

《抗鸡源产气荚膜梭菌的益生菌筛选及深度鉴评技术规范（征求意见稿）》编制说明

一、任务来源

产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）是引起鸡坏死性肠炎的主要病原体，该病在集约化养殖模式下广泛流行，导致鸡只生长迟缓、饲料转化率下降、死亡率升高，给养禽业造成重大经济损失。长期以来，抗生素是防控该病的主要手段，但由于用药频繁、管理不规范，细菌耐药性问题日益严峻。随着国家“饲料禁抗”和“养殖减抗”政策的全面实施，益生菌作为一种绿色、安全的抗生素替代品，市场需求巨大。

然而，目前我国尚缺乏一套科学、统一、针对“抗鸡源产气荚膜梭菌”益生菌筛选与鉴评的技术标准。各科研机构和企业采用的分离方法、评价指标和判定标准不一，导致产品质量参差不齐，功能标注混乱，检测结果缺乏可比性和权威性，不利于行业管理和替抗产品的科学应用。现有标准如GB/T 20191《饲料中嗜酸乳杆菌的微生物学检验》仅涉及单一菌种的检测方法，NY/T 1442《饲料添加剂 微生物 嗜酸乳杆菌》仅涉及产品质量标准，均未涵盖从分离纯化、体外拮抗、安全性评价到动物体内验证的全流程技术规范。

为落实《全国兽药残留与耐药性监测计划》及绿色养殖的相关要求，规范抗鸡源产气荚膜梭菌益生菌的筛选与鉴评技术，确保筛选流程的科学性和评价结果的可追溯性，并为益生菌产品的质量控制和精准应用提供技术支撑，温氏食品集团股份有限公司、广东省农业科学院动物卫生研究所及广东温氏大华农生物科技有限公司联合向广东省畜牧兽医学会提出了《抗鸡源产气荚膜梭菌的益生菌筛选及深度鉴评技术规范》团体标准立项申请。学会随后组织了标准预研工作，并召开专家论证会，对立项申请进行了审查。经充分讨论与评估，专家组一致认为，该项目资料基本齐全、论证充分，符合国家产业发展需求，所申报的团体标准立项条件完备，同意立项。目前，标准研究团队已完成主要技术参数与指标的试验验证，形成了标准文本征求意见稿。

二、起草工作简要过程

（一）标准参与单位和参与人员

本文件由温氏食品集团股份有限公司、广东省农业科学院动物卫生研究所、广东温氏大华农生物科技有限公司联合起草。

本文件起草人为覃健萍、孙铭飞、邹增丁、戚南山、周庆丰、刘小艳、王占新、陈丹、刘松柏、高立坤、王定爱、苏观志、罗霜、逢诗蕾、廖申权、李娟、蔡海明、林栩慧、吕敏娜、宋勇乐、陈祥杰、朱易斌、张健骅等。

（二）工作任务分工

标准编制过程中，温氏食品集团股份有限公司负责标准整体框架设计、体外拮抗试验方法验证及动物体内验证试验；广东省农业科学院动物卫生研究所负责菌株分离纯化、安全性评价及抗性分析方法的建立与验证；广东温氏大华农生物科技有限公司负责培养基优化、试剂配制及部分验证试验。

覃健萍：项目负责人，负责的标准的立项、整体方案确立及宣贯，负责标准的审阅、项目申报建议及相关技术文件的校订；

孙铭飞、邹增丁、戚南山、张健骅：负责各版本标准稿的讨论；

周庆丰、刘小艳、王占新、陈丹、刘松柏：负责标准中方法的建立；
廖申权、李娟、吕敏娜：负责各版本标准稿的修订工作及征求意见后的修改工作；
蔡海明、宋勇乐：负责标准中部分方法的起草和验证；
林栩慧、陈祥杰、朱易斌：负责仪器设备的验证、耗材的选择；
高立坤、王定爱、苏观志、罗霜、逢诗蕾：负责部分标准方法的验证及推广应用。

（三）主要起草过程

1. 预研阶段（2026年5月—2026年6月）

为制定本标准，项目组组织相关技术人员广泛调研和资料收集，系统查阅了国内外关于益生菌筛选、产气荚膜梭菌防控的技术专著、科研论文，以及国家、地方和行业标准等大量文献资料，并结合生产实践与检测需求，开展了多轮技术研讨与方案预讨论工作。

