

《饲料添加剂 屎肠球菌》（征求意见稿）标准编制说明

1. 任务来源

2014 年全国饲料工业标准化技术委员会下达了制订国家标准《饲料添加剂 屎肠球菌》的任务（项目编号：20140211-Q-469），由国家粮食局科学研究院提出，全国饲料工业标准化技术委员会归口，国家粮食局科学研究院作为承担单位主持该标准的制订工作。

本标准是按照 GB/T1.1-2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构与编写规则》的要求进行编写的。

2. 标准的主要单位和起草人

本标准的起草单位为国家粮食局科学研究院、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。本标准的主要起草人为张晓琳、韩伟、李爱科、魏永刚、李晓敏、赵晨、黄颖、郝淑红。

3. 标准制订的必要性和意义

随着人们生活质量的提高以及全球经济一体化，动物性食品安全已成为一个世界性的挑战和全球重要的公共卫生问题。其中，抗生素残留问题是影响动物性食品安全的重要因素之一。基于对抗生素危害性的认识，“安全、绿色、环保”的新型饲用抗生素替代产品已成为饲料行业的重点发展方向。微生物饲料添加剂由于不仅具有与抗生素饲料添加剂相似的有益作用，而且还具有无毒、无副作用、无残留、无抗药性，同时也不污染环境等优点，已逐步发展成为最具有应用前景的抗生素替代产品。

屎肠球菌，是人体内原著菌群、同样是饲料工业中广泛使用的乳酸菌菌种之一；其自身的优良性能在饲料添加剂中得以体现：大量的动物实验表明，饲料中加入屎肠球菌，具有促进动物生长、调整肠道菌群结构、抑制有害病原菌生长、减少疾病发生、降低仔猪腹泻率、改善毛色光泽、减少粪臭等优良特性。与此同时，屎肠球菌类产品也存在着其它乳酸菌类似的问题，如菌株的纯化与传代、存储过程中抗逆性差、货架期短、检测方法不统一，导致产品稳定性和益生特性差异大。屎肠球菌还被认为典型的条件致病菌，安全评价也是标准需要考虑的。

目前,在中华人民共和国农业部公告 2045 号《饲料添加剂品种目录(2013)》中,允许添加的微生物共有 34 种,包括:地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、两歧双歧杆菌、粪肠球菌、**屎肠球菌**、乳酸肠球菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、德式乳杆菌乳酸亚种(原名:乳酸乳杆菌)、植物乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌、产朊假丝酵母、酿酒酵母、沼泽红假单胞菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、短双歧杆菌、青春双歧杆菌、嗜热链球菌、罗伊氏乳杆菌、动物双歧杆菌、黑曲霉、米曲霉、迟缓芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、纤维二糖乳杆菌、发酵乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种(原名:保加利亚乳杆菌)、产丙酸丙酸杆菌、布氏乳杆菌、副干酪乳杆菌、凝结芽孢杆菌、侧孢短芽孢杆菌(原名:侧孢芽孢杆菌)。然而,涉及 2045 号公告中提及的微生物相关产品,尤其是单一微生物产品(包括屎肠球菌),大多数尚未制订国家标准。

近几年,我国微生物饲料添加剂发展非常迅速,目前已形成年总产值超过 30-50 亿元的新兴产业。但由于我国的微生物饲料添加剂市场起步较晚,还没有对其形成一个完善的管理机制,尤其是尚没有针对每类具体产品的质量标准。当前国内市场也存不规范之处,例如,①从我们在标准研制的 5 年中采样结果来看,作为主要品质检测指标的有效活菌数,超过 50%的样品与产品标识不符;②符合产品中经常标注“肠球菌”,并没有明确具体种或学名。因此,相关国家标准的制订和实施,将促进微生物饲料添加剂产业的可持续健康发展,加强微生物类产品有效管理,提高动物食品安全水平具有重要意义。

4. 确定国家标准主要内容的论据和编制过程

根据全国饲料工业标准化技术委员会的文件要求及制标任务通知,国家粮食局科学研究院随即下达了关于启动制订国家标准项目的任务,组织科研攻关团队,并立项实施。

本标准立足于本行业发展现状,同时关注行业发展趋势。首先在对我国历年微生物类国标、行标、地方标准及企标汇总分析的基础上,又参考了 ISO、欧盟、台湾等的有关产品和检测标准,以使制订的标准能与最先进标准接轨。另外,本项标准制订单位分别对山东、上海、河南等代表性厂家生产的屎肠球菌代表性产品进行采样,并对主要指标进行检测及分析,同时我们也统计了相关质量分析数

