② 標準添加法

同量の試料溶液３個以上を量り、それぞれに被検元素が段階的に含まれるように標準液を添加し、さらに、溶媒を加えて一定容量とする。それぞれの溶液につき、吸光度を測定し、横軸に添加した標準被検元素量（濃度）、縦軸に吸光度をとり、グラフにそれぞれの値をプロットする。プロットから得られた回帰線を延長し、横軸との交点と原点との距離から被検元素量（濃度）を求める。ただし、この方法は、①による検量線が原点を通る直線の場合のみに適用できる。

③ 内標準法

内標準元素の一定量に対して、標準被検元素を段階的に加えた標準液を、数種類調製する。それぞれの液につき、各元素の分析線波長で、標準被検元素による吸光度及び内標準元素による吸光度を、同一条件で測定し、標準被検元素による吸光度と内標準元素による吸光度との比を求める。横軸に標準被検元素量（濃度）、縦軸に吸光度の比をとり、検量線を作成する。次に、標準液の場合と同量の内標準元素を加えた試料溶液を調製し、検量線を作成したときと同一条件で得た被検元素による吸光度と内標準元素による吸光度との比を求め、検量線から被検元素量（濃度）を求める。

注意：試験に用いる試薬・試液は、測定の妨げとならないものを用いる。

⑿ 抗菌活性試験法

抗菌活性試験法は、飼料添加物中の酵素の抗菌活性の有無を生物学的方法により測定する試験法である。この試験に使用する水、試薬、試液、計量器、容器及びディスクは、必要に応じて無菌のものを用いる。

試験用器具

ディスクは、直径10mmのものを、メンブランフィルターは、孔径0.45μmのものを使用し、ペトリ皿は、内径90mm、高さ20mmの硬質ガラス製又は合成樹脂製であって、底面が平滑で、これに適合する蓋を有するものを使用する。

培地の種類並びにその組成及びpH

別に規定する場合を除き、次の表に掲げる組成及びpHを有するものを使用する。

培地の組成及びpH

	培地番号		1	2	3
培地1,000mLの組成	ペプトン	(g)	10		
	肉エキス	(g)	5		
	食塩	(g)	2.5	5	5
	ブドウ糖	(g)		2.5	
	膵消化カゼイン	(g)		17	15
	パパイン消化大豆	(g)		3	5
	リン酸一水素カリウム	(g)		2.5	
	寒天	(g)	13-15		13-15
	蒸留水		適量	適量	適量
	滅菌後のpH		6.5±0.1	7.3±0.1	7.3±0.1

試験菌液の調製

① *Micrococcus luteus* ATCC 9341及び*Escherichia coli* ATCC 27166にあっては、１号培地に約１週間間隔で移植を繰り返し、35～37℃で純粋培養しながら継代保存した種菌を、使用に当たって２号培地に移植した後、35～37℃で22～24時間静置培養し、よく振り混ぜて試験菌液とする。

② *Bacillus subtilis* ATCC 6633にあっては、１号培地に約３か月間隔で移植を繰り返し、35～37℃で純粋培養しながら継代保存した種菌を、使用に当たって、ルー瓶中の同一培地に移し、35～37℃で１週間培養して芽胞を生じさせる。この菌苔(たい)をかき取って適量の水に均等に浮遊させ、毎分3,000回転で30分間遠心分離してその上澄液を捨てたものに、適量の水を加え、振とうした後、24時間間隔で、65℃で20分間２回加熱し、毎分1,000回転で５分間遠心分離してその上層液を採取し、芽胞数を計算し適当な濃度の芽胞浮遊液を調製する。この芽胞浮遊液を水で希釈して、1×10^{6}個/mLの芽胞浮遊液を調製し、試験菌液とする。

平板培地の調製

３種類の試験菌液1.5mLずつを量り、それぞれ一度溶かし、試験菌の活力を阻害しない温度に冷却した３号培地13.5mLに加え、完全に混和した後、滅菌ペトリ皿に注入し、水平に静置して培地を凝固させる。

操作法

試料１gに水９mLを加え、よく振り混ぜ、毎分3,000回転で５分間遠心分離し、その上澄液をメンブランフィルターを用いてろ過滅菌して試料溶液とする。ディスク６枚に試料溶液0.1mLずつを充分に吸着させ、３種類の平板培地上に各２枚ずつ対角になるように置く。さらに、ディスク６枚に水0.1mLを充分に吸着させ、２枚ずつを正方形の各頂点となるように置き、冷所で２時間放置する。次に、35～37℃で22～24時間培養し、ディスク周囲の発育阻止円の有無を観察する。

判定基準

直径12mm以上の明瞭な発育阻止円を認めたとき、抗菌活性を示すものとする。

⒀ 抗生物質の力価試験法

力価試験法は、飼料添加物中の抗生物質の力価を生物学的方法又は化学的方法により測定する試験法である。別に規定する場合を除き、次の方法で試験を行う。この試験に使用する水、試薬・試液及び計量器・用器は、必要に応じ無菌のものを用いる。

円筒（カップ）

外径7.9～8.1mm、内径5.9～6.1mm、高さ9.9～10.1mmのステンレス鋼製のものを用いる。なお、円筒は、試験に支障を来すものであってはならない。

培地の種類並びにその組成及びpH

別に規定する場合を除き、次の表に掲げる組成及びpHを有するものを使用する。ただし、培地の成分として単に「ペプトン」と記載してある場合は、獣肉製ペプトン又はカゼイン製ペプトンのいずれを用いても差し支えない。培地のpHの調整は、１mol/L水酸化ナトリウム試液又は１mol/L塩酸試液を用い、滅菌後のpHが、所定のものとなるようにする。滅菌は、高圧蒸気滅菌器を用いて121℃で20分間行う。ただし、*Bacillus subtilis* ATCC 6633の培地は、アンモニア試液、水酸化カリウム試液又は１mol/L塩酸試液を用いて調整する。なお、既製の乾燥培地は、それぞれ規定の組成により調製した培地と同一成分を有し、同等の試験菌の発育及び性能を示す場合には、これを使用することができる。