



中华人民共和国国家标准

GB XXXX—XXXX

食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

食品安全国家标准

食品用菌种安全性评价程序

1 范围

本标准规定了食品用菌种（包括细菌、丝状真菌、酵母、放线菌及单细胞藻类）的安全性评价程序。

本标准适用于拟用于生产食品、食品添加剂、新食品原料、保健食品用活的微生物菌种的安全性评价。本标准不适用于基因改造微生物的安全性评价。

对于微生物菌种生产的产品及产品其他成分的安全性评价，应参照国家相关规定进行。

2 术语和定义

2.1 致病性

是指微生物感染宿主造成健康损害引起疾病的能力。

2.2 产毒性能

是指微生物产生对人和动物有毒作用的活性代谢产物的能力。

2.3 毒性

是指微生物有毒代谢物引起的宿主健康损伤。

2.4 抗微生物药物耐药性

是指微生物（包括细菌、真菌等）对抗微生物药物的抗性，对抗微生物药物耐药的微生物又被称为耐药微生物。其中细菌对抗生素类药物的耐药最常见。耐药性又分为天然耐药（又称固有耐药）和获得性耐药两类。

2.5 固有耐药性

是指微生物对某种抗微生物药物的天然耐药性。固有耐药性是由微生物基因组基因决定且代代相传的耐药，由微生物的种属特性所决定。

2.6 获得性耐药

是指当微生物接触抗微生物药物后，原来敏感的微生物发生基因突变或获得外源性耐药基因而改变自身的代谢途径、使其能避免被药物抑制或杀灭。获得性耐药多由质粒介导，也可由染色体介导。

2.7 最低抑菌浓度

是指在规定的体外实验条件下、在规定的时间内，可观察到抑制微生物生长的最低药物浓度，单位为 mg/L。

2.8 藻类毒素

是指由藻类产生、对人和动物有毒作用的活性物质。

2.9 全基因组测序

是指在一次测序中确定一个生物体完整 DNA 序列（包括生物体的全部染色体、质粒、线粒体、以及植物叶绿体等）的操作过程。

2.10 诱变

是指通过物理、化学诱变剂，生物因子，核酸重组技术等诱发一个或多个基因发生突变的过程，其变种发生频率显著高于自发突变。

3 对拟评价微生物菌种的基本要求

拟评价微生物菌种评价前需提供以下资料。

3.1 基本信息

菌种名称（包括中文名、拉丁名、别名等）、来源及用途。

3.2 菌种分类学资料

提供国内外有菌种鉴定资质的检验机构出具的拟评价菌种规范、科学的分类学（属、菌种名称或株号）资料。细菌的分类和命名应遵循原核生物分类学国际委员会（International committee on systematics of prokaryotes）的规定，并符合原核生物国际命名法规（International code of nomenclature of prokaryotes）要求。藻类和真菌的分类和命名应遵循国际藻类、真菌和植物命名法规（International code of nomenclature for algae, fungi, and plants）的规定。

3.3 菌种鉴定资料

根据目前已有的知识，提供基于表型和最新测序技术鉴定到种或株水平的资料。

3.4 菌种生长环境条件资料

提供菌种生长适宜培养基及培养条件（包括但不限于培养时间、培养温度和湿度、光照等），以及菌种保藏及复壮方法等相关资料。

3.5 对诱变菌种的要求

经诱变的菌种必须提供详细的诱变方法（包括使用的诱变剂、诱变条件及诱变实验流程等）和不少于 100 代（传代间隔不少于 7 天）的遗传稳定性研究报告。

3.6 生产相关信息

包括但不限于安全用于食品、食品添加剂、新食品原料或保健食品等生产的原辅料记录、产品配方、工艺流程、技术要求或企业标准等资料。

3.7 其他国家审批资料

提供其他国家已经批准或认可该菌种作为食品、食品添加剂、新食品原料或保健食品等审批资料。

3.8 毒理学资料

对国内外均无食用习惯的微生物，应进行急性经口毒性试验、三项遗传毒性试验、90 天经口毒性试验、致畸试验和生殖毒性试验。仅在国外个别国家或国内局部地区有食用习惯的微生物，应进行急性经口毒性试验、三项遗传毒性试验、90 天经口毒性试验；已在多个国家批准食用的微生物类，应进行急性经口毒性试验、两项遗传毒性试验。其中，两项遗传毒性试验包括 AMES 试验和微核试验，而三项遗传毒性试验可按照食品安全国家标准《食品安全性毒理学评价程序》（GB 15193.1）中推荐的遗传毒性试验组合进行。

3.9 其他需要说明的信息。

4 评价方法

已经按照 3 的要求提供以上资料的拟评价菌种可以按照以下方法开展评价。

4.1 国内外安全性评价资料综述

基于国内外文献数据，提供拟评价菌种国内外使用历史及安全性评价资料，包括但不限

于其致病性和产毒能力报告、科技文献或综述等。若无拟评价菌种的上述资料，应提供同种内其他菌株或在亲缘关系上与其相近种属的使用历史和安全性评价资料。

4.2 全基因组测序

4.2.1 基因测序

对拟评价的菌株进行下一代(next generation sequencing)和第三代(third generation sequence)全基因组测序，分别获得其基因组框架图和完成图，并提供包括但不限于以下信息的测序报告：

- DNA 提取方法
- 测序方案及仪器设备
- 序列组装方法
- 序列质量评价
- FASTA 文件
- 与预期基因组大小相关的重叠群 (contigs) 总长度
- 基因注释流程
- 对真菌和藻类而言，还需提供从相关数据库中获得的注释质量信息。

4.2.2 基因序列分析

将拟评价菌株的基因组序列与目前国内外已有的毒力基因（或毒素合成关键基因）数据库（包括但不限于 VFDB、PAI DB、MvirDB、CGE 等）、耐药基因数据库（包括但不限于 CARD、ResFinder、Argannot、NDARO 等）最新版本中存储的序列进行比对，并分析拟评价菌株遗传物质中与致病性、耐药性（抗生素、消毒剂、杀虫剂等）相关的已知毒力（或耐药）基因、毒素产生相关基因等情况，并提供至少包括以下信息的分析报告：

- 毒力/致病性（或产毒）相关基因名称、所在位置（移动遗传元件/染色体）、与最新数据库中已有毒力基因的匹配度等信息
- 编码的蛋白及序列号
- 毒力/致病因子（毒素、侵袭和粘附因子等）
- 染色体和移动遗传元件上是否存在对临床治疗、动物疫病预防及治疗用抗微生物药物耐药的基因、基因环境描述等
- 序列长度覆盖度 $\geq 60\%$
- 输入序列与数据库中序列的匹配度 ($\geq 85\%$) 和 e 值 ($\leq 10^{-5}$)
- 数据库中基于输入序列已有的并充分描述过的菌株名称
- 基因组完成图谱
- 拟评价的真菌菌株或藻种还应根据文献报道能够产生的毒素类别，有针对性地检索是否存在毒素合成关键基因。

4.3 动物致病性试验

由具有菌种致病性检测和评价资质的机构，分别按照附录 A、附录 B、附录 C 及附录 D 的试验方案，对拟评价的食品用细菌、丝状真菌、酵母、放线菌菌株进行动物致病性试验，对试验结果做出评价并出具报告。

4.4 耐药性试验

按照附录 E 的规定对拟评价菌种进行耐药性试验，同时结合 4.2.2 基因组完成图中耐药基因携带情况，出具综合评价报告。

4.5 产毒试验

根据现有知识，对某些能产生毒素（包括抗生素）的菌种，应在有资质的国内外检测机

构进行包括生产用培养基在内的多种基质（单品种固体、多品种固体复合、不同成分液体组合等）中的产毒试验。试验的培养时间应不短于一个生产周期，真菌的产毒试验应按照附录 F 规定的方法进行，并按照我国或国际组织规定的标准检测方法进行有毒活性代谢产物真菌毒素含量的测定并出具检测报告。若产毒试验显示受试菌株产生毒素，则应该按照国际通用方法，结合产生毒素的水平 and 人群对用该菌株生产食品的摄入量，评估毒素对人群健康的影响并出具评估报告。

放线菌产生的抗微生物药物或藻类产生的藻类毒素则按我国相应的标准检测方法、或国际相关组织及其他国家规定的标准方法进行检验。

4.6 其他活性物质

能够产生其他活性代谢产物（如 D-乳酸等）、或已知具有溶血活性的菌株，需按照国家及国际组织/或其他国家规定的检测方法，进行代谢产物或溶血活性的测定。

5 结果的判定

对拟评价菌株从以下四个方面进行安全性的综合评价。

5.1 满足 5.1.1 或 5.1.2 任一条件者，可认为菌株是安全的

5.1.1 三个以上国家或地区批准或认可作为食品用菌种且具有长期（30 年以上）的使用历史，最新研究结果显示对人和动物无致病性，且不产生对人和动物有毒性的代谢产物。

