

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2131—2025

代替 NY/T 2131—2012

饲料添加剂 枯草芽孢杆菌

Feed additives—*Bacillus subtilis*

2025-12-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布





## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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

- a) 更改了对菌种的要求(见 4.1,2012 年版的 4.1)；
- b) 增加了对载体的要求(见 4.2)；
- c) 更改了对粒度试验筛的孔径要求(见表 1,2012 年版的 4.4)；
- d) 更改了水分指标要求(见表 1,2012 年版的 4.3)；
- e) 删除卫生指标“志贺氏菌及金黄色葡萄球菌”(见表 2,2012 年版的表 2)；
- f) 更改了卫生指标“黄曲霉毒素”的适用产品(见表 2,2012 年版的表 2)；
- g) 增加微生物取样标准(见第 5 章,2012 年版的 5.1)；
- h) 增加了枯草芽孢杆菌菌种鉴定方法(见 6.3)；
- i) 更改了黄曲霉毒素 B1 检测方法(见 6.10,2012 年版的 5.6.1)；
- j) 增加了组批要求(见 7.1)；
- k) 删除了出厂检验中的粒度(见 7.2,2012 年版的 6.1)；
- l) 更改了需要型式检验时的情况(见 7.3,2012 年版的 6.2)；
- m) 增加了除微生物之外各指标的极限数值判定执行标准(见 7.4.3)；
- n) 更改了保质期要求(见 8.5,2012 年版的 8.5)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本文件起草单位：广东省科学院微生物研究所(广东省微生物分析检测中心)。

本文件主要起草人：羊宋贞、刘阳、冯广达、郑湘玲、章俊、陆雪影、李燕旋、陈艳、段锦梅、陈清莹、武明明、王永红、朱红惠。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2012 年首次发布为 NY/T 2131—2012；

——本次为第一次修订。



# 饲料添加剂 枯草芽孢杆菌

## 1 范围

本文件规定了饲料添加剂枯草芽孢杆菌的技术要求、取样、检验规则、标签、包装、运输、储存和保质期,描述了相应的试验方法。

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

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- GB/T 5917.1 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法
- GB/T 6435 饲料中水分的测定
- GB/T 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 13078 饲料卫生标准
- GB/T 13079 饲料中总砷的测定
- GB/T 13080 饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
- GB/T 13081 饲料中汞的测定
- GB/T 13082 饲料中镉的测定
- GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定
- GB/T 13092 饲料中霉菌总数测定方法
- GB/T 14699 饲料 采样
- GB/T 18869 饲料中大肠菌群的测定
- GB/T 26428 饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测
- GB/T 42959 饲料微生物检验 采样
- NY/T 2071 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**枯草芽孢杆菌** *Bacillus subtilis*

属于芽孢杆菌科芽孢杆菌属,为革兰氏阳性杆菌。单个细胞大小为 $(0.7\sim 0.8)\mu\text{m}\times(2\sim 3)\mu\text{m}$ ;有芽孢,芽孢呈椭圆形至柱形,中生或近中生。

## 4 技术要求

### 4.1 菌种

应符合附录 A 中枯草芽孢杆菌的形态、生理生化特性,必要时进行分子生物学鉴定(A.3.4)。

### 4.2 载体

来源于《饲料原料目录》和(或)《饲料添加剂品种目录》所列品种,并符合 GB 13078 及相关标准要求。

### 4.3 外观与性状

粉末或颗粒,色泽均匀、形态一致,无异物,无异臭味。

### 4.4 质量指标

应符合表 1 的要求。

表 1 质量指标

项目	指标
枯草芽孢杆菌活菌数,CFU/g	$\geq 1.0 \times 10^9$
粒度(0.85mm 试验筛通过率,%)	100
水分,%	$\leq 10$
注:粒度指标仅适用于粉状产品。	

