

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4347—2023

饲料添加剂 丁酸梭菌

Feed additives—*Clostridium butyricum*

2023-04-11 发布

2023-08-01 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。

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。

本文件主要起草人：饶正华、曾新福、谷巍、李克克、张军民、刘金松、梁洛源、陆唯、焦京琳、高思祺、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术语和定义、技术要求、检验规则、标签、包装、运输、储存和保质期,描述了相应的取样和试验方法。

本文件适用于以丁酸梭菌为菌种,经液体发酵、浓缩、载体吸附、干燥等工艺制得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
- 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 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

属于芽孢杆菌科梭菌属,大小为(0.6~1.2) μm × (3.0~7.0) μm 直或微弯的杆菌,单个或成对、短链排列;有芽孢,芽孢卵圆形或短杆状、偏中生或次端生;专性厌氧;革兰氏阳性,培养后期可变为革兰氏阴性。

4 技术要求

4.1 载体

载体来自《饲料原料目录》或《饲料添加剂品种目录》。

4.2 外观与性状

产品颜色为白色至灰褐色,流动性好,颗粒大小均匀,无结块,无异物,无霉变,有丁酸梭菌发酵的特殊气味,无异味。

4.3 菌种鉴别

应符合附录 A 中所述的丁酸梭菌的形态和生理生化特性。必要时,进行分子生物学鉴定。

4.4 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/(%)	≤ 10.0

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,mg/kg	≤ 2
铅,mg/kg	≤ 10
汞,mg/kg	≤ 0.1
镉,mg/kg	≤ 2
黄曲霉毒素 B ₁ ^a , μ g/kg	≤ 30
玉米赤霉烯酮 ^a ,mg/kg	≤ 1
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 ^a ,mg/kg	≤ 5
霉菌总数,CFU/g	$\leq 4.0 \times 10^4$
大肠菌群,MPN/100 g	$\leq 1.0 \times 10^4$
沙门氏菌/(25 g)	不得检出

^a 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,与从其他包装取的样品共同放入同一个无菌取样容器内作为一件样品。

5.3 样品的保存和运输

5.3.1 应在接近原有保存温度条件下运输及保存样品,或采取必要措施尽快将样品送达实验室检验,以防止样品中微生物数量的变化。

5.3.2 运输过程中应保持样品完整。

6 试验方法

6.1 外观与性状

取适量试样于透明玻璃杯中,在自然光线下观察颜色,检查状态,嗅其气味。

6.2 菌种鉴别

观察亚硫酸铁琼脂上的菌落形态,挑取特征菌落进行革兰氏染色后在显微镜下观察菌体形态,并按附

录 A 规定的生理生化特性进行试验鉴定。分子生物学鉴定见附录 B。

6.3 丁酸梭菌活菌数

按照附录 C 的规定执行。

6.4 水分

按照 GB/T 6435 的规定执行。

6.5 总砷

按照 GB/T 13079 的规定执行。

6.6 铅

按照 GB/T 13080 的规定执行。

6.7 汞

按照 GB/T 13081 的规定执行。

6.8 镉

按照 GB/T 13082 的规定执行。

6.9 黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮

按照 NY/T 2071 的规定执行。

6.10 脱氧雪腐镰刀菌烯醇

按照 GB/T 30956 的规定执行。

6.11 霉菌总数

按照 GB/T 13092 的规定执行。

6.12 大肠菌群

按照 GB/T 18869 的规定执行。

6.13 沙门氏菌

按照 GB/T 13091 的规定执行。

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 50 t。

7.2 出厂检验

出厂检验项目为外观与性状、丁酸梭菌活菌数、水分。

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。在有如下情况之一时,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) 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项目不得复检。

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

8 标签、包装、运输、贮存和保质期

8.1 标签

按照 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共运。

8.4 储存

阴凉储存，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)
形态与生理生化特性

A.1 形态

丁酸梭菌菌体形态为：大小为 $(0.6\sim 1.2)\mu\text{m}\times(3.0\sim 7.0)\mu\text{m}$ 直或微弯的杆菌，单个或成对、短链排列；有芽孢，芽孢卵圆形或短杆状、偏中生或次端生；专性厌氧；革兰氏阳性，培养后期可变为革兰氏阴性。

