



# 中华人民共和国国家标准

GB 7300.50X—XXXX

## 饲料添加剂 第5部分：微生物 凝结芽孢杆菌

Feed additives—Part 5: Live Microorganisms—Bacillus coagulans

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本草案完成时间：)

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。

本部分为GB 7300《饲料添加剂》的第50X部分。GB 7300已经发布了以下部分：

- 第101部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 L-苏氨酸（GB 7300.101）；
- 第102部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 甘氨酸（GB 7300.102）；
- 第103部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 蛋氨酸羟基类似物（GB 7300.103）；
- 第104部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 L-缬氨酸（GB 7300.104）；
- 第201部分：维生素及类维生素 L-抗坏血酸-2-磷酸酯盐（GB 7300.201）；
- 第202部分：维生素及类维生素 维生素D<sub>3</sub> 油（GB 7300.202）；
- 第203部分：维生素及类维生素 甜菜碱（GB 7300.203）；
- 第204部分：维生素及类维生素 甜菜碱盐酸盐（GB 7300.204）；
- 第301部分：矿物元素及其络（螯）合物 碘化钾（GB 7300.301）；
- 第302部分：矿物元素及其络（螯）合物 亚硒酸钠（GB 7300.302）；
- 第303部分：矿物元素及其络（螯）合物 碘酸钾（GB 7300.302）；
- 第401部分：酶制剂 木聚糖酶（GB 7300.401）；
- 第402部分：酶制剂 植酸酶（GB 7300.402）；
- 第403部分：酶制剂 纤维素酶（GB 7300.403）；
- 第40x部分：酶制剂 甘露聚糖酶（GB 7300.40X）；
- 第40x部分：酶制剂  $\alpha$ -半乳糖苷酶（GB 7300.40X）；
- 第501部分：微生物 酿酒酵母（GB 7300.501）；
- 第502部分：微生物 植物乳杆菌（GB 7300.502）；
- 第503部分：微生物 屎肠球菌（GB 7300.503）；
- 第504部分：微生物 嗜酸乳杆菌（GB 7300.504）；
- 第601部分：非蛋白氮 尿素（GB 7300.601）；
- 第801部分：防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 碳酸氢钠（GB 7300.801）；
- 第901部分：着色剂  $\beta$ -胡萝卜素粉（GB 7300.901）；
- 第902部分：着色剂  $\beta,\beta$ -胡萝卜素-4,4-二酮（斑螯黄）（GB 7300.902）；
- 第1001部分：调味和诱食物质 谷氨酸钠（GB 7300.1001）；
- 第1002部分：调味和诱食物质 大蒜素（GB 7300.1002）。

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出并归口。

## 引 言

饲料添加剂是指在饲料加工、制作、使用过程中添加的少量或者微量物质，包括营养性饲料添加剂和一般饲料添加剂。为便于使用，按照产品类型，GB 7300《饲料添加剂》分为以下13个部分。

每部分再根据具体添加剂品种进行依次编号（两位数字），标准编号规则为“GB 7300”+“部分号”+“两位品种编号”+“年代号”。

- 第1部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物；
- 第2部分：维生素及类维生素；
- 第3部分：矿物元素及其络（螯）合物；
- 第4部分：酶制剂；
- 第5部分：微生物；
- 第6部分：非蛋白氮；
- 第7部分：抗氧化剂；
- 第8部分：防腐剂、防霉剂和酸度调节剂；
- 第9部分：着色剂；
- 第10部分：调味和诱食物质；
- 第11部分：粘结剂、抗结块剂、稳定剂和乳化剂；
- 第12部分：多糖和寡糖；
- 第13部分：其他。

本文件的产品凝结芽孢杆菌属于第5大类微生物，因凝结芽孢杆菌是第X个发布的产品标准，所以本文件以GB 7300.50X编号，作为GB 7300的第50X部分。

# 饲料添加剂 第5部分：微生物 凝结芽孢杆菌

## 1 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。

## 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 5917.1 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法
- GB/T 6435 饲料中水分的测定
- GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定
- GB 10648 饲料标签
- GB 13078 饲料卫生标准
- GB/T 13079 饲料中总砷的测定
- GB/T 13080 饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
- GB/T 13081 饲料中汞的测定
- GB/T 13082 饲料中镉的测定
- GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定
- GB/T 13092 饲料中霉菌总数的测定
- GB/T 14699 饲料 采样
- GB/T 18869 饲料中大肠菌群的测定
- GB/T 42959 饲料微生物检验 采样
- NY/T 2071 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和T-2毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

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。革兰氏染色阳性。

#### 4 技术要求

##### 4.1 菌种

应符合附录B中所述的形态特征和生理生化特征。必要时，进行分子生物学鉴定。

##### 4.2 载体

载体来源于《饲料原料目录》和（或）《饲料添加剂品种目录》所列品种，并符合GB 13078及相关标准的要求。

##### 4.3 外观与性状

色泽均匀一致，无结块，无霉变，有特殊发酵气味，无异臭味。

##### 4.4 质量指标

应符合表1的要求。

表1 质量指标

项 目	指 标
凝结芽孢杆菌活菌数/（CFU/g）	$\geq 1.0 \times 10^9$
水分/%	$\leq 10$
粒度（通过0.85 mm 孔径试验筛）/%	$\geq 90$

