

附件4

NYSL

新饲料和新饲料添加剂产品标准

NYSL—1003—2026

饲料添加剂 贝莱斯芽孢杆菌 (CGMCC 24752)

Feed additive—*Bacillus velezensis* (CGMCC 24752)

2026-01-06 发布

2026-01-06 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。

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出，由全国饲料评审委员会归口。

本文件由中国农业大学、湖北凯能生物科技有限公司起草，由国家饲料质量检验检测中心（北京）复核。

本文件主要起草人：胡永飞、呙于明、陈晓峰、林燕、别君艳、孙宝盛、文秋。

饲料添加剂 贝莱斯芽孢杆菌（CGMCC 24752）

1 范围

本文件规定了饲料添加剂贝莱斯芽孢杆菌（CGMCC 24752）的技术要求、取样、试验方法、检验规则及标签、包装、运输、贮存和保质期。

本文件适用于以贝莱斯芽孢杆菌（CGMCC 24752）经发酵、浓缩、干燥，与载体混合稀释后制得的饲料添加剂贝莱斯芽孢杆菌。

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 饲料粉碎粒度测定法 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 10648 饲料标签
- 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 18869 饲料中大肠菌群的测定
- 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

贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis*

属于厚壁菌门芽孢杆菌目芽孢杆菌科芽孢杆菌属，为革兰氏阳性杆菌。菌体具有周生鞭毛，可运动，能形成抗逆性极强的内生芽孢，好氧或兼性厌氧。

4 菌种鉴别

4.1 形态特征

菌落形态特征：在 LB 固体培养基上形成白色圆形菌落，呈短链或念珠状排列，表面粗糙有褶皱，中间凸起，形成菌膜，菌膜下有黏液（见图 1 中的 a）。

菌体形态特征：在 LB 固体培养基上挑选特征菌落，进行革兰氏染色和细胞形态观察，革兰氏染色为阳性，菌体呈杆状（见图 1 中的 b）。

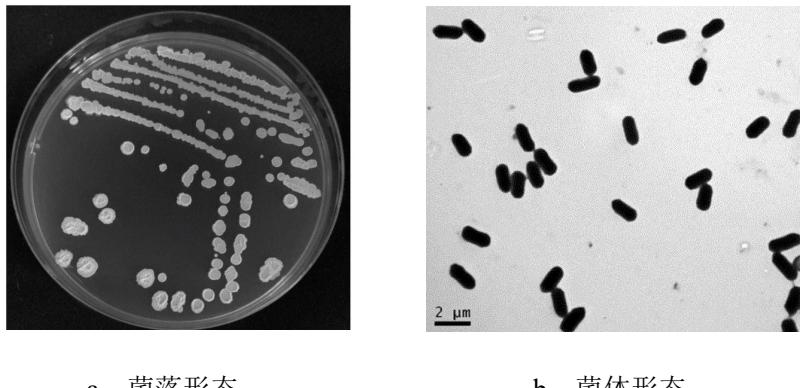


图 1 菌落形态和菌体形态

4.2 生理生化特征

应符合表 1 的要求。

表 1 生理生化特征

试验项目	结 果	试验项目	结 果	试验项目	结 果
甘露醇	+	组氨酸	+	33-羟基-丁酸盐	-
D-葡萄糖	+	鼠李糖	-	4-羟基-苯甲酸盐	-
水杨素	+	衣康酸	-	N-乙酰葡萄糖胺	+
D-蜜二糖	+	辛二酸盐	-	5-酮基-葡萄糖酸盐	-
L-岩藻糖	-	丙二酸盐	-	2-酮葡萄糖酸盐	-
D-山梨醇	+	乙酸盐	-	3-羟基-苯甲酸盐	-
L-阿拉伯糖	+	L-脯氨酸	+	DL-乳酸盐	+
丙酸盐	-	糖 原	+	L-丙氨酸	+
葵酸盐	-	戊酸盐	-	L-丝氨酸	-
柠檬酸盐	+	D-核糖	+/-	肌醇	+/-
蔗糖	+/-	麦芽糖	+/-		

