*）	GDMCC 1.4075^T	广东省微生物菌种保藏中心	CCUG 70177
35	特基拉芽孢杆菌（*B. tequilensis*）	GDMCC 1.4077^T	广东省微生物菌种保藏中心	KCTC 13622
36	死谷芽孢杆菌（*B. vallismortis*）	GDMCC 1.4068^T	广东省微生物菌种保藏中心	LMG 18725
37	贝莱斯芽孢杆菌（*B. velezensis*）	GDMCC 1.4070^T	广东省微生物菌种保藏中心	LMG 22478

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益及生态效益。

（一）枯草芽孢杆菌检测方法的确定

查找了国内外关于芽孢杆菌检测的相关标准，主要有国家标准《饲用微生物

制剂中枯草芽孢杆菌的检测》GB/T 26428-2010、《生物产品中功能性微生物检测》GB/T34224-2017，农业行业标准《细菌微生物农药 枯草芽孢杆菌 第 1 部分 枯草芽孢杆菌母药》NY/T 2293.1-2012、《农用微生物菌剂中芽孢杆菌的测定》NY/T 3264-2018，进出口行业标准《枯草芽孢杆菌检测鉴定方法》SN/T 2728-2010 及欧洲标准《Animal feeding stuffs:Methods of sampling and analysis-Detection and enumeration of Bacillus spp.used as feed additive》BS EN 15784-2021。对比了国内外有关芽孢杆菌的检测方法，技术指标比较如表6所示。

表 6 国内外芽孢杆菌检测方法技术指标比较

技术内容	GB/T 26428-2010	GB/T 34224-2017	NY/T 2293.1-2012	NY/T 3264-2018	SN/T 2728-2010	BS EN 15784-2021
适用产品	饲用微生物制剂	生物产品	细菌微生物农药	农用微生物菌剂	通用	饲料
检样制备取样量	25 g＋225 mL	25 g＋225 mL	3 g＋27 mL	10 g＋水定容至 100 mL	25 g＋225 mL	5 g＋495 mL
稀释液	0.85 % 生理盐水	0.85 % 生理盐水	0.05％吐温 20 或 TritonX-100 的无菌水	无菌水	0.85 % 生理盐水	0.2%NaOH 吐温-80 溶液
接种培养基	NA	NA	NA	LB	NA	TSA
接种平板数	各两个平板	各两个平板	各三个平板	各三个平板	各两个平板	各两个平板以上
水浴 80±1 ℃	是	是	否	否	否	否
培养温度及时间	37± 1 ℃，48±2h	37± 1 ℃，48±2h	30℃，24h～48 h	30～37℃，24h～48h	30± 1 ℃，24h～48h	37± 1 ℃，16h～24h
菌落计数选取菌落数范围	30～300 个	20～200 个	30～300 个	30～300 个	\	10~100 个
可疑菌鉴定	形态＋生理生化	形态＋生理生化	形态+生理生化	形态＋生理生化＋分子鉴定（16S rDNA ＋gyrB 基因）	形态＋生理生化＋分子鉴定（普通 PCR 或荧光 PCR）	形态+生理生化+分子鉴定或 MALDI-TOF

1．检样制备

如表 6 所示，标准 GB/T 26428-2010 中样品制备时取样量为 25g 加入 225mL

0.85%灭菌生理盐水，均质 1 min~2 min，制成 1：10 的初始悬浮液。通过调研企业反馈原检测方法取样量太大，考虑到《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》产品中主成分的菌数非常高（至少达到百万级别的活菌数），而已有的相关标准只有欧洲标准 BS EN 15784-2021 的适用范围包括了饲料添加剂，因此参考了欧洲标准 BS EN 15784-2021 中饲料添加剂产品取样量，将样品制备时取样量定为 5 g+495 mL 0.85%灭菌生理盐水，均质 1 min~2 min，制成 1：100 的初始悬浮液。

2．稀释液

如表 6 所示，已有标准所用稀释液有五种，分别为 0.85％生理盐水、无菌水、0.05％吐温-20 或 TritonX-100 的无菌水及 0.2%NaOH 吐温-80 溶液。五种稀释液中后三种多用于油脂类样品的稀释，可以使产品分散得更加均匀，但在样品稀释均质混合时会有大量的泡沫产生，影响后续稀释的取样。定向征求意见时，有专家提出需要用具体数据来证明。因此，随机抽取 3 号样品对不同稀释液的检测结果做了补充试验，如表 7 所示，实验结果差异不明显。结合本实验室中近十多年来使用 GB/T 26428-2010 中使用的稀释液（0.85％生理盐水）制备样品的情况及使用本方法的产品的特性，本检测方法选用稀释液为 0.85％生理盐水。

表 7 不同稀释液对菌数的影响

稀释液	培养基	菌数（CFU/g）
0.85％生理盐水	营养琼脂	1.1×10^{11}
无菌水（蒸馏水）	营养琼脂	0.9×10^{10}
0.05％吐温-20 溶液	营养琼脂	1.3×10^{11}
0.2%NaOH 吐温-80 溶液	营养琼脂	0.8×10^{10}

3．接种培养基

如表 6 所示，已有标准所用芽孢杆菌培养基有三种，分别为 NA、LB 及 TSA 培养基，本实验选取不同数量级菌数的两个样品（样品 3 及样品 6）对三种培养基进行了对比试验，结果如表 8 所示，利用 R 语言中的配对 t 检验算法分析，NA 培养基与 LB 培养基的 p 值为 1.000，NA 培养基与 TSA 培养基的 p 值为 1.000，LB 培养基与 TSA 培养基的 p 值为 0.547，说明这三种培养之间无明显差异。在各培养基上的菌落生长速度、菌落大小情况：TSA 培养基>NA 培养基>LB 培养

基。菌落太大容易导致菌落连成片状生长，影响计数（见图 1）。之前使用标准 GB/T 26428-2010 中使用的培养基是 NA，实验人员已熟悉枯草芽孢杆菌在 NA 培养基上的菌落形态（见图 2），故综合考虑菌落的直观性，人员的习惯性与培养基的易配性及培养基使用的广泛性等因素，本检测方法选用 NA 培养基。

表 8 不同培养基培养计数结果

样品序号	枯草芽孢杆菌数（CFU/g）					
	NA 培养基		LB 培养基		TSA 培养基	
	30℃，24h	37℃，24h	30℃，24h	37℃，24h	30℃，24h	37℃，24h
3	3.7×10^{11}	3.3×10^{11}	3.3×10^{11}	4.2×10^{11}	3.7×10^{11}	3.7×10^{11}
6	3.2×10^{10}	3.9×10^{10}	4.0×10^{10}	3.9×10^{10}	4.4×10^{10}	3.9×10^{10}
	30℃，48h	37℃，48h	30℃，48h	37℃，48h	30℃，48h	37℃，48h
3	3.7×10^{11}	3.3×10^{11}	3.3×10^{11}	4.2×10^{11}	3.7×10^{11}	3.7×10^{11}
6	3.2×10^{10}	3.9×10^{10}	4.0×10^{10}	3.9×10^{10}	4.4×10^{10}	3.9×10^{10}