5.1.2 致病性及产毒能力

完全符合以下三种情况者认为菌株是安全的。

5.1.2.1 根据现有知识，全基因组序列分析结果显示不存在已知的致病相关基因或毒素合成关键基因。

5.1.2.2 动物试验显示无致病性。

5.1.2.3 真菌、放线菌或藻类产毒试验结果显示在受试的所有培养基中均不产生已知有毒活性代谢产物。

5.2 全基因组序列中发现含有已知毒力/致病基因（或毒素合成关键基因），但动物试验显示不具有致病性、或产毒实验显示在受试的培养基中可产生已知的有毒活性代谢产物但其水平较低，评估结果显示长期摄入对人体健康无影响，结合国内外安全使用历史，可认为菌株是安全的。

5.3 全基因组测序结果显示存在致病/产毒相关的基因，且动物试验显示具有致病性或产生高水平已知的有毒代谢产物，长期摄入可能影响人体健康，认为菌株是不安全的。

5.4 耐药性的判定

以下耐药性的判定原则仅适用于 5.1 及 5.2 中已确认为安全的菌株。

5.4.1 对受试抗微生物药物无耐药性，表现为菌株对一种或几种受试抗微生物药物的 MIC 值低于设定的阈值，且全基因组序列中未检测到与耐药表型直接相关的耐药基因，或检测到的与耐药表型直接相关的耐药基因但经试验证实不表达，则认为菌株是安全的。

5.4.2 对受试抗微生物药物具有固有耐药性，表现为菌株对一种或几种受试抗微生物药物的 MIC 值高于设定的阈值，且其携带的耐药基因位于染色体上，通过水平传播的可能性很小，认为菌株是安全的。

5.4.3 对受试抗微生物药物产生获得性耐药，表现为菌株对一种或几种受试抗微生物药物的 MIC 值高于设定的阈值，若产生耐药的机制是染色体突变所致，其水平传播的可能性很低，一般认为菌株是安全的。

5.4.4 菌株对一种或几种抗微生物药物的 MIC 值高于设定的阈值，若全基因组测序分析结

果显示耐药决定子位于可移动遗传元件上,具有水平传播的潜力,则菌株不能用作食品生产。

5.4.5 若表型实验结果显示菌株对一种或几种受试抗微生物药物的 MIC 值高于设定的阈值,即使其基因组序列中缺乏赋予其耐药的遗传基础,该菌株也不能用于食品生产。

附录 A

食品用细菌致病性试验方法

A.1 范围

本方法规定了食品用细菌的致病性试验方法。

本方法适用于食品用细菌的致病性评价。

A.2 设备和材料

除微生物实验室常规设备外，其他设备与材料如下：

- A.2.1 恒温培养箱：36 °C ±1 °C。
 - A.2.2 离心机：离心力 ≥ 3 000 ×g。
 - A.2.3 真空冷冻干燥机。
 - A.2.4 电子天平：感量分别为 0.1 g 和 0.001 g。
 - A.2.5 比浊仪。
 - A.2.6 温湿度计。
 - A.2.7 显微镜：10×~100×。
 - A.2.8 厌氧培养装置：厌氧罐、厌氧箱。
 - A.2.9 无菌锥形瓶：容量 100 mL、500 mL。
 - A.2.10 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。
 - A.2.11 无菌试管：16 mm×160 mm。
 - A.2.12 无菌培养皿：直径 90 mm。
 - A.2.13 无菌量筒：容量 100 mL。
 - A.2.14 微量移液器及配套吸头：量程为 100 μL~1 000 μL。
 - A.2.15 注射器：量程为 100 μL~1 000 μL。
 - A.2.16 小鼠灌胃针头。
- A.3 培养基和试剂

- A.3.1 无菌生理盐水：商品化生理盐水，或 8.5 g NaCl 溶于 1 000 mL 蒸馏水中，分装后 121 °C 高压灭菌 15 min，备用。
- A.3.2 LB 肉汤培养基：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 °C 高压灭菌 15 min，备用。
- A.3.3 LB 琼脂平板：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 °C 高压灭菌 15 min，制备 LB 琼脂平板，备用。
- A.3.4 半胱氨酸盐酸盐储备液：称取 500 mg 半胱氨酸盐酸盐于 50 mL 无菌离心管中，加入 10 mL 蒸馏水，充分溶解后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后备用。
- A.3.5 含有半胱氨酸盐酸盐的 MRS 肉汤培养基：商品化 MRS 肉汤培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 °C 高压灭菌 15 min，待培养基冷却至 50 °C 左右时，加入 A.3.4 中制备的半胱氨酸盐酸盐储备液，使培养基中半胱氨酸盐酸盐的终浓度为 500 μg/mL，备用。
- A.3.6 含有半胱氨酸盐酸盐 MRS 琼脂平板：商品化 MRS 琼脂培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 °C 高压灭菌 15 min，待培养基冷却至 50 °C 左右时，加入 A.3.4 中制备的半胱氨酸盐酸盐储备液，使培养基中半胱氨酸盐酸盐的终浓度为 500 μg/mL，用于制备含有半胱氨酸盐酸盐的 MRS 琼脂平板。
- A.3.7 含有半胱氨酸盐酸盐的双歧杆菌琼脂平板：商品化双歧杆菌琼脂培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 °C 高压灭菌 15 min，待培养基冷却至 50 °C 左

右时,加入A.3.4中制备的半胱氨酸盐酸盐储备液,使半胱氨酸盐酸盐的终浓度为500 µg/mL,用于制备含有半胱氨酸盐酸盐的双歧杆菌琼脂平板。

A.4 实验动物

选用 SPF 级昆明或 ICR 健康成年小鼠,雌雄各半,体重范围为 18.0 g~22.0 g。

A.5 操作步骤

对于国内外均无使用历史的菌株,或国内外虽有使用历史、但对人和动物健康有不良影响记载或报道的菌株,必须使用腹腔注射和经口灌胃两种途径给予动物受试物,以评价不同受试物给予途径对动物的致病性。

对于国内外均有使用历史、且使用过程中未发现对人和动物健康有不良影响的菌株,可选择经口灌胃单一途径给予动物受试物,以评价受试物对动物的致病性。

A.5.1 腹腔注射

A.5.1.1 菌种活化:目前我国食品用细菌菌种主要是双歧杆菌属和乳杆菌属,除这两个属以外的其他新申报菌种在以下描述中均使用“其他细菌”。根据送检菌株的保存状态,将双歧杆菌和乳杆菌首先接种含有半胱氨酸盐酸盐的 MRS 肉汤、其他细菌接种 LB 肉汤或适于该菌生长的最适液体培养基中,并置适宜的培养条件下(包括培养温度、湿度,厌氧、需氧、微需氧等)培养一定时间(培养时间长短视不同菌种而异),确认为纯培养后备用。

A.5.1.2 菌悬液制备:将 A.5.1.1 中活化的双歧杆菌接种含有半胱氨酸盐酸盐的 MRS 琼脂平板或含有半胱氨酸盐酸盐的双歧杆菌琼脂平板;乳杆菌接种含有半胱氨酸盐酸盐的 MRS 琼脂平板,其他细菌接种 LB 琼脂平板或适应于该菌生长的最适培养基琼脂平板,在规定的适宜培养条件下(包括培养温度、湿度,厌氧、有氧、微需氧等)培养一定时间(培养时间长短视不同菌种而异)后,刮取平板上的菌落,将其悬浮于无菌生理盐水中,充分混匀后,用适量无菌生理盐水调整菌悬液浓度并比浊,使最终菌悬液中的菌浓度达到 5.0×10^7 CFU/mL,用于小鼠腹腔注射。

A.5.1.3 腹腔注射:小鼠不少于40只,雌雄各半,随机分成4组(每组不少于10只),包括雄性小鼠无菌生理盐水对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠无菌生理盐水对照组、雌性小鼠菌悬液组。注射量为0.2 mL/只,即受试物组每只小鼠注射菌量至少 1.0×10^7 CFU。

A.5.1.4 动物观察:动物腹腔注射后每天观察1次,连续观察至少21 d。观察并记录小鼠皮肤和毛、眼睛和粘膜、呼吸情况、肢体活动、行为方式等有无异常。特别注意观察是否出现震颤、抽搐、腹泻、嗜睡、流涎和昏迷等现象。试验前称量并记录所有小鼠的体重,实验结束后称量并记录所有存活小鼠的体重。对于实验期间死亡的小鼠,尽可能精确记录小鼠的死亡时间,同时称重并记录。

A.5.2 经口灌胃

A.5.2.1 菌数预估:无菌吸取上述 A.5.1.1 的培养液,分别加至两个无菌离心管中,每管 1 mL, $3\ 000 \times g$ 离心 10 min,弃去上清液后,用适量无菌生理盐水调整菌悬液浓度并比浊,使最终菌悬液中菌的浓度分别不低于 2.5×10^8 CFU/mL 和 1.25×10^9 CFU/mL,并分别记录每 mL 培养液离心后所得沉淀物中细菌数调整至 2.5×10^8 CFU/mL 和 1.25×10^9 CFU/mL 时需加入的无菌生理盐水的体积 (mL)。

