

中华人民共和国强制性国家标准

《饲料添加剂 第5部分：微生物 粪
肠球菌》

（定向征求意见稿）

编制说明

国家粮食和物资储备局科学研究院
山东泰山生力源集团股份有限公司
北京大北农科技集团股份有限公司
武汉新华扬生物股份有限公司
江苏三仪生物工程有限公司
中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

2024年12月

目录

一、工作简况	1
二、标准编制原则、强制性国家标准主要技术要求的依据及理由	3
三、与有关法律、行政法规和其他强制性标准的关系，配套推荐性标准的制定情况 ..	13
四、与国际标准化组织、其他国家或者地区有关法律法规和标准的比对分析	13
五、重大分歧意见的处理过程、处理意见及其依据	14
六、对强制性国家标准自发布日期至实施日期之间的过渡期（以下简称过渡期）的建议及理由	14
七、与实施强制性国家标准有关的政策措施	14
八、是否需要对外通报的建议及理由	14
九、废止现行有关标准的建议	15
十、涉及专利的有关说明	15
十一、强制性国家标准所涉及的产品、过程或者服务目录	15
十二、其他应予说明的事项	15
附件 1 饲料添加剂粪肠球菌产品企业标准清单	17

强制性国家标准《饲料添加剂 第5部分：微生物 粪肠球菌》

编制说明（定向征求意见稿）

一、工作简况

1. 标准制定背景

（1）粪肠球菌的生物学特性

粪肠球菌（*Enterococcus faecium*）是革兰氏阳性球菌，细菌界厚壁菌门芽胞杆菌纲乳杆菌目肠球菌科肠球菌属。菌落形态呈卵圆形，在其培养过程中会产生大量的乳酸，是一种兼性厌氧的乳酸菌，广泛分布于人体和动物肠道中，是肠道中的正常菌群。

（2）饲料添加剂粪肠球菌产品的生产工艺流程

目前粪肠球菌的生产工艺形式主要有两种：固体表面发酵法和大罐液体发酵法。1）固体发酵法：该法是把固体培养的菌泥与载体按比例混合经干燥制成的。此法投资少、产品活菌含量低，易受杂菌污染。目前，因受到以上缺点的限制，市场上固体发酵产品较少。2）液体发酵法：大罐液体发酵法一般生产工艺流程为：菌种接种培养→种子罐培养→生产罐培养→排放培养液→收集菌泥→加入适量载体→干燥→粉碎→过筛→质量检验→产品。此法适于工业化生产，便于无菌操作，但前期投资较多。无论是固体表面发酵工艺还是大罐液体发酵工艺，其整体工艺过程都需要在无菌的环境下操作，每个环节的卫生条件都要求十分严格。

（3）液体发酵法的核心设备

液体发酵法的核心设备为发酵罐和种子罐。1）发酵罐。发酵罐是一种对物料进行机械搅拌与发酵的设备。该设备采用内循环方式，用搅拌桨分散和打碎气泡，它溶氧速率高，混合效果好。罐体采用 SUS304 或 316L 进口不锈钢，罐内配有自动喷淋清洗头，确保生产过程符合 GMP 要求。粪肠球菌发酵过程是一个无菌、无污染的过程，发酵罐采用了无菌系统。罐体上设有米洛板或迷宫式夹套，可通入加热或冷却介质来进行循环加热或冷却。发酵罐的容量有多种不同规格（300L-20000L 最为常见）。2）种子罐。适用于乳酸菌摇瓶种子的扩培，其作用可加热、保温及冷却，为全封闭发酵专用设备。材料同样多采用 SUS304 或 316L 进口不锈钢。冷却加热形式有夹套式、内盘管式，外环管式。

（4）益生菌产品的国内外市场状况

益生菌（尤其是乳酸菌）产品多以颗粒、粉末剂、胶囊、片剂等形式出现。又可分成三大类，其中包括：a. 乳杆菌类（如嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌等）；b. 双歧杆菌类（如长双歧杆菌、短双歧杆菌、青春双歧杆菌、嗜热双歧杆菌等）；c. 革兰氏阳性球菌（如链球菌、肠球菌、乳球菌、嗜热链球菌等）。近 5 年，我国益生菌产业每年以高于 15% 的增速快速发展，但大部分应用于乳品工业。在益生菌的细分市场中，益生菌

乳制品市场依然占据大部分比例，而药品冲剂、保健品、动物用益生菌的市场比例逐渐增加，在乳制品、药品冲剂、保健品、动物用益生菌这四大细分市场比例占益生菌总市场份额的98.35%，益生菌市场的细分程度正逐渐提高，而益生菌乳制品的市场比例将逐渐减少，但其规模依然保持增长趋势。

目前全球益生菌食品的种类超过500种，并且还在迅速增加。据2020年的统计，用作动物饲料的益生菌（尤其是乳酸菌）将为整个市场贡献近47亿美元的销售额。粪肠球菌，是国内市场常见、工业成熟度较高、价格相对低的乳酸菌产品，预计有超过1亿元人民币的销售额。目前，随着益生菌细分市场不断完善，粪肠球菌已开始出现在包括水产养殖业、畜牧业、青贮饲料等涉农行业，市场覆盖范围更加广阔，未来随着这些领域应用技术更加娴熟，粪肠球菌的市场份额有扩大之势。

