

国家标准《饲料中细菌总数的测定》
修订编制说明
(征求意见稿)

承担单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所
[国家饲料质量检验检测中心（北京）]
中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

二〇二二年七月十一日

目录

一、标准制定背景及任务来源	3
(一) 任务来源	3
(二) 修订背景	3
(三) 修订标准的必要性、可行性和协调性	3
(四) 修订工作过程	4
1. 成立标准修订小组	4
2. 查阅资料和搜集样品	4
3. 确定实验方案	6
4. 实验验证	6
5. 定向征求意见	6
6. 依据反馈意见对标准进行完善	6
7. 申请预审会	6
8. 申请终审会	6
二、标准修订原则和主要技术内容的确定	7
(一) 标准修订原则	7
(二) 主要修订内容	7
(三) 主要技术内容确定的依据	8
三、主要修订内容实验分析综述	8
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况	21
五、与有关法律、法规的关系	21
六、重大分歧意见的处理经过和依据	21
七、标准作为强制性或推荐性国家标准的建议	21
八、涉及专利的有关说明	21
九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议	21
十、其他应予说明的事项	22
参考文献	22

国家标准《饲料中细菌总数的测定》修订编制说明

一、标准制定背景及任务来源

（一）任务来源

本标准修订任务是国家标准化管理委员会批准的 2021 年推荐性国家标准修订任务，全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口，任务号 20213326-T-469。由中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所主持承担《饲料中细菌总数的测定》的修订工作，由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所承担该项目的修订工作。

（二）修订背景

细菌检测是通过对饲料及原料中细菌含量进行检验，以得出细菌指标，进而反映饲料及原料的新鲜程度或清洁程度、加工操作是否符合卫生要求、辨察饲料是否受污染、确证微生物性中毒的病因等等。

饲料在原料进厂、生产、储存、运输及销售等各个环节都有可能受到细菌的污染,造成饲料腐败变质或食源性疾病。多年来我国饲料中毒仍以动物性饲料的细菌等致病菌为主。细菌总数的检验是开展饲料卫生工作的重要手段。饲料及其原料细菌检验数据的可靠性直接关系到饲料和畜产品的安全。只有严格把控饲料卫生质量，才能更好为国家社会经济提供物质上的保证，为进一步提高我国饲料产品质量水平奠定基础。

“十四五”时期是我国由全面建成小康社会向基本实现社会主义现代化迈进的关键时期，饲料中细菌的检测，对推进生态环保、改善民生有着显著作用，是企业了解产品质量的重要保障，是保障人民食品安全的前提，没有质量安全的饲料及原料就不可能有质量安全的畜产品，因此，它是产业发展的重要保障。

（三）修订标准的必要性、可行性和协调性

饲料中细菌总数的测定是饲料微生物检验的主要组成部分，是用来判定饲料被细菌污染的程度及卫生质量，它反映饲料在生产过程中是否符合卫生要求，以便对被检样品做出适当的卫生学评价。菌落总数的多少在一定程度上标志着饲料卫生质量的优劣。细菌主要作为判定饲料被污染程度的标志，细菌总数的检测也可以观察细菌在饲料繁殖的动态，以便对被检样品进行卫生学评价时提供依据。菌落总数严重超标，说明其产品的卫生状况达不到基本的卫生要求，将会破坏饲

料的营养成分，加速饲料的腐败变质，使饲料失去饲喂价值。畜禽饲用细菌超标严重的饲料，很容易患痢疾等肠道疾病，可能引起呕吐、腹泻等症状，危害牲畜健康安全，进而影响到畜产品的安全。

从某种程度上看，饲料细菌检测在饲料卫生质量的安全评价和市场监管等方面承担着重要的作用，细菌总数的数量是导致饲料腐败变质的关键因素。饲料中细菌总数检测必须严格遵守国家饲料卫生标准的检验方法。

（四）修订工作过程

1.成立标准修订小组

2021年09月27日主持承担单位组织召开第一次会议，成立标准修订小组，由中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所主持承担《饲料中细菌总数的测定》的修订工作，由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所承担该项目的修订工作。主要起草人分工如下：

李丽蓓：承担修订标准的实验方案设计、实验工作、文本和编制说明起草。

谢秀兰：承担修订标准的资料查询，标准整理、修改及报批。

刘晓露：承担修订标准的文本整理、修改和标准报批。

娄迎霞：承担修订标准的实验和验证工作。

李征：承担修订标准的实验和验证工作。

姚婷：承担修订标准的文本编写和整理。

董雪：承担修订标准的实验工作。

樊霞：承担修订标准的文本修改。

会议安排了查阅资料，搜集样品种类，明确了实验方案，以及标准修订的进度日程，按规定时间完成。

2.查阅资料和搜集样品

修订小组2021年10月查阅了大量与细菌总数测定相关的国内外标准和资料，见表1。并搜集了饲料和饲料原料样品23个，见表2。结合实际样品情况，对这些资料进行整理；撰写标准文本和编制说明，准备标准征求意见稿，预审和终审的申报。