据，从有关文献及部分饲料厂汇集了一批近年的尿肠球菌产品卫生指标及动物应用效果分析结果，以使我们制订的标准具有实用性。在此基础上形成了《饲料添加剂 尿肠球菌》国家标准征求意见稿。

在编制过程中，我们遵循以下原则：

（1）一致性原则

本标准在编制过程中采用或参考与《微生物饲料添加剂技术通则》（NY/T 1444-2007）、《Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods》（ISO 16140）、《食品微生物指标制定和应用的原则》（GB/T 23784-2009）、《食品微生物学检验 乳酸菌检验》（GB 4789.35-2010）等标准中就有关术语和定义、技术要求、试验方法和检验原则等相一致的原则和方法，并参考了大量国标、国外标准、行标及企标中的规定；以保证本标准既吸收国内外先进经验，又便于采标单位将标准中的要求纳入已建立的质量管理体系中来。同时，在充分研究和分析基础上，综合考虑我国企业、市场、消费者及监管机构的实际情况，科学、合理地编制本标准的内容。

（2）科学实用原则

科学性体现在，系统地分析代表性产品的有效技术指标，结合生产应用实际，凝练问题及产生原因、表现形式、预防措施等，明确产品在试验方法、检验规则、判定规则、包装、运输、储存、保质期等方面的要求，为该产品设置具有适当“门槛”或“标杆”。实用性体现在，研制标准过程考虑到产品生产、储运、流通、销售和应用各个环节的实际状况，不同行业同类技术成熟程度，消费者心理预期，标准涉及的检测成本等，最终体现在本标准的征求意见稿当中。

标准研制过程所处阶段和进度如下：

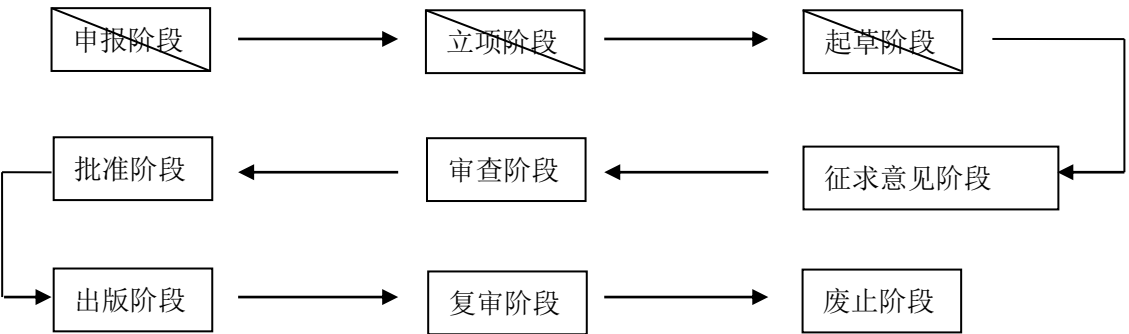


表1 标准研制工作-进度表

时间区段	工作内容	备注
2011.8.1-2016.1.30	收集、查阅国内外相关资料、标准信息。	部分工作与国标《饲料添加剂 屎肠球菌》研制过程同时进行。
2012.2.1-2015.8.30	走访企业、消费者、相关专家学者，初步确定重点指标和研究思路，并重点确定标准采用的新方法及涉及新仪器，组织实验。	
2011.8.1-2016.3.30.	采样阶段，采国内外的乳酸菌产品，并抽取国内有代表性的生产企业的样品。	
2012.2.1-2015.11.30	试验论证和验证阶段。结合试验验证、数据分析和专家意见，逐步确定标准重点考量指标。	
2014.7	成立工作小组：张晓琳、李爱科、韩伟、赵晨等，进行具体分工。	
2012.11.5-2016.6.30	广泛征求科研、生产、经营、质检及消费者的意见。	
2015.6.15-2016.3.15	修改标准文本草稿，形成征求意见稿。	
2016.7.15-	修改征求意见稿。专家论证会。函审等。	

4.1 饲料添加剂 屎肠球菌-采样和检测依据

根据农业部批准的获得（屎肠球菌）饲料添加剂生产许可证的企业名单联系厂家、或直接购买市场上销售产品等方式、收集采样。采集样品经登记、编号、取/留样、盲样跟踪等步骤后、进行初步筛选，筛选原则为：①信息有追溯性；②样品标签上明确标识“肠球菌”并在实物中确实含有屎肠球菌；③活菌数量 $\geq$ 产品标识活菌数；④市场上有售，并具一定代表性。经过样品的初步检验，确定11个样品为跟踪检测和评价的样品。