注：+为阳性反应，-为阴性反应，+/-为阳性或阴性反应。

4.3 分子生物学鉴定

菌株的 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因分别与 *Bacillus velezensis* strain MFYC06X 的 16S rRNA (Sequence ID: OK147638.1) 和 *Bacillus velezensis* strain LPL-K103 (Sequence ID: CP039380.1) 进行序列比对，一致性 (identity) 值 ≥99.5%。

5 技术要求

5.1 外观与性状

浅黄褐色，流动性好，颗粒大小均匀，具有该产品的特殊气味。

5.2 技术指标

应符合表 2 的要求。

表 2 技术指标

项 目	指 标
贝莱斯芽孢杆菌活菌数/ (CFU/g)	$\geq 2.0 \times 10^{11}$
水分/%	≤ 8.0
粒度 (0.425 mm 孔径试验筛通过率) /%	≥ 90
总砷 (以 As 计) / (mg/kg)	≤ 2.0
铅/ (mg/kg)	≤ 5.0
汞/ (mg/kg)	≤ 0.1
镉/ (mg/kg)	≤ 0.5
黄曲霉毒素 B ₁ / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	≤ 10.0
玉米赤霉烯酮/ (mg/kg)	≤ 0.1
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 中)	不得检出

6 取样

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

7 试验方法

7.1 菌种鉴别

7.1.1 形态特征

菌落形态特征：LB 固体培养基 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 24 h, 形成白色圆形菌落, 呈短链或念珠状排列, 表面粗糙有褶皱, 中间凸起, 形成菌膜, 菌膜下有黏液。

菌体形态特征：LB 固体培养基 $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 24 h, 挑选特征菌落, 进行革兰氏染色和细胞形态观察: 革兰氏染色呈紫色, 菌体呈杆状。

7.1.2 生理生化特征

从 LB 固体培养基挑取一个或几个相同的新鲜菌落, 将待测菌悬液用生理盐水稀释, 用比浊仪调整其浊度至 0.5 麦氏单位。将菌悬液接种至 LB 固体培养基中, 于 $29^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 经 24 h~48 h 孵育后检测, 检测结果应符合表 1 的规定。

7.1.3 分子生物学鉴定

按附录 A 规定执行。

7.2 外观与性状

取适量试样，置于洁净的白色背景下，在自然光状态下，观察其色泽、状态，嗅其气味。

7.3 贝莱斯芽孢杆菌活菌数

按附录 B 规定执行。

7.4 水分

按 GB/T 6435 规定执行。

7.5 粒度

按 GB/T 5917.1 规定执行。

7.6 总砷（以 As 计）

按 GB/T 13079 规定执行。

7.7 铅

按 GB/T 13080 规定执行。

7.8 汞

按 GB/T 13081 规定执行。

7.9 镉

按 GB/T 13082 规定执行。

7.10 黄曲霉毒素 B₁

按 NY/T 2071 规定执行。

7.11 玉米赤霉烯酮

按 NY/T 2071 规定执行。

7.12 霉菌总数

按 GB/T 13092 规定执行。

7.13 大肠菌群

按 GB/T 18869 的规定执行。

7.14 沙门氏菌

按 GB/T 13091 的规定执行。

8 检验规则

8.1 组批

以相同菌株、相同发酵工艺、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 900 kg。

8.2 出厂检验

出厂检验项目为外观与性状、贝莱斯芽孢杆菌活菌数、水分。产品出厂前应逐批检验，检验合格并且附具合格证和使用说明书（见附录 C）方可出厂。

8.3 型式检验

型式检验项目为本文件第 4 章和第 5 章规定的所有项目，在正常生产情况下，型式检验一般每半年至少进行一次。在有下列情况之一时，也应进行型式检验：

- a) 产品定型投产时；
- b) 生产工艺、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 6 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) 饲料管理部门提出检验要求时。

8.4 判定规则

8.4.1 所验项目全部合格，判定为该批次产品合格。

8.4.2 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。复检结果仍不符合本文件规定，则判定该批产品不合格。微生物指标不得复检。