表1 国内外相关标准情况

标准号	名称
GB/T 13093-2006	饲料中细菌总数的测定
GB 4789.2-2022	食品微生物学检验 菌落总数的测定
GB/T 5750.12-2006	生活饮用水标准检验方法 微生物指标
SN/T 0168-2015	进出口食品中菌落总数计数方法
GB 18204.9-2000	游泳池水微生物检验方法 细菌总数测定
HJ 1000-2018	水质 细菌总数的测定 平皿计数法
ISO 4833-2013	Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms
AOAC 966.23	Microbiological Methods
AS 5013.5:2016	Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms
FDA BAM Chapter 3	Aerobic Plate Count

表2 准备样品

序号	产品类型	产品名称	标准允许量	检测方法
1	配合饲料	蛋鸡配合饲料	/	GB/T 13093-2006
2		仔猪配合饲料	/	
3	浓缩饲料	猪浓缩饲料	/	
4		鸡浓缩饲料	/	
5	饲料原料 (动物源性) GB 13078-2017 2×10^6	鱼粉(进口)	2×10^6	
6		鱼粉(国产)		
7		喷雾干燥猪血浆蛋白粉	GB/T 33914-2017	
8		喷雾干燥猪血球蛋白粉	2×10^5	
9		乳清粉	NY/T 1563-2007	
10		高蛋白乳清粉	1.5×10^4	
11		鸡肉粉	2×10^6	
12		水解羽毛粉	2×10^6	
13		鱼油	2×10^6	
14		马肉骨粉	GB/T 20193-2006	
15		猪肉骨粉	2×10^6	
16	饲料原料 (微生物发酵)	酿酒酵母提取物	NY/T 3316-2018 1×10^6	
17	饲料添加剂	饲用活性干酵母 酿酒酵母	GB/T 22547-2008 2×10^6	
18		饲用螺旋藻粉	GB/T 17243-1998 5×10^4	
19	精料补充料	牛精料补充料	/	
20		羊精料补充料	/	

21	饲料原料 (植物源性)	玉米蛋白粉	/	
22		豆粕	/	
23		菜籽粕	/	

根据 GB 13078-2017《饲料卫生标准》中规定，动物源性饲料的细菌总数要求，以及产品标准涉及到细菌总数的要求，同时考虑到饲料中常用的原料和配合饲料，课题组共搜集了 23 个样品，其中，配合饲料 2 个；浓缩饲料 2 个；精料补充料 2 个；动物源性饲料原料 11 个；植物性饲料原料 3 个；饲料添加剂 2 个，生物发酵饲料原料 1 个。

3.确定实验方案

2021 年 12 月~2022 年 04 月按照实验方案对培养基、培养时间、培养温度进行实验比较，最终确立修改文本。

2022 年 05 月~07 月起草征求意见稿和编制说明，并进行方法验证。

2022 年 08 月~09 月整理反馈意见，上报申请召开预审会。

2022 年 09 月~10 月预审会后，修改文本和编制说明。

2022 年 11 月上报申请召开终审会。

4.实验验证

2022 年 5~7 月，由北京市兽药饲料监测中心、山东省饲料兽药质量检验中心、中国农业科学院饲料研究所对修订后的标准进行方法验证。

5.定向征求意见

2022 年 8 月~9 月，通过发函的方式征询意见，经反馈意见对标准进行修改。本标准的修订广泛征求意见，共收到回函___份。收到意见___条，其中采纳___个、部分采纳___个、不采纳___个，归纳汇总后具体见《征求意见汇总处理表》。

6.依据反馈意见对标准进行完善

2022 年 9 月，根据反馈意见，对定向征求意见进行修改，完善标准正文和编制说明。

7.申请预审会

2022 年 10 月，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。

8.申请终审会

2022 年 11 月，根据预审会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，申请终审会。

二、标准修订原则和主要技术内容的确定

(一) 标准修订原则

本标准依据 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 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分：试验标准方法》的规定进行修订编制。

