



中华人民共和国国家标准

GB 20××—××××

饲料添加剂 第5部分：微生物 屎肠球菌

Feed additive —Part 5: Live microorganisms — *Enterococcus faecium*

(征求意见稿)

20××-××-××发布

20××-××-××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

GB 7300《饲料添加剂》按产品分为若干部分：

本文件为 GB 7300 的第 502 部分。

本文件按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出并归口。

本文件起草单位：国家粮食局科学研究院。

本文件主要起草人：张晓琳、韩伟、李爱科、魏永刚、李晓敏、赵晨、黄颖、郝淑红。

饲料添加剂 第5部分：微生物

屎肠球菌

1 范围

GB 7300 的本部分规定了饲料添加剂屎肠球菌产品的要求、试验方法、检验规则、标签、运输、储存、保质期的要求。

本文件适用于含屎肠球菌的饲料添加剂。

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 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 4789.3	食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群测定
GB/T 4789.5	食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验
GB/T 4789.10	食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验
GB/T 4789.15	食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数
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/T 10647	饲料工业术语
GB/T 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	饲料中镉的测定方法
GB/T 13091	饲料中沙门氏菌的测定

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 17480 饲料中黄曲霉毒素 B1 的测定 酶联免疫吸附法

3 术语和定义

屎肠球菌 *Enterococcus faecium*

属于肠球菌属，革兰氏阳性，菌体卵圆形，多数成对或成短链，无芽孢，不运动。在饲料工业中被制成微生物饲料添加剂使用。

4 要求

4.1 微生物学指标

4.1.1 菌体形态

菌体细胞呈卵圆形，直径 $0.6\sim 2.0\mu\text{m}\times 0.6\sim 2.5\mu\text{m}$ ，多数成对或成短链。无芽孢，无明显荚膜，通常不运动。

4.1.2 菌落形态

在肠球菌选择性培养基（胆汁七叶苷叠氮钠琼脂）上菌落生长形态特征为：带有棕紫色环的黑色或棕黑色菌落，边缘整齐、表面光滑、圆形。

4.1.3 生理生化特征

屎肠球菌生理生化特征见表 1。

表 1 屎肠球菌生理生化特征

特征	结果	特征	结果
革兰氏染色	+	碳水化合物反应	
6.5%NaCl	+	麦芽糖	+
pH 9.6	+	七叶苷	+
0.04%硝酸盐	-	丙酮酸	-
0.02%叠氮化钠	+	L-阿拉伯糖	+

注：+为阳性反应；-为阴性反应。

4.2 感官指标

产品性状应符合包装上标明的产品固有的形状、色泽、气味、均匀程度、杂质等，无异臭味。

4.3 水分

不高于 8.0%。

4.4 活菌数

屎肠球菌活菌数 $\geq 1.0 \times 10^9$ CFU/g。

注：活菌数以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。

4.5 卫生标准

屎肠球菌饲料添加剂符合表 2 的要求。

表 2 屎肠球菌饲料添加剂卫生指标

项目	指标
杂菌率的允许量，%	≤ 0.1
黄曲霉素 B1， $\mu\text{g}/\text{kg}$	≤ 10.0
砷的允许量， mg/kg	≤ 2.0
铅的允许量， mg/kg	≤ 5.0
汞的允许量， mg/kg	≤ 0.1
镉的允许量， mg/kg	≤ 0.5
大肠菌群的允许量，CFU/100 g	≤ 400
霉菌总数的允许量，个/kg	$< 1.0 \times 10^4$
酵母总数的允许量，个/kg	$< 1.0 \times 10^4$
致病菌（志贺氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌）	不得检出

5 试验方法

5.1 抽样

按 GB/T14699.1 进行样品的采集。采样时必须特别注意样品的代表性和避免采样时的污染。首先准备好灭菌容器和采样工具，如灭菌牛皮纸袋、均质袋或广口瓶，金属勺和刀，在卫生学调查基础上，采取有代表性的样品，样品采集后应立即进行检验。

