《饲料添加剂 屎肠球菌》

（送审稿）

标准编制说明

**目 录**

[一、标准制定背景及任务来源 3](#_Toc3010_WPSOffice_Level1)

[二、主要工作过程 4](#_Toc8019_WPSOffice_Level1)

[三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据 5](#_Toc5137_WPSOffice_Level1)

[四、采用国际标准 18](#_Toc12054_WPSOffice_Level1)

[五、与现行法律法规和强制性标准的关系 18](#_Toc21239_WPSOffice_Level1)

[六、重大分歧意见的处理经过和依据 18](#_Toc9848_WPSOffice_Level1)

[七、标准作为强制性或推荐性标准的意见 18](#_Toc21690_WPSOffice_Level1)

[八、贯彻标准的要求和措施建议 18](#_Toc23830_WPSOffice_Level1)

[九、废止现行有关标准的建议 18](#_Toc8780_WPSOffice_Level1)

[十、其他应予说明的事项 18](#_Toc12476_WPSOffice_Level1)

[附件1 企业标准清单 19](#_Toc16481_WPSOffice_Level1)

**一、标准制定背景及任务来源**

1. **任务来源**

本标准由中华人民共和国农业农村部提出并归口；项目编号：20140211-Q-469；由国家粮食和物资储备局科学研究院承担该项目的制定工作。

1. **制定背景**

**（1）屎肠球菌的生物学特性**

屎肠球菌（*Enterococcus faecium*）是革兰氏阳性球菌，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。菌落形态呈卵圆形，在其培养过程中会产生大量的乳酸，是一种厌氧或兼性厌氧的乳酸菌，广泛分布于人体和动物肠道中，是肠道中的正常菌群。

**（2）饲料添加剂屎肠球菌产品的生产工艺流程**

目前屎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：菌种接种掊养→种子罐培养→生产罐培养→排放培养液，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机头，确保生产过程符合GMP要求。屎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。材料多采用进口304、1cr18Ni9Ti组成。种子罐有碳钢制种子罐、不锈钢制种子罐两种。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、詹氏乳杆菌、瑞士乳杆菌等）；b. 双歧杆菌类（如长双歧杆菌、短双歧杆菌、卵形双歧杆菌、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。

2016年全球益生菌市场规模为246亿美元，其中中国市场约占45亿美元（约350亿元人民币）。目前全球益生菌食品的种类超过500种，并且还在迅速增加。到2020年，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。屎肠球菌，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5亿元人民币的销售额。目前，随着益生菌细分市场不断完善，屎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，屎肠球菌的市场份额有扩大之势。

**（5）制定饲料添加剂屎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。屎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和抑制有害菌的特性，且是肠道内的常驻菌，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。我国目前没有相应的产品标准。因此，制定饲料添加剂屎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。

**二、主要工作过程**

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，以使该标准能与最先进标准接轨。另外，本项标准制定单位分别对北京、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屎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 屎肠球菌》国家标准征求意见稿。

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，为该类产品设置具有适当“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。

标准研制工作进度详见表1。

表1 标准研制工作进度表

|  |  |
| --- | --- |
| 时间区段 | 工作内容 |
| 2014.7.1-2014.8.30 | 成立工作小组，收集、查阅国内外相关资料、标准信息。 |
| 2014.8.1-2014.9.30 | 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。 |
| 2014.7.1-2014.10.30. | 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。试验论证和验证阶段。 |
| 2014.11.4-2015.1.30 | 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。 |
| 2015.2.5-2015.4.30 | 广泛征求科研、生产、经营、质检及消费者的意见。 |
| 2015.5.1-2015.7.30 | 修改标准文本草稿，形成征求意见稿。新方法尝试。 |
| 2015.8.1-2015.10.20 | 再次国外内资料收集，企业电话访问。形成二次修改稿 |
| 2015.10.29 | 专家论证会。 |
| 2015.12.1-2017.11.30 | 征求意见，组织预审会，完善标准内容等。 |
| 2017.11.30 | 预审会，提出14项修改意见。 |
| 2017.12.1-2018.4.12 | 根据预审会意见对标准进行了修改，形成送审稿，送送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。 |
| 2018.4.27 | 第一次终审，共邀请14位专家对送审稿进行了审查，提出13项修改意见，意见主要是关于补充实验数据等问题，标准起草人采纳全部意见，并据此对送审稿进行修改，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处后再次审查。 |
| 2018.9.5 | 召开专家论证会。补充安全性及保质期相关材料 |
| 2018.4.28-2019.3.26 | 根据专家意见补充试验数据，完善标准内容。 |

