



中华人民共和国国家标准

GB 7300.503—2023



饲料添加剂 第5部分：微生物 屎肠球菌

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

2023-05-23 发布

2024-06-01 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 503 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(GB 7300.101)；
- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 甘氨酸(GB 7300.102)；
- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 蛋氨酸羟基类似物(GB 7300.103)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 L-抗坏血酸-2-磷酸酯盐(GB 7300.201)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 维生素 D₃ 油(GB 7300.202)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 甜菜碱(GB 7300.203)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 甜菜碱盐酸盐(GB 7300.204)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 碘化钾(GB 7300.301)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 亚硒酸钠(GB 7300.302)；
- 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(斑蝥黄)(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。

本文件的产品屎肠球菌属于第 5 大类微生物,因屎肠球菌是此大类第 3 个发布的产品标准,所以本文件以 GB 7300. 503 编号,作为 GB 7300 的第 503 部分。

饲料添加剂

第5部分:微生物 屎肠球菌

1 范围

本文件规定了饲料添加剂屎肠球菌的技术要求、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。

本文件适用于以屎肠球菌为菌种,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 13079 饲料中总砷的测定

GB/T 13080—2018 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

GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定

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 B₁ 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

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

屎肠球菌 *Enterococcus faecium*

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，菌体卵圆形，主要成对偶尔成短链，无芽孢，多数不运动，厌氧或兼性厌氧，化能异养，发酵产 L(+) - 乳酸，但不产气。

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

菌种应符合屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)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
屎肠球菌活菌计数 ^a /(CFU/g)	$\geq 1.0 \times 10^9$
水分/%	≤ 10.0
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 ^a /(μg/kg)	≤ 10.0

表 2 卫生指标 (续)

项目	指标
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 ^a /(mg/kg)	≤ 1.0
玉米赤霉烯酮 ^a /(mg/kg)	≤ 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
表中所列限量,除特别说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)	
^a 此类指标仅适用于植物性载体生产的产品。	

4.6 屎肠球菌的氨苄青霉素敏感性

屎肠球菌对氨苄青霉素的最低抑菌浓度(MIC)小于或等于 2 mg/L。



5 采样

5.1 采样原则

样品的采集应遵循随机性、代表性的原则,采样过程应遵循无菌采样要求,防止一切可能的外来污染。

5.2 采样方法

5.2.1 应在同一批次产品中采集样品,每件样品的采样量应满足微生物指标检验的要求,一般不少于 500 g。

5.2.2 独立包装小于或等于 500 g 的产品,取完整包装。

5.2.3 独立包装大于 500 g 的产品,应用无菌采样器从同一包装的不同部位分别采取适量样品,放入同一个无菌采样容器内作为一件样品。

5.3 采集样品的贮存和运输

5.3.1 应尽快将样品送往实验室检验。

5.3.2 应在运输过程中保持样品完整。

5.3.3 应在接近原有贮存温度条件下贮存样品,或采取必要措施防止样品中微生物数量的变化。

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 屎肠球菌鉴定

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。若为包被屎肠球菌产品,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—2018 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

以相同材料、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、尿肠球菌活菌计数、水分为出厂检验项目。

7.3 型式检验

型式检验项目为第 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。在有下情况之一时,也应进行型式检验:

- 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,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)
屎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(胆汁七叶苷叠氮钠琼脂)

A.1.1.1 成分

胰蛋白胨	17.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
酵母浸粉	5.0 g
牛胆粉	10.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸钠	1.0 g
七叶苷	1.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
叠氮化钠	0.25 g
琼脂	13.5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.1 ± 0.2

A.1.1.2 制法

将所有成分加入蒸馏水中,加热不断搅拌,煮沸使琼脂完全溶解,121 °C 高压灭菌 15 min。临用时加热使培养基熔化,冷却至 45 °C~50 °C 时使用。

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,大小为 $(0.6\ \mu\text{m}\sim 2.0\ \mu\text{m})\times(0.6\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \mu\text{m})$ 多数成对或成短链。无芽孢,无明显荚膜,通常不运动。

A.1.4 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。

A.2 生理生化特征

屎肠球菌生理生化特征见表 A.1。

表 A.1 屎肠球菌生理生化特征

试验项目		结果
6.5% NaCl		+
pH 9.6		+
0.04% 硝酸盐		-
0.02% 叠氮化钠		+
碳水化合物 (4种)反应	麦芽糖	+
	七叶苷	+
	丙酮酸	-
	L-阿拉伯糖	+
注：“+”表示为 90% 以上的菌株为阳性反应；“-”表示 90% 以上菌株为阴性反应。		

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 ATCC19434 的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较,序列差异小于 1%,则判定该菌株为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)。



附 录 B
(规范性)
尿肠球菌活菌计数

B.1 试剂**B.1.1 MRS 培养基****B.1.1.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	5.0 g
酵母粉	4.0 g
葡萄糖	20.0 g
吐温 80	1.0 mL
磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)	2.0 g
乙酸钠($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)	5.0 g
柠檬酸三铵	2.0 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 g
硫酸锰($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05 g
琼脂粉	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	6.2±0.2

**B.1.1.2 制法**

将各成分加入蒸馏水中,加热不断搅拌,煮沸使琼脂完全溶解,115 ℃高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热使培养基熔化,冷却至 45 ℃~50 ℃时使用。

B.1.2 生理盐水**B.1.2.1 成分**

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

B.1.2.2 制法

将氯化钠加入蒸馏水中,搅拌溶解,分装,121 ℃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,再将样品用无菌溶剂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,注入无菌平皿,每个稀释度做两个平皿。将融化并冷却至 45 ℃~50 ℃的 MRS 培养基,向每个培养皿中倒入 15 mL~20 mL,摇匀并凝固,制成相应培养基的琼脂平板。36 ℃ ± 1 ℃倒置培养 24 h~48 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、菌落在 30 CFU~300 CFU 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)
-