

ICS 65.120
B 46



团体标准

T/ZZB 1406—2019

饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌

Microorganism feed additive-Bacillus licheniformis

2019 - 12 - 06 发布

2019 - 12 - 31 实施

浙江省品牌建设联合会 发布

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 基本要求 1

5 技术要求 2

6 试验方法 4

7 检验规则 6

8 标签、包装、运输和贮存 7

9 质量承诺 7

附 录 A （资料性附录） 8



前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准的某些内容可能涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由浙江省品牌建设联合会提出并归口管理。

本标准由浙江省标准化研究院牵头组织制定。

本标准主要起草单位：浙江惠嘉生物科技股份有限公司。

本标准参与起草单位：中国计量大学，浙江省标准化研究院（排名不分先后）。

本标准主要起草人：刘金松、杨彩梅、曹广添、曾新福、胡玉华、李慧、张玲玲、郝洪生、吕晓思。

本标准评审专家组长：廖上富。

本标准由浙江省标准化研究院负责解释。



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—地衣芽孢杆菌的术语和定义、基本要求、技术要求、试验方法、检验规则、标签、包装、运输和贮存、质量承诺等内容。

本标准适用于固态和液态的地衣芽孢杆菌饲料添加剂。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 191 包装储运图示标志
GB 4789.5 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验
GB 4789.10 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验
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 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 饲料中汞的测定方法
GB/T 13082 饲料中镉的测定方法
GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定
GB/T 13092 饲料中霉菌检验方法
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
GB/T 18869 饲料中大肠菌群的测定
GB 19541 饲料原料 豆粕
GB/T 23530 酵母抽提物
NY/T 119 饲用小麦麸
NY/T 1444 微生物饲料添加剂技术通则
NY/T 1461 饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌
国家质量监督检验检疫总局令第75号 定量包装商品计量监督管理办法

3 术语和定义

NY/T 1461界定的术语和定义适用于本文件。

4 基本要求

4.1 设计研发

4.1.1 应具备自主筛选、培育菌种和优化发酵工艺的设计研发能力。

4.1.2 具有省级以上或同等能力的研发团队。

4.2 原辅材料

4.2.1 豆粕

应符合GB 19541中一级品以上要求。

4.2.2 酵母抽提物

应符合GB/T 23530中纯品型要求。

4.2.3 麸皮

应符合NY/T 119中二级品以上要求。

4.3 工艺装备

4.3.1 应采用液体发酵和喷雾干燥的工艺。

4.3.2 应配备发酵后处理、喷雾干燥、震动过筛和包装环节的自动化生产线。液体发酵应采用自动控制系统（DCS）。

4.4 检验检测

应具备地衣芽孢杆菌含量、水分、粒度、重金属、总砷、微生物等项目的检验能力。

5 技术要求

5.1 微生物指标

5.1.1 菌体形态

5.1.1.1 染色：革兰氏染色为阳性。

5.1.1.2 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 $(0.6\sim0.8)\mu\text{m}\times(1.5\sim3.0)\mu\text{m}$ ，两端钝圆。有芽孢，芽孢近椭圆形，中生，大小为 $0.8\mu\text{m}\times1.3\mu\text{m}$ ，具有稀疏的周身鞭毛，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。

5.1.2 菌落形态

5.1.2.1 LB 营养琼脂培养基（Luria-Bertani Agar, LB）：菌落呈灰白色或乳白色，圆形或花瓣形。

5.1.2.2 营养琼脂培养基（Nutrients Agar, NA）：菌落呈杏仁白色，湿润有光泽，表面略有放射状条纹。

5.1.2.3 桑塔斯琼脂培养基（Sauton's Agar, SA）：菌落呈乳脂色，湿润有光泽，不透明，中央凸起。

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

5.1.3 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。

5.1.4 生理生化特征

地衣芽孢杆菌生理生化特征应符合表1的要求。

表1 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	+	酪氨酸分解	—
pH 5.5～8.7生长	+	牛奶凝固	—
厌氧洋葱生长	+	牛奶胨化	+
V - P试验	+	利用糖产酸	葡萄糖 +
卵黄反应	—		阿拉伯糖 +
接触酶反应	+		木糖 +
吡哌反应	—		甘露醇 +
注：+为阳性反应；—为阴性反应。			

5.2 感官指标

产品性状可分为固态和液态两类，应符合包装上标明的产品固有的形状、色泽和气味等，均匀程度、杂质等，无异臭味、无发霉变质，无异物。

5.3 理化指标

理化指标应符合表2的要求。

表2 理化指标

项目	指标
水分（固态菌剂），%	≤9.0
粒度（固态菌剂，孔径850 μm试验筛通过率），%	≥95.0
地衣芽孢杆菌菌数，cfu/（g或mL）	≥1.0×10 ¹¹

5.4 卫生指标

卫生指标应符合表3的要求。

表3 卫生指标

项目	指标
黄曲霉毒素B ₁ ，μg/kg	≤10.0
砷（以As计）的允许量，mg/kg	≤2.0

表3 （续）

项目	指标
铅（以Pb计）的允许量，mg/kg	≤ 5.0
汞（以Hg计）的允许量，mg/kg	≤ 0.1
镉（以Cd计）的允许量，mg/kg	≤ 0.5
杂菌率，%	≤ 0.1
霉菌总数的允许量，cfu/（g或mL）	$< 2.0 \times 10^4$
大肠菌群的允许量，cfu/（100 g或100 mL）	≤ 400
沙门氏菌	不得检出
志贺氏菌	不得检出
金黄色葡萄球菌	不得检出

