



中华人民共和国国家标准

GB 7300.50X-XXXX

饲料添加剂 第5部分：微生物 粪肠球菌

Feed additives —Part 5: Live microorganisms —*Enterococcus faecalis*

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

定向征求意见稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 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。

本文件为 GB 7300《饲料添加剂》的第 50X 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（GB7300.101）；
- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 甘氨酸（GB7300.102）；
- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 蛋氨酸羟基类似物（GB7300.103）；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 *L*-抗坏血酸-2-磷酸酯盐（GB7300.201）；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 维生素 D3 油（GB7300.202）；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 甜菜碱（GB7300.203）；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 甜菜碱盐酸盐（GB7300.204）；
- 第 3 部分：矿物元素及其络（螯）合物 碘化钾（GB7300.301）；
- 第 3 部分：矿物元素及其络（螯）合物 亚硒酸钠（GB7300.302）；
- 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 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 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 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（斑螯黄）（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）。

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个大类：

- 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。

本文件的产品粪肠球菌属于第5大类微生物，因粪肠球菌是此大类第X个发布的产品标准，所以本文件以GB 7300.50X编号，作为GB 7300的第50X部分。

饲料添加剂 第5部分：微生物 粪肠球菌

1 范围

本文件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。

本文件适用于以粪肠球菌为菌种，经液态或固态发酵、干燥等工艺后制得的饲料添加剂产品。

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 13078	饲料卫生标准
GB/T 42959	饲料微生物检验 采样
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	饲料中沙门氏菌的检测方法
GB/T 13092	饲料中霉菌总数测定方法
GB/T 13093	饲料中细菌总数的测定
GB/T 17480	饲料中黄曲霉毒素 B ₁ 的测定 酶联免疫吸附法
GB/T 18869	饲料中大肠菌群的测定
GB/T 28716	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 30956	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 4789.35	食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验
SN/T 0475	出口商品中粪链球菌群检验方法
GB/T34224	生物产品中功能性微生物检测》
GB 7300.501-2021	饲料添加剂 第5部分：微生物 酿酒酵母
GB 7300.502-2023	饲料添加剂 第5部分：微生物 植物乳杆菌
GB 7300.503-2023	饲料添加剂 第5部分：微生物 屎肠球菌
GB 7300.504-2023	饲料添加剂 第5部分：微生物 嗜酸乳杆菌
ISO 20776-1:2006	临床实验室测试和体外诊断测试系统-传染性病原体及药敏设备性能评估的敏感性试验 第1部分：抗菌药物的体外活性检测方法（Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic

test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*

属于细菌界厚壁菌门芽孢杆菌纲乳杆菌目肠球菌科肠球菌属，为革兰氏阳性球菌。

4 技术要求

4.1 原料

载体和稀释剂品种来自《饲料原料目录》或《饲料添加剂品种目录》，并符合GB 13078中有毒有害物质及微生物的限量要求。

4.2 外观与性状

产品为粉末或颗粒，形态、色泽均匀一致，无异物，无异臭味。

4.3 菌种

应符合粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）的形态、生理生化和分子生物学特性。

4.4 理化指标

理化指标应符合表1的要求。

表1 理化指标

项目	指标
粪肠球菌活菌计数/（CFU/g） ^a	$\geq 1.0 \times 10^9$
水分/（%）	≤ 12.0
细度（2.0 mm 标准筛通过率）/（%） ^b	≥ 95
^a 活菌数以每克产品中菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。	
^b 仅适用于粉状产品。	

4.5 卫生指标

卫生指标应符合表2的要求。

表2 卫生指标

项目	指标
总砷/（mg/kg）	≤ 2.0

铅/ (mg/kg)	≤ 5.0
汞/ (mg/kg)	≤ 0.1
镉/ (mg/kg)	≤ 0.5
黄曲霉毒素 B ₁ / (μg/kg) ^a	≤ 10.0
脱氧雪腐镰刀菌烯醇/ (mg/kg) ^a	≤ 1.0
玉米赤霉烯酮/ (mg/kg) ^a	≤ 0.1
大肠菌群/ (MPN/g)	≤ 10
霉菌总数/ (CFU/g)	≤ 1.0×10 ⁴
沙门氏菌/ (25 g)	不得检出
^a 此类指标仅适用于植物性载体生产的产品。 表中所列限量，除特别注明外均以干物质含量 88%为基础计算（大肠菌群、霉菌总数、沙门氏菌除外）。	