表2 （屎肠球菌）饲料添加剂 生产企业名录

编号	厂家
1	思科福（北京）生物科技有限公司
2	大连三亿动物药品有限公司
3	台湾亚芯公司

4	沧州旺发生物技术研究
5	北京好实沃生物技术有限公司
6	江苏绿科生物技术有限公司
7	北京中农颖泰生物技术有限公司
8	瑞士百福微生物公司
9	上海嘉楚生物工程有限公司
10	宜春强微生物科技有限公司
11	山东省乐陵市集大生物科技有限公司

4.2 饲料添加剂 屎肠球菌-术语和定义的编制依据

主要参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》（R.E.布坎南，N.E.吉本斯等）、《常见细菌系统鉴定手册》（东秀珠、蔡妙英等）相关屎肠球菌的鉴定部分。

4.3 饲料添加剂 屎肠球菌-微生物形态的编制依据

4.3.1 菌体形态

参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》（R.E.布坎南，N.E.吉本斯等）、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》（凌代文），并经过对屎肠球菌标准菌株和样品的革兰氏染色和显微观察，确定屎肠球菌的菌体形态为：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。

表3 跟踪检测和评价的样品-特征描述

编号	形态	革氏染色 ^a	芽孢	荚膜	运动性
1	卵圆、短链	阳性	无	无	无
2	卵圆、短链	阳性	无	无	无
3	卵圆、成对	阳性	无	无	无
4	卵圆、短链	阳性	无	无	无
5	卵圆、短链	阳性	无	无	无
6	卵圆、成对	阳性	无	无	无
7	卵圆、成对	阳性	无	无	无
8	卵圆、成对	阳性	无	无	无
9	卵圆、短链	阳性	无	无	无

10	卵圆、成对	阳性	无	无	无
11	卵圆、短链	阳性	无	无	无

a:革兰氏染色部分为生理生化特征，放在标准中4.1.3。

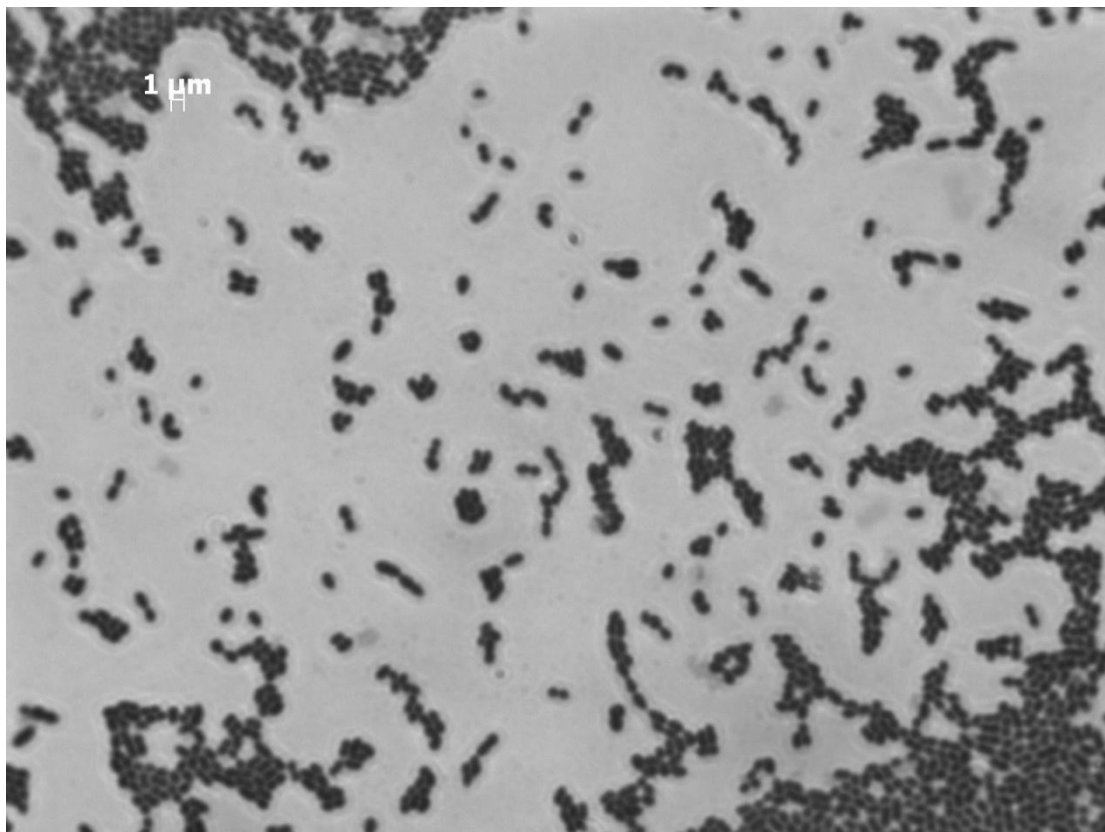


图1 样品典型显微形态

4.3.2 菌落形态

参考数十篇尿肠球菌文献及尿肠球菌的特性，选用适合肠球菌选择性培养基，即胆汁七叶苷叠氮钠琼脂，为国标草案中分离用培养基。跟踪检测的样品在下述培养基上培养（ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，24-48h），菌落形态均符合典型特征，即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。如图 2。