A.5.2.2 菌悬液制备

A.5.2.2.1 培养上清液的制备:根据受试动物总数和每只动物的灌胃体积计算所需要的受试菌株培养液用量,吸取 A.5.1.1 培养液,将培养液一分为二, $3\ 000 \times g$ 各离心 10 min 后,将上清液分别转至 100 mL 无菌量筒中,一份上清液用于菌悬液原液的制备,另一份上清液冷冻浓缩至原体积的五分之一,作为 5 倍浓缩上清液,备用。

A.5.2.2.2 菌悬液原液的制备:按照 A.5.2.2.1 中获得的细菌终浓度达到 2.5×10^8 CFU/mL 所

需要的生理盐水体积，根据离心的培养物体积，按相同比例加入 A.5.2.2.1 获得的上清液，调整离心后的沉淀物使其细菌数达到 2.5×10^8 CFU/mL（上清液量不够时可用空白培养基补齐）。

A.5.2.2.3 5倍浓缩菌悬液的制备：按照 A.5.2.2.1 中获得的细菌终浓度达到 1.25×10^9 CFU/mL 所需要的生理盐水体积，根据离心的培养物体积，按相同比例加入 A.5.2.2.1 获得的 5 倍浓缩上清液，调整离心后的沉淀物使其细菌数达到 1.25×10^9 CFU/mL。

A.5.2.3 灌胃：小鼠不少于 80 只，雌雄各半，分别随机分成 8 组（每组不少于 10 只），包括雄性小鼠培养基对照组、雄性小鼠菌悬液组、雄性小鼠 5 倍浓缩培养基对照组、雄性小鼠 5 倍浓缩菌悬液组；雌性小鼠培养基对照组、雌性小鼠菌悬液组、雌性小鼠 5 倍浓缩培养基对照组、雌性小鼠 5 倍浓缩菌悬液组。各组均以 20 mL/kg BW 的体积给小鼠灌胃，使受试物组每只小鼠灌胃菌量分别为 1.0×10^8 CFU（原液组）和 5.0×10^8 CFU（5 倍浓缩液组），连续灌胃 3 d。首次灌胃前动物禁食过夜（16 h），灌胃后 3 h~4 h 喂食。

A.5.2.4 观察：动物经口灌胃后每天观察 1 次，至少连续观察 21 d，观察指标同 A.5.1.4。

A.6 结果与报告

对 A.5.1 和 A.5.2 的动物试验结果进行统计学分析和综合评价，包括：

- (1) 受试物对动物一般健康情况有无不良影响；
- (2) 受试物对动物体重等指标的影响；
- (3) 受试物组动物死亡情况；
- (4) 对受试物组和相应对照组小鼠的体重进行方差分析检验，检验标准为 $\alpha = 0.05$ ，统计量为 F。若受试物组动物在实验期间未出现中毒症状或死亡，且体重等指标与对照组相比差异无统计学意义，即可判定该菌种无致病性；若受试物组动物在试验期间出现中毒症状或死亡，或试验期间体重等指标与对照组相比有显著性差异，即可判定该菌种具有致病性。

附录 B

食品用丝状真菌的致病性试验方法

B.1 范围

本方法规定了食品用丝状真菌的致病性试验方法。

本方法适用于食品用丝状真菌的致病性评价。

B.2 设备和材料

除微生物实验室常规设备外，其他设备和材料如下：

- B.2.1 恒温培养箱：28 ℃±1 ℃。
 - B.2.2 电子天平：感量为 0.1 g。
 - B.2.3 锥形瓶：容量为 500 mL。
 - B.2.4 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。
 - B.2.5 显微镜：10×~100×。
 - B.2.6 微量移液器及配套吸头：量程为 100 μL~1 000 μL。
 - B.2.7 血球计数板。
 - B.2.8 注射器：量程为 100 μL~1 000 μL。
 - B.2.9 小鼠灌胃针头。
 - B.2.10 温湿度计。
 - B.2.11 接种钩。
 - B.2.12 球磨仪或功能相当的仪器。
 - B.2.13 无菌培养皿：直径 90 mm。
- B.3 培养基和试剂

- B.3.1 无菌生理盐水：见附录 A.3.1。
- B.3.2 麦芽汁琼脂平板：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 ℃高压灭菌 15 min，制备麦芽汁琼脂平板，备用。
- B.3.3 马铃薯葡萄糖琼脂平板：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 ℃高压灭菌 15 min，制备马铃薯葡萄糖琼脂平板，备用。

如拟评价菌株在上述两种培养基上的生长状态和产孢子量均不理想，可选用适于该菌株生长和产孢的其他培养基。

B.4 实验动物

见附录 A.4。

B.5 操作步骤

对于国内外均无使用历史的菌株，或国内外虽有使用历史、但对人和动物健康有不良影响记载或报道的菌株，必须使用腹腔注射和经口灌胃两种途径给予动物受试物，以评价不同受试物给予途径对动物的致病性。

对于国内外均有使用历史、且使用过程中未发现对人和动物健康有不良影响的菌株，可选择经口灌胃单一途径给予动物受试物，以评价受试物对动物的致病性。

B.5.1 腹腔注射

- B.5.1.1 菌株活化：将送检菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂平板（红曲霉接种于麦芽汁琼脂平板）或适于该菌生长的最适培养基中，并置适宜的培养条件下（包括培养温度、湿度、光照、通气量等）培养一定时间（培养时间长短视不同菌种而异），确认为纯培养后备用。

B.5.1.2 菌悬液制备

B.5.1.2.1 产孢子量大的菌株: 将拟评价菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂平板(红曲霉属菌株接种麦芽汁琼脂平板)或适于拟评价菌株生长的培养基平板, 28 °C ±1 °C 培养 7 d~14 d 后, 挑取平板上的孢子, 将其悬浮于无菌生理盐水中, 充分混匀后, 用血球计数板计数孢子浓度, 并用适量无菌生理盐水调整, 使其最终浓度不低于 5.0×10^7 CFU/mL。

B.5.1.2.2 产孢子量少或不产孢子的菌株: 将拟评价菌株接种于适宜的培养基上, 28 °C ±1 °C 下培养 7 d~14 d 或在适宜的诱导产孢条件下培养一定时间后, 挑取平板上的菌丝体及孢子, 用球磨仪(或其他功能相当的仪器)将菌丝体磨碎, 并用生理盐水重悬后, 用血球计数板计数, 并用适量无菌生理盐水调整, 使菌悬液中菌丝体片段数/孢子的最终浓度不低于 5.0×10^7 CFU/mL。

B.5.1.3 腹腔注射: 小鼠不少于 40 只, 雌雄各半, 分别随机分成 4 组(每组不少于 10 只), 包括雄性小鼠生理盐水对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠生理盐水对照组、雌性小鼠菌悬液组, 每只小鼠注射 0.2 mL, 即受试物组每只小鼠注射的菌量至少 1.0×10^7 CFU。

B.5.1.4 动物观察: 动物腹腔注射后每天观察 1 次, 至少连续观察 21 d, 观察指标同附录 A 中的 A.5.1.4。

B.5.2 经口灌胃

B.5.2.1 菌悬液制备: 除制备的菌悬液中真菌孢子/菌丝体片段的浓度不低于 2.5×10^8 CFU/mL 外, 其他操作步骤同 B.5.1.2。

B.5.2.2 灌胃: 小鼠不少于 40 只, 雌雄各半, 分别随机分成 4 组(每组不少于 10 只), 包括雄性小鼠生理盐水对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠生理盐水对照组、雌性小鼠菌悬液组, 各组均以 20 mL/kg BW 的体积给小鼠灌胃 1 次, 使受试物组每只小鼠灌胃菌量为 1.0×10^8 CFU, 灌胃前禁食过夜(16 h), 灌胃后 3 h~4 h 喂食。

B.5.2.3 观察: 动物经口灌胃后每天观察 1 次, 至少连续观察 21 d, 观察指标同附录 A 中的 A.5.1.4。

B.6 结果与报告

对B.5.1和B.5.2的动物试验结果进行统计学分析和综合评价, 内容同附录A中的条款A.6。

附录 C

食品用酵母的致病性试验方法

C.1 范围

本方法规定了食品用酵母的致病性试验方法。

本方法适用于食品用酵母的致病性评价。

C.2 设备和材料

除微生物实验室常规设备外，其他设备和材料如下：

- C.2.1 恒温培养箱：28 °C ±1 °C。
 - C.2.2 真空冷冻干燥机。
 - C.2.2 电子天平：感量为 0.1 g。
 - C.2.3 锥形瓶：容量为 500 mL。
 - C.2.4 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。
 - C.2.5 显微镜：10×~100×。
 - C.2.6 微量移液器及配套吸头：量程为 100 μL~1 000 μL。
 - C.2.7 血球计数板。
 - C.2.8 注射器：量程为 100 μL~1 000 μL。
 - C.2.9 小鼠灌胃针头。
 - C.2.10 温湿度计。
 - C.2.11 接种环。
 - C.2.12 离心机：离心力 ≥3 000 ×g。
 - C.2.13 无菌培养皿：直径 90 mm。
 - C.2.14 无菌量筒：容量 100 mL。
- C.3 培养基和试剂