1. **标准编制原则和主要技术内容确定的依据**
2. **标准编制原则**

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》、GB/T 20001.10-2015《标准编写规则第10部分：产品标准》的规定进行的编制。

1. **主要技术内容确定的依据**

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 4789.35-2010）、《饲料添加剂 嗜酸乳杆菌》（报批稿）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）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（附件1）或直接购买市场上销售产品等方式、收集采样。产品共来自19家相关生产企业。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“肠球菌”并在实物中确实含有屎肠球菌；c. 市场上有售，并具一定代表性。

**（2）饲料添加剂 屎肠球菌-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、及微生物和屎肠球菌的特性，本标准内容涵盖了饲料添加剂屎肠球菌的术语和定义、产品要求、试验方法、检验规则、判定规则、标签、包装、运输、储存、保质期的要求。

②综合考虑工艺特点、载体和稀释剂安全性等，本标准适用于经过发酵工艺、仅含屎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，我们仅收集到1个液态样品，该样品虽标识为单菌产品，但实际为混菌样品，且活菌数极低（< 106 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屎肠球菌。

③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。

**（3）饲料添加剂 屎肠球菌-活菌数的编制依据**

主要参考《食品微生物学检验 乳酸菌检验》（GB4789.35）对屎肠球菌产品活菌数进行检测。由收集到的20个样品的产品标识活菌数和实际初次检验活菌数（表2）可知，全部样品的标识浓度均≥ 1×109 CFU/g，且仅有2个样品（占比10%）的初检活菌数低于1×109 CFU/g。

从收集到的28个企业标准来看，仅有1个企业标准中有产品活菌数< 108 CFU/g，5家企业标准中有产品要求活菌数≥ 1×108 CFU/g，其余均要求活菌数≥ 1×109 CFU/g。所以，考虑到行业平均加工水平和市场实际情况，我们认为将屎肠球菌活菌数规定为≥ 1.0×109 CFU/g是合适的。因此，将屎肠球菌活菌数指标设置为≥ 1.0×109 CFU/g。

表2 饲料添加剂屎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 | 1×1010 | ≥ 1×1010 |
| 2 | -- | ≥ 1×109 |
| 3 | 1×1011 | ≥ 1×1011 |
| 4 | 1×1010 | ≥ 1×1010 |
| 5 | 1×1010 | ≥ 2×1010 |
| 6 | 1×1010 | ≥ 4×109 |
| 7 | 1×1010 | ≥ 1×1010 |
| 8 | 1×109 | ≥ 1×109 |
| 10 | -- | ≥ 1×109 |
| 11 | -- | ≥ 1×109 |
| 12 | 1×1011 | ≥ 1×1011 |
| 13 | 6×1011 | ≥ 6×1010 |
| 14 | 1×1011 | ≥ 1×1011 |
| 15 | 2.4×1010 | ≥ 1×1010 |
| 16 | 2×1010 | ≥ 2×1010 |
| 17 | 2×1010 | ≥ 1×1010 |
| 18 | 1×1011 | ≥ 1×1011 |
| 19 | 1×1010 | ≥ 1×107 |
| 20 | 1.2×109 | ≥ 4×108 |

注：--表示未检测。

**（4）饲料添加剂 屎肠球菌-水分和粒度的编制依据**

《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《饲料中水分和其他挥发性物质含量的测定》（GB/T 6435-2006）、《饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法》（GB/T 5917.1-2008）对14个样品中的水分和粒度（见表3）进行了测定，并对实测样品水分含量符合比例和企业标准中规定水分符合比例进行了统计（见表4）。24份规定了水分要求的企业标准中，有75%的企业要求水分≤ 10%（表4），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≤ 10%的要求是合适的。

22份规定了粒度要求的企业标准中，2家企业（占比9%）要求2~3 mm标准筛的通过率为90%，1家企业规定2.5 mm（8目）标准筛的通过率为100%，2家企业规定2 mm（10目）标准筛通过率为100%，其余企业100%标准筛通过率的粒度要求均≤ 1.25 mm（16目）。因此，综合考虑产品实测值和企业标准对产品粒度的要求，我们认为粒度要求设置为2.0 mm标准筛通过率≥ 95%（仅适用于粉状产品）的要求是合适的。

表3 饲料添加剂屎肠球菌产品水分和粒度实际检测值

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项目  编号 | 水分（%） | 粒度（2.0 mm标准筛通过率） |
| 1 | 5.30 | 100% |
| 2 | 6.00 | 100% |
| 3 | 5.61 | 100% |
| 4 | 6.81 | 100% |
| 5 | 6.94 | 100% |
| 6 | 9.57 | 100% |
| 7 | 6.85 | 100% |
| 8 | 7.24 | 100% |
| 9 | 7.35 | 100% |
| 10 | 7.91 | 100% |
| 11 | 7.62 | 100% |
| 12 | 10.32 | 100% |
| 13 | 8.96 | 100% |
| 14 | 7.90 | 100% |