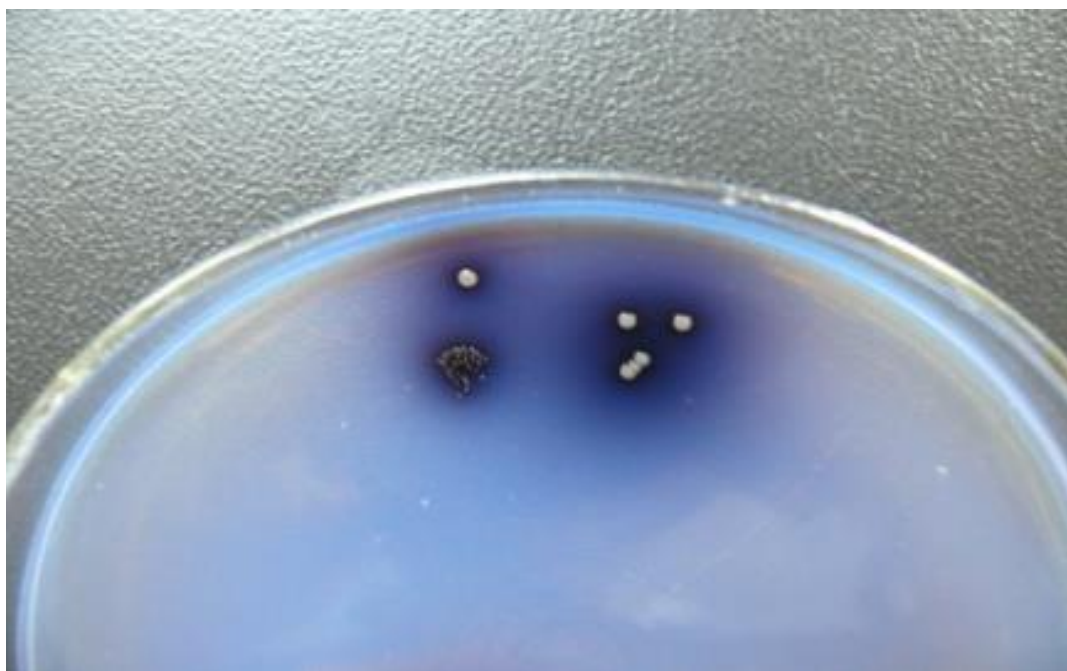


图2 样品典型菌落形态

4.3.3 生理生化特征

主要参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》（R.E.布坎南，N.E.吉本斯等），《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》（凌代文）。凡在胆汁七叶苷叠氮钠琼脂斜面上，于 $36 \pm 1^\circ\text{C}$, 24h~48h 培养，刮取菌苔，进行表 4 中试验，以验证屎肠球菌生理生化特征；包括革兰氏染色、硝酸盐、叠氮化钠等耐受试验及利用不同碳源实验。生理生化试验的选择具有鉴别性，例如，叠氮化钠耐受和七叶苷利用与否，可区别多数常见乳酸菌；0.04 %硝酸盐耐受和丙酮酸发酵，可区别屎肠球菌和粪肠球菌；6.5 %NaCl 中生长与否，可区别屎肠球菌和乳酸肠球菌。

表 4 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。			

表5 跟踪检测样品的生理生化结果描述

编号	麦芽糖	七叶苷	丙酮酸	阿拉伯糖	6.5% NaCl	pH 9.6	0.04% 磷酸盐	0.02% 叠氮化钠
1	+	+	-	+	+	+	-	+
2	+	+	-	+	+	+	-	+
3	+	+	-	+	+	+	-	+
4	+	+	-	+	+	+	-	+
5	+	+	-	+	+	+	-	+
6	+	+	-	+	+	+	-	+
7	+	+	-	+	+	+	-	+
8	+	+	-	+	+	+	-	+
9	+	+	-	+	+	+	-	+
10	+	+	-	+	+	+	-	+
11	+	+	-	+	+	+	-	+

4.4 饲料添加剂 屎肠球菌-感官特征的编制依据

目前，市场在售的乳酸菌类饲料添加剂大多为固态产品，在我们收集的屎肠球菌样品中，全部为固态产品。从溶解性分析，水溶性产品居多，不乏肠溶性产品。从形态分析，存在、多层微囊、冻干菌粉、湿法造粒、载体吸附菌粉等，且粒度在 20-100 目范围，颜色都很均一。在标准草案中的表述为：“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”。