（5）制定饲料添加剂粪肠球菌国家标准的意义

随着养殖业从业者对畜禽肠道健康越来越重视，我国饲用乳酸菌添加剂行业迅速发展，因此，人们对这类产品质量的要求和关注也有所提高。粪肠球菌是我国允许作为饲料添加剂使用的微生物菌种之一，因其具有较好的产酸、抑制有害菌和调节肠道健康的特性，而被广泛用于畜禽饲料中。大量的动物实验表明，饲料中加入粪肠球菌，促进动物对营养物质的消化吸收，并产生乳酸等物质来抑制肠道中致病菌和腐败菌的繁殖，从而预防肠道感染，防止腹泻，还具有免疫激活的作用，从而提高动物的健康水平。与此同时，粪肠球菌类产品也存在着其它乳酸菌类似的问题，如菌粉产品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。我国目前没有相应的产品标准。因此，制定饲料添加剂粪肠球菌标准对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，以及对今后产品的规范化生产非常必要，对提高动物食品安全水平具有特别重要的意义。

2. 标准任务来源

本标准制订任务由中华人民共和国农业农村部提出并归口，项目编号20110860-Q-469。本文件起草单位：国家粮食和物资储备局科学研究院、山东泰山生力源集团股份有限公司、北京大北农科技集团股份有限公司、武汉新华扬生物股份有限公司、江苏三仪生物工程有限公司、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。本文件主要起草人：乔琳、王薇薇、李军训、李爱科、王丽、宋丹、滕堃如、施晶晶、陈丽仙、刘宽博、刘雪连、沈红霞、徐丽、周樱、江国托、刘艳、单春乔、李娟、刘秋晨、徐启民、佟建明、董晓芳。

3. 主要工作过程

1. 起草阶段

2024年1月~5月，确定起草组并进行分工，收集查阅粪肠球菌相关的国内外标准、企业标准及相关资料，结合实际情况，对这些资料进行整理。2024年6月-8月收集企业及市场流通的粪肠球菌产品，征询生产企业及用户关于标准制定的意见和建议；标准设值的讨论；

并按照 GB/T 1.1-2020 形成了标准初稿。

2024 年 9~12 月，起草组对粪肠球菌的鉴定方法，活菌检测方法，质量指标，卫生指标等技术内容进行研究，根据试验结果形成定向征求意见稿。

2. 定向征求意见
3. 预审
4. 终审

二、标准编制原则、强制性国家标准主要技术要求的依据及理由

1. 标准编制原则

本标准是按照 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》、GB/T 20001.10-2014《标准编写规则 第 10 部分：产品标准》的规定进行的编制。

2. 强制性国家标准主要技术要求的依据及理由

饲料添加剂是食品安全的源头，其质量安全直接影响养殖动物的健康，最终影响人民群众的身体健康，一直倍受社会各界关注，应制定强制性国家标准，具体理由如下：

饲料安全监管需要。饲料添加剂是工业化加工的产品，安全风险相对较大，做为饲料生产的重要投入品，其质量是饲料行业监管的重点。新修订的 GB 13078-2017《饲料卫生标准》删除了饲料添加剂产品的有关内容。也就是说新版的《饲料卫生标准》发布实施后，饲料添加剂产品没有了安全兜底标准。

参照国际惯例和我国食品添加剂标准。在欧盟或发达国家，饲料添加剂与食品添加剂均采用同样的管理措施。如：欧盟的饲料添加剂标准都是以“欧盟令”的形式发布。我国《食品安全法》第二十六条明确规定食品添加剂应制定强制性的食品安全标准。

沿袭现有的饲料添加剂标准工作基础。目前，农业农村部批准并列入《饲料添加剂品种目录》的饲料添加剂共 436 种。每一种饲料添加剂的原料来源和生产工艺不同，质量指标、卫生指标差异特别大，很难分类制定标准。2017 年，经请示市场监管总局和农业农村部同意，饲料添加剂可制定强制性国家标准。为控制饲料添加剂强制性国家标准数量，2019 年，我标委会以《关于报送饲料添加剂产品强制性标准分类原则和编号方法建议的函》（全饲标【2019】16 号）文件的形式向市场监管总局标准技术管理司建议饲料添加剂强制性标准按 GB 7300 饲料添加剂产品系列标准进行编号。

本标准在编制过程中主要参考相关标准：《微生物饲料添加剂技术通则》（NY/T 1444-2007）、《标准编写规则 第 10 部分：产品标准》（GB/T 20001.10-2014）、《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 4789.35-2023）、《饲料中细菌总数的测定》（GB/T 13093）、《出

口商品中粪链球菌群检验方法》(SN/T 0475-95)、《饲料添加剂 第5部分:微生物 酿酒酵母》(GB 7300.501-2021)、《饲料添加剂 第5部分:微生物 植物乳杆菌》(GB 7300.502-2023)、《饲料添加剂 第5部分:微生物 屎肠球菌》(GB 7300.503-2023)、《饲料添加剂 第5部分:微生物 嗜酸乳杆菌》(GB 7300.504-2023)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,并参考生产企业的企业标准等相关资料制定了本标准。

