

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1461—2007

饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌

Microorganism feed additives *Bacillus Licheniformis*

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人：佟建明、萨仁娜、张琪、谷春涛、彭爱铭、崔东良。

饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌

1 范围

本标准规定了饲料微生物添加剂-地衣芽孢杆菌产品的要求、试验方法、检验规则、标签、包装、运输、储存、保质期的要求。

本标准适用于固体和液体的地衣芽孢杆菌饲料添加剂。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注明日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.3 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定

GB/T 4789.5 食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验

GB/T 4789.10 食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

GB/T 5918 配合饲料混合均匀度的测定

GB/T 6435 饲料中水分和其他挥发性物质含量的测定

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

GB/T 13081 饲料中汞的测定

GB/T 13082 饲料中镉的测定

GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的检测方法

GB/T 13092 饲料中霉菌总数的测定方法

GB/T 13093 饲料中细菌总数的测定

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 17480 饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 酶联免疫吸附法

3 术语和定义

3.1

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus Licheniformis*)

属于芽孢杆菌科、芽孢杆菌属,菌体杆状,革兰氏阳性,有芽孢,中生。可抵抗不良环境条件,在饲料工业被制成微生物添加剂使用。

3.2

杂菌数

指在选择培养基上,除地衣芽孢杆菌外的其他细菌和霉菌菌落数之和。

3.3

杂菌率

指杂菌数在地衣芽孢杆菌数和杂菌数之和中所占百分率。

4 要求

4.1 微生物指标

4.1.1 菌体形态

4.1.1.1 染色:革兰氏染色为阳性。

4.1.1.2 形态特征:菌体细胞(营养体)呈直杆状,单个、成对或短链排列,大小为 $0.6\ \mu\text{m}\sim 0.8\ \mu\text{m}\times 1.5\ \mu\text{m}\sim 3.5\ \mu\text{m}$,两端钝圆。有芽孢,芽孢近椭圆形,中生,大小为 $0.8\ \mu\text{m}\times 1.3\ \mu\text{m}$,具有稀疏的周生鞭毛,能运动。孢子囊不膨大,内生孢子释放后孢子壳不是多处破裂。

4.1.2 菌落形态

4.1.2.1 营养琼脂(Nutrient Agar,NA):菌落杏仁白色,湿润有光泽,表明略有放射状条纹。

4.1.2.2 桑塔斯琼脂(Sauton'S Agar):菌落乳脂色,湿润有光泽,不透明,中央凸起。

4.1.2.3 牛肉浸汁培养基(Beef extract Agar):菌落乳脂色,湿润有光泽,不透明,边缘毛发状。

4.1.3 细胞壁化学

菌体细胞壁水解液含有内消旋二氨基庚二酸(meso-DAP)和甘氨酸,无特征性糖(糖型C),为细胞壁Ⅱ型。

4.1.4 生理生化特征

地衣芽孢杆菌生理生化特征见表1。

表1 地衣芽孢杆菌生理生化特征

特 征	结 果	特 征	结 果
明胶液化	+	生长温度范围	15℃~55℃
淀粉水解	+	利用柠檬酸盐	+
硝酸盐还原	+	苯丙氨酸脱氨	—
0.001%溶菌酶生长	+	酪素分解	+
7% NaCl 生长	+	酪氨酸分解	—
pH 5.5~8.7 生长	+	牛奶凝固	—
厌氧洋菜生长	+	牛奶脓化	+
V - P 反应	+	利用糖产酸	葡萄糖 +
卵黄反应	—		阿拉伯糖 +
接触酶反应	+		木糖 +
吡啉反应	—		甘露醇 +
注：+为阳性反应；—为阴性反应。			

4.2 感官指标

产品性状可分为液体和固体两类,应符合包装上标明的产品固有的形状、色泽、气味、均匀程度、杂质等,无异臭味,无异物。

4.3 水分(固体菌剂)

不高于 9.0%。

4.4 粒度(固体菌剂)

应通过 SSW0.400/0.250 mm 的试验筛。

4.5 微生物含量

地衣芽孢杆菌数 $\geq 1\times 10^9$ CFU/mL 或 g。

4.6 卫生指标

地衣芽孢杆菌饲料添加剂应符合表2的要求。

表 2 地衣芽孢杆菌饲料添加剂卫生指标

项 目	指 标
黄曲霉素 B ₁ (每千克产品中), μg	≤ 10
砷 (每千克产品中), mg	≤ 2.0
铅 (每千克产品中), mg	≤ 5.0
汞 (每千克产品中), mg	≤ 0.1
镉 (每千克产品中), mg	≤ 0.5
杂菌率, %	≤ 0.1
致病菌 (肠道致病菌和致病性球菌)	不得检出
大肠菌群 (100 g 或 100 mL 产品中), 个	≤ 400
霉菌总数 (每克或每毫升产品中), CFU	$\leq 2 \times 10^4$

5 试验方法

5.1 抽样

按 GB/T 14699.1 的规定,进行样品的采集。采样时必须特别注意样品的代表性和避免采样时的污染。首先准备好灭菌容器和采样工具,如灭菌牛皮纸袋或广口瓶,金属勺和刀。在卫生学调查基础上,采取有代表性的样品。样品采集后应立即进行检验。