(二) 主要修订内容

本标准与 GB/T 13093-2006 相比，主要修订内容见表 3。

表 3 主要修订内容

序号	原标准章条号	本标准章条号	修改内容和原因
1	1 范围	1 范围	饲料原料（鱼粉等）修改为：饲料原料（动物源性、植物源性饲料原料）。跟饲料原料目录一致。
2	2 规范性引用文件	2 规范性引用文件	删除 GB/T14699.1 饲料 采样。没有用到。
3	5 设备及材料	5 仪器设备	将设备及材料修改为：仪器设备。规范文本。
4	6 培养基和试剂	6 培养基或材料	将培养基和试剂修改为：培养基或材料。规范文本。
5	6.1 营养琼脂培养基	6.1 平板计数琼脂培养基	营养琼脂培养基修改为：平板计数琼脂培养基。更适宜菌落生长，菌落形态便宜计数，并跟国内外接轨。
6	7 试样制备	7 样品	将试样制备修改为：样品，增加 7.1 采样原则、7.2 采样方法、7.3 采集样品的贮存和运输。现微生物采样没有标准可依，因此，增加采样原则、方法及贮存和运输，降低样品污染的风险。
7	8 测定程序	附录 B	将测定程序图放到附录 B（规范性附录）。规范文本。
8	8 测定步骤	9 试验方法	将测定步骤修改为：试验方法。规范文本。
9	9.1 试样稀释及培养	8.1 试样的稀释	将试样稀释及培养修改为： 8.1 试样的稀释（并在此章条中增加了空白试验）； 8.2 培养； 8.3 细菌计数。 使操作者一目了然，并规范了文本。
10		8.2 培养	
11		8.3 细菌计数	
12	9.1.6	8.2.1	将培养温度修改为：36℃±1℃；培养时间修改为：48h±2h。温度更适宜细菌生长，同时同国内外接轨。
13	9.3 细菌总数计数的报告	8.3 细菌计数	将细菌总数计数的报告修改为：细菌计数。报告另设一章条，使操作者一目了然，并规范了文本。

14	9.3.3 细菌总数报告	9 报告	将细菌总数报告修改为：报告和计算公式。在此章条中给出子章条 9.1 细菌总数的计算，给出计算公式和示例；9.2 细菌总数的报告，增加了修约的描述，以及空白试验的要求。使操作者一目了然，更加合理，并规范了文本。
----	--------------	------	--

（三）主要技术内容确定的依据

本标准修订确定的主要技术内容依据如下：

GB 4789.2-2022 《食品微生物学检验 菌落总数的测定》。

ISO 4833-2013 《Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms》。

GB/T 18869-2019 《饲料中大肠菌群的测定》。

三、主要修订内容实验分析综述

（一）培养基的确定

国内外标准用于测定细菌总数的培养基是平板计数琼脂培养基（PCA）和营养琼脂培养基（NA）两种，我们对两种培养基的成分进行了比较，见表 4。汇总国内外测定细菌总数测定的培养温度和培养时间，见表 5。我们对两种培养基进行了比较，见表 6～表 7。

表 4 用于细菌总数测定的培养基

2 种培养基 成分作用	营养琼脂培养基	平板计数琼脂培养基 (PCA)
成分	蛋白胨 10.0 g	胰蛋白胨 5.0 g
	牛肉膏 3.0 g	酵母浸膏 2.5 g
	氯化钠 5.0 g	葡萄糖 1.0 g
	琼脂 15.0 g	琼脂 15.0 g
	蒸馏水 1000 mL	蒸馏水 1000 mL
作用	蛋白胨和牛肉膏提供氮源、碳源、氨基酸和维生素；氯化钠提供均衡的渗透压。	胰蛋白胨提供氮源和碳源；酵母浸膏提供维生素；葡萄糖提供能源。

表 5 国内外细菌总数测定用的培养基、培养温度、培养时间

标准号	名称	培养基	培养温度 (°C)	培养时间 (h)
GB/T 13093-2006	饲料中细菌总数的测定	NA	30	72
GB 4789.2-2022	食品微生物学检验 菌落总数的测定	PCA	36、30	48、72
SN/T 0168-2015	进出口食品中菌落总数计数方法	PCA	36	48
HJ 1000-2018	水质 细菌总数的测定 平皿计数法	NA	36	48
ISO 4833-2013	Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms	PCA	30±1	72±3
AOAC 966.23	Microbiological Methods	PCA	35	48±2
AS 5013.5:2016	Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms	PCA	30±1	72±3
FDA BAM Chapter 3	Aerobic Plate Count	PCA	35	48±2

从表 4 中可以看出，PCA 里的胰蛋白胨比 NA 里的蛋白胨是更优质的“食物”，葡萄糖更适合细菌生长。平板计数琼脂（PCA）生长的菌落不容易运动，不容易造成蔓延，无法计数的现象。

从表 5 中可以看出，国内外除了我们现修订的饲料标准和环保行业的两个标准外，其余都是使用 PCA 培养基。

表 6 NA 和 PCA 培养基相同条件下的比较

样品编号	样品名称	PCA 30℃	NA 30℃
		72 h	72 h
1	蛋鸡配合饲料	1.6×10^4	1.6×10^4
2	仔猪配合饲料	1.0×10^7	1.0×10^7
3	猪浓缩饲料	5.3×10^6	5.1×10^6
4	鸡浓缩饲料	6.8×10^6	8.2×10^6
5	国产鱼粉	1.6×10^4	1.1×10^4
6	进口鱼粉	3.8×10^3	6.6×10^3
7	喷雾干燥猪血球蛋白粉	1.8×10^4	1.8×10^4
8	喷雾干燥猪血浆蛋白粉	1.4×10^4	1.2×10^4
9	乳清粉	3.5×10^2	1.2×10^3
10	高蛋白乳清粉	1.5×10^2	2.5×10^2
11	鸡肉粉	4.3×10^4	6.7×10^4
12	水解羽毛粉	1.5×10^5	1.7×10^5
13	鱼油	65	25
14	酿酒酵母提取物	3.0×10^2	1.5×10^2
15	酿酒酵母	90	65
16	饲料用螺旋藻粉	1.5×10^4	1.3×10^4
17	牛精料补充料	3.4×10^4	2.6×10^4
18	羊精料补充料	2.0×10^4	1.8×10^4
19	马肉骨粉	2.0×10^5	2.4×10^5
20	猪肉骨粉	4.2×10^4	4.2×10^4
21	玉米蛋白粉	7.0×10^2	2.0×10^2
22	豆粕	2.9×10^4	3.0×10^4
23	菜籽粕	5.2×10^4	2.7×10^4

