

T/CVDA

团体标准

T/CVDA XXXXX—XXXX

宠物用复合益生菌制剂活菌数检测与评价 技术标准

Technical standards for detection and evaluation of viable counts in pet
compound probiotic preparations

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中国兽药协会 发布

目 录

目 录..... 1

前 言..... 2

1 范围 3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义 3

 3.1 宠物 3

 3.2 宠物食品 3

 3.3 益生菌 4

 3.4 复合益生菌 4

 3.5 宠物食品用复合益生菌 4

 3.6 兼性厌氧菌 4

 3.7 活菌数 4

4 通用要求 4

 4.1 测试宠物食品要求 4

 4.2 测试条件要求 4

5 测试 5

 5.1 设备和材料 5

 5.2 培养基 5

 5.3 操作步骤 6

 5.4 菌落计数 6

6 结果计算 6

 6.1 菌落总数 6

 6.2 益生菌菌落总数 7

 6.3 活菌率 7

7 实验报告 错误!未定义书签。

参考文献 9

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

本文件由中国兽药协会提出并归口。

本文件起草单位：上海宠幸宠物用品有限公司、卫仕营养科学研究院（江苏）有限公司、江苏大学、中国农业大学动物科技学院、中国质量检验检测科学研究院、芜湖卫仕生物科技有限公司、东西志览国际文化发展无锡有限公司。

本文件主要起草人：马海乐、李云亮、郭丽娜、陈义强、陈航宇、段玉清、严子华、刘淑琴、宋亮亮。

1 范围

本标准规定了宠物食品用复合益生菌和复合益生菌活菌计数的相关术语和定义,并规范宠物用复合益生菌活菌数检测与评价技术标准,包括通用要求(菌株要求、测试条件要求)、分析测试指标和方法、数据处理与结果判定、实验报告。

本标准适用于各类工业化生产和加工的益生菌添加剂、复合益生菌制剂,包括粉末状、液体状和颗粒状等形态,以及含有添加益生菌成分的宠物食品。

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/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB19489 实验室生物安全通用要求

GB/T27476.1 检测实验室安全第1部分:总则

GB/T31190 实验室废弃化学品收集技术规范

GB/T 35507 生化用试剂测定通则

SN/T 3509 实验室样品管理指南

SN/T 3592 实验室化学药品和样品废弃物处理的标准指南

SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求

GB2760 食品安全国家标准食品添加剂使用标准

GB13432 预包装特殊膳食用食品标签通则

GB16740 保健(功能)食品通用标准

GB26687 食品安全国家标准复配食品添加剂通则

GB28050 食品安全国家标准预包装食品营养标签通则

GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差

GB/T 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定

GB/T 4789.32 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验

GB/T 4789.34 食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验

T/CAQI 362 宠物食品用益生菌通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 宠物 pet

家庭豢养并宠爱的动物,本标准主要指作为伴侣动物的犬和猫。

3.2 宠物食品 pet food

专为宠物设计和制造的食品,以满足它们的营养需求和维持健康生活。这类食品通常包括以犬、猫为主的各类宠物所需的营养成分,如蛋白质、碳水化合物、脂肪、维生素和矿物质等。

3.3 益生菌 probiotics

定植在宿主体内，增殖到一定数量对宿主有益的活体微生物。

3.4 复合益生菌 complex probiotics

由不同种类、不同菌株的益生菌组成的混合制剂，通常用于增强益生菌制品的功能协同作用或覆盖面。

3.5 宠物食品用复合益生菌 probiotics for pet food use

由两种或两种以上对宠物安全有效的益生菌菌株按一定比例混合制成、用于宠物食品中的益生菌制剂。

3.6 兼性厌氧菌 facultative anaerobic bacteria

在有氧或无氧环境中均能生长繁殖的微生物。

3.7 活菌数 viable count

单位质量或体积的制剂中所含的、具有繁殖能力的活微生物菌体数量，通常以菌落形成单位（CFU/g 或 CFU/mL）表示。

3.8 活菌率 viability rate

样品中活菌数量的对数值与菌体总数对数值的比值，用以表示样品中活菌的相对含量，常用于评价微生物制剂的活性保持程度。

4 通用要求

4.1 测试宠物食品要求

测试样品应为声称含有益生菌或复合益生菌制剂的宠物食品或添加剂。测试样品未受污染，同时避免阳光直射、高温和潮湿环境对样品的影响。测试样品应在保质期内产品且产品包装应完整，标示清晰，包括产品名称、菌种名称、活菌含量、生产日期等内容。