5.2 感官检验

取一定量（250g）的样品于无色玻璃杯中，自然光线下采用目测、鼻嗅的方法进行检验。

5.3 水分测定

按 GB/T6435 检测。

5.4 屎肠球菌检测

5.4.1 检验程序

屎肠球菌检验程序流程图如图 1。

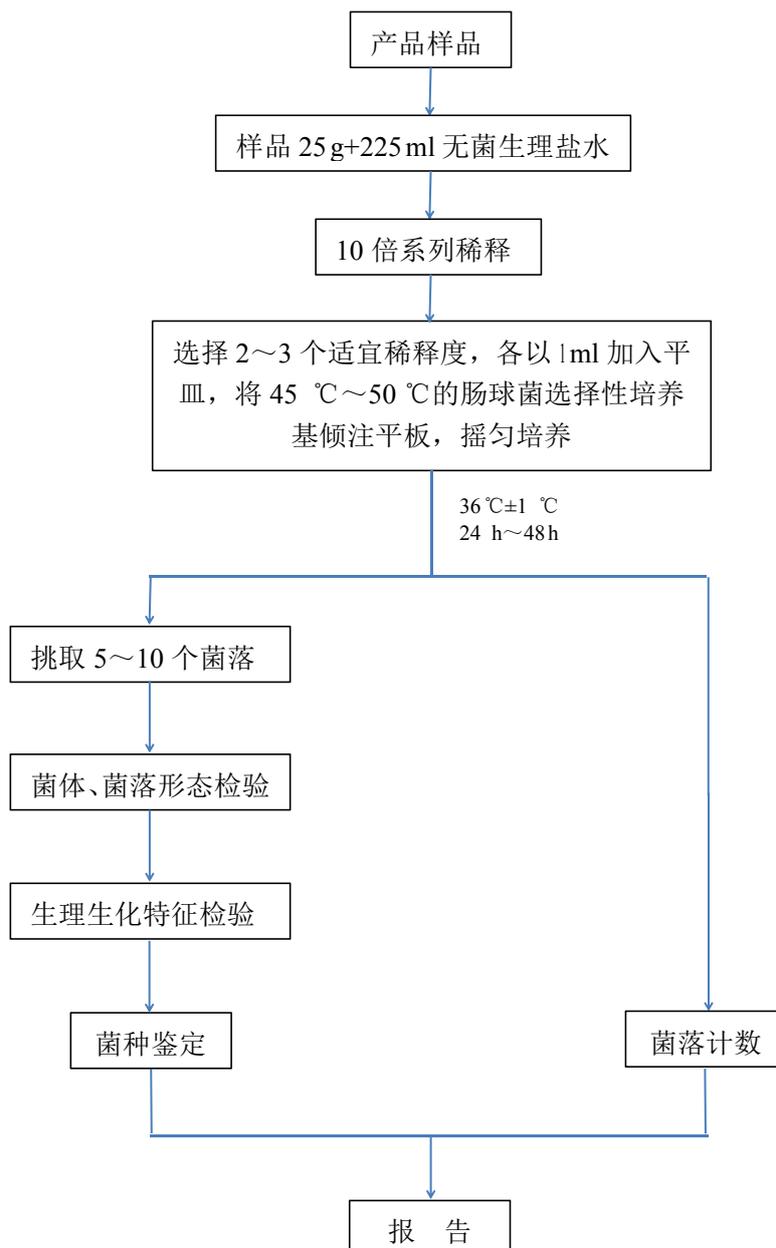


图 1 尿肠球菌检验程序流程图

5.4.2 菌种鉴定

5.4.2.1 样品制备

在按照 GB/T14699.1 进行采样基础上，称取 $25.0\text{g}\pm 0.01\text{g}$ 或 $25.0\text{ml}\pm 0.01\text{ml}$ 样品，加入 225ml 无菌生理盐水中均质，待均匀后，再将样品用无菌生理盐水按十倍稀释法制成不同浓度稀释液。取 1.0ml 合适浓度稀释液，注入无菌平板，每个稀释度做 3 次重复。将融化并冷却至 $45\sim 50\text{℃}$ 的肠球菌选择性培养基，向每个培养皿中倒入约 $15\sim 20\text{ml}$ ，摇匀并凝固，制成肠球菌琼脂平板。 37℃ 倒置培养 $24\sim 48\text{h}$ 。需要时对样品进行延长均质时间、研磨、超声波等预处理。如果肠溶性固态样品具有非水溶性，应根据实际情况，用合适的肠溶性缓冲液对样品进行溶解并均质。

5.4.2.2 菌体形态检验：挑取菌体，涂片染色，用光学显微镜观察菌体形态。

5.4.2.3 菌落形态检验：观察菌落颜色、形态。

5.4.2.4 菌落选择：用接种针或接种环随机挑取 5～10 个菌落。

5.4.2.5 生理生化特征检验：接种并进行 4.1.3 表 1 中各项试验。

5.4.3 菌落计数

5.4.3.1 按 5.4.2.1 中所述方法进行倾注平板培养，计数。

5.4.3.2 选取适宜的稀释度，菌落在 $30\sim 300$ 之间的平板进行计数。

5.4.3.3 计算方法见公式（1）。

$$N=\sum C/[V(n_1+0.1n_2)d] \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$\sum C$ ——两个连续稀释度全部平板上菌落数总和