表 7 NA 和 PCA 培养基不同条件下的比较

样品编号	样品名称	PCA 36°C	NA 30°C
		48h	72h
1	蛋鸡配合饲料	1.9×10^4	1.6×10^4
2	仔猪配合饲料	1.1×10^7	1.0×10^7
3	猪浓缩饲料	5.2×10^6	5.1×10^6
4	鸡浓缩饲料	7.2×10^6	8.2×10^6
5	国产鱼粉	1.1×10^4	1.1×10^4
6	进口鱼粉	3.2×10^3	6.6×10^3
7	喷雾干燥猪血球蛋白粉	1.1×10^4	1.8×10^4
8	喷雾干燥猪血浆蛋白粉	1.1×10^4	1.2×10^4
9	乳清粉	4.0×10^2	1.2×10^3
10	高蛋白乳清粉	1.5×10^2	2.5×10^2
11	鸡肉粉	3.9×10^4	6.7×10^4
12	水解羽毛粉	1.4×10^5	1.7×10^5
13	鱼油	45	25
14	酿酒酵母提取物	3.1×10^2	1.5×10^2
15	酿酒酵母	40	65
16	饲料用螺旋藻粉	6.8×10^3	1.3×10^4
17	牛精料补充料	2.6×10^4	2.6×10^4
18	羊精料补充料	1.9×10^4	1.8×10^4
19	马肉骨粉	1.8×10^5	2.4×10^5
20	猪肉骨粉	4.2×10^4	4.2×10^4
21	玉米蛋白粉	3.0×10^2	2.0×10^2
22	豆粕	2.6×10^4	3.0×10^4
23	菜籽粕	5.5×10^4	2.7×10^4

同时，我们也对两种培养基分别进行了相同条件下和不同条件下的比较，见表 6 和表 7。

NA 和 PCA 培养基在相同条件下（实验结果见表 6），对两组数据进行了统计学的 T 检验分析， $p=0.3917$ ，两者之间差异不显著。

NA 和 PCA 培养基在不同条件下（实验结果见表 7），对两组数据进行了统计学的 T 检验分析， $p=0.9296$ ，两者之间差异不显著。

从以上结果可以看出，不管是方法相同和不同，差异都不显著（ $p>0.05$ ），特别是不同的检测方法，差异更不显著（ $p=0.9296$ ）。同时我们查阅一些文献报道，在重复几百次试验后，PCA 培养基上细菌生长会更好，因平板计数琼脂(PCA)生长的菌落不容易运动，不容易造成蔓延，无法计数的现象。

同时，我们主要依据 GB 4789.2-2022《食品微生物学检验 菌落总数的测定》、ISO 4833-2013 《Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms》的检测方法，以及参考 AOAC、FDA、AS 等方法和国内进出口检验的方法，都是使用 PCA 培养基。根据我们的实验结果，以及参考其它行业国家标准，最终培养基修改为平板计数琼脂培养基（PCA），与国内外接轨。

（二）培养温度的确定

培养基确立后，我们对 23 个不同种类的样品进行 30℃和 36℃培养温度进行比较，见表 8。

表 8 PCA 培养基 30℃和 36℃

样品编号	样品名称	PCA 30℃	PCA 36℃	相对标准偏差 RSD (%)
		48h	48h	
1	蛋鸡配合饲料	1.5×10^4	1.9×10^4	1.8
2	仔猪配合饲料	1.0×10^7	1.1×10^7	0.2
3	猪浓缩饲料	5.1×10^6	5.2×10^6	0.11
4	鸡浓缩饲料	6.6×10^6	7.2×10^6	0.21
5	国产鱼粉	1.6×10^4	1.1×10^4	2.7
6	进口鱼粉	3.6×10^3	3.2×10^3	1.0
7	喷雾干燥猪血球蛋白粉	1.2×10^4	1.1×10^4	0.70
8	喷雾干燥猪血浆蛋白粉	1.2×10^4	1.1×10^4	0.70
9	乳清粉	3.5×10^2	4.0×10^2	1.7
10	高蛋白乳清粉	1.5×10^2	1.5×10^2	0
11	鸡肉粉	3.9×10^4	3.9×10^4	0
12	水解羽毛粉	1.4×10^5	1.4×10^5	0
13	鱼油	45	45	0
14	酿酒酵母提取物	3.0×10^2	3.1×10^2	0.28
15	酿酒酵母	80	80	0
16	饲料用螺旋藻粉	9.3×10^3	6.8×10^3	2.5
17	牛精料补充料	3.0×10^4	2.6×10^4	1.1
18	羊精料补充料	1.8×10^4	1.9×10^4	0.33
19	马肉骨粉	2.0×10^5	1.8×10^5	0.54
20	猪肉骨粉	4.0×10^4	4.2×10^4	0.61
21	玉米蛋白粉	3.0×10^2	3.0×10^2	0
22	豆粕	2.6×10^4	2.9×10^4	0.80
23	菜籽粕	5.0×10^4	5.5×10^4	0.60