- C.3.1 无菌生理盐水：见附录 A.3.1。
- C.3.2 麦芽汁琼脂平板：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 °C 高压灭菌 15 min，制备麦芽汁琼脂平板，备用。
- C.3.3 麦芽汁培养基：商品化培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 °C 高压灭菌 15 min，备用。

如拟评价菌株在麦芽汁琼脂培养基上的生长状态不理想，可选用适于该菌株生长的其他培养基。

C.4 实验动物

见附录 A.4。

C.5 操作步骤

对于国内外均无使用历史的菌株，或国内外虽有使用历史、但对人和动物健康有不良影响记载或报道的菌株，必须使用腹腔注射和经口灌胃两种途径给予动物受试物，以评价不同受试物给予途径对动物的致病性。

对于国内外均有使用历史、且使用过程中未发现对人和动物健康有不良影响的菌株，可选择经口灌胃单一途径给予动物受试物，以评价受试物对动物的致病性。

C.5.1 腹腔注射

C.5.1.1 菌株活化：根据送检菌株的保存状态，接种于麦芽汁琼脂平板或适于该菌生长的最适液体培养基中，并置适宜的培养条件下（包括培养温度、湿度、通气量等）培养一定时间

(培养时间长短视不同菌种而异), 确认为纯培养后备用。

C.5.1.2 菌悬液制备: 将拟评价菌株接种麦芽汁琼脂平板, $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养一定时间(培养时间长短视不同菌种而异)后, 刮取平板上的菌落, 将其悬浮于无菌生理盐水中, 充分混匀后, 用血球计数板计数, 并用适量无菌生理盐水调整菌悬液浓度, 使菌悬液中菌的最终浓度不低于 $5.0\times 10^7\text{ CFU/mL}$ 。

C.5.1.3 腹腔注射: 小鼠不少于 40 只, 雌雄各半, 分别随机分成 4 组(每组不少于 10 只), 包括雄性小鼠生理盐水对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠生理盐水对照组及雌性小鼠菌悬液组, 每只小鼠腹腔注射 0.2 mL, 即每只小鼠注射的菌量不少于 $1.0\times 10^7\text{ CFU}$ 。

C.5.1.4 动物观察: 动物腹腔注射后每天观察 1 次, 至少连续观察 21 d, 观察指标同附录 A 中的 A.5.1.4。

C.5.2 经口灌胃

C.5.2.1 菌株培养: 将菌株接种到麦芽汁培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养一定时间(培养时间长短视不同菌种而异)后, 备用。

C.5.2.2 菌数预估: 无菌吸取上述 C.5.2.1 的培养液, 分别加至两个无菌离心管中, 每管 1 mL, $3\ 000\times g$ 离心 10 min, 弃去上清液后, 用适量无菌生理盐水调整菌悬液浓度并计数, 使最终菌悬液中菌的浓度分别不低于 $2.5\times 10^8\text{ CFU/mL}$ 和 $6.25\times 10^8\text{ CFU/mL}$, 并分别记录每 mL 培养液离心后所得沉淀物中酵母菌数调整至 $2.5\times 10^8\text{ CFU/mL}$ 和 $6.25\times 10^8\text{ CFU/mL}$ 时加入无菌生理盐水的体积 (mL)。

C.5.2.3 菌悬液制备

C.5.2.3.1 培养上清液的制备: 根据受试动物总数和每只动物的灌胃体积计算所需要的受试菌株培养液用量, 继而将培养液一分为二, $3\ 000\times g$ 各离心 10 min 后, 将上清液分别转至 100 mL 无菌量筒中, 一份上清液作为菌悬液原液的制备, 另一份上清液冷冻浓缩至原体积的五分之二, 作为 2.5 倍浓缩上清液, 备用。

C.5.2.3.2 菌悬液原液的制备: 按照 C.5.2.2 中获得的酵母终浓度达到 $2.5\times 10^8\text{ CFU/mL}$ 所需要的生理盐水体积, 根据离心的培养物体积, 按相同比例加入 C.5.2.2 获得的上清液, 调整离心后的沉淀物使其酵母数达到 $2.5\times 10^8\text{ CFU/mL}$ (上清液量不够时可用空白培养基补齐)。

C.5.2.3.3 浓缩菌悬液的制备: 按照 C.5.2.2 中获得的菌终浓度达到 $6.25\times 10^8\text{ CFU/mL}$ 所需要的生理盐水体积, 根据离心的培养物体积, 按相同比例加入 C.5.2.2 获得的培养上清液 2.5 倍浓缩液, 调整离心后的沉淀物使其菌数达到 $6.25\times 10^8\text{ CFU/mL}$ 。

C.5.2.4 灌胃: 小鼠不少于 80 只, 雌雄各半, 分别随机分成 8 组(每组不少于 10 只), 包括雄性小鼠培养基对照组、雄性小鼠菌悬液组、雄性小鼠 2.5 倍浓缩培养基对照组、雄性小鼠 2.5 倍浓缩菌悬液组; 雌性小鼠培养基对照组、雌性小鼠菌悬液组、雌性小鼠 2.5 倍浓缩培养基对照组、雌性小鼠 2.5 倍浓缩菌悬液组。各组均以 20 mL/kg BW 的体积给小鼠灌胃 1 次, 使受试物组每只小鼠灌胃菌量分别为 $1.0\times 10^8\text{ CFU}$ (原液组) 和 $2.5\times 10^8\text{ CFU}$ (2.5 倍浓缩液组), 灌胃前应禁食过夜 (16 h), 灌胃后 3 h~4 h 喂食。

C.5.2.5 观察: 动物经口灌胃后每天观察 1 次, 至少连续观察 21 d, 观察指标同附录 A 中的 A.5.1.4。

C.6 结果与报告

对 C.5.1 和 C.5.2 的动物实验结果进行统计学分析和综合评价, 内容同附录 A 中的 A.6。

附录 D

食品用放线菌的致病性试验方法

D.1 范围

本方法规定了食品用放线菌的致病性试验方法。

本方法适用于食品用放线菌的致病性评价。

D.2 设备和材料

除微生物实验室常规设备外，其他设备与材料如下：

- D.2.1 恒温培养箱：36 °C ±1 °C。
- D.2.2 离心机：离心力 ≥ 3 000 ×g。
- D.2.3 电子天平：感量分别为 0.1 g 和 0.001 g。
- D.2.4 比浊仪。
- D.2.5 温湿度计。
- D.2.6 显微镜：10×~100×。
- D.2.7 无菌锥形瓶：容量 100 mL、500 mL。
- D.2.8 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。
- D.2.9 无菌试管：16 mm×160 mm。
- D.2.10 无菌培养皿：直径 90 mm。
- D.2.11 无菌量筒：容量 100 mL
- D.2.12 微量移液器及配套吸头：量程 100μL~1 000μL。
- D.2.13 注射器：量程 100μL~1 000μL。
- D.2.14 小鼠灌胃针头。

D.3 培养基和试剂

D.3.1 葡萄糖天门冬素培养基：葡萄糖 10 g，天门冬素 0.5 g，K₂HPO₄ 0.5 g，加水至 1 000 mL，调节 pH 至 7.2~7.4，分装后 121 °C 高压灭菌 15 min，备用。商品化葡萄糖天门冬素琼脂培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 °C 高压灭菌 15 min，制备葡萄糖天门冬素平板，备用。

D.3.2 高氏合成 1 号培养基：可溶性淀粉 20 g，KNO₃ 1.0 g，K₂HPO₄ 0.5 g，MgSO₄·7H₂O 0.5 g，NaCl 0.5 g，FeSO₄·7H₂O 0.01 g，加蒸馏水 1 000 mL，调节 pH 至 7.2~7.4，分装后 121 °C 高压灭菌 20 min，备用。商品化高氏合成 1 号琼脂培养基按照产品说明书用蒸馏水配制，充分加热溶解后分装，121 °C 高压灭菌 15 min，制备高氏合成 1 号平板，备用。

如拟评价菌株在葡萄糖天门冬素培养基或高氏合成 1 号培养基上的生长状态不理想，可選用适于该菌株生长的其他培养基。

D.4 实验动物

见附录 A.4。

D.5 操作步骤

对于国内外均无使用历史的菌株，或国内外虽有使用历史、但对人和动物健康有不良影响记载或报道的菌株，必须使用腹腔注射和经口灌胃两种途径给予动物受试物，以评价不同受试物给予途径对动物的致病性。