2. 起草阶段（2026年7月—2026年10月）

在标准起草过程中，项目组重点围绕关键技术参数进行了系统验证，内容涵盖鸡源益生菌的分离纯化、体外拮抗能力测定、安全性评价、抗逆性分析及动物体内验证等方面，确保所提出技术指标的科学性、合理性与可操作性。截止2026年7月中旬，项目组已完成标准文本的初稿编制与修改。

3. 立项阶段（2026年7月—2026年8月）

广东省畜牧兽医学会根据《广东省畜牧兽医学会团体标准管理办法》的相关规定召开团体标准立项评审会，经评估论证，批准立项并予以公告。

3. 征求意见阶段（2026年8月—2026年9月）

2026年8月，学会对外发布征求意见稿，公开征求意见。本次征求意见工作共收到来自吉林大学、中国农业科学院上海兽医研究所、宁夏大学、安徽科技工程大学、广西大学、中国农业大学、南京农业大学、华中农业大学、华南农业大学等10家单位、10位专家的反馈意见，共计32条。经标准编制组认真研究和核查，意见处理结果如下：采纳26条，部分采纳2条，不采纳4条。编制组根据采纳及部分采纳的意见，对标准文本进行了相应修改和完善，形成了征求意见稿。

三、编写原则和确定标准主要内容的依据

（一）标准编制原则

本标准按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。编制过程中遵循“科学性、先进性、实用性”原则，既吸收国际通行的益生菌评价理念，又紧密结合我国养禽业生产实际和减抗需求，确保标准的可操作性。

（二）主要技术内容确定的依据

1. 标准名称

本标准名称为：抗鸡源产气荚膜梭菌的益生菌筛选及深度鉴评技术规范；对应英文为：Technical specification for screening and evaluation of probiotics against chicken-derived *Clostridium perfringens*。

理由及依据：根据标准计划下达名称，最终将标准名称确定为“抗鸡源产气荚膜梭菌的益生菌筛选及深度鉴评技术规范”。英文名称根据对应的中文意思进行翻译，“抗鸡源产气荚膜梭菌”翻译为“against chicken-derived *Clostridium perfringens*”，“益生菌筛选及深度鉴评”翻译为“screening and evaluation of probiotics”，因此标准对应的英文名称确定为“Technical specification for screening and evaluation of probiotics against chicken-derived *Clostridium perfringens*”。

2. 标准范围

本文件规定了抗鸡源产气荚膜梭菌的益生菌筛选与鉴评的术语和定义、益生菌的分离与纯化、体外拮抗能力测定、安全性评价、抗逆性分析、益生菌体内效能验证的技术要求。本文件适用于从鸡源样品中分离获得的乳酸杆菌、芽孢杆菌、肠球菌等候选益生菌的筛选，以及其抗鸡源产气荚膜梭菌功能的综合评价。

理由及依据：根据专家意见，原范围中“乳酸杆菌、芽孢杆菌、肠球菌等来源的鸡源益生菌”语义关系不够清晰，修改后明确了菌株来源、候选菌种范围及评价对象，使标准适用范围更加准确。

3. 术语和定义

本标准设置了益生菌、产气荚膜梭菌、抑菌圈、深度鉴评4个术语。其中，益生菌定义参考FAO/WHO《食品益生菌评价指南》，并结合本标准实际，限定为“拟用于鸡肠道健康调控的活菌制剂”；抑菌圈定义根据专家意见修改为“在琼脂扩散试验（如牛津杯法）中，因益生菌或其代谢产物抑制指示菌生长而形成的透明区域或生长受抑区域”，与6.2牛津杯法保持一致。

4. 符号与缩略词

本标准列出了BHI、TSB、CFU、MRS、FTG、MIC等缩略词。根据专家意见，补充了BHI（脑心浸液）、TSB（胰酪大豆胨肉汤）、FTG（流体硫乙醇酸盐培养基）等缩略语，确保缩略语完整。

5. 益生菌的分离与纯化

5.1 样品采集：规定采集健康鸡的新鲜粪便或盲肠内容物，4℃保存，24 h内送检。该依据来源于GB/T 20191及常规微生物学检验方法。

5.2 菌株分离：根据专家意见，增加了稀释倍数（10倍梯度稀释）、培养条件（乳酸菌37℃厌氧48 h；芽孢杆菌37℃需氧24 h；肠球菌37℃需氧24~48 h）、菌落形态描述（乳酸菌：圆形、凸起、乳白色；芽孢杆菌：干燥、不透明、边缘不规则；肠球菌：灰白色、针尖状、光滑）及菌种鉴定要求（16S rRNA基因测序或MALDI-TOF质谱鉴定到种水平）。该依据来源于GB/T 20191、NY/T 4656-2025及常规微生物学检验方法。

