



中华人民共和国国家标准

GB 7300.505—2025



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*

2025-06-30 发布

2026-07-01 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 505 部分。GB 7300 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 L-苏氨酸(GB 7300.101)；
- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 甘氨酸(GB 7300.102)；
- 第 1 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 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 L-缬氨酸(GB 7300.104)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 L-抗坏血酸-2-磷酸酯盐(GB 7300.201)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 维生素 D₃油(GB 7300.202)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 甜菜碱(GB 7300.203)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 甜菜碱盐酸盐(GB 7300.204)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 碘化钾(GB 7300.301)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 亚硒酸钠(GB 7300.302)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 碘酸钾(GB 7300.303)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 甘氨酸铁络合物(GB 7300.304)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 碱式氯化铜(GB 7300.305)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 烟酸铬(GB 7300.306)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 甘氨酸锌(GB 7300.307)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 苏氨酸锌螯合物(GB 7300.308)；
- 第 4 部分：酶制剂 木聚糖酶(GB 7300.401)；
- 第 4 部分：酶制剂 植酸酶(GB 7300.402)；
- 第 4 部分：酶制剂 纤维素酶(GB 7300.403)；
- 第 4 部分：酶制剂 β -甘露聚糖酶(GB 7300.404)；
- 第 4 部分：酶制剂 α -半乳糖苷酶(GB 7300.405)；
- 第 5 部分：微生物 酿酒酵母(GB 7300.501)；
- 第 5 部分：微生物 植物乳杆菌(GB 7300.502)；
- 第 5 部分：微生物 屎肠球菌(GB 7300.503)；
- 第 5 部分：微生物 嗜酸乳杆菌(GB 7300.504)；
- 第 5 部分：微生物 凝结芽孢杆菌(GB 7300.505)；
- 第 6 部分：非蛋白氮 尿素(GB 7300.601)；
- 第 8 部分：防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 碳酸氢钠(GB 7300.801)；
- 第 8 部分：防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 丙酸(GB 7300.802)；
- 第 8 部分：防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 氯化铵(GB 7300.803)；
- 第 8 部分：防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 苯甲酸(GB 7300.804)；
- 第 9 部分：着色剂 β -胡萝卜素粉(GB 7300.901)；
- 第 9 部分：着色剂 β , β -胡萝卜素-4,4-二酮(斑蝥黄)(GB 7300.902)；

- 第 10 部分:调味和诱食物质 谷氨酸钠(GB 7300.1001);
- 第 10 部分:调味和诱食物质 大蒜素(GB 7300.1002);
- 第 10 部分:调味和诱食物质 新甲基橙皮苷二氢查耳酮(GB 7300.1003);
- 第 13 部分:其他 胆汁酸(GB 7300.1301)。

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。

- 氨基酸、氨基酸盐及其类似物;
- 维生素及类维生素;
- 矿物元素及其络(螯)合物;
- 酶制剂;
- 微生物;
- 非蛋白氮;
- 抗氧化剂;
- 防腐剂、防霉剂和酸度调节剂;
- 着色剂;
- 调味和诱食物质;
- 粘结剂、抗结块剂、稳定剂和乳化剂;
- 多糖和寡糖;
- 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 5 个发布的产品标准,所以本文件以 GB 7300.505 编号,作为 GB 7300 的第 505 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原料和菌种、技术要求、采样、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、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/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—2019 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。

注：革兰氏染色阳性，单个细菌呈椭圆或杆状，无鞭毛，产芽孢，芽孢呈椭圆形或球形，位于孢子囊中，中生到次端生，具运动性。

4 原料和菌种

4.1 原料

来源于《饲料原料目录》和(或)《饲料添加剂品种目录》所列品种。

4.2 菌种

菌种为凝结芽孢杆菌。

5 技术要求

5.1 外观与性状

色泽均匀一致,无结块,无霉变,无异臭味。

注:产品若有特殊发酵气味,视为正常。

5.2 凝结芽孢杆菌鉴别

应符合附录 A 中所述的形态特征、生理生化特征及分子生物学结果。

5.3 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/%	≤ 10.0
粒度(通过 0.85 mm 孔径试验筛)/%	≥ 90.0