(1) 采样和检测依据

根据农业部批准的获得(粪肠球菌)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。产品共来自18家相关生产企业,共计23个样品。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:a. 信息有追溯性;b. 样品标签上明确标识“粪肠球菌”并在实物中检测确实含有粪肠球菌;c. 市场上有售,并具一定代表性。经过样品的初步检验,筛选出部分样品为跟踪检测和评价的样品。同时,我们统计了企业标准信息公共服务平台上的粪肠球菌产品基本信息作为参考(详见附件1)。

(2) 范围、术语和定义的编制依据

①基于饲料添加剂类产品的要求、及微生物和粪肠球菌的特性,本标准内容涵盖了饲料添加剂粪肠球菌的术语和定义、产品的技术要求、取样、试验方法、检验规则、标签、包装、运输、贮存和保质期。

②综合考虑工艺特点、载体和稀释剂安全性等,本标准适用于经过液态或固态发酵、干燥等工艺制得的、仅含粪肠球菌的饲料添加剂产品。另一方面,个别企业虽然有液态产品的标准,但并没有产品,而且采集样品时,有些企业虽然称有液态产品,但是告知液态产品稳定性太差,不建议购买。因此,我们仅收集到两个厂家的液态样品,经检测活菌数极低($< 10^6$ CFU/g);再加上液态样品不便于运输和保存,因此,本标准只适用于固态饲料添加剂粪肠球菌。

③术语和定义规定为:粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*: 属于细菌界厚壁菌门芽胞杆菌纲乳杆菌目肠球菌科肠球菌属,为革兰氏阳性球菌,菌体卵圆形,主要成对或短链,无芽胞,多数不运动,兼性厌氧,化能异养,发酵产L(+)-乳酸,但不产气。(参考《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》(R.E.布坎南, N.E.吉本斯等)中有关粪链球菌的鉴定部分^[1],以及《Taxonomic Outline of the Prokaryotes Berger's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition》(George M. Garrity, Julia A. Bell, Timothy G. Lilburn) ^[2]。

(3) 菌株鉴别编制依据

① 菌体染色及形态检验编制依据

参考《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》,并经过对粪肠球菌标准菌株和样品的革兰氏染色和显微观察,确定粪肠球菌的菌体形态为:菌体细胞

呈卵圆形，直径为 0.5 μm~1.0 μm，多数成对或成短链。无芽孢，无明显荚膜，通常不运动。具体数据见表 2 和图 1。

表2 饲料添加剂粪肠球菌产品菌体染色及形态特征描述

编号	形态	革氏染色	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

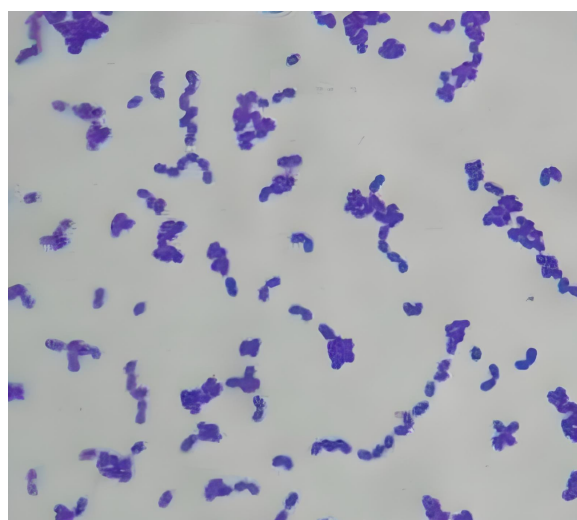
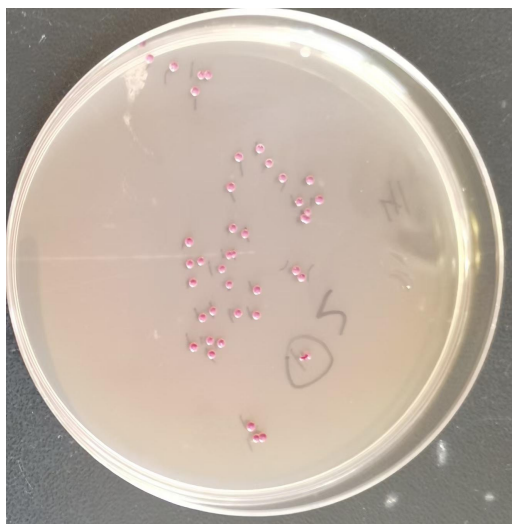


图1 样品菌体典型显微形态

②菌落形态编制依据

参考《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》和《生物产品中功能性微生物检测》（GB/T34224-2017），选用适合肠球菌选择性培养基，即 KF 链球菌琼脂培养基，为本标准中分离鉴定用培养基，培养基成分与配制见标准文本附录 A.1.1。跟踪检测的样品在下述培养基上培养（37°C ± 1°C，48 ± 2h），菌落形态均符合典型特征，暗红色至粉红色，边缘整齐、表面光滑、圆形。



③生理生化特征

主要参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》和《生物产品中功能性微生物检测》（GB/T34224-2017），并结合 API 20 Strep 鉴定试纸条测试结果，标准中设定粪肠球菌的生理生化特征如表 3。对 11 个样品进行表 3 中相应生理生化特征的试验，具体数据见表 4。从产品的试验结果看，符合本标准的要求。

