

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—20XX

饲料添加剂 丁酸梭菌

Feed additives—*Clostridium butyicum*

(公开征求意见稿)

20XX - XX - XX 发布

20XX - XX - XX 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这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

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：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、浙江惠嘉生物科技股份有限公司、山东宝来利来生物工程股份有限公司、河南金百合生物科技股份有限公司、大连三仪动物药品有限公司。

本文件起草人：饶正华、曾新福、谷巍、李克克、江国托、张军民、刘金松、梁泓源、陆唯、焦京琳、高思淇、刘娜、徐海燕、谢秀兰。

# 饲料添加剂 丁酸梭菌

## 1 范围

本文件规定了饲料添加剂丁酸梭菌的定义、技术要求、取样、试验方法、检验规则、标签、包装、运输、贮存和保质期。

本文件适用于以丁酸梭菌为菌种,经深层液体发酵、干燥工艺生产的饲料添加剂丁酸梭菌固态产品。

## 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 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 饲料中镉的测定方法

GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定

GB/T 13092 饲料中霉菌总数的测定

GB/T 18869 饲料中大肠菌群的测定

GB/T 30956 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

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

## 丁酸梭菌 *Clostridium butyricum*

酪酸菌、丁酸梭状芽孢杆菌

直或微弯的杆菌，（0.6 $\mu$ m~1.2 $\mu$ m） $\times$ （3.0 $\mu$ m~7.0 $\mu$ m），端圆；单个、成对、短链、偶见长丝状菌体。以周生鞭毛运动。孢子卵圆，偏心到次端生，无孢子外壁和附属丝。革兰氏阳性，在老培养物中变成阴性。

### 4 技术要求

#### 4.1 外观与性状

产品颜色为类白色、浅灰色、灰褐色或淡黄色，流动性和均匀度好，无结块，无异物，无霉变，有丁酸梭菌的特殊气味，无异味。

#### 4.2 菌种鉴别

应符合丁酸梭菌的形态、生理生化和分子生物学特性。

#### 4.3 质量指标

应符合表 1 的要求。

表 1 质量指标

项 目	指 标
丁酸梭菌活菌数/（CFU/g）	$\geq 1.0 \times 10^8$
水分/%	$\leq 10.0$

#### 4.4 卫生指标

应符合表 2 的要求。

表 2 卫生指标

项 目	指 标
总砷/（mg/kg）	$\leq 2.0$
铅/（mg/kg）	$\leq 5.0$
汞/（mg/kg）	$\leq 0.1$
镉/（mg/kg）	$\leq 0.5$
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> <sup>a/</sup> （ $\mu$ g/kg）	$\leq 10.0$
玉米赤霉烯酮 <sup>a/</sup> （mg/kg）	$\leq 0.5$
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 <sup>a/</sup> （mg/kg）	$\leq 2.0$
霉菌总数/（CFU/g）	$\leq 2.0 \times 10^4$
大肠菌群/（MPN/100g）	$\leq 1.0 \times 10^3$

沙门氏菌/（25g）	不得检出
<sup>a</sup> 此类指标仅适用于植物性载体生产的产品。	

## 5 取样

### 5.1 取样原则

样品的采集应遵循随机性、代表性的原则。取样过程应遵循无菌操作程序，防止一切可能的外来污染。

### 5.2 取样方法

5.2.1 应在同一批次产品中采集样品，每件样品的取样量应满足微生物指标检验的要求，一般不少于 500 g。

5.2.2 独立包装不大于 500 g 的产品，取完整包装。

5.2.3 独立包装大于 500 g 的产品，应用无菌取样器从同一包装的不同部位分别采取适量样品，放入同一个无菌取样容器内作为一件样品。

### 5.3 采集样品的贮存和运输

5.3.1 应尽快将样品送往实验室检验。

5.3.2 应在运输过程中保持样品完整。

5.3.3 应在接近原有贮存温度条件下运输及贮存样品，或采取必要措施防止样品中微生物数量的变化。

## 6 试验方法

### 6.1 外观与性状

取适量试样于无色玻璃杯中，在自然光线下对颜色和状态进行目测检查，对气味进行嗅觉检查。

### 6.2 丁酸梭菌活菌计数

按附录 A 执行。

### 6.3 菌种鉴别

按附录 B 执行。

### 6.4 水分

按 GB/T 6435 规定执行。

### 6.5 总砷

按 GB/T 13079 规定执行。

### 6.6 铅

按 GB/T 13080 规定执行。

### 6.7 汞

按 GB/T 13081 规定执行。

#### 6.8 镉

按 GB/T 13082 规定执行。

#### 6.9 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮

按 NY/T 2071 规定执行。

#### 6.10 脱氧雪腐镰刀菌烯醇

按 GB/T 30956 规定执行。

#### 6.17 霉菌总数

按 GB/T 13092 规定执行。

#### 6.11 大肠菌群

按 GB/T 18869 规定执行。

#### 6.12 沙门氏菌

按 GB/T 13091 规定执行。

### 7 检验规则

#### 7.1 组批

以相同菌株、相同的发酵工艺、相同生产条件、连续生产或同一班次生产的产品为一批，但每批产品不得超过5 t。

#### 7.2 出厂检验

出厂检验项目为外观与性状、水分、丁酸梭菌活菌数。

#### 7.3 型式检验

型式检验项目为本文件第 4 章规定的所有项目，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、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标准规定时，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标准规定，则判定该批产品不合格。微生物指标不复检。

7.4.3 各项目指标的极限数值判定按 GB/T 8170 修约值比较法执行。

## 8 标签、包装、运输、贮存、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，禁止与有毒有害物质共运。

### 8.4 贮存

阴凉贮存，仓库应通风、干燥、能防暴晒、防雨淋，有防虫、防鼠设施，不得与有毒有害的物质混贮。

### 8.5 保质期

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。

**附录A**  
**(资料性)**  
**丁酸梭菌活菌计数**

### A.1 试剂和材料

A.1.1 除非另有说明，在分析中仅适用确认为分析纯的实际，水符合 GB/T 6682 中三级水的要求。

#### A.1.2 亚硫酸铁琼脂 (Ferric sulfite Agar)

称取胰蛋白胨 15.0 g，大豆蛋白胨 5.0 g，酵母粉 5.0 g，偏重亚硫酸钠 1.0 g，柠檬酸铁铵 1.0 g，琼脂 20.0 g，加入 1000 mL 蒸馏水加热煮沸至完全溶解后，用 1 mol/L 盐酸溶液或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至  $7.6 \pm 0.2$ ，121°C 高压灭菌 15 min，冷却至 50°C 左右备用。商品培养基按使用说明配制。

#### A.1.3 1 mol/L 盐酸溶液

量取 83.3 mL 的 12 mol/L 浓盐酸，用水溶解定容至 1 L，得到浓度为 1 mol/L 的盐酸溶液。

#### A.1.4 1 mol/L 氢氧化钠溶液

称取 40.0 g 氢氧化钠，用水溶解定容至 1 L，得到浓度为 1 mol/L 的氢氧化钠溶液。

#### A.1.5 0.85% 生理盐水

称取 0.85 g 氯化钠，加少量蒸馏水溶解，倒入 100 mL 容量瓶里定容，121°C 高压灭菌 15 min。

#### A.1.6 革兰氏染色液

商品革兰氏染色液按使用说明使用。

##### A.1.6.1 结晶紫染色液

将 1.0 g 结晶紫完全溶解于 20.0 mL 95% 乙醇中，然后与 80.0 mL 1% 草酸铵溶液混合配成结晶紫染色液，过滤备用。

##### A.1.6.2 革兰氏碘液

将 1.0 g 碘与 2.0 g 碘化钾混合后，加入少许蒸馏水充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 mL，配成革兰氏碘液。

##### A.1.6.3 沙黄复染液

将 0.25 g 沙黄溶解于 10.0 mL 95% 乙醇中，然后用 90.0 mL 蒸馏水稀释，配成沙黄复染液。

### A.2 仪器设备和器具

A.2.1 天平：感量为 0.01 g；

A.2.2 pH 计：精度 0.01；

A.2.3 振荡摇床：转速范围满足 220 r/min；

A.2.4 拍击式均质器：拍击式；

A.2.5 厌氧装置：厌氧盒或厌氧袋（配厌氧包）、厌氧箱或厌氧罐；

A.2.6 恒温培养箱：使用温度为  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ；

A.2.7 高压灭菌锅：使用温度为  $121^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ；

A.2.8 吸管：容量为 1 mL、10 mL 或相当规格的移液器；

A.2.9 广口瓶或三角瓶：容量为 500 mL；

A.2.10 平皿：直径为 90 mm；

A.2.11 试管：15 mm×180 mm、18 mm×180 mm。

### A.3 试验步骤

无菌条件下称取试样 10 g，加入装有 90 mL 0.85% 灭菌生理盐水的均质袋中，然后用均质器拍打 2 min~3 min，制成 1:10 稀释液。

用无菌吸管或微量移液器移取上述 1:10 稀释液 1 mL，注入含有 9 mL 0.85% 灭菌生理盐水的试管中，充分混匀后，制成 1:100 稀释液。按上述操作方法，10 倍递增稀释制备系列样品稀释液，每递增稀释一次换用 1 次 1 mL 无菌吸管或吸头。选择 3 个适宜稀释度，用吸管或微量移液器移取 1 mL 稀释液于灭菌平皿内，每个稀释度做三个平皿，同时吸取 1 mL 0.85% 灭菌生理盐水作空白对照。及时将凉至  $50^{\circ}\text{C}$  左右的亚硫酸铁琼脂注入平皿中，小心转动培养基使试样与培养基充分混匀。待培养基凝固后，将平皿倒置放入厌氧装置中， $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 16 h~24 h，观察菌落形态并计数。

