

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

解淀粉芽孢杆菌母药

Bacillus amyloliquefaciens Technical concentrate

（征求意见稿）

（本稿完成日期：2025.10）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部种植业管理司提出。

本文件由全国农药标准化技术委员会(SAC/TC 133)归口。

本文件起草单位：。

本文件主要起草人：

解淀粉芽孢杆菌母药

警告：使用本文件的人员应有实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施。

1 范围

本文件规定了解淀粉芽孢杆菌母药的技术要求、检验规则、验收和质量保证期以及标志、标签、包装、储运，描述了解淀粉芽孢杆菌母药的试验方法。

本文件适用于解淀粉芽孢杆菌母药产品的质量控制。

注：解淀粉芽孢杆菌拉丁名称、分类地位和形态学特征等描述参见附录A。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 1601 农药 pH 值的测定方法

GB/T 1604 商品农药验收规则

GB/T 1605—2001 商品农药的采样方法

GB 3796—2018 农药包装通则

GB 4789.2-2022 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定

GB 20813—2006 农药产品标签通则

GB/T 30361 农药干燥减量的测定方法

GB/T 37874-2019 核酸提取纯化方法评价通则

NY/T 4686-2025 直接饲喂微生物和发酵制品类饲料添加剂生产菌株 细菌菌种鉴定 分子生物学方法

3 术语、定义和缩略语

下列文件的术语和定义适用于本文件。

3.1 术语和定义

菌落形成单位 colony forming units (CFU)

解淀粉芽孢杆菌母药稀释后得到的菌液通过涂布的方法，让其单个芽孢分散在营养琼脂平板上，待培养后，每个活芽孢形成一个菌落，即一个菌落形成单位（CFU），通过肉眼观察菌落的数量来推算单位微生物农药样品中的活芽孢含量。

3.1.1

GB/T 33031—XXXX

杂菌数 number of microbial contaminants

样品中，除解淀粉芽孢杆菌菌落以外的其他菌（真菌+细菌）菌落之和。

3.1.2

杂菌率 rate of microbial contaminants

样品中除解淀粉芽孢杆菌外，杂菌数占总菌量的百分率。

3.1.3

平均核苷酸一致性 Aaverage Nucleotide Identity

简称ANI，是一种从基因组水平计算基因组相似性的分析方法。

4 技术要求

4.1 外观

均匀疏松的粉末。

4.2 技术指标

解淀粉芽孢杆菌母药应符合表1要求。

表 1 解淀粉芽孢杆菌母药技术指标

项 目	指 标
解淀粉芽孢杆菌活芽孢数/（CFU/g）	≥标示值 ^a
杂菌率/%	≤3.0
干燥减量/%	≤6.0
pH 值	4.5~7.5
^a 标示值可以是 5000 亿 CFU/g、1000 亿 CFU/g、100 亿 CFU/g	

5 试验方法

5.1 一般规定

本文件所用试剂和水在没有注明其他要求时，均指生化试剂和蒸馏水。

5.2 取样

解淀粉芽孢杆菌母药按 GB/T 1605—2001中5.3.1进行。用随机数表法确定取样的包装件数，最终取样量应不少于100 g。

5.3 菌种鉴别

由于芽孢杆菌属内菌株高度同源性，因此需对全基因组测序，进行ANI分析，当对鉴别有争议或需要进行法律仲裁检验时，应道具有菌种鉴定资质的单位，将待检菌与模式菌种进行比较，出具菌种鉴定报告，作为仲裁依据。

有效成分的特征及鉴别方法参见附录A。

5.4 活芽孢数

5.4.1 方法提要

采用平板菌落计数法。将母药润湿、稀释后，均匀涂布在培养基平板上，待各芽孢菌体形成菌落后，统计菌落总数，以单位样品（g）中菌落形成单位数（CFU）表示活芽孢数（CFU/g）。

5.4.2 试剂、培养基和溶液

5.4.2.1 水。

5.4.2.2 吐温-20。

5.4.2.3 营养琼脂（NA）培养基（g/L）：蛋白胨 10 g，牛肉浸粉 3 g，氯化钠 5 g，琼脂 15 g，蒸馏水 1000 mL，浸泡 3 min~5min 后，加热煮沸使琼脂溶解，补充水至 1L，摇匀，分装后，121℃高压蒸汽灭菌 15 min。

