

中华人民共和国强制性国家标准  
《饲料添加剂 第5部分：微生物  
凝结芽孢杆菌》  
(公开征求意见稿)

编制说明

武汉新华扬生物股份有限公司  
中国农业科学院饲料研究所  
湖北华扬科技发展有限公司

2024年8月

# 目录

一、 工作简况（包括任务来源、制定背景、工作过程等） .....	1
（一） 任务来源 .....	1
（二） 制定背景 .....	1
（三） 工作过程 .....	2
1. 起草阶段 .....	3
2. 定向征求意见 .....	3
3. 第三方验证 .....	3
4. 预审 .....	3
5. 公开征求意见 .....	4
二、 编制原则、强制性国家标准主要技术要求的依据（包括验证报告、统计数据等）及理由 .....	4
（一） 标准编制原则 .....	4
（二） 主要技术要求确定的依据 .....	4
1 国内外生产情况 .....	4
2 标准范围 .....	12
3 术语和定义 .....	12
4 凝结芽孢杆菌的鉴别试验 .....	12
5 活菌数测定方法 .....	36
6 芽孢数测定方法 .....	42
7 活菌数和芽孢数的确定 .....	42
8 杂菌率 .....	43
9 外观与性状 .....	46
10 水分 .....	48
11 粒度 .....	48
12 总砷的测定 .....	48
13 铅的测定 .....	49
14 汞的测定 .....	50

15 镉的测定 .....	51
16 霉菌总数 .....	52
17 大肠菌群的测定 .....	52
18 沙门氏菌的测定 .....	53
19 黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> 测定 .....	53
20 玉米赤霉烯酮的测定 .....	54
21 脱氧雪镰刀菌烯醇的测定 .....	55
22 保质期 .....	56
23 与已发布同类标准指标比较 .....	56
(三) 第三方验证 .....	57
三、与有关法律、行政法规和其他强制性标准的关系，配套推荐性标准的制定情况 .....	57
四、与国际标准化组织、其他国家或者地区有关法律法规和标准的比对分析 .....	58
五、重大分歧意见的处理过程、处理意见及依据 .....	58
六、对强制性国家标准自发布日期至实施日期的过渡期（以下简称为过渡期）的建议及理由 .....	58
七、与实施强制性国家标准有关的政策措施 .....	58
八、是否需要对外通报的建议及理由 .....	59
九、废止现行有关标准的建议 .....	59
十、涉及专利的有关说明 .....	59
十一、强制性国家标准所涉及的产品、过程或者服务目录 .....	59
十二、其他应予说明的事项 .....	59

# 一、工作简况（包括任务来源、制定背景、工作过程等）

## （一）任务来源

本标准制定任务来源于全国饲料工业标准化技术委员会，项目任务编号为20221496-Q-326。

起草单位：武汉新华扬生物股份有限公司、中国农业科学院饲料研究所、湖北华扬科技发展有限公司。

主要起草人：徐丽、乔宇、石波、周樱、詹志春。

## （二）制定背景

目前，自我国成为世界第一大饲料生产国后，更加注重饲料的高质量发展，饲料质量安全成为饲料工业高质量发展的核心要素。饲料行业进入无抗时代，饲料中不允许添加药物性饲料添加剂。以益生菌为代表的肠道健康产品在应对饲料全面“禁抗”中起到了关键作用。农业农村部2004年第372号公告批准饲用凝结芽孢杆菌作为饲料添加剂使用，并在2008年公布的《饲料添加剂品种目录》中列入保护期内的新饲料和新饲料添加剂。

凝结芽孢杆菌的首次发现可以追溯到1915年，Hammer发现凝结芽孢杆菌引起大规模的罐装炼乳凝结，1932年凝结芽孢杆菌被首次分离。在发现之初凝结芽孢杆菌被称为芽孢乳酸杆菌（*Lactobacillus sporogenes*），具有杆菌科和乳酸菌科的共同特征，后来才更名为凝结芽孢杆菌（*B.coagulans*）。Gupta等（2020）为了明确芽孢杆菌的进化关系和物种分类，对300株芽孢杆菌们进行了全面的系统基因组学比较分析。结果发现，除了枯草芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌所在分支外，其余大多数芽孢杆菌物种形成了17个新的不同分支。基于系统发育和分子证据，研究者建议从芽孢杆菌物种分出17个新属，命名为 *Alteribacter*, *Ectobacillus*, *Evansella*, *Ferdinandcohnia*, *Gottfriedia*, *Heyndrickxia*, *Lederbergia*, *Litchfieldia*, *Margalitia*, *Niallia*, *Priestia*, *Robertmurraya*, *Rossellomorea*, *Schinkia*, *Siminovitchia*, *Sutcliffiella*, *Weizmannia*。其中凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）所在分支独立为魏茨曼氏菌属（*Weizmannia*，纪念微生物学家和生物化学学家、以色列首任总统 Chaim Weizmann），相应改名为凝结魏茨曼氏菌（*Weizmannia coagulans*）。2023年NARSING等基于全基因组序列分析在属水平将凝结魏茨曼氏菌又更名

为海恩德里克斯氏菌属 (*Heyndrickxia coagulans*)。

作为批准允许使用的微生物类饲料添加剂，凝结芽孢杆菌具有独特的性质。凝结芽孢杆菌是兼性厌氧菌，在不良条件下形成芽孢，具有强抗逆性和耐热性，抵抗胃肠道内的极端环境，具有益生菌特征。凝结芽孢杆菌最适生长温度为 35℃~50℃，最适生长 pH 为 5.5~6.5。少数耐高温凝结芽孢杆菌在 pH 6.2, 60℃~65℃ 也能生长。在 pH 4.5, 65℃ 的环境中也曾分离到凝结芽孢杆菌。凝结芽孢杆菌在 100℃ 处理 10 分钟，存活率可达 96%，能耐受饲料加工过程中的高温、高压环境。能够进行乳酸发酵，产生的 L-乳酸能降低肠道 pH 值。在动物日粮中添加凝结芽孢杆菌能够：1) 抑制病原菌的增殖，促进双歧杆菌、乳酸菌等增殖并合成多种 B 族维生素，增强机体对营养物质的吸收，提高养殖动物的生长性能。2) 促进乳酸菌等有益菌的增殖，对致病菌有拮抗作用，优化动物肠道。3) 凝结芽孢杆菌能诱导动物体内炎症介质和抗炎细胞因子产生，激发免疫系统保护宿主减少炎症反应。4) 凝结芽孢杆菌提高调节肝脏中抗氧化酶和抗氧化酶的转录调节水平来缓解机体氧化应激。

凝结芽孢杆菌作为微生物类饲料添加剂已被列入饲料添加剂品种目录中，但尚未有饲料添加剂凝结芽孢杆菌的国家标准或行业标准，只有云南省标准化协会发布团体标准《饲料添加剂 凝结芽孢杆菌的测定》 T/YNBX 024-2021，北京生物饲料产业技术创新战略联盟发布团体标准《饲料添加剂 凝结芽孢杆菌》 T/CSWSL 022-2020 和辽宁省市场监督管理局发布辽宁省地方标准《饲用微生物制剂中凝结芽孢杆菌的检测》 DB21/T 3278-2020。国外也没有关于饲料添加剂凝结芽孢杆菌的具体标准可以查询。欧盟于 2020 年 11 月 25 日批准凝结芽孢杆菌 DSM 32016 作为饲料添加剂用于哺乳和断奶仔猪、家禽育肥和观赏鸟类，规定在含水率 12% 全价饲料中的最低含量为  $1 \times 10^9$  CFU/kg，并规定了菌落计数 (EN 15787 方法) 以及菌种鉴别的方法 (脉冲场凝胶电泳)。

由于缺乏统一的标准进行规范约束和验证，导致市场上产品质量难以监控，阻碍了该产品在饲料行业的应用。为了规范该类产品在饲料工业及畜牧生产中的使用，更好地发挥该类产品抗病促生长的优势，保护生产者和消费者的合法利益，迫切需要制定该标准。

### (三) 工作过程

## 1. 起草阶段

2023年1月~9月，确定起草组并进行分工，完成初稿。

武汉新华扬生物股份有限公司（徐丽、周樱）：收集查询国内企业标准并进行比较整理，汇总为参考依据。建立凝结芽孢杆菌活菌及芽孢数的检测方法，收集市场流通微生态制剂产品，论证杂菌率方法，进行活菌数、芽孢数、质量指标、卫生指标等的检测。

中国农业科学院饲料研究所（乔宇、石波）：查询国内登记注册厂家信息，查询国际国外标准情况及相关文献。收集咨询国内生产厂家相关信息，并收集样品。建立凝结芽孢杆菌的鉴别方法，并对收集的样品进行测试。征询生产企业及用户关于标准制定的意见和建议。

湖北华扬科技发展有限公司（詹志春）：提供产品生产及市场背景信息，以及生产过程数据信息，提供标准制修订资源，协调项目运行。

经过三方对初步数据的汇总讨论，初步确定标准中各参数及数值，并按照GB/T 1.1-2020形成了标准文本及编制说明初稿。

## 2. 定向征求意见

2023年10月~12月进行定向征求意见，发函单位34个，回函单位27个，未回函单位7个；提出意见单位24个，无意见单位3个。发函单位性质包括生产企业，科研院所，第三方检测机构及使用企业。共提出意见134条；采纳98条，部分采纳2条，不采纳34条。提出的意见主要包括书写规范、格式要求、杂菌率及杂菌检测方法、液态剂型、颗粒剂型及粒度、鉴定方法、毒素指标及毒素检测方法等方面的问题。

## 3. 第三方验证

2024年1月~4月完成三家方法验证，由中国农业科学院饲料研究所委托国家饲料质量检验检测中心，武汉新华扬生物股份有限公司委托湖北省饲料质量监督检验站和辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院共同完成，三家检测结果显示预审稿中检测方法及鉴定方法适用于饲料添加剂凝结芽孢杆菌。

## 4. 预审

2024年6月起草组向全国饲料工业标准化技术委员会提交预审申请。2024

年7月30日，全国饲料工业标准化技术委员会微生物及酶制剂标准化工作组组织专家对武汉新华扬生物股份有限公司等单位起草的强制性国家标准《饲料添加剂 第5部分：微生物 凝结芽孢杆菌》（预审稿）进行了认真审查。专家组由饶正华、杨曙明、曹云鹤、韩小敏、张晓琳、羊宋贞、阮静、乔琳组成。列席企业代表有北京挑战生物技术有限公司王海燕、北京昕大洋科技发展有限公司余艳、昆明三正生物科技（集团）有限公司李亚平。在听取起草专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出了修改意见。与会专家一致同意标准起草单位按照意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

## 5. 公开征求意见

2024年8月，起草组提交公开征求意见稿。

## 二、 编制原则、强制性国家标准主要技术要求的依据（包括验证报告、统计数据等）及理由

### （一）标准编制原则

本文件根据 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》及 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的规定进行编制。

参考国内外标准，如 NY/T 1444-2007《微生物饲料添加剂技术通则》、GB/T 23181-2008《微生物饲料添加剂通用要求》、GB 13078-2017《饲料卫生标准》、《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》、团体标准、同类产品标准、企业标准中各项技术指标，结合实测数据进行制定。

### （二）主要技术要求确定的依据

#### 1 国内外生产情况

##### 1.1 国内外标准情况

目前国内在国家标准和行业标准中，尚无凝结芽孢杆菌的检测方法标准和产

品标准。云南省标准化协会发布团体标准 T/YNBX 024-2021《饲料添加剂 凝结芽孢杆菌的测定》，北京生物饲料产业技术创新战略联盟发布团体标准 T/CSWSL 022-2020《饲料添加剂 凝结芽孢杆菌》，辽宁省市场监督管理局发布辽宁省地方标准 DB21/T 3278-2020《饲用微生物制剂中凝结芽孢杆菌的检测》。

国际标准化组织 2013 年颁布了芽孢杆菌落计数的方法：食物链微生物学微生物计数的水平法第 1 部分：用倒板技术在 30℃ 下的菌落计数(ISO 4833-1-2013)。欧盟于 2020 年 11 月 25 日批准凝结芽孢杆菌 DSM 32016 作为饲料添加剂用于哺乳和断奶仔猪、家禽育肥和观赏鸟类，规定在含水率 12%全价饲料中的最低含量为  $1 \times 10^9$  CFU/kg，并规定了菌落计数（EN 15787 方法）以及菌种鉴别的方法（脉冲场凝胶电泳）。

## 1.2 国内外生产情况

目前国际品牌饲料添加剂凝结芽孢杆菌在国内基本未见销售，国内已有多家企业致力于饲用凝结芽孢杆菌的研发、生产及应用，经查询注册生产的企业有 83 家，生产型企业收集的样品及保藏中心菌种见下表 1。

国内生产厂家大多采用液体深层发酵工艺生产凝结芽孢杆菌，产品为固体剂型为主。生产工艺大致流程：斜面培养 → 摇瓶培养 → 种子罐 → 发酵罐 → 浓缩 → 载体吸附 → 干燥 → 成品包装。凝结芽孢杆菌菌种经过斜面培养、摇瓶培养至种子罐培养，在种子罐培养至适宜阶段转移到发酵罐中，发酵过程监测并控制发酵液的溶氧、温度、pH 等指标，待发酵罐中菌体生长至芽孢生成率达到一定比例停止发酵。发酵液经一定处理后添加载体后进行干燥，按要求计量、包装。

对比凝结芽孢杆菌团标和企标（见表 2），85%饲料添加剂凝结芽孢杆菌中卫生指标是按照 NY/T 1444-2007 中规定执行的，有 50%以上的企标删除了杂菌率。而混合型饲料添加剂凝结芽孢杆菌企标中技术指标差异就比较大，主要差异在卫生指标如总砷、铅、汞、镉、霉菌总数、大肠菌群的规定上。绝大部分企业采用的液体发酵生产凝结芽孢杆菌，极个别企业使用固态发酵生产。

剂型：剂型主要为固体型产品，也有企标涉及液体产品。但是市场流通产品只有固态产品，因液体产品储存稳定性不及固态产品，市场需求有限，未收集到在售的饲料添加剂级别的液态产品。饲料添加剂液态凝结芽孢杆菌企标包括河南



炎黄生物工程有限公司和湖北雅琪生物科技有限公司两家公司，混合型饲料添加剂液态凝结芽孢杆菌包括河南省派特生物科技有限公司，山西宇弘晟生物科技有限公司，河南百草元兽药有限公司，艾倪生物技术(镇江)有限公司，青岛尚德生物技术有限公司，河南伟佳大成牧尔康生物技术有限公司等单位。经过电话咨询以上企业涉及液体产品企标的企业，均表示无产品市场中流通。

载体：企标中标识的载体无机类的有石粉、麦饭石、滑石粉、蒙脱石粉、轻质碳酸钙、沸石粉、凹凸棒石粉、高岭土等，有机类的有葡萄糖、稻壳粉、玉米淀粉、饲用天然植物、玉米皮、麦芽糊精、玉米、白酒糟、麸皮、玉米胚芽粕、棉粕、豆粕、糊精、蛋白胨、氯化钠、淀粉等。

表 1：凝结芽孢杆菌样品信息

序号	标识	描述	来源
1	CMGCC1.0007	30°C培养，含 30%甘油菌液	中国微生物菌种保藏中心
2	CMGCC1.2009	30°C培养，含 30%甘油菌液	中国微生物菌种保藏中心
3	CMGCC1.2407	37°C培养，含 30%甘油菌液	中国微生物菌种保藏中心
4	凝结芽孢杆菌	粉末， $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	江苏奕农生物股份有限公司
5	凝结芽孢杆菌	粉末， $1.0 \times 10^{11}$ CFU/g	北京科为博生物科技有限公司
6	凝结芽孢杆菌	粉末， $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	山东益昊生物科技有限公司
7	凝结芽孢杆菌	粉末	青岛尚德生物技术有限公司
8	凝结芽孢杆菌	粉末	青岛根源生物技术集团有限公司
9	凝结芽孢杆菌	粉末， $1.0 \times 10^9$ CFU/g	山东宝来利来生物工程有限公司
10	凝结芽孢杆菌	粉末， $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	山东宝来利来生物工程有限公司
11	凝结芽孢杆菌	粉末， $\geq 5.0 \times 10^9$ CFU/g	山东济宁市金益菌生物科技有限公司
12	凝结芽孢杆菌	粉末， $\geq 1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	山东济宁市金益菌生物科技有限公司
13	凝结芽孢杆菌	粉末， $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	山东蔚蓝生物科技有限公司
14	凝结芽孢杆菌	粉末， $10 \times 10^8$ CFU/g	青岛贝宝海洋科技有限公司
15	凝结芽孢杆菌	粉末， $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	山东天润和生物工程有限公司
16	凝结芽孢杆菌	粉末， $2.0 \times 10^{10}$ CFU/g	山东天润和生物工程有限公司
17	凝结芽孢杆菌	粉末， $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	山东得和明兴生物科技有限公司
18	凝结芽孢杆菌	粉末， $\geq 5.0 \times 10^{10}$ CFU/g	武汉新华扬生物股份有限公司

19	凝结芽孢杆菌	粉末, $\geq 5.0 \times 10^{10}$ CFU/g	湖北华扬科技发展有限公司
20	凝结芽孢杆菌	粉末, $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	江苏微康生物科技有限公司
21	凝结芽孢杆菌	粉末, $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	湖北华扬科技发展有限公司
22	凝结芽孢杆菌	粉末, $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	湖南普菲克生物科技有限公司
23	凝结芽孢杆菌	粉末, $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	安徽省正一生物科技有限公司
24	凝结芽孢杆菌	粉末, $1.0 \times 10^{10}$ CFU/g	武汉新华扬生物股份有限公司
25	CCTCC AB 92066	模式菌株	中国典型培养物保藏中心

表 2：企标汇总分析

序号	标准号	种类	黄曲霉 B1 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	玉米赤霉烯酮/ ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	脱氧雪腐镰刀菌烯醇 / ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	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)	是否阴凉 贮存	菌数 ( $\text{CFU}/\text{g}$ )	外观	载体
1	TCSWCL 022-2020	饲添	$\leq 10$	/	/	$\leq 2.0$	$\leq 5.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	$\leq 1$	$\leq 10$	3.0-7.0	固态 6 月, 液态 3 月	是	$\geq 5.0 \times 10^9$ $\geq 5.0 \times 10^8$		
2	Q/370215 JKH 007-2022	混添	/	/	/	$\leq 10$	$\leq 30$	/	/	/	/	/	/	$\leq 12$	/	24	否	$10^8$ - $10^9$	浅黄色至棕色	葡萄糖、稻壳粉、石粉
3	Q/PT 044-2021	混添	/	/	/	$\leq 10$	$\leq 30$	/	/	/	/	不得检出	/	/	2.0-9.5	12	否	$10^6$ - $10^8$	色泽均一	纯化水
4	Q/SYHS 017-2020	混添	$\leq 10.0$	/	/	$\leq 10.0$	$\leq 30.0$	/	/	/	/	不得检出	$\leq 1.0$	/	4.0-7.0	18	否	$10^6$ - $10^7$	色泽均一	纯化水
5	Q/370784SYJ	混添	$\leq 10.0$	/	/	$\leq 2.0$	$\leq 5.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	$\leq 1.0$	$\leq 12$	/	18	否	$10^4$ - $10^{11}$		
6	Q/HNFL 006-2022	混添	$\leq 10.0$	/	/	$\leq 10$	$\leq 40$	/	/	/	/	/	/	$\leq 10$	/	12	否	$10^6$ - $10^9$	色泽均一	葡萄糖, 玉米淀粉
7	Q/370902SBL	混添	$\leq 10.0$	/	/	$\leq 10$	$\leq 20$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	$\leq 0.5$	$\leq 10$	/	12	否	$10^8$ - $10^{10}$	灰褐色	麦饭石
8	Q/12HNY 002-2022	混添	$\leq 10.0$	/	/	$\leq 2.0$	$\leq 5.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出	$\leq 1.0$	$\leq 12$	/	24	否	$10^7$ - $10^{12}$		石粉、饲用天然植物
9	Q/370214SDS 024-2021	混添	$\leq 10.0$	/	/	$\leq 2.0$	$\leq 5.0$	$\leq 0.1$	$\leq 0.5$	$< 2.0 \times 10^4$	$\leq 100$	不得检出	/	$\leq 10$	/	12	否	$10^9$ - $10^{10}$	淡黄色	滑石粉, 玉米皮, 葡萄糖, 麦芽糊精