5.4 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)	≤ 2.00
铅(Pb)/(mg/kg)	≤ 5.00
汞(Hg)/(mg/kg)	≤ 0.10
镉(Cd)/(mg/kg)	≤ 0.500
黄曲霉毒素 B ₁ ^a /(μg/kg)	≤ 10.0
霉菌总数/(CFU/g)	$\leq 4 \times 10^4$
大肠菌群/(MPN/100 g)	$\leq 10\ 000$
沙门氏菌(25 g 中)	不得检出
^a 仅适用于添加植物性载体的产品。	

6 采样

以微生物检验为目的的采样按照 GB/T 42959 执行,以其他指标检验为目的的采样按照 GB/T 14699 执行。

7 试验方法

7.1 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。

7.2 凝结芽孢杆菌鉴别

按附录 A 规定执行。

7.3 凝结芽孢杆菌活菌数

按附录 B 规定执行。

7.4 水分

按 GB/T 6435 规定执行。

7.5 粒度

按 GB/T 5917.1 规定执行。

7.6 总砷

按 GB/T 13079 规定执行。

7.7 铅

按 GB/T 13080 规定执行。

7.8 汞

按 GB/T 13081 规定执行。

7.9 镉

按 GB/T 13082 规定执行。

7.10 黄曲霉毒素 B₁

按 NY/T 2071 规定执行。

7.11 霉菌总数

按照 GB/T 13092 规定执行。

7.12 大肠菌群

按 GB/T 18869—2019 中乳酸胆盐发酵法规定执行。

7.13 沙门氏菌

按 GB/T 13091 规定执行。

8 检验规则

8.1 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,每批产品不应超过 50 t。

8.2 出厂检验

出厂检验项目为外观与性状、水分、粒度、凝结芽孢杆菌活菌数。

8.3 型式检验

型式检验项目为第 5 章规定的所有项目。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,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。



8.4 判定规则

8.4.1 所验项目全部合格,判定为该批次产品合格。

8.4.2 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应复检。

8.4.3 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。

9 标签、包装、运输、贮存和保质期

9.1 标签

按 GB 10648 规定执行。

9.2 包装

包装材料应无毒、无害、防潮、不透光。

9.3 运输

运输中防止包装破损、日晒、雨淋,不应与有毒有害物质混运。

9.4 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。

9.5 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。

10 标准的实施

本文件实施之日前生产或进口的产品,可以销售至产品标示的有效期(保质期)限为止。

附 录 A
(规范性)
凝结芽孢杆菌鉴别

A.1 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

- A.1.1 琼脂糖。
- A.1.2 DNA 分子质量标准物。
- A.1.3 革兰氏染色液。
- A.1.4 生理生化鉴定试剂。
- A.1.5 细菌基因组提取试剂盒。
- A.1.6 聚合酶链式反应试剂盒(PCR 试剂盒)。

A.2 仪器设备

- A.2.1 PCR 仪。
- A.2.2 电泳仪。
- A.2.3 凝胶成像分析系统。
- A.2.4 显微镜:×100 倍油镜。
- A.2.5 离心机。
- A.2.6 生化培养箱:精度±1℃。

A.3 试验步骤

A.3.1 菌种纯化

改良 MRS 平板上挑取典型凝结芽孢杆菌单菌落(B.3.2),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,备用。

A.3.2 形态观察

A.3.2.1 菌落形态

观察特征菌落(A.3.1),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。

A.3.2.2 菌体形态

挑选特征菌落(A.3.1),作革兰氏染色,镜检菌体为紫色、椭圆或杆状。

A.3.3 生理生化确证

挑选特征菌落(A.3.1)进行生理生化实验,特征应符合表 A.1。若表 A.1 中有 1 项~2 项不符合,应进行分子生物学鉴定。

表 A.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：“+”表示≥90%菌株为阳性；“—”表示≥90%菌株为阴性。			