表4 实测样品水分含量符合比例

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 水分含量（%） | 实测水分符合比例（%） | 企业标准规定水分符合比例（%） |
| ≤ 12 | 100.00 | 100.00 |
| ≤ 11 | 100.00 | 83.33 |
| ≤ 10 | 92.86 | 75 |
| ≤ 9 | 85.71 | 16.67 |
| ≤ 8 | 78.57 | 12.5 |
| ≤ 7 | 42.86 | 0.4 |

**（5）饲料添加剂 屎肠球菌-卫生指标的编制依据**

《饲料卫生标准》（GB 13078-2017）、《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）、《饲料添加剂 嗜酸乳杆菌（报批稿）》中关于卫生标准的相关规定，对产品卫生指标进行了限定。

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》（GB/T 13080）、《饲料中镉的测定方法》（GB/T 13082）、《饲料中沙门氏菌的检测方法》（GB/T 13091）、《饲料中霉菌总数测定方法》（GB/T 13092）、《饲料中黄曲霉毒素B1的测定 酶联免疫吸附法》（GB/T 17480）、《饲料中大肠菌群的测定》（GB/T 18869）、《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 28726）、《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）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、大肠菌群及沙门氏菌等相应指标进行检测，具体数据见表5、表6。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，1个样品的大肠菌群高于限定值。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5 饲料添加剂屎肠球菌产品的重金属和霉菌毒素含量实际检测值

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 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 | 0.27 | < 1 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 4 | < 0.01 | < 1 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 5 | 0.022 | < 1 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 8 | 1.59 | < 1 | < 0.005 | < 0.01 | < 0.5 | < 1 | < 0.1 |
| 10 | 2.03 | < 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6 饲料添加剂屎肠球菌产品的霉菌、致病菌的检测结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 霉菌总数，  CFU/g | 沙门氏菌，  25 g | 大肠菌群，  CFU/g | 金黄色葡萄球菌，  25 g | 志贺氏菌，25g |
| 1 | 4.6×104 | 未检出 | < 10 | 未检出 | 未检出 |
| 2 | 未检出 | 未检出 | 未检出 | 未检出 | 未检出 |
| 3 | 8.3×103 | 未检出 | 未检出 | 未检出 | 未检出 |
| 4 | 3.5×102 | 未检出 | 未检出 | 未检出 | 未检出 |
| 5 | 2.5×102 | 未检出 | 未检出 | 未检出 | 未检出 |
| 6 | 1.0×102 | 未检出 | 未检出 | 未检出 | 未检出 |
| 7 | 50.0 | 未检出 | 未检出 | 未检出 | 未检出 |
| 8 | 2.8×104 | 未检出 | 1.0×103 | 未检出 | 未检出 |
| 9 | 4.0×102 | 未检出 | 未检出 | 未检出 | 未检出 |
| 本标准设定值 | 1.0×104 | 不得检出 | 100 | -- | -- |