5.4.2.4 NA 平板制备：5.4.2.3 培养基冷却至约 50℃，倾倒入直径 90 mm 平板，厚度不小于 3 mm，静置待凝固，琼脂表面适当干燥后，倒置，以免产生冷凝水污染培养基。于（30±2）℃培养（24±2）h，验证无微生物污染后方可使用。

5.4.2.5 0.05%吐温-20 水溶液：取 1L 水，用移液器移入 0.5 mL 吐温-20，超声振荡 10 min，分装后，于 121℃高压灭菌 30 min，冷却后备用。

5.4.3 仪器

5.4.3.1 分析天平：精度为 0.0001 g。

5.4.3.2 移液器：20 μL~200 μL，1 mL~10 mL。

5.4.3.3 高压蒸汽灭菌器。

5.4.3.4 振荡器。

5.4.3.5 超净工作台。

5.4.3.6 恒温培养箱。

5.4.4 试验步骤

5.4.4.1 试样处理

样品搅拌均匀，准确称取3.0 g样品（精确至0.01g），于装有10粒无菌玻璃珠的三角瓶中，移入27.0 mL的0.05%吐温-20水溶液，浸泡30 min后，以200 r/min 振荡30 min，得到稀释10倍的样品溶液，标记为0号。然后参照表2（以稀释8次为例）进行梯度稀释。

表 2 梯度稀释示例

编 号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
0.05%吐温-20 水溶液体积, mL	27.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0

加入上一稀释浓度溶液的体积, mL	—	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
累计稀释度	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹

5.4.4.2 涂板计数

按母药规格选择适宜梯度稀释液，吸取100 μL于NA平板上，用无菌涂布棒均匀涂布在整个平板表面，每一稀释度做3次重复。涂布至少三个稀释度，涵盖菌落数大于300 CFU、30 CFU~300 CFU及小于30 CFU稀释度；同时取100 μL的0.05%吐温-20水溶液涂布于NA培养基平板上，做3次重复，作为空白对照。

上述平板倒置于（30±2）℃下培养18 h~30 h后，选择适宜的稀释度，取菌落数在30 CFU~300 CFU之间的平板进行计数。

5.4.4.3 计算

若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，活芽孢数 X_1 按式（1）计算：

$$X_1 = \frac{N}{3 \times 0.1 \times d} \dots\dots\dots (1)$$

如有两个连续稀释度的平板菌落数均在适宜计数范围之内，则按式（2）计算：

$$X_1 = \frac{N}{(1 \times 3 + 0.1 \times 3) \times 0.1 \times d} \dots\dots\dots (2)$$

- 式中：
- X_1 ——单位样品 (g) 中的菌落数 (CFU/g)；
 - N ——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和，CFU；
 - 3 ——每个稀释度调查平板数；
 - d ——连续两个稀释度中的前一个稀释度。

5.4.4.4 菌落总数报告

按GB 4789.2-2022中7.2进行。

5.4.4.5 允许差

两次平行测定结果之相对差应不大于20%，取其算术平均值作为测定结果。

5.5 杂菌率

5.5.1 方法提要

采用平板菌落计数法。选择同有效成分计数相同稀释度的稀释液，涂布在培养基平板上，统计细菌杂菌、真菌杂菌菌落数，结合解淀粉芽孢杆菌菌落数，计算杂菌率。

5.5.2 试剂、培养基和溶液

5.5.2.1 含氯霉素马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基（g/L）：马铃薯粉 6.0 g，葡萄糖 20.0 g，氯霉素 0.1 g，琼脂 20.0 g，蒸馏水 1000 mL，浸泡 3 min~5 min，加热煮沸后，补充水至 1L，分装后，121℃ 高压灭菌 15 min。

5.5.2.2 PDA（含氯霉素）平板制备：5.5.2.1 培养基冷却至约 50℃，倾倒入直径 90 mm 平板，厚度不小于 5 mm，静置待凝固，琼脂表面适当干燥后，倒置，以免产生冷凝水污染培养基。

5.5.2.3 其余同 5.4.2。

5.5.3 仪器

5.5.3.1 同 5.4.3。

5.5.4 试验步骤

5.5.4.1 细菌杂菌

与 5.4 活芽孢数测定同时进行。

5.5.4.2 真菌杂菌

按 5.4 进行，选择 5.4 中所涂布平板的相同稀释溶液，取 100 μL 涂布在 PDA（含氯霉素）平板上，每一稀释度做 3 次重复，同时取 100 μL 的 0.05%吐温-20 水溶液涂布于 PDA（含氯霉素）平板上，做 3 次重复，做为稀释液空白对照另取 3 个 PDA（含氯霉素）平板，作为平板空白对照。上述平板倒置于（30 ± 2）℃下培养 48 h。