表 3 粪肠球菌生理生化特征

鉴定特征	粪肠球菌	鉴定特征	粪肠球菌
生长10℃	+	产酸 D-木糖	—
生长45℃	+	产酸 蔗糖	+
生长6.5%氯化钠	+	产酸 棉籽糖	—
生长0.01%四唑	+	产酸 蜜二糖	—
精氨酸双水解酶	+	产酸 山梨醇	(+)
马尿酸水解	(+)	产酸 乳糖	+
产酸 L-鼠李糖	d	产酸 甘油	+
产酸 松三糖	(+)	产酸 甘露醇	+

注：“+”表示不小于90%的菌株为阳性反应；“-”表示阴性反应，（+）表示80%~89%的菌株为阳性反应，d表示21%~79%的菌株为阳性反应。

表4 饲料添加剂粪肠球菌的生理生化结果描述

编	生	生	生	生	精	马	产	产	产	产	产	产	产	产	产
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

号	长 10 ℃	长 45 ℃	长 6.5 % 氯化 钠	长 0.0 1% 四 唑	氨 酸 双 水 解 酶	脲 酸 水 解	酸 L- 鼠 李 糖	酸 松 三 糖	酸 D - 木 糖	酸 蔗 糖	酸 棉 籽 糖	酸 蜜 二 糖	酸 山 梨 醇	酸 乳 糖	酸 甘 油	酸 甘 露 醇
1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+

注：“+”表示为90%以上的菌株为阳性反应；“-”表示阴性反应。

④分子生物学鉴定

采用核酸序列分析法，将 11 个粪肠球菌样品的 16S rRNA（16S 核糖体核糖核酸）序列与 GeneBank 国际核酸序列数据库中模式菌株 ATCC19433 的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较，相似度在 99%以上。具体结果见表 5。

表5 跟踪检测样品的16S rRNA基因全序列比对

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
相似度，%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

(4) 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。活菌数的高低关系到产品的质量。目前，针对粪肠球菌的活菌数在 ISO 标准、国标、行标中尚无强制规定。然而，在国标《食品安全国家标准 发酵乳》（GB 19302-2010）、《食品安全国家标准 婴儿配方食品》（GB 10765 - 2010）、《食品安全国家标准 较大婴儿和幼儿配方食品》（GB 10767 - 2010）、《食品安全国家标准 婴幼儿谷类辅助食品》（GB 10769 - 2010）等均明确：终端食品中活性益生菌的活菌数应 $\geq 10^6$ CFU/g (mL)。另一方面，在大量代表性杂志文献中，饲料添加剂粪肠球菌的有效

活菌浓度大多在 10^9 - 10^{11} CFU/g 饲料（添加量一般 $\leq 0.1\%$ ）范围内，表明若要实现其在动物上的益生功能，产品的活菌数一般在 10^9 CFU/g 以上。另外，从收集到的 31 份企业标准来看，虽然有 1 个企业标准中产品活菌数定为 $\geq 1 \times 10^6$ CFU/g (mL)，5 家企业标准中产品活菌数定为 $\geq 1 \times 10^7$ CFU/g (mL)，13 家企业标准中产品活菌数定为 $\geq 1 \times 10^8$ CFU/g (mL)，其余均要求活菌数 $\geq 1 \times 10^9$ CFU/g(mL)，但是这些企业的产品活菌数都可以做到 10^9 CFU/g(mL) 以上。考虑到作为饲料添加剂产品，在饲料中的添加量不易过高，通常 $\leq 0.1\%$ ，同时从粪肠球菌的菌种特征、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 1.0×10^9 CFU/g 的菌粉是完全可以达到的，而这样的含量也符合饲料添加剂产品适宜的添加量要求。

此外，参考《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》（GB4789.35-2023），《出口商品中粪链球菌群检验方法》（SNT0475-1995）和《生物产品中功能性微生物检测》（GB/T34224-2017）中提到的方法，检测粪肠球菌共有三种方法：一、采用稀释倾注法，用 MRS 培养基培养；二、采用稀释倾注法，用 KF 链球菌琼脂或者 PSE 琼脂培养基培养；三、采用稀释涂布法，用 KF 链球菌琼脂培养基培养。对市场采集的同一种产品分别用上述三种方法检测，即采用稀释倾注法，分别用 MRS 培养基、KF 链球菌琼脂和 PSE 琼脂培养基培养；采用稀释涂布法，分别用 MRS 培养基、KF 链球菌琼脂和 PSE 琼脂培养基培养，结果表明采用稀释涂布法，用 KF 链球菌琼脂获得的活菌数最高，故粪肠球菌的活菌计数方法用稀释涂布法，KF 链球菌琼脂培养基培养。由收集到的 11 个样品的产品标识活菌数和实际初次检验活菌数（表 6）可知，全部样品的标识浓度均 $\geq 1 \times 10^9$ CFU/g，且大部分样品的活菌数标识均为 $\geq 1 \times 10^{11}$ CFU/g。因此，将粪肠球菌活菌数指标设置为 $\geq 1.0 \times 10^9$ CFU/g。

表6 饲料添加剂粪肠球菌产品的标识活菌数和初检活菌数（CFU/g）

编号	产品标识活菌数	初检活菌数
1	$\geq 1 \times 10^{11}$	1.2×10^{11}
2	$\geq 1 \times 10^{11}$	1.5×10^9
3	$\geq 1 \times 10^{11}$	9.8×10^{10}
4	$\geq 1 \times 10^{11}$	2.1×10^{11}
5	$\geq 1 \times 10^{11}$	5.6×10^{10}
6	$\geq 5 \times 10^{10}$	4×10^{10}
7	$\geq 2 \times 10^{10}$	3.2×10^{10}
8	$\geq 1 \times 10^9$	2.3×10^9
10	$\geq 7.5 \times 10^{10}$	8.8×10^{10}
11	$\geq 6 \times 10^{10}$	2.9×10^{10}