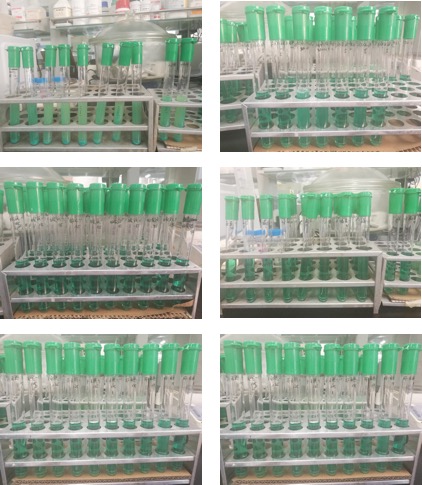
注：金黄色葡萄球菌、志贺氏菌检测未写入本标准；--表示未检测。

图1 部分样品大肠菌群检测结果

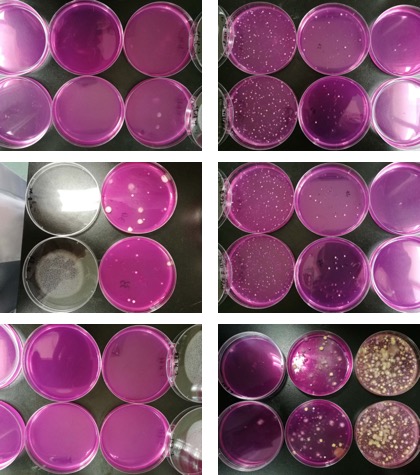


图2 部分样品霉菌检测结果

**（6）饲料添加剂 屎肠球菌-安全性的编制依据**

屎肠球菌是人畜胃肠道共生菌，但其中一些菌株可能是人类致病菌。然而，如今尚没有关于屎肠球菌安全性检测的国际和国家标准公布。欧洲食品安全局（EFSA）动物饲料添加剂和饲料产品委员会（FEEDAP）的微生物工作小组建立了屎肠球菌安全性评估准则，并发布了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）。该安全性评估指南规定，屎肠球菌菌株对氨苄青霉素的MIC值> 2 mg/L或含有三种病原菌标志基因IS16、*esp*和*hylEfm*的任意其一时，均不得作为饲料添加剂使用。我们根据此安全性评估指南和国际标准ISO 20776-1:2006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屎肠球菌菌株对氨苄青霉素的MIC值（见表7）。经检测，各产品菌株对氨苄青霉素的MIC值均≤ 2 mg/L。

另外，我们对屎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8。经检测，所有三种病原菌标志基因IS16、*esp*和*hylEfm*均检测阴性（图3）。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。

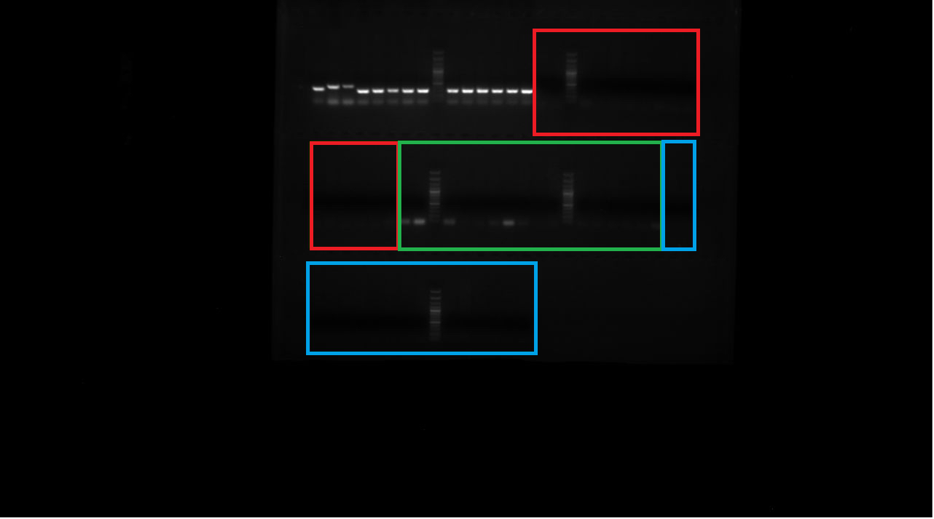
参考国际标准和相关安全性评估指南，我们将屎肠球菌的安全性指标设置为对氨苄青霉素的最低抑菌浓度（MIC）≤ 2 mg/L。

表7 屎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 |
| 12 | 2.0 |

表8 屎肠球菌标志基因IS16、*esp*和*hylEfm*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 | TCAAAAAGTGGGCTTGGC |
| *esp*-F | AGATTTCATCTTTGATTCTTGG | 510 | J Clin Microbiol, 2004, 42(10):4473-4479 |
| *esp*-R | AATTGATTCTTTAGCATCTGG |
| *hylEfm*-F | ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG | 276 | J Clin Microbiol, 2004, 42(10):4473-4479 |
| *hylEfm*-R | GACTGACGTCCAAGTTTCCAA |



IS16

*esp*

*hylEfm*

IS16

*esp*

*hylEfm*

图3 屎肠球菌菌种中三种病原菌标志基因IS16、*esp*和*hylEfm*的表达

**（7）贮存和保质期的编制依据**

益生菌是一类对[宿主](https://baike.baidu.com/item/%E5%AE%BF%E4%B8%BB/11528" \t "_blank)有益的活[的](https://baike.baidu.com/item/%E6%B4%BB%E6%80%A7" \t "_blank)[微生物](https://baike.baidu.com/item/%E5%BE%AE%E7%94%9F%E7%89%A9" \t "_blank)，是[定植](https://baike.baidu.com/item/%E5%AE%9A%E6%A4%8D/9548141" \t "_blank)于人体[肠道](https://baike.baidu.com/item/%E8%82%A0%E9%81%93/6912371" \t "_blank)、[生殖](https://baike.baidu.com/item/%E7%94%9F%E6%AE%96" \t "_blank)系统内，能产生确切[健康](https://baike.baidu.com/item/%E5%81%A5%E5%BA%B7/352662" \t "_blank)功效从而改善宿主微[生态](https://baike.baidu.com/item/%E7%94%9F%E6%80%81" \t "_blank)[平衡](https://baike.baidu.com/item/%E5%B9%B3%E8%A1%A1/75238" \t "_blank)、发挥有益作用的活的[微生物](https://baike.baidu.com/item/%E5%BE%AE%E7%94%9F%E7%89%A9/147527" \t "_blank)的总称。因此，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，其在生产、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，储存条件和保质期对产品质量保证非常重要。