5.5.4.3 杂菌计数

细菌杂菌，选择 5.4 中解淀粉芽孢杆菌菌落在 30 CFU~300 CFU 的平板，选择与解淀粉芽孢杆菌形态不同的菌落计数。

真菌杂菌，选择 5.4 中解淀粉芽孢杆菌菌落在 30 CFU~300 CFU 平板相同稀释度的稀释液涂布 PDA（含氯霉素）平板，计菌落数。

若 5.4 测定中有两个稀释度的菌落数在 30 CFU~300 CFU，杂菌数选择第一稀释度的平板进行计数。

5.5.5 计算

杂菌率 X_2 按公式（3）计算：

$$X_2 = \frac{N_1 + N_2}{N_1 + N_2 + N} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X_2 ——样品中的杂菌率，%；

N_1 ——细菌杂菌菌落数总和，CFU；

N_2 ——真菌杂菌菌落数总和，CFU；

N ——解淀粉芽孢杆菌菌落数总和，CFU。

5.5.6 结果报告

5.5.6.1 若稀释液空白对照、平板空白对照有菌落生长，则此次检验结果无效。

5.5.6.2 取两次结果的算术平均值作为测定结果。

5.6 干燥减量

按GB/T 30361进行。

5.7 pH 值

按GB/T 1601进行。

6 检验规则

6.1 出厂检验

每批产品均应做出厂检验,经检验合格签发合格证后,方可出厂。出厂检验项目为第4章中外观、活芽孢数、杂菌率、干燥减量、pH值。

6.2 型式检验

型式检验项目为第4章中的全部项目,在正常连续生产情况下,每3个月至少进行一次。有下述情况之一,应进行型式检验:

- a) 原料有较大改变,可能影响产品质量时;
- b) 生产地址、生产设备或生产工艺有较大改变,可能影响产品质量时;
- c) 停产后又恢复生产时;
- d) 质量监管机构提出型式检验要求时。

6.3 判定规则

按 GB/T 8170-2008 中4.3.3判定检验结果是否符合本文件要求。

按第4章技术要求对产品进行出厂检验和型式检验,任一项目不符合指标要求判为该批次产品不合格。

7 验收和质量保证期

7.1 验收

应符合 GB/T 1604的规定。

7.2 质量保证期

在8.2的储运条件下,解淀粉芽孢杆菌母药的质量保证期从生产日期算起为2年。质量保证期内,解淀粉芽孢杆菌母药的活芽孢数不低于储前测定值的70%,且各项指标仍符合本文件要求。

8 标志、标签、包装、储运

8.1 标志、标签、包装

解淀粉芽孢杆菌母药的标志、标签、包装应符合 GB 3796 的规定;解淀粉芽孢杆菌母药采用聚酯瓶、聚乙烯瓶包装或高阻隔瓶包装,并应有铝箔封口,每瓶的净含量可以为 50 g、100 g、250 g、500 g、1 kg 等,也可采取更大包装;外包装可用纸箱、瓦楞纸板箱,每箱的净含量不应超过 15 kg,也可根据用户要求或订货协议,采用其他形式的包装,但需符合 GB 3796 的规定。

8.2 储运

解淀粉芽孢杆菌母药包装件应储存在通风、阴凉、干燥的库房中，严防日晒；储运时，产品对温度敏感，要关注储运时的温度变化，要严防潮湿、日晒和高温，不得与食物、种子、饲料混放，避免与皮肤、眼睛接触，防止由口鼻吸入。

附录 A
(资料性)

A.1 解淀粉芽孢杆菌的拉丁学名、分类地位和形态学特征参数

——拉丁学名：*Bacillus amyloliquefaciens*;

——分类地位：细菌(*Bacteria*)；厚壁菌门(*Bacillota*)；芽孢杆菌纲(*Bacilli*)；芽孢杆菌目(*Bacillales*)；芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)；芽孢杆菌属(*Bacillus*)；解淀粉芽孢杆菌种组(*Bacillus amyloliquefaciens group*)。