10	Q/370283QRQ 038-2022	混添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤0.5	≤10	/	12	是	10 <sup>7</sup> -10 <sup>10</sup>	灰白色	滑石粉
11	Q/(GD)HNC 79-2022	混添	/	/	/	≤2.0	≤5.0	/	/	/	/	/	/	≤10	/	12	否	10 <sup>9</sup> -10 <sup>10</sup>		
12	Q/HBCY 025-2022	混添	≤10.0	/	/	≤20	≤40	/	/	/	/	/	/	/	<7.0	24	否	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>		纯化水
13	Q/370702WDY 009-2018	混添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤0.5	≤12	/	18	是	10 <sup>7</sup> -10 <sup>11</sup>	灰白、 淡黄	玉米、玉米皮粉、白酒糟、麸皮、玉米胚芽粕、棉粕、蒙脱石粉、豆粕、石粉、高岭土、麦饭石、石粉、玉米淀粉、糊精、葡萄糖
14	Q/320681 WCA02-2022	混添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤0.5	≤10	/	12	否	>10 <sup>10</sup>		玉米淀粉、葡萄糖、凹凸棒石粉
15	Q/ANS 036-2022	混添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤1.0	/	4.0-8.0	12	是	10 <sup>7</sup> -10 <sup>10</sup>		纯化水
16	Q/370214SDS 104-2022	混添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤10.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	/	/	4.0-6.0	12	否	10 <sup>8</sup>		生活饮用水
17	Q/XH 023-2019	混添	/	/	/	≤10	≤30	/	/	/	/	/	/	/	2.0-7.0	18	否	10 <sup>5</sup> -10 <sup>9</sup>		

18	Q/HSRZH 044-2022	混添	/	/	/	≤10	≤30	/	/	/	/	不得检出	/	/	3.0-7.5	18	否	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>		纯化水
19	Q/HYKJ 006-2022	混添	/	/	/	≤5	≤10	/	/	/	/	/	≤1.0	≤10	/	/	是	10 <sup>6</sup> -10 <sup>10</sup>	黄色 - 黄褐色	石粉、沸石粉、麦芽糊精
20	Q/371325FKN 107-2020	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤1.0	≤12		12	否	10 <sup>9</sup> -10 <sup>11</sup>		轻质碳酸钙、玉米淀粉、糊精
21	Q/370211QDH 008-2021	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤1.0	≤7		24	否	≥10 <sup>9</sup>		葡萄糖、蛋白胨、氯化钠
22	Q/XMCK 035-2021	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤1.0	/	5.0-7.0	12	否	10 <sup>7</sup> -10 <sup>9</sup>		
23	Q/BAK 08-2021	饲添- 固态 发酵	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤1.0	≤10		12	否	≥10 <sup>9</sup>	褐色	
24	Q/OCPE103-20 21	饲添	/	/	/	≤2.0	≤5.0	/	/		≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	/	≤12		12	否	10 <sup>9</sup> -10 <sup>10</sup>		
25	Q/HYH T005-2021	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	/	≤13	3.0-7.5	液体18 固态24	是	10 <sup>4</sup> -10 <sup>8</sup>		
26	Q/320584 WKSW 02-2021	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤1.0	≤12			是	≥10 <sup>8</sup>		
27	Q/YBS013-202 1	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	/	≤10		12	否	10 <sup>9</sup> -10 <sup>10</sup>		
28	Q/370402 JNS021-2022	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	/	≤10		12	否	≥10 <sup>10</sup>		稻壳粉、石粉、轻质碳酸钙、麦芽糊

																				精、葡萄糖
29	Q/371621SLH 038-2017	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤1.0	≤12		12	是	10 <sup>9</sup> -10 <sup>11</sup>		淀粉
30	Q/HBYQ 29-2022	饲添	/	/	/	≤2.0	≤5.0	/	/	/	/	不得检出	/	/	/	固态-6 液体-3	否			
31	Q/KAK 11-2022	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤2.0	≤10		12	否	10 <sup>9</sup> -10 <sup>10</sup>		
32	Q/370902SBL 103-2022	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出		≤10		12	否	10 <sup>9</sup> -10 <sup>11</sup>	褐色	
33	Q/HLHM 009-2021	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出		≤10		12	是	≥10 <sup>10</sup>		
34	Q/JXHSW 014-2022	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤1.0	≤9		12	是	≥10 <sup>9</sup> ≥10 <sup>10</sup>		
35	Q/HHDR 016-2022	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.1×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤1.0	≤10		12	否	≥10 <sup>11</sup>		
36	Q/HYKJ 04-2021	饲添	/	/	/	≤5	≤10	/	/	/	/	/	≤1.0	≤10		12	是	≥10 <sup>9</sup> ≥10 <sup>10</sup>		
37	Q/653222XKL	饲添	≤10.0	/	/	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	<2.0×10 <sup>4</sup>	≤1.0×10 <sup>4</sup>	不得检出	≤0.5	≤10	/	12	否	10 <sup>9</sup> -10 <sup>11</sup>	微黄色	

## 2 标准范围

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

本文件适用于以凝结芽孢杆菌为菌种，经发酵生产、添加或不添加载体、干燥等工艺制得的饲料添加剂凝结芽孢杆菌。

## 3 术语和定义

参考《Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (2015)》和《常见细菌系统鉴定手册》，结合标准制定过程中凝结芽孢杆菌的特性，描述了凝结芽孢杆菌的术语如下：

凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans*（凝结魏茨曼氏菌 *Weizmannia coagulans*、凝结海恩德里克斯氏菌 *Heyndrickxia coagulans*）：属于厚壁菌门、芽孢杆菌科、海恩德里克斯氏菌属。单个细菌呈椭圆或杆状。具运动性。产芽孢，芽孢呈椭圆形或球形，位于孢子囊中，中生到次端生。无鞭毛。革兰氏阳性。

## 4 凝结芽孢杆菌的鉴别试验

《中华人民共和国药典》2020年版（ChP 2020）四部相关检查法和指导原则（通则 1001、1021、9202、9204、9205、9206）已提供了较为完备的微生物鉴定体系，多种现代鉴定技术均可实现对污染微生物“种”、“属”水平的鉴定。依据《伯杰氏系统细菌学手册》中的菌种形态鉴定和生理生化实验鉴定，并结合菌种的分子生物学鉴定方法可实现微生物的准确鉴定。

### 4.1 形态鉴定

菌体形态：参考《Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (2015)》和《常见细菌系统鉴定手册》操作步骤对凝结芽孢杆菌菌体和芽孢进行染色，显微镜下进行菌体形态观察。凝结芽孢杆菌单个细菌呈杆状。具运动性、产芽孢，芽孢呈椭圆形或球形，芽孢位于孢子囊中，偶尔位于菌体中心或末端；少量菌株不易产生孢子。

菌落形态：挑取凝结芽孢杆菌单菌落划线于 MRS 固体培养基上，进行菌落形态观察。40℃ 培养 48 h，菌落直径 0.5~3 mm，菌落呈白色凸起，表面光滑，边缘整齐；随着培养时间的延长，菌落颜色变成奶油色（图 1）。

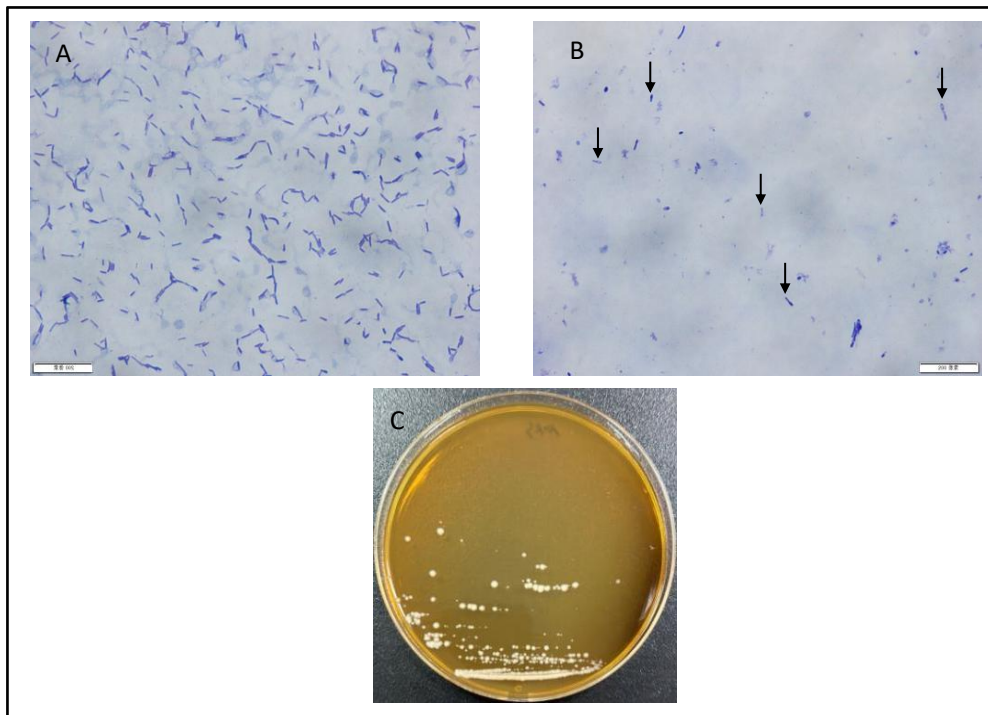


图 1-1: 凝结芽孢杆菌的菌体形态

注: A 凝结芽孢杆菌的菌体形态 ( $\times 100$  倍油镜); B 凝结芽孢杆菌的芽孢形态 ( $\times 100$  倍油镜); C 凝结芽孢杆菌的菌落形态

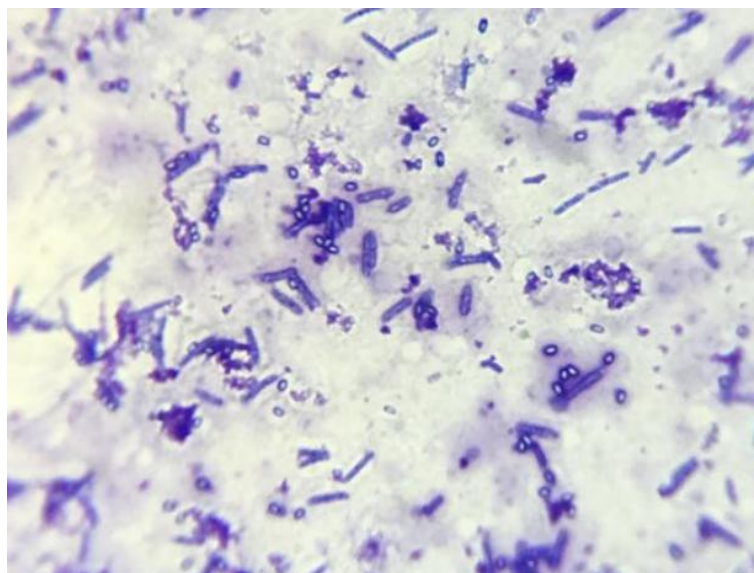


图 1-2: 凝结芽孢杆菌发酵过程中菌体形态

#### 4.2 生理生化实验



凝结芽孢杆菌呈杆状，形成芽胞，从形态特征上不易与其它芽孢杆菌区分。因此，选取常见的几种芽孢杆菌，根据《伯杰氏系统细菌学手册》(Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (2015)) 和《常见细菌系统鉴定手册》中芽孢杆菌属种间鉴别特征，确定凝结芽孢杆菌的生理生化鉴定指标。

表 3: 生理生化

特 征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌
细胞直径 > 1.0 $\mu$ m	—	—	—	—	+	+
运动性	+	+	+	+	+	+
厌氧生长	+	—	+	—	—	+
接触酶	+	+	+	+	+	+
V-P 测定	d	+	+	+	—	+
D-葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+
D-甘露糖产酸	+	+	+	+	—	—
D-甘露醇产酸	—	+	+	+	+	—
L-阿拉伯糖产酸	d	+	+	+	+	—
D-木糖产酸	d	+	+	+	+	—
水解明胶	d	+	+	+	+	+
水解淀粉	+	+	+	—	+	+
水解酪蛋白	—	+	+	+	+	+
利用柠檬酸盐	—	+	+	+	+	+
利用丙酸盐		—	+	—		
卵黄反应	—	—	+	—	—	+
硝酸盐还原	—	+	+	—	d	d
生长 NaCl: 2%	+	+	+	+	+	+
生长 NaCl: 5%	—	+	+	+	+	+
生长 NaCl: 7%	—	+	+	+	+	d
生长 NaCl: 10%	—	d		+	—	
生长温度: 5 $^{\circ}$ C		d	—	d	d	
生长温度: 10 $^{\circ}$ C		d	—	d	d	d
生长温度: 20 $^{\circ}$ C		+	+	+	+	+
生长温度: 30 $^{\circ}$ C	+	+	+	+	+	+
生长温度: 40 $^{\circ}$ C	+	+	+	+	d	+
生长温度: 50 $^{\circ}$ C	d	d	+	d	d	
生长温度: 55 $^{\circ}$ C	d	d	d	—	d	
生长温度: 65 $^{\circ}$ C	—	—	—	—	—	

注: +,  $\geq 90\%$ 菌株为阳性; —,  $\geq 90\%$ 菌株为阴性; d, 11%~89%菌株为阳性。

#### 4.2.1 细胞直径

不同芽孢杆菌染色后在显微镜下观察利用测微尺测定细胞大小，结果如图 2

所示。

表 4: 不同芽孢杆菌细胞直径

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
细胞直径 >1.0 μm	-	-	-	-	+	+	+

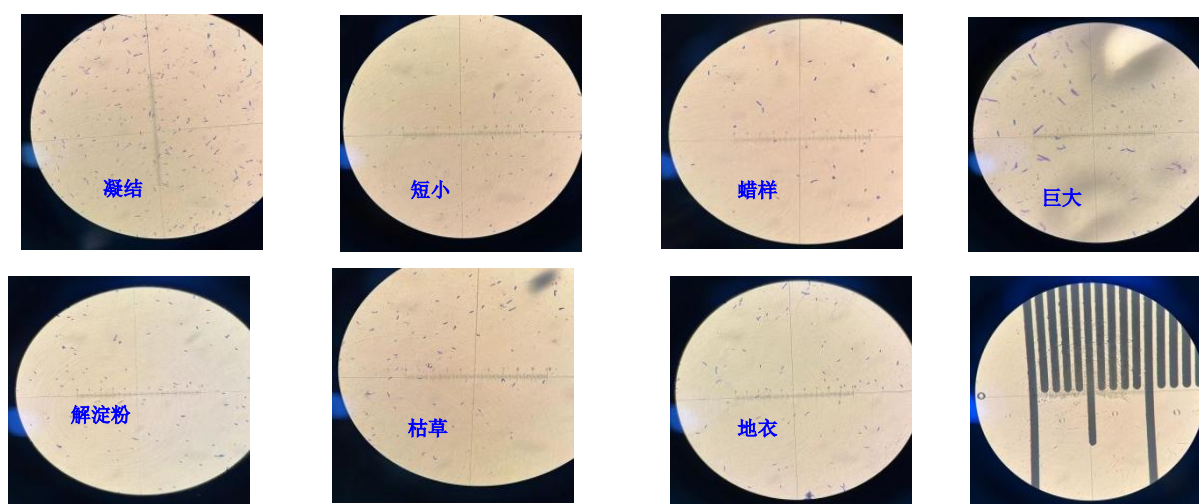


图 2: 不同芽孢杆菌在显微镜下的细胞大小

#### 4.2.2 运动性

根据有鞭毛的细菌可以在半固体培养基中游动却又不能任意游走的现象，观察细菌生长情况，判定试验菌是否有运动性。具体操作为用直针穿刺接种试验菌于含 0.4%琼脂的半固体培养基中培养。如生长物只生长在穿刺线上，边缘十分清晰，则表示试验菌无运动性；如生长物由穿刺线向四周呈云雾状扩散，其边缘呈云雾状，则表示试验菌有运动性。将不同芽孢杆菌置于厌氧培养箱进行培养中，观察生长情况。

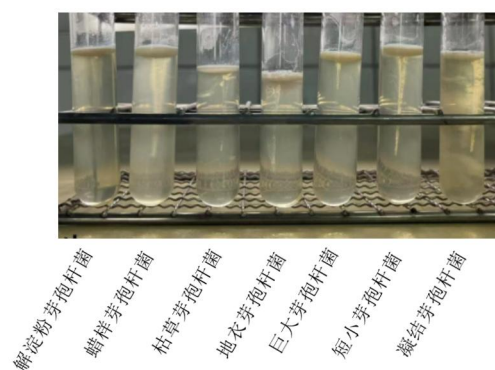


图 3: 不同芽孢杆菌的运动性

表 5: 不同芽孢杆菌的运动性和厌氧生长情况

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
运动性	+	+	+	+	+	+	+
厌氧生长	+	-	+	-	-	+	-

#### 4.2.3 接触酶

将 24h 培养的斜面菌，以接种环取一小环涂抹于已滴有 3%过氧化氢的玻璃片上，如有气泡产生则为阳性，无气泡则为阴性。不同芽孢杆菌的接触酶特征如图 4 和表 6 所示。7 种芽孢杆菌均为接触酶阳性。

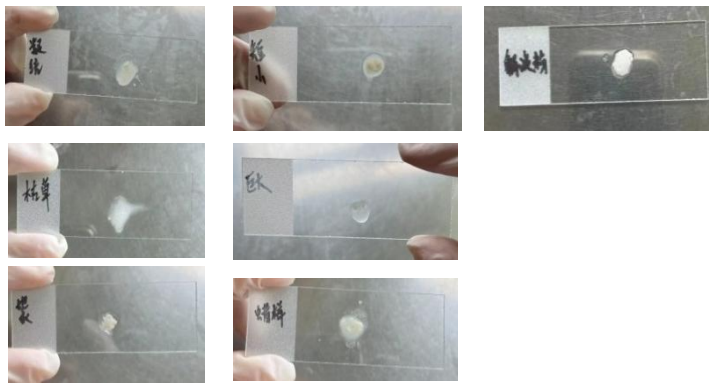


图 4: 不同芽孢杆菌接触酶试验结果

表 6: 不同芽孢杆菌的接触酶特征

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
接触酶	+	+	+	+	+	+	+

#### 4.2.4 VP 试验

培养基: 蛋白胨 7g, 葡萄糖 5g, 磷酸氢二钾 5g, 水 1000ml, pH 7~7.2。  
 操作步骤: 单菌落到上述培养基, 37℃, 24 h。加 3 滴 vp 试剂甲液, 1 滴乙液, 震荡。红色为阳性, 若为黄色, 继续培养 4 h 观察。不同芽孢杆菌 VP 试验结果如图 5 和表 7 所示。