实验结果从表 8 中可以看出，PCA 培养基用 30℃和 36℃ 分别培养 48 小时，70%的结果基本相同或高于 30℃的结果；相对标准偏差 RSD 在 0%~2.5% 之间；对两组数据进行了统计学的 T 检验分析， $p=0.1552$ ，两者之间差异不显著；微生物细菌的生长温度也是 36℃最为适宜；同时我们参考 GB 4789.2-2022《食品微生物学检验 菌落总数的测定》，用 36℃培养更加反应样品的菌落情况。

考虑到大部分细菌（益生菌）都是用 36℃温度培养，省去了检测单位培养箱的单独设置和检定。因此，我们最终决定培养温度为 36℃。

(三) 培养时间的确定

在确定了培养基和培养温度后，我们对 23 个不同种类的样品进行了培养时间的比较，见表 9。

表 9 PCA 培养基 36℃，48h 和 72h 比较

样品编号	样品名称	PCA 36℃	PCA 36℃
		48h	72h
1	蛋鸡配合饲料	1.9×10^4	2.0×10^4
2	仔猪配合饲料	1.1×10^7	1.1×10^7
3	猪浓缩饲料	5.2×10^6	5.2×10^6
4	鸡浓缩饲料	7.2×10^6	7.2×10^6
5	国产鱼粉	1.1×10^4	1.2×10^4
6	进口鱼粉	3.2×10^3	3.2×10^3
7	喷雾干燥猪血球蛋白粉	1.1×10^4	1.2×10^4
8	喷雾干燥猪血浆蛋白粉	1.1×10^4	1.2×10^4
9	乳清粉	1.0×10^2	1.0×10^2
10	高蛋白乳清粉	1.5×10^2	2.5×10^2
11	鸡肉粉	3.6×10^4	4.0×10^4
12	水解羽毛粉	1.4×10^5	1.4×10^5
13	鱼油	45	65
14	酿酒酵母提取物	3.1×10^2	1.0×10^2
15	酿酒酵母	40	45
16	饲料用螺旋藻粉	6.8×10^3	7.7×10^3
17	牛精料补充料	2.6×10^4	2.9×10^4
18	羊精料补充料	1.9×10^4	2.0×10^4
19	马肉骨粉	1.8×10^5	1.9×10^5
20	猪肉骨粉	4.2×10^4	4.2×10^4
21	玉米蛋白粉	3.0×10^2	3.0×10^2
22	豆粕	2.6×10^4	2.9×10^4
23	菜籽粕	5.5×10^4	5.6×10^4

实验结果从表 9 中可以看出，PCA 培养基 36℃ 分别培养 48h 和 72h 后，两个培养时间的结果基本相同，对两组数据进行了统计学的 T 检验分析， $p=0.7806$ ，两者之间差异不显著。同时我们参考 GB 4789.2-2022《食品微生物学

检验 菌落总数的测定》和进出口食品、AOAC 和 FDA，都是 36℃，培养 48 h，并考虑到时长和简便性。因此，我们最终决定培养时间为 48 h。

（四）精密度和准确度试验

1.重复性实验（实验室内再现性）

培养条件确立后，我们使用赋值的质控样品进行精密度和准确度的实验，详细情况见表 10。《中国药典》2020 年版第四部，指导原则 9012 生物样品定量分析方法验证指导原则中准确度规定：该方法测得值与分析物标示浓度的接近程度，表示为： $(\text{测定值}/\text{真实值}) \times 100\%$ 。实验结果从表 10 中可以看出，准确度为：101%，中国药典微生物的实验要求，30~300 CFU/皿，RSD 值 < 15%，相对标准偏差 RSD 为：2.9%，符合要求。

同时，我们按照 RB/T 151-2016《食品微生物定量检测测量不确定度评估指南》，对质控样品和搜集的样品中挑选不同含量梯度的样品（1 号蛋鸡配合饲料、3 号猪浓缩饲料、4 号鸡浓缩饲料、9 号乳清粉、11 号鸡肉粉、15 号酿酒酵母、18 号羊精料补充料、19 号马肉骨粉、23 号菜籽粕）共 9 个样品进行了实验室内再现性实验（重复性实验），进行统计分析（微生物检测数据是偏态分布，所以结果以 10 为底对数转换后进行计算），也均符合要求，在误差范围之内。见表 11~表 20。