4.5 饲料添加剂 屎肠球菌-水分的编制依据

对收集的所有完整包装的固态样品的水分含量的测定：称取 2.00~10.0g 切碎或磨细的样品，精密称量后放入置 95~105℃干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，干燥 2~4h 后，盖好取出，放入干燥器内冷却 0.5h 后称量。然后再放入 95~105℃干燥箱中干燥 1h 左右，取出，放干燥器内冷却 0.5h 后再称量。至前后两次质量差不超过 2mg，即为恒量。结果表明：所收集的完整包装的固态样品的水分含量在 5.6%-8.0%区间内。另外，随机挑选 1 个样品，调节不同水分（6%和 12%），贮存不同时间（3、6、12 月），结果发现高水分样品中，随水分提高和时间延长，霉菌总量也显著增加。考虑到商品加工、流通、储藏、使用过程中可能带来的误差和水分增加，标准草案中的表述为：“不高于 8.0%。”

表6 跟踪检测样品水分检测结果

编号	样品 1/%	样品 2/%	样品 3/%	平均值/%	标准差
1	5.31	5.30	5.28	5.30	0.02
2	6.00	6.00	6.00	6.00	0.00
3	5.60	5.60	5.62	5.61	0.01
4	6.80	6.82	6.80	6.81	0.01
5	7.01	6.82	6.98	6.94	0.10
6	6.57	6.57	6.57	6.57	0.00
7	6.89	6.80	6.85	6.85	0.05
8	7.21	7.20	7.32	7.24	0.07
9	7.35	7.35	7.34	7.35	0.01
10	7.91	7.90	7.91	7.91	0.01
11	7.65	7.60	7.60	7.62	0.03

4.6 饲料添加剂 屎肠球菌-活菌数的编制依据

活菌数，是益生菌在最重要的功能性指标之一；在 FAO/WHO 和欧盟对益生菌的定义中，均强调“足够数量”的必要性。所以说，活菌数的高低关系到产品的质量。目前，针对屎肠球菌的活菌数在 ISO 标准、国标、行标中尚无强制规定，但乳酸菌在食品、保健食品中相关规定、及微生物饲料添加剂产品的文献中数据都值得借鉴。在国标《发酵乳》（GB19302-2010）、《乳酸菌饮料卫生标准》（16321-2003）、《婴儿配方食品》（GB10765 - 2010）、《较大婴儿和幼儿配方食品》（GB10767 - 2010）、《婴幼儿谷类辅助食品》（GB10769 - 2012）等均明确：产品中活性益生菌的活菌数应 $\geq 10^6$ CFU/g(ml)。而在大量代表性杂志文献中（包括《Animal Science》、《动物学报》、《动物学杂志》、《动物营养学报》等），微生物饲料添加剂的有效活菌浓度大多在 10^7 - 10^{10} 范围内。从屎肠球菌的菌种特征、发酵规律、工业成熟度分析，饲料添加剂从业者自微生物发酵、离心收集、冻干处理或加载体复配、干燥等步骤后，得到大于 1.0×10^{10} CFU/g 的菌粉是完全可以达到的。同时，从收集样品的标识和实际检验来看，85%的（乳酸菌）样品的初始活菌数大于 1.0×10^9 CFU/g，且使用浓度均要求或建议在 1.0

$\times 10^6$ CFU/g（饲料）以上。所以，考虑到行业平均加工水平、有效使用浓度、市场实际情况，并本着促进行业发展、对从业者提高“适当门槛”的原则，标准草案提出：屎肠球菌活菌数 $\geq 1.0 \times 10^9$ CFU/g。

表7 跟踪检测样品的标识活菌数

编号	标识活菌数, CFU/g	初检活菌数*, CFU/g
1	1×10^{10}	$\geq 1 \times 10^{10}$
2		$\geq 1 \times 10^9$
3	1×10^{11}	$\geq 1 \times 10^{11}$
4	6×10^{11} 和 1×10^{10}	$\geq 1 \times 10^{10}$
5	1×10^{10}	$\geq 2 \times 10^{10}$
6	1×10^{10}	$\geq 4 \times 10^9$
7	1×10^{10}	$\geq 1 \times 10^{10}$
8	1×10^{11} 和 1×10^9	$\geq 1 \times 10^{11}$ 和 $\geq 1 \times 10^9$
10		$\geq 1 \times 10^9$
11		$\geq 1 \times 10^9$