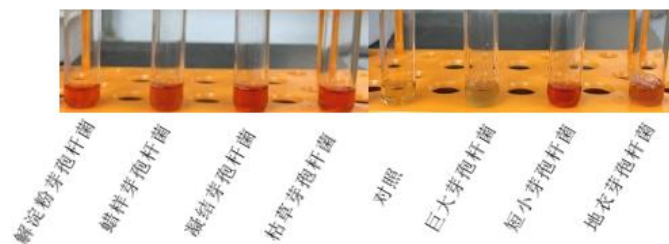


图 5: 不同芽孢杆菌 VP 试验结果

表 7: 不同芽孢杆菌的 V-P 测定结果

特 征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
V-P 测定	+	+	+	+	-	+	+

#### 4.2.5 水解酪蛋白

将不同芽孢杆菌划线于牛奶平板上培养，若菌落周围被分解透明即为阳性，否则为阴性。不同芽孢杆菌水解酪蛋白特性不同，结果如图 6 和表 8 所示。

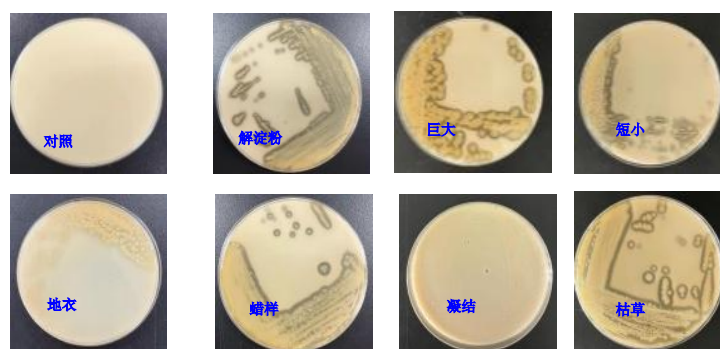


图 6: 不同芽孢杆菌酪蛋白水解试验结果

表 8: 不同芽孢杆菌的水解酪蛋白测定结果

特 征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
水解酪蛋白	-	+	+	+	+	+	+

#### 4.2.6 水解淀粉

将不同芽孢杆菌划线于添加 0.2%可溶性淀粉的固体培养平板上，培养 2-5 天形成明显菌落后，在平板上滴加碘液平板呈蓝黑色，菌落周围如有不变色透明圈，表示淀粉水解阳性，仍是蓝黑色为阴性。不同芽孢杆菌水解淀粉特性不同，结果如图 7 和表 9 所示。

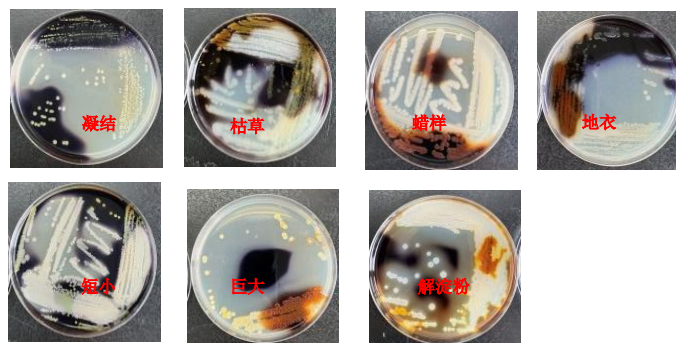


图 7: 不同芽孢杆菌水解淀粉结果

表 9：不同芽孢杆菌的水解淀粉结果

特 征	凝结芽胞杆菌	枯草芽胞杆菌	地衣芽胞杆菌	短小芽胞杆菌	巨大芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	解淀粉芽胞杆菌
水解淀粉	—	+	+	—	+	+	+

#### 4.2.7 利用柠檬酸盐

将不同芽孢杆菌划线于含 0.2%柠檬酸钠和酚红液指示剂的固体斜面上, 30℃ 培养 3-7 天。培养基为碱性（指示剂桃红色）者为阳性，否则为阴性。不同芽孢杆菌利用柠檬酸盐的结果不同，如图 8 和表 10 所示。

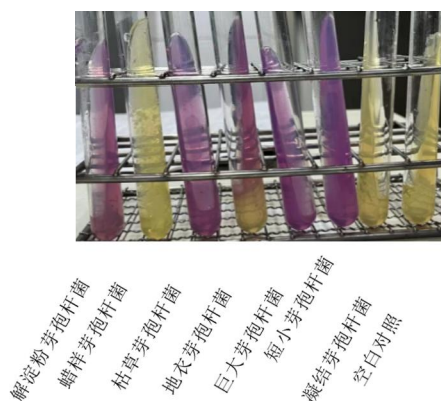


图 8：不同芽孢利用柠檬酸盐结果

表 10：不同芽孢杆菌的利用柠檬酸盐结果

特 征	凝结芽胞杆菌	枯草芽胞杆菌	地衣芽胞杆菌	短小芽胞杆菌	巨大芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌	解淀粉芽胞杆菌
利用柠檬酸盐	—	+	+	+	+	—	+

#### 4.2.8 利用丙酸盐

将不同芽孢杆菌接种于含 0.3%丙酸盐和溴百里酚蓝指示剂的液体培养基中, 培养 1-3 天。培养基由绿变蓝者为阳性，培养基不变色为阴性。

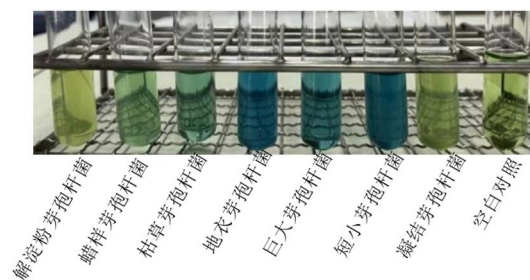


图 9：不同芽孢利用丙酸盐结果

表 11：不同芽孢杆菌的利用丙酸盐结果

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
利用丙酸盐	—	—	+	+	+	—	—

#### 4.2.9 水解明胶

配制含 0.5%蛋白胨，15%明胶的培养基。取不同芽孢杆菌培养物穿刺接种，于 20℃ 中培养，观察菌的生长情况及明胶液化现象。如菌已生长，明胶表面无凹陷且为稳定的凝块，则为明胶水解阴性。如明胶凝块部分或全部在 20℃ 以下变为可流动的液体，则为明胶水解阳性。如菌已生长，明胶未液化，但明胶表面菌苔下出现凹陷小窝，也是轻度水解，按阳性记录。

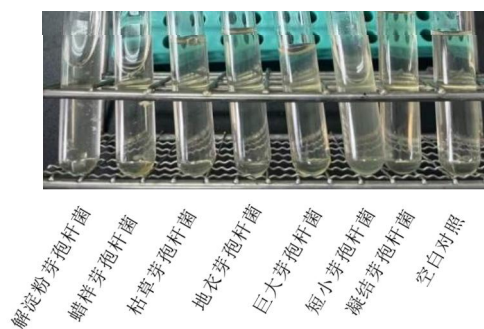


图 10：不同芽孢杆菌水解明胶结果

表 12：不同芽孢杆菌水解明胶结果

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
水解明胶	—	—	—	+	—	+	+

#### 4.2.10 卵黄反应

将不同芽孢杆菌在卵黄平板上划线培养 3-7 天，如菌落周围和下面有不透明的区域出现，表明芽孢杆菌分解卵磷脂生成脂肪，即为阳性。否则为阴性。

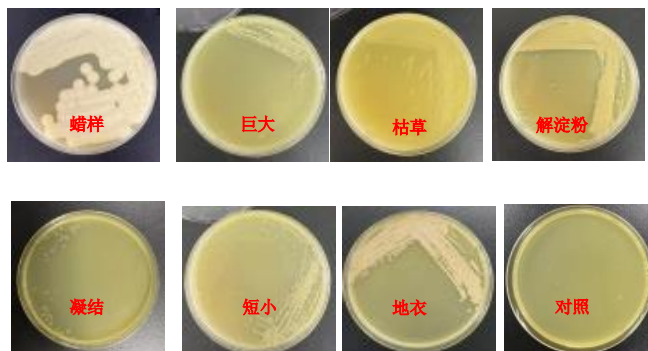


图 11：不同芽孢杆菌卵黄反应结果

表 13：不同芽孢杆菌卵黄反应结果

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
卵黄反应	—	—	—	—	—	+	—

#### 4.2.11 甘露糖产酸

将不同芽孢杆菌接种于甘露糖作为唯一碳源的培养基中，同时添加溴甲酚紫作为指示剂进行培养。观察培养基颜色由紫变黄为阳性，培养基不变色为阴性。不同芽孢杆菌甘露糖产酸结果如图 12 和表 14 所示。

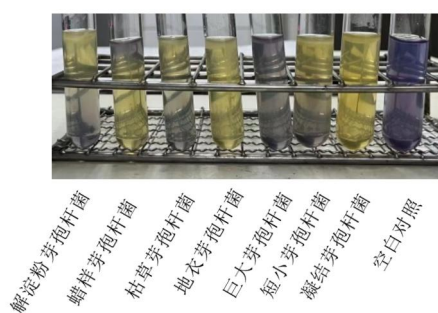


图 12：不同芽孢杆菌甘露糖产酸结果

表 14：不同芽孢杆菌甘露糖产酸结果

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
甘露糖产酸	+	+	+	+	—	+	+

#### 4.2.12 葡萄糖产酸

将不同芽孢杆菌接种于葡萄糖作为唯一碳源的培养基中，同时添加溴甲酚紫作为指示剂进行培养。观察培养基颜色由紫变黄为阳性，培养基不变色为阴性。不同芽孢杆菌甘露糖产酸结果如图 13 和表 15 所示。

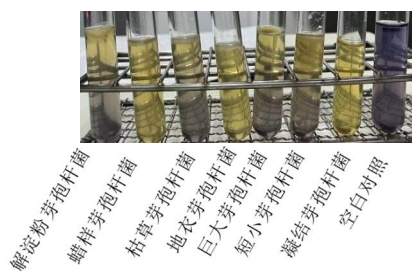


图 13：不同芽孢杆菌葡萄糖产酸结果

表 15: 不同芽孢杆菌葡萄糖产酸结果

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+	+

#### 4.2.13 甘露醇产酸

将不同芽孢杆菌接种于甘露醇作为唯一碳源的培养基中,同时添加溴甲酚紫作为指示剂进行培养。观察培养基颜色由紫变黄为阳性,培养基不变色为阴性。不同芽孢杆菌甘露醇产酸结果如图 14 和表 16 所示。

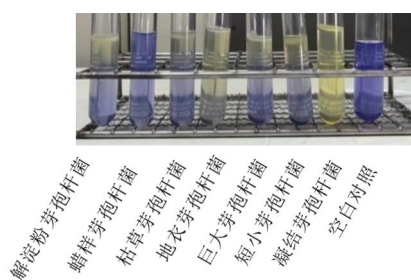


图 14: 不同芽孢杆菌甘露醇产酸结果

表 16: 不同芽孢杆菌甘露醇产酸结果

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
甘露醇产酸	+	+	+	+	+	-	+

#### 4.2.14 木糖产酸

将不同芽孢杆菌接种于木糖作为唯一碳源的培养基中,同时添加溴甲酚紫作为指示剂进行培养。观察培养基颜色由褐变黄为阳性,培养基不变色为阴性。不同芽孢杆菌木糖产酸结果如图 15 和表 17 所示。

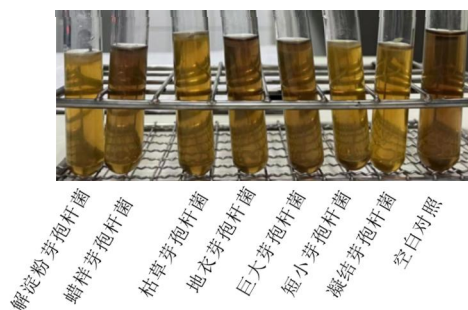


图 15: 不同芽孢杆菌木糖产酸结果



表 17: 不同芽孢杆菌木糖产酸结果

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
木糖产酸	+	+	-	+	-	-	+

#### 4.2.15 阿拉伯糖产酸

将不同芽孢杆菌接种于阿拉伯糖作为唯一碳源的培养基中，同时添加溴甲酚紫作为指示剂进行培养。观察培养基颜色由褐变黄为阳性，培养基不变色为阴性。不同芽孢杆菌阿拉伯糖产酸结果如图 16 和表 18 所示。

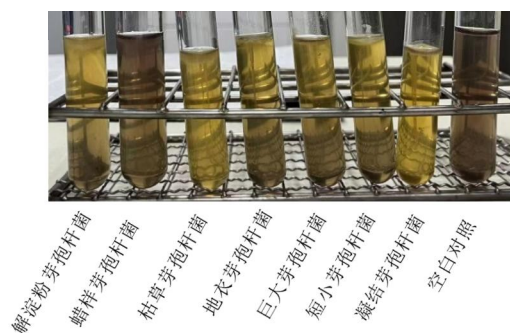


图 16: 不同芽孢杆菌阿拉伯糖产酸结果

表 18: 不同芽孢杆菌阿拉伯糖产酸结果

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
阿拉伯糖产酸	+	+	+	+	+	-	+

#### 4.2.16 硝酸盐还原

将不同芽孢杆菌接种于硝酸盐液体培养基中培养，在培养液中分别添加格里斯氏（Griess）试剂 A 液和 B 液各 1 滴后，当培养液中滴加 A，B 液后，溶液变为粉红色、玫瑰红色、橙色、棕色等表示亚硝酸盐存在，为硝酸盐还原阳性。如无红色出现，则可滴加 1 滴苯胺试剂，此时如呈蓝色反应，则表示培养液中仍有硝酸盐，又无亚硝酸盐反应，表示无硝酸盐还原作用；如不呈现蓝色反应，表示硝酸盐和形成亚硝酸盐都已还原成其他物质，故仍应按照硝酸盐还原阳性处理。不同芽孢杆菌硝酸盐还原结果如图 17 和表 19 所示。

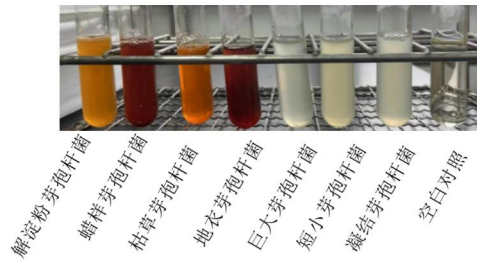


图 17: 不同芽孢杆菌硝酸盐还原结果

表 19: 不同芽孢杆菌硝酸盐还原结果

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
硝酸盐还原	-	+	+	-	-	+	+

#### 4.2.17 耐盐性

将不同芽孢杆菌依次接种于不同浓度 NaCl (2%、5%、7%、10%) 的培养中培养 3 和 7 天, 与未接种的对照管对比, 观察生长情况。不同芽孢杆菌的耐盐性如图 18 和表 20 所示。不同芽孢杆菌在 7%NaCl 条件下出现生长差异。

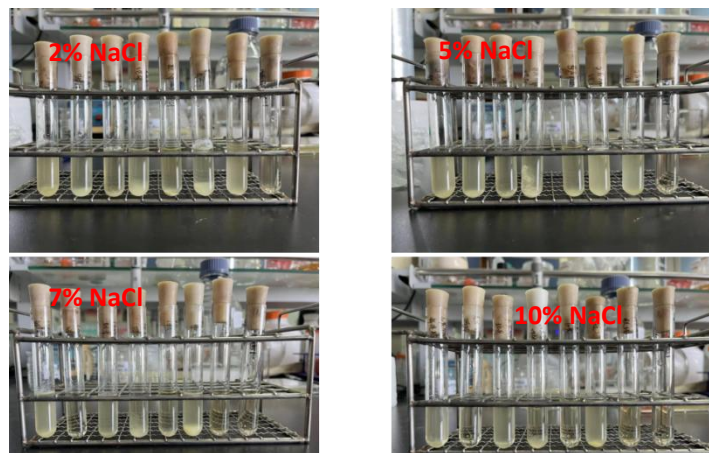


图 18: 不同芽孢杆菌的耐盐性结果

注: 每个 NaCl 浓度下左至右分别为解淀粉芽孢杆菌, 蜡样芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌, 地衣芽孢杆菌, 巨大芽孢杆菌, 短小芽孢杆菌, 凝结芽孢杆菌, 空白对照。

表 20: 不同芽孢杆菌的耐盐性结果

特征	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
生长 NaCl: 2%	+	+	+	+	+	+	+
生长 NaCl: 5%	+	+	+	+	+	+	+
生长 NaCl: 7%	-	+	+	+	-	-	+
生长 NaCl: 10%	-	+	-	+	-	-	+

#### 4.2.18 生长温度

将不同芽孢杆菌依次不同温度下进行培养，与未接种的对照管对比，观察生长情况。不同芽孢杆菌的耐盐性如图 19 和表 21 所示。



图 19：不同芽孢杆菌的生长温度

注：每个温度下左至右分别为解淀粉芽孢杆菌，蜡样芽孢杆菌，枯草芽孢杆菌，地衣芽孢杆菌，巨大芽孢杆菌，短小芽孢杆菌，凝结芽孢杆菌，空白对照。

表 21：不同芽孢杆菌的生长温度

生长温度	凝结芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌
5°C	—	—	—	—	—	—	—
10°C	—	—	—	—	—	—	—
20°C	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+
50°C	+	+	+	+	—	—	+
55°C	+	+	+	—	—	—	+
65°C	—	—	—	—	—	—	—

#### 4.2.19 生理生化指标确认

根据以上生理生化结果，以及不同芽孢杆菌的特性差异，选择了厌氧生长、水解酪蛋白、利用柠檬酸盐、7%NaCl 生长、55℃ 生长、接触酶及 D-葡萄糖产酸作为凝结芽孢杆菌生理生化鉴别指标。另外，不同凝结芽孢杆菌菌种反应结果可能不同的指标（例如 V-P 测定、L-阿拉伯糖产酸、水解明胶、硝酸盐还原等）未列入。

表 22：生理生化指标

特征	结果	特征	结果
厌氧生长	+	接触酶	+
D-葡萄糖产酸	+	水解酪蛋白	-
生长 NaCl: 7%	-	利用柠檬酸盐	-
生长温度: 55℃	+		

注：+，≥90%菌株为阳性；-，≥90%菌株为阴性。

#### 4.3 分子生物学鉴定实验

目前国际上公认和普遍采用的细菌分类系统是伯杰氏分类系统，“原核生物”系统是根据 16S rRNA 序列同源性建立的系统发育体系。除此之外，细菌的基因组中有很多功能基因，这些基因在系统进化过程中非常保守，但相对于 16S rRNA 基因变异速率快，能够代表种以下分类单元的进化方向，如 *gyrB*、*gyrA*、*rpoB*、*rpoD*、*recA*、*purH*、*polC*、*groEL*、*sodA*、*toxR*、*rctB* 等。近几年解旋酶基因（*gyrB*）在菌种分类和鉴定上的意义日显突出。有研究者比较了 16S rRNA 基因和基因序列，发现枯草群各种、亚种的 *gyrB* 基因相似性在 75%~95%之间，比 16S rRNA 有更好的区分效果，认为 *gyrB* 基因是非常好的替代靶基因。因此，我们在试验中验证了 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列比对的结果。

##### 4.3.1 16S rRNA 序列分析

16S rRNA 存在于所有细菌，其核苷酸数目约 1540 bp，包含 9 个可变区和 10 个保守区。16S rRNA 前 500 bp 序列变化较大，包含细菌种属的特异性信息。对于大多数菌株来说只需要扩增前 500 bp 的序列，即可鉴定出细菌的菌属。目前，16S rRNA V3-V4 区测序是菌种分析的最佳选择。对于前 500 bp 无法鉴定的菌株，则需要扩增全序列，以获得完整的 16S rRNA 序列。16S rRNA 部分扩增

和全长扩增均可用于菌株鉴定和菌群分析，全长 16S rRNA 测序在鉴定细菌到种和株水平上的精度高于部分扩增。因此，本实验采用扩增全长 16S rRNA 序列进行比对分析。

基因组 DNA 提取：采用细菌基因组试剂盒提取芽孢杆菌基因组 DNA。16S rRNA 扩增引物序列：27F：5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'；1492R：5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应：PCR 扩增体系（25  $\mu$ L）包括：无菌水 16  $\mu$ L，10 $\times$ Easy Taq Buffer 2.5  $\mu$ L，dNTPs（2.5 mmol/L）3.125  $\mu$ L，上下游引物（10  $\mu$ mol/L）各 1.25  $\mu$ L，Easy Taq DNA polymerase 0.3  $\mu$ L，DNA 模板 1.5  $\mu$ L；PCR 扩增程序：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，55 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 扩增片段为 1.5kb，委托公司进行序列测定。分别将测序得到的不同芽孢杆菌 16S rRNA 序列在 NCBI 网站进行比对，结果如表 23 所示。