8.4.3 除微生物指标外，各项目指标的极限数值判定按 GB/T 8170 修约值比较法执行。

9 标签、包装、运输、贮存和保质期

9.1 标签

按 GB 10648 规定执行，见附录 D。

9.2 包装

内包装材料采用聚对苯二甲酸乙二醇酯（PET），外包装采用覆膜编织袋。包装应完整、无破损、无泄漏。

9.3 运输

运输过程中应防止日晒、雨淋，搬运装卸时小心轻放，不应与有毒有害物质混装、共运。

9.4 贮存

应贮存于干燥、阴凉、通风处，防止日晒、雨淋，不应与有毒有害物质混贮。

9.5 保质期

在规定的运输、贮存条件下，未开启包装的产品保质期为 24 个月。

附录 A

(规范性)

贝莱斯芽孢杆菌 (CGMCC 24752) 分子生物学鉴定

A. 1 16S rRNA 基因及 *gyrB* 基因鉴定

A. 1. 1 试剂或材料

除非另有规定, 仅使用分析纯试剂。所有试剂均使用无 DNA 酶污染的容器存储和分装。

A. 1. 1. 1 水: GB/T 6682, 一级。

A. 1. 1. 2 无水乙醇。

A. 1. 1. 3 高度去离子甲酰胺 (Hi-Di)。

A. 1. 1. 4 琼脂糖: 纯度 \geqslant 99.5%。

A. 1. 1. 5 70%乙醇: 量取 70 mL 无水乙醇 (A. 1. 1. 2), 用水稀释至 100 mL, 混匀。

A. 1. 1. 6 氢氧化钠溶液 (0.5 mol/L): 称取 20 g 氢氧化钠, 加水溶解, 冷却后用水稀释定容至 1000 mL, 置于聚乙烯瓶中。

A. 1. 1. 7 乙二胺四乙酸二钠溶液 (0.5 mol/L, pH 8.0): 称取 186.1 g 二水合乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 溶于水, 用氢氧化钠溶液 (A. 1. 1. 6) 调节 pH 至 8.0, 用水稀释定容至 1000 mL, 混匀。

A. 1. 1. 8 乙酸钠缓冲溶液 (3 mol/L, pH 5.2): 称取 408.1 g 三水合乙酸钠, 加入约 600 mL 水溶解, 用冰乙酸调节 pH 至 5.2, 用水稀释定容至 1000 mL。

A. 1. 1. 9 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

A. 1. 1. 10 电泳缓冲母液 (50 \times): 称取 242 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 加入约 800 mL 水, 搅拌溶解; 缓慢滴加 57.1 mL 冰醋酸, 加入 37.2 g 二水合乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 搅拌溶解, 用氢氧化钠溶液 (A. 1. 1. 6) 调节 pH 至 8.0, 加水至 1000 mL, 混匀。

A. 1. 1. 11 电泳缓冲工作液 (1 \times 工作液): 移取 20 mL 电泳缓冲母液 (50 \times) (A. 1. 1. 10), 加入 980 mL 水, 混匀。临用现配。也可使用市售产品。

A. 1. 1. 12 上样缓冲溶液 (6 \times Loading buffer): 量取乙二胺四乙酸二钠溶液 (A. 1. 1. 7) 6 mL、甘油 40 mL, 加入溴酚蓝 0.05 g、二甲苯青 0.05 g, 充分溶解后, 用灭菌水定容至 100 mL。也可使用市售产品。

A. 1. 1. 13 核酸凝胶染色剂: 溴化乙锭或吖啶橙。

A. 1. 1. 14 DNA 分子量标记: 覆盖 100 bp-2000 bp 的范围。

A. 1. 1. 15 胶回收试剂盒。

A. 1. 1. 16 循环测序试剂盒。

A. 1. 2 仪器设备

A. 1. 2. 1 分析天平: 感量 0.01 g。

A. 1. 2. 2 离心机: 离心力大于 15000 g。

A. 1. 2. 3 恒温水浴锅: 控温精度 \pm 1℃。

A. 1. 2. 4 涡旋振荡仪。

A. 1. 2. 5 电泳仪。

A. 1. 2. 6 超微量分光光度计: 波长精度 \pm 2 nm。

A. 1. 2. 7 紫外凝胶成像仪或蓝光切胶仪。

A. 1. 2. 8 测序仪。

A. 1. 3 试验步骤

A. 1. 3. 1 DNA 模板制备

从纯化培养 24 h~48 h 后的 LB 固体培养基上，刮取 1~2 接种环菌苔，加入 200 μL 灭菌水，涡旋振荡，充分混匀。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒（A. 1. 1. 9），提取细菌基因组 DNA，用超微量分光光度计于波长 260 nm 和 280 nm 处测吸光度，计算 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值，应为 1.7~2.0。于-20℃下保存，备用。