对于国内外均有使用历史、且使用过程中未发现对人和动物健康有不良影响的菌株，可选择经口灌胃单一途径给予动物受试物，以评价受试物对动物的致病性。

D.5.1 腹腔注射

D.5.1.1 菌株活化：将放线菌菌株接种于葡萄糖天门冬素培养基、或高氏合成 1 号培养基或适于该菌株生长的其他培养基平板，并在适宜的培养条件下（包括培养温度、湿度、通气量等）培养一定时间（培养时间长短视不同菌种而异），确认为纯培养后备用。

D.5.1.2 菌悬液制备：刮取 D.5.1.1 平板上的菌落，将其悬浮于无菌生理盐水中，充分混匀后，用适量无菌生理盐水调整菌悬液浓度并比浊，使最终菌悬液中的菌浓度达到 5.0×10^7 CFU/mL，用于小鼠腹腔注射。

D.5.1.3 腹腔注射：小鼠不少于 40 只，雌雄各半，随机分成 4 组（每组不少于 10 只），包括雄性小鼠无菌生理盐水对照组、雄性小鼠菌悬液组、雌性小鼠无菌生理盐水对照组、雌性小鼠菌悬液组。注射量为 0.2 mL/只，即受试物组每只小鼠注射菌量至少 1×10^7 CFU。

D.5.1.4 动物观察：动物腹腔注射后每天观察 1 次，连续观察至少 21 d。观察指标同附录 A 中的 A.5.1.4。

D.5.2 经口灌胃：同附录 A 中的 A.5.2。

D.5.2.1 菌数预估：同附录 A 中的 A.5.2.1。

D.5.2.2 菌悬液制备：同附录 A 中的 A.5.2.2。

D.5.2.2.1 培养上清液的制备：同附录 A 中的 A.5.2.2.1。

D.5.2.2.2 菌悬液原液的制备：同附录 A 中的 A.5.2.2.2。

D.5.2.2.3 5 倍浓缩菌悬液的制备：同附录 A 中的 A.5.2.2.3。

D.5.2.3 灌胃：同附录 A 中的 A.5.2.3。

D.5.2.4 观察：同附录 A 中的 A.5.2.4。

D.6 结果与报告

对 D.5.1 和 D.5.2 的动物实验结果进行统计学分析和综合评价，内容同附录 A 中的 A.6。

附录 E

食品用细菌菌种抗微生物药物耐药性的测定—微量肉汤稀释法

E.1 范围

本方法规定了食品用细菌菌种抗微生物药物耐药性的测定方法。

本方法适用于食品用细菌菌种抗微生物药物耐药性的测定。

E.2 设备和材料

除微生物实验室常规设备外，其他设备与材料如下：

- E.2.1 恒温培养箱：28 °C \pm 1 °C、32 °C \pm 1 °C和 37 °C \pm 1 °C。
- E.2.2 厌氧培养箱或厌氧培养罐。
- E.2.3 比浊仪。
- E.2.4 高压灭菌器。
- E.2.5 水浴锅：28 °C \sim 55 °C，温度精度 \pm 1 °C。
- E.2.6 pH 计：25 °C下精度为 \pm 0.1 pH。
- E.2.7 具盖（或塞）试剂瓶：容量分别为 150 mL、250 mL、500 mL、1 000 mL。
- E.2.8 无菌吸管：量程分别为 0.05 mL（具 0.001 mL 刻度）、0.1 mL（具 0.01 mL 刻度）、1.0 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度），或同等量程的微量移液器及配套吸头。
- E.2.9 无菌培养皿：直径 90 mm。
- E.2.10 无菌玻璃或金属刮刀。
- E.2.11 无菌滤膜：孔径 0.22 μ m。
- E.2.12 具盖（塞）无菌试管：5 mL、20 mL 和 50 mL。
- E.2.13 干燥箱或烤箱。
- E.2.14 无菌套管：2 mL。
- E.2.15 分光光度计：625 nm。
- E.2.16 标准 96 孔微孔板。

E.3 培养基和试剂

E.3.1 MRS 琼脂培养基

蛋白胨 10.0 g，牛肉粉 10.0 g，酵母提取物 5.0 g，葡萄糖 20.0 g，吐温 80 1.0 mL，七水磷酸氢二钾（ $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ）2.0 g，醋酸钠（ $NaCH_3CO_2 \cdot 3H_2O$ ）5.0 g，柠檬酸铵 $[(NH_4)_2HC_6H_5O_7] \cdot 2.0$ g，七水硫酸镁（ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ）0.2 g，四水硫酸锰（ $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ）0.05 g，琼脂粉 10.0 g \sim 15.0 g（视琼脂的凝胶强度决定琼脂粉的量）。加入蒸馏水 1 000 mL，加热充分溶解后，调节 pH 至 6.2 \pm 0.2，分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。于水浴中冷却至 48 °C，倾注平板，每板约 15 mL \sim 20 mL，静置凝固后备用。制备好的平板可于塑料袋中密封包装，2 °C \sim 8 °C 下避光保存 1 周。

E.3.2 MRS-半胱氨酸琼脂（MRS-Cys 琼脂）培养基

E.3.2.1 L-半胱氨酸储备液：称取 0.3 g L-半胱氨酸盐酸盐，加到 10 mL 蒸馏水中，充分溶解后过 0.22 μ m 滤膜除菌，过滤除菌后的 L-半胱氨酸储备液可于 2 °C \sim 8 °C 下避光保存 1 周。

E.3.2.2 MRS-Cys 琼脂培养基：取 E.3.1.1 制备好的 MRS 基础培养基 100 mL，加热溶解，调节 pH 至 6.2 \pm 0.2 后 121 °C 高压灭菌 15 min，在水浴锅中冷却至 48 °C，加入 2.1 制备好的 L-半胱氨酸储备液 1 mL，混匀后倾注平板，每板约 15 mL \sim 20 mL，静置凝固后备用。制备好的平板可密封包装于塑料袋中，于 2 °C \sim 8 °C 下避光保存 1 周。

E.3.3 M17-蔗糖琼脂培养基

E.3.3.1 基础培养基 M17 琼脂：胰蛋白胨 5.0 g，大豆蛋白胨 5.0 g，牛肉粉 5.0 g，酵母膏

(干粉) 2.5 g, 抗坏血酸 ($C_6H_8O_6$) 0.5 g, 七水硫酸锰 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.25 g, 五水甘油磷酸钠 ($C_3H_7PO_6Na_2 \cdot 5H_2O$) 19.0 g, 琼脂粉 10.0 g~15.0 g (视琼脂的凝胶强度决定琼脂粉的量), 加蒸馏水 950 mL, 加热溶解, 调节 pH 至 7.35 ± 0.2 , 分装后 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min, 置于水浴中冷却至 $48\text{ }^\circ\text{C}$ 备用。

E. 3. 3. 2 蔗糖储备液: 称取 5 g 蔗糖加入到 50 mL 的蒸馏水中, 充分溶解后过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜除菌。

E. 3. 3. 3 M17-蔗糖琼脂培养基: 取 E.3.3.1 中制备好的 M17 琼脂培养基 95 mL, 加入 E.3.3.2 制备好的蔗糖储备液 5 mL (加入过程中避免气泡产生), 混匀后倾注平板, 每板约 15 mL~20 mL, 静置凝固。制备好的平板可密封包装于塑料袋中, $2\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $8\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存 2 周。

E. 3. 4 M17-乳糖琼脂

E. 3. 4. 1 乳糖储备液: 称取 5 g 乳糖于 50 mL 蒸馏水中, 充分溶解后过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜除菌。

E. 3. 4. 2 M17-乳糖琼脂培养基: 取 E.3.3.1 中制备好的 M17 琼脂 95 mL, 加入 E.3.4.1 制备好的乳糖储备液 5 mL, 混匀(加入过程中避免气泡产生)后倾注平板, 每板约 15 mL~20 mL, 静置凝固。制备好的平板可密封包装于塑料袋中, $2\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $8\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存 2 周。

E. 3. 5 Elliker 琼脂培养基

胰酶消化的酪蛋白 20.0 g, 酵母膏 5.0 g, 明胶 2.5 g, 右旋糖 5.0 g, 乳糖 5.0 g, 蔗糖 5.0 g, 氯化钠 4.0 g, 醋酸钠 ($NaCH_3CO_2 \cdot 3H_2O$) 1.5 g, 抗坏血酸 ($C_6H_8O_6$) 0.5 g, 琼脂粉 10.0 g~15.0 g (视琼脂的凝胶强度决定加入琼脂粉的量), 加入蒸馏水 1 000 mL, 加热溶解后, 调节 pH 至 6.95 ± 0.2 , 分装后 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min, 于水浴中冷却至 $48\text{ }^\circ\text{C}$ 后倾注平板, 每板约 15 mL~20 mL, 静置凝固。制备好的平板可密封包装于塑料袋中, $2\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $8\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存 2 周。