4.6 粪肠球菌的氨苄青霉素敏感性

粪肠球菌对氨苄青霉素的最低抑菌浓度（MIC）≤2 mg/L。

5 采样

按照 GB/T 42959《饲料微生物检验 采样》的规定执行。

6 试验方法

6.1 外观与性状

取适量试样置于干净白色纸片上，在自然光下观察其形态、色泽、有无异物，嗅其气味。

6.2 粪肠球菌鉴定

按附录A规定的方法测定。

6.3 活菌计数

按附录B规定的方法测定。若为包被粪肠球菌产品，应提供溶解方法。

6.4 水分

按GB/T 6435规定的方法测定。

6.5 粒度

按GB/T 5917.1规定的方法测定。

6.6 总砷（以 As 计）

按GB/T 13079规定的方法测定。

6.7 铅（以 Pb 计）

按GB/T 13080规定的方法测定。

6.8 汞（以 Hg 计）

按GB/T 13081规定的方法测定。

6.9 镉（以 Cd 计）

按GB/T 13082规定的方法测定。

6.10 黄曲霉毒素 B1

按GB/T 17480规定的方法测定。

6.11 脱氧雪腐镰刀菌烯醇（呕吐毒素）

按GB/T 30956规定的方法测定。

6.12 玉米赤霉烯酮

按GB/T 28716规定的方法测定。

6.13 霉菌总数

按GB/T 13092规定的方法测定。

6.14 大肠菌群

按GB/T 18869规定的方法测定。

6.15 沙门氏菌

按GB/T 13091规定的方法测定。

6.16 氨苄青霉素 MIC 值

按ISO 20776-1:2006规定的方法测定。

7 检验规则

7.1 组批

以相同菌株、相同的原料、相同的生产工艺，经连续生产或同一班次生产的同一规格的产品为一批，但每批产品不应超过50 t。

7.2 出厂检验

外观与性状、粪肠球菌活菌数、水分为出厂检验项目。

7.3 型式检验

型式检验项目为本文件第4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。在有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

a) 产品定型投产时；

b) 生产工艺、配方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) 管理部门提出检验要求时。

7.4 判定规则

7.4.1 所验项目全部合格，判定为该批次产品合格。

7.4.2 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。复检结果即使有一项指标不符合本文件规定，则判定该批产品不合格。卫生指标中的微生物指标不得复检。

7.4.3 除微生物指标外，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、贮存、保质期

8.1 标签

标签应符合 GB 10648 的规定。

8.2 包装

包装材料应清洁卫生、无毒无害、并能防污染、防潮湿、防泄漏。

8.3 运输

运输工具应清洁卫生、能防暴晒、防雨淋，不应与有毒有害的物品混装混运。

8.4 贮存

应贮存于干燥、阴凉、通风处，防止日晒、雨淋，不应与有毒有害物质混贮。

8.5 保质期

未开启包装的产品，在规定的运输、贮存条件下，产品保质期与标签中标明的保质期一致。

附 录 A
(规范性)
粪肠球菌菌种鉴别方法

A.1 形态鉴别

A.1.1 肠球菌选择性培养基 (KF 链球菌琼脂)

A.1.1.1 成分

月示蛋白胨	10.0g
麦芽糖	20.0g
酵母浸膏	10.0g
甘油磷酸钠	10.0g
氯化钠	5.0g
乳糖	1.0g
琼脂	13.0g
溴甲酚紫	0.015g
叠氮化钠	0.4g
2,3,5-氯化三苯四氮唑	0.1g
蒸馏水	1000mL

A.1.1.2 制法

将所有成分加入蒸馏水中，煮沸溶解，补足蒸馏水至 1000 mL，于 25℃时调节 pH 至 7.2±0.2，分装于适宜容器中，煮沸 5 min，冷至 50℃左右，倾入无菌平皿，备用。

A.1.2 菌落选择

用接种针或接种环随机挑取 5 个菌落。

A.1.3 菌体染色及形态检验

革兰氏染色阳性。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。

A.1.4 菌落形态

在肠球菌选择性培养基 (KF 链球菌琼脂) 上菌落生长形态特征为：暗红色至粉红色，边缘整齐、表面光滑、圆形。

A.2 生理生化特征

粪肠球菌生理生化特征见表 A.1。

表 A.1 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。			

A.3 分子生物学鉴定

采用核酸序列分析法对菌株 rRNA 基因中 16S rRNA 全基因序列进行分析，与 GenBank 等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，序列差异小于 1%，则判定该菌株为粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）。

附 录 B
(规范性)
粪肠球菌活菌计数

B.1 试剂

B.1.1 KF 链球菌琼脂培养基

成分和制法同附录 A.1.1.1 和 A.1.1.2.

B.1.2 生理盐水

B.1.2.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1000 mL

B.1.2.2 制法

将氯化钠加入蒸馏水中，搅拌溶解，分装，121 °C高压灭菌 15 min。

B.2 样品制备

称取25.0 g样品，加入225 mL无菌生理盐水（对于包被产品，可采用厂家提供的方法进行预处理）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0.1 mL合适浓度稀释液，注入已经制备好的KF链球菌琼脂平板内，使用涂布棒尽可能小心快速地涂布接种液于琼脂表面，涂布棒不得接触平皿边缘，每个稀释度做两个平板。涂布后，将平板静置10 min使接种物完全被培养基吸收。倒置平板于37°C±1°C培养箱中培养48 h±2 h。空白对照至少为2个，以无菌溶剂代替同等质量的样品。

B.3 菌落计数

选取 B.2 中适宜的稀释度、菌落数在 30 CFU~300 CFU 个之间的平板进行计数。计算方法和结果输出按照 GB/T 13093 执行。

参 考 文 献

- [1] 《饲料原料目录》（中华人民共和国农业农村部公告）
 - [2] 《饲料添加剂品种目录》（中华人民共和国农业农村部公告）
-