*：初检活菌数为采样即检测的结果。样品初检均在产品标识保质期的前2月内。

4.7 饲料添加剂 屎肠球菌-卫生标准的编制依据

主要参考《微生物饲料添加剂技术通则》（NY/T1444-2007）、《饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌》（NY/T1461-2007）、《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》（2131-2012）中关于卫生标准的相关规定。其中，考虑到霉菌及其产生的毒素可能对人和动物的健康危害，我们认为在标准中应有更严格的上限控制；结合样品检测结果，标准草案规定霉菌和酵母总数的允许量为 1.0×10^4 个/kg。标准草案表述如表 8。

在屎肠球菌类产品中混有杂菌是不可避免的。杂菌可能来自环境、用水、配料、载体及包装等，同时杂菌的种类又具有不可预知性，这给杂菌的鉴别及其定量带来了极大的难度。按照通常检测杂菌的办法：将样品稀释到合适浓度，倾注平板培养，根据菌落的差异辨别杂菌，并同时定量。由于常用 9cm 平板空间有限，勉强分辨菌落形态、须平板至多长 100-300 个菌落，所以依靠平板培养方法的分辨率仅为 1%。而尝试的分子生物学定量方法的精确度和精密度较低。这种

情况下，将杂菌率的允许量仍设为为 1.0%。

表 8 屎肠球菌饲料添加剂卫生指标

项目	指标
杂菌率，%	≤ 1.0
黄曲霉素 B1， g/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/100g	≤ 400
霉菌总数的允许量， CFU/g	< 1.0×10 ⁴
致病菌（志贺氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌）	不得检出

如表 9 和表 10 所示，所选样品进行霉菌、大肠菌群、致病菌和重金属的检测，结果表明有 81%以上的样品在标准草案规定范围内。

表9 跟踪检测样品的霉菌、致病菌的检测结果

编 号	霉菌总数， CFU/g	沙门氏菌， CFU/g	大肠菌群， CFU/100g	金黄色葡萄球 菌， CFU/g	志贺氏菌， CFU/g
1	≤5. 0×10 ³	-	≤200	-	-
2	≤7. 75×10 ³	-	≤300	-	-
3	≤2.5×10 ³	-	≤150	-	-
4	≤5.0×10 ²	-	≤350	-	-
5	≤2.0×10 ⁴	-	≤300	-	-
6	≤5.0×10 ³	-	≤350	-	-
7	≤1.0×10 ⁴	-	≤300	-	-
8	≤1.0×10 ⁴	-	≤300	-	-
10	≤1.5×10 ⁴	-	≤300	-	-
11	≤1.0×10 ⁴	-	407	-	-

表10 部分样品的重金属含量分析

样品	砷， mg/kg	铅， mg/kg	镉， mg/kg	汞， mg/kg	黄曲霉毒
----	----------	----------	----------	----------	------

					素, µg/kg
1	0.27	未检出 (< 1)	未检出 (< 0.01)	未检出 (< 0.005)	未检出 (< 0.5)
4	未检出 (< 0.01)	未检出 (< 1)	未检出 (< 0.01)	未检出 (< 0.005)	未检出 (< 0.5)
5	0.022	未检出 (< 1)	未检出 (< 0.01)	未检出 (< 0.005)	未检出 (< 0.5)
8	1.59	未检出 (< 1)	未检出 (< 0.01)	未检出 (< 0.005)	未检出 (< 0.5)
10	2.03	未检出 (< 1)	未检出 (< 0.01)	未检出 (< 0.005)	未检出 (< 0.5)