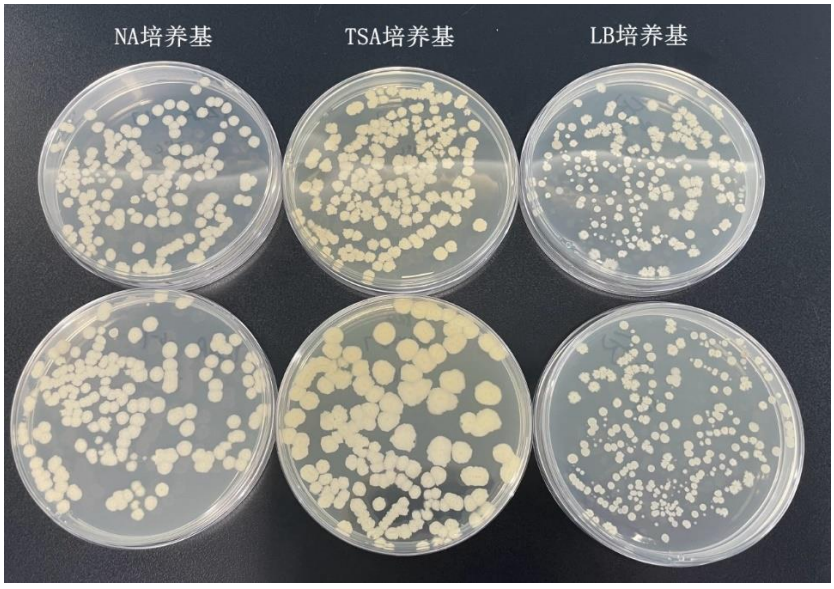

图 1 ：不同培养基枯草芽孢杆菌生长情况（37℃培养 24h）

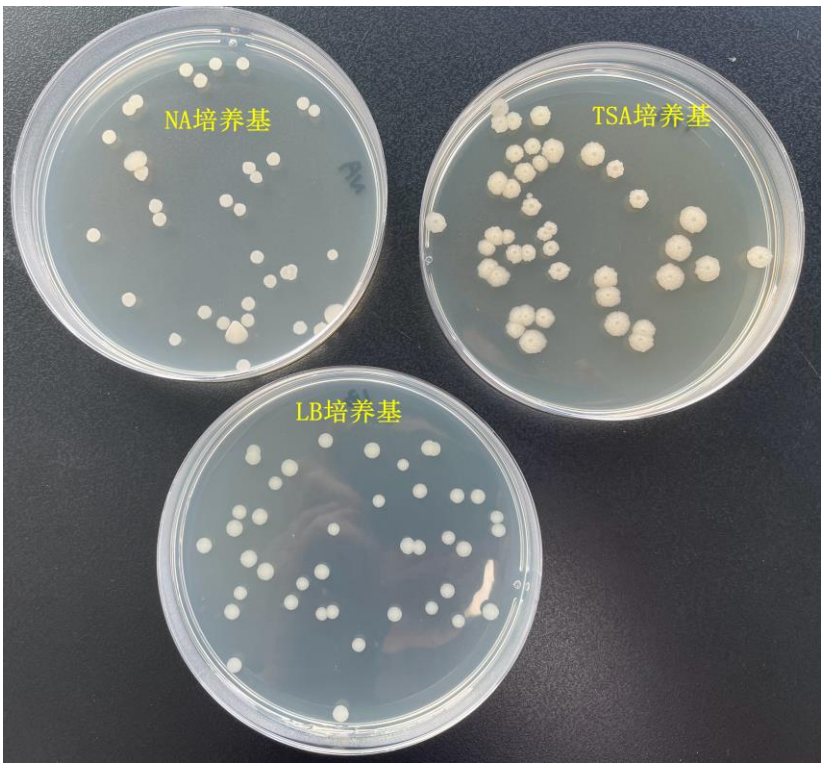

图 2 不同培养基枯草芽孢杆菌菌落形态（37℃培养 24h）

4．接种平板数量

如表 6 所示，6 个芽孢杆菌检测方法中选择 2 个~3 个适宜的稀释度，各接种到两个平板上和三个/三个以上的各占一半，考虑到与其他微生物检测方法的一致性，故本检测方法选用接种到两个营养琼脂平板上。

5．水浴处理

如表 6 所示，6 个芽孢杆菌检测方法中采用水浴 80±1 ℃处理的有两个，GB/T 26428-2010 适用范围比较广，除了适用于饲料添加剂也适用于混合型饲料添加剂，增加 80±1 ℃处理能够杀死部分杂菌的干扰，而本产品标准为单一型的饲料添加剂，载体比较简单，污染非芽孢杂菌的情况并不常见（见表 10），考虑到标准使用简便性原则，本检测方法不使用水浴处理。

6．培养温度及时间

如表 6 所示，6 个芽孢杆菌检测方法中采用培养温度及时间分别为：① 30℃±1 ℃，24 h～48 h；② 37℃±1 ℃，16 h～24 h；③ 37℃±1 ℃，48h±2 h。本实验室选取不同菌数的两个样品（样品 3 及样品 6）对三种培养温度及时间进行了对比试验。结果显示，培养 24h～48 h 后，37℃培养与 30℃培养的平板上除了菌落大小（培养 48 小时的菌落明显比 24 小时的大）有区别之外（见图 3~6），菌数无差异（见表 8）。枯草芽孢杆菌 37℃±1 ℃，16 h～24 h 就可以