5.2 感官检验

取一定量(固态 250 g、液态 250 mL)的样品于无色玻璃杯中,采用目测、鼻嗅的方法进行检验。

5.3 水分测定

按 GB/T 6435 进行测定。

5.4 粒度(固态添加剂)检测

按 GB/T 5918 规定执行。

5.5 地衣芽孢杆菌检测

5.5.1 菌体形态检验:

5.5.1.1 染色:革兰氏染色和芽孢染色。

5.5.1.2 形态检验:用营养琼脂,在 30℃ 条件下,培养 48 h 后,在无菌环境中,取菌体涂片染色,用光学显微镜观察菌体形态。

5.5.2 菌落特性检验:在营养琼脂、桑塔斯琼脂和牛肉浸汁琼脂平板上,30℃ 培养 48 h 后,观察菌落颜色、形态和色素等。

5.5.3 生理生化特征检验:参照《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》Vol. II 和《常见细菌系统鉴定手册》的有关内容进行。

5.5.4 活菌计数

5.5.4.1 采用稀释倒平板法。按 10 倍稀释法制成不同浓度稀释液,从稀释液中分别吸取一定体积置于无菌培养皿中,每一稀释度做 3 次重复。将事先融化并冷却至 50℃ 左右的营养琼脂培养基,向每个培养皿中倒入约 12 mL,摇匀,待凝固后,倒置培养 24 h,进行菌落计数。

5.5.4.2 对培养后的每个稀释度取 5 个~10 个菌落的菌体,涂片染色,进行显微镜识别。

5.5.4.3 选择适宜的稀释度,菌落在 30 个~300 个之间的平板进行计数。

5.5.4.4 计算方法见公式(1)、(2):

$$\text{地衣芽孢杆菌数 (CFU/g、mL)} = \text{菌落平均数} \times \text{稀释倍数} \times \frac{\text{母液菌悬液的体积(mL)}}{\text{菌剂 g 数或 mL 数}} \times \frac{1}{\text{接种量(mL)}} \quad \dots (1)$$

$$\text{杂菌率(\%)} = \frac{\text{杂菌数}}{\text{目标活菌数} + \text{杂菌数}} \times 100 \quad \dots (2)$$

5.6 卫生检验

5.6.1 黄曲霉素 B₁ 检验

按 GB/T 17480 规定执行。

5.6.2 砷含量测定

按 GB/T 13079 规定执行。

5.6.3 铅含量测定

按 GB/T 13080 规定执行。

5.6.4 汞含量的测定

按 GB/T 13081 规定执行。

5.6.5 镉含量的测定

按 GB/T 13082 规定执行。

5.6.6 霉菌检测

按 GB/T 13092 规定执行。

5.6.7 大肠菌群检测

按 GB/T 4789.3 规定执行。

5.6.8 致病菌检测

按 GB/T 13091、GB/T 4789.5 和 GB/T 4789.10 规定执行。

6 检验规则

6.1 出厂检验(交收检验)

感官指标、水分、粒度、微生物含量(含活菌数和杂菌率)指标为出厂检验项目,由生产厂或公司的质检部门进行检验,检验合格并签发质量合格证的产品方可出厂。

6.2 型式检验(例行检验)

一般情况下,企业半年进行一次型式检验。但有下列情况之一时,亦须进行型式检验:

- a) 更改主要原辅材料和关键生产工;
- b) 新试制的产品或正常生产的产品停产 3 个月以上(或半年),重新恢复生产时;
- c) 国家质量监督机构提出要求进行型式检验。

7 判定规则

- a) 检验中有一项指标不符合本标准时,应重新抽样,进行复检。复检结果仍有一项指标不符合本标准时,则判定该批产品为不合格。
- b) 如有致病菌检出,不得复检,直接判定该批产品为不合格产品。

8 标签、包装、运输、储存、保质期

8.1 标签

8.1.1 采用鲜明的标签贴于外包装。

8.1.2 标签内容应符合 GB 10648 的规定要求。

8.2 包装

应采用符合国家相关标准的、无毒的包装材料。

8.3 运输

运输中应避免日晒及 35℃ 以上高温。气温低于 0℃ 时需用保温车(8℃~10℃)运输。搬运装卸时

小心轻放,不得倒置,不得与有毒物质混装、混运。

8.4 储存

应保存于干燥、阴凉、通风的仓库中,避免直接日晒,防止长时间 35℃ 以上高温。不得和有毒、有害物质一起堆放,严防污染。

8.5 保质期

本产品保质期为 12 个月。

附 录 A
(资料性附录)

A.1 营养琼脂培养基(Nutrient Agar, NA)

蛋白胨 10.0 g, 牛肉提取物 3.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH7.0。

A.2 牛肉浸汁培养基(Beef extract Agar)

取去脂肪的瘦肉 500 g, 切碎, 于烧杯中加蒸馏水 1.0 L, 置 4℃ 冰箱中过夜, 用棉花过滤, 将滤液于水浴中煮沸 1 h, 使蛋白质凝固, 过滤, 在滤液中加入 10.0 g 蛋白胨和 5.0 g 氯化钠, 调 pH7.4, 并将液体补足 1.0 L, 琼脂 15.0 g, 分装后灭菌, 备用。

A.3 桑塔斯琼脂培养基(Sauton'S Agar)

蛋白胨 20.0 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.5 g, $MgSO_4$ 0.73 g, 甘油 15.0 mL, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH7.0。