——菌体形态学特征：革兰氏阳性杆状菌(如图A.1)，周身鞭毛(如图A.2)。芽孢呈椭圆至柱状，芽孢囊不膨大，中生或近中生(如图A.3)，无伴孢晶体。

——菌落形态学特征：在NA平板上培养24小时后，菌落呈圆形、表面粗糙、边缘不整齐，白色、不透明。

——有效成分主要存在形式：芽孢。

——主要生物活性：抑菌。

——培养保存条件：最适生长温度为30~37℃，适合培养基为营养琼脂(NA)或营养肉汤(NB)培养基，适宜储存温度为0~4℃。

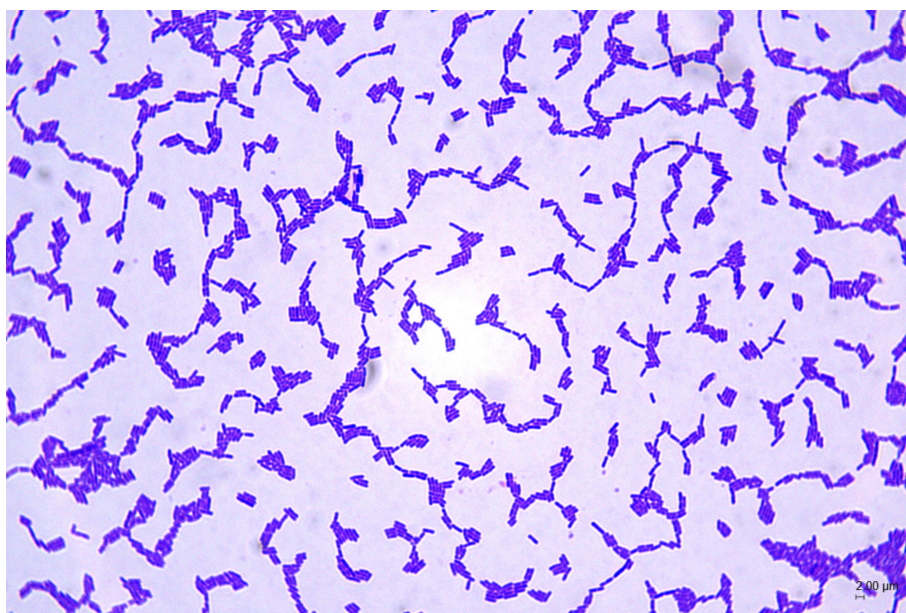


图 A.1 解淀粉芽孢杆菌革兰氏染色图(1000×油镜)