### A.4 确证试验

选择菌落数在 30 个~300 个之间的平皿，从中选出 5 个特征菌落进行确证试验。生理生化特征（见 B.1）和分子生物学鉴定（B.2）。

### A.5 试验数据处理

根据菌落计数结果和证实为丁酸梭菌的菌落数，计算出平皿内的菌数，然后乘其稀释倍数即得每克样品中此菌数，计算公式按公式（1）。

$$A = B \times \frac{C}{5} \times f \dots\dots\dots(1)$$

式中：A—测定的丁酸梭菌菌落数，CFU/g；

B—疑似丁酸梭菌的菌落数；

C—5 个鉴定的菌落中确认为丁酸梭菌的菌落数；

f—稀释倍数。

**附录B**  
**(资料性)**  
**菌种鉴定**

**B.1 生理生化特征**

丁酸梭菌的生理生化特征见表 B.1。

**表 B.1 丁酸梭菌生理生化特征**

特 征	结 果	特 征	结 果
淀粉水解	+	山梨醇产酸	-
明胶液化	-	鼠李糖产酸	-
葡萄糖产酸	+	蜜二糖产酸	+
乳糖产酸	+	核糖产酸	+
木糖产酸	+	棉籽糖产酸	+
蔗糖产酸	+	水杨苷产酸	+

注：“+”表示试验结果为阳性；“-”表示试验结果为阴性。

**B.2 分子生物学鉴定**

利用商品化试剂盒对丁酸梭菌纯培养物提取DNA，作为模板。以 16S rRNA 基因的通用引物(见表 B.2)，进行PCR扩增、纯化和测序，用NCBI中的GeneBank数据库进行序列比对，评价其与模式菌株(ATCC 19398)的序列相似性，以 99%为阈值，判定其属种。

**表B.2 引物序列**

靶基因名称	扩增引物序列	测序引物序列
16S rRNA	27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	同扩增引物
	1492R: TACGACTTAACCCCAATCGC	

# 中华人民共和国农业行业标准

## 《饲料添加剂 丁酸梭菌》编制说明 (公开征求意见稿)

承担单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

浙江惠嘉生物科技股份有限公司

山东宝来利来生物工程股份有限公司

河南金百合生物科技股份有限公司

大连三仪动物药品有限公司

二〇二一年十一月

# 目 录

一、标准制定背景及任务来源.....	1
(一) 任务来源.....	1
(二) 立项理由.....	1
(三) 国内外产业状况.....	3
(四) 主要生产工艺.....	3
(五) 产品情况.....	4
二、主要工作过程.....	5
(一) 确定编制小组, 搜集样品和资料.....	5
(二) 确定技术路线, 进行实验.....	5
(三) 起草小组编制、内部讨论和修改完善.....	5
(四) 实验验证.....	5
(五) 定向征求意见.....	6
(六) 对反馈意见进行修改完善.....	6
(七) 申请预审.....	6
(八) 通过预审.....	6
三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....	6
(一) 标准编制原则.....	6
(二) 主要技术路线.....	6
(三) 主要技术内容确定的依据.....	7
1. 国内标准情况.....	7
2. 企业标准情况.....	7
3. 国际标准情况.....	8
四、主要试验(或验证)的分析, 综述报告, 技术经济论证, 预期的经济效果.....	10
(一) 丁酸梭菌检测方法的确定.....	10
1. 平板计数法.....	10
2. 试管计数法.....	13
3. 流式细胞仪计数.....	13
4. 生化试验.....	15
(二) 饲料添加剂丁酸梭菌主含量的确定.....	15
1. 丁酸梭菌含量.....	16
2. 水分、灰分和粒度/pH.....	18
3. 重金属含量.....	18
4. 霉菌毒素.....	19
5. 微生物.....	22
6. 贮存.....	22
(三) 预期的经济效果.....	23
五、采用国际标准和国外先进标准的程度, 以及与国际、国外同类标准水平的对比情况.....	24
六、与有关的现行法律法规和强制性国家标准的关系.....	25
七、重大分歧意见的处理经过和依据.....	25
八、贯彻农业行业标准的要求和措施建议.....	25
九、废止现行有关标准的建议.....	25

十、其他应予说明的事项.....	25
参考文献.....	26

# 农业行业标准《饲料添加剂 丁酸梭菌》编制说明

## （公开征求意见稿）

### 一、标准制定背景及任务来源

#### （一）任务来源

本任务由农业农村部农产品质量安全监管司《关于下达 2021 年农业国家标准和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函〔2021〕76 号），项目编号 NYB-21101，由饶正华主持承担《饲料添加剂 丁酸梭菌》的制定工作，由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、浙江惠嘉生物科技股份有限公司、山东宝来利来生物工程股份有限公司、河南金百合生物科技股份有限公司、大连三仪动物药品有限公司承担该项目的制定工作。

#### （二）立项理由

丁酸梭菌又名酪酸梭菌、丁酸梭状芽孢杆菌，是芽孢杆菌科梭菌属的一种产丁酸的革兰氏阳性厌氧细菌。丁酸梭菌是严格厌氧菌，能够充分适应动物肠道的厌氧环境，通过多种方式调节肠道菌群平衡。

（1）**丁酸梭菌具有良好的“替抗”功效。**丁酸梭菌在肠道尤其是肠后端能产生大量丁酸，丁酸是肠细胞的能量来源，对肠道上皮组织的再生和修复具有重要的意义。丁酸梭菌产生丁酸梭菌素（抗菌肽），杀死有害菌如产气荚膜梭菌，有效防治坏死性肠炎；丁酸梭菌能产生大量内源酶，能进行二次消化，利用肠内剩余营养；丁酸梭菌可以在增殖过程中产生叶酸等营养物质，丁酸梭菌可以抵制生成胺类、吲哚类等物质的细菌的活动，减少蛋白质向胺和氨的转化，可以抑制部分微生物的脲酶活性，减少粪尿中的氮排放，从而降低粪尿恶臭，改善饲养环境。在家畜方面主要应用于猪，其能改猪肠道菌群结构，维持肠道屏障完整，激活机体免疫，增进消化，促进生长。在家禽应用方面，日粮中添加丁酸梭菌，不仅可提高肉鸡日增重、饲料转化率，改善肠道菌群结构和屏障功能，还可有效预防肠炎的发生，提高肉鸡的免疫力，促进生长，改善鸡肉品质。丁酸梭菌由于本身的微生物生态学特性决定，其是集乳酸菌和芽孢杆菌优点于一身的活菌制剂，具有耐胃酸、消化酶、胆汁酸和抗生素等特点，是一类

极有开发前途的新型微生物饲料添加剂。

**(2) 国家饲料监管法律法规的配套需要。**丁酸梭菌是我国《饲料添加剂品种目录（2013）》中规定允许使用的菌种，但没有相应的国家标准和行业标准与之配套，本标准的制定是为了适应《饲料和饲料添加剂管理条例》和中华人民共和国农业农村部公告第 226 号《新饲料添加剂申报材料要求》的相关要求。

**(3) 促进市场和产业发展需求。**目前国内约有 54 家企业致力于丁酸梭菌的研发、生产、推广应用等，主要包括：湖北绿雪生物科技有限公司、河南金百合生物科技股份有限公司、湖北华扬科技发展有限公司、青岛东海药业有限公司、山东宝来利来生物工程股份有限公司、北京好实沃生物技术有限公司、浙江惠嘉生物科技股份有限公司、山东蔚蓝生物科技股份有限公司、青岛根源生物技术集团有限公司、山东益昊生物科技股份有限公司、广东海纳川生物科技股份有限公司、江苏三仪生物工程有限公司、湖北蓝谷中微生物技术有限公司、北京金泰得生物科技股份有限公司、厦门和美科盛生物技术有限公司、湖北华大瑞尔科技有限公司、潍坊瑞辰生物科技股份有限公司、潍坊华英生物科技股份有限公司等企业。

**(4) 为保障丁酸梭菌产品质量安全提供技术支撑。**随着饲料“无抗”时代的到来，丁酸梭菌等替抗产品得以推广使用，实践证明，丁酸梭菌制剂或与其他益生菌、中药提取物等联合使用，能够纠正动物肠道紊乱，减少肠毒素的发生，增强机体免疫功能，还能分泌多种酶类和维生素，有效促进营养物质的消化吸收，起到消除炎症、营养肠道的作用，应用效果显著。作为一种新型绿色微生态制剂，尤其是在无抗饲养的大环境下，丁酸梭菌制剂有着十分广泛的应用前景和较大的市场需求。在畜牧养殖方面，随着畜牧养殖业的稳定发展和无抗养殖的进程加快，丁酸梭菌等微生态制剂应用越来越广泛，而且显示出不可限量的应用前景。但同时由于我国尚缺少饲料添加剂丁酸梭菌的标准，企业产品标准水平高低不一，产品质量良莠不齐，不利于丁酸梭菌产品科学合理应用，因此有必要制定此项标准。

### （三）国内外产业状况

国外丁酸梭菌主要生产商包括：AOR Canada（加拿大 AOR）、Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd（日本米雅利桑制药株式会社）、MITUSHI BIO PHARMA（三井制药公司）。1940 年，丁酸梭菌在日本实现了商业化生产并被应用于临床。2003 年欧盟批准丁酸梭菌用作肉鸡和断奶仔猪的饲料添加剂。

我国对丁酸梭菌作为饲料添加剂的研究起步较晚，开始于 2000 年左右。2009 年 7 月我国农业部批准了新饲料添加剂—丁酸梭菌的生产和使用，并于 2013 年 12 月将其纳入《饲料添加剂品种目录（2013）》的附录二中。浙江惠嘉生物科技股份有限公司最先研制出可用作饲料添加剂的丁酸梭菌，并于 2009 年 11 月获得了原农业部颁发的饲料添加剂新产品证书[新饲证字 2009

(01)]。随后，一些科研院所、大专院校及各大企业加大了丁酸梭菌作为饲料添加剂的基础研究及应用研究，成果相继在畜禽、水产等动物养殖领域应用。比如河南金百合生物科技股份有限公司、青岛东海药业有限公司、湖北绿雪生物科技有限公司、洛阳欧科拜克生物技术股份有限公司、湖北蓝谷中微生物技术有限公司、山东宝来利来生物工程股份有限公司等企业生产的丁酸梭菌制剂已商业化用作畜禽水产饲料添加剂。五年保护期后，其他企业纷纷投入量产，国内约有 54 家企业进行了丁酸梭菌的注册。根据起草组的调研，目前约有 22 家企业对丁酸梭菌进行了生产，包括青岛家宝生物科技有限公司、威海优乐生物科技有限公司、青岛根源生物技术集团有限公司、山东益昊生物技术有限公司、洛阳欧科拜克生物技术股份有限公司、山东宝来利来生物工程股份有限公司、江苏远山生物技术有限公司、山东天弓生物技术有限公司、鹤壁兴旺生物科技有限公司、广州微立旺生物科技有限公司、河南金百合生物科技股份有限公司、宜春强微生物科技有限公司、湖北蓝谷中微生物技术有限公司、浙江盛通生物科技有限公司、无锡木子生物科技有限公司、山东晟耀生物科技有限公司、潍坊瑞辰生物科技有限公司、湖北绿雪生物科技有限公司、浙江惠嘉生物科技有限公司、江苏三仪生物产业集团、山东蔚蓝生物科技有限公司、湖北华扬科技发展有限公司等。