V ——每个平板上接种的体积，ml

n_1 ——第 1 个稀释度的平板数

n_2 ——第 2 个稀释度的平板数

d ——相对第 1 稀释度的稀释因数

结果为每克或每毫升产品微生物菌落数，以科学计数法表示结果。

具体结果输出实例可参考 GB/T 4789.2。

5.4.3.4 允许差

两次平行测定结果的相对偏差不大于 2%。

5.5 卫生检验

5.5.1 杂菌率的允许量

5.5.1.1 杂菌识别：将肠球菌选择性培养基替换为营养琼脂培养基，按 5.4.2.1 中所述方法进行取样、样品稀释、倾注平板与培养，计数。并观察菌落颜色、形态，必要时显微镜镜检。

5.5.1.2 杂菌率检测：杂菌率=杂菌数/（屎肠球菌活菌数+杂菌数）×100%……………（2）

5.5.2 黄曲霉素 B1 检验

按照 GB/T 17480 执行。

5.5.3 砷含量测定

按照 GB/T 13079 执行。

5.5.4 汞含量测定

按照 GB/T13081 执行。

5.5.5 镉含量测定

按照 GB/T 13082 执行。

5.5.6 霉菌和酵母检测

按照 GB/T 4789.15 执行。

5.5.7 大肠菌群检测

按照 GB/T 4789.3 执行。

5.5.8 致病菌检测

按照 GB/T 4789.5、GB/T 4789.10、GB/T 13091 执行。

6 检验规则

6.1 出厂检验（交收检验）

感官指标、水分、粒度、活菌数、杂菌率指标为出厂检验项目，由生产厂或公司的质检部门进行检验，检验合格并签发质量合格证的产品方可出厂。

6.2 型式检验（例行检验）

6.2.1 一般情况下，企业一年进行一次型式检验，下列检验项应包括：

- a) 菌种遗传特征检验：与《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》（《伯杰氏系统细菌学手册》）所列模式菌株 ATCC19434 的 16S rRNA (16S 核糖体核糖核酸)基因全序列进行比对，相似度在 99%以上。
- b) 国家质量监督机构要求的其它型式检验。

6.2.2 但有下列情况之一时，企业半年进行一次型式检验，下列检验项应包括：

- a) 更改主要原辅材料和关键生产工序；
- b) 新试制的产品或正常生产的产品停产 3 个月以上（或半年），重新恢复生产时；
- c) 国家质量监督机构提出要求进行型式检验。

7. 判定规则

7.1 所验项目全部合格，判定为该批次产品合格。

7.2 检验结果中有任何指标不符合本部分规定时，可自同批产品中重新加倍取样进行复检。复检结果即使有一项指标不符合本部分规定，则判定该批产品不合格。

7.3 各项目指标的极限数值判定按 GB/T 8170 中全数值比较法执行。

8. 标签、包装、运输、储存、保质期

8.1 标签

8.1.1 采用鲜明的标签贴于外包装显著位置；

8.1.2 标签内容应符合 GB 10648 的要求；

8.1.3 标签应标明所添加微生物的学名和数量。

8.2 包装

应采用符合国家相关标准的、无毒的包装材料。

8.3 运输

运输中应避免日晒，搬运装卸时小心轻放，不得与有毒物质混装混运。

8.4 储存

应保存于干燥、阴凉、通风的仓库中，避免直接日晒和高温地表放置，防止长时间 30℃以上高温，不得和有毒、有害物质一起堆放，严防污染。建议使用 10℃以下的冷藏条件。

8.5 保质期

产品保质期为 6 个月以上。

附录 A

(资料性附录)

专用培养基及试剂

A.1 肠球菌选择性培养基 (胆汁七叶苷叠氮钠琼脂)

A.1.1 成分

胰蛋白胨	17.0g
牛肉浸粉	3.0g
酵母浸粉	5.0g
牛胆粉	10.0g
氯化钠	5.0g
柠檬酸钠	1.0g
七叶苷	1.0g
柠檬酸铁铵	0.5g
叠氮化钠	0.25g
琼脂	18.0g
蒸馏水	加至 1000ml
pH7.1±0.1	

A.1.2 制法

将所有成分加入蒸馏水中，加热溶解，校正 pH7.1±0.1。分装。高压灭菌 121℃ 15 min。临用时加热融化琼脂，冷至 45~50℃时使用。

A.2 生理盐水

A.2.1 成分

氯化钠	8.5g
蒸馏水	加至 1000ml

A.2.2 制法

将氯化钠加入蒸馏水中，搅拌溶解，分装，高压灭菌 121℃ 15 min。

A.3 营养琼脂培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15~20 g
蒸馏水	加至 1000 ml