4.1.1 纳入标准

宠物食品明确标示添加益生菌，并注明具体菌种名称及其标称活菌数（以CFU计）。所添加菌种应属于国家允许用于宠物食品或饲料添加剂的微生物品种。产品应处于保质期内，且无胀袋、漏液、变质等外观异常现象。

4.1.2 排除标准

未声称添加益生菌的普通宠物食品，或标签信息不清楚的产品；不含明确活菌种类或添加量，或标注为“益生菌提取物”或“死菌”等非活性成分的产品；所添加菌株未列入可用于宠物食品或饲料添加剂的益生菌安全名单；经高温灭菌无法保证活菌存活的宠物产品；包装破损、受污染，或存在霉变、泄露、颜色异变等异常情况的产品；以及已过保质期或未标示生产日期的样品。

4.2 测试条件要求

4.2.1 测试环境要求

测试环境应在具备微生物检测资质的实验室内进行操作，具备完善的通风和空气净化系统。实验区域应划分为样品处理区、培养区和记录区，各区域应分开操作，防止交叉污染。操作区域应保持清洁，无杂菌干扰。操作台、手部、器具表面应使用75%酒精或其他合规消毒剂定期消毒。所用器具应经高压蒸汽灭菌或经确认的灭菌方式处理。

4.2.2 测试样品要求

测试样品应来源明确，标注清晰的生产批次、储存条件及有效期。样品应保持干燥状态，避免受潮、氧化或其他影响益生菌活性的因素。样品及标准品应在低温、避光条件下保存（如 4℃），并应在有效期内完成检测。根据产品剂型（如粉剂、颗粒、膏状、液体等），应采用标准化取样方法，确保代表性和检测结果的准确性。

4.2.3 测试人员要求

测试人员应为接受过微生物实验操作培训的专业人员，具备相关检测经验，熟悉活菌计数的标准操作流程、常用益生菌菌种特性以及常见干扰因素的识别与判断。检测过程中，人员应穿戴洁净的实验服、口罩、帽子和手套，规范操作，防止人为污染。实验过程中应详细记录关键步骤，包括样品编号、稀释倍数、接种量、培养时间与温度等。操作结束后，应按规定妥善处理废弃样品、培养基及微生物废弃物，严格遵守生物安全管理要求。

5 测试方法

5.1 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，恒温培养箱（36℃±1℃）；厌氧培养装置：厌氧培养箱、厌氧罐、厌氧袋或能提供同等厌氧效果的装置；涡旋混合仪；电子天平：感量为1mg；均质机；无菌离心管：1mL、10 mL；微量移液器和灭菌吸头；无菌培养皿；无菌锥形瓶：100mL、250 mL。

5.2 培养基

5.2.1 MRS 液体培养基

称取51.2 g MRS培养基粉末（其成分为：蛋白胨10.0 g/L，酵母浸粉4.0 g/L，葡萄糖20.0 g/L，山梨醇酐单油酸酯1 mL，磷酸氢二钾2.0 g/L，乙酸钠·3H₂O 5.0 g/L，柠檬酸钛铵2.0 g/L，硫酸镁·7H₂O 0.2 g/L，硫酸锰·4H₂O 0.05 g/L），加入1000 mL蒸馏水，加热至完全溶解。将溶液pH调节至6.2±0.2，并于121℃高压灭菌20 min。