长好，而且不影响菌落计数结果，综合考虑了检测的时效性等，本检测方法选用的培养温度及时间为 37℃± 1 ℃，16 h ～24 h 。

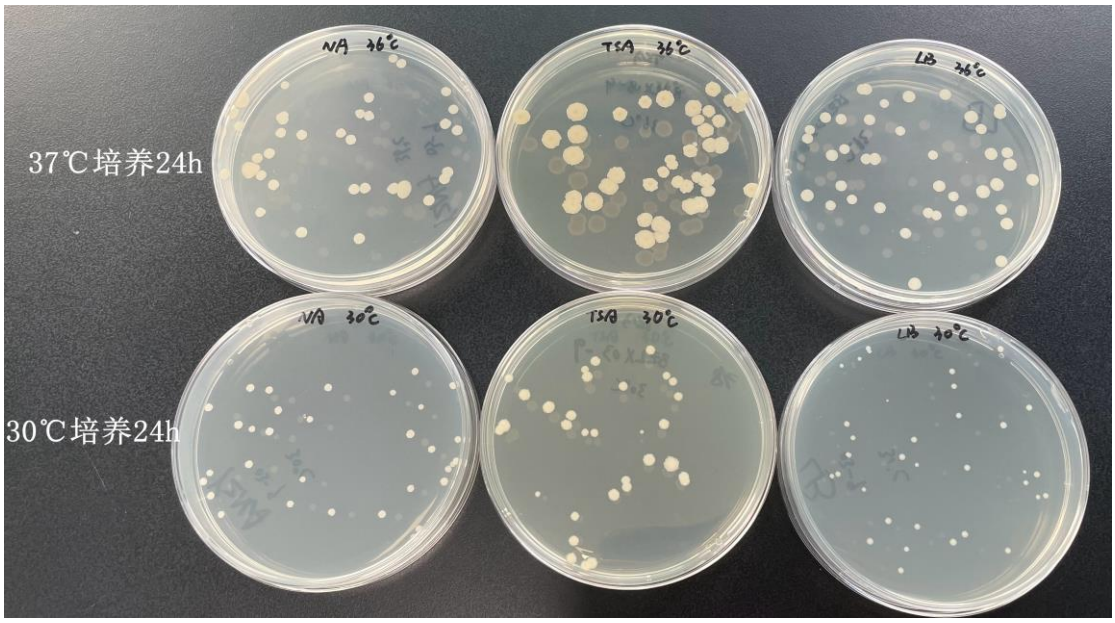

图 3 不同培养温度及时间平板菌落图-样品 3（30℃及 37℃培养 24 h ）

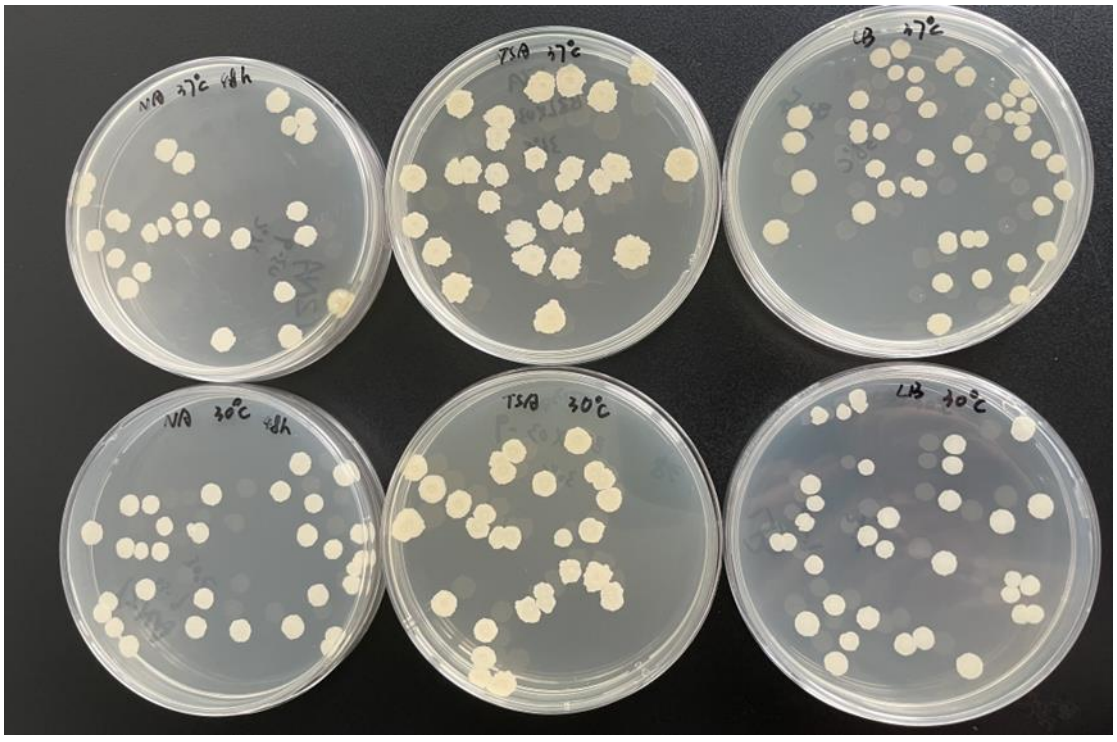

图 4 不同培养温度及时间平板菌落图-样品 3（30℃及 37℃培养 48 h ）

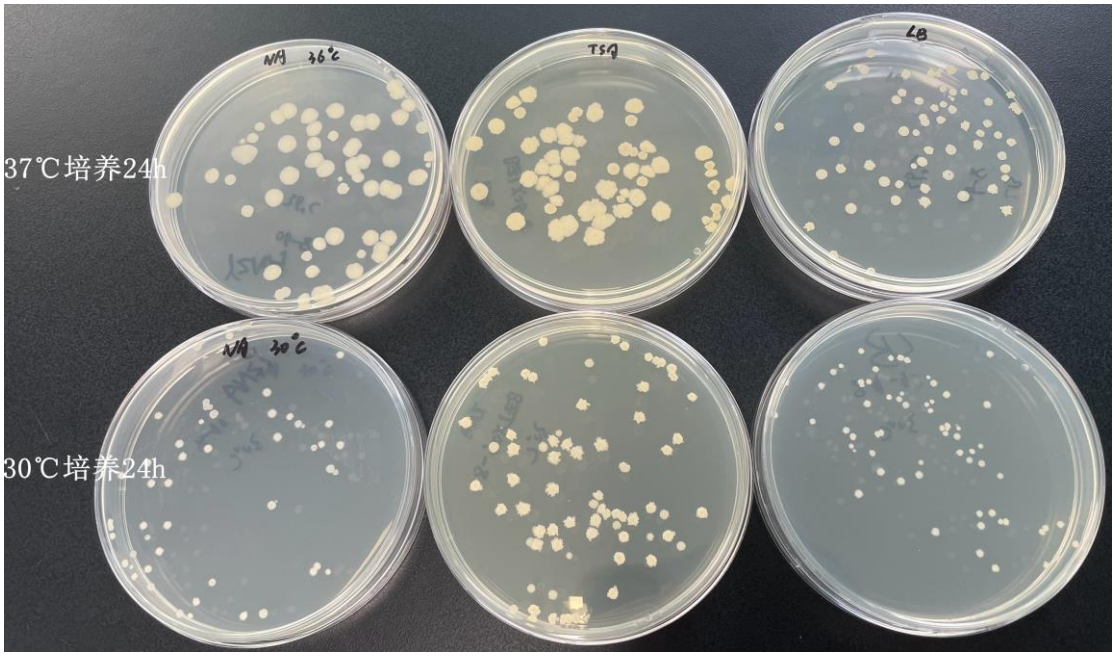

图 5 不同培养温度及时间平板菌落图-样品 6（30℃及 37℃培养 24 h ）

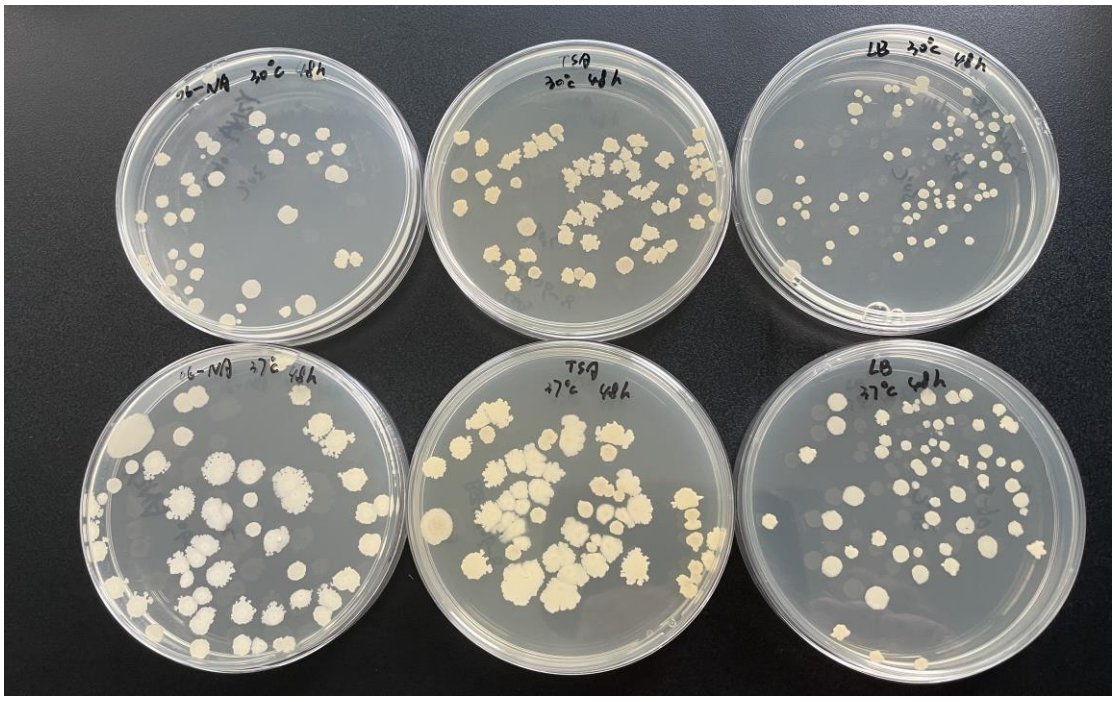

图 6 不同培养温度及时间平板菌落图-样品 6（30℃及 37℃培养 48 h ）

7．菌落计数选取平板菌落数

如表 6 所示，6 个芽孢杆菌检测方法中有一个对菌落数未做规定要求，有三个标准选取菌落数在 30 个~300 个之间的平板进行计数，选取落数在 10 个~100 个和 20 个~200 个之间的平板进行计数的各一个标准。观察实际检测结果的平板可知，枯草芽孢杆菌在 NA 培养基上 37℃培养 24 h 后的菌落比较大，在平板上

菌落数达到 200 个~300 个之间时，可以正常计数但菌落之间容易连成链状，影响计数（如图 7，左上平板菌落数为 214 个，右上平板菌落数为 171 个，下面平板菌落数为 322 个）。综合考虑下，将本检测方法中选取计数的平板定为菌落数在 20 个~200 个之间的平板。