（5）水分和细度的编制依据

《微生物饲料添加剂技术通则》（NY/T 1444-2007）中未对水分和粒度允许量做要求。我们根据《饲料中水分的测定》（GB/T 6435-2014）、《饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法》（GB/T 5917.1-2008）对 11 个样品中的水分和粒度（见表 7）进行了测定，所有样品的水分均 $\leq 12\%$ 。25 份规定了水分要求的企业标准中，有 52%的企业要求水分 $\leq 10\%$ ，有 32%的企业要求水分 $\leq 12\%$ 。综合考虑企业标准（附件 1）和产品实测水分值，我们认为水分含量指标设置为 $\leq 12\%$ 的要求是合适的。

在实际生产中，有企业会遇到粉状产品结块或有部分大颗粒导致产品均匀性不佳的问题。为了避免此问题，标准中增加了对粉状产品粒度的规定。21 份规定了粒度要求的企业标准中，4 家企业（占比 19%）规定 3 mm 标准筛的通过率为 100%，1 家企业规定 2 mm 标准筛的通过率为 95%，1 家企业规定 2 mm 标准筛的通过率为 98%，1 家企业规定 2.36 mm 标准筛的通过率为 95%，剩余企业规定通过率为 100%的粒度均 < 2 mm 标准筛。实际检测的 11 份样品全部能够 100%通过 2 mm 标准筛。因此，综合考虑产品实测值和企业标准对产品粒度的要求以及测定过程中的合理损耗，我们认为粒度要求设置为 2.0 mm 标准筛通过率 $\geq 95\%$ （仅适用于粉状产品）的要求是合适的。

表 7 饲料添加剂粪肠球菌产品水分和粒度实际检测值

样品编号	水分 (%)	粒度 (2.0 mm 标准筛通过率)
1	8.5	100%
2	5.2	100%
3	10.05	100%
4	11.23	100%
5	7.66	100%
6	4.2	100%
7	9.8	100%
8	10.6	100%
9	12.0	100%
10	8.35	100%
11	7.62	100%

(6) 卫生指标的编制依据

载体和稀释剂品种来自《饲料原料目录》^[7]或《饲料添加剂品种目录》，并符合《饲料卫生标准》（GB 13078-2017）中有毒有害物质及微生物的限量要求。卫生指标主要参考《饲料卫生标准》（GB 13078-2017）、《微生物饲料添加剂技术通则》（NY/T 1444-2007）、《饲料添加剂 枯草芽孢杆菌》（NY/T 2131-2012）、《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 酿酒酵母》（GB 7300.501-2021）、《饲料添加剂 第 5 部分：微生物 植物乳杆菌》（GB

7300.502-2023)、《饲料添加剂 第5部分:微生物 屎肠球菌》(GB 7300.503-2023)、《饲料添加剂 第5部分:微生物 嗜酸乳杆菌》(GB 7300.504-2023)中关于卫生标准的相关规定,对产品卫生指标进行了限定(表9、表10)。我们根据《饲料中总砷的测定》(GB/T 13079-2006)、《饲料中铅的测定 原子吸收法光谱法》(GB/T 13080-2018)石墨炉原子吸收光谱法、《饲料中镉的测定方法》(GB/T 13082-1991)、《饲料中沙门氏菌的测定》(GB/T 13091-2018)、《饲料中霉菌总数测定方法》(GB/T 13092-2006)、《饲料中黄曲霉毒素B1的测定 酶联免疫吸附法》(GB/T 17480-2008)、《饲料中大肠菌群的测定》(GB/T 18869-2019)、《饲料中玉米赤霉烯酮的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》(GB/T 28716-2012)、《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》(GB/T 30956-2014)对5个样品的重金属及霉菌毒素含量的指标进行检测,并对9个样品的霉菌总数及沙门氏菌等相应指标进行检测,具体数据见表8、表9和表10。从产品的检测值看,仅有一个样品的砷含量高于标准限定值,2个样品的霉菌总数高于限定值;所有样品的大肠菌群小于等于限定值。综合考虑其他相关标准和产品的实际检测值数据,我们认为,本标准中卫生指标的设定值是合适的。

表8 饲料添加剂粪肠球菌产品的重金属和霉菌毒素含量实际检测值

编号	总砷, mg/kg	铅, mg/kg	汞, mg/kg	镉, mg/kg	黄曲霉毒素 B1, µg/kg	脱氧雪腐镰刀 菌烯醇(呕吐 毒素), mg/kg	玉米赤 霉烯酮, mg/kg
1	0.17	< 1	< 0.005	< 0.01	< 0.5	< 1	< 0.1
3	< 0.01	< 1	< 0.005	< 0.01	< 0.5	< 1	< 0.1
6	0.03	< 1	< 0.005	< 0.01	< 0.5	< 1	< 0.1
8	0.96	< 1	< 0.005	< 0.01	< 0.5	< 1	< 0.1
10	2.55	< 1	< 0.005	< 0.01	< 0.5	< 1	< 0.1
本标准 设定值	≤2.0	≤5.0	≤0.1	≤0.5	≤10	≤2	≤0.5