表 23: 不同芽孢杆菌 16S rRNA 序列的 BLAST 比对结果

	菌株	16S rRNA 序列	比对结果																		
1	解淀粉芽孢杆菌	>GGAAGTGCGGGTGCTATAATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAG CGGGCGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC CGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAGGTGGCTTCGGCTAC CACTTACAGATGGACCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGGCAGC ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGT GAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAAT AGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGTAACACTAGTGCAGCAGCCGG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTCT TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACCTTGA GTGCAAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGC GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTT CCGCCCTTAGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGAAGACT GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC AACCGAAGAACCCTTACAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCGCCCTTC GGGGCGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT GCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGG CTACACAGTGTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAGACCGCGAGGTTAAGCCAATCCC ACAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGT AATCGGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATACACCCGCCGTCACAC CACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAA	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Description</th> <th>Scientific Name</th> <th>Max Score</th> <th>Total Score</th> <th>Query Cover</th> <th>E value</th> <th>Per. Ident</th> <th>Acc. Len</th> <th>Accession</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus amylolofaciens strain Ba13-16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a></td> <td><a href="#">Bacillus amylolofaciens</a></td> <td>2641</td> <td>2641</td> <td>99%</td> <td>0.0</td> <td>99.93%</td> <td>1444</td> <td>MG946076.1</td> </tr> </tbody> </table>	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus amylolofaciens strain Ba13-16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus amylolofaciens</a>	2641	2641	99%	0.0	99.93%	1444	MG946076.1
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession													
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus amylolofaciens strain Ba13-16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus amylolofaciens</a>	2641	2641	99%	0.0	99.93%	1444	MG946076.1													
2	蜡芽孢杆菌	>GGACTTTGGGGGGTGTATAATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAG TTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGA AACCGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACNGCATGGTTCGAAATTGAAAGCGGCTTCGG CTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGGCA ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC CGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTG AATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTT CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTG AGTGCAAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACACTGACACTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTT CCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCT GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC AACCGAAGAACCCTTACAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTC GGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT GCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGG CTACACAGTGTACAATGGACGGTACAAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCA TAAAACCGTTCAGTTCGGATTGATGGCTGCAACTCGCCATACATGAAGCTGGAATCGCTAGTA ATCGGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATACACCCGCCGTCACACC ACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCAAGGTG	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Description</th> <th>Scientific Name</th> <th>Max Score</th> <th>Total Score</th> <th>Query Cover</th> <th>E value</th> <th>Per. Ident</th> <th>Acc. Len</th> <th>Accession</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cereus strain C2-16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a></td> <td><a href="#">Bacillus cereus</a></td> <td>2652</td> <td>2652</td> <td>99%</td> <td>0.0</td> <td>99.93%</td> <td>1454</td> <td>JX544747.1</td> </tr> </tbody> </table>	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cereus strain C2-16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2652	2652	99%	0.0	99.93%	1454	JX544747.1
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession													
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cereus strain C2-16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus cereus</a>	2652	2652	99%	0.0	99.93%	1454	JX544747.1													

3	枯草芽孢杆菌	<p>&gt;GACGTGCGGGTGCTATAATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGTGTGCTCCCTGATGTTAGC GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC GGGGCTAATACCGGATGGTGTGTTGAAACCGCATGGTTCAAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACC ACTTACAGATGGACCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCCAAGGCGACGA TGCGTAGCCGACTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGGTG AGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATA GGGGCGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGTGGCAAAGCGTTGTCCGAAATTATGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTA AGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAACTGGGGAACCTTGAGT GCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA ACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGTTTTCC GCCCCCTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGA AACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAA CGCGAAGAACCCTTACCAGGCTTGTGACATCTCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCTCCCTCGG GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCA CCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTGGGCACTTAAGGTGACTG CCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCAGCCCTTATGACTGGGC TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAGCCAATCCCA CAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTA ATCGGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCCGGTCACACC ACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCCGCGAAG</p>	<table border="1"> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td><a href="#">Bacillus subtilis strain T0-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a></td> <td><a href="#">Bacillus subtilis</a></td> <td>2652</td> <td>2652</td> <td>99%</td> <td>0.0</td> <td>100.00%</td> <td>1447</td> <td><a href="#">MN133078.1</a></td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td><a href="#">Bacillus subtilis strain SMF1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a></td> <td><a href="#">Bacillus subtilis</a></td> <td>2649</td> <td>2649</td> <td>99%</td> <td>0.0</td> <td>99.93%</td> <td>1444</td> <td><a href="#">OK035217.1</a></td> </tr> </tbody> </table>	<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain T0-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	2652	2652	99%	0.0	100.00%	1447	<a href="#">MN133078.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain SMF1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	2649	2649	99%	0.0	99.93%	1444	<a href="#">OK035217.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain T0-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	2652	2652	99%	0.0	100.00%	1447	<a href="#">MN133078.1</a>														
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis strain SMF1.16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus subtilis</a>	2649	2649	99%	0.0	99.93%	1444	<a href="#">OK035217.1</a>														
4	地衣芽孢杆菌	<p>&gt;TACTAGCGATTCCAGTTCACGCGAGTCGAGTTGACAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATT GTGGGATTGGCTTAGCCTCGCGGCTTCGCTGCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTTGTGAG CCCAGGTCATAAAGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGCA GTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA CTTAACCCAACATCTACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACACCTGTCACTCTGCCCCC GAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTGACAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT TGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCA GTCTTGCGACCGTACTCCCGAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGACGACTAAAGGGCGGA AACCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGATATCTAATCTGTTCGC TCCCACGCTTTCCGCGCTCAGCGTACGTACAGACCAGAGAGTCCGCTTCGCCACTGGTGT CCTCCACATCTTACGCAATTCACCGCTACAGTGGAAATCCACTCTCCTTCTGCACTCAAGT TCCCAGTTCCAATGACCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACC GCCTGCGCGGCTTTACGCCCAATAAATCCCGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGG TGCTGGCACGTAAGTTAGCCGTGCTTTCTGGGTTAGGTACCCTCAAGTCCCGCCCTATTGCAACG GTACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACCTACGCGCGTG CTCGTACAGACTTTCGTCCATGCGAGATCCCTACTGCTGCCCTCCGTAGGAGTCTGGCGGTCTCAG TTCCAGTGTGCGATCATCTCAGGTCGGTACGCATCGTCCGTTGGGTGAGCGTACCTACCAT CTAGCTTATATCGCCCCGCGGG</p>	<table border="1"> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td><a href="#">Bacillus licheniformis strain SRM103583 chromosome, complete genome</a></td> <td><a href="#">Bacillus licheniformis</a></td> <td>2854</td> <td>22689</td> <td>100%</td> <td>0.0</td> <td>100.00%</td> <td>4419047</td> <td><a href="#">CP035404.1</a></td> </tr> </tbody> </table>	<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus licheniformis strain SRM103583 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Bacillus licheniformis</a>	2854	22689	100%	0.0	100.00%	4419047	<a href="#">CP035404.1</a>										
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus licheniformis strain SRM103583 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Bacillus licheniformis</a>	2854	22689	100%	0.0	100.00%	4419047	<a href="#">CP035404.1</a>														
5	巨大芽孢杆菌	<p>&gt;GGGGGGGTGCTATAATGCAAGTCGAGCGAAGTGGGAACTGATTAGAAGCTTGCTTATGACGTTAGC GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACC GAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTCGGCTATCA CTTACAGATGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGAT GCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTAC GGGAGGCGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGGTGA GTGATGAAGGCTTTCCGGTCTGAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGGTAACCTG CTTGACTTGTGACGGTACCTAACGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACGTAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTAAG TCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAACCTGGGGAACCTGAGTGC AGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGC CCTTAGTGTGACGCTAACGATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Description</th> <th>Scientific Name</th> <th>Max Score</th> <th>Total Score</th> <th>Query Cover</th> <th>E value</th> <th>Per. Ident</th> <th>Acc. Len</th> <th>Accession</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td><a href="#">Bacillus megaterium strain L36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a></td> <td><a href="#">Prestia megaterium</a></td> <td>2667</td> <td>2667</td> <td>99%</td> <td>0.0</td> <td>100.00%</td> <td>1488</td> <td><a href="#">KJ179342.1</a></td> </tr> </tbody> </table>		Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain L36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Prestia megaterium</a>	2667	2667	99%	0.0	100.00%	1488	<a href="#">KJ179342.1</a>
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession														
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain L36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Prestia megaterium</a>	2667	2667	99%	0.0	100.00%	1488	<a href="#">KJ179342.1</a>														

	<p>CTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGG GGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC CCGC AACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT ACACACGTGCTACAATGGATGTTACAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAAATCCATA AAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTAAT CGCGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCAC GAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGTAGCCGCTAAGGTTACCC AC</p>	
6	短小芽孢杆菌 <p>&gt;TTGGGTCCTTTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAAAC TCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAAACGTATTACCGCGGCATGCTGATC CGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACCTGAGAAC AGATTTGTTGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGT GTGTAGCCCAAGTCAAAAGGGGATGATGATTTGACGTCAATCCCACTTCTCCGGTTTGTCA CCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTT GCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCT GTCCCGAAGGGAAGCCCTATCTTAGGGTTGTACAGAGGATGTCAGACCTGGTAAGGTTCT TCGGGTTGCTTCAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTCGGGGCCCGCTCAATTCTTTGA GTTTCAGTCTTGGCAGCGTACTCCCGAGGCGGAGTGTAAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGG GGCGGAAACCCCTAACACTTAGCCTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC TGTTGCTCCCGCAGCTTTCGCTCCTCAGCGTCACTACAGACAGAGAGTGCCTTCGCCACT GGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCTCCTTCTGCAC TCAAGTTTCCAGTTTCAATGACCTCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAG AAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATCCGGACAACGCTTGCACCTACGTATTACCG CGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCCTCAAGGTGCAAGCAGTTA CTCTTGCACTTGTCTCCCTAACACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTATCACTACCGCG GCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGATC TGGGCGGTGCTCAGTCCAGTGTGGCGGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTGCCTT GGTAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAA ACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAACATCCCGTATTAGCTCCGGTTCCCGG AGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCGCGTAAATCCGG GAGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTGCATGTATAGCACCCCGC</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cumilus strain Lmb059.16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a> <a href="#">Bacillus cumilus</a> 2658 2658 99% 0.0 100.0% 1453 <a href="#">KT398124.1</a></p>
7	凝结芽孢杆菌 <p>&gt;CGGCTGGCTCGTAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACCTCTCGTGGTGTGACGGG CGGTGTGTACAAGGCCCGGAAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT CGGCTTATGACAGCGGGTGCAGCCTGCAATCCGAACCTGGGAATGGTTTTCTGGATTGGCTT AACCTCGCGGTCTCGCAGCCCTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGAGCCAGGTCATAAG GGGCATGATGATTGACGTCATCCCGCCTTCTCCGGTTGTACCGGCAGTCACTTAGAGT GCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGTCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGACTTAACCAACAT CTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCGAAGGGGAAGG CCCTGTCTCCAGGGAGGTCAGAGGATGTAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTGTCTCGAAT AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGTCAATTCTTTGAGTTTACGCTTTCGCGCC GTACTCCCGAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTAAC ACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGTAATCTAATCTGTTTGTCTCCCGCCTT TCGCGCTCAGCGTCAAGTTACAGACCAGAGAGCCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCACATCT CTACGATTTACCGCTACACGTGGAATCCACTCTCCTTCTGCACTCAAGCCCTCCAGTTTC CAATGACCGCTTGGGTTGAGCCGCAAGATTACATCAGACTTAAGAAGCCGCTGCGCGG CTTTACGCCAATAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA GTTAGCCGTGGTTTCTGGCCGGTACCCTCAAGGCGCCGCTGTTCGAACGGCACTTGTTC TTCCCGGCAACAGAGTTTACGACCCGAAGGCTTCTTCACTACGCGCGTGTGCTCCGTC GACTTTCGCTTTCGCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGCTCA GTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTTGCTTGGTGAAGCGTTACC CCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTTCCTTTT TCCTCCATGCGGAGGAAAAACTATCCGGTATTAGCCCGGTTTCCCGGCTTATCCCGATCTTA CAGGCAGTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCGCGCTAACCTTTAAAAGCAAGCTTTTAAA</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Weizmannia coagulans strain 3989.16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a> <a href="#">Weizmannia coagulans</a> 2582 2582 100% 0.0 99.93% 1454 <a href="#">MT538813.1</a></p>



	AGGTCCGCACGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCCTGAGCCTATTCCCAAAC TCTAAAAAGGGGGCCCCCGGGGGTGGT	
--	--	--

### 4.3.2 *gyrB* 基因序列分析

基因组 DNA 提取：采用细菌基因组试剂盒提取凝结芽孢杆菌基因组 DNA。*gyrB* 扩增引物序列：F: 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNNGGNGGNAARTTYGA-3'，R: 5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCACRTCN GTCAT-3'。PCR 反应：PCR 扩增体系（25 μL）包括：无菌水 16 μL，10×Easy Taq Buffer 2.5 μL，dNTPs（2.5 mmol/L）3.125 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1.25 μL，Easy Taq DNA polymerase 0.3 μL，DNA 模板 1.5 μL；PCR 扩增程序：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，62℃退火 1min，72℃延伸 2 min，35 个循环；72℃终延伸 10 min。PCR 扩增片段为 1.1 kb。委托公司进行序列测定。分别

将测序得到的不同芽孢杆菌 *gyrB* 基因序列在 NCBI 网站进行比对，结果如表 24 所示。

表 24：基因序列

菌株	<i>gyrB</i> 基因序列	比对结果																																				
1 解淀粉芽孢杆菌	>ACGCCTTATCGACCACTCTTGACGTAACGGTTCATCGTGACGGGAAAATCCATTATCAGG CGTATGAACGCGGTGTACCGGTGGCCGATCTGAAGTGATCGGTGATACTGATAAGACCG GAACGATTACGCACTTTGTTCTGTATCCGAAATTTCAAAGAAAACAACCGTATACGACTA TGATCTGCTTTCAAACCGTGTCCGAGAATTGGCCTTCTGACAAAAGGGCGTCAACATCAC GATTGAAGACAACCGTGAAGGACAAGAACGGAAAAACGAGTACCACACTCGAAGGCGGA ATCAAAAAGCTACGTTGAGTACTTAAACCGTTCAAAAGAAGTCGTTTCATGAAGAGCCGATT TATATCGAAGGCGAAGAACGGCATAACGGTTGAAGTTGCATTGCAATACAACGACAGC TATAAAGCAACATTTATTTTACGAATAACATCAACACATATGAAGGCGGCACGCATG AAGCCGGATTTAAAACCGGTTTAAACCGTGTACATAAACGACTATGCAAGAAGAAAAGGGA TTTTCAAAGAAAATGATCCGAATCTGAGCGGTGATGATGTGAGAGAAAGGGCTGACTGCCA TCATTTCAATTAAGCACCCCTGACCCGCAATTCGAAGGGCAGACGAAAACGAAGCTCGGC AACTCCGAAGCGAGAACGATTACTGATACGCTGTTTTCTTCCGCACTGGAGACATTCCTTC TTGAAAATCCGGACTCAGCCCGCAAAAATCGTTGAAAAGGGCTTAATGGCCGCAAGAGCG CGGATGGCGGCGAAAAAGCGCGGGAATTGACCCGGCGTAAAAGCGCACTTGAGATTTTC CAACCTGCCGGTAAACTGGCGGACTGTCTTCTAAAGATCCGAGCATTTCAGGCTGAT ATCGTAGAGGGTACTTGCAGGCGGATCAGCGAAAACAGGGACGGGACCGTCATTTC AGCCATTTCGCCGCTGCGCGTAAGATTCTGAACGTCGAGAAAACGAAGACTTGATAAGAT TCCTCAAACAATGAGGTCAGATCAATGATTACGGCTCTCGGGACAGGAATCGGAGAAGA CTTAATC	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Description</th> <th>Scientific Name</th> <th>Max Score</th> <th>Total Score</th> <th>Query Cover</th> <th>E value</th> <th>Per Ident</th> <th>Acc. Len</th> <th>Accession</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.sp.L381.chromosome.complete.genome</td> <td><a href="#">Bacillus.sp.L381</a></td> <td>1999</td> <td>1999</td> <td>100%</td> <td>0.0</td> <td>99.91%</td> <td>3861105</td> <td>CP127</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.amyloliquefaciens.strain.35M.chromosome.complete.genome</td> <td><a href="#">Bacillus.amyloliquefaciens.strain.35M</a></td> <td>1999</td> <td>1999</td> <td>100%</td> <td>0.0</td> <td>99.91%</td> <td>3930927</td> <td>CP082</td> </tr> </tbody> </table>	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession	<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.sp.L381.chromosome.complete.genome	<a href="#">Bacillus.sp.L381</a>	1999	1999	100%	0.0	99.91%	3861105	CP127	<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.amyloliquefaciens.strain.35M.chromosome.complete.genome	<a href="#">Bacillus.amyloliquefaciens.strain.35M</a>	1999	1999	100%	0.0	99.91%	3930927	CP082									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession																														
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.sp.L381.chromosome.complete.genome	<a href="#">Bacillus.sp.L381</a>	1999	1999	100%	0.0	99.91%	3861105	CP127																														
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.amyloliquefaciens.strain.35M.chromosome.complete.genome	<a href="#">Bacillus.amyloliquefaciens.strain.35M</a>	1999	1999	100%	0.0	99.91%	3930927	CP082																														
2 蜡样芽孢杆菌	>GTATGCTCTACACAGAATTAGAAGTATTTGTACATCGTGAAGGTAATCCATTATCAA AATACGAAAGAGGTATTCCGGTTGCAGATTTAAAAGTCAATGGTGACACCGATCAAACAG GAACAATAACTCGATTTAAACCCAGATCCGAAATTTTCAAAGAAAACAACAGTATACGATTT TGATACGCTAGCAACTCGTATGCGTGAATTAGCGTTTTTAAATCGAATATTAATTAACAA	<table border="1"> <tbody> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.thuringiensis.strain.SCG04-02.chromosome.complete.genome</td> <td><a href="#">Bacillus.thuringiensis.strain.SCG04-02</a></td> <td>1978</td> <td>1978</td> <td>99%</td> <td>0.0</td> <td>99.63%</td> <td>5436019</td> <td>CP017577.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.cereus.strain.BC33.chromosome.complete.genome</td> <td><a href="#">Bacillus.cereus</a></td> <td>1978</td> <td>1978</td> <td>99%</td> <td>0.0</td> <td>99.63%</td> <td>5325341</td> <td>CP072774.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.thuringiensis.serpax.azorensis.strain.IBRC-T64.001.DNA.topoisomerase.ii.ATP-hydrolyzing.DNA.gyrase.s...</td> <td><a href="#">Bacillus.thuringiensis.serpax.azorensis.strain.IBRC-T64.001</a></td> <td>1978</td> <td>1978</td> <td>99%</td> <td>0.0</td> <td>99.63%</td> <td>1897</td> <td>EE210272.1</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.cereus.strain.WP5SVZ.chromosome.complete.genome</td> <td><a href="#">Bacillus.cereus</a></td> <td>1973</td> <td>1973</td> <td>99%</td> <td>0.0</td> <td>99.64%</td> <td>5328644</td> <td>CP053289.1</td> </tr> </tbody> </table>	<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.thuringiensis.strain.SCG04-02.chromosome.complete.genome	<a href="#">Bacillus.thuringiensis.strain.SCG04-02</a>	1978	1978	99%	0.0	99.63%	5436019	CP017577.1	<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.cereus.strain.BC33.chromosome.complete.genome	<a href="#">Bacillus.cereus</a>	1978	1978	99%	0.0	99.63%	5325341	CP072774.1	<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.thuringiensis.serpax.azorensis.strain.IBRC-T64.001.DNA.topoisomerase.ii.ATP-hydrolyzing.DNA.gyrase.s...	<a href="#">Bacillus.thuringiensis.serpax.azorensis.strain.IBRC-T64.001</a>	1978	1978	99%	0.0	99.63%	1897	EE210272.1	<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.cereus.strain.WP5SVZ.chromosome.complete.genome	<a href="#">Bacillus.cereus</a>	1973	1973	99%	0.0	99.64%	5328644	CP053289.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.thuringiensis.strain.SCG04-02.chromosome.complete.genome	<a href="#">Bacillus.thuringiensis.strain.SCG04-02</a>	1978	1978	99%	0.0	99.63%	5436019	CP017577.1																														
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.cereus.strain.BC33.chromosome.complete.genome	<a href="#">Bacillus.cereus</a>	1978	1978	99%	0.0	99.63%	5325341	CP072774.1																														
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.thuringiensis.serpax.azorensis.strain.IBRC-T64.001.DNA.topoisomerase.ii.ATP-hydrolyzing.DNA.gyrase.s...	<a href="#">Bacillus.thuringiensis.serpax.azorensis.strain.IBRC-T64.001</a>	1978	1978	99%	0.0	99.63%	1897	EE210272.1																														
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus.cereus.strain.WP5SVZ.chromosome.complete.genome	<a href="#">Bacillus.cereus</a>	1973	1973	99%	0.0	99.64%	5328644	CP053289.1																														