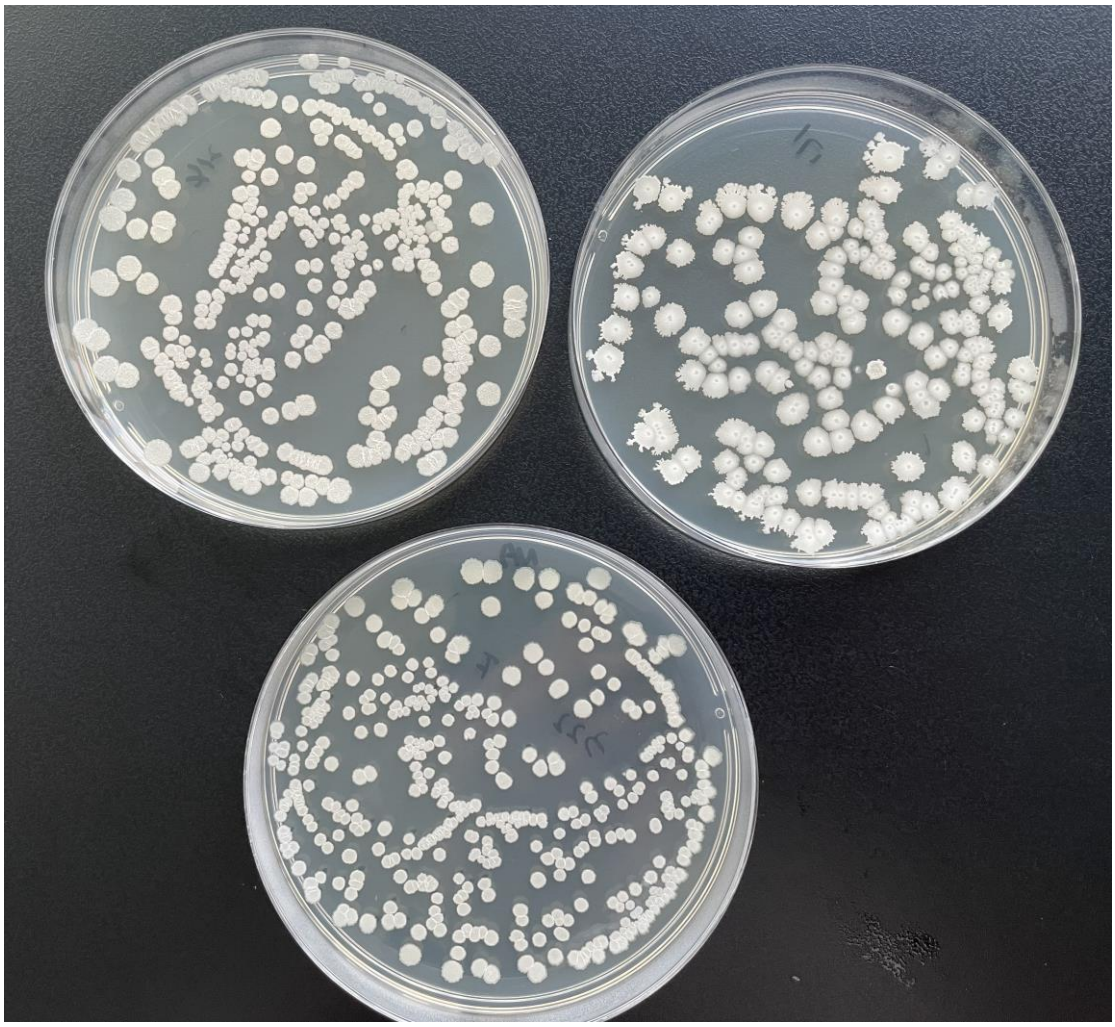

图 7　NA 培养基上枯草芽孢杆菌菌落图

7．可疑菌鉴定

如表 6 所示，6 个芽孢杆菌检测方法中 GB/T 26428-2010、GB/T 34224-2017 及 NY/T 2293.1-2012 采用形态观察及生理生化鉴定进行可疑菌鉴定，难以高效区分枯草芽孢杆菌及其相似菌种。NY/T 3264-2018 采用形态观察、生理生化鉴定、16S rDNA 及 gyrB 基因测序，欧洲标准 BS EN 15784-2021 采用形态观察、生理生化鉴定、分子生物学或 MALDI-TOP 鉴定，均能有效区分枯草芽孢杆菌及其相似菌种，但大部分企业没办法自主完成，需要外包到测序公司去测序，耗时长，成本高，MALDI-TOP 仪器费用昂贵（国产的仪器费用也在 200 万左右），

标准 SN/T 2728-2010 中使用的普通 PCR 及荧光 PCR 方法进行鉴定，经验证，普通 PCR 的引物特异性不强，不能实现对枯草的特异性扩增鉴定，而荧光 PCR 大部分企业没有相应仪器，因此，标准的可操作性不高，难以推广使用。

本实验室针对以上问题，寻找能满足标准可操作性的快速鉴定方法。在国标 GB/T 26428-2010 的鉴定基础上，重点开展枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌、暹罗芽孢杆菌等近缘物种模式菌株及生产应用菌株资源的收集鉴别。通过基因组测序和公共数据库资源搜集，开展枯草芽孢杆菌等近缘物种的比较基因组学分析，从中发掘有效区分枯草芽孢杆菌近缘物种的新靶标。在此基础上针对新靶标设计特异性的 PCR 扩增引物，以搜集的芽孢杆菌近缘菌种资源作为检验对象，以基因组鉴定结果为依据，开展特异性引物的验证分析，以确定实现枯草芽孢杆菌及其亲缘物种有效区分的特异性引物，实现枯草芽孢杆菌的快速精准鉴别和检测。主要技术路线内容如下。

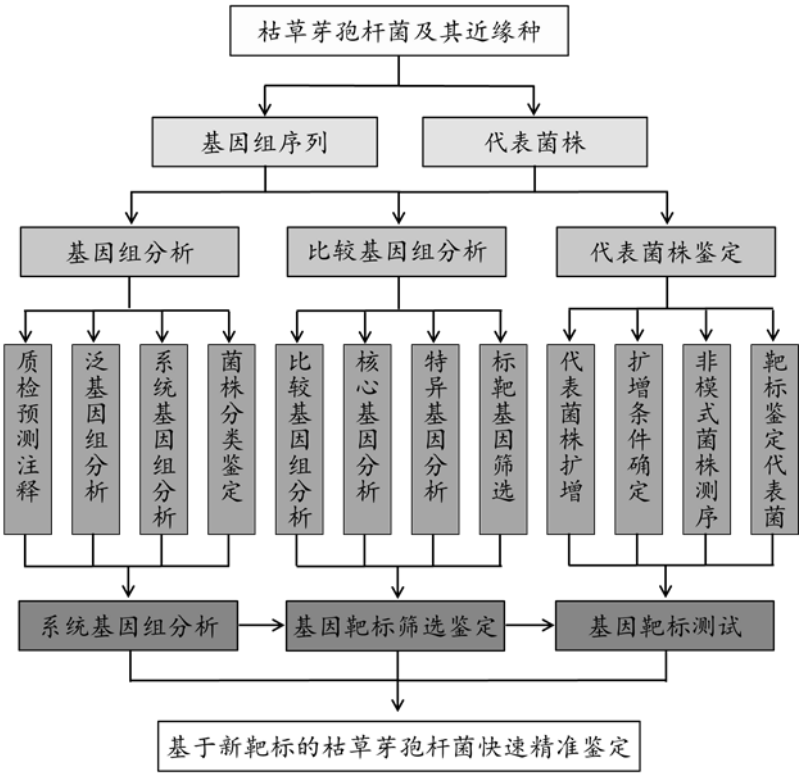

图 8 技术路线图

7.1 枯草芽孢杆菌特异性标靶基因鉴定

7.1.1 枯草芽孢杆菌及其近缘菌株的比较基因组分析

为了获得枯草芽孢杆菌特异性标靶基因，从 NCBI 数据库下载枯草芽孢杆菌及其近缘菌株的基因组序列。共获得 158 个枯草芽孢杆菌及其近缘菌株的基因组序列（表 9），其中枯草芽孢杆菌包含 35 个基因组序列，枯草芽孢杆菌 20 个近缘物种包含 123 个基因组序列。因此，该研究使用的基因组序列数目充分，物种覆盖全面。

表 9 各个物种分析基因组数目

物种名称	基因组数目
Bacillus amyloliquefaciens	5
Bacillus atrophaeus	5
Bacillus cabrialesii	4
Bacillus glycinifermentans	2
Bacillus halotolerans	5
Bacillus haynesii	4
Bacillus inaquosorum	4
Bacillus licheniformis	13
Bacillus mojavensis	2
Bacillus nakamurai	2
Bacillus paralicheniformis	10
Bacillus rugosus	1
Bacillus siamensis	3
Bacillus sonorensis	4
Bacillus spizizenii	4
Bacillus stercoris	3
Bacillus subtilis	35
Bacillus swezeyi	3
Bacillus tequilensis	3
Bacillus vallismortis	3
Bacillus velezensis	42

为了保证基因组分析和比较基因组分析的准确性，该研究对使用的基因组质量基因评估。基于软件 CheckM 分析，该研究获得的 158 个基因组序列的污染度均低于 2%，完整度均高于 97%，表明本研究使用的基因组序列是高质量。

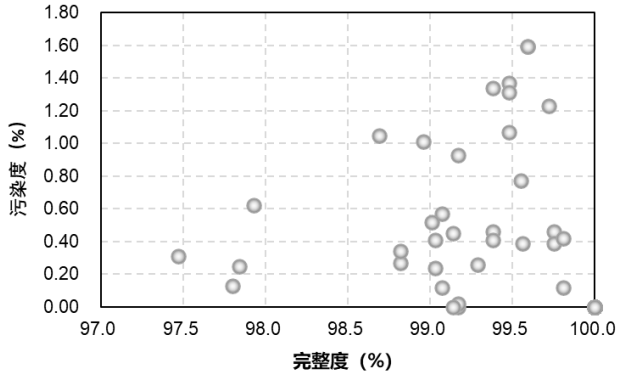

图 9 基因组序列污染度和完整度评估

为了保证基因组分析和比较基因组分析的一致性，本研究对所有基因序列进行重新的基因预测和注释，获得其蛋白质序列文件后，进行分析。基于软件 Roary 分析，获得核心基因共 687 个，附属基因共 33264 个。构建基于核心基因的系统基因组发育树，对 158 个基因组的分类归属进行验证。