A. 1. 3. 2 PCR 扩增

16S rRNA 基因使用细菌 16S 核糖体通用引物（27F 和 1492R）扩增（16S rRNA 基因引物序列见表 A.2），gyrB 基因使用 gyrB 基因特异引物（gyrB_sub1F 和 gyrB_subR）扩增（gyrB 基因引物序列见表 A.3），PCR 扩增反应体系见表 A.4。

表 A. 2 16S rRNA 基因引物序列

引物名称	序列（5' → 3'）
27F（上游）	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R（下游）	GGTTACCTTGTACGACTT

表 A. 3 gyrB 基因引物序列

引物名称	序列（5' → 3'）
gyrB_sub1F（上游）	CGGATATAAAGTATCCGGCGG
gyrB_subR（下游）	CCCGCAGAGTCACCCCTACG

表 A. 4 PCR 扩增反应体系

PCR 试剂	实验体系	阴性对照体系	阳性对照体系
基因组 DNA（100 ng/ μL ）	1.0 μL	-	1.0 μL
10×Buffer（含 2.5 mM Mg ²⁺ ）	5.0 μL	5.0 μL	5.0 μL
Taq 酶（5 U/ μL ）	0.25 μL	0.25 μL	0.25 μL
dNTP（10 mM）	2.0 μL	2.0 μL	2.0 μL
上游引物（10 μM ）	1 μL	1 μL	1 μL
下游引物（10 μM ）	1 μL	1 μL	1 μL
灭菌水（ddH ₂ O）	39.75 μL	40.75 μL	39.75 μL
总体积	50.0 μL	50.0 μL	50.0 μL

注：该反应体系也可使用市售的 PCR 预混液。阳性对照体系为标准菌株（CGMCC 24752）基因组 DNA。

按照表 A. 4，向离心管内依次加入各组分，涡旋振荡后瞬时离心，收集管壁上的液滴至管底，于 PCR 扩增仪进行 PCR 反应。

反应流程参考条件如下：

95℃预变性 60 s；

95℃变性 35 s；

55℃退火 30 s；

72℃延伸 1.5 min；

共 30 个循环，72℃延伸 5 min。

A. 1. 3. 3 PCR 产物检测

用琼脂糖（A. 1. 1. 4）、电泳缓冲工作液（A. 1. 1. 11）和核酸凝胶染色剂（A. 1. 1. 13）制备 1.0%~1.5% 浓度的琼脂糖凝胶。移取 PCR 产物（A. 1. 3. 2）2 μL、上样缓冲溶液（A. 1. 1. 12）1 μL，混匀后上样。在 90 V~150 V 电压下，用制备的琼脂糖凝胶进行电泳，当溴酚蓝染料带跑至胶板超过 1/2 处结束电泳，紫外凝胶成像或蓝光切胶板下观察，待测样本和阳性对照样本的目的片段均应出现在约 1480 bp（16S rRNA 基因）、970 bp（gyrB 基因）处，同时，阴性对照应无条带。

A. 1. 3. 4 PCR 产物测序

取扩增后的 PCR 产物（A. 1. 3. 2）25 μL，加入 5 μL 上样缓冲溶液（A. 1. 1. 12），混匀后进行琼脂糖凝胶电泳（220 V，45 min）。在紫外分析仪下，根据样本的目的片段大小，将目的条带切下，用胶回收试剂盒（A. 1. 1. 15）回收，得到 30 μL 左右的纯化产物。纯化后的样本用循环测序试剂盒（A. 1. 1. 16）进行循环测序反应，反应体系见表 A. 5。PCR 仪进行扩增，扩增程序为：96℃，1 min；96℃，10 s；50℃，5 s（25 个循环）；60℃，4 min。扩增后产物采用乙醇沉淀法进行纯化：加入 1/10 体积的乙酸钠缓冲溶液（A. 1. 1. 8），再加入 2.5 倍体积预冷无水乙醇（A. 1. 1. 2），室温避光沉淀 15 min，4℃ 离心 30 min，70% 乙醇（A. 1. 1. 5）洗涤沉淀。沉淀干燥后，加入 10 μL 高度去离子甲酰胺（A. 1. 1. 3）溶解，混匀，于测序仪上进行 Sanger 法一代测序。