卫生部发布《预包装食品标签标准》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”。在本标准中，我们将符合产品标识活菌数的期限定义为保质期。并且参考《中华人民共和国药典》规定，标准中提到的常温条件系指10~30°C，低温条件系指10°C以下。28份企业标准中，除2家企业要求贮存条件为0~40°C外，其余企业标准均要求贮存条件为阴凉、干燥。通过对28家生产企业的企业标准的统计，有26家企业规定了保质期。其中，除2家企业将产品保质期与贮存条件对应起来（4-8°C，12个月；15-25°C，6个月）外，所有产品的保质期均定为12个月及以上（见附件1）。但根据我们对屎肠球菌类产品为期一年的跟踪检测，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；b.在阴凉、干燥的常温条件下储存，活菌数在12个月时均无法满足标签含量；c. 冷藏储存效果显著好于常温储存。因此，乳酸菌的储藏条件对产品保质期影响极大，是影响产品质量的首要因素。

在常温储存条件下跟踪监测样品共12个，其中，只有10个产品活菌数初始检测值达到标签含量。我们分别在常温（10-30°C）和低温（4°C）储存条件下，连续跟踪了这10个产品在6个月内的屎肠球菌存活率情况。在常温保存条件下（见表9），储存1个月和2个月时，均有60%的样品活菌数能够达到标签值，这些样品活菌数存活率分别为61%~100%和57%~100%；储存3个月时，仍有60%的样品活菌数能够达到标签值，这些样品活菌数存活率为38%~71%；储存6个月时，只有50%的样品活菌数能够达到标签值，这些样品活菌数存活率为38%~60%。在低温（4°C）储存条件下（见表10），储存6个月时，仍有80%的样品活菌数能够达到标签值，这些样品活菌数存活率为19%~76%。由此可见，在常温（10-30°C）和低温（10°C以下）储存条件下，市场上产品的活菌存活率变化有很大区别。

全价配合饲料厂或养殖户在配制饲料时，一方面都会提前采购饲料添加剂并保存一定时间，一般在3个月左右，且存放条件一般均在仓库等阴凉处，并没有大型低温保存设施；另一方面乳酸菌加入到配合饲料中后，也需要1-3个月才能使用完。因此，饲料添加剂屎肠球菌产品生产厂家应按照产品活菌数存活性能，调整现有标识活菌数或提高产品初始活菌数量。

综合考虑乳酸菌产品在实际饲料配制中的使用习惯，本标准规定饲料添加剂屎肠球菌保质期为低温（10℃以下）保存期为6个月以上；常温（10℃-30℃）保存期为3个月以上。

同时，鉴于产品在常温和低温条件下屎肠球菌存活率的明显差别，在对贮存条件的要求中提出：“建议使用10°C以下的冷藏条件”、“防止长时间30℃以上高温”。

表9 饲料添加剂屎肠球菌产品常温（10-30°C）储存存活率

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 标签含量（CFU/g） | 初始含量（CFU/g） | 存活率（%） | | | | | |
| 1个月 | 2个月 | 3个月 | 4个月 | 5个月 | 6个月 |
| 1 | 2.00E+10 | 4.60E+10 | 100.00 | 86.96 | 85.87 | 84.78 | 83.70 | 82.17 |
| 2 | 1.00E+11 | 1.22E+11 | 6.58 | 1.46 | 1.52 | 0.96 | 0.85 | -- |
| 3 | 1.00E+11 | 7.15E+11 | 96.50 | 93.01 | 70.63 | 43.64 | 32.80 | 41.33 |
| 4 | 1.00E+11 | 7.90E+11 | 61.39 | 56.96 | 37.97 | 46.77 | 32.03 | 43.04 |
| 5 | 1.00E+11 | 1.36E+11 | 67.65 | 62.50 | 35.66 | 28.33 | 26.47 | 23.35 |
| 6 | 1.00E+10 | 1.11E+10 | 100.00 | 127.03 | 71.17 | 141.89 | 18.47 | 153.60 |
| 7 | 1.00E+11 | 3.20E+11 | 75.94 | 56.56 | 45.94 | 36.25 | 36.56 | 153.13 |
| 8 | 2.00E+10 | 3.60E+10 | 82.15 | 30.97 | 54.72 | 82.08 | -- | 47.17 |
| 9 | 2.00E+10 | 2.29E+10 | 50.66 | 43.67 | 48.91 | 83.84 | -- | 46.51 |
| 10 | 1.00E+11 | 1.97E+11 | 32.32 | 6.36 | 8.52 | 9.54 | -- | -- |
| 11 | 1.00E+10 | 7.80E+07 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 12 | 1.00E+09 | 4.30E+08 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