### （四）主要生产工艺

根据 PUBLIC VERSION-*CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* MIYAIRI 588 NOVEL FOOD APPLICATION（公示版丁酸梭菌 Miyairi 588 新型食品应用益生菌食品补充剂）文

件，日本米雅公司 Miya-Pro 剂的生产工艺流程包括发酵、离心分离、干燥，混合后粉碎等。

国内饲料添加剂丁酸梭菌的生产主要有以下几种代表性工艺：（1）青岛根源生物技术集团有限公司、山东益昊生物技术有限公司：以丁酸梭菌为菌种，经培养、发酵、压滤后加饲料原料玉米皮粉或麦芽糊精或葡萄糖干燥制成的饲料添加剂丁酸梭菌产品。（2）洛阳欧科拜克生物技术股份有限公司：以丁酸梭菌为菌种，通过液体发酵的菌液经配制、灌装或菌液经菌体分离、吸附、干燥所得的饲料添加剂丁酸梭菌产品。（3）河南金百合生物科技股份有限公司：以丁酸梭菌为菌种，经液态发酵、灌装而成或经液态发酵、干燥而成或加入粉碎后的饲用天然植物（黄芪、刺五加等）经固态发酵、干燥而成的饲料添加剂丁酸梭菌。（4）大连三仪动物药品有限公司：以丁酸梭菌为原菌种经发酵、离心、包被、干燥等工艺加工而成的饲料添加剂。

大部分丁酸梭菌产品未采取包被工艺。只有宜春强微苞丁乳为粉剂产品经过制粒、抛丸、分筛、包衣后制成了微丸产品，大连三仪部分产品使用了包被工艺。

### （五）产品情况

丁酸梭菌市场上常见的产品主要有：丁丁素-5.0、丁丁素-10、丁丁素-50、丁丁素-100（湖北绿雪生物科技有限公司）；丁益健（洛阳欧科拜克生物技术股份有限公司）；DSSJ-50HE DSSJ-100（山东蔚蓝生物科技有限公司）；I型和II型（湖北华扬科技发展有限公司）；畅丁-5/10/20/50/100/200和畅丁酵素（宜春强微生物科技有限公司）；I~XII型（浙江惠嘉生物科技股份有限公司）；YH004-10/50/100/200/500（山东益昊生物科技有限公司）；CB10/25/50/100（湖北蓝谷中微生物技术有限公司）；丁酸梭菌 F10/50/100/200（青岛根源生物技术集团有限公司）；B-1（青岛东海药业有限公司）等。

饲料添加剂丁酸梭菌的产品分固体剂型和液体剂型，其中固体粉末最为常见，固体微丸颗粒状和液体剂型较少。

由于不同生产企业的丁酸梭菌菌株来源以及其发酵水平的差异，市面上丁酸梭菌产品的质量良莠不齐，丁酸梭菌的活菌数差异较大，低的只有几千万，高的可以达到几百亿不等，活菌数主要集中在2~100亿/g之间。

## 二、主要工作过程

### (一) 确定编制小组，搜集样品和资料

2020年6月~11月：收集查阅了与丁酸梭菌相关的国内外标准、企业标准及相关资料，搜集了丁酸梭菌饲料添加剂样品，结合实际样品情况，对这些资料进行整理；编制标准草案，进行标准申报。

### (二) 确定技术路线，进行实验

2020年11月~2021年5月，进一步进行试验，对草案进行完善；标准设值的讨论；并按照 GB/T 1.1-2020 形成了标准初稿。

### (三) 起草小组编制、内部讨论和修改完善

2021年5月，与参与单位浙江惠嘉生物科技股份有限公司、山东宝来利来生物工程股份有限公司和河南金百合生物科技股份有限公司进行多次讨论和协商，对标准初稿进行修改。

### (四) 实验验证

2021年8月，由农业农村部农产品及加工品质量监督检验测试中心（北京）、深圳海关食品检验检疫技术中心、辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院对文件中制定的丁酸梭菌检测方法进行验证。

SN/T 3266-2012《食品微生物检验方法确认技术规范》中“6.3 定量方法性能指标计算与判定”和 GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第2部分确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》对重复性、再现性进行计算。

样品号	重复	检测值					重复性	再现性
1号	1	1.15E+10	1.14E+10	1.02E+10	9.50E+09	1.08E+10	0.08	0.03
	2	1.14E+10	1.20E+10	1.15E+10	1.08E+10	1.13E+10	0.04	
	3	1.10E+10	1.13E+10	1.09E+10	1.08E+10	1.16E+10	0.03	
2号	1	1.23E+10	1.25E+10	1.23E+10	1.28E+10	1.25E+10	0.02	0.01
	2	1.31E+10	1.28E+10	1.24E+10	1.34E+10	1.20E+10	0.04	
	3	1.25E+10	1.30E+10	1.24E+10	1.30E+10	1.28E+10	0.02	
3号	1	7.50E+10	6.30E+10	8.30E+10	6.40E+10	6.40E+10	0.13	0.11
	2	8.60E+10	7.90E+10	8.20E+10	7.00E+10	7.10E+10	0.09	
	3	5.50E+10	6.70E+10	6.20E+10	5.00E+10	6.30E+10	0.11	
4号	1	2.90E+09	2.50E+09	2.00E+09	3.30E+09	2.70E+09	0.18	0.10
	2	2.80E+09	2.30E+09	3.10E+09	2.70E+09	2.60E+09	0.11	
	3	3.30E+09	3.20E+09	3.60E+09	3.70E+09	2.60E+09	0.13	

平均值							0.08	0.06
-----	--	--	--	--	--	--	------	------

### （五）定向征求意见

2021年7月11日~8月17日，通过发函征询意见，通过反馈意见对标准进行修改。本标准的制定广泛征求意见，共收到回函22份，其中来自科研院所和大专院校的8份、第三方检测机构的4份、饲料生产使用企业的回函10份。收到意见171条，汇总后归纳为94条。

### （六）对反馈意见进行修改完善

2021年7月20日~8月15日，对征求意见进行汇总修改，根据反馈意见，用丁酸梭菌 CICC 10390 标准菌株，补充了丁酸梭菌在不同培养基中的添加回收试验。

### （七）申请预审

2021年9月3日，形成预审稿后，上报至全国饲料工业标准化技术委员会，申请预审。

### （八）通过预审

2021年9月15日，通过预审，预审会共邀请7位专家对本标准进行了审查，提出7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。

## 三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

### （一）标准编制原则

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》的规定进行编制。

### （二）主要技术路线

本标准确定的主要技术路线内容如下。

# 技术路线

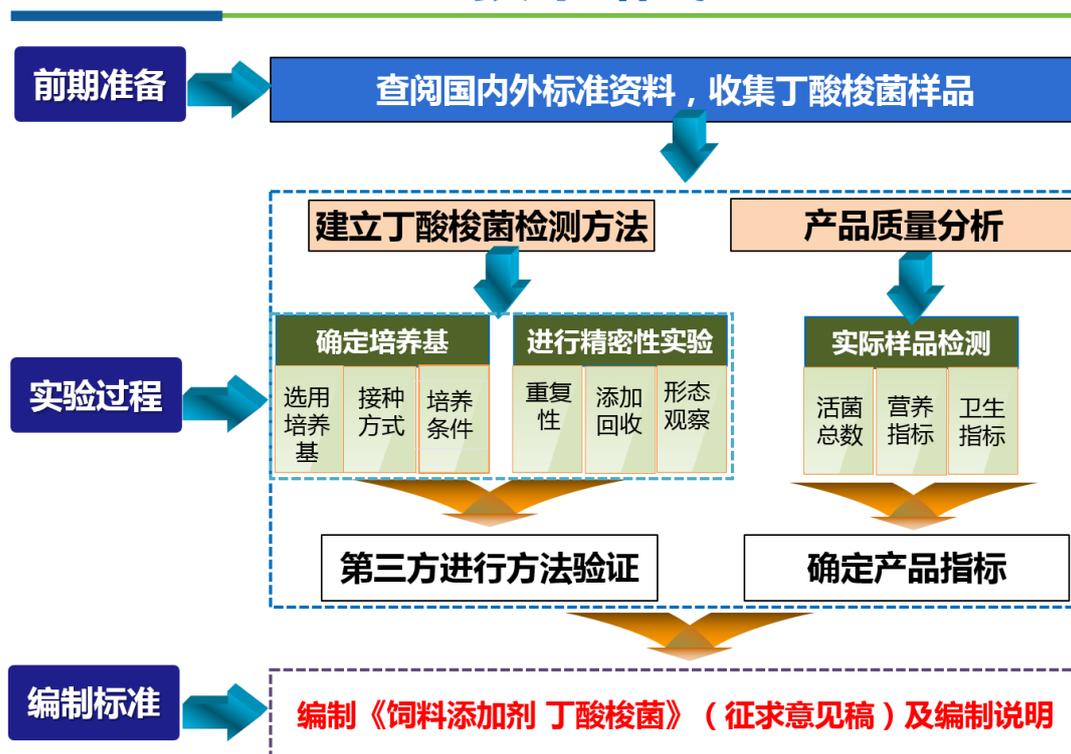


图 1 农业行业标准《饲料添加剂 丁酸梭菌》研制技术路线

### (三) 主要技术内容确定的依据

本标准主要技术内容说明如下：

#### 1.国内标准情况

目前国内在国家标准和行业标准中，尚无丁酸梭菌的检测方法标准和产品标准。河南省质量技术监督局曾于 2018 年 11 月发布了地方标准《DB41/T 1728-2018 饲料添加剂丁酸梭菌的测定 微生物法》，但此标准已于 2020 年 3 月作废。2019 年 9 月，由生物饲料产业技术创新战略联盟发布 T/CSWSL 006-2019《饲料添加剂 丁酸梭菌》团体标准。