表 A. 5 反应体系

组 分	体 积
纯化 PCR 产物	1~3 μL（30~100 ng）
测序引物（10 μmol/L）	1 μL
循环测序预混液（BigDye Mix）	0.5~1 μL
5×测序缓冲液（5× Sequencing Buffer）	1~2 μL
灭菌水（ddH ₂ O）	补至 10 μL

A. 1. 3. 5 序列分析

16S rRNA 基因测序应满足峰图清晰，无重叠峰区域双端测序拼接后碱基数应不低于 1320 bp，与 DNA 序列数据库中收录的 *Bacillus velezensis* strain MFYC06X 的 16S rRNA（Sequence ID: OK147638.1）序列比对，一致性（identity）值≥99.5%。

gyrB 基因测序应满足峰图清晰，无重叠峰区域双端测序拼接或单端测序后碱基数应不低于 800 bp，与 DNA 序列数据库中收录的 *Bacillus velezensis* strain LPL-K103 序列（Sequence ID: CP039380.1）的一致性（identity）值≥99.5%。

A. 2 贝莱斯芽孢杆菌（CGMCC 24752）的 16S rRNA 基因和 gyrB 基因序列

A. 2. 1 16S rRNA（1421 bp）

```
TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGATAACTCCGGAAACCAGGGCTAATAC
CGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTCAGACATAAAAGGTGGCTCGGCTACCAAGGCGACGA
CAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGA
TGCCTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA
```

ACGCCCGTGAGTGTAGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTAGGGAAGAAC
AGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTATTGGGC
GTAAAGGGCTCGCAGGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCGGG
GAGGGTCATTGAAACTGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGATTCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGTTCCGCCCCTAGTG
CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATCGAAC
GCGAACGAAACCTTACCAAGGTCTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCC
TTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTT
GGGTTAAGTCCCACGAGCGAACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGC
ACTCTAAGGTGACTGCCGGTACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCAT
CATGCCCTTATGACCTGGCTACACACGTCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCG
AAACCGCAGGTTAACCCAATCCCACAAATCTGTTCTAGTCGGATCGCAGTCTGCA
ACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGGGATCAGCATGCCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTACACCACGAGAGTTGTAACACCCGAA
GTCGGTGAGGTAACTTATGGAGCCAGCCGCCGAA

A. 2.2 *gyrB* (897 bp)

CACTCTGACGTTACGGTCATCGTACGGAAAAATCCACTATCAGGCGTACGAGCGC
GGTGTACCTGTGGCCGATCTGAAGTGATCGGTGATAACTGATAAGACCGGAACGATTAC
GCACTTCGTTCCGGATCCGGAAATCTCAAAGAAACAACCGTACCGACTATGATCTGC
TTTCAAACCGTGTCCGGAAATTGGCCTTCTGACAAAAGCGTAAACATCACGATTGA
AGACAAACGTGAAGGACAAGAACGGAAAAACGAGTACCAACTACGAAGGCGGAATCA
AAAGCTATGTTGAGTACTTAAACCGTCCAAAGAACGTTCATGAAGAGCCGATTAT
ATCGAAGGCGAGAAAGACGGATAACGGTTGAAGTTGCATTGCAATACAACGACAGCT
ATACAAGCAATATTATTCTTCACGAATAATATCAACACATACGAAGGCGGCACGCAC
GAGGCCGGATTAAAACCGGTCTGACCCGTGTCAAACGACTATGCAAGAAGAAAA
GGGATTTCAAAGAAAATGATCCGAATTAAAGCGGGATGATGTGAGAGAACGGCTGA
CTGCCATTATTCAATTAAAGCACCCCTGATCCGCAATTGAAAGGGCAGACGAAACGAA
GCTCGGCAACTCCGAAGCGAGAACGATCACTGATACGCTTTCTCGCCTGGAA
ACATTCTTCTGAAAATCCGGACTCAGCCGCAAAATCGTTGAAAAGGTTAATGG
CCGCAAGAGCGCGGATGGCAGCGAAAAAGCACGGGAATTGACCCGGCGAAAGT
GCGCTGAGATTCCAATCTGCCGGCAAACGGACTGTTCTAAAGATCCGA
GCATTCCGAGCTGTATCGTAGAGGG