5.5 净含量允差

净含量允差应符合原国家质量监督检验检疫总局第75号令。

6 试验方法

6.1 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测。

6.2 感官检验

取适量样品（固态250 g，液态250 mL）于无色玻璃杯中进行感官检验，观察、嗅闻或触摸。

6.3 水分测定

按GB/T 6435规定执行。

6.4 粒度检测（固态菌剂）

按GB/T 5917.1规定执行。

6.5 地衣芽孢杆菌检测

6.5.1 菌体形态检验：

6.5.1.1 染色：革兰氏染色和芽孢染色。

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

6.5.2 菌落特性检验：

在LB营养琼脂、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。

6.5.3 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。

6.5.4 活菌计数

6.5.4.1 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，凝固后倒置培养 24 h，进行菌落计数。

6.5.4.2 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。

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

6.5.4.4 计算公式见（1）、（2）：

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

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

6.6 卫生检验

6.6.1 黄曲霉素 B₁ 检验

按GB/T 17480规定执行。

6.6.2 砷含量测定

按GB/T 13079规定执行。

6.6.3 铅含量测定

按GB/T 13080规定执行。

6.6.4 汞含量测定

按GB/T 13081规定执行。

6.6.5 镉含量测定

按GB/T 13082规定执行。

6.6.6 霉菌检测

按GB/T 13092规定执行。

6.6.7 大肠菌群检测

按GB/T 18869规定执行。

6.6.8 沙门氏菌检测

按GB/T 13091规定执行。

6.6.9 志贺氏菌检测

按GB 4789. 5规定执行。

6.6.10 金黄色葡萄球菌检测

按GB 4789. 10规定执行。

6.7 净含量允差

按原国家质量监督检验检疫总局第75号令执行。

7 检验规则

7.1 检验分类

7.1.1 检验类型

分为出厂检验和型式检验。

7.1.2 出厂检验

出厂检验项目见表4。

表4 检验项目

序号	检验项目	检验类型		技术要求	试验方法
		出厂检验	型式检验		
1	微生物指标	--	√	5.1	6.5.1、6.5.2、6.5.3
2	感官指标	√	√	5.2	6.2
3	水分	√	√	5.3	6.3
4	粒度	√	√	5.3	6.4
5	地衣芽孢杆菌活菌数	√	√	5.3	6.5.4
6	杂菌率	√	√	5.4	6.5.4
7	黄曲霉素B ₁	--	√	5.4	6.6.1
8	砷(As)	√	√	5.4	6.6.2
9	铅(以Pb计)	√	√	5.4	6.6.3
10	汞(Hg)	√	√	5.4	6.6.4
11	镉(Cd)	√	√	5.4	6.6.5
12	霉菌总数	√	√	5.4	6.6.6
13	大肠菌群	√	√	5.4	6.6.7
14	沙门氏菌	--	√	5.4	6.6.8
15	志贺氏菌	--	√	5.4	6.6.9
16	金黄色葡萄球菌	--	√	5.4	6.6.10
17	净含量允差	√	√	5.5	6.7
注：大肠菌群、铅和砷每2个月进行定期检验。					

7.1.3 型式检验

一般情况下，企业半年进行一次型式检验，型式检验项目见表4。但有下列情况之一时，应进行型式检验，且生产用地衣芽孢杆菌菌种需送至有资质机构进行菌种鉴定：

- a) 当产品的原料、工艺设备有大的改变，可能影响产品质量时；
- b) 产品停产 3 个月以上，恢复生产时；
- c) 出厂检验结果与上次型式检验有较大差异时；
- d) 当用户对产品质量有较大异议时；
- e) 当国家产品质量监督管理机构提出要求时。

7.2 组批与抽样

7.2.1 组批：在同一混合机同时混合的，或同一罐由同一喷雾干燥塔喷雾出来的，包装完好的产品确定为一个批次。

7.2.2 抽样按 GB/T 14699. 1 规定进行。

7.3 判定规则

7.3.1 检验结果有一项指标不符合本标准时，应重新加倍抽样，进行复检。复检结果有一项指标不符合标准，则判定整批产品为不合格产品。

7.3.2 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、运输和贮存

8.1 标签

8.1.1 采用鲜明的标签贴于外包装。

8.1.2 标签内容应按 GB 10648 规定执行。

8.2 包装

8.2.1 包装图示标志应符合 GB/T 191 的规定，包装完整，标签等资料齐全。

8.2.2 包装材料应采用符合国家相关标准的、无毒包装材料，宜采用铝箔袋、纸塑复合袋或聚氧乙烯复合袋，并装入双层防潮纸箱。

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。搬运卸载时小心轻放，不得倒置，不得与有毒物质混装、混运。

8.4 贮存

贮存应严格按照分类要求，各品种依次堆放，不得和有毒、有害物质一起堆放，严防污染。产品应密闭，在干燥、阴凉、通风处存放，避免直接日晒，防止长时间35℃以上高温。

9 质量承诺

9.1 在规定的包装、贮存条件下，自生产之日起原包装保存，产品保质期不低于 24 个月。

9.2 收到客户反馈时，应在 24 h 内予以响应，48 h 为用户提供解决方案。

附 录 A
(资料性附录)

A.1 LB营养琼脂培养基 (Luria-Bertani)

胰蛋白胨10.0 g, 酵母浸出粉5.0 g, 氯化钠10.0 g, 琼脂15.0 g, 蒸馏水1.0 L, pH 7.0~7.2。

A.2 营养琼脂培养基 (Nutrients Agar)

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, pH 7.0。

A.3 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pH 7.4, 并将液体补足1.0 L, 琼脂15.0 g。

A.4 桑塔斯琼脂培养基 (Sauton' S Agar)

蛋白胨20.0 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.5g, $MgSO_4$ 0.73g, 甘油15.0 mL, 琼脂15.0 g, 蒸馏水1.0 L, pH 7.0。