表9 饲料添加剂粪肠球菌产品的霉菌、致病菌的检测结果

编号	霉菌总数, CFU/g	沙门氏菌, 25 g
1	3.5×10 ⁴	未检出
2	2.1×10 ⁴	未检出
3	6.6×10 ³	未检出

4	1.8×10^2	未检出
5	4.6×10^2	未检出
6	1.7×10^2	未检出
7	100.0	未检出
8	3.3×10^3	未检出
9	5.0×10^2	未检出
本标准设定值	$\leq 1.0 \times 10^4$	不得检出

表 10 饲料添加剂粪肠球菌产品的大肠菌群检测结果

编号	大肠菌群 (MPN/g)
1	< 3.0
2	5.0
3	7.8
4	7.4
5	< 3.0
6	< 3.0
7	4.2
8	< 3.0
9	< 3.0
10	10
11	9.3
本标准设定值	≤ 10

(7) 安全性的编制依据

肠球菌属中的某些种通常含有致病基因，其中屎/粪肠球菌是典型的多种毒力基因携带者。肠球菌是一种重要的院内感染菌，能在人类和动物之间水平传播，不仅引起复杂的耐药机制使肠球菌在治疗时显得十分棘手，而且其携带的众多毒力因子也是肠球菌难以得到控制的原因。目前已发现肠球菌毒力因子包括Cyl、AS、esp、efaA、hyl、EF0591、gelE等17种。这些毒力因子有的与生物膜形成相关，有的与心内膜炎、腹膜炎感染相关，有的能增强肠球菌对环境的应激能力。不同的毒力因子在肠球菌的致病性中起着不同的作用，并且很多毒力因子的致病机理现在仍不清楚。EFSA在2014年制订的用于动物营养的屎肠球菌安全性评价的指南性文件（EFSA，2014）中提出了屎肠球菌对氨苄青霉素的抗性检测以及相关毒力因子检测方法：（1）首先对待测菌株进行分子生物学鉴定，属于屎肠球菌进行接下来的评价；（2）采用梯度2倍稀释的方法，测定氨苄青霉素对该菌的最小抑菌浓度（Minimum Inhibitory Concentration, MIC），同时还要包括阳性对照菌株；测定的方法可以参考欧盟委员会抗菌

药物敏感性试验（EUCAST, European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing）、美国临床和实验室标准协会（CLSI, the Clinical and Laboratory Standard Institute）制定的需氧菌的稀释法抗菌药物敏感试验和国际标准化组织的标准（ISO standard, International Standardization Organization, standard）等；若MIC>2 mg/L，则不安全；若MIC≤2 mg/L，还需要检测与抗生素抗性和毒性有关的三个元件：IS16、Esp和hyl-like gene；如果有条件可以进行全基因组测序，包括染色体和质粒，来检测这三个元件；（3）若三个元件都没有检测到，则被认为是安全的，若有1个或多个被检测到，则被认为是不安全的。粪肠球菌与屎肠球菌同属于肠球菌属，实际应用中也会有携带毒力基因的潜在风险，而且我们在市场调研时，很多企业也反映由于行业中都知道粪肠球菌的这种安全性风险，致使粪肠球菌饲料添加剂产品的应用受到了限制。我们根据此安全性评估指南和国际标准ISO 20776-1:2006^[32]中对MIC值检测的要求和方法，检测了从采集样品中分离出来的粪肠球菌菌株对氨苄青霉素的MIC值（见表11）。经检测，各产品菌株对氨苄青霉素的MIC值均≤2 mg/L。

另外，我们对粪肠球菌中三个病原菌标志基因IS16、*esp*和*hylEfm*的表达进行了PCR检测。三个基因的引物序列如表12。经检测，所有样品中的三种病原菌标志基因IS16、*esp*和*hylEfm*均为阴性，即未得到条带。但因为安全性评估指南中推荐检测三种基因时，应以三种基因阳性菌DSMZ 25390和三种基因阴性菌DSMZ 25389分别作为阳性和阴性对照菌株，需从国外进口，涉及安全性问题，很难购买到。考虑到我们检测样品中三种基因均为阴性，且标志基因检测可行性较低，故在本标准中，未将三种病原菌标志基因IS16、*esp*和*hylEfm*的检测列为标准中的检测项目。

参考国际标准和相关安全性评估指南，我们将粪肠球菌的安全性指标设置为对氨苄青霉素的最低抑菌浓度（MIC）≤2 mg/L。

表11 粪肠球菌菌株对氨苄青霉素的最低抑菌浓度（MIC，mg/L）

编号	MIC 值
1	1.0
2	1.0
3	1.0
4	2.0
5	2.0
6	1.0
7	2.0
8	2.0
9	2.0

10	1.0
11	2.0

表12 粪肠球菌标志基因IS16、*esp*和*hlyEfm*引物序列

引物名称	引物序列	合成基因片段大小 (bp)	序列来源
IS16-F	CATGTTCCACGAACCAGAG	547	EFSA Journal 2012;10(5):2682
IS16-R	TCAAAAAGTGGGCTTGCC		
<i>esp</i> -F	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG	510	J Clin Microbiol, 2004, 42(10):4473-4479
<i>esp</i> -R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG		
<i>hlyEfm</i> -F	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276	J Clin Microbiol, 2004, 42(10):4473-4479
<i>hlyEfm</i> -R	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA		