A.3.4 分子生物学鉴定

A.3.4.1 基因组 DNA 提取

用细菌基因组提取试剂盒提取凝结芽孢杆菌基因组 DNA。

A.3.4.2 PCR 扩增与测序

A.3.4.2.1 引物合成

按照表 A.2 16S rRNA 合成扩增引物。

表 A.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'-TACGGYTACCTGTTACGACTT-3'	

A.3.4.2.2 PCR 反应

PCR 扩增体系(25 μL)包括:无菌水 15 μL,10×缓冲液 2.5 μL,dNTPs(2.5 mmol/L) 3.5 μL,上下游引物(A.3.4.2.1)(10 μmol/L)各 1.0 μL,DNA 聚合酶 0.5 μL,DNA 模板 1.5 μL。以无菌水为模板作为阴性对照,以模式菌株的基因组 DNA 为模板作为阳性对照。

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。

A.3.4.2.3 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 分子质量标准物做参照,120 V 电泳 30 min。

阴性对照应无条带,阳性对照条带大小应为 1 500 bp 左右,当样品检测结果无条带或者条带大小不是 1 500 bp 左右,认为扩增失败,当样品检测结果中有清晰明亮的大小为 1500 bp 左右的条带时,认为是目标条带,可以用于测序。

A.3.4.2.4 PCR 扩增产物测序

电泳结束后,根据 DNA 分子质量标准物条带的指示,对目的条带进行胶回收,获得的产物进行

测序。

A.3.4.3 测序结果比对

将凝结芽孢杆菌的 16S rRNA 序列结果(A.3.4.2.4)与 DNA 序列数据库基因序列进行比较,与凝结芽孢杆菌模式菌株 ATCC 7050(基因 ID:29814753)的基因序列(表 A.3)相似度在 99%以上。

表 A.3 凝结芽孢杆菌 ATCC 7050 16S rRNA 参考基因序列

菌株	16S rRNA 基因序列
凝结芽孢杆菌 ATCC 7050	1 ttactgaga gtttgatcct ggctcaggac gaacgctggc ggcgtgccta atacatgcaa 61 gtcgtgcgga ccttttaaaa gcttgctttt aaaagggttag cggcggacgg gtgagtaaca 121 cgtgggcaac ctgctgtaa gactgggata acgcccggaa accggggcta ataccagata 181 gtttttctect ccgcatggag gagaaggaa aggcggett cgtgccact tacagatggg 241 cccgcggcgc attagctagt tggcggggta acagcccacc aaggcaacga tgcgtagccg 301 acctgagagg gtgatcgcc acattgggac tgagacacgg ccaaaactcc tacgggaggg 361 agcagtaggg aatcttcgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgcc cgtgagtga 421 gaaggccttc gggctgtaaa actctgttg cggggaagaa caagtgcgt tcgaacaggg 481 cggcgccttg acggtaccg gccagaaagc caccgctaac tacgtgccag cagcccggt 541 aatactagg tggcaacgt tgtccggaat tattgggcgt aaagcgcgcg caggcggctt 601 cttaagtctg atgtgaaatc ttgcggtca accgcaacg gtcattggaa actgggaggg 661 ttgagtgcag aagaggagag tggaattcca cgtgtagcgg tgaaatgcgt agagatgtg 721 aggaacacca gtggcgaagg cgctctctg gtctgtaact gacgctagg cgcgaaagc 781 tggggagcaa acagattag ataccctggt agtcacgcc gtaaacgatg agtctaagt 841 gttagagggt ttccgccctt tagtctgca gtaacgcat taagcactcc gcctggggag 901 tacggccgca aggtgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat 961 gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatct ctgacctccc 1021 tggagacagg gccttccct tcgggggaca gactgacagg tgggtcatgg ttgtcgtcag 1081 ctcgtgtcgt gagatgttg gtaagtccc gcaacgagcg caaccttga ccttagttgc 1141 cagcattgag ttgggcactc taagtgact gccggtgaca aaccggagga aggtggggat 1201 gacgtcaaat catcatgcc cttatgacct gggtacaca cgtgctaca tgatggtac 1261 aaagggtgc gagaccgca ggttaagcca atcccagaaa accattccca gttcggattg 1321 caggctgcaa ccgctgca tgaagccgga atcgctagta atcgcgatc agcatgccg 1381 ggtgaatacg ttccgggccc ttgtacacac cggcgctac accacgagag ttgtaaac 1441 ccgaagtgcg tgaggtaacc ttacggagc cagccgccga aggtgggaca gatgattggg 1501 gtgaagtctg aacaaggtag ccgtatcgga aggtgcggct ggatcacctc cttt