在本文件中规定的试验条件下，丁酸梭菌的特征菌落形态为：菌落圆形，中心为黑色实心。

A.2 生理生化特性

丁酸梭菌的生理生化特性见表 A.1。

表 A.1 丁酸梭菌生理生化特性

特 征	结 果	特 性	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。

附 录 B
(资料性)
分子生物学鉴定

用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.1),进行 PCR 扩增、纯化和测序,用基因数据库进行序列比对,与模式菌株(ATCC 19398)的序列相似性 $\geq 99\%$ 时,判定为丁酸梭菌。

表 B.1 公牛体尺体重

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	

附 录 A
(规范性)
丁酸梭菌活菌计数

C.1 试剂或材料

除非另有说明,在分析中仅适用确认为分析纯的试剂。

C.1.1 水

应符合 GB/T 6682 中三级水的要求。

C.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 1 000 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 至 7.6 ± 0.2 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,倾注平皿备用。商品培养基按使用说明配制。

C.1.3 生理盐水吐温稀释液

称取 8.5 g 氯化钠,移取 10 mL 吐温 80,加入 1 000 mL 蒸馏水混匀, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

C.2 仪器设备和器具

C.2.1 天平:感量为 0.01 g。

C.2.2 拍击式均质器或振荡器。

C.2.3 厌氧罐:2.5 L 或 5 L(配厌氧产气袋)或相当性能的厌氧装置。

C.2.4 恒温培养箱:使用温度为 $(36 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

C.2.5 高压灭菌锅。

C.2.6 无菌吸管:容量为 1 mL、10 mL 或相当规格的移液器以及配套的无菌吸头。

C.2.7 广口瓶或三角瓶:容量为 500 mL。

C.2.8 无菌平皿:直径为 90 mm。

C.2.9 试管:15 mm \times 180 mm、18 mm \times 180 mm。

C.3 试验步骤

无菌条件下称取试样 25 g,加入装有 225 mL 灭菌生理盐水吐温稀释液的均质袋中,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 灭菌生理盐水吐温稀释液的试管中,充分混匀后,制成 1:100 稀释液。按上述操作方法,制备 10 倍递增系列稀释液,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 0.1 mL 稀释液加至干燥后的亚硫酸铁琼脂平板表面,用灭菌的涂布棒将稀释液均匀涂于表面。每个稀释度涂布 2 个平板,同时吸取 0.1 mL 灭菌生理盐水吐温稀释液作空白对照。待稀释液吸收后,再倾注 3 mL~5 mL 亚硫酸铁琼脂,均匀覆盖在平板表面,凝固后倒置放入厌氧罐里, $(36 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h~24 h。

丁酸梭菌的特征菌落形态为:菌落圆形,中心为黑色实心。选择菌落数在 20 个~200 个的平板。根据特征菌落形态,从中选出 5 个丁酸梭菌疑似菌落按生理生化特征(见 A.2)或分子生物学鉴定(B.1)进行鉴定。

C.4 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,计算出平板内的菌数,然后乘其稀释倍数即得每克样品中丁酸梭菌活菌数 A (CFU/g),按公式(C.1)计算。

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

式中:

- A ——每克样品中丁酸梭菌活菌数的数值,单位为菌落形成单位每克(CFU/g);
- B ——丁酸梭菌疑似菌落数的数值,单位为菌落形成单位(CFU);
- C ——5个鉴定的菌落中确认为丁酸梭菌菌落数的数值,单位为菌落形成单位(CFU);
- f ——稀释倍数的数值,单位为每克(g^{-1});
- 5 ——选出的丁酸梭菌疑似菌落的数值,单位为菌落形成单位(CFU)。

参考文献

- [1] 饲料原料目录[Z]. 中华人民共和国农业农村部. 2021.
 - [2] 饲料添加剂品种目录[Z]. 中华人民共和国农业农村部. 2021.
-