表 10 准确度和精密度实验

序号	样品名称	PCA36℃, 48h	
		测定值 CFU/g	平均值 CFU/g
1	CICC (FTQC-02-01)	1.4×10^3	1.42×10^3
2		1.4×10^3	
3		1.4×10^3	
4		1.4×10^3	
5		1.4×10^3	
6		1.5×10^3	
结果		参考值 (CFU/mL): 1.4×10^3 , 参考值范围 (CFU/mL): $5.7 \times 10^2 \sim 3.5 \times 10^3$. 准确度: 101 % 相对标准偏差 (RSD) : 2.9 %	

表 11 样品实验室内再现性标准偏差 (PCA 36 °C, 48h)

样品名称	n	X_{iA}	X_{iB}	$y_{iA}=\log_{10}(X_{iA})$	$y_{iB}=\log_{10}(X_{iB})$	$(y_{iA} - y_{iB})^2/ 2$
质控样品	1	1.4×10^3	1.5×10^3	3.15	3.18	0.00045
	2	1.4×10^3	1.4×10^3	3.15	3.15	0
	3	1.4×10^3	1.5×10^3	3.15	3.18	0.00045
	4	1.4×10^3	1.4×10^3	3.15	3.15	0
	5	1.4×10^3	1.4×10^3	3.15	3.15	0
	6	1.5×10^3	1.5×10^3	3.18	3.18	0
	结果	参考值 (CFU/mL): 1.4×10^3 ; 参考值范围 (CFU/mL): $5.7 \times 10^2 \sim 3.5 \times 10^3$ 。 再现性标准偏差为: 0.03 (log10) CFU/g				
1 号样品 (蛋鸡配合饲料)	1	1.9×10^4	2.0×10^4	4.28	4.30	0.0002
	2	2.0×10^4	2.1×10^4	4.30	4.32	0.0002
	3	2.1×10^4	2.2×10^4	4.32	4.34	0.0002
	4	1.8×10^4	1.9×10^4	4.26	4.28	0.0002
	5	2.2×10^4	2.0×10^4	4.34	4.30	0.0004
	6	2.1×10^4	2.2×10^4	4.32	4.34	0.0002
	结果	再现性标准偏差为: 0.02 (log10) CFU/g				
3 号样品 (猪浓缩饲料)	1	1.1×10^7	1.0×10^7	7.04	7.00	0.0016
	2	1.1×10^7	1.3×10^7	7.04	7.11	0.0049
	3	1.2×10^7	1.1×10^7	7.08	7.04	0.0016
	4	1.2×10^7	9.9×10^6	7.08	7.00	0.0064
	5	9.8×10^6	9.6×10^6	6.99	6.98	0.0001
	6	1.1×10^7	1.2×10^7	7.04	7.08	0.0016
	结果	再现性标准偏差为: 0.05 (log10) CFU/g				
4 号样品 (鸡浓缩饲料)	1	6.6×10^6	7.0×10^6	6.82	6.85	0.00045
	2	6.8×10^6	7.1×10^6	6.83	6.85	0.0002
	3	7.2×10^6	7.5×10^6	6.86	6.88	0.0002
	4	8.0×10^6	8.2×10^6	6.90	6.91	0.00005
	5	8.2×10^6	8.5×10^6	6.91	6.93	0.0002
	6	1.0×10^7	1.3×10^7	7.00	7.11	0.00605
	结果	再现性标准偏差为: 0.03 (log10) CFU/g				
9 号样品 (乳清粉)	1	3.5×10^2	4.1×10^2	2.54	2.61	0.00245
	2	3.5×10^2	4.2×10^2	2.54	2.62	0.0032
	3	4.0×10^2	4.3×10^2	2.60	2.63	0.00045