#### 2.企业标准情况

目前现行有效的企业标准多达 50 余项，由参与生产企业起草制定（表 1）。

表 1 丁酸梭菌主要企业标准代号

序号	起草单位	标准号
1	青岛东海药业有限公司	Q/370211QDH 007-2016
2	山东蔚蓝生物科技有限公司	Q/371621SLH055-2017

3	青岛根源生物技术集团有限公司	Q/370283GYS 201-2020
4	湖北绿雪生物科技有限公司	Q/LX001-2016
5	湖北华扬科技发展有限公司	Q/HYKJ 03-2018
6	洛阳欧科拜克生物技术股份有限公司	Q/LOK 015-2016
7	河南金百合生物科技股份有限公司	Q/HJBH 007-2019
8	浙江惠嘉生物科技股份有限公司	Q/ZHJ 1001-2020
9	广州市微生物研究所	Q/GZWSW 9-2018
10	四川润格生物科技有限公司	Q/MA633BH724-2.04-2018
11	山东益昊生物科技有限公司	Q/370725SYH 004-2020
12	山东仙普爱瑞科技股份有限公司	Q/370785SXA 012-2018
13	南京福润德动物药业有限公司	Q/320115FRDW 008-2017
14	宜春强微生物科技有限公司	Q/YCQW029-2018
15	山东迅达康生物科技有限公司	Q/370113XDK 501-2018
16	湖北绿天地生物科技有限公司	Q/LTD050-2019
17	武汉合缘绿色生物股份有限公司	Q/WHY23-2018
18	山东宝来利来生物工程股份有限公司	Q/370902SBL 129-2021
19	重庆美邦农生物技术有限公司	Q/MBN 023-2019

### 3. 国际标准情况

丁酸梭菌在欧盟和日本多用作食品添加剂。1993 年，欧盟批准丁酸梭菌制剂用作肉鸡、稀有家禽（不包括蛋鸡）、断奶仔猪的饲料添加剂，规定最低菌落含量为  $5 \times 10^8$  CFU/kg。2003 年欧盟将丁酸梭菌作为肉鸡、断奶仔猪的肠道菌群稳定剂，最低菌落含量为  $2.5 \times 10^8$  CFU/kg。2013 年 4 月 24 日欧盟委员会发布（EU）No. 374/2013 法规，批准丁酸梭菌（*Clostridium butyricum*）用作蛋鸡饲料添加剂。日本米雅公司 Miya-Pro 剂的质量指标包括干燥失重、菌种纯度检验、重金属和砷等。

相关的国际标准有 ISO 15213，食品和动物饲料的微生物学.在厌氧条件下亚硫酸还原菌生长计数的水平法（Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions），该标准采用亚硫酸铁琼脂，培养温度为  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

表 2 团体标准和企业标准中丁酸梭菌产品各技术指标要求

序号	标准号	黄曲霉 B1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	砷(总砷 计) ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	铅 ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	汞 ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	镉 ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	霉菌总数 ( $\text{cfu}/\text{g}$ )	大肠菌群 ( $\text{MPN}/100\text{g}$ )	沙门氏菌 [25g (ml)]	杂菌率 (%)	水分 (%)	pH 值 (液体)	保质期 (月)
1	团标 TCSWCL006-2019	$\leq 10.0$	$\leq 2.0$	$\leq 5.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 1.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	$\leq 1$	$\leq 10$	4.0-6.5	固态 6 个月, 液态 3 个月
2	惠嘉 Q/ZHJ1001-2020	$\leq 10.0$	$\leq 2.0$	$\leq 5.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	$\leq 1$	$\leq 9$	/	18
3	远山 Q/320900JYS 003-2019	$\leq 10.0$	$\leq 2.0$	$\leq 5.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	/	$\leq 11.0$	/	12
4	天弓 Q/370702STG 005-2019	$\leq 10.0$	$\leq 2.0$	$\leq 20.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	$\leq 1.0$	$\leq 12$	/	24
5	兴旺 Q/XSW 005-2018	$\leq 10.0$	$\leq 5.0$	$\leq 10.0$	/	$\leq 3.0$	/	/	不得检出	$\leq 1.0$	$\leq 13.0$	/	24
6	东海 Q/370211QDH 010-2020	$\leq 10.0$	$\leq 2.0$	$\leq 10.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	$\leq 0.5$	$\leq 15$	/	24
7	优乐 Q/371083FYL 008-2018	$\leq 10.0$	$\leq 2.0$	$\leq 5.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^7$	$\leq 1.0 \times 10^5$	不得检出	$\leq 0.5$	$\leq 12$	/	12
8	根源 Q/370283GYS	$\leq 10.0$	$\leq 2.0$	$\leq 10.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^7$	$\leq 1.0 \times 10^5$	不得检出	$\leq 0.5$	$\leq 10$	/	12
9	金百合 Q/HJBH007-2019	$\leq 10.0$	$\leq 2.0$	$\leq 5.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	/	$\leq 10$	3.8-6.2	固态 18, 液 态 12
10	欧科拜克 Q/LOK015-2016	$\leq 20.0$	$\leq 2.0$	$\leq 5.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	$\leq 0.5$	/	2.0-4.0	12
11	微立旺 Q/WWSWC018-2020	/	/	/	/	/	/	/	/	$\leq 30$	$\leq 15$	/	24

#### 四、主要试验（或验证）的分析，综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

##### （一）丁酸梭菌检测方法的确定

##### 1. 平板计数法

常用于培养和计数梭菌的培养基见表 2。

表 3 常用于培养和计数梭菌的常用培养基

培养基名称	主要用途
亚硫酸铁琼脂 Ferric Sulfite Agar	用于厌氧亚硫酸盐还原梭菌的计数
胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础（TSC） Tryptose Sulfite Cycloserine Agar Base	用于产气荚膜梭菌的平板计数
梭菌鉴别琼脂（DCA） Differentia Clostridial Agar	用于亚硫酸盐还原梭菌的计数和培养
强化梭菌鉴别琼脂（DRCA） Differentia Reinforced Clostridial Agar	用于梭菌的计数和培养
强化梭菌琼脂（RCA） Reinforced Clostridium Agar	用于梭菌的增菌培养和计数
强化梭菌培养基（RCM） Reinforced Clostridium Medium	用于梭菌的增菌培养和计数
梭菌属测定用培养基 Clostridium Test Medium	用于梭菌属细菌检测
胰蛋白胨葡萄糖酵母浸膏肉汤（TPGY）	用于肉毒梭菌的增菌培养
梭菌强化培养基（USP） Reinforced medium for clostridia	用于梭菌的增菌培养和计数
FS 培养基 FS Medium	用于梭杆菌的选择性增菌培养

表 4 丁酸梭菌常用检测培养基

序号	培养基名称	培养基成分，pH	使用的标准号
1	DRCA	酵母粉 1.0g，牛肉粉 8.0g，葡萄糖 1.0g，胰蛋白胨 5.0g，蛋白胨 5.0g，淀粉 1.0g，L-半胱氨酸盐酸盐 0.5g，醋酸钠 5.0g，亚硫酸氢钠 0.5g，柠檬酸铁铵 0.5g，刃天青 0.002g，琼脂 15.0g，pH7.1±0.2	《Q/370702STG 005-2019 混合型饲料添加剂 丁酸梭菌》

2	RCA	牛肉粉 10.0g, 胰酪蛋白胨 10.0g, 酵母粉 3.0g, 葡萄糖 5.0g, 可溶性淀粉 1.0g, 氯化钠 5.0g, 醋酸钠 3.0g, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5g, 琼脂 12.5g, pH6.8±0.2	《24 株鸡源丁酸梭菌的分离鉴定及耐药基因与毒力基因携带情况》
3	亚硫酸铁琼脂	胰蛋白胨 15.0g, 大豆蛋白胨 5.0g, 酵母粉 5.0g, 偏重亚硫酸钠 1.0g, 柠檬酸铁铵 1.0g, 琼脂 20.0g, 蒸馏水 1000mL, pH7.6±0.2	1. 《DB 41/T 1728-2018 饲料添加剂 丁酸梭菌的测定 微生物法 (已废止)》 2. 《Q/YCQW 030-2018 混合型饲料添加剂 屎肠球菌+丁酸梭菌+地衣芽孢杆菌》 3. 《Q/XWSW 005-2018 混合型饲料添加剂 丁酸梭菌》 4. 《Q/320900JYS 003-2019 饲料添加剂 丁酸梭菌》 5. 《Q/371083FYL 008-2018 混合型饲料添加剂》 6. 《Q/HJBH 007-2019 饲料添加剂 丁酸梭菌》 7. 《Q/ LOK 015-2016 饲料添加剂 丁酸梭菌》 8. 《GZWSW 9-2018 微立旺 丁酸梭菌》
4	TSC	胰蛋白胨 15.0 g, 大豆蛋白胨 5.0 g, 酵母粉 5.0 g, 焦亚硫酸钠 1.0g, 柠檬酸铁铵 1.0g, 琼脂 15.0g, pH 7.6±0.2	1. 《Q/370283GYS 饲料添加剂 丁酸梭菌》 2. 《T/CSWSL 006-2019 饲料添加剂 丁酸梭菌》
5	TYA	胰蛋白胨 6g, 乙酸铵 3g, 酵母浸粉 2g, 磷酸二氢钾 0.5g, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.3g, FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O, 琼脂 16.3g, pH: 6.5±0.2	Butyric acid as sole product from xylose fermentation by a non-solventogenic Clostridium beijerinckii strain under controlled pH and nutritional conditions

从用于培养和计数梭菌的常用培养基 (表 2) 和常用检测丁酸梭菌的培养基 (表 3) 得知, 目前主要使用的丁酸梭菌检测培养基包括强化梭菌鉴别培养基 (DRCA)、RCA (强化梭菌琼脂培养基)、亚硫酸铁琼脂 (Ferric sulfite Agar)、胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂 (TSC)、TYA 培养基等。选用标准中使用较多的亚硫酸铁琼脂培养基、RCA 培养基、DRCA 培养基选用这 3 种培养基进行试验。