### 4.5 卫生指标

应符合表 2 的要求。

表 2 卫生指标

项目	指标
总砷(以 As 计),mg/kg	$\leq 2$
铅(以 Pb 计),mg/kg	$\leq 5$
汞(以 Hg 计),mg/kg	$\leq 0.1$
镉(以 Cd 计),mg/kg	$\leq 0.5$
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> <sup>*</sup> , $\mu\text{g}/\text{kg}$	$\leq 10$
霉菌总数,CFU/g	$\leq 2.0 \times 10^4$
大肠菌群,MPN/100 g	$\leq 1.0 \times 10^4$
沙门氏菌,25 g	不得检出
注 1:除微生物指标外,表中所列允许量均以干物质含量为 88% 计算;。	
注 2: <sup>*</sup> 指标仅适用于植物性载体生产的产品。	

## 5 取样

以微生物检验为目的的取样按照 GB/T 42959 的规定执行,以其他指标检验为目的的取样按照 GB/T 14699 的规定执行。

## 6 试验方法

### 6.1 外观与性状

取适量样品于白色背景中,在自然光线下观察其色泽、状态,嗅其气味。

### 6.2 枯草芽孢杆菌活菌数计数

按 GB/T 26428 的规定执行。

### 6.3 枯草芽孢杆菌菌种鉴定

按附录 A 的规定执行。

### 6.4 粒度

按 GB/T 5917.1 的规定执行。

### 6.5 水分

按 GB/T 6435 的规定执行。

### 6.6 总砷

按 GB/T 13079 的规定执行。

### 6.7 铅

按 GB/T 13080 的规定执行。

### 6.8 汞

按 GB/T 13081 的规定执行。

#### 6.9 镉

按 GB/T 13082 的规定执行。

#### 6.10 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>

按 NY/T 2071 的规定执行。

#### 6.11 霉菌总数

按 GB/T 13092 的规定执行。

#### 6.12 大肠菌群

按 GB/T 18869 的规定执行。

#### 6.13 沙门氏菌

按 GB/T 13091 的规定执行。

### 7 检验规则

#### 7.1 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,但每批产品应不超过 50 t。

#### 7.2 出厂检验

出厂检验项目为外观与性状、水分及枯草芽孢杆菌活菌数。

#### 7.3 型式检验

型式检验项目为 4.3~4.5 规定的所有项目。在正常生产情况下,每半年至少进行 1 次型式检验。在有下列情况之一时,亦应进行型式检验:

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

#### 7.4 判定规则

7.4.1 所验项目全部合格,判定为该批次产品合格。

7.4.2 检验结果中有任何指标不符合本文件规定时,可自同批产品中重新加倍取样进行复检。复检结果即使有一项指标不符合本文件规定,则判定该批产品不合格。卫生指标中的微生物指标不得复检。

7.4.3 除微生物指标外,各项目指标的极限数值判定按 GB/T 8170 中全数值比较法的规定执行。

### 8 标签、包装、运输、储存和保质期

#### 8.1 标签

按 GB 10648 的规定执行。

#### 8.2 包装

包装材料应无毒、无害、防潮。

#### 8.3 运输

运输中防止包装破损、日晒、高温、雨淋,不得与有毒有害物质混运。

#### 8.4 储存

通风、干燥处存放,防晒、防雨淋,不得与有毒有害的物质混储。

#### 8.5 保质期

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

附 录 A  
(规范性)  
枯草芽孢杆菌菌种鉴定

A.1 试剂或材料

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

A.2 仪器设备

- A.2.1 PCR 仪。
- A.2.2 电泳仪。
- A.2.3 凝胶分析成像系统。
- A.2.4 超净工作台。
- A.2.5 小型离心机。
- A.2.6 微量可调移液器(量程分别为 2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)。

A.3 试验步骤

A.3.1 菌种纯化

自平板上挑取单菌落,划线转接培养于营养琼脂平板上,(36±1)°C 培养 16 h~24 h。从平板中选取至少 1 个分离良好的特征菌落,转接保存,进行确证试验。