如图 10 所示，本研究基于 687 个核心基因，构建 158 株枯草芽孢杆菌及其近缘菌株的系统基因组发育树。根据系统发育分支的聚类情况，本研究确定这些菌株准确的系统发育关系，并验证其物种划分正确。

7.1.2 枯草芽孢杆菌特异性标靶基因筛选

附属基因包含每个物种特有的基因，因此本研究从 33264 个附属基因筛选枯草芽孢杆菌物种的特有基因，作为潜在的特异性标靶基因。基于分析，本研究获得了一个枯草芽孢杆菌物种特有基因，命名为 *BSSM*（**B**acillus **s**ubtilis **s**pecies-specific **m**arker）。枯草芽孢杆菌种特异基因 *BSSM* 包含 291 bp，其注释结果为假定的噬菌体蛋白，因此其具体的功能未知。

基于比较基因组分析，本研究从枯草芽孢杆菌的 35 个基因组中提取基因 *BSSM* 序列。使用软件 DNAMAN 对获得的基因 *BSSM* 序列进行多序列比对，剔除重复序列，保留差异基因进行引物设计。基于多序列比对分析，结合引物设计原理，本研究设计了扩增基因 *BSSM* 序列的特异性引物对，即上游引物 BSSMF（5′-GTTTTTTCTGTACTGGCTCAACT-3′）和下游引物 BSSMR（5′-ACCAGTTCCAAGTAGACCTATTA-3′）。按照上下游引物的位置信息，基因 *BSSM* 序列扩增的目标产物的大小为 183 bp，其延伸时间预设为 12 秒。基于 Tm = 4（G + C）+ 2（A + T）计算公式，确定上下游引物 Tm 值均为 64ºC，因此，本研究初步设定基因 *BSSM* 序列扩增的目标区域的退火温度设定为 60ºC。

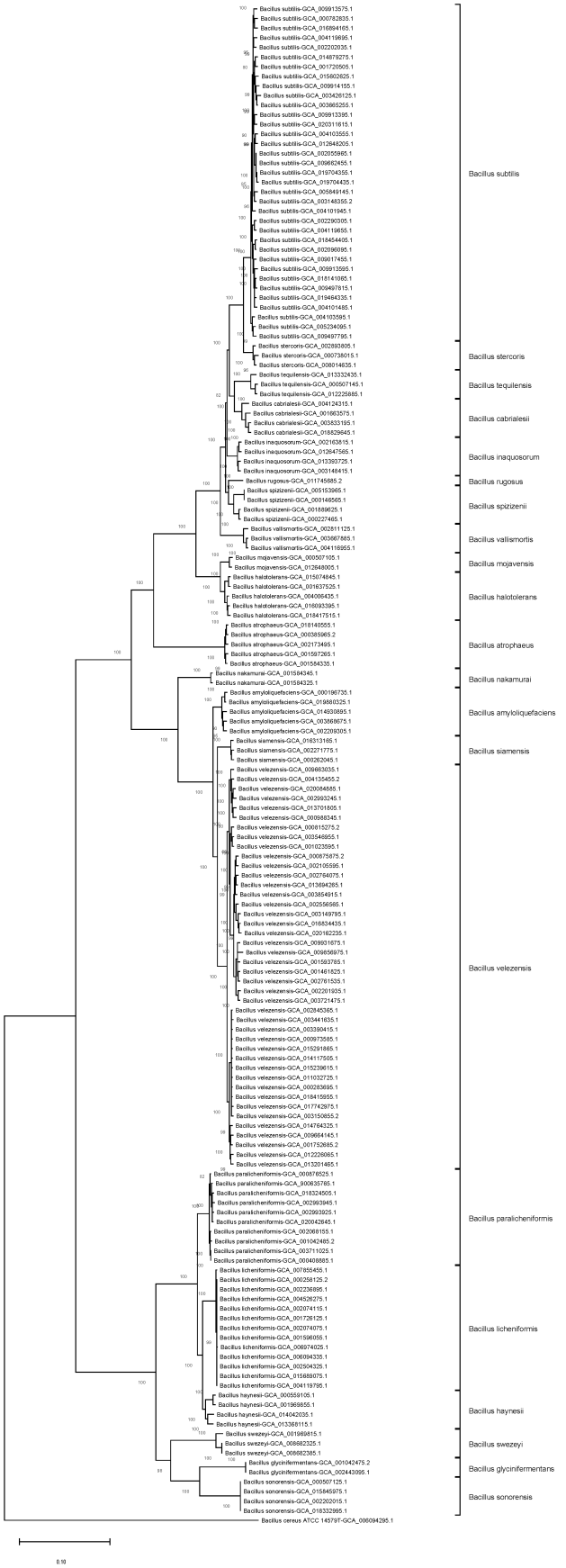

图 10 158 株枯草芽孢杆菌及近缘种菌株系统基因组发育树

7.1.3 枯草芽孢杆菌参考菌株确定

为了验证上述枯草芽孢杆菌种特异基因 *BSSM* 的特异性，本研究从广东省微生物菌种保藏中心（GDMCC）获得了 17 株细菌作为参考（表 5 和表 10）。由于枯草芽孢杆菌与其近缘物种菌株高度近缘，因此使用生理生化鉴定和分子鉴定较难区分这些菌株。为了精准鉴定 17 株参考菌株的分类地位，本研究对这些菌株进行了基因组测序。

使用软件 SPAdes 对参考菌株的质检后测序序列进行拼接，并参考序列片段长度和覆盖度对拼接的序列进行清洗，获得的基因组序列用于下游分析。使用 CheckM 对参考菌株清洗的基因组序列进行质检，结果表明这些菌株基因组序列完整度均高于 98%，污染度均低于 2.5%，确认这些基因组序列是高质量。为了确定这些参考菌株物种分类，本研究使用在线工具 Genome-to-Genome Distance Calculator 3.0 计算了每株参考菌株基因组序列与对枯草芽孢杆菌模式菌株基因组序列间的 DNA-DNA 杂交值。如表 10 所示，参考菌株和模式菌株间 dDDH 数值均高于 70%物种划分“金标准”，确认这些参考菌株全部属于枯草芽孢杆菌，可用于后续验证枯草芽孢杆菌种特异基因 *BSSM* 的特异性。

表 10 枯草芽孢杆菌参考菌株

菌株编号	完整度（%）	污染度（%）	dDDH
B. subtilis 79703B	99.81	0.12	88.5
B. subtilis GDMCC 1.131	99.67	0.13	89.5
B. subtilis GDMCC 1.1357	99.44	0.88	86.3
B. subtilis GDMCC 1.149	99.81	0.12	89.9
B. subtilis GDMCC 1.1976	99.81	0.25	87.3
B. subtilis GDMCC 1.22	99.81	0.12	86.4
B. subtilis GDMCC 1.258	99.81	0.25	99.9
B. subtilis GDMCC 1.2586	99.81	0.12	85.3
B. subtilis GDMCC 1.372	99.81	0.12	88.1
B. subtilis GDMCC 1.427	99.81	1.10	88.3
B. subtilis GDMCC 800594	99.81	0.25	87.8
B. subtilis GDMCC 803523	98.70	1.01	85.0
B. subtilis GDMCC 806729	98.70	0.99	86.4
B. subtilis GDMCC 810444	99.81	0.50	87.4
B. subtilis GDMCC 810496	99.81	2.12	89.2
B. subtilis GDMCC 810525	99.81	0.12	84.7
B. subtilis GDMCC 811704	99.81	0.56	88.2

7.1.4 枯草芽孢杆菌特异靶标基因验证

枯草芽孢杆菌特异靶标基因验证包括两个方面：（1）在基因组水平，确认参考菌株是否包含本研究确定的特异靶标基因；（2）使用本研究设计特异靶标基因引物，对参考菌株进行 PCR 验证。

使用特异性靶标基因 *BSSM* 作为目标，以参考菌株基因组序列作为比对的数据库，进行本地比对。如表 11 所示，枯草芽孢杆菌 17 株参考菌株的基因组序列菌包含与特异性靶标基因 BSSM 同源片段，且其相似度全部高于 90%，覆盖度全部高于 99%。这表明：这些枯草芽孢杆菌参考菌株的基因组序列是包括特异性靶标基因 *BSSM*，再次验证了该靶标基因在枯草芽孢杆菌特异性。