A.3.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内，加入 15% 氢氧化钠溶液约 2 ml 校正 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装烧瓶，121℃ 高压灭菌 15 min。

A.4 革兰氏染色液

A.4.1 结晶紫染色液

A.4.1.1 成分

结晶紫	8.5 g
95%乙醇	20 ml
1%草酸铵水溶液	80 ml

A.4.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.4.2 革兰氏碘液

A.4.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 ml

A.4.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合，加入蒸馏水少许充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 ml。

A.4.3 沙黄复染液

A.4.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 ml

蒸馏水	90ml
-----	------

A.4.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.4.4 染色法

A.4.4.1 将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

A.4.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A.4.4.3 滴加 95%乙醇脱色，约 15s~30s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。

A.4.4.4 滴加复染液，复染 1 min。水洗、待干、镜检。

A.5 糖发酵管

A.5.1 基础成分

牛肉膏	5.0g
蛋白胨	5.0g
酵母浸膏	5.0g
吐温 80	0.5 ml
琼脂	1.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 ml
蒸馏水	1000ml

A.5.2 制法

按 0.5%加入所需糖类，并分装小试管，121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

附录 B

(资料性附录)

模式菌株 ATCC 19434 的 16 S rRNA 基因序列

```

1  ttgagagtaa acctctcaaa actgaacaaa gtaaaaacaa attgtgtagt ctccgtaata
61  ttccttagaa aggaggtgat ccagccgcac cttccgatac ggctaccttg ttacgacttc
121 accccaatca tctatcccac cttaggcggc tggctccaaa aaggttacct caccgacttc
181 ggggtgttaca aactctcgtg gtgtgacggg cgggtgtgtac aaggcccggg aacgtattca
241 ccgcggcgtg ctgatccgcg attactagcg attccggctt catgcaggcg agttgcagcc
301 tgcaatccga actgagagaa gctttaagag attagcttag cctcgcgact tcgcaactcg
361 ttgtacttcc cattgtagca cgtgtgtagc ccaggtcata aggggcatga tgatttgacg
421 tcatccccac cttcctccgg tttgtcaccg gcagtcttgc tagagtgcc aactgaatga
481 tggcaactaa caataagggt tgcgctcggt gcgggactta acccaacatc tcacgacacg
541 agctgacgac aaccatgcac cacctgtcac tttgcccccg aaggggaagc tctatcteta
601 gagtgggtcaa aggatgtcaa gacctggtaa ggttcttcgc gttgcttcga attaaaccac
661 atgctccacc gcttgtgctg gccccgtca attcctttga gtttcaacct tgcggtcgta
721 ctccccaggc ggagtgttta atgctgttagc tgcagcactg aagggcgga accctccaac
781 acttagcact catcgtttac ggcgtggact accaggggat ctaatcctgt ttgctcccca
841 cgctttcgag cctcagcgtc agttacagac cagagagccg ccttcgccac tgggtgttct
901 ccatatatct acgcatttca ccgctacaca tggaaattca ctctcctctt ctgcactcaa
961 gtctcccagt ttccaatgac cctccccggt tgagccgggg gctttcacat cagacttaag
1021 aaaccgctg cgctcgcttt acgccaata aatccggaca acgcttgcca cctacgtatt
1081 accgcggtg ctggcacgta gttagccgtg gctttctggt tagataccgt caagggatga
1141 acagttactc tcatccttgt tcttcteta caacagagtt ttacgatccg aaaaccttct
1201 tactcaccgc ggcgttctc ggtcagactt tcgtccattg ccgaagattc cctactgctg
1261 cctcccgtag gagtttgggc cgtgtctcag tccaatgtg gccgatcacc ctctcaggtc
1321 ggctatgcat cgtggccttg gtgagccgtt acctaccaa ctagctaatg caccgogggt
1381 ccatccatca gcgacacccg aaagcgcctt tcaaatcaaa accatgcggt ttcgattggt
1441 atacggtatt agcacctgtt tccaagtgtt atccccttct gatgggcagg ttaccacgct
1501 gttactcacc cgttcgccac tcctcttttt ccggtggagc aagctccggt ggaaaaagaa
1561 gcgtacgact tgcattgatt aggcacgccg ccagcgttcg tcctgagcca ggatcaaaact
1621 ctcataaaaa gttcgaacaa tcttgcgatt gttaagctca atttgtttgc tagcatatt

```