##### 4.5 卫生指标

应符合表2的要求。

表2 卫生指标

项 目	指 标
总砷（以As计）/（mg/kg）	$\leq 2$
铅（Pb）/（mg/kg）	$\leq 5$
汞（Hg）/（mg/kg）	$\leq 0.1$
镉（Cd）/（mg/kg）	$\leq 0.5$
黄曲霉毒素B <sub>1</sub> <sup>a</sup> /（μg/kg）	$\leq 10$
霉菌总数 /（CFU/g）	$\leq 4.0 \times 10^4$
大肠菌群 /（MPN/100 g）	$\leq 1.0 \times 10^4$
沙门氏菌（25 g中）	不得检出
<sup>a</sup> 此类指标仅适用于植物性载体生产的产品。	

#### 5 取样

以微生物检验为目的的取样按照GB/T 42959执行，以其它指标检验为目的的取样按照GB/T 14699执行。

## 6 试验方法

### 6.1 外观与性状

取适量试样置于洁净的白色背景中，在自然光线下，观察其色泽、状态，嗅其气味。

### 6.2 活菌数

按附录A规定执行。

### 6.3 菌种鉴别

按附录B规定执行。

### 6.4 水分

按GB/T 6435规定执行。

### 6.5 粒度

按GB/T 5917.1规定执行。

### 6.6 总砷

按GB/T 13079规定执行。

### 6.7 铅

按GB/T 13080规定执行。

### 6.8 汞

按GB/T 13081规定执行。

### 6.9 镉

按GB/T 13082规定执行。

### 6.10 黄曲霉毒素 B1

按NY/T 2071规定执行。

### 6.11 霉菌总数

按照GB/T 13092规定执行。

### 6.12 大肠菌群

按GB/T 18869规定执行。

### 6.13 沙门氏菌

按GB/T 13091规定执行。

## 7 检验规则

### 7.1 组批

以相同菌株、相同的原料、相同的生产工艺、连续生产或同一班次生产的同一规格的产品为一批，每批产品不得超过50 t。

### 7.2 出厂检验

出厂检验项目为外观与性状、水分、凝结芽孢杆菌活菌数。

### 7.3 型式检验

型式检验项目为4.3~4.5规定的所有项目。在正常生产情况下，每半年至少进行1次型式检验。有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

- a) 产品定型投产时；
- b) 生产工艺或主要原料来源有较大改变，可能影响产品质量时；
- c) 停产3个月以上，重新恢复生产时；
- d) 出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时；
- e) 行政管理部门提出检验要求时。

### 7.4 判定规则

7.4.1 所验项目全部合格，判定为该批次产品合格。

7.4.2 检验结果中有任何指标不符合本文件规定时，可自同批产品中重新加倍取样进行复检。若复检有一项结果不符合本文件规定，即判定该批产品不合格。卫生指标中的微生物指标不得复检。

7.4.3 除微生物指标外，各项指标的极限数值按 GB/T 8170 中全数值比较法进行判定。

## 8 标签、包装、运输、贮存和保质期

### 8.1 标签

按GB 10648规定执行。

### 8.2 包装

包装材料应无毒、无害、防潮、不透光。

### 8.3 运输

运输中防止包装破损、日晒、雨淋，禁止与有毒有害物质混运。

### 8.4 贮存

通风、干燥处存放，防晒、防雨淋，不应与有毒有害物质混贮。

#### 8.5 保质期

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。



**附录 A**  
**(规范性)**  
**凝结芽孢杆菌活菌数检测方法**

### A.1 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂，试验用水应符合GB/T 6682中三级水规定。

A.1.1 改良MRS培养基：酵母浸粉5.0 g、胰蛋白胨10.0 g、牛肉浸粉5.0 g、葡萄糖5.0 g、无水氯化钙0.15 g、氯化钠2.5 g、一水合硫酸锰0.1 g、L-半胱氨酸盐酸盐0.5 g、琼脂粉16.0~20.0 g、水1000 mL，pH调制5.0~5.5（25℃），115℃灭菌30 min。也可使用相同成分商品化培养基，按使用说明配制。

A.1.2 稀释液：称取8.5 g氯化钠，1.0 g吐温溶于1000 mL水中，121℃灭菌30 min后备用。

### A.2 仪器设备

除常用微生物实验室设备外，其他设备和材料如下。

A.2.1 天平：精度0.1 mg，1 mg。

A.2.2 生化培养箱：精度1℃。

A.2.3 恒温振荡器：精度1℃。

A.2.4 涡旋混合器。

A.2.5 高压灭菌锅。

A.2.6 水浴锅：精度0.2℃。

### A.3 试验步骤

#### A.3.1 试样制备

准确称量5.0 g试样，置于250 mL无菌三角瓶（带玻璃珠），加入95 mL稀释液（A.1.2），置于25℃恒温振荡器，不低于140 r/min振荡30 min，制成1:100菌悬液。准确移取1:100菌悬液1.0 mL，加入装有9.0 mL稀释液（A.1.2）的试管中，在涡旋混合器上混匀，制成1:1000稀释菌液，同法制成适宜稀释度的系列稀释菌液。