6. 体外拮抗能力测定

6.1 指示菌的活化：规定将鸡源产气荚膜梭菌标准株或临床分离株接种于FTG培养基或TSB厌氧肉汤中，37℃厌氧培养16 h~20 h，调整浓度至约 1×10^8 CFU/mL。该依据来源于GB/T 26426-2010中规定的厌氧培养条件。

6.2 牛津杯法：规定BHI半固体琼脂与产气荚膜梭菌菌液（终浓度约 10^6 CFU/mL）混匀倾注平板，加入150 μL待测益生菌发酵上清液，4℃扩散2 h后37℃厌氧培养18 h~24 h，测定抑菌圈直径，≥15 mm判定为强拮抗活性。该阈值基于项目组前期对86株潜在益生菌的筛选数据统计得出（抑菌圈直径16 mm~24 mm）。

6.3 抑菌物质稳定性分析：根据专家意见，明确了pH梯度（2.0、4.0、7.0、8.0）、温度梯度（60℃、80℃、100℃处理30 min）、蛋白酶K终浓度（1 mg/mL，37℃孵育1 h），并增加了空白培养基对照。该依据来源于益生菌功能评价的常规方法及专家建议。

7. 安全性评价

7.1 溶血性：规定血琼脂平板法，37℃培养24 h~48 h，无溶血圈或α溶血判定为安全，β溶血判定为不安全。该依据来源于FAO/WHO益生菌安全性评价指南。

7.2 抗生素敏感性试验：根据专家意见，明确了CLSI（美国临床和实验室标准协会）和EUCAST（欧洲药敏试验委员会）的全称，并增加了可转移耐药基因的说明（如van、mec、tet(M)等），规定携带可转移耐药基因的菌株不得选用。该依据来源于CLSI M100标准及FAO/WHO益生菌评价指南。

8. 抗逆性分析

根据专家意见，补充了活菌计数方法（平板倾注法或涂布法，每个稀释度3个重复，设空白对照扣除本底）。规定待测菌悬液（约 10^8 CFU/mL）加入pH 2.5人工胃液37℃孵育2 h，转接至pH 8.0人工肠液（含胆盐0.3%）37℃孵育4 h，存活率 $>50\%$ 判定为耐受性良好。该依据来源于《中华人民共和国兽药典》及FAO/WHO益生菌评价指南。

9. 益生菌体内效能验证

9.1 试验分组：根据专家意见，增加了阴性菌株对照组（无拮抗功能益生菌），以排除非特异性肠道调节干扰。选取1日龄健康雏鸡，随机分为5组：空白对照组、攻毒对照组、阴性菌株对照组、益生菌低剂量组（ 10^6 CFU/只）、益生菌高剂量组（ 10^8 CFU/只），每组3个重复，每个重复10只鸡。

9.2 模型建立与评价：根据专家意见，补充了攻毒剂量（ 1×10^8 CFU/只，连续3 d）、qPCR方法（以cpa基因为靶标，制作标准曲线定量）、病理组织学观察指标（绒毛长度、隐窝深度、炎性细胞浸润）。该依据来源于国内外主流学术文献及相关兽药临床药效评价指导原则。

10. 判定标准

根据专家意见，调整了判定标准：（1）体外抑菌圈直径 ≥ 15 mm，记录抑菌物质对蛋白酶、pH、热处理的敏感性特征作为菌株背景信息，不再将“抑菌物质对蛋白酶敏感”作为硬性判定条件；（2）无 β 溶血现象，不携带可转移的临床重要耐药基因；（3）人工胃肠液存活率 $>50\%$ ；（4）动物试验证实可显著降低肠道病变评分（ $P < 0.05$ ）或显著降低盲肠产气荚膜梭菌定植数量（ $P < 0.05$ ）。

11. 附录A（规范性）培养基与试剂配制

根据专家意见，将各成分表表头统一修改为“含量（g/L）”，明确了单位。附录A规定了MRS培养基、营养琼脂培养基、血琼脂平板、人工胃液、人工肠液、抗生素药敏纸片、PBS缓冲液等配制方法。