5.2.2 MRS 固体培养基

称取51.2 g MRS培养基粉末，加入1.5%~2.0%（w/v）琼脂和1000 mL蒸馏水，加热至完全溶解。将溶液pH调节至6.2±0.2，并于121℃高压灭菌20 min。

5.2.3 麦芽汁液体培养基

称取130 g麦芽浸粉，加入1000 mL蒸馏水，加热至完全溶解，将溶液pH调节至6.2±0.2，并于121℃高压灭菌20 min。

5.2.4 麦芽汁固体培养基

称取130 g麦芽浸粉，加入1.5%~2.0 % (w/v) 琼脂和1000 mL蒸馏水，加热至完全溶解。将溶液pH调节至6.2±0.2，并于121 °C高压灭菌20 min。

5.2.5 液体复合培养基

将5.2.1中制备的MRS培养基与5.2.3中制备的麦芽汁培养基按体积比8:2混合，制得液体复合培养基。

5.2.6 固体复合培养基

将5.2.2中制备的MRS培养基与5.2.4中制备的麦芽汁培养基在灭菌冷却后按体积比8:2混合，趁热倒入无菌培养皿，冷却凝固后制得固体复合培养基。

5.3 操作步骤

5.3.1 样品前处理

粉末状制剂：称取1~25 g样品，加入盛有液体复合培养基的锥形瓶中，在振荡器上振荡15 min，使样品充分溶解或均匀分散，配制成样品与液体复合培养基质量体积比为1:100的初始菌悬液。

片剂制剂：将片剂粉碎均匀后，称取1~25 g样品，加入盛有液体复合培养基的锥形瓶中，在振荡器上振荡15 min，使样品充分溶解或均匀分散，配制成样品与液体复合培养基质量体积比为1:100的初始菌悬液。

胶囊制剂：打来胶囊，取出内容物，称取1~25 g样品，加入盛有液体复合培养基的锥形瓶中，在振荡器上振荡15 min，使样品充分溶解或均匀分散，配制成样品与液体复合培养基质量体积比为1:100的初始菌悬液。

液体制剂：吸取1~25 mL样品，加入盛有液体复合培养基的锥形瓶中，在振荡器上振荡15 min，使样品充分溶解或均匀分散，配制成样品与液体复合培养基质量体积比为1:100的初始菌悬液。

5.3.2 接种和培养

按照GB 4789.2样品稀释方法对初始菌悬液进行梯度稀释。根据对待测样品中益生菌含量的预估，选择3~4个连续适宜稀释度的稀释液，涂布于固体复合培养基平板。平板分别置于37°C好氧条件下培养48~72 h、37°C厌氧条件下培养48~72 h以及37°C兼性条件下培养48~72 h。当菌落生长至适宜大小时进行计数。

5.4 菌落计数

见GB4789.2菌落计数部分。

6 结果计算

6.1 菌落总数

6.1.1 当仅有一个稀释度的平板菌落数符合适宜计数范围时，应取该稀释度下两个平板的菌落数平均值，并乘以该稀释度的稀释倍数。所得结果即为每克（或每毫升）样品中菌落总数。

6.1.2 当有两个连续稀释度的平板菌落数均在适宜计数范围内时，按照式（1）计算菌落总数：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2) \times d}$$

式中：

N ——每克（或每毫升）样品中菌落总数（CFU/g或CFU/mL）；

$\sum C$ ——所选两个连续稀释度平板上的菌落总和；

n_1 ——第一个稀疏度（低稀释倍数）平板个数；

n_2 ——第二个稀疏度（高稀释倍数）平板个数；

d ——稀释因子（第一稀释度）。

6.1.3 当所有稀释度的平板菌落数均大于 300 CFU，应取稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

6.1.4 当所有稀释度的平板菌落数均小于 30 CFU，应取稀释度最低的平板进行计数，结果按平均菌落数乘以稀释倍数计算。

6.1.5 当所有稀释度（包括液体样品原液）平板均无菌落生长，结果以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