表 11 参考菌株基因组序列特异性靶标基因检测

特异基因	参考菌株	相似度	覆盖度	E 值
BSSM	*B. subtilis* 79703B	98.63	100	2.15E-143
BSSM	*B. subtilis* CGMCC 1.921	97.94	100	1.11E-140
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 1.1357	100	100	8.00E-149
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 1.149	99.65	99.0	4.14E-146
BSSM	*B. subtilis* C30101	99.31	100	4.14E-146
BSSM	*B. subtilis* CGMCC 1.421	98.26	99.0	3.88E-140
BSSM	*B. subtilis* CGMCC 1.1390	100	100	8.00E-149
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 1.2586	98.28	99.0	3.19E-141
BSSM	*B. subtilis* ACCC 11089	98.63	100	2.15E-143
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 1.427	97.23	99.0	7.02E-137
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 800594	99.31	100	4.14E-146
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 803523	91.29	99.0	2.45E-117
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 806729	98.28	100	9.13E-142
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 810444	99.31	99.0	5.05E-145
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 810496	99.65	99.0	4.14E-146
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 810525	97.92	99.0	1.35E-139
BSSM	*B. subtilis* GDMCC 811704	97.94	100	1.35E-139

利用本研究设计的靶标基因 *BSSM* 特异性扩增引物，根据确定的退火温度和延伸时间，对 18 株枯草芽孢杆菌细菌和 19 株非枯草芽孢杆菌细菌进行 PCR 验证。如图 11 所示，PCR 产物电泳检测表明 18 株枯草芽孢杆菌细菌全部获得目的条带，而且条带明亮、清晰、单一；而 19 株非枯草芽孢杆菌细菌全部没有检测到目的条带。这些结果表明：本研究针对靶标基因 BSSM 设计的特异性引物和确定的 PCR 条件是可以用于枯草芽孢杆菌细菌的快速、精准鉴定。

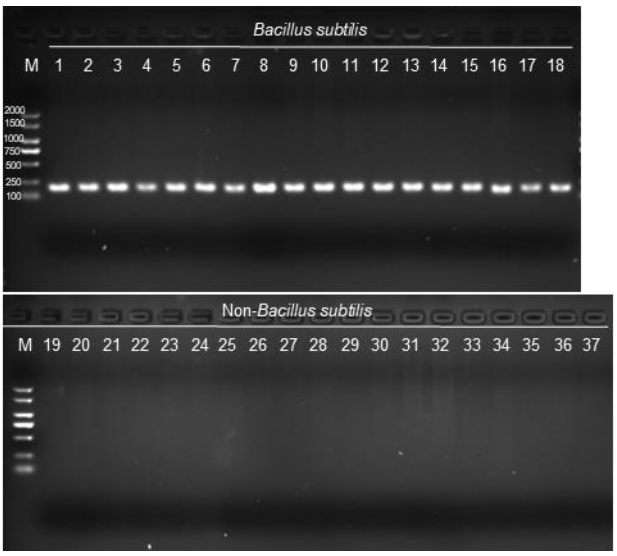

图 11 枯草芽孢杆菌特异靶标基因 PCR 检测

泳道：M，Marker 2000；泳道 1-37 的菌株编号与表 3 相同。

8．方法确认试验

(1) 重复性实验（实验室内再现性）

按照 RB/T 151-2016《食品微生物定量检测测量不确定度评估指南》，对搜集的样品中挑选不同含量梯度的样品（序号 2、6、25、26）共 4 个进行了实验室内再现性实验（重复性实验），进行统计分析（微生物检测数据是偏态分布，所以结果以 10 为底对数转换后进行计算），均符合要求，在误差范围之内（见表 12）。

表 12 样品实验室内再现性标准偏差（NA 37 ℃, 16 h~24 h）单位：CFU/g

样品名称	n	X_{iA}	X_{iB}	$y_{iA}=\log_{10}(X_{iA})$	$y_{iB}=\log_{10}(X_{iB})$	$(y_{iA}-y_{iB})^2/2$
2 号（1000 亿/g）	1	1.3×10^{11}	1.5×10^{11}	11.11	11.08	0.00060
	2	1.6×10^{11}	1.4×10^{11}	11.08	11.04	0.00071
	3	1.7×10^{11}	1.6×10^{11}	11.08	11.11	0.00060
	4	1.5×10^{11}	1.7×10^{11}	11.04	11.08	0.00071
	5	1.4×10^{11}	1.6×10^{11}	11.15	11.08	0.00224
	6	1.8×10^{11}	1.5×10^{11}	11.08	11.08	0
	结果	再现性标准偏差为：0.03（log10）CFU/g				
6 号（200 亿/g）	1	3.9×10^{10}	3.8×10^{10}	10.59	10.58	0.00006
	2	3.8×10^{10}	3.8×10^{10}	10.58	10.58	0
	3	3.6×10^{10}	3.8×10^{10}	10.56	10.58	0.00028
	4	3.7×10^{10}	3.7×10^{10}	10.57	10.57	0

	5	3.8×10^{10}	3.6×10^{10}	10.58	10.56	0.00028
	6	3.9×10^{10}	4.0×10^{10}	10.59	10.60	0.00006
	结果	再现性标准偏差为： 0.01（log10）CFU/g				
25 号（150 亿/g）	1	1.3×10^{10}	1.3×10^{10}	10.11	10.11	0
	2	1.5×10^{10}	1.4×10^{10}	10.18	10.15	0.00045
	3	1.4×10^{10}	1.3×10^{10}	10.15	10.11	0.00052
	4	1.3×10^{10}	1.3×10^{10}	10.11	10.11	0
	5	1.2×10^{10}	1.2×10^{10}	10.08	10.08	0
	6	1.2×10^{10}	1.2×10^{10}	10.08	10.08	0
	结果	再现性标准偏差为： 0.04（log10）CFU/g				
26 号样品（1000 亿/g）	1	1.2×10^{11}	1.2×10^{11}	11.08	11.08	0
	2	1.3×10^{11}	1.3×10^{11}	11.11	11.11	0
	3	1.1×10^{11}	1.2×10^{11}	11.04	11.08	0.00071
	4	1.3×10^{11}	1.2×10^{11}	11.11	11.08	0.00060
	5	1.3×10^{11}	1.3×10^{11}	11.11	11.11	0
	6	1.1×10^{11}	1.2×10^{11}	11.04	11.08	0.00071
	结果	再现性标准偏差为： 0.04（log10）CFU/g				

(2) 再现性实验

按照要求，2023 年 8 月～9 月，由国家饲料质量检验检测中心（北京）（实验室—1）、中国广州分析测试中心（实验室—2）、广电计量检测集团股份有限公司（实验室—3）及本单位（实验室—4）对制订的标准方法进行方法验证。挑取了 2 个不同含量的样品，分别进行测定。对实验间的数据进行实验室间再现性的统计分析。

三家验证单位和本单位共 4 个单位的再现性符合要求，没有超出 RSD 15 % 。相对标准偏差 RSD 均在 0～14.8%以内，见表 13。

表 13 实验室间结果再现性

样品编号	重复	实验室—1 CFU/g（mL）	实验室—2 CFU/g（mL）	实验室—3 CFU/g（mL）	实验室—4 CFU/g（mL）	相对标准偏差 RSD（%）
25	1	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}	1.2×10^{10}	1.3×10^{10}	8.0
	2	1.2×10^{10}	1.1×10^{10}	9.8×10^{9}	1.4×10^{10}	14.8

	3	1.2×10^{10}	1.2×10^{10}	1.1×10^{10}	1.3×10^{10}	6.8
	4	1.1×10^{10}	1.2×10^{10}	9.4×10^{9}	1.3×10^{10}	14.0
	5	1.2×10^{10}	1.2×10^{10}	1.2×10^{10}	1.2×10^{10}	0
	6	1.2×10^{10}	1.1×10^{10}	1.1×10^{10}	1.2×10^{10}	4.8
26	1	1.2×10^{11}	1.2×10^{11}	1.1×10^{11}	1.2×10^{11}	4.2
	2	1.2×10^{11}	1.3×10^{11}	9.7×10^{10}	1.3×10^{11}	13.0
	3	1.1×10^{11}	1.2×10^{11}	1.0×10^{11}	1.2×10^{11}	8.7
	4	1.2×10^{11}	1.2×10^{11}	1.1×10^{11}	1.2×10^{11}	4.2
	5	1.3×10^{11}	1.3×10^{11}	1.2×10^{11}	1.3×10^{11}	3.8
	6	1.2×10^{11}	1.3×10^{11}	1.1×10^{11}	1.2×10^{11}	6.8
备注	微生物检测数据是偏态分布，所以结果以 10 为底对数转换后进行计算。					