(8) 贮存和保质期的编制依据

益生菌要发挥作用，保持活性非常重要。然而，乳酸菌的抗逆性较差，如果不经过有效活性保护，其生产、销售、储存和饲料加工等过程中，活菌死亡将会非常严重。尤其在常温储存环境下，不同产品活菌存活率变化非常大。因此，为了保证乳酸菌质量、尤其保证活菌含量，运输、储存条件和保质期对产品质量保证非常重要。

卫生部发布的《食品安全国家标准 预包装食品标签通则》（GB 7718-2011）^[33]中，对产品保质期进行了定义：“预包装食品在标签指明的贮存条件下，保持品质的期限。在此期限内，产品完全适于销售，并保持标签中不必说明或已经说明的特有品质”。

参考以上标准中对保质期的定义，我们在本标准中规定保质期为“未开启包装的产品，在规定的运输、贮存条件下，产品保质期与标签中标明的保质期一致”。

三、与有关法律、行政法规和其他强制性标准的关系，配套推荐性标准的制定情况

在本标准的修订过程中严格遵守国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准，与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调性原则。

四、与国际标准化组织、其他国家或者地区有关法律法规和标准的对比分析

1、对于饲料添加剂粪肠球菌的产品标准，尚无相应的国际标准可比较。

2、本标准的安全性标准参考欧洲食品安全局（EFSA）动物饲料添加剂和饲料产品委员会（FEEDAP）的饲用屎肠球菌的安全性评估指南（Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition, EFSA Journal, 2012,10(5):2682-2691）设置。参考国际标准和相关安全性评估指南，我们将粪肠球菌的安全性指标也设置为对氨苄青霉素的最低抑菌浓度（MIC） ≤ 2 mg/L。

五、重大分歧意见的处理过程、处理意见及其依据

无

六、对强制性国家标准自发布日期至实施日期之间的过渡期（以下简称过渡期）的建议及理由

本标准规定了饲料添加剂粪肠球菌的技术要求、采样、检验规则、标签、包装、运输、贮存和保质期，描述了相应的试验方法。在过渡期期间，对已生产产品库存销售和已经印刷的包装材料消耗；产品标签重新根据标准进行修改设计印刷，并与供应商沟通确认；与下游客户沟通修改质量规格协议，修订相关的合同内容。根据企业情况评估是否需要购进或改进技术装备、检测手段等，以配合产品的质量达标或达到相关检测要求，整个改造完成大概需要一年左右。因此，建议自发布日期至实施日期之间的过渡期为 12 个月。

七、与实施强制性国家标准有关的政策措施

根据《强制性国家标准管理办法》第九条，县级以上人民政府标准化行政主管部门和有关行政主管部门依据法定职责，对强制性国家标准的实施进行监督检查。根据《饲料和饲料添加剂管理条例》第三条规定，国务院农业行政主管部门负责全国饲料、饲料添加剂的监督管理工作。县级以上地方人民政府负责饲料、饲料添加剂管理的部门（以下简称饲料管理部门），负责本行政区域饲料、饲料添加剂的监督管理工作。第四条，县级以上地方人民政府统一领导本行政区域饲料、饲料添加剂的监督管理工作，建立健全监督管理机制，保障监督管理工作的开展。

违反该强制性国家标准的行为，依据第 609 号国务院令《饲料和饲料添加剂管理条例》中“第四章 法律责任”、农业农村部公告第 2625 号《饲料添加剂安全使用规范》、主席令 2000 年第 33 号《中华人民共和国产品质量法》中“第四章 损害赔偿”和“第五章 罚则”和主席令第 11 号《中华人民共和国标准化法》中“第五章 法律责任”等相关法律法规相关条款进行处理。

八、是否需要对外通报的建议及理由

国内企业生产的粪肠球菌产品会有到国外流通的需求，按照世界贸易组织（WTO）的 TBT 规则，为保证产品公正、公平进行贸易，同时依据《强制性国家标准管理办法》要求，

建议对外通报。本标准已于 年 月 日~ 年 月 日完成 WTO 成员国官方通报，结果无异议。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、涉及专利的有关说明

无。

十一、强制性国家标准所涉及的产品、过程或者服务目录

本标准涉及以粪肠球菌为菌种，经液态或固态发酵、干燥等工艺后制得的饲料添加剂产品。本文件适用于以中华人民共和国农业农村部公告《饲料添加剂品种目录》中规定的粪肠球菌产品。

十二、其他应予说明的事项

无。

附 件

附件 1 饲料添加剂粪肠球菌产品企业标准清单。

序号	区域	省份	公司名称	标准名称	菌种名称	活菌数	水分(%)	粒度 (mm, 通过率 100%)	保质要求	保质期
1	东北	辽宁	大连三仪动物药品有限公司	Q/DSYT001-2023 《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^7$	≤ 10	0.425 (90%通过率)	阴凉、干燥	24 个月
2	华北	河北	河北宝典药业有限公司	Q/HBDBDDM09-2022 《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^7$	≤ 12	1.25	阴凉、干燥	12 个月
3	华东	江苏	江苏纳克生物工程有 限公司	Q/320830BS013-2021 《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 5 \times 10^8$	≤ 10	3.0	阴凉、干燥	18 个月
4			江苏三仪生物工程有 限公司	Q/320382SYSW01-2023 《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 5 \times 10^8$	≤ 10	0.84	阴凉、干燥	24 个月
5			江苏苏微生态科技有 限公司	Q/320691WAC03-2021 《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 5 \times 10^8$	≤ 9	3.5	阴凉、干燥	12 个月
6			淮安香兰金土地生物	Q/320830JTD119-2023	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^9$	≤ 12.5	3.5	阴凉、	24 个月