附录 B
(规范性)
贝莱斯芽孢杆菌活菌数检测方法

B. 1 原理

试样经无菌生理盐水提取、稀释， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h，根据稀释倍数，计算试样中贝莱斯芽孢杆菌活菌数。

B. 2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。玻璃器皿及与样品溶液直接接触的器具均应无菌。

B. 2. 1 水：GB/T 6682，一级。

B. 2. 2 无菌生理盐水：称取氯化钠 8.5 g，用水溶解并定容至 1000 mL，分装适宜容器或每管 9 mL， 121°C 高压灭菌 15 min。

B. 2. 3 LB 固体培养基的制备：

琼脂	15 g
胰蛋白胨	10 g
酵母浸粉	5 g
氯化钠	10 g
pH	7.0
水	1 L

上述各成分溶解于水中，必要时加热溶解。 121°C 灭菌 30 min，温度降至 50℃左右，取 15 mL 倾入平皿中，自然晾干，然后置于培养箱中 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h，确认无污染后备用。

B. 3 仪器设备

B. 3. 1 分析天平：感量 0.1 mg。

B. 3. 2 生化培养箱：控温精度为 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

B. 3. 3 恒温水浴振荡器：控温精度为 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

B. 3. 4 涡旋混合器。

B. 3. 5 立式压力蒸汽灭菌锅。

B. 3. 6 pH 计。

B. 3. 7 无菌吸量管：0.1 mL、0.5 mL、1 mL、5 mL，或微量移液器。

B. 3. 8 无菌培养皿。

B. 4 试验步骤

B. 4. 1 试样溶液制备

称取 10 g 试样，精确至 0.1 mg，置于 250 mL 无菌锥形瓶，加入 90 mL 无菌生理盐水（B. 2. 2），置于 25°C 恒温水浴振荡器，170 r/min 振荡 30 min，制成 1:10 菌悬液。准确移取 1:10 菌悬液 1.0 mL，加入装有 9.0 mL 无菌生理盐水（B. 2. 2）的试管中，在涡旋混合器上混匀，制成 1:100 稀释菌液，同法制成适宜稀释级的系列稀释菌液。

B. 4. 2 培养

准确移取 3 个适宜稀释级的稀释菌液 0.1 mL，分别接种至 LB 固体培养基（B. 2. 3）平皿，使用涂布棒尽可能小心快速地涂布接种液于平皿表面，涂布棒不得接触平皿边缘。每个

平皿用一支无菌涂布棒。每个稀释级做两个平皿。同时，分别吸取 0.1 mL 无菌生理盐水（B. 2. 2）至两个 LB 固体培养基（B. 2. 3）平皿，作稀释剂空白对照。涂布好的平皿盖好，置室温中放置 15 min，使接种物完全被琼脂吸收，将平皿倒置于 36℃±1℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后，计数。

B. 4. 3 菌落计数

B. 4. 3. 1 可用肉眼观察，必要时用放大镜或菌落计数器，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位（colony forming unit, CFU）表示。

B. 4. 3. 2 通常选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平皿计数菌落总数。低于 30 CFU 的平皿记录具体菌落数，大于 300 CFU 的可记录为多不可计。

B. 4. 3. 3 其中一个平皿有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无较大片状菌落生长的平皿作为该稀释级的菌落数；若片状菌落不到平皿的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，可计算半个平皿后乘以 2，代表一个平皿菌落数。

B. 4. 3. 4 当平皿上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

B. 5 试验数据处理

B. 5. 1 若只有一个稀释级平皿上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平皿菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释因子，作为每克试样中活菌数结果。

B. 5. 2 若有两个连续稀释级的平皿菌落数在适宜计数范围内时，按式（B.1）计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2) \times d} \quad \text{.....(B.1)}$$