（二）饲料添加剂枯草芽孢杆菌主含量的确定

通过企业及市场渠道收集了 24 家企业的 29 个饲料添加剂枯草芽孢杆菌样品。其中 1 个为液体样品，1 个为混合型饲料添加剂枯草芽孢杆菌，其它全部为饲料添加剂枯草芽孢杆菌粉末样品，产品中枯草芽孢杆菌活菌数为 100 亿/g~2000 亿/g。27 个饲料添加剂枯草芽孢杆菌粉末样品信息见表 14。

表 14 样品编号及来源

序号	样品名称	性状	活菌数（亿/g）	来源
1	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	/	广大博特（河源）生物科技有限公司
2	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	广东海纳川生物科技股份有限公司
3	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	2000	广东海纳川生物科技股份有限公司
4	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	/	中山茂辉生物科技有限公司
5	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	/	武汉新华扬生物股份有限公司
6	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	200	安琪酵母股份有限公司
7	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	2000	北京昕大洋科技发展有限公司
9	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	河南新仰韶生物科技有限公司

10	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	湛江恒兴养殖技术服务有限公司
11	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	广东大泽农生物科技股份有限公司
12	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	100	广东大泽农生物科技股份有限公司
13	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	升盛生物科技（珠海）有限公司
14	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	/	厦门市科环海洋生物科技有限公司
15	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	100	山东益昊生物科技有限公司
16	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	山西大禹生物工程股份有限公司
17	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	/	江苏远山生物技术有限公司
18	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	/	云南博仕奥生物技术有限公司
19	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	/	云南博仕奥生物技术有限公司
20	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1500	山西大禹生物工程股份有限公司
21	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	湛江安美生物科技有限公司
22	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	河南新仰韶生物科技有限公司
24	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	潍坊康地恩生物科技有限公司
25	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	100	高唐华农生物工程有限公司
26	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	湖北华扬科技发展有限公司
27	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	150	康百（中山）生物科技有限公司
28	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1000	广州同心源生物科技有限公
29	饲料添加剂 枯草芽孢杆菌	粉末	1500	山东康地恩生物科技有限公司

1．枯草芽孢杆菌含量

对收集样品中的枯草芽孢杆菌的含量进行测定，收集的样品主含量标示为枯草芽孢杆菌的 27 个样品检测后发现，其中 11 个样品中菌种与标示主成分名称不符合（表 15 及图 12）。

符合的 16 个样品实测值为 9.6×10^{9}CFU/g ~3.5×10^{11}CFU/g，全部与标识值符合。故本标准主成分枯草芽孢杆菌含量保持原标准的定值，设为≥10×10^{9}CFU/g。

表 15 样品中枯草芽孢杆菌含量检测情况

样品编号	标示值（亿/g）	实测值 CFU/g	在稀释度 10^{-7}~10^{-9} 平板上非芽孢菌检出情况	特异性引物鉴定结果	其它芽孢菌 16S+gyrB 鉴定结果
1	/	2.5×10^{10}	未检出	有目的条带	无
2	1000	1.5×10^{11}	未检出	有目的条带	无
3	2000	未检出	未检出	无目的条带	检出 Bacillus inaquosorum
4	/	9.6×10^{9}	未检出	有目的条带	无
5	/	1.8×10^{11}	未检出	有目的条带	无
6	200	未检出	未检出	无目的条带	检出 Bacillus velezensis
7	2000	未检出	未检出	无目的条带	检出 Bacillus velezensis
9	1000	1.5×10^{11}	未检出	有目的条带	无
10	1000	1.2×10^{11}	未检出	有目的条带	无
11	1000	2.7×10^{11}	未检出	无目的条带	检出 Bacillus inaquosorum
12	100	未检出	未检出	无目的条带	检出 Bacillus inaquosorum
13	1000	未检出	未检出	无目的条带	检出 Bacillus velezensis
14	/	未检出	未检出	有目的条带	无
15	100	3.2×10^{10}	未检出	有目的条带	无
16	1000	1.7×10^{11}	未检出	无目的条带	检出 Bacillus velezensis
17	/	未检出	未检出	有目的条带	无
18	/	9.8×10^{9}	未检出	无目的条带	检出 Bacillus velezensis
19	/	未检出	未检出	无目的条带	检出 Bacillus velezensis
20	1500	未检出	未检出	无目的条带	检出 Bacillus velezensis
21	1000	未检出	未检出	无目的条带	检出 Bacillus velezensis
22	1000	未检出	未检出	有目的条带	无
24	1000	1.1×10^{11}	未检出	有目的条带	无
25	100	1.3×10^{10}	未检出	有目的条带	无
26	1000	2.6×10^{11}	未检出	有目的条带	无
27	150	1.4×10^{10}	未检出	有目的条带	无

28	1000	1.3×10^{11}	未检出	有目的条带	无
29	1500	3.5×10^{11}	未检出	有目的条带	无

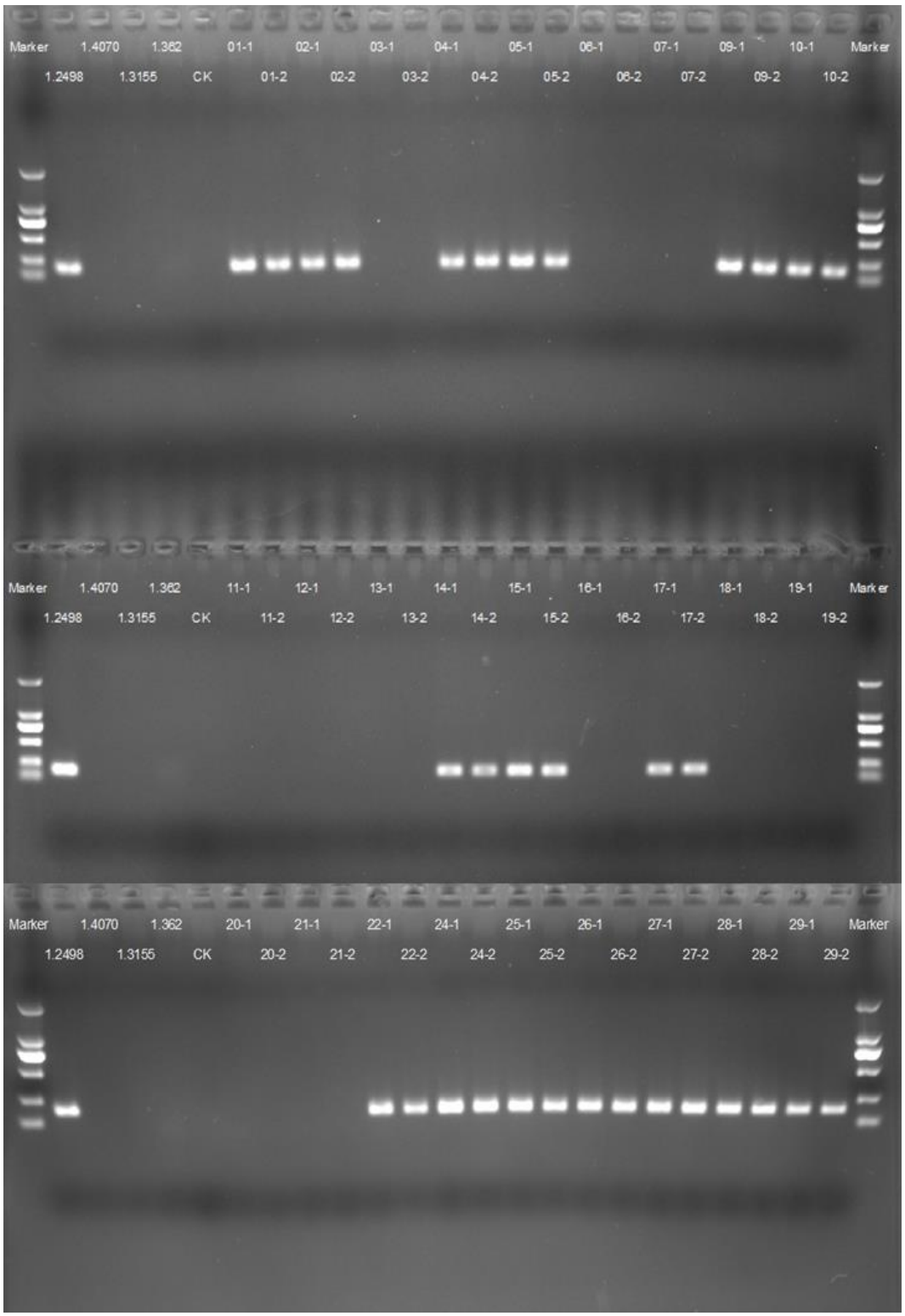

图 12 样品中枯草芽孢杆菌特异靶标基因 PCR 扩增验证结果

注：泳道：Marker2000（从上到下：2000，1500，1000，750，500，250，100）；1.2498：

枯草芽孢杆菌模式菌株 GDMCC 1.2498；1.4070：贝莱斯芽孢杆菌模式菌株 GDMCC 1.4070；1.3155：解淀粉芽孢杆菌模式菌株 GDMCC 1.3155; 1.362：地衣芽孢杆菌模式菌株 GDMCC 1.362；CK：空白对照；01-1、01-2：1 号样品的两次平行（后续序号与此相同）。