标准菌株采用 CICC 10390。

接种方式分别采用倾注法和涂布法。

培养条件一种是铺单层培养基 (“单层”) 后倒置放在厌氧装置中进行培养

（“厌氧”），另一种是通过倾注法或涂布法在一层培养基接种，凝固后再铺上一层培养基凝固后，常规条件倒置培养（“常规”）。

表 5 丁酸梭菌平板计数法试验结果

培养基	倒板方式	培养条件	涂板方法	菌落形态	菌数 (CFU/g)
亚硫酸铁琼脂	单层	厌氧	倾注法	黑色实心圆点	$1.53 \times 10^{10}$
	单层	厌氧	涂布法	白色圆点，个别有黑色中心	$1.41 \times 10^{10}$
	双层板：亚+亚	常规	下层倾注	黑色实心圆点	$1.55 \times 10^{10}$
	双层板：亚+亚	常规	下层涂布	黑色实心圆点	$1.35 \times 10^{10}$
RCA 培养基	单层	厌氧	倾注法	白色不规则点	$1.66 \times 10^{10}$
	单层	厌氧	涂布法	白色圆点	$1.61 \times 10^{10}$
	双层板：RCA+RCA	常规	下层倾注	白色不规则点，产气，有气泡	$1.68 \times 10^{10}$
	双层板：RCA+RCA	常规	下层涂布	白色规则点，产气	$1.38 \times 10^{10}$
DRCA 培养基	单层	厌氧	倾注法	黑色实心圆点，个别有白边，产气	$1.40 \times 10^{10}$
	单层	厌氧	涂布法	白色实心圆点	$1.33 \times 10^{10}$
	双层板：DRCM+DRCM	常规	下层倾注	黑色实心圆点，产气	$1.47 \times 10^{10}$
	双层板：DRCM+DRCM	常规	下层涂布	黑色、白色点状菌落，产气	$1.28 \times 10^{10}$
TSC 培养基	单层	厌氧	倾注法	黑色、圆形菌落	$1.48 \times 10^{10}$
	单层	厌氧	涂布法	黑色、圆形菌落	$1.42 \times 10^{10}$

利用 R 语言中的配对 t 检验算法分析，单层与双层培养基之间的  $p$  值为 0.4151，厌氧培养与常规培养的  $p$  值为 0.4151，二者之间差异均不显著，考虑操作的简易性，选用单层厌氧培养法。

利用 R 语言中的配对 t 检验算法分析，涂布法与倾注法的  $p$  值为 0.00974，说明差异显著。涂布培养菌数的平均值为  $1.393E+10$ ，倾注培养菌数的平均值为  $1.548E+10$ ，因此选用倾注法接种。

通过利用 R 语言中的配对 t 检验算法分析，亚硫酸铁培养基与 RCA 培养基  $p$  值为 0.0394，亚硫酸铁培养与 DRCA 培养的  $p$  值为 0.006939，RCA 培养与 DRCA 培养的  $p$  值为 0.01328，说明这三种培养基之间差异显著。但对于培养基的选择要综合考虑菌落的直观性、培养基的易配性以及培养基使用的广泛性等因素。按照表 4 现有企业标准的广泛性，本标准选用亚硫酸铁培养基。

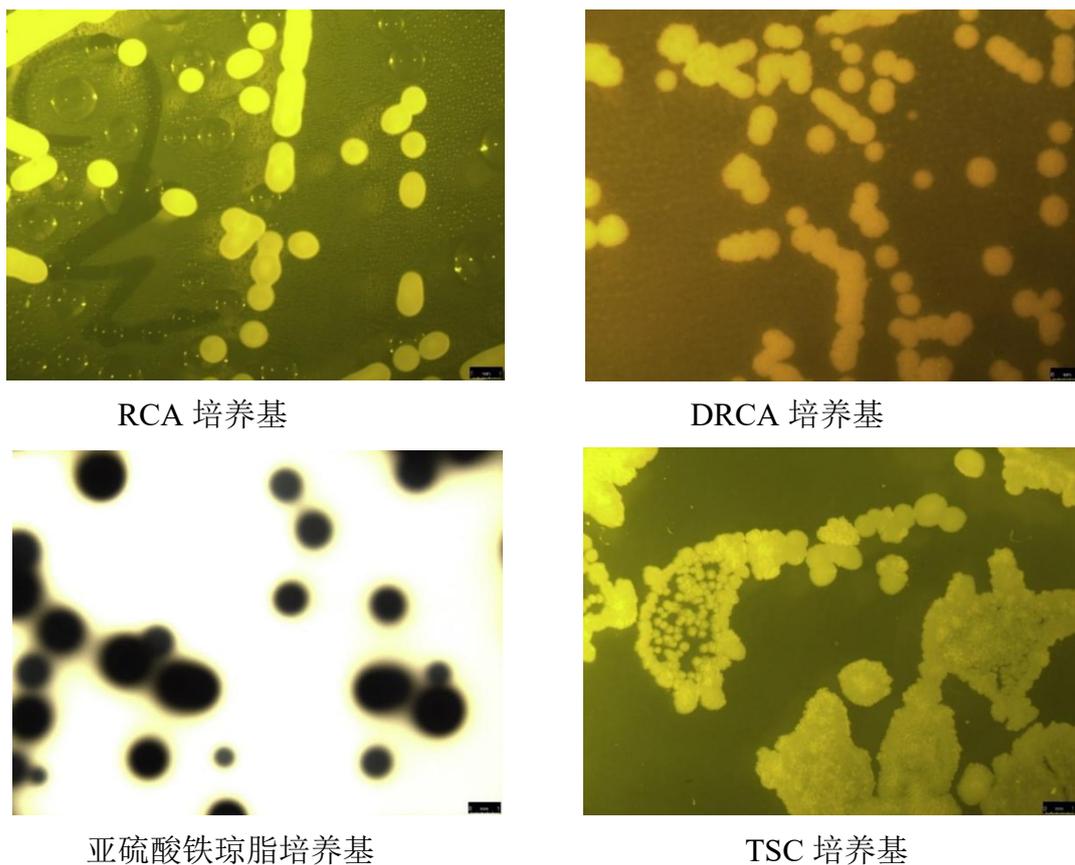


图 2 丁酸梭菌 ATCC 19398 在培养基上的菌落形态

## 2. 试管计数法

以无菌操作称取含 100 亿菌数的 25 g 样品，置于加入带玻璃珠的 225 mL 的稀释液中，在旋转式摇床上以 200 r/min 充分振荡 5min~10 min，制成 1:10 的样品匀液，并以此为基础做成 10 倍梯度稀释菌液。

取 3 个连续的适宜稀释度，每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液，将移液管或枪头插入已除氧(试管培养基于沸水中煮沸 10min~15 min 直至蓝色显色剂变为无色) 温度降至 45°C~48°C 的培养基试管液体石蜡液面以下快速放液或打入。

加样后的试管于 36°C±1°C，直立静置培养 16h±2h 后计菌落数。

表 6 丁酸梭菌试管计数法试验结果

单位：CFU/g

重复	1	2	3	4
菌数	$1.17 \times 10^{10}$	$1.14 \times 10^{10}$	$1.13 \times 10^{10}$	$1.07 \times 10^{10}$

## 3. 流式细胞仪计数

取  $10^{-3}$  稀释度丁酸梭菌菌液 1 mL 转移至 2 mL 无菌离心管。4°C、12000 r/min

条件下离心 10 min 后小心吸掉上清，再加入 200  $\mu\text{L}$  超纯水重悬菌体。加入 200  $\mu\text{L}$  PI 染液，室温条件下避光染色 10 min。重复离心一次，吸掉上清后加入 1 mL 超纯水重悬。述样品进行流式细胞仪检测（注意避光操作），设置进样速度为 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ，记录 50  $\mu\text{L}$  样品中颗粒个数。计数结果如下：

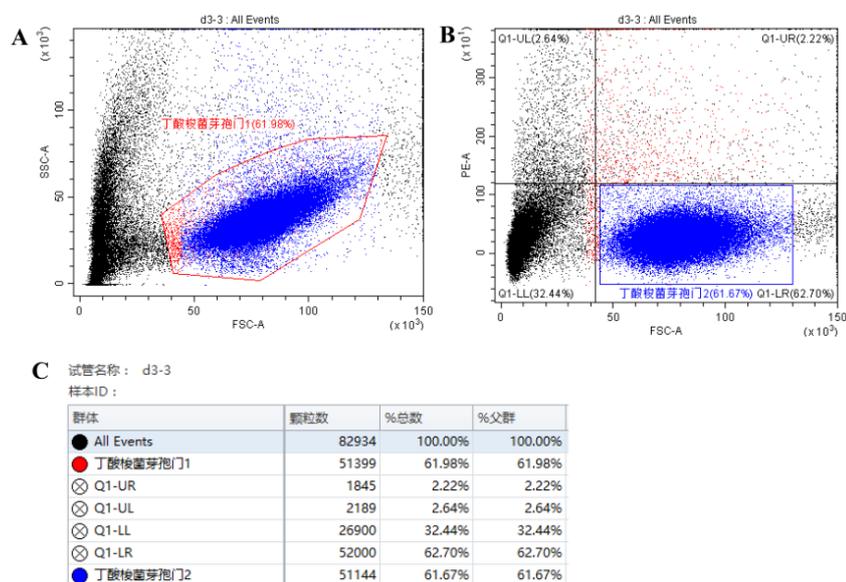


图 3 丁酸梭菌菌粉  $10^{-3}$  稀释度流式细胞仪检测结果

结果说明： $10^{-3}$  稀释度菌液流式细胞仪检测到的丁酸梭菌菌数分别为： $1.02 \times 10^9 \text{ CFU/g}$ 。上图为流式细胞仪检测  $10^{-3}$  稀释度菌液中颗粒数及分布。如图 1A 所示，当数据坐标设定为 FSC 和 SSC 时，流式细胞仪检测到的颗粒分为两群。图 1A 中黑色颗粒群因颗粒直径较小，主要是培养基中杂质及部分细菌碎片；中间圈定的颗粒群主要为样品中的菌体（占总颗粒数的 61.98%）。当数据面板坐标设定为 FSC 和 PE 时，所有颗粒分为四个组群：Q1-UL（PI 阳性，营养体碎片）、Q1-UR（PI 阳性，死细菌群）、Q1-LL（PI 阴性，培养基杂质）和 Q1-LR（PI 阴性，活细菌群）。Q1-LR 区的丁酸梭菌菌群，占总颗粒数的 61.67%。进样 50  $\mu\text{L}$  流式细胞仪记录的总颗粒数为 82934 个，丁酸梭菌颗粒数共 51144 个。推算到丁酸梭菌菌粉菌数为： $51144 \times 20 \times 1000 = 1.02 \times 10^9 \text{ CFU/g}$ 。