E. 3. 6 IST 培养基

水解酪蛋白 11.0 g, 蛋白胨 3.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 氯化钠 3.0 g, 可溶性淀粉 1.0 g, 磷酸氢二钠 2.0 g, 醋酸钠 1.0 g, 甘油磷酸镁 0.2 g, 葡萄糖酸钙 0.1 g, 硫酸钴 (II) 0.001 g, 硫酸铜 (II) 0.001 g, 硫酸锌 0.001 g, 硫酸铁 (II) 0.001 g, 二氯化镁 (II) 0.002 g, 维生素 K 0.001 g, 维生素 B12 0.001 g, 盐酸 L-半胱氨酸 0.02 g, L-色氨酸 0.02 g, 维生素 B6 0.003 g, 泛酸 0.003 g, 烟碱 0.003 g, 维生素 H 0.0003 g, 维生素 B1 0.00004 g, 腺嘌呤 0.01 g, 鸟嘌呤 0.01 g, 黄嘌呤 0.01 g, 尿嘧啶 0.01 g, 加入蒸馏水 1 000 mL (当用于耐药性测定时, 只需加 500 mL 水), 加热溶解后, 调节 pH 至 7.4 ± 0.2 , 分装后 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。制备好的培养基可密封后于 $2\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $8\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存 2 周。

E. 3. 7 IST 乳糖培养基

无菌操作取 E.3.6 中制备好的 IST 培养基 90 mL, 加入 E.3.4.1 制备好的乳糖储备液 10 mL, 充分混匀。当用于耐药性测定时, IST 培养基只加 1/2 体积的蒸馏水。制备好的培养基可密封后于 $2\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $8\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存 2 周。

E. 3. 8 LSM 培养基

取 E.3.6 制备好的 IST 培养基 90 mL, 加入 E.3.1 中制备好的不含琼脂粉的 MRS 培养基 10 mL, 混匀。当用于耐药性测定时, IST 培养基和不含琼脂粉的 MRS 培养基均只加 1/2 体积的蒸馏水。调节 pH 至 6.85 ± 0.1 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。制备好的培养基可密封后于 $2\text{ }^\circ\text{C}$ ~ $8\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存 2 周。

E. 3. 9 LSM-半胱氨酸培养基 (LSM-Cys 培养基)

取 L-半胱氨酸盐酸盐 0.03 g, 加至 E.3.8 中制备好的 100 mL 未灭菌的 LSM 培养基中, 混匀至完全溶解。当用于耐药性测定时, IST 培养基和不含琼脂粉的 MRS 培养基均只加 1/2 体积的蒸馏水。调节 pH 至 6.85 ± 0.1 后 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。制备好的培养基可密封后

于 2℃~8℃ 下避光保存 1 周。

E.4 操作步骤

E.4.1 待测菌株的复苏及活化

E.4.1.1 冻干的菌株可按表 E.1 给定的培养基, 在不含琼脂的相应液体培养基中复苏后再进行测定。

E.4.1.2 将待测菌株按表 E.1 的规定, 在相应推荐的琼脂培养基和培养条件下活化。若菌株在推荐的培养基和培养条件下生长状况不佳, 则可添加其他适于该菌生长的碳源或改变培养条件, 确保菌株生长良好。

表 E.1 推荐的培养条件

菌种名称	培养基	培养温度 (℃)	培养条件	培养时间 (h)
双歧杆菌属	MRS-半胱氨酸琼脂	37	厌氧	24~48
短乳杆菌	MRS 琼脂	28	厌氧或有氧	24~48
植物乳杆菌/戊糖乳杆菌	MRS 琼脂	28	厌氧或有氧	24~48
清酒乳杆菌	MRS 琼脂	28	厌氧或有氧	24~48
德氏乳杆菌	MRS 琼脂	37	厌氧或有氧	24~48
乳酸乳杆菌	M17-乳糖琼脂或 Elliker 琼脂	32	厌氧或有氧	24~48
其他乳杆菌	MRS 琼脂	37	厌氧或有氧	24~48
嗜热链球菌	M17-乳糖琼脂或 Elliker 琼脂	37	厌氧或有氧	24~48

注: 其他细菌可根据细菌本身特点选择适宜培养基、培养条件和培养时间。

E.4.2 质控菌株

每次耐药性测定均需用标准菌株同步操作进行质量控制。

E.4.2.1 推荐使用的质控菌株包括植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) ATCC 14917, 副干酪乳杆菌 (*L. paracasei*) ATCC 334, 乳酸乳杆菌 (*L. lactis*) ATCC 19435, 嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) LMG 18311, 长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) ATCC 15707。

E.4.2.2 质控菌株的使用条件

E.4.2.2.1 待测乳酸杆菌在 28℃ 条件下培养时, 推荐用植物乳杆菌 (*L. plantarum*) ATCC 14917 作质控菌株。

E.4.2.2.2 待测乳酸杆菌在 32℃ 条件下培养时, 推荐用乳酸乳杆菌 (*L. lactis*) ATCC 19435 作质控菌株;

E.4.2.2.3 待测乳酸杆菌在 37℃ 条件下培养时, 推荐用副干酪乳杆菌 (*L. paracasei*) ATCC 334 作质控菌株;

E.4.2.2.4 对嗜热链球菌进行耐药性测定时, 推荐用嗜热链球菌 (*S. thermophilus*) LMG 18311 作质控菌株;

E.4.2.2.5 对双歧杆菌进行耐药性测定时, 推荐用长双歧杆菌 (*B. longum*) ATCC 15707 作质控菌株。

E.4.3 微量稀释板的制备

E.4.3.1 抗微生物药物种类及配制

试验用抗微生物药物种类、浓度范围和配制方法见表 E.2。

表 E.2 试验用抗微生物药物及配制^a

抗微生物药物	所属类别	浓度范围 (mg/L)	溶剂 ^c	稀释剂 ^d
庆大霉素	氨基糖苷类	0.5~256	水	水
卡那霉素	氨基糖苷类	2~1024	水	水
链霉素	氨基糖苷类	0.5~256	水	水
四环素	四环素类	0.125~64	水	水
红霉素	大环内酯类	0.016~8	95%乙醇或冰醋酸	水
克林霉素	林可酰胺类	0.032~16	水	水
氯霉素	氯霉素类	0.125~64	95%乙醇	水
氨苄西林	青霉素类	0.032~16	0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH=8.0	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液, pH=8.0
万古霉素	糖肽类	0.25~128	水	水
环丙沙星	喹诺酮类	0.25~128	水	水
泰利菌素	大环内酯类	0.5~256	冰醋酸 ^b	水
粘菌素	脂肽类	0.25~128	水	水
磷霉素	磷霉素类	1~512	水	水

^a表中涉及的溶剂和稀释剂大多数来源于 CLSI 的 M100-S16 文件。该文件会定期更新, 建议试验前查阅并参考最新版 CLSI 的 M100-S16 文件。

^b使用冰醋酸做溶剂时, 先加 1/2 体积的水做溶剂, 然后逐滴加冰醋酸直至药物溶解并补充到所需体积。

^c用于溶解粉末状抗微生物药物的溶液。

^d用于稀释抗微生物药物溶液的试剂。

E.4.3.2 微量稀释板中抗微生物药物的布局

微量稀释板中抗微生物药物布局见表 E.3。

表 E.3 微量稀释板中抗微生物药物布局 (单位为 mg/L)

A 板												
抗微生物药物	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 ^b
庆大霉素	P	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	N
卡那霉素	P	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	N
链霉素	P	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	N
四环素	P	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	N
红霉素	P	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	N
克林霉素	P	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	N
氯霉素	P	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	N
氨苄西林	P	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	N

^aP 代表阳性对照孔, 不添加任何抗微生物药物, 只添加待测菌株和含有用于溶解抗微生物药物溶剂 (最高浓度) 的培养基。

^bN 代表阴性对照孔, 既不加抗微生物药物也不加待测菌株, 只添加培养基。对屎肠球菌而言, 所使用的卡那霉素浓度范围为 4 mg/L~2048 mg/L。

B 板

抗微生物药物	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 ^b
万古霉素	P	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	N
环丙沙星	P	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	N
泰利菌素	P	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	N
粘菌素	P	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	N
磷霉素	P	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	N

^aP 代表阳性对照孔, 不添加任何抗微生物药物, 只添加待测菌株和含有用于溶解抗微生物药物溶剂 (最高浓度) 的培养基。

^bN 代表阴性对照孔, 既不加抗微生物药物也不加待测菌株, 只添加培养基。对屎肠球菌而言, 所使用的卡那霉素浓度范围为 4 mg/L~2048 mg/L。

E.4.3.3 抗微生物药物储备液的制备: 所配制抗微生物药物储备液的浓度可根据其溶解性而定, 但至少应在 1 024 mg/L 以上。储备液应按表 E.2 要求选用适宜的溶剂, 连续稀释制

备成适宜浓度的工作液。如需对储备液进行灭菌处理，可使用无菌滤膜过滤除菌，同时在过滤前后进行比对试验，以确保不出现滤膜吸附抗微生物药物的现象。所有的抗微生物药物储备液均应现用现配，特殊情况除外（如需要特殊储存条件以确保储备液的稳定性）。