	4	4.0×10^2	3.6×10^2	2.60	2.56	0.0008
	5	4.0×10^2	4.5×10^2	2.60	2.65	0.00125
	6	4.5×10^2	5.0×10^2	2.65	2.70	0.00125
	结果	再现性标准偏差为：0.04 (log10) CFU/g				
11号样品 (鸡肉粉)	1	3.9×10^4	4.3×10^4	4.59	4.63	0.0004
	2	4.3×10^4	5.0×10^4	4.63	4.70	0.00245
	3	4.0×10^4	4.5×10^4	4.60	4.65	0.00125
	4	3.9×10^4	4.2×10^4	4.59	4.62	0.00045
	5	6.4×10^4	6.0×10^4	4.81	4.78	0.00045
	6	6.7×10^4	6.1×10^4	4.83	4.79	0.0008
	结果	再现性标准偏差为：0.03 (log10) CFU/g				
15号样品 (酿酒酵母)	1	80	90	1.90	1.95	0.00125
	2	90	110	1.95	2.04	0.00405
	3	80	95	1.90	1.98	0.0032
	4	80	105	1.90	2.02	0.0072
	5	60	80	1.78	1.90	0.0072
	6	65	100	1.81	2.00	0.01805
	结果	再现性标准偏差为：0.08 (log10) CFU/g				
18号样品 (羊精料补充料)	1	1.8×10^4	2.2×10^4	4.26	4.34	0.0032
	2	2.0×10^4	2.5×10^4	4.30	4.40	0.005
	3	1.9×10^4	2.3×10^4	4.28	4.36	0.0032
	4	2.0×10^4	2.6×10^4	4.30	4.41	0.00605
	5	1.3×10^4	1.7×10^4	4.11	4.23	0.0072
	6	1.8×10^4	2.4×10^4	4.26	4.38	0.0072
	结果	再现性标准偏差为：0.07 (log10) CFU/g				
19号样品 (马肉骨粉)	1	2.0×10^5	2.6×10^5	5.30	5.41	0.00605
	2	2.0×10^5	2.5×10^5	5.30	5.40	0.005
	3	1.8×10^5	2.3×10^5	5.26	5.36	0.005
	4	1.9×10^5	2.4×10^5	5.28	5.38	0.005
	5	2.2×10^5	2.7×10^5	5.34	5.43	0.00405
	6	2.4×10^5	2.8×10^5	5.38	5.45	0.00245
	结果	再现性标准偏差为：0.07 (log10) CFU/g				
23号样品 (菜籽粕)	1	5.0×10^4	5.5×10^4	4.70	4.74	0.0008
	2	5.2×10^4	5.7×10^4	4.72	4.76	0.0008

	3	5.5×10^4	6.0×10^4	4.74	4.78	0.008
	4	5.6×10^4	6.1×10^4	4.75	4.79	0.008
	5	4.6×10^4	5.1×10^4	4.66	4.71	0.00125
	6	4.4×10^4	5.0×10^4	4.64	4.70	0.0018
	结果	再现性标准偏差为：0.06 (log ₁₀) CFU/g				

2.再现性实验（实验室内再现性）

实验室内再现性：按照要求，我们2022年5月~7月，由北京市兽药饲料监测中心（实验室—1）、山东省饲料兽药质量检验中心（实验室—2）、中国农业科学院饲料研究所（实验室—3）所对修订后的标准方法进行方法验证。我们挑取了12个不同含量和不同种类的样品，实验室分别进行测定。对实验间的数据进行实验室内再现性的统计分析。

三家验证单位和本单位共4个单位的再现性符合要求，没有超出RSD 15%。相对标准偏差RSD均在0.8~11.0%以内，见表21。

表 12 实验室内结果再现性

序号	样品名称	实验室—1 CFU/g (mL)	实验室—2 CFU/g (mL)	实验室—3 CFU/g (mL)	实验室—4 CFU/g (mL)	相对标准偏差 RSD (%)
1	蛋鸡配合饲料	1.2×10^4	2.0×10^4	1.0×10^4	1.9×10^4	3.6
2	猪浓缩饲料	4.6×10^6	4.2×10^6	4.1×10^6	5.2×10^6	0.8
3	国产鱼粉	1.0×10^4	1.1×10^4	3.5×10^4	1.1×10^4	8.3
4	乳清粉	1.2×10^2	90	1.7×10^2	1.0×10^2	5.9
5	鸡肉粉	1.0×10^4	4.7×10^4	5.7×10^4	3.6×10^4	7.6
6	水解羽毛粉	1.7×10^5	1.5×10^5	1.7×10^5	1.4×10^5	0.8
7	鱼油	65	30	58	45	8.7
8	螺旋藻粉	1.7×10^3	6.2×10^3	4.5×10^3	6.8×10^3	7.6
9	牛精料补充料	8.0×10^3	2.2×10^4	2.4×10^4	2.6×10^4	5.6
10	马肉骨粉	2.0×10^5	1.4×10^5	3.6×10^5	1.8×10^5	3.3
11	玉米蛋白粉	8.4×10^2	2.4×10^2	2.0×10^2	3.0×10^2	11.0
12	豆粕	1.9×10^4	2.7×10^4	1.6×10^4	2.6×10^4	2.5
备注	微生物检测数据是偏态分布，所以结果以10为底对数转换后进行计算。					

3.回收率实验

在确定了方法后，选择已知质控样品 CICC (FTQC-02-01) 1.4×10^3 CFU/mL, 添加到含量接近的 6 号进口鱼粉样品 (3.2×10^3 CFU/g), 做添加回收试验。

根据《中国药典》2020 年版微生物检测回收率的要求 50~200%之间，我们测得的结果符合要求，见表 13。

表 13 样品回收率试验

样品编号	未加标含量(CFU/g)	加标含量 (CFU/g)	测定值 (CFU/g)	回收率 (%)
6-1	3.2×10^3	1.4×10^3	3.5×10^3	76
6-2			3.9×10^3	85
6-3			4.0×10^3	87

(五) 细菌总数的计算公式

原标准的计算公式是两个稀释度进行比较，若比值小于2取平均数，若大于2取稀释倍数低的。现依据统计学的原理，计算公式中增加了修正因子，同时参照国际标准和食品标准，更加合理和准确，并对不同含量和不同稀释度可能出现的结果给出了实例，便于操作者使用。