对以上三种方法进行比较，流式细胞仪计数法 < 试管计数法 < 平板计数法，而平板计数法中，同时平板计数法又是最具普适性和可操作性的方法，本标准选用平板计数法。

综上所述，经过对菌落数量的差异比较、结合考虑菌落直观性、操作简便性、培养基使用的广泛性以及方法的普适性和可操作性，本标准中规定，丁酸梭菌检

测法利用亚硫酸铁培养基、倾注接种、厌氧装置内培养的平板计数法。

#### 4.生化试验

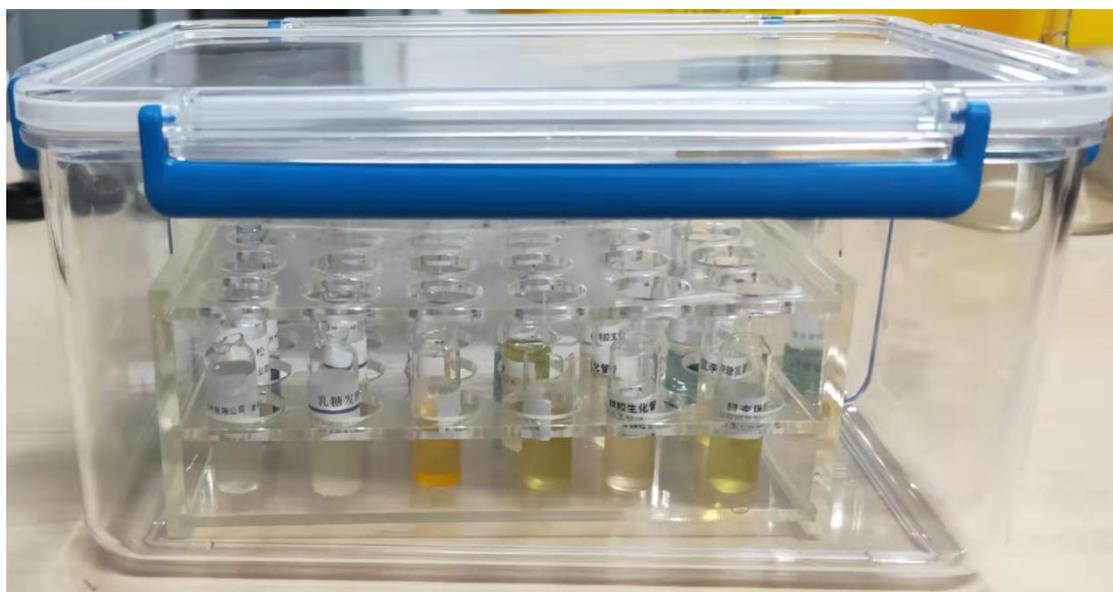


图 4 丁酸梭菌生化试验培养图

生化试验结果表明：丁酸梭菌可水解淀粉，明胶不液化，发酵葡萄糖、乳糖、木糖、蔗糖、蜜二糖、核糖、棉籽糖及水杨苷产酸，不发酵山梨醇及鼠李糖产糖。

#### (二) 饲料添加剂丁酸梭菌主含量的确定

定向收集了分别来自 16 家企业的 16 个丁酸梭菌样品(DSSJ001~DSSJ016)，目前丁酸梭菌在产的主要企业产品，具有广泛的代表性。同时我们也对通过市场渠道收集了 10 个样品。26 个样品中总计粉剂 24 个，颗粒 1 个，液体样品 1 个。样品信息见表 6。

表 7 样品编号及来源

样品编号	性状	产品名称	生产企业/来源
DSSJ001	粉末	菌三宝	江苏远山生物技术有限公司
DSSJ002	粉末	养肠得益	山东天弓生物科技有限公司
DSSJ003	粉末	南华千牧混合型饲料添加剂 丁酸梭菌 (VI 型)	鹤壁兴旺生物科技有限公司

DSSJ004	粉末	东海家宝 365	青岛家宝生物科技有限公司
DSSJ005	粉末	丁酸梭菌	威海优乐生物科技有限公司
DSSJ006	粉末	丁酸梭菌	青岛根源生物技术集团有限公司
DSSJ007	粉末	丁酸梭菌	山东益昊生物技术有限公司
DSSJ008	粉末	丁酸梭菌	洛阳欧科拜克生物技术股份有限公司
DSSJ009	粉末	丁酸梭菌	广州微立旺生物科技有限公司
DSSJ010	粉末	100 亿丁酸	河南金百合生物科技股份有限公司
DSSJ011	包衣微丸 (颗粒)	苞丁乳-200A 混合 型饲料添加剂	宜春强微生物科技有限公司
DSSJ012	粉末	丁酸梭菌	浙江盛通生物科技有限公司
DSSJ013	粉末	丁酸梭菌	无锡木子生物科技有限公司
DSSJ014	粉末	丁酸梭菌	山东晟耀生物科技有限公司
DSSJ015	粉末	丁酸梭菌	湖北蓝谷中微生物技术有限公司
DSSJ016	粉末	丁酸梭菌	山东宝来利来生物工程股份有限公司
DSSJ017	粉末	禽用昕肠美	不详/北京昕大洋
DSSJ018	粉末	丁酸梭菌	杭州惠嘉/广东加大
DSSJ019	粉末	丁酸梭菌	兴鼎/江西农合
DSSJ020	粉末	DZN 大泽农丁酸梭菌 5 亿	大泽农/新希望六和
DSSJ021	粉末	丁酸梭菌	不详/湖北襄大
DSSJ022	粉末	丁酸梭菌	不详/湖北襄大
DSSJ023	粉末	丁酸梭菌	不详/湖北襄大
DSSJ024	粉末	丁酸梭菌	不详/湖北襄大
DSSJ025	粉末	华扬益合宝加强型	湖北华扬/湖北华扬
DSSJ026	液体	仔肠健 液态丁酸梭菌	重庆美邦/网购

### 1. 丁酸梭菌含量

对样品中丁酸梭菌的含量进行测定，结果见表 8。

表 8 样品中丁酸梭菌含量测定值（单位：CFU/g 或 CFU/mL）

样品编号	标识量	实际检测值
DSSJ001	$\geq 1.0 \times 10^{10}$	$5.8 \times 10^9$
DSSJ002	$\geq 1.0 \times 10^9$	$< 10^5$
DSSJ003	$\geq 5.0 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$

DSSJ004	$\geq 5.0 \times 10^8$	$4.8 \times 10^8$
DSSJ005	$\geq 1.0 \times 10^{10}$	$1.2 \times 10^{10}$
DSSJ006	$\geq 2.0 \times 10^{10}$	$1.7 \times 10^{10}$
DSSJ007	$\geq 1.0 \times 10^{10}$	$1.3 \times 10^{10}$
DSSJ008	$\geq 1.0 \times 10^{10}$	$8.8 \times 10^9$
DSSJ009	$\geq 4.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^7$
DSSJ010	$\geq 1.0 \times 10^{10}$	$8.0 \times 10^9$
DSSJ011	$\geq 3.0 \times 10^8$	$5.3 \times 10^8$
DSSJ012	$\geq 5.0 \times 10^9$	$5.4 \times 10^9$
DSSJ013	$\geq 1.0 \times 10^{10}$	$7.8 \times 10^9$
DSSJ014	$\geq 1.0 \times 10^{10}$	$2.7 \times 10^8$
DSSJ015	$\geq 1.5 \times 10^9$	$7.0 \times 10^8$
DSSJ016	$\geq 1.5 \times 10^9$	$1.6 \times 10^9$
DSSJ017	不详	$9.4 \times 10^4$
DSSJ018	不详	$1.11 \times 10^9$
DSSJ019	不详	$6.47 \times 10^8$
DSSJ020	$\geq 5 \times 10^8$	$9.93 \times 10^8$
DSSJ021	不详	$5.2 \times 10^7$ , 丁酸梭菌芽孢 $4.2 \times 10^7$
DSSJ022	不详	$1.3 \times 10^8$ , 丁酸梭菌芽孢 $5.5 \times 10^7$
DSSJ023	不详	$5.1 \times 10^8$ , 丁酸梭菌芽孢 $4.5 \times 10^8$
DSSJ024	不详	$1.2 \times 10^9$ , 丁酸梭菌芽孢 $8.1 \times 10^8$
DSSJ025	$\geq 1 \times 10^8$	$1.0 \times 10^8$
DSSJ026	$\geq 2 \times 10^8$ cfu/mL	$2.2 \times 10^8$

表 9 实测丁酸梭菌活菌数频率分布表

序号	活菌数 (CFU/g 或 CFU/mL)	频率 (%)	频率 (%)
1	$\geq 1.0 \times 10^{10}$	3	11.54
2	$\geq 1.0 \times 10^9$	11	42.30
3	$\geq 1.0 \times 10^8$	21	80.77
4	$\geq 1.0 \times 10^7$	24	92.31
5	$\geq 1.0 \times 10^6$	24	92.31

根据对检测结果进行频率分布表（表 8、表 9），按照市场相关性原则，设为  $\geq 1.0 \times 10^8$  CFU/g 是合适的。

## 2.水分、灰分和粒度/pH

表 10 样品中水分、灰分及粒度测定

样品编号	水分, %		灰分, %		粒度 (粉末, 2.0 mm 标准筛通过率), %	pH (液体)
	标识量	检测值	标识量	检测值	检测值	/
DSSJ001	≤11.0	8.01	/	15.7	100%通过	/
DSSJ002	≤12.0	2.40	/	85.4	100%通过	/
DSSJ003	≤13.0	1.41	/	39.6	100%通过	/
DSSJ004	≤15.0	0.31	/	6.1	100%通过	/
DSSJ005	未标识	4.78	/	5.0	100%通过	/
DSSJ006	未标识	9.04	/	48.5	100%通过	/
DSSJ007	未标识	4.42	/	15.3	100%通过	/
DSSJ008	未标识	4.05	/	56.7	100%通过	/
DSSJ009	未标识	1.73	/	80.9	100%通过	/
DSSJ010	未标识	6.68	/	1.7	100%通过	/
DSSJ011	未标识	4.17	/	84.4	100%通过	/
DSSJ012	未标识	6.10	/	67.4	100%通过	/
DSSJ013	未标识	4.35	/	11.7	100%通过	/
DSSJ014	未标识	9.30	/	48.3	100%通过	/
DSSJ015	未标识	11.77	/	16.4	100%通过	/
DSSJ016	≤10.0	3.40	/	2.1	100%通过	/
DSSJ026	/	/	/	/	/	5.3