	TTGAAGATAAACGTGAACATAAGCAAAGAAAGAATTCCATTACGAAGTGGAATTAAT CATACGTTGAGCATTAAAATCGCTCAAAAACAACCGATTATGAGAGCCTGTGTACGTAGA AGGTTCAAAAAGATGGTATTCAGGTTGAGGTTTCTCTTCAATATAACGAAGGATACACAAA AATATTACTCATTTACGAATAACATCCATACGTATGAAGGTGGTACACATGAGGTAGGTTT TAAAACAGCTTAACTCGTGAATCAACGACATATGGTCGTAAAAATAGCATTTTAAAAGAT GCGGACAGTAATTAACCTGGTGAGGATGTTCTGTAAGGTTTAAACAGCAATTTGATCAATCA AGCATCCAAAATCCACAATTTGAAGGACAAAACGAAGCAAAAATTTGGGAATAGTGAAGCG AGAACAATTACAGAGTCTGTATTCTCAGAGGCAATTTGAAAAGTTCTTACTAGAAAAATCCTA ATGTAGCGCGAAAAATTTAGAAAAAGGTACGATGGCTGCACGTGCACGTGTAGCTGCGA AAAAAGCGCGTGAATTGACACGTCGAAAGAGTGCCTTAGAAGTTTCAAGTTTACCTGGTA AATTAGCTGATTGCTCTCGAAAAGATCCAGCAATTAGTGAAATTTACATCGTAGAGGGTGA CTCTGCGGGTGGATCTGCAAAAACAAGGACGCGATCGTCATTTCCAAGCAATTTACCCTG GAAAGGTAATAATTAATGTGGAAGGCGCTTAGATAAGATTTATCAAAATGATGAA GTTCTGTAATAATACGGCAATCGGTACAATAATGGTGGAGACTCGATAT		
3	枯草芽孢杆菌	>ACGCACTATCACAGACTTGGATGTGACGGTTACCGTGACGGTAAAATTCACCGCCAAA CTTATAAACCGCGAGTTCCGGTTACAGACCTTGAATCATTGGCGAAACGGATCATACAG GAACGACGACACATTTGTCCCGGACCCCTGAAATTTCTCAGAAAACAACCGAGTATGATTA TGATCTGCTTGCCAACCGCGTACGTGAATTAGCCTTTTAAACAAAAGGGCGTAAACATCACG ATTGAGGATAAACGTGAAGGACAAGAGCGCAAAAATGAATACCATTACGAAGCGCGAATT AAAAGTTATGTAGAGTATTTAAACCCTCTAAAGAGGTTGTCATGAAGAGCCGATTACA TTGAAGGCGAAAAGGACGGCATTACGGTTGAAGTGGCTTTGCAATACAATGACAGCTACA CAAGCAACATTTACTCGTTTACAAAACAATTAACACGTACGAAGGGCGGTACCCATGAAG CTGGCTTCAAAAACGGGCTGACTCGTGTATCAACGATTACGCCAGAAAAAAGGGCTTA TTAAAGAAAATGATCCAAACCTAAGCGGAGATGACGTAAGGGAAGGGCTGACAGCGATTA TTTCAATCAAAACCCCTGATCCGCACTTTGAGGGCCAAACGAAAAACAAGCTGGGCAAC TCAGAAGCACGGACGATCACCGATACGTTAATTTCTACGGCGATGGAAACATTTATGCTGG AAAATCCAGATGCACGCAAAAATTTGCGATAAAGGCTTAATGGCGCAAGAGCAAGA ATGGCTGCGAAAAAAGCCCGTAACTAACACGTGTAAGAGTGTCTTGGAAATTTCAAAC CTGCCCGTAAAGTTAGCGGACTGCTCTTCAAAGATCCGAGCATCTCCGAGTTATATATCG TAGAGGGTACTCTGCCGGAGGATCTGTAACAAGGACGCGACAGACATTTCCAAGCC ATTTTGCCGCTTAGAGGTAATAATCCTAAACGTTGAAAAGGCCAGACTGGATAAAAATCCTTT CTAAACAAGAAAGTTCGCTCTATGATCACAGCGCTCGGCACAGGTAATGGGGAAGACTCAA CCTG	<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus subtilis subsp. subtilis strain UCMB5021 chromosome, complete genome</a> <a href="#">Bacillus subtilis subsp. subtilis</a> 1995 1995 99% 0.0 99.82% 4060035 CP051466
4	地衣芽孢杆菌	>ACGCCCTTTCACCGAGCTGGATGTAACGGTTTACAGAGATGGAAAAATCCATTATCAGGAA TTTGAACGTGGCGTTCCGAAAAGCTGATTTGAAAAGTCATTGGAGATACGGAAGTGACGGGA ACGACCACACACTTCAAGCCTGATCCGGAATATTCACGAAAACGACTGAATACGACTAT GATACGCTCGCACTCGTGTCCGCGAACTCGCTTTCTTGACAAAAGGCGTCAAAAATCACG ATCGAAGACAAGCGAGAAGGAAAAAGAACGCAAGAATGAATACTGCTATGAAGCGGAT TAAAAGCTATGTTGAACACTTGAACCGTTCCGCGGAAAGTTATTCATGAAGAGCCGCTAT ATTGAAGGATCCAAGACGGCATTACAGTCGAGGTGGCTTTCAATACAATGACAGCTATA CAAGCAACATTTATTCATTGTAACAACATTCATACGTATGAAGCGGAAACCCATGAAGC CGGCTTAAAGACCGGTTTACGAGGGTCAATCAATGATTACCGGAGAAGAAAACGGCGTATT CAAAGAAAAGCGATCCGAACCTAAGCGGAGAAGACGTCGCGGAAAGGTTTACAGCGATTA TTTCAATCAAGCACCCGGATCCTCAATTTGAAGGACAGCAAAAACAAGCTCGGCAAC TCAGAAGCGCGTACGATAACAGATGCGCTAATTTTCAAGAGCGCTTGAAGAGTTTCTGCTA GAAAACCCGGATTACGCAAAAATCGTTGAAAAGGGGTTATGGCCGCAAGAGCAGCAG GATGGCTGCAAAAGAACGACGCAATTTGACGCGCAGAAAAAGCGCCCTTGAAGTGTCCA ATCTGCCGGGAAACTTGTGACTGTTCTTAAAGACCCGACGATTTCCGAACTTTACAT CGTTGAGGGTACTCTGCGGGCGGATCGGCAAAACAGGGCCGACCGCTAATTTCCAAG CAATTTGCTTTGAGAGGGAAAAATTTGAACGTCGAAAAAGCCCGCTGGCAAAAATAT TGTCACAATGAGGTTCTGTTATGATCACCGCCCTTGGCACCGGAATCGGGGAAGATT CAACCTGAAA	<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus licheniformis strain P8_B2 chromosome, complete genome</a> <a href="#">Bacillus licheniformis</a> 1991 1991 100% 0.0 99.63% 4343379 CP045814_1
5	巨大芽孢杆菌	>CCCATGGCGAAGGTGCTCAGCTGTACGACTTTCTACCTCTTTGGAAGTACACGTACAT CGTGACGGTAAAGTTCATTATCAAAAATATGAACGAGGTGACCGGCTGTGACTTAAAA GTAGTTGGAGAAAACAGATAAAAACAGGTACTGTTATCAATTCATCCAGACGGTGAATTT	<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Priestia arabhattai strain XT37 chromosome, complete genome</a> <a href="#">Priestia arabhattai</a> 2013 2013 98% 0.0 99.37% 5022566 CP128552_1 <input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus megaterium strain Q3, complete genome</a> <a href="#">Priestia megaterium Q3</a> 2013 2013 98% 0.0 99.37% 5153539 CP010586_1

		<p>TTACAGAAACGCTTGAATACGATTTTGATACGTTAGCTAATCGTCTGCGTGAGTTAGCTTTC  TTAAACCGCGGCATTAAAATTACGATTGAAGACAAAACGTGAAGAAGATAAAAAGCGTGAA  TACCATTACGAAGCGGGAATTAAGTCTTACGTTGAACACTTAAACCGTTCGAAAGAAGTG  AATCAGGAAGAGCCGATCTATATTGAAGGTAATCGAGACAAACATTTCTGTAGAAATTGCTA  TTCAATATAACGATAGCTACACAAGTAATTATATTCTTTTCGCAAAACAACATTCACACATAT  GAAGGTGGAACGCACGAAGCAGGATTTAAAACAGCGTTAACGCGTGTAAATTAACGACTAT  GCACGTAAAAACAGCGTATTAAAAGATAGTGACGCCAATTTAACGGGTGAAGATGTTTCGT  GAAGGAATTACAGCTATTATCTCTATTAAGCACCAGATCCGCGAGTTTGAAGGACAAAACA  AAACAAAGCTGGGAAATAGTGAAGCAAGAACAATTACTGACTCTGTGTTTGCAGAACAC  TTAGAACTTACTTGCTAGAGAACCCATTGTGGCGAAAAAGGTAATTGAAAAAGGTTTA  ATGGCTGCAAGAGCAAGAATGGCAGCTAAAAAGCTCGTGAGCTTACAAGACGTAAAAAG  CGCGTTGAAATTTCAAACCTACCAGGTAATAGCAGATTGTTATCAAAAAGATCCTTCT  ATTAGCGAATCTATGTAGTAGAGGGTGACTCTGCCGAGGTTACGTAAGCAGGGAAGA  AGCCGCCATTTCCAAGCTATTTTGCCTTTGCGCGGTAATAATTATCAACGTAGAGAAAGCGC  GTTTAGATAAAAATTTATCTAATAACGAAATTCGTACAATCATTACCGCTCTAGGAACGGGT  ATTGGTGACGATTGATATCGAAAAGGCCCGGCACCCCG</p>	
6	短小芽孢杆菌	<p>&gt;ATGCGTTATCTACGACCTTAGACGTGACCGTATACCGTGATGGAAAAATTCATTACCAGC  AATTCAAACGCGCGTTCAGTTGGAGATTTAGAGGTCATTGGTGAAACAGATGTAACAG  GGACAACGACTCATTTTGTGCCAGATCCAGAAATTTCACTGAAACCAATTGAATTTGATTA  CGACACACTTGCTAACCGGTACGTGAGTTAGCTTTCTTAACAAAAGGCGTCAACATCATC  ATTGAAGACTTACGTGAAGGCAAGAGCGAAGAAACGAATACTGCTATGAAGCGGTATT  AAGAGCTATGTAGAACATTTGAATCGCTGCAAGGAAGTCTGTTATGAAGAACCAGTTTAC  ATCGAGGGTGA AAAAGACGGAATCACCGTTGAAAGTTGCACTGCAATACAACGATTCTCAT  ACAAGCAATTTATTTCTTTCGCCAACAAACATCAACACATATGAAGGGGGAACACACGAA  GCTGGCTTTAAAACCGGTCTGACGCGTGCATCAATGATTATGCTCGTAAAAATGGCGTAT  TCAAAGATGGAGACTCGAATTTGAGCGGTGAAGATGTACGAGAAGGCTTAAACAGCCATTA  TCTCTATCAAAACATCCAGACCCCTCAATTCGAAGGACAAACGAAGACAAAGCTCGGTAAC  CAGAAGCAAGAACCATTACCGACTCCCTCTTCTCCGAAGCACTTGAGAAATTCCTCTTAG  AGAACCCTGATGCTGCAAAAGAAAATTTGGAGAAAAGGTGTGATGGCAGCTCGTGAAGA  ATGGCTGCCAAAAAGGCACGTGAGCTGACAAGACGTAAAAGTGCATGGAAGTCTCTAG  CTTGCCTGGGAAACTGGCAGACTGTTCTTCTAAAGATCCTTCCATCTCTGAGCTTTATATC  GTAGAGGGAGATTCTGCCGGCGGATCTGCTAAGCAAGGTGCTGATCGACATTTCCAAGCG  ATCTTACCCTAAGAGGGAAGATCTAAACGTTGAAAAAGCACGACTAGATAAAAATTTAT  CTAACACGAGGTTCTTCAATGATTACAGCGCTAGGGACTGGAATCGGAGAAGACTCAC  TTA</p>	<p><a href="#">✓ Bacillus altitudinis strain UKM.B911 chromosome</a> <a href="#">Bacillus altitudinis</a> 1999 1999 99% 0.0 99.91% 3767351 CP094654.1</p> <p><a href="#">✓ Bacillus aerophilus strain K192 chromosome .complete genome</a> <a href="#">Bacillus aerophilus</a> 1993 1993 99% 0.0 99.82% 3754440 CP091093.1</p> <p><a href="#">✓ Bacillus pumilus strain Y2 DNA gyrase B subunit (gyrB) gene .partial cds</a> <a href="#">Bacillus pumilus</a> 1982 1982 99% 0.0 99.63% 1132 MF968899.1</p>
7	凝结芽孢杆菌	<p>&gt;CGGGGATACTCGACGTCGAGATGTCGATTATGCGCCGACCCGGGCAATCGCATAAAT  AATGGTAITGATTTCTCATTGTAAAAATATCCGCCAGCTTTGCTTTTTCCGTAITGATGAC  TTTTCTTTAGCGGCAGATAGCCTGGAATTTCCGGTCGCGCCCTGTTGGCAGAACCGCCC  GCGGAATCCCCTTCAACGAGATACAGCTCGCTCCCTGCGGATTGCGGCTTTGCGCCGGC  GCAAGCTTTCCGGACAAGCTCGTTTACTATATCGTCTCTTTTGGCAGTCTCTCTTCCCTC  CCGTGCTTCTCGTCTGCTGCCGGGCTGCGACGCCCGTTGGCTTTCCGGATTA AAAAG  ATTGCTCGGATCCGGGTTTTCTTCTTAAAAATAAGAAAGGTGTTCCGAAAACAATCGTATCAA  CTGCTGATTGGGCTTCACTTGTGCCAAGTTCCCTTGTCTGTTTCAAAAATGCAGCA  GTTTCGACGGGAATGCGGACGGAGATGACGCGCGAGACCCCTTCGCGGATATCCGTGCCTT  CTAATTTTAACTTATCGTTTATCCGGCCGGATTCTCTTGACATCCCGTCAACGACCCGC  GTCAATGCCGACTCTGCCCGGCTTCTGCGTGCCGTGAACATTTCTGCGCACGTAGTTCA  CATAGCAGGCAATGCCTTCCGAAAATCGAAGGATACCTGAAAACGTTATGCGGCTTCGATT  CCGTTCTGTTAAATCTCGATAAACACAGACGGATGGAGCACAGCGGTTCAATGCTCCAC  GTACTGAACAGATGCCTCCATGCCAATGTTATACTGGTACGCGCCGAGCTTCTCACACTT  TGTCATCCATGGTGATTTGATCCCTTTATTA AAAAGGCAAGTTCACGGAGCCGGGTTGTAA  GAATATCAAGTCGAACCTCGGTCGTTCCGTA AAAAATTTCCCGGATCCGGCTTGAAGTGAGT  CGTTGTGCCGTACGATCCGTTTCGCCATGATTTTATGTAAGCAGGTTTCCCGCGGTA  TTTTGGTAGTAATATGCCCGTCGCGGTGGACATAGACATCGAGCTCTGTAGACGGCAATCC  AACAGACGCCACCATCCCGTGCAGACGCCCGGAAACATTATATCCAGACAA</p>	<p><a href="#">✓ Weizmannia coagulans strain DSM 2314 chromosome .complete genome</a> <a href="#">Heyndricksoia coagulans</a> 747 1149 97% 0.0 83.81% 3628651 CP033687.1</p> <p><a href="#">✓ Weizmannia coagulans strain IDCC1201 chromosome .complete genome</a> <a href="#">Heyndricksoia coagulans</a> 747 1149 97% 0.0 83.81% 3664215 CP035305.1</p>

### 4.3.3 16S rRNA 进行凝结芽孢杆菌鉴定的可行性分析

通过 BLAST 将不同芽孢杆菌的 16S rRNA 序列与 NCBI 数据库中的已知序列进行比对, 发现序列相似性均在 99.5% 以上 (表 23), 16S rRNA 对于常见的几株芽孢杆菌的鉴定与区分是有效的, 无需用 *gyrB* 基因序列做比对鉴定。使用 CLUSTALX、BIOEDIT 和 TREECON 软件对凝结芽孢杆菌 16S rRNA 序列和其他芽孢杆菌的 16S rRNA 序列进行比对, 绘制系统发育树如图 20 所示。凝结芽孢杆菌的 16S rRNA 序列与常见的芽孢杆菌如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等处于不同分支, 且亲缘关系较远。同时, 2023 年将凝结芽孢杆菌重新分类为海恩德里克斯氏菌属 *Heyndrickxia*, 也说明了凝结芽孢杆菌与其它芽孢杆菌基因序列差异较大。