			技术有限公司	《饲料添加剂 粪肠球菌》					干燥	
7			淮安香兰金土地生物技术有限公司	Q/320830JTD130-2023 《液体饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^9$	—	—	阴凉、干燥	12 个月
8		福建	厦门昶科生物工程有限公司	Q/XMCK025-2023《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^8$	≤ 10	1.7（90%通过率），2.36（98%通过率）	通风、干燥	24 个月
9			厦门葵星生物科技有限公司	Q/XMKX10008-2019《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^8$	无	1.4（90%通过率），2（98%通过率）	通风、干燥	24 个月
10		山东	山东得和明兴生物科技有限公司	Q/370786YMX015-2023 《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^9$	≤ 10	0.9	阴凉、干燥	12 个月
11			山东汉和集美生物科技有限公司	Q/37082SHH047-2021 《液态粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 5 \times 10^8$	—	—	阴凉、干燥	12 个月
12			山东蔚蓝生物科技有限公司	Q/371621SLH013-2023 《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^9$	≤ 12	0.9	阴凉、干燥	6 个月
13			青岛百奥安泰生物科	Q/370212BAAT023-202	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^7$	—	—	通风、	6 个月

			技有限公司	3《饲料添加剂 液态粪肠球菌》					干燥	
14	华中	河南	河南金百合生物科技 股份有限公司	Q/HJBH1009-2023《饲料 添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 5 \times 10^7$	≤ 10	0.841	阴凉、 干燥	12个月
15			河南金百合生物科技 股份有限公司	Q/HJBH1042-2023《饲料 添加剂 液态粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^8$	—	—	阴凉、 干燥	12个月
16			河南省晨源生物科技 有限公司	Q/HCY105-2023《饲料添 加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^{10}$ (固 态) $\geq 1 \times 10^9$ (液 态)	≤ 12	2.0	阴凉、 干燥	固态产 品 12个 月、液体 产品 6 个月
17			焦作市佰役安生物工 程有限公司	Q/BYA007-2023《饲料添 加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^6$	≤ 10	3.0	阴凉、 干燥	12个月
18			焦作市佰役安生物工 程有限公司	Q/BYA027-2023《饲料添 加剂 液态粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^6$	—	—	阴凉、 干燥	12个月
19			贝多利(河南)生物 工程有限公司	Q/BDL002-2023《饲料添 加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 5 \times 10^7$	≤ 12	1.0	阴凉、 干燥	12个月
20		湖北	湖北华扬科技发展有 限公司	Q/HYKJ08-2021《饲料添 加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 2 \times 10^{10}$	≤ 10	0.42(90%通过 率)	阴凉、 干燥	12个月
21			湖北凌卓微生物科技	Q/LZB05-2017《饲料添	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^{10}$	≤ 8	0.84(90%通过	阴凉、	24个月

			有限公司	加剂 粪肠球菌》				率)	干燥	
22			安琪酶制剂(宜昌)有限公司	Q/AQMZJ0031-2023《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 2 \times 10^{10}$	≤ 10	1.19	阴凉、干燥	12个月
23			武汉合缘绿色生物股份有限公司	Q/WHY 11-2018《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 2 \times 10^8$	≤ 10	0.42(90%通过率)	阴凉、干燥	6个月
24			武汉绿富科技有限公司	Q/LVFU103-2019《粪肠球菌制剂》	粪肠球菌	$\geq 3 \times 10^9$	无	无	阴凉、干燥	24个月
25	华南	广东	广东富农动物药业有限公司	Q/GDFN40-2023《粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 5.5 \times 10^8$	≤ 12	无	阴凉、干燥	24个月
26			广东海纳川生物科技股份有限公司	Q/(GD)HNCA21-2023《饲料添加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^8$	≤ 10	无	通风、干燥、避光	12个月
27			广东牧之林药业有限公司	Q/GDMZL26-2023《粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 5.5 \times 10^8$	≤ 12	无	阴凉、干燥	24个月
28			海南弘奇生物科技有限公司	Q/HNHQ007-2017《粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^{10}$	≤ 12	1.19	阴凉、干燥	24个月
29	西南	四川	成都三阳科技实业有限公司	Q/63315706-7.201-2020《粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^8$	≤ 12	无	阴凉、干燥	6个月
30		云南	云南博仕奥生物技术	Q/YBS011-2023《饲料添	粪肠球菌	$\geq 2 \times 10^9$	≤ 10	0.85(95%通过	阴凉、	12个月

			有限公司	加剂 粪肠球菌》				率)	干燥	
31			昆明爱科特生物科技 有限公司	Q/KAK24-2023《饲料添 加剂 粪肠球菌》	粪肠球菌	$\geq 1 \times 10^8$	≤ 10	2.0 (95%通过 率)	阴凉、 干燥	与标签 标示一 致