E. 4. 3. 4 所需抗微生物药物质量的计算：使用以下公式来计算所需固体抗微生物药物的质量（式 E.1）或溶解液体积（式 E.2）：

$$m = \frac{V \times \rho}{P} \dots\dots\dots (E.1)$$

$$V = \frac{m \times P}{\rho} \dots\dots\dots (E.2)$$

式中：

ρ - 储备液浓度，单位为 mg/L；

m - 抗微生物药物（粉状）质量，单位为 g；

P - 抗微生物药物浓度，单位为 mg/g；

V - 稀释液体积，单位为 L。

E. 4. 3. 5 2 倍浓度抗微生物药物工作液的制备：以庆大霉素为例，将抗微生物药物储备液按照表 E.4 要求稀释，分别制备表 E.4 所需系列 2 倍浓度庆大霉素工作液。

表 E. 4 2 倍浓度庆大霉素工作液的制备

步骤	庆大霉素溶液	庆大霉素溶液浓度 mg/L	吸取体积 (mL)		2 倍浓度庆大霉素工作液 (mg/L)
			庆大霉素溶液	稀释剂	
1	庆大霉素储备液	5120	1	9	512
2	步骤 1 终溶液	512	1	1	256
3	步骤 1 终溶液	512	1	3	128
4	步骤 1 终溶液	512	1	7	64
5	步骤 4 终溶液	64	1	1	32
6	步骤 4 终溶液	64	1	3	16
7	步骤 4 终溶液	64	1	7	8
8	步骤 7 终溶液	8	1	1	4
9	步骤 7 终溶液	8	1	3	2
10	步骤 7 终溶液	8	1	7	1

参照表 E.4 的方法，分别制备表 E.3 中其他抗微生物药物系列 2 倍浓度的工作液。

E. 4. 3. 6 制板

以庆大霉素为例，按照表 E.3 中 A 板的布局，分别移取 50 μ L 浓度为 512 mg/L、256 mg/L、128 mg/L、64 mg/L、32 mg/L、16 mg/L、8 mg/L、4 mg/L、2 mg/L 和 1 mg/L 的 2 倍浓度庆大霉素工作液，加到 96 孔微量稀释板庆大霉素所在排对应的第 11、10、9、8、7、6、5、4、3 和 2 孔中。按此做法依次将其他待测抗微生物药物的系列 2 倍浓度工作液分别加至相对应的微孔板中，备用。制备好的抗微生物药物微量稀释板应尽快使用，如不能及时使用，需将其密封并在低于 -20 $^{\circ}$ C 条件下保存。微量稀释板中的抗微生物药物在低于 -20 $^{\circ}$ C 条件下可稳定保存数月。保存期间可用质控菌株检测其稳定性。

E. 4. 4 待测菌悬液的制备

挑取 E.4.1 中经复苏、活化后在培养基上生长良好的待测菌株新鲜菌落，于盛有 2 mL~5 mL 无菌生理盐水的玻璃试管中制成 1 麦氏浊度菌悬液，或用分光光度计在 625 nm 波长下测定其吸光度，使 OD 值范围为 0.16~0.20。此时，菌悬液中菌的浓度约为 3×10^8 CFU/mL。由于嗜热链球菌和德氏乳杆菌的某些株可能出现 1 麦氏浊度菌悬液中菌的浓度低于 3×10^8 CFU/mL 的现象，在此情况下需调整麦氏浊度稍高于 1，确保菌浓度达 3×10^8 CFU/mL 时方可使用。对于双歧杆菌，需使用提前一天置于厌氧环境中的 LSM 半胱氨酸培养基来制备菌悬液，其他细菌菌悬液制备参照 CLSI 相近种属进行。

E. 4.5 接种

依受试菌株不同，选择表 E.5 推荐的相应培养基将 E.4.4 中制备好的菌悬液稀释 500 倍后，依次加至 E.4.3.6 制备好的抗微生物药物微量稀释板中，每孔 50 μL 。冷冻保存的抗微生物药物微量稀释板使用前应置于厌氧条件下快速融化后方可使用。如使用包被有抗微生物药物的商品化微量稀释板，则选用表 E.5 中推荐的培养基将 E.4.4 制备好的菌悬液稀释 1000 倍后加至商品化抗微生物药物微量稀释板中，每孔 100 μL 。整个接种过程应在 30 min 内完成。

表 E.5 不同菌种进行抗微生物药物耐药性测定用培养基和培养条件

中文名称	培养基	培养温度 ($^{\circ}\text{C}$)	培养条件	培养时间 (h)
双歧杆菌属	LSM 半胱氨酸培养基	37	厌氧	48
短乳杆菌	LSM 培养基	28	厌氧	48
植物乳杆菌/戊糖乳杆菌	LSM 培养基	28	厌氧	48
清酒乳杆菌	LSM 培养基	28	厌氧	48
其他乳杆菌	LSM 培养基	37	厌氧	48
乳酸乳杆菌	IST 培养基	32	厌氧	48
嗜热链球菌	IST-乳糖培养基	37	厌氧	48

注：对双歧杆菌进行耐药性测定时，建议在试验前一天将实验用培养基提前置于厌氧环境中，其他细菌进行抗微生物药物耐药性测定方法参照 CLSI 相近种属进行。

E. 4.6 培养

将接种菌悬液后的微量稀释板于表 E.5 所推荐的相应条件下培养。培养时微量稀释板不宜堆放过高，以确保每块微量稀释板在相同的温度、湿度、通气量等条件下培养。

E. 4.7 结果读取

E. 4.7.1 微量稀释板培养 48 h 后，记录每种抗微生物药物完全抑制待测菌株生长的最小浓度，即该菌的最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC)。

E. 4.7.2 结果记录前，应首先检查阳性和阴性对照孔，若阳性对照孔细菌生长良好、阴性对照孔无细菌生长且质控菌株对所有抗微生物药物的 MIC 值均在质控范围内，则各抗微生物药物对待测菌株的 MIC 值结果可信，否则结果不可信，需重复试验。

E. 4.7.3 若在含有连续梯度稀释的抗微生物药物微孔中加入待测菌悬液时，出现待测菌株不连续（或间断）生长的情况，则结果不可信，需重复试验。

E. 4.8 结果判定

参照欧盟食品安全局动物饲料添加剂和产品专家组定义的微生物耐药折点，报告待测菌种对抗微生物药物敏感 (Susceptible, S, 即低于折点值)、中介 (Intermediate, I) 或耐药 (Resistant, R, 即高于折点值)。具体见表 E.6。

表 E.6 不同抗微生物药物对相关菌株的折点值 (mg/L)

菌种名称	氨苄西林	万古霉素	庆大霉素	卡那霉素	链霉素	红霉素	克林霉素	四环素	氯霉素	环丙沙星	泰利霉素	粘菌素	磷霉素
专性同型发酵乳杆菌 ^a	2	2	16	16	16	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
嗜酸乳杆菌群	1	2	16	64	16	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
专性同型发酵乳杆菌 ^b	2	n.r.	16	64	64	1	4	8 ^c	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
罗伊乳杆菌	2	n.r.	8	64	64	1	4	32	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
兼性厌氧异型乳酸菌 ^d	4	n.r.	16	64	64	1	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
植物/戊糖乳杆菌	2	n.r.	16	64	n.r.	1	4	32	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
鼠李糖乳杆菌	4	n.r.	16	64	32	1	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
干酪/副干酪乳杆菌	4	n.r.	32	64	64	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
双歧杆菌	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
小球菌	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
明串珠菌属	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
乳酸乳球菌	2	4	32	64	32	1	1	4	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
嗜热链球菌	2	4	32	n.r.	64	2	2	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
芽胞杆菌	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
丙酸杆菌属	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
尿肠球菌	2	4	32	1024	128	4	4	4	16	n.r.	4	n.r.	n.r.
棒状杆菌属和其他 G ⁺ 菌	1	4	4	16	8	1	4	2	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
肠杆菌科	8	n.r.	2	8	16	n.r.	n.r.	8	n.r.	0.06	n.r.	2	8

注 1: n.r. 不需要。
注 2: 表中未列出的菌, 若是 G⁺菌, 则应参考其他 G⁺菌判定, 若是 G⁻菌, 则应参考肠杆菌科判定。
注 3: 折点值应该与已经发表的、有关该种或相关种已发表的文献或实验室内尚未发表的数据进行比对。

^a 包括德氏乳酸杆菌和瑞士乳杆菌。
^b 包括发酵乳杆菌。
^c 对布氏乳杆菌而言, 四环素的 MIC 值为 128 mg/L。
^d 包括同型发酵的唾液乳杆菌。

E. 4.9 质控菌株的质控标准

试验用质控菌株的 MIC 值应在规定范围内，具体见表 E.7。

表 E.7 质控菌株 MIC 值的质控范围 (mg/L)