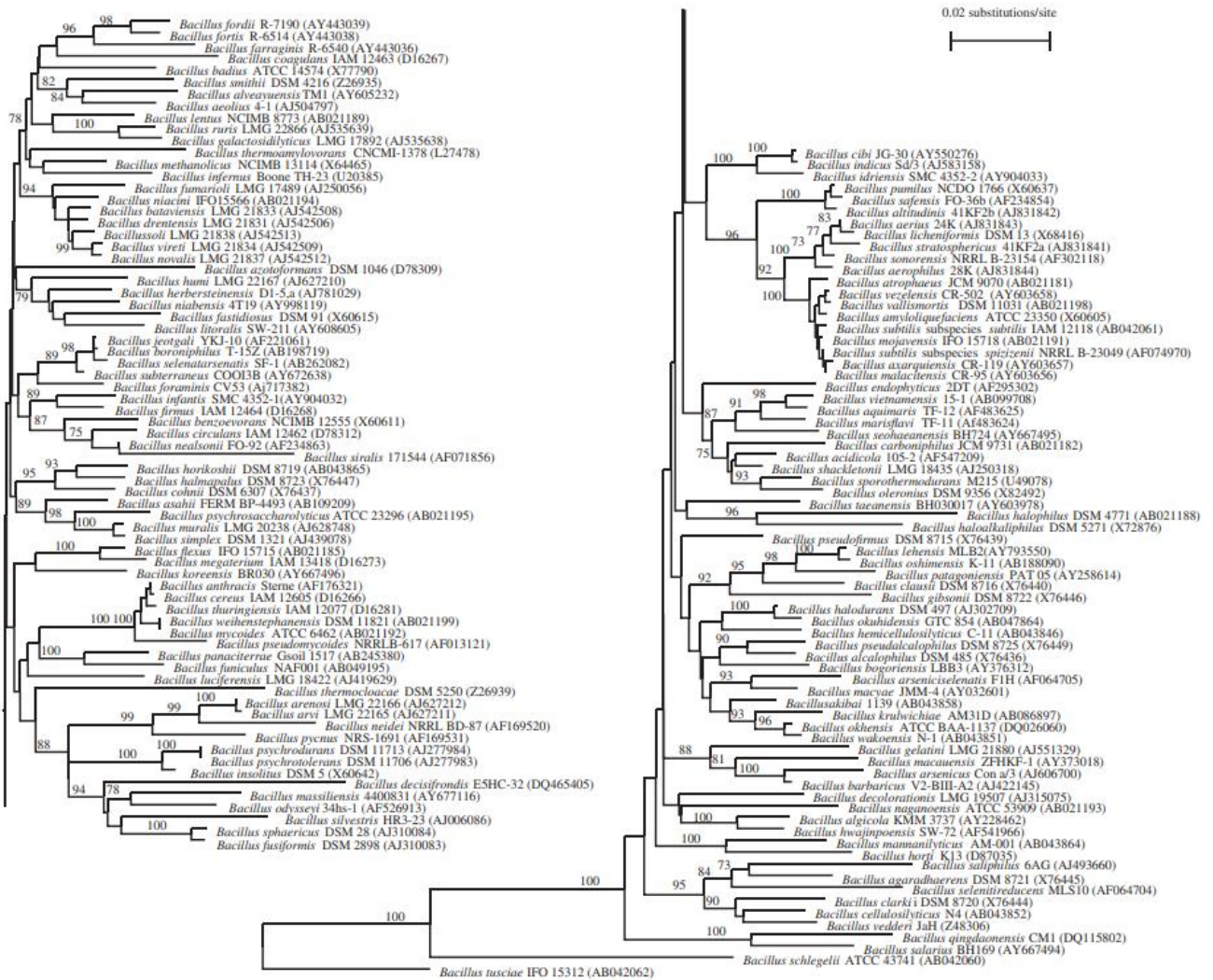


图 20: 基于 16S rRNA 基因序列的芽孢杆菌无根邻接系统发育树


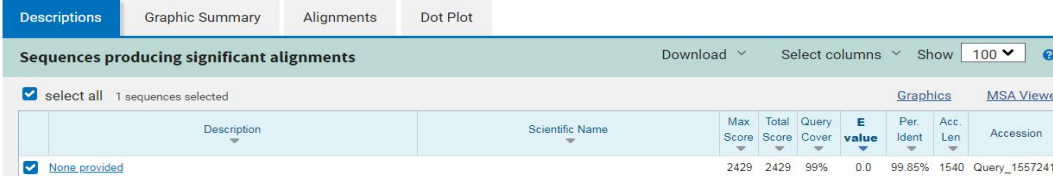
注：分支点的 bootstrap 数值显示高于 70%。数据来源于《伯杰氏系统细菌学手册》（Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria（2015））。

#### 4.3.4 16S rRNA 进行凝结芽孢杆菌分子鉴定的验证结果

将我们现有的凝结芽孢杆菌菌株，包括实验室保存菌株以及饲料添加剂生产企业的菌株进行 16S rRNA 测序，与凝结芽孢杆菌模式菌株 ATCC 7050 进行比对结果如表 25 所示。结果表明，利用 16S rRNA 序列测序比对的方法进行凝结芽孢杆菌的分子鉴定，结果准确可靠。

表 25 不同凝结芽孢杆菌 16S rRNA 序列及比对结果

菌株名称	不同凝结芽孢杆菌 16S rRNA 序列及与模式菌株 ATCC 7050（Gene ID:29814753）比对结果
凝结芽孢杆菌 Heyndrickxia (Bacillus) coagulans CGMCC 1.10823	<p>GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACCTGGCGGCGTGCTAATACATGCAAGTCGTGCGGACCTTTAAAAGCTTGCTTTAAAAGGTTAGC GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACGCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAGTTTTTCTCCGCA TGGAGGAAAAAGGAAAGCGGCTTCGGCTGCCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGGCAAC GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCA ATGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGCTTCGGGTCGTAATACTGTTGCCGGGGAAGAACAAGTGCCGTTCCGA ACAGGGCGGCGCCTTGACGGTACCCGGCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTGGAAGCGTTGTCCGG AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTAAGTCTGATGTGAAATCTTGGGCTCAACCGCAAGCGGTCATTGAAAAGCTGGGAGGCTT GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTG TAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGG TTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTGACATCCTCTGACCTCCCTGGAGACAGGGCCTTCCC CTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGACC TTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCGAATCATGATGCCCTTATGA CCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGTACAAAGGGTGGCAGACCGCGAGGTTAAGCAATCCAGAAAACCATCCAGTTCGGATTGCA GGCTGCAACCCGCTGCATGAAGCCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGT CACACCAGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTACGGAGCCAGCCCGGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGT AACAAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT</p>  <p>The screenshot shows a table with one row: 'None provided' with Max Score 2846, Total Score 2846, Query Cover 100%, E value 0.0, Per. Ident 99.81%, Acc. Len 1549, and Accession Query_1564963.</p>
凝结芽孢杆菌 H.coagulans CGMCC 1.0007	<p>CCACTTACAGATGGGCCCGCGCATTAGCTAGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGG CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG GTGAGTGAAGAAGGCTTCGGGTCGTAAAACCTGTTGCCGGGGAAGAACAAGTGCCGTTCCGAACAGGGCGGCGCCTTGACGGTACCCGGCCA GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGC TTCTAAGTCTGATGTGAAATCTTGGGCTCAACCGCAAGCGGTCATTGAAAAGCTGGGAGGCTTGAGTGAGAGAGGAGAGTGGAATCCACG TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG AGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT AAGCACTCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGA AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTACATCCTCTGACCTCCCTGGAGACAGGGCCTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCAT GGTTGCTGCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTACCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAA</p>

	<p>GGTGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGT  ACAAAGGGCTGCGAGACCGGAGGTTAAGCCAATCCAGAAAACCATCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACCCGCTGCATGAAGCCGGAAT  CGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGT  CGGTGAGGTAACCTTTACGGAGCCAGCCGCCGAAGGTG  GGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT</p> 
<p>凝结芽孢杆菌  H.coagulans  CGMCC 1.2009</p>	<p>AAGGAGGTGATCCAGCCGACCTCCGATACGGTACTCTGTGTACGACTTACCCCAATCATCTGCCACCTTCGCGGCTGGCTCCGTAAAGGT  TACCTCACCAGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCAGCGCATGCTGATCCGCG  ATTACTAGCGATTCCGGTTCATGCAGGCGGGTTGCAGCTGCAATCCGAAGTGGGAATGTTTTCTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTCTCGCAG  CCTTTTGTACCATCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCACCTTCTCCGGTTTGTACCAGGCA  GTCACCTTAGAGTGCCAACTCAATGCTGGCACTAAGGTCAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACAGGCTGACG  ACAACATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCGAAGGGGAAGGCCCTGTCTCCAGGGAGGTGAGAGGATGTAAGACCTGTAAGGTTCTTCGC  GTTGCTTGAATTAACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTAATCTTTGAGTTTACGCTTGGCGGCTACTCCCGAGCGGAGTG  CTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGCGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGATATCTAATCCTGTTTG  CTCCCCAGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATCTCTACGATTTACCAGCTACAG  TGGAATCCACTCTCTCTTCTGCACTCAAGCCTCCAGTTTCAATGACCGCTTGGGTTGAGCCGAAGATTTACATCAGACTTAAGAAGCCG  CCTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCACCTACGTATTACCGGGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGCCG  GGTACCGTCAAGGCGCCGCTGTTGAAACGGCACTGTTCTTCCCGGCAACAGAGTTTACGACCCGAAGGCTTCTTCACTCACGCGGCGTT  GCTCCGTGAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTCCCTCCGTAAGGATTTGGGCGGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTTC  TCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCTTGGTGGCCGTTACCCCGCAACTAGCTAATGCGCCGGGCCCCATCTGTAAGTGG</p> 
<p>凝结芽孢杆菌  H.coagulans  CGMCC 1.2407</p>	<p>CGGCTGGCTCGTAAGTTACCTCACCAGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCG  CGGATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGTTCATGCAGGCGGGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGGGAATGTTTTCTGGGATTGGCTTA  ACCTCGCGGTCTCGAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCACCTTCTCT  CCGTTTTGTACCAGGCACTACCTTAGAGTGCCAACTGAATGCTGGCACTAAGGTCAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCT  CACGACAGGCTGACGACAACCATGCACCCTGTCACTCTGTCCCGAAGGGGAAGGCCCTGTCTCCAGGGAGGTGAGAGGATGTAAGAC  CTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTGAATTAACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTAATCTTTGAGTTTACGCTTGGCGCGTA  CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAG  GGTATCTAATCCTGTTGCTCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATCTCTAC  GCATTTACCAGTACAGTGAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGCCTCCAGTTTCAATGACCGCTTGGGTTGAGCCGAAGATTTACAC  TCAGACTTAAGAAGCCGCTGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCACCTACGTATTACCGGGGCTGCTGGCAGTAGTTAG  CCGTGGCTTTCTGGCCGGTACCCTCAAGGCGCCGCTGTTGAAACGGCACTGTTCTTCCCGGCAACAGAGTTTACGACCCGAAGGCTTCT  TTCACTCACGCGGCTGCTCCGTGAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTCCCTCCGTAAGGATTTGGGCGGTGCTCAGTCCCA  ATGTGGCCGATCACCTCTCAGTCCGCTACGCATCGTTGCTTGGTGGCCGTTACCCCACTAGCTAATGCGCCGGGCCCCATCTGTAAG  TGACAGCCGAAGCGCTTCTCTTTTCTCCATGCGGAGGAAAAAATATCCGGTATTAGCCCGGTTTCCCGGCTTATCCCGATCTTACAGGCA  GGTTGCCAGTGTTACTACCCGCTCCGCGTAACCTTTTAAAGCAAGCTTTTAAAGGTCCGACGACTTGCATGATTAGGACGCGCCGAC</p>

Sequences producing significant alignments							
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
None provided		2630	2630	97%	0.0	99.24%	1540

#### 4.4 市场样品菌种鉴别

挑选了部分样品按照菌体形态、菌落形态、生理生化指标、16s rRNA 进行鉴定，所得结果均符合要求。

表 26: 菌株鉴定

试验项目	产品 4	产品 6	产品 12	产品 13	产品 17	产品 18
菌体形态	与描述相符	与描述相符	与描述相符	与描述相符	与描述相符	与描述相符
菌落形态	与描述相符	与描述相符	与描述相符	与描述相符	与描述相符	与描述相符
厌氧生长	+	+	+	+	+	+
接触酶	+	+	+	+	+	+
V-P 测定	+	+	+	+	+	+
D-葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+
L-阿拉伯糖产酸	+	+	+	+	+	+
水解明胶	-	-	-	-	-	-
水解酪蛋白	-	-	-	-	-	-
利用柠檬酸盐	-	-	-	-	-	-
利用丙酸盐	-	-	-	-	-	-
卵黄反应	-	-	-	-	-	-
硝酸盐还原	-	-	-	-	-	-
生长 NaCl: 7%	-	-	-	-	-	-
生长温度: 55°C	+	+	+	+	+	+
16S rRNA	与描述相符	与描述相符	与描述相符	与描述相符	与描述相符	与描述相符

## 5 活菌数测定方法

国内外具有代表性的凝结芽孢杆菌检测方法汇总如下表 27，不同方法的主要差异在培养基、稀释液、培养温度、培养时间等方面。

表 27：凝结芽孢杆菌活菌数方法汇总

编号	标准	培养基	稀释溶液	温度及时间	计数方法
1	饲用微生物制剂中凝结芽孢杆菌的检测 (DB 21/T 3278-2020)	改良 营 养琼脂	0.85%生理盐水	50℃ 24 h 好氧	平板法
2	饲料添加剂 凝结芽孢杆菌 (T/CSWSL 022-2020)	改良 营 养琼脂	0.85%生理盐水	50℃ 24 h 好氧	平板法
3	饲料添加剂 凝结芽孢杆菌的测定 (T/YNBX 024-2021)	改 良 MRS	0.85%生理盐水、0.1% 吐温-80	40℃ 48 h 好氧	平板法
4	动物饲料-芽孢杆菌的分离和计数方法 (EN 15784: 2021)	TSA	0.2%NaOH, 0.1% 吐 温-80	37℃ 16-24 h 好氧	平板法
5	动物饲料-乳杆菌的分离和计数方法 (EN 15787: 2020)	MRS	PBS+0.1%吐温-80	37℃ 48-72 h 厌氧	平板法
6	欧盟凝结芽孢杆菌 DSM 32016 检测方法的评估报告	MRS	改良 EN 15787, 稀释 液中加入 1% 吐温-80	加热处理, 37℃ 72 h 厌氧	平板法
7	其他企标	MRS pH 5.5	0.85%生理盐水	45℃ 48 h 好氧	平板法

### 5.1 培养条件的选择

参考上表中凝结芽孢杆菌的几种检测方法，配制下表 28 中的几种培养基。并按照方法中的不同培养条件进行比较，结果见下表 29。生长快慢方面，培养基 3 生长缓慢，容易染菌，可排除。培养基 1 和 5 也相对生长缓慢，培养基 1 在 45℃培养 24h 菌落小于培养基 2 和 4；培养基 5 在 45℃下培养 24h 生长极慢，需培养至 48h。在菌数方面，培养基 4 所得菌数最高，其次是培养基 2，进一步比较培养基 2 和 4。

见表 30，在不同的培养时间及培养温度下，培养基 2 比培养基 4 所测得菌数的变异系数更小，不同样品的菌落直径在培养基 2 上更大，说明生长更好。温度低于 45℃时，生长均较缓慢。综合以上，选择 2 号培养基，培养温度及时间为 45℃48h 或者 50℃24h。



表 28：培养基成分比较

成分	①DB 21/T 3278-2020; T/CSWSL 022-2020 改良营养琼脂	②T/YNBX 024-2021 改良 MRS	③EN 15784: 2021 胰蛋白 胨大豆琼脂 TSA	④EN 15787: 2020 MRS 培养基	⑤MRS 培 养基-企 标	⑥MRS 加富培养 基
大豆蛋白胨	5 g	/	5 g	/	/	/
蛋白胨	/	10 g	15 g	10 g	10 g	10 g
酵母膏	2 g	5 g	/	4 g	5 g	5 g
葡萄糖	5 g	5 g	/	20 g	20 g	5 g
牛肉膏	/	5 g	/	8 g	10 g	5 g
无水氯化钙	/	0.15 g	/	/	/	0.15 g
一水硫酸锰	/	0.1 g	/	/	/	0.1 g
氯化钠	/	2.5 g	5 g	/	/	2.5 g
L-半胱氨酸盐酸盐	0.25 g	0.5 g	/	/	/	0.5 g
三水醋酸钠	/	/	/	5 g	5 g	/
磷酸氢二钾	1 g	/	/	2 g	2 g	/
柠檬酸三铵	/	/	/	2 g	2 g	/
吐温 80	/	/	/	1 mL	1 mL	/
七水硫酸镁	0.1 g	/	/	0.2 g	0.1 g	/
四水硫酸锰	0.025 g	/	/	0.05 g	0.05 g	/
乙酸钠	2.5 g	/	/	/	/	/
溴甲酚紫	0.032 g	/	/	/	/	/
蒸馏水	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
琼脂粉	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
pH	5.5	5.2	7.3	6.2	5.5	5.5
培养条件	50°C 24 h	40°C 48 h	37°C 16-24 h	37°C 48-72 h 厌氧培养	45°C 48 h	45°C 48 h

表 29：培养条件比较

培养基	培养温度	活菌数 ( $\times 10^8$ CFU/g)		情况说明
		24h	48h	
1	37°C	未长	645.4 $\pm$ 83	培养基 1 可考虑
	45°C	782.3 $\pm$ 54	809.9 $\pm$ 35	
	50°C	813.8 $\pm$ 25	24h 已长好	
2/6	45°C	758.6 $\pm$ 36	857.1 $\pm$ 43	培养基 2 可考虑
	40°C	593.1 $\pm$ 41	677.8 $\pm$ 26	
3	45°C	未长	300 (染菌)	生长缓慢, 排除。
	37°C	未长	未长	

4	45°C	1032.0±81	1004.9±71	培养基 4 可考虑
	37°C (好氧)	太小	624.0±56	
	37°C (厌氧)	太小	857.1±43	
5	45°C	未长	733.0±54	培养基 5 可考虑, 但在 45°C 下培养时间较长, 需达到 48 h

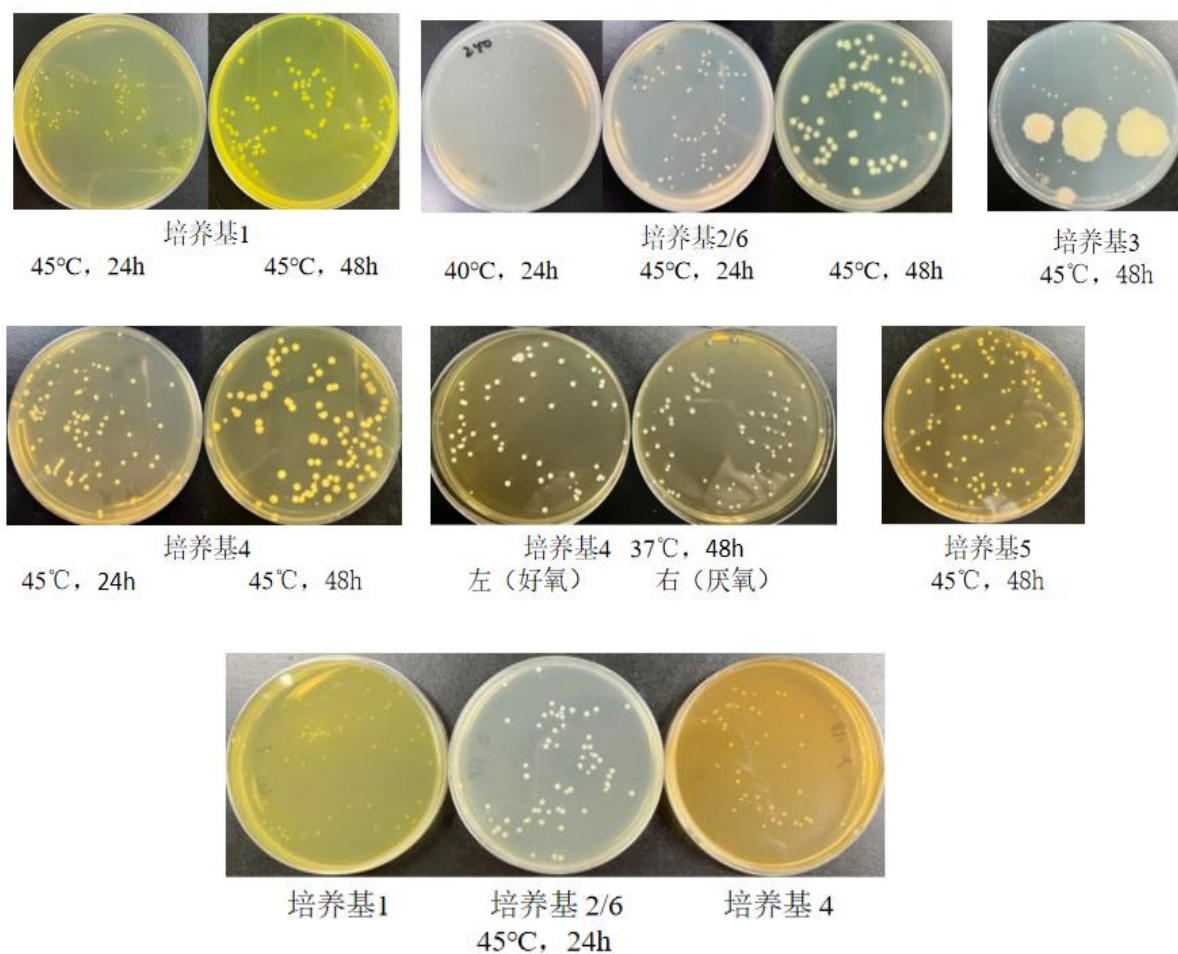


图 21: 不同培养基比较

表 30: 培养基 2 和培养基 4 的比较

样品	培养基 2 ( $\times 10^8$ CFU/g)						培养基 4 ( $\times 10^8$ CFU/g)					
	45°C24h	45°C48h	50°C 24h	50°C 48h	平均值±标准差	RSD	45°C24h	45°C48h	50°C/ 24h	50°C/ 48h	平均值±标准差	RSD
A	772±31	816±54	/	/	/	/	849±175	900±185	/	/	/	/
B	976±212	977±157	/	/	/	/	655±34	665±38	/	/	/	/
C	108.6	109.0	112.4	112.4	110.6±2.1	1.89%	110.8	111.9	108.4	101.3	108.1±4.8	4.41%
D	91.5	91.7	87.6	87.6	89.6±2.3	2.58%	69.7	72.6	63.7	78.4	71.1±6.1	8.60%
E	116	116.7	112.9	112.9	114.6±2.0	1.76%	127.4	128.9	99.1	100.5	114.0±16.4	14.38%
F	117.1	118.8	122.8	122.8	120.4±2.9	2.40%	112.3	124.3	108.9	111.3	114.2±6.9	6.03%