附录 B

(规范性)

凝结芽孢杆菌活菌数检测方法

B.1 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

B.1.1 水:GB/T 6682,三级。

B.1.2 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 1 000 mL, pH 调至 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。

B.1.3 稀释液:称取 8.5 g 氯化钠,1.0 g 吐温溶于 1 000 mL 水中,121℃灭菌 30 min 后备用。

B.2 仪器设备

B.2.1 天平:精度为 0.001 g 和 0.1 g。

B.2.2 生化培养箱:精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

B.2.3 恒温振荡器:精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

B.2.4 涡旋混合器。

B.2.5 高压灭菌锅。

B.2.6 水浴锅:精度 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

B.3 试验步骤

B.3.1 试样制备

称量 1 g 试样,精确至 0.001 g,置于 250 mL 无菌三角瓶(带玻璃珠),加入 99 mL 稀释液(B.1.3),于不超过 25℃恒温振荡器 200 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(B.1.3)的试管中,涡旋混匀,制成 1:1 000 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 个~3 个稀释度的稀释菌液,置于 80℃水浴锅中处理 10 min,取出冷却至室温,备用。



B.3.2 接种和培养

准确移取上述稀释菌液(B.3.1)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(B.1.3)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℃ $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h ± 2 h。

B.3.3 菌落计数

选取特征菌落在 30 CFU~300 CFU 之间的平皿,直接记录菌落总数。若菌落数均不在 30 CFU~300 CFU,调整稀释度后重新测定。

若特征菌落不能确定为凝结芽孢杆菌,按附录 A 进行鉴定。

B.4 试验数据处理

B.4.1 结果计算

B.4.1.1 若只有一个稀释级平皿上的菌落数在 30 CFU~300 CFU 内,计算两个平皿菌落数的平均值,再将平均值乘以相应稀释因子,作为每克样品中凝结芽孢杆菌活菌数结果。

B.4.1.2 若有两个连续稀释级的平皿菌落数在 30 CFU~300 CFU 内,按式(B.1)计算。

$$N = \frac{C_1 + C_2}{(n_1 + 0.1n_2) \times d} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

N ——试样中凝结芽孢杆菌活菌数,以 CFU/g 表示;

C_1 ——第一稀释级(低稀释倍数)平皿菌落数之和;

C_2 ——第二稀释级(高稀释倍数)平皿菌落数之和;

n_1 ——第一稀释级(低稀释倍数)平皿个数;

n_2 ——第二稀释级(高稀释倍数)平皿个数;

d ——稀释度(第一稀释级)。

B.4.1.3 若所有稀释级平皿均无菌落生长,则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

B.4.2 结果表示

采用两位有效数字,在两位有效数字后面的数值,以四舍五入方法修约,以 10 的指数表示。

根据菌落计数结果出具报告,报告单位以 CFU/g 表示。

参 考 文 献

- [1] 农业农村部.饲料原料目录
 - [2] 农业农村部.饲料添加剂品种目录
-