A.3.2 形态观察

将纯化的菌落进行革兰氏染色镜检。枯草芽孢杆菌细胞应为杆状,有芽孢,芽孢椭圆形至柱形,中生或近中生,芽孢囊不明显膨大。

A.3.3 生理生化确证试验

将挑选纯化的菌落进行 7% NaCl 生长、V-P 测定、硝酸盐还原、D-甘露醇发酵和丙酸盐利用试验。枯

草芽孢杆菌与类似芽孢杆菌的鉴别特征见表 A. 1。

表 A. 1 枯草芽孢杆菌与其它类似芽孢杆菌的鉴别特征

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

注：+为阳性；-为阴性；+/-为部分菌株阳性。

### A. 3. 4 PCR 扩增验证

#### A. 3. 4. 1 待测菌株的准备

A. 3. 4. 1. 1 待测菌株纯度检测：经菌落培养确定为单一菌落、染色镜检观察菌体形态一致者，确定培养物符合要求。

A. 3. 4. 1. 2 待测菌株增菌培养：将纯度检验合格的菌株接种于营养琼脂培养基中，在 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下培养 16 h~24 h。

#### A. 3. 4. 2 待测菌株 DNA 的提取

可使用常规手工提取方法或商业化的细菌 DNA 提取试剂盒并按其说明提取制备模板 DNA。

#### A. 3. 4. 3 PCR 反应的质量控制

A. 3. 4. 3. 1 每个 PCR 反应均应设立两个平行实验。

A. 3. 4. 3. 2 应设置空白对照、阳性对照和阴性对照，空白对照的 PCR 反应体系中以水代替 DNA 模板，阳性对照使用与目标菌株同种的模式菌株或参比菌株的 DNA 为模板，阴性对照采用不含目标序列的 DNA 为模板。

#### A. 3. 4. 4 PCR 扩增

A. 3. 4. 4. 1 引物见表 A. 2。

表 A. 2 引物序列

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

A. 3. 4. 4. 2 PCR 反应体系见表 A. 3。

表 A. 3 每 25 $\mu\text{L}$  反应体积所含组分

成分	实际用量
10 $\times$ Buffer	2.50 $\mu\text{L}$
10.0 mmol/L dNTP	0.50 $\mu\text{L}$
2.5 U/ $\mu\text{L}$ Taq DNA 聚合酶	0.25 $\mu\text{L}$
上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.50 $\mu\text{L}$
下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.50 $\mu\text{L}$
DNA 模板	1.00 $\mu\text{L}$
无菌双蒸水	将反应体积补足至 25 $\mu\text{L}$

注：空白对照中应含有除模板核酸外的所有组分。

A.3.4.4.3 PCR反应参数:94℃预变性5 min;94℃变性30 s;61℃退火30 s;72℃延伸12 s,进行30个循环;72℃延伸10 min,4℃保存反应产物。

#### A.3.4.5 PCR扩增产物的电泳检测

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

#### A.3.4.6 结果判定

扩增片段与阳性对照菌株扩增结果一致(大小为183 bp),则目标菌为枯草芽孢杆菌。如有必要可按照A.3.4.7进行测序验证,与靶基因序列相似度高于90%可确定待测菌株为枯草芽孢杆菌。

出现以下情况之一,则判定本次鉴定的结果无效,应重新进行实验。

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

#### A.3.4.7 PCR扩增产物的测序验证

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

```
1  GTTTTTCTG TACTGGCTCA ACTGTTTGC GGTATAGATG ACTCTTACAC TTTGGGGAAT
61  TTATGGTTTT TAGGTGCTTT GGCGGGAATT ATAACCATGC TTGCTTCAAT CCAGACAAAT
121 AATAAACCAG TCTTCAGCAT ATTATTAATT GCTAGTTCAG TAATAGGTCT ACTTGGAAT
181 GGT
```

#### A.3.5 鉴定结果

符合以上形态、生理生化试验及PCR扩增验证结果,则可判为枯草芽孢杆菌。

参 考 文 献

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