注：标签含量为产品包装上标识产品活菌数含量；初始含量为收到产品样品后3天内检测活菌素含量；--表示未检测。

表10 饲料添加剂屎肠球菌产品低温（10°C以下）储存存活率

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 标签含量（CFU/g） | 初始含量（CFU/g） | 存活率（%） | | | | | |
| 1个月 | 2个月 | 3个月 | 4个月 | 5个月 | 6个月 |
| 1 | 2.00E+10 | 4.60E+10 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 96.00 | 90.00 | 86.00 |
| 2 | 1.00E+11 | 1.22E+11 | 1.60 | 1.58 | 1.84 | 0.99 | -- | -- |
| 3 | 1.00E+11 | 7.15E+11 | 35.59 | 27.90 | 33.57 | 32.17 | 31.12 | 22.31 |
| 4 | 1.00E+11 | 7.90E+11 | 86.08 | 77.22 | 61.39 | 31.01 | 14.49 | 53.16 |
| 5 | 1.00E+11 | 1.36E+11 | 41.18 | 33.09 | 7.43 | 23.90 | 15.99 | 7.39 |
| 6 | 1.00E+10 | 1.11E+10 | 137.84 | 100.00 | 201.80 | 57.21 | 68.92 | 75.23 |
| 7 | 1.00E+11 | 3.20E+11 | 100.00 | 76.41 | 18.75 | 12.78 | 27.34 | 55.78 |
| 8 | 2.00E+10 | 36000000000 | 100.00 | 90.83 | 37.36 | 47.08 | 56.94 | 53.61 |
| 9 | 2.00E+10 | 2.29E+10 | 50.66 | 135.81 | 48.91 | 128.60 | 6.03 | 157.21 |
| 10 | 1.00E+11 | 1.97E+11 | 100.00 | 77.86 | 8.65 | 33.08 | 34.10 | 15.06 |
| 11 | 1.00E+10 | 7.80E+07 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 12 | 1.00E+09 | 4.30E+08 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

注：标签含量为产品包装上标识产品活菌数含量；初始含量为收到产品样品后3天内检测活菌素含量；--表示未检测。

**（8）饲料添加剂 屎肠球菌鉴别编制依据**

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）等标准及方法，对屎肠球菌进行鉴别。

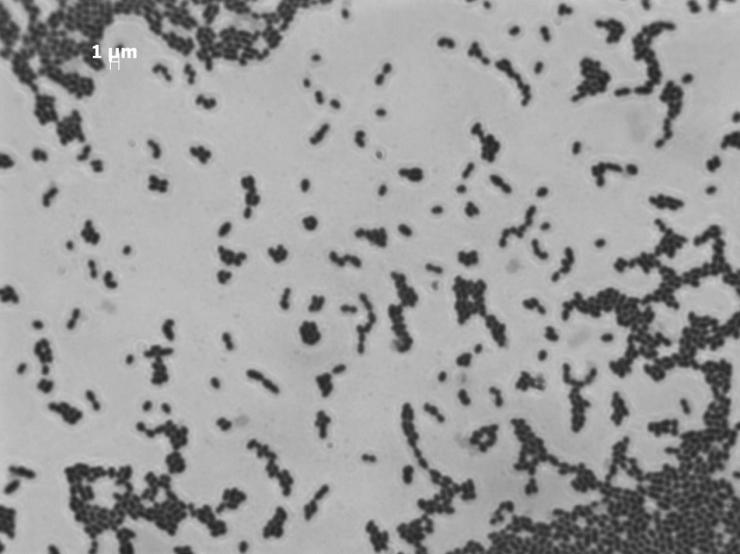
①菌体形态

根据《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：菌菌体细胞呈卵圆形，直径为0.6 μm~2.0 μm×0.6 μm~2.5 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11和图4。