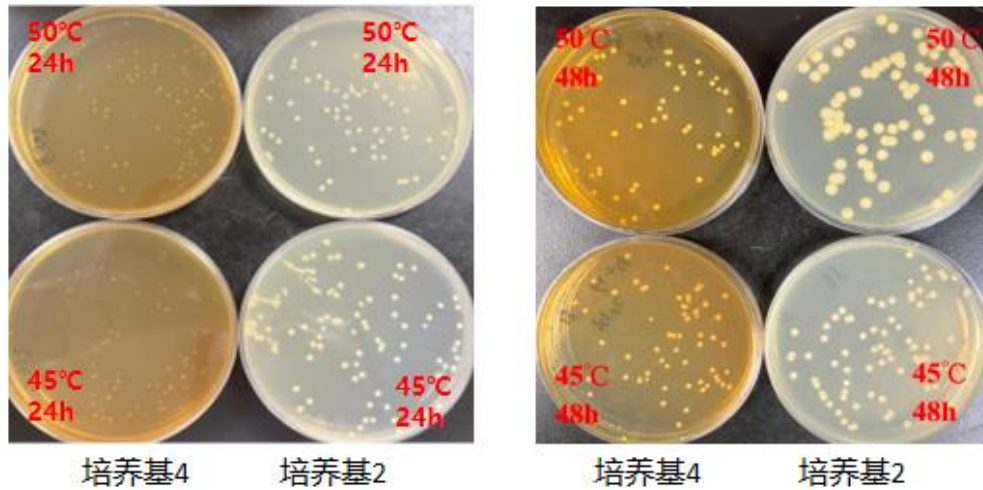


图 22：相同样品在不同培养条件下外观

## 5.2 耗氧需求的选择

选取三个不同的样品于 50°C 分别在好氧和厌氧的条件下培养 24h，实验结果见下表。在好氧及厌氧环境下菌数的差异不大，但厌氧环境下的菌落比好氧环境下的小，考虑到好氧设备更加普遍，故选择了好氧条件进行培养。

表 31：好氧厌氧比较

样品	活菌数 ( $\times 10^8$ CFU/g)		相对偏差
	好氧	厌氧	
A	115.5	116.0	0.21%
B	95.0	103.5	4.27%
C	95.3	95.3	0.00%

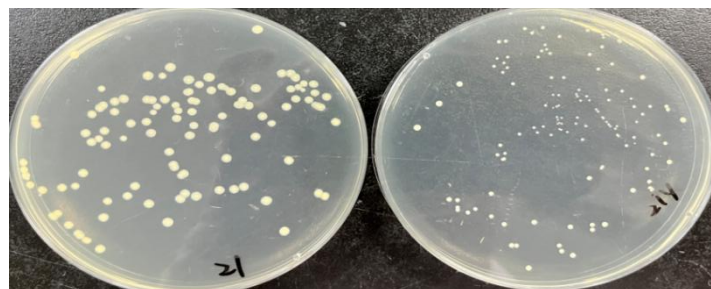


图 23：好氧培养（左）；厌氧培养（右）

## 5.3 称样量

一般饲料中有害微生物的检测称样量多为 25 g，但是益生菌含量都非常高，称样量过高不利于操作。对比不同称样量间的差别，实验结果见表 32，对于 1.0

×10<sup>10</sup> CFU/g 的产品差异较小，相对偏差均在 10%以内。综合考虑，将称样量设定为 5g。

表 32：称样量比较

样品	称样量	活菌数 (×10 <sup>8</sup> CFU/g)	相对偏差
A	1 g 样品+99 mL 生理盐水	115.5	1.75%
	25 g 样品+225 mL 生理盐水	119.7	
B	1 g 样品+99 mL 生理盐水	96.3	2.75%
	25 g 样品+225 mL 生理盐水	91.1	
C	1 g 样品+99 mL 生理盐水	94.6	7.05%
	25 g 样品+225 mL 生理盐水	109.0	

#### 5.4 稀释溶液的选择

采用以下 5 种稀释液进行比较，实验结果见表 34 和表 35。除稀释液 3 外，另 4 种稀释液对于 100 亿产品检测值差异不大，但添加有吐温的稀释液，对高菌数产品活菌数有显著提升，故选择 0.85%生理盐水+0.1%吐温 80 作为稀释液。

表 33：稀释液成分

编号	稀释溶液	标准
1	0.85%生理盐水	饲用微生物制剂中凝结芽孢杆菌的检测(DB 21/T 3278-2020)
		饲料添加剂 凝结芽孢杆菌 (T/CSWSL 022-2020)
		企标
2	0.85%生理盐水+0.1%吐温 80	饲料添加剂 凝结芽孢杆菌的测定 (T/YNBX 024-2021)
3	0.2%NaOH+0.1%吐温 80	动物饲料-芽孢杆菌的分离和计数方法 (EN 15784: 2021)
4	PBS+0.1%吐温 80, pH7.3	动物饲料-乳杆菌的分离和计数方法 (EN 15787: 2020)
5	PBS+1%吐温 80, pH7.3	欧盟凝结芽孢杆菌 DSM 32016 检测方法的评估报告

表 34：稀释液比较

编号	稀释溶液	活菌数 (×10 <sup>8</sup> CFU/g)		相对偏差
		实验一	实验二	
1	0.85%生理盐水	140.5	148.3	2.70%
2	0.85%生理盐水+0.1%吐温 80	125.7	139.1	5.06%
3	0.2%NaOH+0.1%吐温 80	4.4	/	/
4	PBS+0.1%吐温 80,pH7.3	137.3	140.8	1.26%
5	PBS+1%吐温 80,pH7.3	134.8	132.0	1.05%

表 35：高菌数产品稀释液比较

培养基	稀释液	样品 1 ( $\times 10^8$ CFU/g)	提升率	样品 2 ( $\times 10^8$ CFU/g)	提升率
1	0.85%生理盐水	769.5	21.40%	579.5	58.38%
	0.85%生理盐水+0.1%吐温 80	934.2		917.8	
2/6	0.85%生理盐水	797.4	14.03%	939.8	28.50%
	0.85%生理盐水+0.1%吐温 80	909.3		1207.6	
4	0.85%生理盐水	753.0	32.75%	686.0	28.15%
	0.85%生理盐水+0.1%吐温 80	999.6		879.1	

## 6 芽孢数测定方法

目前芽孢杆菌相关标准中规定的芽孢计数方法基本均采用 80℃水浴处理 10 min，例如 GB/T 26428-2010《饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测》，轻工标准 QB/T 5924-2023《凝结魏茨曼氏菌计数方法》及团标 TCSWSL 022-2020《饲料添加剂 凝结芽孢杆菌》中处理条件均为 80℃恒温水浴锅中处理 10 min。有 95%以上的企标中使用芽孢进行计数，企标中规定的芽孢处理方法也基本为 80℃水浴处理 10 min。故本文件未对芽孢检测方法进行其他条件的摸索，采用了 80℃水浴处理 10 min 作为芽孢处理条件。

经综合考虑，将 80℃水浴处理 10 min 纳入活菌数测定步骤中，以活菌数为测定指标。

## 7 活菌数数值的确定

未经高温处理的活菌数测定范围为  $4.6 \times 10^8$  CFU/g~ $1.2 \times 10^{11}$  CFU/g，95%以上符合标识，87.5%超过  $5.0 \times 10^9$  CFU/g。经高温处理的活菌数实测范围为  $3.8 \times 10^8$  CFU/g~ $1.1 \times 10^{11}$  CFU/g，81.25%超过  $5.0 \times 10^9$  CFU/g。

企标中规定活菌数范围为  $1.0 \times 10^7$ ~ $1.0 \times 10^{11}$  CFU/g。

另外，饲料中有效活菌数一般在  $10^6$  CFU/g 才能更好的发挥作用，凝结芽孢杆菌的添加量 0.01%~0.05%，从这个角度饲料添加剂活菌数不宜太低。

综合考虑，本文件规定凝结芽孢杆菌活菌数  $\geq 1.0 \times 10^9$  CFU/g。

表 36：市场样品活菌数和芽孢率实测值

序号	标识值	活菌数 <sup>1</sup> ( $\times 10^8$ CFU/g)	活菌数 <sup>2</sup> ( $\times 10^8$ CFU/g)

1	固体粉末, 100×10 <sup>8</sup> CFU/g	104.2	91.1
2	固体粉末, 1000×10 <sup>8</sup> CFU/g	1202.6	1076.9
3	固体粉末, 100×10 <sup>8</sup> CFU/g	4.6	3.8
4	固体粉末	98.1	88.8
5	固体粉末	87.9	75.5
6	固体粉末, 10×10 <sup>8</sup> CFU/g	59.4	46.2
7	固体粉末, 100×10 <sup>8</sup> CFU/g	232.4	194.7
8	固体粉末, ≥50×10 <sup>8</sup> CFU/g	67.5	62.5
9	固体粉末, ≥100×10 <sup>8</sup> CFU/g	103.4	100.8
10	固体粉末, 100×10 <sup>8</sup> CFU/g	85.0	78.0
11	固体粉末, 10×10 <sup>8</sup> CFU/g	17.7	19.4
12	固体粉末, 100×10 <sup>8</sup> CFU/g	114.4	64.3
13	固体粉末, 200×10 <sup>8</sup> CFU/g	236.6	112.6
14	固体粉末, 100×10 <sup>8</sup> CFU/g	106.6	87.7
15	固体粉末, 500×10 <sup>8</sup> CFU/g	691.7	599.3
16	固体粉末, 500×10 <sup>8</sup> CFU/g	663.7	638.8

注：1 为未经高温处理的活菌数，2 为经高温处理的活菌数。

## 8 杂菌率

在不同的培养方法下，可生长的杂菌不同，因此杂菌率与方法息息相关，目前常用的方法大概两类。一类是测定产品中细菌总数和霉菌总数，记为杂菌，但较多微生物饲料添加剂可在细菌总数和霉菌总数计数条件中生长，因此，该方法也存在严重的问题。一类是在产品本身培养条件下，生长的其他微生物为杂菌，这种方式培养条件决定了杂菌率。

### 8.1 杂菌（细菌总数）

取凝结芽孢杆菌样品测定细菌总数，见下图，10<sup>-1</sup>次平板长满菌落，从10<sup>-1</sup>到10<sup>-10</sup>菌落数呈现梯度关系。刮取10<sup>-1</sup>平板表面菌体镜检均为芽孢，取不同梯度平板中菌落，或为杆状，或为芽孢体，说明凝结芽孢杆菌可在此条件下生长，因此通过测定细菌总数作为杂菌不可行。

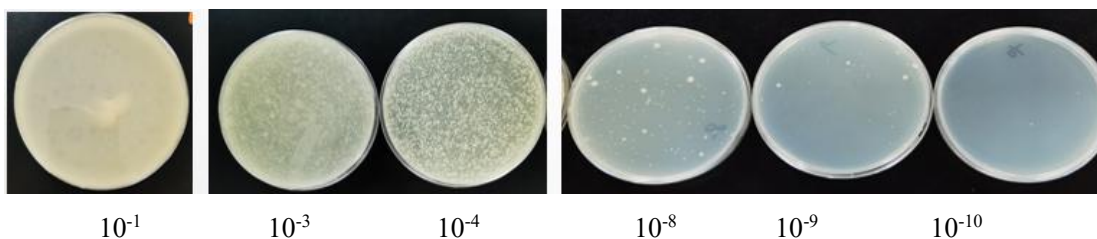


图 24：细菌总数平板



图 25：菌体镜检

注：依次为 10<sup>-1</sup> 平板表层菌体-芽孢，10<sup>-8</sup> 平板里层菌体-杆菌，10<sup>-8</sup> 平板表层菌体-芽孢

## 8.2 杂菌（凝结芽孢杆菌培养条件）

考虑杂菌率与方法有关，故通过复配进行验证该方法对杂菌率的影响。

### 8.2.1 样品及配方

样品：枯草芽孢杆菌（ $2.0 \times 10^{11}$  CFU/g）、地衣芽孢杆菌（ $1.0 \times 10^{11}$  CFU/g）、凝结芽孢杆菌（ $2.0 \times 10^{10}$  CFU/g）

复合产品配方：因非芽孢类产品可通过 80°C 10 min 水浴处理排出，因此只选择了枯草地衣进行复配。按照质量比进行复配（表 37），得到不同数量级含量的凝结芽孢杆菌。

表 37：复合产品配比

样品	凝结芽孢杆菌 (g)	地衣芽孢杆菌 (g)	枯草芽孢杆菌 (g)
复合产品 1	1	0.1	0.1
复合产品 2	0.33	0.33	0.33
复合产品 3	0.05	0.5	0.5

### 8.2.2 试验结果

由编号 1—6 的实验结果可知，地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌在 MRS pH5.5 的平板上于 37°C、45°C、55°C 培养 24h 和 48h 均未生长；地衣芽孢杆菌在 MRS 加

富 pH5.5 的平板上于 55℃ 培养 24h 和 48h 未生长，枯草芽孢杆菌在此条件下长势较差。而凝结芽孢杆菌在 MRS pH5.5, 45℃ 及 MRS 加富 pH5.5, 55℃ 两个条件下的长势均较好，故将这两种条件作为复合产品中凝结芽孢杆菌检测的培养条件。

由编号 7—12 的实验结果可知，复合产品在 MRS pH5.5, 45℃ 下培养 48 h，无论凝结芽孢杆菌的质量所占复合产品中的比例是多或者少，此培养条件下只有凝结芽孢杆菌的菌落，且实际测得的芽孢数与单菌芽孢数差别不大。复合产品在改良 MRS 的条件下，当凝结芽孢杆菌的质量所占复合产品中的比例为 1/3 及以上时，此培养条件下只有凝结芽孢杆菌的菌落，且实际测得的芽孢数与单菌芽孢数差别不大；但当凝结芽孢杆菌的质量所占复合产品的百分比为 4.76% 时，平板中有两种形态的菌，如图 26。

故复合产品中凝结芽孢杆菌检测的最佳培养条件为培养基 MRS pH5.5, 45℃ 培养 48h，此条件检测不出其他菌。而单菌产品采用改良 MRS 培养基可检出杂菌。也更加明确了采用的培养方法显著的影响着杂菌的检出。

基于没有严谨科学，且方便操作的检测方法，故不对杂菌及相关内容进行规定。

表 38：枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌在不同培养条件下的芽孢数

样品	编号	培养时间	NA (×10 <sup>8</sup> CFU/g)			MRSpH5.5 (×10 <sup>8</sup> CFU/g)			改良 MRS (×10 <sup>8</sup> CFU/g)			YPD (×10 <sup>8</sup> CFU/g)		
			37℃	45℃	55℃	37℃	45℃	55℃	37℃	45℃	55℃	37℃	45℃	55℃
地衣单菌	1	24h	870	870	770	未长	未长	未长	670	620	未长	1020	830	660
	2	48h	870	870	770	未长	未长	未长	670	620	未长	1020	830	660
枯草单菌	3	24h	2170	2370	230	未长	未长	未长	2560	2310	100	2020	1980	60
	4	48h	2170	2370	230	未长	未长	未长	2560	2310	100	2020	1980	60
凝结单菌	5	24h	/	6	119	未长	太小	未长	5	227	179	未长	205	175
	6	48h	0.23	110	215	未长	205	未长	84	227	179	168	205	175
复合产品 1	7	24h	/	/	/	/	太小	/	/	/	192	/	/	/
	8	48h	/	/	/	/	196	/	/	/	192	/	/	/
复合产品 2	9	24h	/	/	/	/	太小	/	/	/	207	/	/	/
	10	48h	/	/	/	/	228	/	/	/	207	/	/	/



复合 产品3	11	24h	/	/	/	/	太小	/	/	/	有两种	/	/	/
	12	48h	/	/	/	/	208	/	/	/	菌存在	/	/	/

注：（1）枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌分别稀释至  $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ ，涂布至 MRS 平板中，于  $45^{\circ}\text{C}$  培养 24h 和 48h，均无菌落生长（2）“/”表示未做此组实验







图 26：复合产品 3 在改良 MRS 平板上生长情况






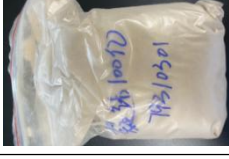
## 9 外观与性状

收集到的样品均为粉末状，颜色有白色、浅棕色、浅黄色或褐色，见下表 39 中实拍图。但考虑微生态产品颜色主要由载体颜色决定，不宜固定具体颜色。另外，产品带有一定的发酵气味。故对固态产品外观与性状描述为：色泽均匀一致，无结块，无霉变，有特殊发酵气味，无异臭味。

表 39：凝结芽孢杆菌产品质量指标

序号	水分	外观	粒度（0.85 mm）	外观实拍图
1	11.10%	白色固体粉末	100%通过	
2	7.80%	浅棕色固体粉末	100%通过	
3	6.3%	浅棕色固体粉末	100%通过	

4	7.00%	浅棕色固体粉末	100%通过	
5	6.40%	浅棕色固体粉末	100%通过	
6	7.40%	浅棕色固体粉末	100%通过	
7	6.80%	棕色固体粉末	100%通过	
8	4.21%	白色固体粉末	100%通过	
9	6.60%	白色固体粉末	100%通过	
10	3.52%	灰色固体粉末	100%通过	
11	4.32%	白色固体粉末	100%通过	
12	4.45%	白色固体粉末	100%通过	

13	2.30%	浅黄色固体粉末	100%通过	
14	3.31%	浅棕色固体粉末	100%通过	
15	6.70%	浅黄色固体粉末	100%通过	
16	9.70%	棕色固体粉末	100%通过	
17	2.62%	棕色固体粉末	100%通过	
18	2.0%	浅棕色固体粉末	100%通过	

## 10 水分

采用 GB/T 6435-2014 《饲料中水分的测定》测定 18 个样品水分，1 个样品水分超过 10%，17 个样品水分（占比 94.44%） $\leq 10\%$ （表 39）。企标中有约 24.32%规定水分 $\leq 12\%$ ，5.4%规定 $\leq 9\%$ ，70.27%规定 $\leq 10\%$ 。综合考虑规定水分 $\leq 10\%$ 。