抗微生物药物	副干酪乳杆菌 ATCC 334	植物乳杆菌 ATCC 14917	长双歧杆菌 ATCC 15707	乳酸乳杆菌 ATCC 19435	嗜热链球菌 LMG 18311
庆大霉素	1~4	-	4~32	0.5~2	0.5~4
卡那霉素	16~64	-	64~512	2~8	8~32
链霉素	8~32	-	8~64	2~16	2~16
四环素	1~4	8~32	0.5~2	0.5~2	0.25~2
红霉素	0.06~0.5	0.25~2	0.03~0.25	0.12~0.5	0.06~0.25
克林霉素	0.06~0.25	0.5~4	0.03~0.12	0.25~1	0.03~0.25
氯霉素	2~8	4~16	0.5~4	2~16	2~8
氨苄西林	0.5~2	0.25~2	0.25~1	0.12~1	0.03~0.25
万古霉素	-	-	0.5~2	0.25~1	0.25~1
环丙沙星	1~4	16~64	4~16	4~16	1~8
泰利霉素	-	-	-	-	-
粘菌素	-	-	-	-	-
磷霉素	-	-	-	-	-

注：“-”表示不适用。

附录 F

食品用真菌产真菌毒素能力测定方法

F.1 范围

本方法规定了食品用真菌产真菌毒素能力的测定方法。

本方法适用于食品用真菌产真菌毒素能力的测定。

本方法规定了食品用真菌在试验条件下的产毒试验方法，对培养物中毒素的测定，按照我国、国际组织及相关国家规定的标准检测方法进行。

F.2 设备和材料

除微生物实验室常规设备外，其他设备与材料如下：

F.2.1 恒温培养箱：温度范围 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

F.2.2 高压灭菌器。

F.2.3 电子天平：感量为 0.1 g。

F.2.4 锥形瓶：容量为 250 mL、500 mL、1 000 mL。

F.2.5 显微镜： $10\times\sim 100\times$ 。

F.2.6 微量移液器及配套吸头：量程为 $100\text{ }\mu\text{L}\sim 1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 。

F.2.7 生物安全柜。

F.2.8 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。

F.2.9 无菌量筒：容量 100 mL~1 000 mL。

F.2.10 温湿度计。

F.2.11 接种针。

F.2.12 分离针。

F.2.13 无菌试管：16 mm×160 mm。

F.2.14 无菌培养皿：直径 90 mm。

F.2.15 载玻片。

F.2.16 盖玻片。

F.3 培养基及其制备

对能够产生毒素的食品用真菌菌种，应在多种基质和条件下（单品种固体、多品种固体复合、不同成分液体组合等）进行产毒试验，并进行有毒活性代谢产物真菌毒素含量的检测。

F.3.1 菌种活化用固体培养基

F.3.1.1 麦芽汁琼脂：同附录 B 中的 B.3.1。

F.3.1.2 马铃薯葡萄糖琼脂：同附录 B 中的 B.3.2。

F.3.1.3 查氏培养基：商品化培养基按照产品说明配制，加热充分溶解后分装， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min 后备用。

F.3.2 产毒用培养基

以下培养基中 F.3.2.1~F.3.2.7 为液体培养基，F.3.2.8~F.3.2.11 为固体培养基。

F.3.2.1 查氏酵母膏培养基： K_2HPO_4 1 g，查氏浓缩液 10 mL，酵母提取物 5 g，蔗糖 30 g，用 1 000 mL 蒸馏水溶解后，分装至 250 mL 锥形瓶中，每瓶 100 mL， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min 后备用。

F.3.2.2 查氏酵母膏加 20% 蔗糖培养基： K_2HPO_4 1 g，查氏浓缩液 10 mL，酵母提取物 5 g，蔗糖 50 g，用 1 000 mL 蒸馏水溶解后，分装至 250 mL 锥形瓶，每瓶 100 mL， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压

灭菌 15 min 后备用。

F. 3. 2. 3 查氏酵母膏加 0.5% NaCl 培养基: K_2HPO_4 1 g, 查氏浓缩液 10 mL, 酵母提取物 5 g, 蔗糖 30 g, NaCl 5 g, 用 1 000 mL 蒸馏水溶解后, 分装至 250 mL 锥形瓶, 每瓶 100 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min 后备用。

F. 3. 2. 4 大米粉玉米浸出液培养基 (Rice corn steep medium, RC): 大米粉 5 g, 玉米浸出液 4 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05 g, 用 1 000 mL 蒸馏水溶解后, 分装至 250 mL 锥形瓶, 每瓶 100 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min 后备用。

F. 3. 2. 5 马铃薯葡萄糖肉汤培养基: 称取商品化马铃薯葡萄糖肉汤培养基 3.5 g, 加入 1 000 mL 蒸馏水溶解后分装至 250 mL 锥形瓶, 每瓶 100 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min 后备用。

F. 3. 2. 6 酵母提取物蔗糖 (Yeast extract sucrose, YES) 液体培养基: 酵母提取物 10 g, 蔗糖 50 g, 用 1 000 mL 蒸馏水溶解后, 调节 pH 至 7.0, 分装至 250 mL 锥形瓶, 每瓶 100 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min 后备用。

F. 3. 2. 7 麦芽汁培养基: 取未经发酵、未加酒花的啤酒生产用麦芽汁, 分装到 250 mL 锥形瓶中, 每瓶 100 mL, 121 °C 高压 15 min, 备用。

F. 3. 2. 8 大米培养基: 取大米 20 g, 置于 500 mL 或 1 000 mL 锥形瓶中, 根据不同菌株产生毒素的湿度要求, 用蒸馏水调整培养基的水分及 pH 值, 121 °C 高压 20 min, 冷却后手心击拍瓶体将结块的米粒打散, 之后每日 121 °C 高压 20 min 一次, 连续灭菌 3 天, 每次高压冷却后均需拍击打散, 备用。

F. 3. 2. 9 玉米培养基: 取粉碎后的玉米渣 20 g (不要粉碎的过细, 粒径 0.2 mm~0.5 mm 左右) 至 500 mL 或 1 000 mL 锥形瓶中, 根据不同菌株产生毒素的湿度要求, 用蒸馏水调整培养基的水分及 pH 值, 121 °C 高压 20 min, 冷却后手心击拍瓶体将结块的玉米渣粒打散, 之后每日 121 °C 高压 20 min 一次, 连续灭菌 3 天, 每次高压冷却后均需拍击打散, 备用。

F. 3. 2. 10 麦麸培养基: 取麦麸 20 g 至 500 mL 或 1 000 mL 锥形瓶中, 根据不同菌株产生毒素的湿度要求, 用蒸馏水调整培养基的水分及 pH 值, 121 °C 高压 20 min, 冷却后手心击拍瓶体将结块的麦麸打散, 之后每日 121 °C 高压 20 min 一次, 连续灭菌 3 天, 每次高压冷却后均需拍击打散, 备用。必要时可用全麦粒替代麦麸进行产毒试验。

F. 3. 2. 11 固体复配培养基: 大米、玉米碴、麦麸 (或全麦粒) 以 1: 1: 1 比例混合后, 取 20 g 至 500 mL 或 1 000 mL 锥形瓶中, 根据不同菌株产生毒素的湿度要求, 用蒸馏水调整培养基的水分及 pH 值, 121 °C 高压 20 min, 冷却后手心击拍瓶体将结块的培养基打散, 之后每日 121 °C 高压 20 min 一次, 连续灭菌 3 天, 每次高压冷却后均需拍击打散, 备用。

在对拟评价菌株进行产毒试验时, 所选的产毒培养基除了生产用基质外, 还需从以上所列培养基中至少选择三种液体培养基、三种固体培养基、和含有三种固体培养基成分的固体复配培养基。

F. 4 操作步骤

F. 4. 1 产毒试验前对送检菌种的处理

送检菌种必须为纯菌种, 转种到适宜的培养基斜面后, 28 °C ± 1 °C 培养 5 d~7 d, 确证为活的纯培养物后方可进行产毒试验。转种用培养基曲霉属一般选用查氏培养基, 红曲霉选用麦芽汁琼脂培养基, 其他菌种选用马铃薯葡萄糖琼脂培养基。

F. 4. 2 产毒培养物制备及产毒培养

将送检菌种按照 F.4.1 要求转种活化后, 加 5 mL 无菌蒸馏水于斜面培养基试管中, 用接种针刮取斜面培养基上的菌丝体和孢子制备孢子悬液, 取一定量孢子悬液, 分别接种于从 F.3.2 中选取的适宜产毒培养基中, 充分混匀后, 置 28 °C ± 1 °C 培养 21 d (每天将固体/液体培养物振摇、混匀) 后, 进行真菌毒素测定。可根据不同菌、不同毒素适宜的产毒条件对

试验过程中的温度、湿度、光照、通气量、培养时间等进行调整。

F. 4.3 真菌毒素测定

有国家标准检测方法的，则参考国家标准检测方法进行真菌毒素测定；没有国家标准检测方法的，可以参考国际组织（如 ISO、AOAC 等）及相关国家规定的标准检测方法进行毒素测定。