表11 饲料添加剂屎肠球菌产品菌体形态特征描述

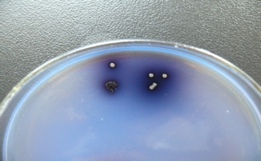
|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 形态 | 革氏染色a | 芽孢 | 荚膜 | 运动性 |
| 1 | 卵圆、短链 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 2 | 卵圆、短链 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 3 | 卵圆、成对 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 4 | 卵圆、短链 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 5 | 卵圆、短链 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 6 | 卵圆、成对 | 阳性 | 无 | 无 | 无 |
| 7 | 卵圆、成对 | 阳性 | 无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

注：a革兰氏染色部分为生理生化特征。

图4 样品菌体典型显微形态

②菌落形态

参考数十篇屎肠球菌文献及屎肠球菌的特性，选用适合肠球菌选择性培养基，即胆汁七叶苷叠氮钠琼脂，为本标准中分离用培养基。跟踪检测的样品在下述培养基上培养（37°C ± 2°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5。

图5 样品典型菌落形态

③生理生化特征

主要参考API 20 Strep鉴定试纸条、BIOLOG鉴定系统、《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）等方法对11个样品进行表12中相应生理生化特征的试验，具体数据见表13。从产品的试验结果看，与本标准的要求基本符合。

表12 屎肠球菌生理生化特征

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 试验项目 | 结果 | 试验项目 | | 结果 |
| 革兰氏染色 | + | 碳水化合物（4种）反应 | | |
| 6.5%NaCl | + | 麦芽糖 | + | |
| pH 9.6 | + | 七叶苷 | + | |
| 0.04%碲酸盐 | - | 丙酮酸 | - | |
| 0.02%叠氮化钠 | + | 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。

表13 饲料添加剂屎肠球菌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%  碲酸盐 | 0.02%  叠氮化钠 |
| 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90％以上菌株为阴性反应。

④菌种遗传特性

依据《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，将11个屎肠球菌样品的16S rRNA（16S核糖体核糖核酸）序列与美国国立生物信息中心（NCBI）中模式菌株ATCC19434的16S rRNA（NR\_115764.1）进行比对，相似度在99%以上。具体结果见表14。

表14 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 |

**四、采用国际标准**

本标准并未采用国际同类标准。

**五、与现行法律法规和强制性标准的关系**

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。

**六、重大分歧意见的处理经过和依据**

无。

**七、标准作为强制性或推荐性标准的意见**

本标准应作为强制性标准。

屎肠球菌，作为动物宿主肠道内的原籍菌，具有良好的生物安全性和优良的益生特性。它可直接参与宿主的物质代谢过程，例如可直接参与胆固醇的代谢，并对异常代谢进行调整；生长代谢速度快；产生L-型乳酸，可在肠内抵抗低pH值环境，能有效地竞争排斥病原菌的定植，并充分发挥其生物功能；能提高饲料转化率，对各种养殖动物幼体起到了营养强化和促生长的作用；对沙门氏菌，志贺氏病和假单胞菌等致病菌都有很好的抑制作用；增强肠道非特异性免疫能力，激活淋巴细胞，增加血液中免疫蛋白的含量，从而提高机体抵抗病原菌的能力。所以，长期在饲料中添加屎肠球菌可以减少畜禽腹泻等疾病的发生。在实际应用效果上，大多数实验证明屎肠球菌组成的益生菌制剂可提高幼年畜禽的日增重，改善饲料报酬，减少腹泻率，降低死亡率。