4.8 饲料添加剂 屎肠球菌-试验方法的编制依据

4.8.1 抽样、感官检验、水分的编制依据

抽样、感官检验、水分均有专项国标及其它国标中方法作为依据。

4.8.2 活菌计数试验方法的编制依据

如图3所示屎肠球菌检验结果流程图。

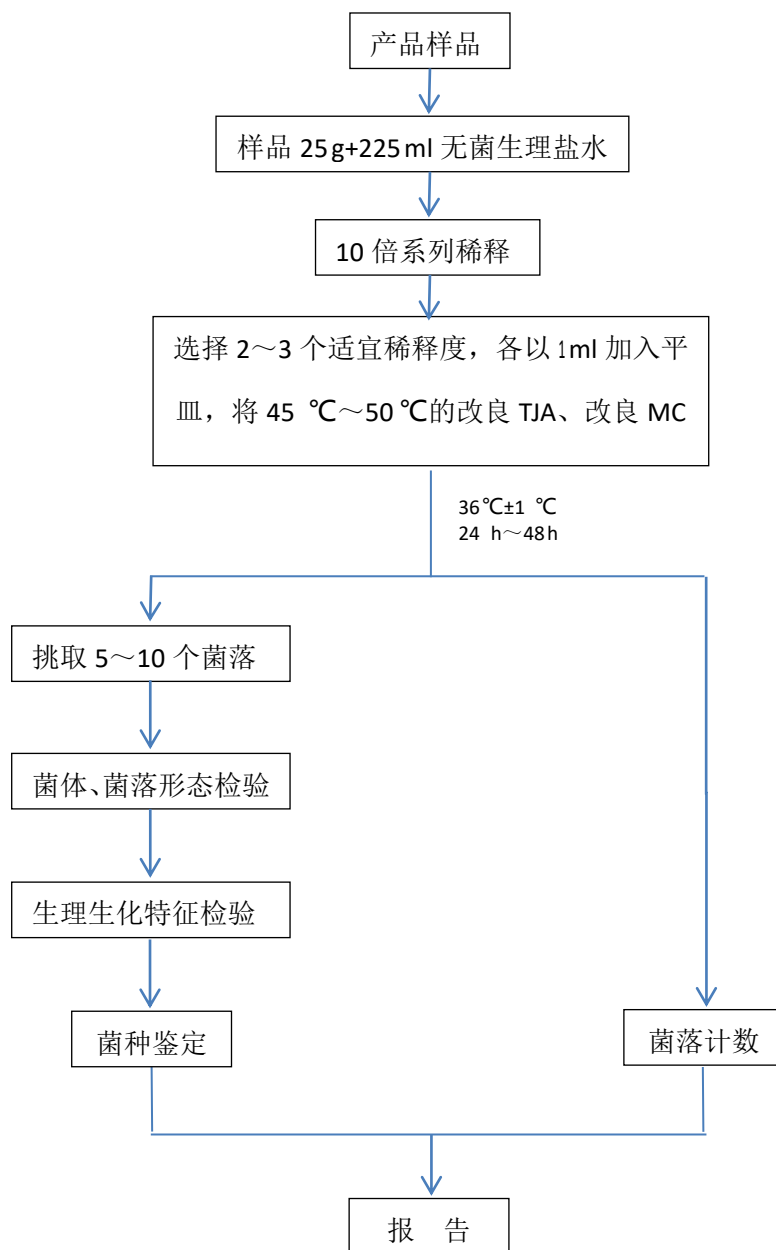


图3 所示屎肠球菌检验结果流程图

主要参考《食品微生物学检验 乳酸菌检验》（GB4789.35）、《食品微生物学检验 双歧杆菌检验》（GB4789.34）、《饲料微生物添加剂 地衣芽孢杆菌》（NY/T1461-2007）、《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》（2131-2012）等标准级方法，通过定性和定量两部分完成屎肠球菌的检测。所以标准草案表述为：

“ 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 $25.0g\pm0.01g$ 或 $25.0ml\pm0.01ml$ 样品，加入

225 ml 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 1.0 ml 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 45~50℃的肠球菌选择性培养基，向每个培养皿中倒入约 15~20 ml，摇匀并凝固，制成肠球菌琼脂平板。37℃倒置培养 24~48 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 30~300 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：

∑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

n₁——第 1 个稀释度的平板数

n₂——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%。”

4.8.3 杂菌允许量试验方法的编制依据

因为杂菌来源多样性和不可预知性，本标准草案重点关注了几类菌群：a.致病菌、霉菌和酵母；草案中均设定了明确限量，在卫生指标中单独列出；有相应的国标方法检测。b.形态明显差别菌；通过菌落观察排除。标准草案表述为：

“5.5.1 杂菌率检测

杂菌率=杂菌数/（屎肠球菌活菌数+杂菌数）×100% (2)

4.8.4 其它试验方法的编制依据

检测项目所采用的检测方法如表11。

表11 检测项目及检测方法一览表

检测项目	检测方法
抽样	GB/T14699.1
水分	GB6435
黄曲霉毒素 B1	GB/T17480
砷含量	GB/T13079
汞含量	GB/T13081
铅含量	GB/T13080
镉含量	GB/T13082
霉菌总数	GB/T4789.15
大肠菌群	GB/T4789.3
致病菌	GB/T4789.5 、 GB/T4789.10 、 GB/T13091

4.9 饲料添加剂 屎肠球菌-检验规则的编制依据

4.9.1 出厂检验的编制依据

感官指标、水分、微生物含量（包括活菌数和杂菌）是出厂最必要的 3 组数据，因为 3 项指标是产品外观区分和质量标准的直接体现。所以标准草案表述为：“感官指标、水分、微生物含量（包括活菌数和杂菌）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。”