2．水分及粒度

对已确定主成分为枯草芽孢杆菌的 16 个样品进行外观与性状观察，水分及粒度的测定， 如表 16 所示，16 个样品的外观颜色有差异，色泽均匀一致，无异物，无异臭味。实测水分值在 4.5%~11.4%之间，只有一个样品高于 10%，小于 10%的占到 93.75%；全部样品均可通过 SSW0.400/0.250 试验筛。因此，水分≤10%及粉剂样品应通过 SSW0.400/0.250 试验筛是合理的，维持原标准设定值。

表 16 样品中水分及粒度测定结果

样品编号	外观与性状	水分（%）	粒度（粉末，SSW 0.400/0.250 试验筛通过率（%）
1	褐色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	9.8	100%通过
2	黄色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	7.5	100%通过
4	灰色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	6.3	100%通过
5	黄棕色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	8.7	100%通过
9	浅黄褐色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	6.8	100%通过
10	浅黄褐色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	5.8	100%通过
14	灰棕褐色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	9.2	100%通过
15	浅黄褐色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	9.5	100%通过
17	浅灰黄褐色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	7.9	100%通过
22	浅黄褐色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	11.4	100%通过
24	浅灰黄褐色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	8.7	100%通过
25	灰棕褐色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	9.2	100%通过
26	灰褐色粉末，形态、色泽均匀一	8.6	100%通过

	致，无异物，无异臭味		
27	浅黄褐色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	9.3	100%通过
28	灰白色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	8.5	100%通过
29	黄棕色粉末，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味	4.5	100%通过

3．卫生指标

饲料添加剂枯草芽孢杆菌的卫生指标参考原有标准 NY/T 2131-2012、微生物饲料添加剂技术通则 NY/T 1444-2007、企业标准（表 4）及实测值（表 17）。经过综合分析考虑后，维持原标准设定值。在征求意见时，有专家提出把金黄色葡萄球菌项目改为凝固酶阳性葡萄球菌。由于大部分葡萄球菌不致病的，也有一些致病的球菌，多数葡萄球菌致病菌株产生凝固酶，使血浆凝固，检测饲料添加剂中的凝固酶阳性葡萄球菌比单纯检测金黄色葡萄球菌更肯实际意义。因此，采纳专家提出的意见，将原标准卫生指标中致病菌“金黄色葡萄球菌”改为“凝固酶阳性葡萄球菌”并补充相关试验。

表 17 饲料添加剂枯草芽孢杆菌的卫生指标样品实测值

卫生指标	样品实测值																设定值
	1	2	4	5	9	10	14	15	17	22	24	25	26	27	28	29	
黄曲霉毒素B1/（μg/kg）	<2	2.23	3.51	<2	5.28	<2	<2	6.06	3.32	<2	<2	<2	6.89	<2	<2	<2	≤10
总砷/（mg/kg）	0.32	1.23	0.41	0.24	0.67	0.48	0.98	1.25	0.39	0.50	1.13	0.35	0.49	0.25	0.67	0.42	≤2.0
铅/（mg/kg）	0.112	0.089	0.076	0.110	0.115	0.561	0.732	0.854	0.246	0.986	0.085	1.489	4.125	2.223	0.096	1.232	≤5.0
汞/（mg/kg）	0.012	0.016	0.025	0.034	0.019	0.023	0.059	0.013	0.017	0.013	0.029	0.033	0.022	0.054	0.043	0.082	≤0.1
镉/（mg/kg）	0.057	0.145	0.015	0.007	0.005	0.009	0.008	0.018	0.022	0.013	0.024	0.007	0.009	0.005	0.011	0.015	≤0.5
霉菌总数/（CFU/g）	<10	82	2.2×10^2	<10	6.2×10^2	<10	<10	7.5×10^2	2.0×10^2	<10	<10	<10	8.8×10^2	<10	<10	<10	$\leq2.0\times10^4$
大肠菌群/(MPN/100g)	<30	60	<30	1.2×10^2	<30	<30	<30	1.2×10^3	<30	<30	<30	1.3×10^2	<30	<30	<30	1.2×10^2	$\leq1.0\times10^4$
沙门氏菌/(25g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	不得检出

志贺氏菌/(25g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	不得检出
凝固酶阳性葡萄球菌/(25g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	不得检出

注：“-”表示未检出

4．贮存及保质期

对于产品的贮存，饲料添加剂企业现场审核时一般要求热敏物质及微生物贮存于阴凉房（温度<20℃），另外多数企业标准中多数规定贮存有阴凉处，因此，本标准维持原标准规定，阴凉贮存；而保质期与菌种特性、工艺等密切相关，调查收集的 20 家企标（表 4）中规定保质期为 12 个月的企业有 15 家，占比 75%；18 个月的企业有 2 家，占比 10%；24 个月的企业有 3 家，占比 15%。因此，本标准规定：“未开启包装的产品，在规定的运输、贮存条件下，产品保质期应与标签中标明的保质期一致”。

（三）技术经济论证，预期的经济效益、社会效益及生态效益

1）经济效益：质量是企业在市场竞争中得以生存和发展的基础保证，因此枯草芽孢杆菌饲料添加剂产品质量的好坏在很大程度上影响着企业的经济效益，如果产品的质量不能得到保证就难以取得长期的、可持续的发展，而产品质量的好坏需要一个标准来衡量，使其在满足相关法规标准和顾客需求的前提下，也能够最大程度降低产品的成本，而标准化的实施使得这些问题迎刃而解，从而为企业创造最大化的、持久的经济效益。本文件的修订和实施，可使枯草芽孢杆菌饲料添加剂产品的性能和品质得到提升，同时降低成本，提高企业的竞争力，最终带动整个微生物饲料添加剂的产业升级。

2) 社会效益：该标准的修订和实施，可使产品更安全，有助于保护购买者的合法权益不受侵害。另外，亦可使生产企业的管理人员、一线生产人员更加严格要求自己，有利于提高自身的素质，从而给经济的发展提供良好的社会大环境。该标准修订的过程是随着当前科学技术发展水平而动态变化的，既是反映当前科学技术水平的提高，同时也是将科技成果转化为生产力的重要途径，标准的实施在很大程度上促进科技成果转化为生产力的进程，促进科学技术水平提高与生产力水平提高的良性循环。

3）生态效益：标准化是促进生态文明建设的重要手段，为建设资源节约型、环境友好型社会提供技术基础。生态文明建设本身需要有相应的标准来衡量，推动该标准的实施，能够科学地进行产业布局，促进对自然资源的合理利用，保持生态平衡，维护人类社会当前和长远的利益。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本文件修订过程中未查到国际标准，未查询到区域标准和国外标准。

本文件修订过程中未测试国外的样品、样机。

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

本文件未引用或采用国际国外标准。

六、与有关法律、法规的关系

本文件修订过程中严格遵守国家有关方针、政策、法律法规，严格执行强制性国家标准和行业标准，与相关的各种基础标准相衔接，遵循政策性和协调性原则。

本文件修订过程遵循《中华人民共和国标准化法》、《农业标准化管理办法》等法律法规的要求，与强制性标准协调一致、没有冲突，同时满足《饲料和饲料添加剂管理条例》、《新饲料添加剂申报材料要求》的相关要求。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

无。

九、贯彻农业行业标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

本文件发布以后，替代 NY/T 2131-2012《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》，需做好标准宣贯工作，保证相关单位和人员熟知并掌握本文件，保证枯草芽孢杆菌饲料添加剂产品质量和市场规范。鼓励枯草芽孢杆菌饲料添加剂的相关管理要求

符合本文件。发布后，建议过渡期为半年，为企业配置相应试剂、仪器、实验前方法验证等行为预留过渡时间。

十、其他应当说明的事项

无。