近年我国微生物饲料添加剂发展非常迅速，而屎肠球菌等乳酸菌产品需求和产值也逐年迅猛提高，亟需形成一个完善的管理机制，尤其是针对屎肠球菌产品标准。

**八、贯彻标准的要求和措施建议**

无。

**九、废止现行有关标准的建议**

无。

**十、其他应予说明的事项**

无。

附件1 饲料添加剂屎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 | 华北 | 北京 | 北京好实沃生物技术有限公司 | Q/HDHSN 0025-2017《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 1~5×109-11 | 无 | 无 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 2 |  |  | 北京大北农科技集团股份有限公司 | Q/HDDBN0068-2014《饲料添加剂 屎肠球菌 | 屎肠球菌 | 1×1010 | ≤ 10 | 2~3（90%通过率） | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 3 |  | 河北 | 邢台思倍特生物科技有限公司 | Q/SBT 11-2018《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 无 | ≤ 10 | 0.9 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 4 | 华东 | 上海 | 上海四季生物科技有限公司 | Q31/0117000094C022《微生物饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 1×109 | ≤ 5 | 无 | 无 | 无 |
| 5 |  | 南京 | 南京福润德动物药业有限公司 | Q/320115FRDW 007-2017《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 1×109~10 | ≤ 10 | 2.5 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 6 |  | 江苏 | 江苏远山生物技术有限公司 | Q/320900JYS 007-2016《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 1×109 | ≤ 11 | 0.4 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 7 |  |  | 江苏三仪生物工程有限公司 | Q/320382SYSW08-2017《饲料添加剂屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 5×107-10 | ≤ 10 | 0.84 | 阴凉、干燥 | 24个月 |
| 8 |  | 浙江 | 浙江诚缘生物科技有限公司 | Q/ZJCYSW 015-2017《饲料添加剂屎肠球菌（微囊型） | 屎肠球菌 | 0.5~1×1010 | ≤ 10 | 无 | 阴凉、干燥 | 24个月 |
| 9 |  | 福建 | 福建奥姆龙生物工程有限公司 | Q/FAML 005-2018《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.01~3×1010 | ≤ 10 | 2 | 阴凉、干燥 | 24个月 |
| 10 |  |  | 福建大北农水产科技有限公司 | Q/ZFDS 009-2014《水质改良剂 屎肠球菌剂》 | 屎肠球菌 | 1×1010 | 无 | 2~3（90%通过率） | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 11 |  | 江西 | 江西好实沃生物技术有限公司 | Q/JXHSW 002-2018《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.1~2×1010 | ≤ 9 | 无 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 12 |  |  | 宜春强微生物科技有限公司 | Q/YCQW024-2018《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.003~5×1011 | ≤ 12 | 0.38（90%通过率） | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 13 |  | 山东 | 山东宝益泽生物工程有限公司 | Q/370125BYZ026-2015《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 1×1011 | ≤ 12 | 1.25 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 14 |  |  | 山东宝来利来生物工程股份有限公司 | Q/370902SBL113-2016《饲料添加剂屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 1×109-11 | ≤ 10 | 0.9 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 15 |  |  | 山东蔚蓝生物科技有限公司 | Q/371621SLH015-2017《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 1~5×109-11 | ≤ 12 | 0.9 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 16 |  |  | 山东迅达康生物科技有限公司 | Q/370113XDK 502-2017《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 5×1010 | ≤ 10 | 0.9 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 17 |  |  | 山东中科嘉亿生物工程有限公司 | Q/370781SJY 012-2017《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.1~5×1011 | ≤ 10 | 0.9 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 18 | 华中 | 河南 | 洛阳希望生物科技有限公司 | Q/LYXW012-2017《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.02~1×1010 | ≤ 11 | 2 | 阴凉、干燥 | 18个月 |
| 19 |  |  | 河南德邻生物制品有限公司 | Q/HDS 031-2018《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.005~1×1014 | ≤ 12 | 0.85 | 阴凉、干燥 | 液态6个月，固态12个月 |
| 20 |  | 湖北 | 武汉生发生物科技有限公司 | Q/WSF005-2017《屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.1~8×1010 | 无 | 无 | 0~40°C | 12个月 |
| 21 |  |  | 武汉惟勤生化有限公司 | Q/WWQ005-2017《屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.1~8×1010 | 无 | 无 | 0~40°C | 12 个月 |
| 22 |  |  | 湖北绿天地生物科技有限公司 | Q/LTD 012-2017《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.01~5×1011 | ≤ 8 | 0.84（90%通过率） | 阴凉、干燥15°C~25°C或4°C | 4°C~8°C，12个月，15°C~25°C，6个月 |
| 23 |  |  | 湖北华大瑞尔科技有限公司 | Q/HHDR 003-2017《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 1×1010 | ≤ 8 | 0.84（90%通过率） | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 24 |  |  | 武汉新华扬生物股份有限公司 | Q/XHY 23-2018《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 2~4×1010 | ≤ 10 | 0.425（90%通过率） | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 25 |  |  | 湖北省新兴地生物技术有限公司 | Q/HXXD 009-2018《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 1×1010 | ≤ 10 | 0.84 | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 26 |  |  | 湖北华扬科技发展有限公司 | Q/HYKJ 07-2018《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.4~2×1011 | ≤ 10 | 0.42（90%通过率） | 阴凉、干燥 | 12个月 |
| 27 |  |  | 武汉科缘生物发展有限责任公司 | Q/WHKY 115-2018《饲料添加剂 屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 0.05~1×1011 | ≤ 10 | 0.9 | 阴凉、干燥15°C~25°C或5°C | 4°C~8°C，12个月，15°C~25°C，6个月 |
| 28 | 西南 | 四川 | 成都通威水产科技有限公司 | Q/709207981U•2-2017《饲料添加剂屎肠球菌》 | 屎肠球菌 | 1×108 | ≤ 10 | 1.25 | 阴凉、干燥 | 无 |