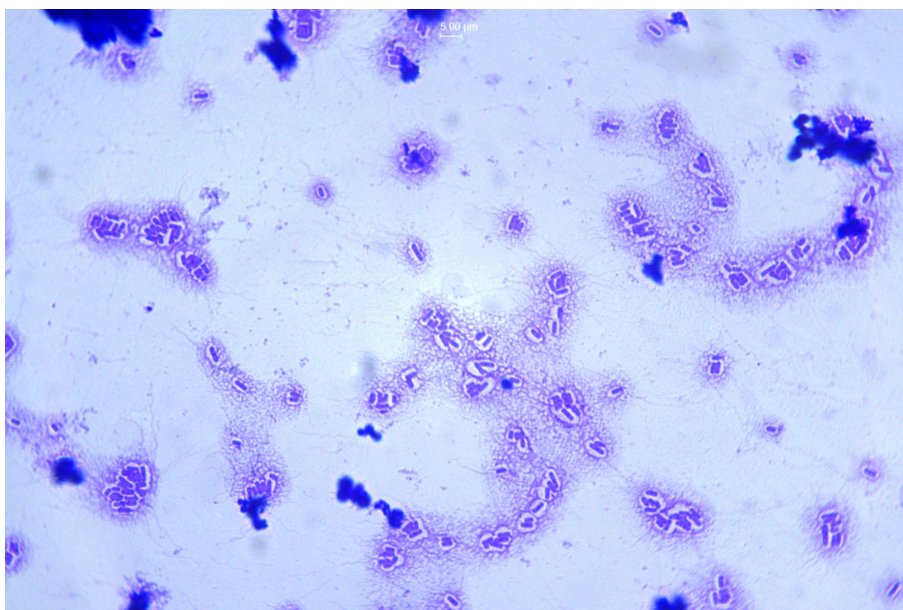
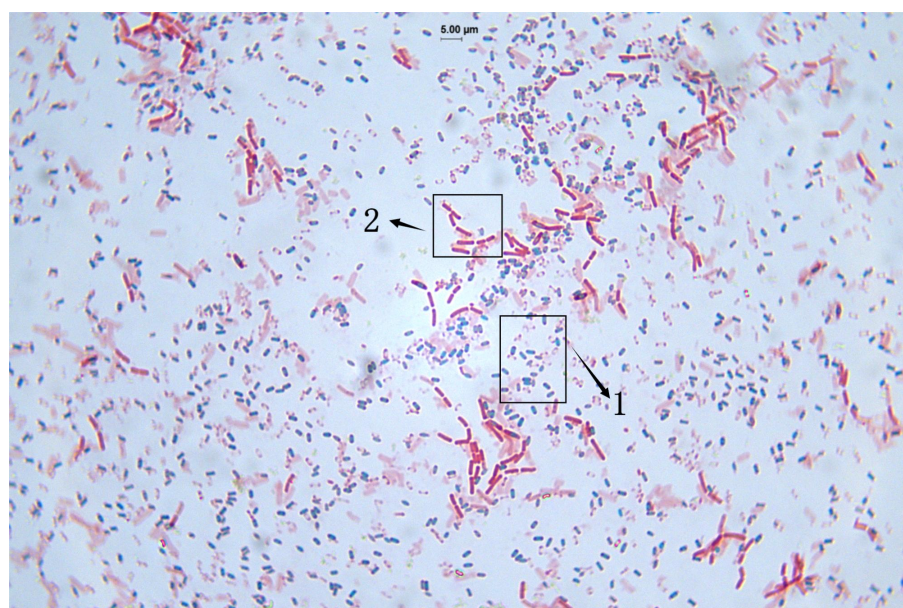


图 A. 2 解淀粉芽孢杆菌鞭毛染色（1000×油镜）



标引序号说明：

- 1——芽孢（孔雀蓝色）；
- 2——解淀粉芽孢杆菌菌体。

图 A. 3 解淀粉芽孢杆菌芽孢染色（30℃，7d；（1000×油镜）



图 A.4 解淀粉芽孢杆菌 NA 培养基菌落图（30℃，24h）

表 A.1 解淀粉芽孢杆菌及同属其近似种的生化特征

项目		阳性 结果	解淀粉 芽孢杆菌 <i>B.amyloliquefaciens</i>	枯草 芽孢杆菌 <i>B.subtilis</i>	贝莱斯 芽孢杆菌 <i>B.velezensis</i>	苏云金 芽孢杆菌 <i>B.thuringiensis</i>	蜡状 芽孢杆菌 <i>B.cereus</i>
过氧化氢酶		产生气泡	+	+	ND	+	+
厌氧生长		生长	-	-	-	+	-
产 酸	D-葡萄糖	变黄	+	+	ND	+	+
	D-木糖	变黄	+	+	+	-	-
	L-阿拉伯糖	变黄	+	+	+	-	-
	D-甘露醇	变黄	-	+	+	-	-
水 解	明胶液化	液化	+	+	+	+	+
	淀粉水解	不变蓝	+	+	+	+	+
柠檬酸盐利用		变蓝	+/-	+	+	+	+
硝酸盐还原		变红	+	+	+	+	+/-
V-P试验		变红	+	+	+	+	+

A.2 ANI鉴定法

A.2.1 解淀粉芽孢杆菌基因组DNA提取

采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取解淀粉芽孢杆菌基因组DNA。DNA的纯度应符合GB/T 37874的要求，DNA的浓度和总量应符合文库构建的相关要求。提取的基因组DNA于-20℃保存，备用。

A.2.2 基因组测序和序列质控

采用第二代测序技术,或第二代和第三代测序技术相结合,测定待鉴定菌株基因组序列,获得基因组框架图或完成图。原始序列经分析软件比对和组装,获得待鉴定菌株的基因组序列。

序列指控按NY/T 4686-2025中6.2.2进行。

A.2.3 ANI分析

按NY/T 4686-2025中6.2.2进行。经过ANI分析,与解淀粉芽孢杆菌模式菌株之间基因组序列的ANI值大于96%,鉴定为解淀粉芽孢杆菌。