细菌总数的报告，增加了修约的描述，以及空白试验的要求。使操作者一目了然，更加合理，并规范了文本。修改如下：

1. 若只有一个稀释度平板上的细菌数在适宜计数范围内，计算两个平板细菌数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每g (mL) 样品中细菌总数结果。

示例1:

单位为CFU/g(mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	多不可计, 多不可计	160, 168	20, 26	16400

上述数据按9.2.2数字修约后, 表示为16000或 1.6×10^4 。

2. 若有两个连续稀释度的平板细菌数在适宜计数范围内时，按下列公式计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

式中：

N ——样品中细菌数；

$\sum C$ ——平板(含适宜范围细菌数的平板)细菌数之和；

n_1 ——第一稀释度(低稀释倍数)平板个数；

n_2 ——第二稀释度(高稀释倍数)平板个数；

d ——稀释因子(第一稀释度)。

示例2: 单位为CFU/g(mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	多不可计, 多不可计	252, 264	44, 46	27545

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} = \frac{252+264+44+46}{[2+(0.1 \times 2)] \times 10^{-2}} = 27545$$

上述数据按9.2.2数字修约后, 表示为28000或 2.8×10^4 。

3. 若所有稀释度的平板上细菌数均大于300 CFU, 则对稀释度最高的平板进行计数, 其他平板可记录为多不可计, 结果按平均细菌数乘以最高稀释倍数计算。

示例3: 单位为CFU/g(mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	多不可计, 多不可计	多不可计, 多不可计	308, 318	313000

上述数据按9.2.2数字修约后, 表示为310000或 3.1×10^5 。

4. 若所有稀释度的平板细菌数均小于30 CFU, 则应按稀释度最低的平均细菌数乘以稀释倍数计算。

示例4: 单位为CFU/g(mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	25, 29	2, 6	0, 0	270

上述数据按9.2.2数字修约后, 表示为270或 2.7×10^2 。

5. 若所有稀释度(包括液体样品原液)平板均无细菌生长, 则以小于1乘以最低稀释倍数计算。

示例5: 单位为CFU/g(mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	0, 0	0, 0	0, 0	<10

6. 若所有稀释度的平板细菌数均不在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的平均细菌数乘以稀释倍数计算。

示例6: 单位为CFU/g(mL)

稀释度	1:10	1:100	1:1000	结果计算
细菌数	305, 311	19, 24	2, 4	3080

上述数据按9.2.2数字修约后, 表示为3100或 3.1×10^3 。

(六) 修改试样的制备

原标准章节7为“试样的制备”, 此次修订将试样的制备修改为: 7 样品。增加7.1 采样原则、7.2 采样方法、7.3 采集样品的贮存和运输。现微生物采样没有标准可依, 因此, 参考GB/T 18869-2019《饲料中大肠菌群的测定》7中的要求, 增加采样原则、方法及贮存和运输, 降低样品污染的风险。

(七) 结论

经过上述试验方法的确立和方法的验证, 试验的重复性符合《中国药典》2020年版第四部微生物的实验要求, 30~300 CFU/皿, RSD 值<15%。对质控样品和不同含量梯度的样品进行实验室内再现性实验(重复性), 按照 RB/T 151-2016《食品微生物定量检测测量不确定度评估指南》进行统计分析, 符合实验的要求, 再现性标准偏差在 0.02%~0.08%之间。回收率在 69%~87%之间。

通过我们的实验结果和参考国内外的标准, 最终我们主要修改了培养基为平板计数培养基(PCA), 确立了培养温度和培养时间, 以及细菌总数的计算方法, 使标准更加准确的检测细菌总数, 并与国际接轨, 减少因检测结果的误差, 造成贸易纠纷。缩短了检测时间, 减少了资源的浪费。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

没有等同、等效和修改采用国际和国外标准。

五、与有关法律、法规的关系

本标准的制定可为饲料质量安全的评价、相关质量标准指标的制订和贯彻执行提供直观的指导。

在标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章。与相关的各种基础标准相衔接

与有关的现行法律法规和强制性国家标准没有冲突和重复。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准的修订广泛征求意见, 包括科研院所、检验机构、生产企业, 根据反馈意见对标准的《征求意见稿》、《送审稿》进行修改, 无重大分歧意见。

七、标准作为强制性或推荐性国家标准的建议

该标准经修订后建议作为推荐性标准发布。

八、涉及专利的有关说明

没有涉及有关的专利。

九、贯彻国家标准的要求, 以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

为了贯彻实施本国家标准, 建议相关职能部门指导, 指定制修订单位进行相

关检测人员进行技术培训。

十、其他应予说明的事项

无

参考文献

- [1] GB 4789.2-2022 食品微生物学检验 菌落总数的测定
- [2] ISO 4833-2013 《Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms》
- [3] GB/T 18869-2019 饲料中大肠菌群的测定
- [4] GB 13078-2017 饲料卫生标准