12. 附录B（资料性）产气荚膜梭菌肠道病变记分标准

采用国际通用的5分制（0~4分）坏死性肠炎病变评分系统（Johnson & Reid改良法），根据专家意见，在9.2中明确引用附录B，4分描述中删除“因产气荚膜梭菌感染死亡的鸡只也记为4分”，记分仅针对肠道病理损伤。

四、技术经济论证和预期的经济效益

（一）技术经济分析论证

益生菌替抗技术是当前畜牧业减抗行动的重要方向。本标准在编制过程中，充分参考了国内外相关研究成果与现行技术规范，结合我国养禽业生产特点与实验室检测条件，经过多轮试验验证与专家论证，所提出的筛选流程、技术参数及判定方法科学、合理、可操作性强。

标准在技术路径上采用成熟可靠的实验方法，能够在现有实验设备条件下直接应用，无需高额投入即可开展常规筛选与评价，具备良好的技术普及与推广基础。本标准的实施不依赖昂贵仪器设备，主要使用微生物学常规实验室设施，配套试剂和材料可在国内稳定供应，检测成本低、重复性好。通过标准化操作规程，可显著提高筛选效率、降低误差与重复试验成本，从而提升整体经济效益。

（二）预期的经济效益

通过统一的筛选与鉴评技术标准，可显著提高不同研发机构间产品数据的可比性与一致性，为建立益生菌产品质量数据库提供技术支撑，减少重复筛选与无效试验，降低研发成本。标准化的评价数据有助于饲料企业和养殖场选择高效、安全的益生菌产品，从源头上减少抗生素的滥用，降低耐药风险和药残隐患。

通过精准应用高效的抗产气荚膜梭菌益生菌，可有效减少鸡坏死性肠炎的发生率和死亡率。据估算，标准实施后，在规模化养殖场应用可使坏死性肠炎造成的经济损失降低约15%~25%，提高饲料转化率和日增重，带来显著经济收益。标准的实施将推动我国益生菌产业由粗放式生产向科学化评价转变，提升畜禽微生态制剂行业的整体水平，为畜禽产品质量安全、畜牧业绿色发展提供重要技术支撑。

五、采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比

目前，国内外虽已发布部分与益生菌相关的技术标准，但尚缺乏专门针对“抗鸡源产气荚膜梭菌”这一特定功能进行筛选与鉴评的技术规范。FAO/WHO发布的《食品益生菌评价指南》（Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food）提供了通用框架，包括菌株鉴定、安全性评价、功能性评价等基本要求，但未涉及特定病原（如产气荚膜梭菌）的拮抗评价和动物攻毒模型验证。

国际标准化组织（ISO）发布了ISO 15213-3:2024《食物链微生物学——产气荚膜梭菌检测方法》，但仅限于病原菌检测，未涉及拮抗用益生菌的筛选。国内标准如T/CIFST 009-2022《食品用益生菌通则》主要针对食品领域，未涵盖禽类病原拮抗和动物体内验证。

本标准针对上述空白，系统规范了从分离纯化、体外拮抗、安全性评价、抗逆性分析到动物体内验证的全流程技术环节，其中体外抑菌圈直径阈值、人工胃肠液存活率标准、肠道病变5分制评分体系等关键参数均基于国际通用方法和项目组验证数据确定。本标准的制定，不仅补充和完善了我国在禽用特异性功能益生菌评价领域的技术规范体系，为替抗产品的研发和应用提供了科学依据，同时也为益生菌产业的规范发展提供了关键技术支撑。

六、与现行法律、法规、政策及相关标准的协调性

本标准与现行的法律、行政法规、部门规章、国家和行业标准总体一致，并在现有规范的基础上补充和细化了针对抗鸡源产气荚膜梭菌益生菌筛选鉴评的专门技术要求。引用的GB 4789.28-2024、GB/T 18869-2019、GB/T 20191-2006、GB/T 26426-2010、NY/T 1442-2007、NY/T 4656-2025等标准均为现行有效版本，与《饲料和饲料添加剂管理条例》《兽药管理条例》等法律法规无抵触。本标准弥补了现行标准在特定功能益生菌评价方面的空白，且不与上位法律法规相抵触。

七、征求意见的采纳情况

（一）意见征集情况

本次标准征求意见工作共收到来自吉林大学、中国农业科学院上海兽医研究所、宁夏大学、安徽科技工程大学、广西大学、中国农业大学、南京农业大学、华中农业大学、华南农业大学等10家单位、10位专家的反馈意见，共计32条。经评审论证和编制组评估，采纳26条，部分采纳2条，不采纳4条。