表 2 中, 16 个固体样品中, 只有 4 个企业标准对水分有规定, 最小规定≤11%, 最大规定≤15%, 但实际检测发现, 水分值在 0.31%~11.77%之间, 只有一个样品高于 10%, ≤10%的占到 93.8%, 因此, 水分值设为≤10.0%是合理。

灰分值由于与植物性载体或矿物载体等相关, 差距非常大, 很难给出合理的值, 同时所有其他的标准也没有对此进行规定, 因此本标准也不对灰分进行规定。根据实验结果, 粒度 (2.0 mm 标准筛通过率), 设为 95%通过是可行的。

## 3.重金属含量

表 11 样品中重金属含量测定 (单位: mg/kg)

样品编号	砷	铅	镉	铬	汞
DSSJ001	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ002	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ003	<0.5	2.1379	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ004	2.8829	<0.5	0.1107	1.7926	未检出
DSSJ005	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ006	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ007	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ008	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ009	4.2021	6.1014	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ010	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ011	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ012	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ013	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ014	0.6333	<0.5	0.1533	2.4808	未检出
DSSJ015	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出
DSSJ016	<0.5	<0.5	<0.05	<1.25	未检出

注：定量限 (mg/kg)：砷 0.5，铅 0.5，镉 0.05，铬 1.25，汞 0.05；检出限：汞 0.017。

根据检测结果，结合 NY/T 1444《微生物饲料添加剂技术通则》要求，砷、铅、汞、镉分别设为≤2、5、0.1、0.5 mg/kg 或 mg/L。

#### 4.霉菌毒素

对样品进行霉菌毒素（黄曲霉毒素 B1、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素）的检测。

表 12 样品中霉菌毒素含量测定（单位：μg/kg）

样品编号 含量	黄曲霉毒素 B1	玉米赤霉烯酮	呕吐毒素
DSSJ001	N.D	N.D	N.D
DSSJ002	N.D	N.D	N.D
DSSJ003	N.D	N.D	N.D
DSSJ004	N.D	N.D	N.D
DSSJ005	N.D	N.D	N.D
DSSJ006	N.D	N.D	N.D
DSSJ007	N.D	N.D	N.D
DSSJ008	N.D	N.D	N.D
DSSJ009	N.D	N.D	N.D
DSSJ010	N.D	N.D	N.D
DSSJ011	N.D	N.D	N.D
DSSJ012	N.D	N.D	N.D
DSSJ013	N.D	N.D	N.D

DSSJ014	N.D	N.D	N.D
DSSJ015	N.D	N.D	N.D
DSSJ016	N.D	N.D	N.D

注：N.D 表示未检出，其中黄曲霉毒素 B1 检出限 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。玉米赤霉烯酮检出限 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限：10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。呕吐毒素定量限为 0.1 $\text{mg}/\text{kg}$ 。

结果（表 12）表明所有样品均未检出霉菌毒素，均为合格产品，各霉菌毒素标准品及样品谱图见图 6~图 11。根据 GB13078《饲料卫生标准》和企业标准，规定黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>≤10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，玉米赤霉烯酮≤0.5 $\text{mg}/\text{kg}$ ，脱氧雪腐镰刀菌烯醇（呕吐毒素）≤2  $\text{mg}/\text{kg}$ 。

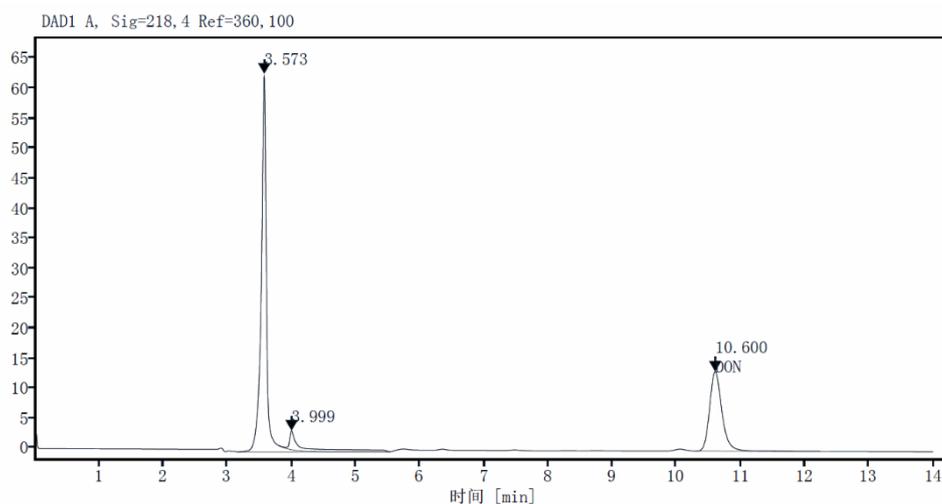


图 5 呕吐毒素标准品谱图（LC）

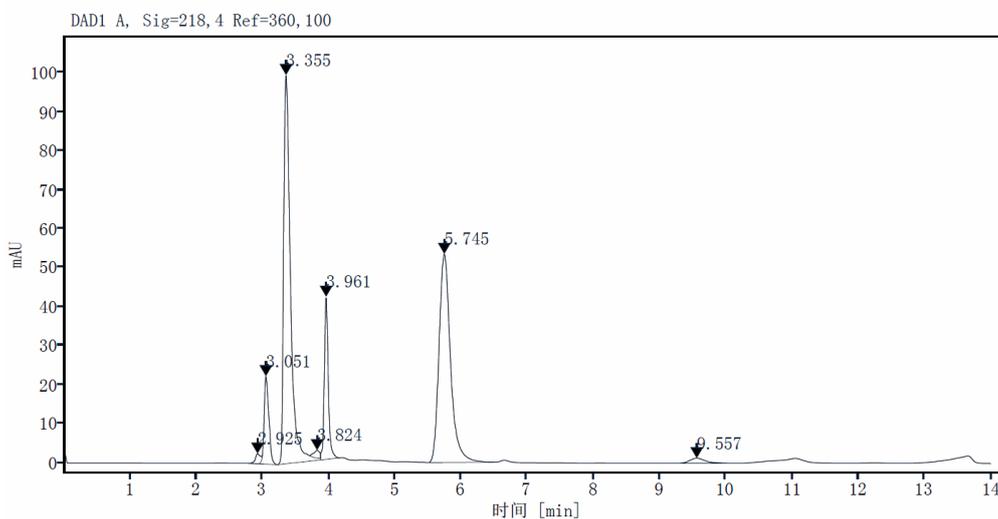


图 6 呕吐毒素样品谱图（LC）

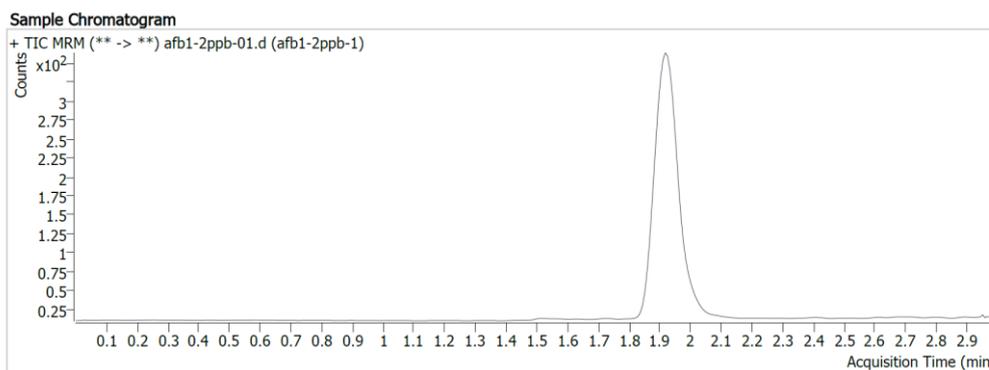


图 7 黄曲霉毒素 B1 标准品谱图 (LC-MS/MS)

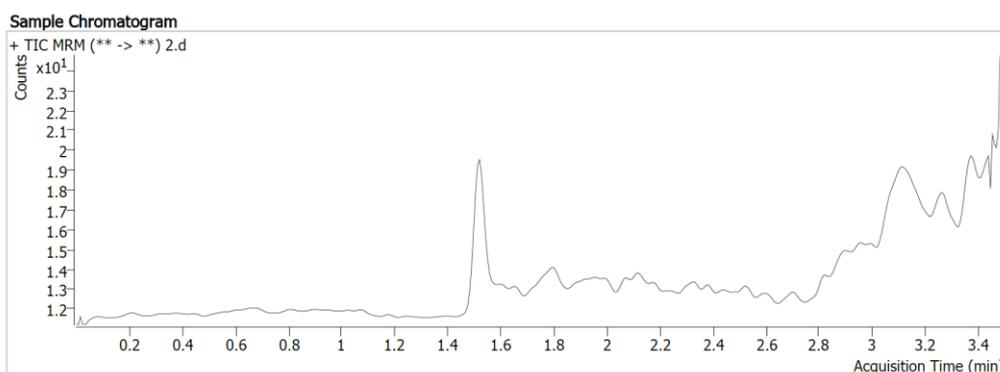


图 8 黄曲霉毒素 B1 样品谱图 (LC-MS/MS)