选择上述合适的1~3个梯度稀释液，置于80℃水浴锅中处理10 min，取出冷却至室温，作为稀释菌液备用。

#### A.3.2 接种和培养

准确移取上述稀释菌液0.1 mL，加至已凝固的改良MRS培养基平板中，用无菌涂布棒均匀涂于表面。每个稀释度做两个平行。同时，分别吸取0.1 mL稀释液（A.1.2）至两个改良MRS培养基平板中作空白对照。将平板倒置于恒温培养箱中，45℃±1℃培养48 h±2 h。

#### A.3.3 菌落计数

选取菌落数在 30 个~300 个之间的平板计数。典型凝结芽孢杆菌菌落呈白色，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。从同一稀释度的平板中选出 5 个具有上述典型菌落特征的凝结芽孢杆菌疑似菌落进行确证试验。

#### A.3.4 菌种确证试验

按附录 B 执行。

#### A.4 试验数据处理

根据菌落计数结果和证实为凝结芽孢杆菌的菌落数，计算出平板内的菌数，然后乘其稀释倍数即得每克样品中凝结芽孢杆菌活菌数A（CFU/g），按公式（A.1）计算。

$$A = \frac{B \times C \times f}{5} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

A——每克样品中凝结芽孢杆菌活菌数的数值，单位为菌落形成单位每克（CFU/g）；

B——凝结芽孢杆菌疑似菌落数的数值，单位为菌落形成单位（CFU）；

C——5个鉴定的菌落中确认为凝结芽孢杆菌菌落数的数值，单位为菌落形成单位（CFU）；

f——稀释倍数的数值，单位为每克（g<sup>-1</sup>）；

5——选出的凝结芽孢杆菌疑似菌落的数值，单位为菌落形成单位（CFU）。

**附 录 B**  
**(规范性)**  
**凝结芽孢杆菌菌种鉴别**

**B.1 试剂或材料**

- B.1.1 革兰氏染色液。
- B.1.2 生理生化鉴定试剂盒。
- B.1.3 对照菌株（凝结芽孢杆菌模式菌株ATCC 7050）。
- B.1.4 细菌基因组试剂盒。
- B.1.5 PCR试剂盒。
- B.1.6 琼脂糖。
- B.1.7 DNA marker。

**B.2 仪器设备**

- B.2.1 PCR仪。
- B.2.2 电泳仪。
- B.2.3 凝胶分析成像系统。
- B.2.4 超净工作台。
- B.2.5 离心机。
- B.2.6 微量可调移液器。

**B.3 试验步骤**

**B.3.1 菌种纯化**

自平板上挑取单菌落，划线转接培养于改良MRS平板上，45℃±1℃培养 24 h~48 h。从每一平板中选取至少 1 个良好分离的特征菌落，转接保存，进行确证试验。

**B.3.2 形态观察**

**B.3.2.1 菌落形态**

本文件规定的试验条件下，凝结芽孢杆菌菌落呈白色，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。

**B.3.2.2 菌体形态**

挑选纯化的凝结芽孢杆菌菌落作革兰氏染色，镜检，菌体应为椭圆或杆状。

### B.3.3 生理生化确证

挑选纯化的菌落进行生理生化鉴定，指标及特征应符合表B.1。

表 B.1 凝结芽孢杆菌生理生化特征

生化试验	结果	生化试验	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。

### B.3.4 分子生物学鉴定

#### B.3.4.1 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。

#### B.3.4.2 PCR 扩增

##### a) 引物

见表B.2 16S rRNA扩增引物序列。

表 B.2 16S rRNA 扩增引物序列

靶基因名称	扩增引物序列	测序引物序列
16S rRNA	27F: 5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	同扩增引物
	1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'	

##### b) PCR 反应体系

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, 55℃退火30 s, 72℃延伸2 min, 35个循环; 72℃终延伸10 min。

##### c) PCR 扩增产物电泳

用电泳缓冲液 (0.5×TBE) 制备1.0%琼脂糖凝胶, 5 μL PCR扩增产物点样, 核酸染料染色, DNA marker (2000 bp DNA ladder) 做参照, 120 V电泳30 min。

##### d) PCR 扩增产物测序

电泳结束后, 根据DNA Marker条带的指示, 对目的条带进行胶回收, 获得的产物进行测序。

#### B.3.4.3 测序结果比对

序列结果与Genebank数据库基因序列进行比较, 与凝结芽孢杆菌模式菌株ATCC 7050 (Gene ID:29814753) 的基因相似度在99%以上。

参 考 文 献

- [1] 饲料原料目录（中华人民共和国农业农村部公告）
  - [2] 饲料添加剂品种目录（中华人民共和国农业农村部公告）
-