6.1.6 当所有稀释度的平板菌落数均不在 30 CFU~300 CFU 之间，其中一部分小于 30 CFU 或大于 300CFU 时，结果按最接近 30 CFU 或 300CFH 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

6.2 益生菌菌落总数

$$T = A + B - C$$

式中：

T ——每克（或每毫升）样品中活菌菌落总数（CFU/g或CFU/mL）；

A ——每克（或每毫升）样品中好氧菌菌落总数（CFU/g或CFU/mL）；

B ——每克（或每毫升）样品中厌氧菌菌落总数（CFU/g或CFU/mL）；

C ——每克（或每毫升）样品中兼性厌氧菌菌落总数（CFU/g或CFU/mL）。

6.3 活菌率

$$X = \frac{\log N_{\text{活}}}{\log N_{\text{总}}} \times 100\%$$

式中：

X ——样品中活菌率（%）

$N_{\text{活}}$ ——每克（或每毫升）样品中活菌菌落总数（CFU/g或CFU/mL）；

$N_{\text{总}}$ ——每克（或每毫升）样品中益生菌添加量（CFU/g或CFU/mL）。

7 结果判定

- ① 当在复合培养基中培养后，若受试样品中益生菌的菌落总数达到或超过 10^9 CFU/g，或存活率高于90%，则判定该测试样品为高活力益生菌产品；
- ② 当在复合培养基中培养后，若受试样品中益生菌的菌落总数在 $10^8 \sim 10^9$ CFU/g之间，或存活率在80%~90%之间，则判定该测试样品为中等活力益生菌产品；
- ③ 当在复合培养基中培养后，若受试样品中益生菌的菌落总数低于 10^8 CFU/g，或存活率低于80%，则判定该测试样品为低活力益生菌产品。

8 实验报告

实验报告应提供试验获得的所有内容、数据及可视化信息。未纳入统计分析的数据或由于数据缺乏、丢失等无法评价的情况也应报告，并说明在各组别中的平均值及误差。所有试验样品必须留样保存，宠物饲料（食品）留样量 $\geq 500\text{g}$ ，液体样品留样量 $\geq 500\text{mL}$ 。

实验报告正文至少应包括：

- a. 实验名称；
- b. 实验目的；
- c. 实验材料，至少包括实验用品、受试样品及处理方法、受试动物（包括宠物）要求；
- d. 实验方法，测试指标和方法；
- e. 结果与分析，根据数据统计结果给出平均值和标准方差、误差值及决定系数，并以可视化的数据或图和表形式体现。
- f. 结论，针对受试样品的实验结果给出判定。

此外，试验过程中涉及的所有原始数据和相关可视化图表均要存档。

参考文献

- GB/T6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB19489 实验室生物安全通用要求
- GB/T27476.1 检测实验室安全 第1部分:总则
- GB/T31190 实验室废弃化学品收集技术规范
- GB/T 35507 生化用试剂测定通则
- GB2760 食品安全国家标准食品添加剂使用标准
- GB13432 预包装特殊膳食用食品标签通则
- GB16740 保健(功能)食品通用标准
- GB26687 食品安全国家标准复配食品添加剂通则
- GB28050 食品安全国家标准预包装食品营养标签通则
- GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差
- GB/T 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定
- GB/T 4789.32 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验
- GB/T 4789.34 食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验
- T/CAQI 362 宠物食品用益生菌通则
- 张赛赛. 益生菌研究进展及其在宠物食品加工中的应用现状[J].饲料工业, 2023, 44(18):93-98.
- 杨宇翔,王朋朋,李斌,等.益生菌在犬肠道疾病作用及机制的研究进展[J].畜牧兽医学报, 2025.
- Klinmalai P, Kamonpatana P, Sodsai J, et al. Probiotics in Pet Food: A Decade of Research, Patents, and Market Trends[J]. Foods, 2025, 14(19): 3307.
- 王诚,孔德玲,董桂红,等.益生菌对宠物益生效果的初步研究[J].甘肃畜牧兽医, 2024, 54(2):56-59.
-