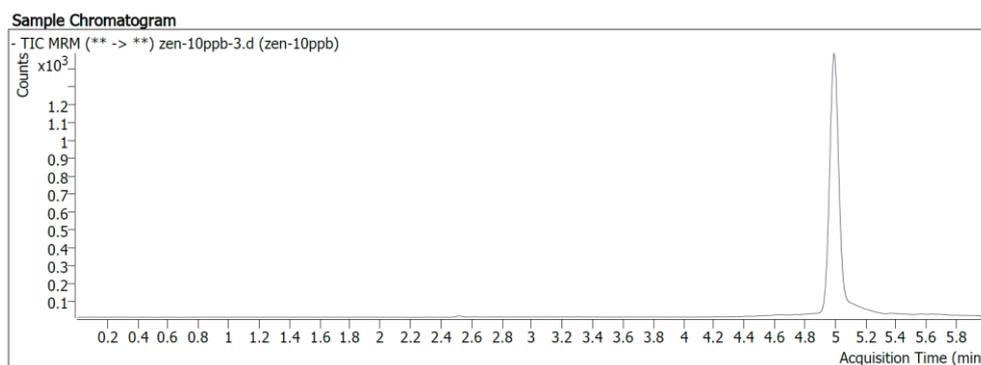


图 9 玉米赤霉烯酮标准品谱图 (LC-MS/MS)

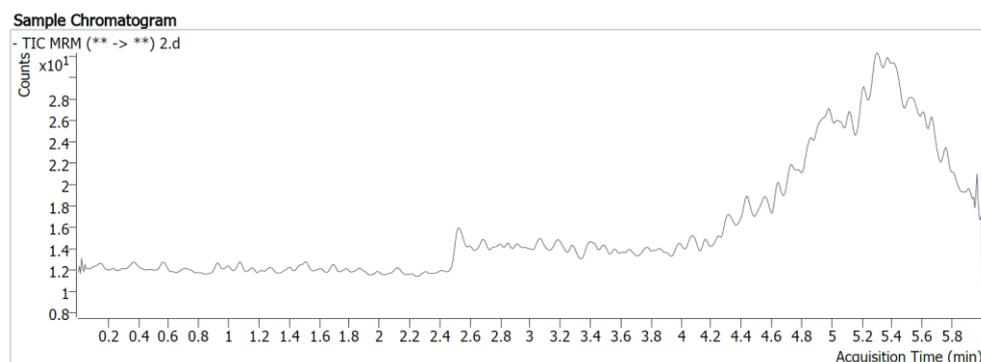


图 10 玉米赤霉烯酮样品谱图 (LC-MS/MS)

## 5.微生物

表 13 微生物指标检测结果

样品编号 含量	霉菌总数 CFU/g	大肠菌群 MPN/100g	沙门氏菌 25g 样品中
DSSJ001	88	$<1.0 \times 10^3$	未检出
DSSJ002	15	$<300$	未检出
DSSJ003	$<10$	$<300$	未检出
DSSJ004	114	$<300$	未检出
DSSJ005	$<10$	$<300$	未检出
DSSJ006	$<10$	$<300$	未检出
DSSJ007	$<10$	$<300$	未检出
DSSJ008	25	$<300$	未检出
DSSJ009	62	$<300$	未检出
DSSJ010	$<10$	$<300$	未检出
DSSJ011	44	$<300$	未检出
DSSJ012	$<10$	$<300$	未检出
DSSJ013	152	$<300$	未检出
DSSJ014	$<10$	$<300$	未检出
DSSJ015	76	$<300$	未检出
DSSJ016	$<10$	$<100$	未检出

根据表 11 中检测结果，结合 GB13078《饲料卫生标准》和企业标准，规定霉菌总数 $\leq 1.0 \times 10^3$  CFU/g，大肠菌群 $\leq 1.0 \times 10^3$  MPN/100g，沙门氏菌不得检出。

## 6.贮存

表 14 相关标准对于丁酸梭菌保质期的规定

序号	标准号	保质期
1	团标 TCSWCL006-2019	固态 6 个月，液态 3 个月
2	惠嘉 Q/ZHJ1001-2020	18 个月
3	远山 Q/320900JYS 003-2019	12 个月
4	天弓 Q/370702STG 005-2019	24 个月

5	兴旺 Q/XWSW 005-2018	24 个月
6	东海 Q/370211QDH 010-2020	24 个月
7	优乐 Q/371083FYL 008-2018	12 个月
8	根源 Q/370283GYS	12 个月
9	金百合 Q/HJBH007-2019	固态 18 个月，液态 12 个月
10	欧科拜克 Q/LOK015-2016	12 个月
11	微立旺 Q/WWSWSC018-2020	24 个月

对于贮存温度的规定，广州微立旺科技有限公司、河南金百合生物科技股份有限公司、湖北绿天地生物科技有限公司、洛阳欧科拜克生物技术股份有限公司、宜春强微生物科技有限公司、江苏远山生物技术有限公司、大连三仪动物药品有限公司、湖北蓝谷中微生物技术有限公司等规定，产品应贮存在通风、阴凉、干燥的仓库内；威海优乐生物科技有限公司、青岛东海药业有限公司等规定，产品应放在常温，通风、干燥的地方。《中国药典》2015 版规定阴凉处是指温度不超过 20℃，常温是指 10-30℃，除另有规定外，贮藏项下未规定贮藏温度的一般系指常温。根据检索到的企业标准中对贮存条件的要求，以阴凉居多，常温次之，鉴于此建议还是在阴凉处存放。

保质期与菌种特性、工艺等关系密切，差别也比较大，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）预期的经济效果

在畜牧养殖方面，随着畜牧养殖业的稳定发展和无抗养殖的进程加快，丁酸梭菌等微生态制剂应用越来越广泛，而且显示出不可限量的应用前景。

实践证明，丁酸梭菌制剂或与其他益生菌、中药提取物等联合使用，能够纠正动物肠道紊乱，减少肠毒素的发生，增强机体免疫功能，还能分泌多种酶类和维生素，有效促进营养物质的消化吸收，起到消除炎症、营养肠道的作用，应用效果显著。作为一种新型绿色微生态制剂，尤其是在无抗饲养的大环境下，丁酸梭菌制剂有着十分广泛的应用前景和较大的市场需求。

中国是世界上最大的养殖国家，且规模化程度呈不断上升趋势。2019 年全国饲料添加剂总产值 763.4 亿元，微生物饲料添加剂的应用占比以最低 5%计，产值将有 38.2 亿。其中丁酸梭菌单菌或含有丁酸梭菌的复合菌剂，占据 30%~50%份额，拌料比一般为 0.1%~0.2%，有 15.3 亿左右的产值，丁酸梭菌类产品经济效益显著。丁酸梭菌的大量应用，动物饲料利用效率提高 3%~5%，预计养殖者可节约饲料 0.6 万吨~1.2 万吨。

本行业标准的制订和实施，可以使丁酸梭菌整个产品的性能和品质得到提升的同时，降低成本，进而提高企业的竞争力，最终带动整个饲用微生态制剂的产业升级。我国已正式出台“饲料禁抗”政策法规，自 2020 年 1 月 1 日起，退出除中药类外的所有促生长类药物饲料添加剂在饲料中的添加使用；同时国家鼓励酶制剂、微生物制剂等绿色添加剂产品研发上市，加快了我国进入“无抗时代”的脚步。由于丁酸梭菌具有整肠、抗炎和促进动物生长等作用，作为饲料添加剂使用，不含任何添加剂，无任何药物和有害物质，可用于生产绿色畜禽产品，因此将丁酸梭菌应用于畜禽等养殖动物，能实现养殖户的控病降费、节能减排、提质增效，保障食品安全，促进养殖业健康可持续发展，具有显著的社会效益。

通过本标准的实施，进一步深入以及人们对绿色、安全和环保意识的不断增强，丁酸梭菌应用后将大幅度地减少抗生素的用量（减少 30%~50%），有效改善养殖污染和化学药物的二次污染，为我国畜牧业向绿色、健康、无污染的方向发展，具有显著生态效益。

## 五、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况

欧盟于 1993 年批准丁酸梭菌制剂用作肉鸡、稀有家禽（不包括蛋鸡）、断奶仔猪的饲料添加剂，规定最低菌落含量为  $5 \times 10^5$  CFU/g。2003 年欧盟修订丁酸梭菌用作肉鸡、断奶仔猪的饲料添加剂，最低菌落含量为  $2.5 \times 10^5$  CFU/g。2013 年 4 月 24 日欧盟委员会发布（EU）No. 374/2013 法规，批准丁酸梭菌（*Clostridium butyricum*）用作蛋鸡饲料添加剂。本标准中规定丁酸梭菌  $\geq 1.0 \times 10^8$  CFU/g，高于国际标准。

## 六、与有关的现行法律法规和强制性国家标准的关系

在本标准的修订过程中严格遵守国家有关方针、政策、法律和规章等，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，遵循了政策性和协调性原则。

配套的推荐性标准包括 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/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 《饲料中镉的测定方法》、GB/T 13091 《饲料中沙门氏菌的测定》GB/T 13092 《饲料中霉菌总数的测定》、GB/T 18869 《饲料中大肠菌群的测定》、GB/T 30956 《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》、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》。

## 七、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

## 八、贯彻农业行业标准的要求和措施建议

本标准颁布以后，推荐饲料添加剂丁酸梭菌的相关管理要求符合本产品标准。

## 九、废止现行有关标准的建议

无。

## 十、其他应予说明的事项

无。

## 参考文献

- [1] GB 13078-2017 饲料卫生标准
- [2] NY/T 1444-2007 微生物饲料添加剂技术通则
- [3] GB/T 23181-2008 微生物饲料添加剂通用要求
- [4] GB/T 5917.1-2008 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法
- [5] GB/T 6435-2006 饲料中水分的测定
- [6] GB 10648-2013 饲料标签
- [7] GB/T 13079-2006 饲料中总砷的测定
- [8] GB/T 13080-2018 饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
- [9] GB/T 13081 饲料中汞的测定
- [10] GB/T 13082 饲料中镉的测定方法
- [11] GB/T 13091-2002 饲料中沙门氏菌的测定
- [12] GB/T 13092-2006 饲料中霉菌总数的测定
- [13] GB/T 18869-2019 饲料中大肠菌群的测定
- [14] GB/T 30956-2014 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法
- [15] NY/T 2071-2011 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
- [16] George M. Garrity, Julia A. Bell and Timothy G. Lilburn, Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of systematic bacteriology[M], Second Edition Release 5.0 May 2004.