## 11 粒度

采用 GB/T 5917.1-2008 《饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法》对样品进行筛分，样品均为粉末状，均 100%通过 0.85 mm 孔径试验筛（表 39）。将粒度规定如下：产品 90 %以上通过孔径为 0.85 mm 的试验筛。

## 12 总砷的测定

采用 GB/T 13079 《饲料中总砷的测定》测定总砷（以 As 计）含量，结果见表 40。结果表明，最大值为 1.31 mg/kg，最小值为 0.05 mg/kg，平均值为 0.52 mg/kg。

GB 13078-2017《饲料卫生标准》中规定“其他矿物质饲料原料 $\leq 10.0$  mg/kg”，NY/T 1444-2007《微生物饲料添加剂技术通则》中规定总砷 $\leq 2.0$  mg/kg, NY/T 4347-2023《饲料添加剂 丁酸梭菌》中规定总砷 $\leq 2.0$  mg/kg, GB 7300.501-2021《饲料添加剂 第5部分：微生物 酿酒酵母》、GB 7300.502-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 植物乳杆菌》、GB 7300.503-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 屎肠球菌》、GB 7300.504-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 嗜酸乳杆菌》四项已发布强标中均规定总砷 $\leq 2.0$  mg/kg。综合考虑，本文件将总砷（以 As 计）含量定为 $\leq 2$  mg/kg。

表 40：总砷

样品	As (mg/kg)	样品	As (mg/kg)
1	0.36	12	0.12
2	1.31	13	0.12
3	0.78	14	0.23
4	0.17	15	0.05
5	0.36	16	0.25
6	0.24	17	0.54
7	0.84	18	0.68
8	0.26	最大值	1.31
9	0.99	最小值	0.05
10	1.04	平均值	0.52
11	0.95		

### 13 铅的测定

采用 GB/T 13080《饲料中铅的测定 原子吸收光谱法》测定铅含量，结果见表 41。结果表明，所测样品中铅含量最大值为 4.146 mg/kg，最小值为 0.086 mg/kg，平均值为 0.607 mg/kg。参考 GB 13078-2017《饲料卫生标准》中规定“矿物质饲料原料 $\leq 15.0$  mg/kg”，NY/T 1444-2007《微生物饲料添加剂技术通则》中规定铅 $\leq 5.0$  mg/kg, GB 7300.501-2021《饲料添加剂 第5部分：微生物 酿酒酵母》中规定铅 $\leq 1.5$  mg/kg、GB 7300.502-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 植物乳杆菌》、GB 7300.503-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 屎肠球菌》、GB 7300.504-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 嗜酸乳杆菌》三项标准规定铅 $\leq 5$  mg/kg, NY/T

4347-2023《饲料添加剂 丁酸梭菌》规定铅 $\leq 10$  mg/kg。综合考虑,本文件将铅(以Pb计)含量定为 $\leq 5$  mg/kg。

表 41: 铅含量

样品	Pb(mg/kg)	样品	Pb(mg/kg)
1	0.12	12	0.170
2	4.146	13	0.334
3	0.088	14	0.296
4	0.112	15	0.086
5	0.116	16	0.189
6	0.079	17	0.303
7	0.565	18	1.400
8	0.477	最大值	4.146
9	1.270	最小值	0.086
10	0.404	平均值	0.607
11	0.765		

## 14 汞的测定

采用 GB/T 13081《饲料中汞的测定》测定汞含量,结果见表 42,最大值 0.042 mg/kg,最小值 0.005 mg/kg,平均值 0.017 mg/kg。GB 13078-2017《饲料卫生标准》中规定“其他饲料原料 $\leq 0.1$  mg/kg”, NY/T 1444-2007《微生物饲料添加剂技术通则》、NY/T 4347-2023《饲料添加剂 丁酸梭菌》、GB 7300.501-2021《饲料添加剂 第 5 部分:微生物 酿酒酵母》、GB 7300.502-2023《饲料添加剂 第 5 部分:微生物 植物乳杆菌》、GB 7300.503-2023《饲料添加剂 第 5 部分:微生物 屎肠球菌》、GB 7300.504-2023《饲料添加剂 第 5 部分:微生物 嗜酸乳杆菌》中均规定汞 $\leq 0.1$  mg/kg。综合考虑,本文件规定汞含量 $\leq 0.1$  mg/kg。

表 42: 汞含量

样品	Hg (mg/kg)	样品	Hg (mg/kg)
1	0.019	12	0.014
2	0.011	13	0.013
3	0.019	14	0.005
4	0.013	15	0.014
5	0.012	16	0.027
6	0.024	17	0.014

7	0.042	18	0.013
8	0.018	最大值	0.042
9	0.013	最小值	0.005
10	0.014	平均值	0.017
11	0.025		

## 15 镉的测定

采用 GB/T 13082《饲料中镉的测定方法》测定镉含量，结果见表 43。结果表明，镉含量都比较低，最大值 0.146 mg/kg，最小值 0.002 mg/kg，平均值 0.032 mg/kg。参考 GB 13078-2017《饲料卫生标准》中规定“植物性饲料原料 $\leq 1.0$  mg/kg”、“其他矿物质饲料原料 $\leq 2.0$  mg/kg”，NY/T 1444-2007《微生物饲料添加剂技术通则》、GB 7300.501-2021《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 酿酒酵母》、GB 7300.502-2023《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 植物乳杆菌》、GB 7300.503-2023《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 屎肠球菌》、GB 7300.504-2023《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 嗜酸乳杆菌》中均规定镉 $\leq 0.50$  mg/kg。NY/T 4347-2023《饲料添加剂 丁酸梭菌》规定镉 $\leq 2$  mg/kg。综合考虑，本文件规定镉含量为 $\leq 0.5$  mg/kg。

表 43：镉含量

样品	Cd (mg/kg)	样品	Cd (mg/kg)
1	0.008	12	0.047
2	0.007	13	0.021
3	0.009	14	0.095
4	0.005	15	0.072
5	0.002	16	0.022
6	0.013	17	0.006
7	0.012	18	0.025
8	0.005	最大值	0.146
9	0.015	最小值	0.002
10	0.146	平均值	0.032
11	0.057		

## 16 霉菌总数

采用 GB/T 13092《饲料中霉菌总数的测定》测定霉菌总数，测定值在2300 CFU/g 以内，部分未检出。GB7300.501-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 酿酒酵母》中未规定霉菌总数，GB7300.502-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 植物乳杆菌》和GB7300.503-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 屎肠球菌》规定的 $\leq 1 \times 10^4$ CFU/g，GB7300.504-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 嗜酸乳杆菌》规定 $\leq 1 \times 10^3$ CFU/g，NY/T 4347-2023《饲料添加剂 丁酸梭菌》规定 $\leq 4 \times 10^4$ CFU/g。综合考虑，本文件规定霉菌总数 $\leq 1 \times 10^4$ CFU/g。

表 44：霉菌总数

样品	霉菌总数 (CFU/g)	样品	霉菌总数 (CFU/g)
1	114	12	—
2	232	13	—
3	<100	14	—
4	<100	15	125
5	300	16	<100
6	1900	17	<100
7	2300	18	<100
8	<100	最大值	2300
9	122	最小值	<100
10	<100	平均值	414
11	—		

## 17 大肠菌群的测定

采用 GB/T 18869《饲料中大肠菌群的测定》测定，只有 2 个样品检出，且均低于  $1.0 \times 10^3$  MPN/100 g。GB 13078-2017《饲料卫生标准》和 GB 7300.501-2021《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 酿酒酵母》中没有规定大肠菌群，GB 7300.502-2023《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 植物乳杆菌》、GB 7300.503-2023《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 屎肠球菌》、GB 7300.504-2023《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 嗜酸乳杆菌》中均规定大肠杆菌群 $\leq 1.0 \times 10^3$  MPN/100 g。NY/T 4347-2023《饲料添加剂 丁酸梭菌》规定 $\leq 1.0 \times 10^4$  MPN/100 g。综合考虑，本文件中大肠菌群 $\leq 1.0 \times 10^4$  MPN/100 g。

表 45: 大肠菌群含量

样品	MPN/100 g	样品	MPN/100 g
1	—	12	—
2	—	13	—
3	—	14	—
4	—	15	—
5	—	16	—
6	—	17	380
7	—	18	—
8	—	最大值	/
9	—	最小值	/
10	360	平均值	/
11	—		

注: —为低于定量限 (300 MPN/100 g)。

## 18 沙门氏菌的测定

采用 GB/T 13091 《饲料中沙门氏菌的检测方法》检测沙门氏菌, 结果见表 46, 所测样品中均未检出沙门氏菌。本文件中规定沙门氏菌不得检出。

表 46: 沙门氏菌含量

样品	个/25 g	样品	个/25 g
1	—	12	—
2	—	13	—
3	—	14	—
4	—	15	—
5	—	16	—
6	—	17	—
7	—	18	—
8	—	最大值	—
9	—	最小值	—
10	—	平均值	—
11	—		

## 19 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 测定

选取部分样品进行检测, 最大值 6.08  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 最小值 2.87  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 大部分低于



2 µg/kg。GB 13078-2017《饲料卫生标准》中规定“其他植物性饲料原料黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> ≤30 µg/kg”，GB 7300.501-2021《饲料添加剂 第5部分：微生物 酿酒酵母》中没有规定该指标，GB 7300.502-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 植物乳杆菌》、GB 7300.503-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 屎肠球菌》、GB 7300.504-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 嗜酸乳杆菌》中均规定黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 制定为 ≤10 µg/kg，NY/T 4347-2023《饲料添加剂 丁酸梭菌》规定 ≤30 µg/kg。综合考虑，本文件将饲料添加剂凝结芽孢杆菌产品黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 规定为 ≤10 µg/kg。

表 47：黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量

样品	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)	样品	AFB <sub>1</sub> (µg/kg)
1	2.23	12	<2
2	4.01	13	<2
3	5.36	14	4.54
4	<2	15	3.86
5	<2	16	<2
6	<2	17	<2
7	3.56	18	<2
8	<2	最大值	6.08
9	6.08	最小值	2
10	<2	平均值	2.87
11	<2		

## 20 玉米赤霉烯酮的测定

选取部分样品进行检测，最大值 0.11 mg/kg，最小值 0.03 mg/kg，检测结果均比较低。GB 13078-2017《饲料卫生标准》中规定“玉米皮、喷浆玉米皮玉米浆干粉玉米酒糟类产品玉米赤霉烯酮毒素要求为 ≤1.5 mg/kg”，GB 7300.502-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 植物乳杆菌》、GB 7300.503-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 屎肠球菌》中规定玉米赤霉烯酮为 ≤0.1 mg/kg，GB 7300.504-2023《饲料添加剂 第5部分：微生物 嗜酸乳杆菌》中规定玉米赤霉烯酮为 ≤0.5 mg/kg，NY/T 4347-2023《饲料添加剂 丁酸梭菌》规定 ≤1 mg/kg。综合考虑，预审稿中规定玉米赤霉烯酮制定为 ≤1 mg/kg，会上专家组结合实测数据，定向征求意见以及企业代表反馈情况，建议删除该指标。

表 48：玉米赤霉烯酮含量

样品	玉米赤霉烯酮 (mg/kg)	样品	玉米赤霉烯酮 (mg/kg)
1	<0.01	12	<0.01
2	<0.01	13	<0.01
3	0.11	14	0.03
4	0.11	15	0.08
5	<0.01	16	<0.01
6	<0.01	17	<0.01
7	<0.01	18	<0.01
8	<0.01	最大值	0.11
9	0.09	最小值	0.03
10	<0.01	平均值	0.03
11	0.016		

## 21 脱氧雪镰刀菌烯醇的测定

GB 13078 中规定饲料原料和饲料产品使用方法为 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》，本文件也按照 GB/T 30956 执行，检测结果见下表。最大值为 1.9 mg/kg，最小值为 0.2 mg/kg，大部分样品含量低于检测限。GB 13078-2017 《饲料卫生标准》中规定“植物性饲料原料含量脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素要求为 $\leq 5$  mg/kg”，GB 7300.502-2023 《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 植物乳杆菌》、GB 7300.503-2023 《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 屎肠球菌》中规定为 $\leq 1.0$ mg/kg，GB 7300.504-2023 《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 嗜酸乳杆菌》中规定 $\leq 2.0$  mg/kg，NY/T 4347-2023 《饲料添加剂 丁酸梭菌》规定 $\leq 5$  mg/kg。综合考虑，预审稿将脱氧雪腐镰刀菌烯醇规定为 $\leq 2$  mg/kg，会上专家组结合实测数据，定向征求意见以及企业代表反馈情况，建议删除该指标。

表 49：脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量

样品	DON (mg/kg)	样品	DON (mg/kg)
1	1.4	12	<0.1
2	<0.1	13	<0.1
3	<0.1	14	1.7
4	<0.1	15	0.6
5	1.9	16	<0.1

6	1.4	17	0.5
7	<0.1	18	<0.2
8	<0.1	最大值	1.9
9	<0.1	最小值	0.2
10	1.6	平均值	0.57
11	<0.1		

## 22 保质期

36家企标（表1）中规定的保质期为12个月的企业占比63.89%，18个月占比13.89%，24个月13.89%，该产品稳定性较好，整体保质期均较长。保质期与菌种特性、工艺等关系密切，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”。

## 23 与已发布同类标准指标比较

已确定指标同已发布同类标准进行比较，其中总砷、汞、镉、黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、沙门氏菌、鉴别基本一致，铅、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、霉菌总数、大肠菌群指标值存在差异，已发布的5项产品标准均未规定杂菌率。

表 50：相关标准对比

指标	GB 13078-2017 《饲料卫生标准》	NY/T 1444-2007 《微生物饲料添加剂技术通则》	GB7300.501-2023 《饲料添加剂 第5部分：微生物酿酒酵母》	GB7300.502-2023 《饲料添加剂 第5部分：微生物植物乳杆菌》	GB7300.503-2023 《饲料添加剂 第5部分：微生物尿肠球菌》	GB7300.504-2023 《饲料添加剂 第5部分：微生物嗜酸乳杆菌》	NY/T 4347-2023 《饲料添加剂 丁酸梭菌》	《饲料添加剂 第5部分：微生物凝结芽孢杆菌》
总砷（以As计）/（mg/kg）	其他矿物质饲料原料 10.0 mg/kg	2.0	2.0	2.0	2.0	2	2	2
铅（Pb）/（mg/kg）	矿物质饲料原料 15.0 mg/kg	5.0	1.5	5.0	5.0	5	10	5
汞（Hg）/（mg/kg）	其他饲料原料 0.1 mg/kg	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
镉（Cd）/（mg/kg）	其他矿物质饲料原料 2.0 mg/kg	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.5
黄曲霉毒素B <sub>1</sub> /（μg/kg）	其他植物性饲料原料 30	10	/	10.0	10.0	10	30	10
玉米赤霉烯酮/（mg/kg）	其他植物性饲料原料 1	无	/	0.1	0.1	0.5	1	/

脱氧雪腐镰刀菌烯醇/(mg/kg)	植物性饲料原料 5	无	/	1.0	1.0	2	5	/
霉菌总数 / (CFU/g)	谷物及其加工产品 4.0×10 <sup>4</sup>	2.0×10 <sup>4</sup>	/	1×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>3</sup>	4.0×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>4</sup>
大肠菌群 / (MPN/100 g)	无	100	/	1×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>
沙门氏菌 (25 g 中)	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出
杂菌率 (%)	/	有	/	/	/	/	/	/
形态鉴别	无	无	有	有	有	无	有	有
生理生化鉴别	无	无	有	有	有	无	有	有
分子生物学鉴别	无	无	有	有	有	无	有	有

### (三) 第三方验证

邀请国家饲料质量检验检测中心、湖北省饲料质量监督检验站和辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院三家单位进行第三方验证，具体结果见验证报告。下表仅为活菌数验证结果，活菌数回收率 94%~116%之间，变异系数 1.79%~5.66%。三家对凝结芽孢杆菌菌体形态的镜检结果、菌落形态和生理生化特征验证结果均一致。

表 51：第三方验证结果

单位	样品	活菌数 (×10 <sup>10</sup> CFU/g)	回收率	变异系数
国家饲料质量检验检测中心	样品 1	2.0~2.1	102%~110%	2.8%
	样品 2	1.5~1.6	94%~100%	2.4%
湖北省饲料质量监督检验站	样品 1	1.839~2.095	95.5%~108.8%	2.21%~4.36%
	样品 2	1.511~1.67	97.1%~107.3%	1.79%~5.66%
辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院	样品 1	2.1~2.2	111%~116%	2.4%
	样品 2	1.7~1.8	106%~113%	3.1%

## 三、与有关法律、行政法规和其他强制性标准的关系，配套推荐性标准的制定情况

在本文件的制定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，与有关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调性原则。

#### **四、 与国际国标准化组织、其他国家或者地区有关法律法规和标准的比对分析**

未查询到包括 ISO、IEC、DIN、AFNOR、AENOR、BELST 等国际标准和国外标准。

#### **五、 重大分歧意见的处理过程、处理意见及依据**

本文件在制定过程中无重大分歧意见。

#### **六、 对强制性国家标准自发布日期至实施日期的过渡期（以下简称过渡期）的建议及理由**

建议按照强制性国家标准管理办法设置自发布日期至实施日期的过渡期为 1 年。在过渡期间，组织学习国家标准，加大对标准的宣传及贯彻力度，标准委员会作为企业之间的桥梁，做好沟通，推进行业的进一步发展。过渡期内，企业应在标准发布 2 个月内对产品进行以上指标的测定与甄别。对于满足要求的产品，确认产品标签是否需根据标准重新进行修改、设计和印刷，如需修改，与供应商及时进行确认，对已经印刷的包装材料进行消耗。对于不满足要求的产品，在标准实施前，进行产品库存销售，并保证不满足要求老旧产品在过渡期结束时退出市场，同时根据企业情况评估是否需要购进或改进技术装备、检测手段等，以配合产品的质量达标或相关检测，与上游供应商沟通确认产品标签，与下游客户沟通修改质量规格协议，修订相关合同内容。

#### **七、 与实施强制性国家标准有关的政策措施**

根据《强制性国家标准管理办法》第九条，县级以上人民政府标准化行政主管部门和有关行政主管部门依据法定职责，对强制性国家标准的实施进行监督检查。根据《饲料和饲料添加剂管理条例》第三条规定，国务院农业行政主管部门负责全国饲料、饲料添加剂的监督管理工作。县级以上地方人民政府负责饲料、饲料添加剂管理的部门（以下简称饲料管理部门），负责本行政区域饲料、饲料添加剂的监督管理工作。第四条，县级以上地方人民政府统一领导本行政区域饲

料、饲料添加剂的监督管理工作，建立健全监督管理机制，保障监督管理工作的开展。

违反该强制性国家标准的行为，依据第 609 号国务院令《饲料和饲料添加剂管理条例》、农业农村部第 2625 号《饲料添加剂安全使用规范》、主席令 2000 年第 33 号《中华人民共和国产品质量法》和主席令第 11 号《中华人民共和国标准化法》等相关法律法规条款进行处理。

## **八、 是否需要对外通报的建议及理由**

按照《全国饲料工业标准化技术委员会标准预审管理办法（实行）》的要求，强制性国家标准进行 WTO 成员国官方通报，期限一般为 60 天。本标准已于 xx 年 x 月 x 日完成 WTO 成员国官方通报。

## **九、 废止现行有关标准的建议**

没有需要废止的相关标准。

## **十、 涉及专利的有关说明**

本文件不涉及专利。

## **十一、 强制性国家标准所涉及的产品、过程或者服务目录**

本文件适用于以中华人民共和国农业农村部公告《饲料添加剂品种目录》中规定的饲料添加剂凝结芽孢杆菌产品。

## **十二、 其他应予说明的事项**

无其他需进行说明的事项。