（二）未采纳意见说明

未采纳意见主要集中在部分技术细节和非关键条款。关于将“抗生素敏感性试验”修改为“药敏试验”的建议，编制组认为“抗生素敏感性试验”为更规范的专业术语，且与CLSI标准术语一致，故未予采纳。关于删除“动物体内验证”环节的建议，编制组认为动物试验是评价益生菌体内效能的不可或缺的关键环节，能够验证体外筛选结果与实际应用效果的一致性，且是FAO/WHO益生菌评价指南的核心要求，故未采纳该意见。关于将“丁酸梭菌”改为“酪酸梭菌”的建议，编制组认为“丁酸梭菌”为《饲料添加剂品种目录》中的规范名称，故未采纳。

（三）主要修订内容

根据征集意见对标准主要做了以下修订：

- （1）完善了第1章范围表述，明确了菌株来源、候选菌种范围及评价对象；
- （2）补充了第4章缩略语（BHI、TSB、FTG等）；
- （3）细化了5.2菌株分离步骤，增加了稀释倍数、培养条件、菌落形态描述及菌种鉴定要求；
- （4）明确了6.3抑菌物质稳定性分析的pH梯度、温度梯度、蛋白酶浓度及空白对照；
- （5）完善了7.2抗生素敏感性试验中CLSI和EUCAST的全称及可转移耐药基因说明；
- （6）补充了第8章活菌计数方法和空白对照；
- （7）增加了9.1阴性菌株对照组，细化了9.2攻毒剂量、qPCR方法及病理观察指标；
- （8）调整了第10章判定标准，删除“抑菌物质对蛋白酶敏感”的硬性条件；
- （9）修改了附录A表头单位标注；
- （10）在9.2中明确引用附录B，修改了附录B中4分描述。

八、贯彻实施标准的措施和建议

（一）组织实施

本次标准征求意见工作共收到来自吉林大学、中国农业科学院上海兽医研究所、宁夏大学、安徽科技工程大学、广西大学、中国农业大学、南京农业大学、华中农业大学、华南农业大学等10家单位、10位专家的反馈意见，共计32条。经评审论证和编制组评估，采纳26条，部分采纳2条，不采纳4条。

（二）未采纳意见说明

未采纳意见主要集中在部分技术细节和非关键条款。关于将“抗生素敏感性试验”修改为“药敏试验”的建议，编制组认为“抗生素敏感性试验”为更规范的专业术语，且与CLSI标准术语一致，故未予采纳。关于删除“动物体内验证”环节的建议，编制组认为动物试验是评价益生菌体内效能的不可或缺的关键环节，能够验证体外筛选结果与实际应用效果的一致性，且是FAO/WHO益生菌评价指南的核心要求，故未采纳该意见。关于将“丁酸梭菌”改为“酪酸梭菌”的建议，编制组认为“丁酸梭菌”为《饲料添加剂品种目录》中的规范名称，故未采纳。

（三）主要修订内容

根据征集意见对标准主要做了以下修订：

- （1）完善了第1章范围表述，明确了菌株来源、候选菌种范围及评价对象；
- （2）补充了第4章缩略语（BHI、TSB、FTG等）；
- （3）细化了5.2菌株分离步骤，增加了稀释倍数、培养条件、菌落形态描述及菌种鉴定要求；
- （4）明确了6.3抑菌物质稳定性分析的pH梯度、温度梯度、蛋白酶浓度及空白对照；
- （5）完善了7.2抗生素敏感性试验中CLSI和EUCAST的全称及可转移耐药基因说明；
- （6）补充了第8章活菌计数方法和空白对照；
- （7）增加了9.1阴性菌株对照组，细化了9.2攻毒剂量、qPCR方法及病理观察指标；
- （8）调整了第10章判定标准，删除“抑菌物质对蛋白酶敏感”的硬性条件；
- （9）修改了附录A表头单位标注；
- （10）在9.2中明确引用附录B，修改了附录B中4分描述。

九、贯彻实施标准的措施和建议

本标准发布后，可通过相关部门组织的政策引导、技术培训、示范带动等多种措施，推动标准在科研机构、检测机构、益生菌生产企业及规模化养殖场中的全面落实。建议归口单位组织编

写配套的宣贯材料，针对益生菌研发技术人员开展标准操作培训，并选择有代表性的益生菌生产企业先行试点，逐步推广，促进益生菌产业和禽病防控工作的科学化、标准化和精准化。

九、其它应予说明的事项

无。