式中：

N ——试样中贝莱斯芽孢杆菌活菌数，单位为 CFU/g；

$\sum C$ ——平皿（含适宜范围菌落数的平皿）菌落数之和；

n_1 ——第一稀释级（低稀释倍数）平皿个数；

n_2 ——第二稀释级（高稀释倍数）平皿个数；

d ——稀释因子（第一稀释级）。

B. 5. 3 若所有稀释级的平皿上菌落数均大于 300 CFU，则对稀释级最高的平皿进行计数，其他平皿可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

B. 5. 4 若所有稀释级的平皿菌落数均小于 30 CFU，则应按稀释级最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

B. 5. 5 若所有稀释级平皿均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

B. 5. 6 若所有稀释级的平皿菌落数均不在 30 CFU~300 CFU 之间，其中一部分小于 30 CFU 或大于 300 CFU 时，则以最接近 30 CFU 或 300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

B. 5. 7 采用两位有效数字，在两位有效数字后面的数值，以四舍五入方法修约，以 10 的指数表示。根据菌落计数结果出具报告，报告单位以菌落形成单位每克（CFU/g）表示。

附录 C
(规范性)
产品使用说明书

【新产品证书号】**【生产许可证号】****【产品批准文号】****【执行标准】**

饲料添加剂 贝莱斯芽孢杆菌 (CGMCC 24752)
使用说明书

【产品名称】贝莱斯芽孢杆菌 (CGMCC 24752)**【英文名称】***Bacillus velezensis* (CGMCC 24752)**【有效成分】**贝莱斯芽孢杆菌**【性状】**浅黄褐色，流动性好，颗粒大小均匀，具有该产品的特殊气味。**【产品成分分析保证值】**

项 目	指 标
贝莱斯芽孢杆菌活菌数/ (CFU/g)	$\geq 2.0 \times 10^{11}$
水分/%	≤ 8.0
粒度 (0.425 mm 孔径试验筛通过率) /%	≥ 90
总砷 (以 As 计) / (mg/kg)	≤ 2.0
铅/ (mg/kg)	≤ 5.0
汞/ (mg/kg)	≤ 0.1
镉/ (mg/kg)	≤ 0.5
黄曲霉毒素 B ₁ / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	≤ 10.0
玉米赤霉烯酮/ (mg/kg)	≤ 0.1
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 中)	不得检出

【作用功效】提高生产性能，调节肠道菌群。**【适用范围】**肉仔鸡**【用法与用量】**在肉仔鸡配合饲料中的推荐添加量为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ CFU/g。**【注意事项】****【贮运】**应贮存于干燥、阴凉、通风处，运输中防止日晒、雨淋，不应与有毒有害物质混贮、混运。**【净含量】****【保质期】**24 个月**【生产企业】**

地址

邮编

电话

传真

网址

邮箱

附录 D
(规范性)
产品标签

【新产品证书号】

【生产许可证号】

【产品批准文号】

【执行标准】

饲料添加剂 贝莱斯芽孢杆菌 (CGMCC 24752)
Bacillus velezensis (CGMCC 24752)

【产品名称】贝莱斯芽孢杆菌 (CGMCC 24752)

【产品成分分析保证值】

项 目	指 标
贝莱斯芽孢杆菌活菌数/ (CFU/g)	$\geq 2.0 \times 10^{11}$
水分/%	≤ 8.0
粒度 (0.425 mm 孔径试验筛通过率) /%	≥ 90
总砷 (以 As 计) / (mg/kg)	≤ 2.0
铅/ (mg/kg)	≤ 5.0
汞/ (mg/kg)	≤ 0.1
镉/ (mg/kg)	≤ 0.5
黄曲霉毒素 B ₁ / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	≤ 10.0
玉米赤霉烯酮/ (mg/kg)	≤ 0.1
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 中)	不得检出

【有效成分】贝莱斯芽孢杆菌 (CGMCC 24752)

【作用功效】提高生产性能，调节肠道菌群。

【适用范围】肉仔鸡

【用法与用量】在肉仔鸡配合饲料中的推荐添加量为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ CFU/g。

【注意事项】

【贮 运】应贮存于干燥、阴凉、通风处，运输中防止日晒、雨淋，不应与有毒有害物质混贮、混运。

【净含量】

【保质期】24 个月

【生产企业】

生产/注册地址

邮编

电话

传真

【生产日期】

【生产批号】