4.9.2 型式检验的编制依据

参考《微生物饲料添加剂通用要求》（GB/T23181-2008）中功能菌的菌种要求 and 安全性要求、组织专家讨论会中专家意见、及企业调研，草案强调了菌株的唯一性、稳定性和安全性，对目标菌的分子生物学特征、形态特征、培养特征和生理生化特征、生产情况调整作出年检或半年检验。另外，在标准草案附录中增

加了模式菌株ATCC19434的16SrRNA 基因的全序列。

16SrRNA 基因的全序列的检测,作为目前常用的、成熟的鉴定细菌手段之一,不存在技术难度,但没有放在“菌种鉴定”部分的原因:考虑到不同用户的检测可操作程度,多数企业和部分检测机构尚不能独立完成从 DNA 提取、PCR、目的基因转入质粒、到测序的全部过程。同时,我们认为,鉴定菌种对于微生物类饲料添加剂产品的检测工作非常必要,16SrRNA 基因的检测作为简单、准确的鉴定手段之一,在型式检验中最易实现。

标准表述为:

“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》) Vol. II 所列模式菌株 ATCC19434 或 NCTC7171 的 16 S rRNA (16S 核糖体核糖核酸)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。”

“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。”

4.9.3 判定规则的编制依据

标准草案中涉及检测指标或参数,都为强制性要求,所以要求每一项指标合格才可以形成商品、进入流通环节。同时如有某项或某几项指标检测不合格,需要复检确认。标准草案表述为:“检验中有一项指标不符合本标准时,应重新抽样,进行复检,复检结果仍有一项指标不符合本标准时,则判定该批产品为不合格。”

4.9.4 标签、包装、运输、储存和保质期的编制依据

4.9.4.1 标签、包装、运输的编制依据

参考同类饲料添加剂的国家标准和行业标准中相关规定。值得说明的是:本标准草案尤其对标签中应标明产品包含功能性微生物的学名和数量作出要求,这是针对市场上一些产品标签上使用“乳酸菌”或“微生物数量为××”,严重模糊了种属区分,同时增加了检测难度。标准草案表述为:

“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 GB10648 的要求;

8.1.3 标签应标明所有添加微生物的学名和数量。”

4.9.4.2 储存和保质期的编制依据

根据我们对屎肠球菌类产品为期一年（或其标明保质期）的跟踪检测、温度梯度储存试验，又考虑到乳酸菌自身特性、饲料企业实际应用情况，我们发现：
a.所有收集产品中屎肠球菌的活菌数随时间延长而降低，冷藏储存效果显著好于常温储存，在 6 月周期内常温储存的屎肠球菌活菌数呈数量级降低（约 81%的产品）；
b.饲料生产和应用企业及消费者几乎不能满足长周期冷藏储存大量饲料添加剂的条件，且饲料添加剂往往和其它大宗饲料原料混合好销售，全部冷藏几乎不可能。

虽然可能由于菌种与保护工艺限制的原因，多数采集的乳酸菌类样品在其货架期内均出现不同程度的活菌数减少；但从保证产品的有效性与合理稀释角度出发，产品保质期的严肃性应该被加以重视，标准草案提出的活菌数是指，在其保质期内不得低于 $1.0 \times 10^9 \text{CFU/g}$ 。所以，（在保证标准草案规定的屎肠球菌活菌数前提下）标准草案表述为“保质期为 6 个月。”但同时，在对储存的要求中，标准草案仍提出：“建议使用 10°C 以下的冷藏条件。”

表12 检测样品常温储存期内活菌变化

接样检测活菌数*	3 月后活菌数/存活率	6 月后活菌数/存活率	9 月后活菌数/存活率	12 月后活菌数/存活率
1.0×10^{10}	$5.0 \times 10^8 - 3.5 \times 10^9$	$3.0 \times 10^7 - 1.0 \times 10^9$	$2.1 \times 10^6 - 3.0 \times 10^8$	$7.0 \times 10^5 - 5.6 \times 10^7$

*:单位: Log(CFU)/g;

4.10 饲料添加剂 屎肠球菌-资料性附录的编制依据

资料性附录参考如下：

表16 资料性附录的参考源

资料性附录名称	参考源
营养肉汤培养基	GB/T4789. 2-2010
生理盐水	GB/T4789. 35-2010
革兰氏染液	《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》
发酵管	
模式菌株 ATCC19434 的 16 S	NCBI数据库资源

rRNA 基因序列	
-----------	--

5. 与现行法律法规和强制性国家标准的关系

本标准的制订可为饲料添加剂 屎肠球菌质量安全的评价、相关质量标准指标的制订和贯彻执行提供直观的指导。

与有关的现行法律、法规和强制性国家标准没有冲突、矛盾和重复。