



中华人民共和国国家标准

GB 31615.2—2025

食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序

2025-03-16 发布

2026-03-16 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、放线菌、丝状真菌、酵母及单细胞藻类)的安全性评价程序。

本标准适用于食品、食品添加剂用活的微生物菌种(包括细菌、放线菌、丝状真菌、酵母及单细胞藻类)的安全性评价。

本标准不适用于遗传修饰微生物的安全性评价。

2 术语和定义

2.1 致病性

微生物感染宿主造成健康损害引起疾病的能力。

2.2 产毒能力

微生物产生对生物体有损伤作用物质的能力。

2.3 毒性

微生物有毒代谢产物引起的宿主健康损伤。

2.4 抗菌药物耐药性

微生物对抗菌药物的抗性,耐药性又分为固有耐药(又称天然耐药)和获得性耐药两类。

2.5 固有耐药性

微生物对抗菌药物的天然耐药,反映了1个种内所有或几乎所有野生型菌株的抗菌模式。一种由微生物基因组基因决定且代代相传、不依赖于基因的水平转移或染色体定位基因的自发突变且不随着物种的系统发育进化而消失或出现的特性,与抗菌药物的存在无关。

2.6 获得性耐药

当微生物接触抗菌药物后,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。可由水平转移元件(如质粒、转座子、整合子等)介导,或由染色体突变引起。

2.7 最低抑菌浓度

在规定的体外试验条件下、规定的时间内,可观察到抑制微生物生长的最低药物浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

2.8 全基因组测序

在1次测序中确定1个生物体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。

2.9 诱变

通过物理方法、化学诱变剂、生物因子诱发生物体遗传物质发生 1 个或多个突变的过程,其变种的发生频率显著高于自发突变。

3 拟评价微生物菌种的基本资料

3.1 基本信息

包括菌种名称(包括中文名、拉丁名、别名等)、来源及用途。

3.2 分类学资料

包括规范、科学的菌种分类学(属、种、亚种等)资料。当菌种分类学地位发生变化时,还应包含其重新分类后的名称及曾用名。

3.3 鉴定资料

包括基于表型和基因型的菌种鉴定资料。

3.4 生长环境条件资料

包括适宜于菌种生长的培养基及培养条件(包括但不限于培养时间、培养温度和湿度、需氧情况、光照等),以及菌种的保藏及复壮方法等。

3.5 诱变菌种的资料

经诱变的菌种,应包括其详细的诱变方法(包括使用的诱变剂、诱变条件及诱变试验流程等),以及诱变后其表型和基因型等发生的变化。

3.6 遗传稳定性资料

包括 1 个生产周期内最多传代次数 2 倍以上代数的菌种关键指标或特征的遗传稳定性资料。

3.7 生产相关信息

包括但不限于菌种用于食品、食品添加剂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。

3.8 其他资料

需要说明的其他技术资料。

4 评价方法

在掌握 3.1~3.8 所列资料基础上,对微生物菌种按照以下方法开展安全性评价:

- a) 国内外安全性评价资料分析:对菌种国内、国外使用历史及安全性(包括但不限于其致病性和产毒能力报告、临床试验资料、科技文献或综述等)进行综合分析。若无上述资料,应对同种内其他株或在亲缘关系上与其相近种属菌种的使用历史和安全性评价资料(包括但不限于与该菌种的亲缘性关系说明、基因序列匹配度分析等)进行分析。
- b) 全基因组测序:对菌种进行全基因组测序,分别获得其基因组框架图和完成图(藻类除外),并

对测序数据的毒力基因、耐药基因、毒素产生相关基因等进行综合分析。

c) 动物致病性试验：分别参照附录 A～附录 D 的方法或其他等效方法进行动物致病性试验，并对试验结果进行评价。

d) 耐药性试验：参照附录 E 中的方法或其他等效方法，对细菌菌种进行耐药性试验，同时结合全基因组测序获得的基因组完成图中耐药基因携带情况，进行综合评价。

e) 产毒试验：对细菌菌种，应对其基因组中产毒基因携带及表达情况进行综合分析与评价。若携带产毒基因且能表达，应参照生产条件进行包括生产用培养基在内的多种基质中（单品种固体、多品种固体复合、不同成分液体组合等）的产毒试验。产毒试验的培养时间应不短于 1 个产品生产周期，并按照食品安全国家标准规定的检验方法或其他等效方法进行毒素（或抗菌物质）含量（或活性）检测。

对真菌菌种，其产毒试验应参照附录 F 中的方法进行，并按照食品安全国家标准规定的检验方法或其他等效方法进行真菌毒素含量的测定。

放线菌产生的抗菌物质或藻类产生的藻类毒素应按照相应食品安全国家标准规定的检验方法或其他等效方法进行检验。

若产毒试验显示受试菌种产生毒素（或抗菌物质），则应根据产生毒素（或抗菌物质）的水平，并结合人群对用该菌种生产食品的摄入量，评估其对人群健康的影响。

f) 毒理学试验：对国内外均无食用习惯的菌种，应进行急性经口毒性试验/致病性试验、3 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菌种，应进行急性经口毒性试验/致病性试验、3 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菌种，可进行急性经口毒性试验/致病性试验、2 项遗传毒性试验。其中，2 项遗传毒性试验包括细菌回复突变试验和哺乳动物红细胞微核试验，3 项遗传毒性试验按照 GB 15193.1《食品安全国家标准 食品安全性毒理学评价程序》中规定的遗传毒性试验组合进行。

g) 其他活性物质测定：直接添加到供 1 岁以下婴儿食用食品中的菌种，还应按照食品安全国家标准规定的检验方法或其他等效方法进行 D-乳酸的测定。

具有溶血活性或可产生其他代谢产物的菌种，还应按照食品安全国家标准规定的检验方法或其他等效方法进行溶血活性物质或相关代谢产物的测定。

5 结果判定

5.1 致病性及产毒能力完全符合以下 3 种情况者认为该菌种是安全的：

a) 全基因组序列分析结果显示不存在已知的毒力/致病相关基因或毒素合成关键基因；或存在可能与致病相关的基因，但根据菌种的功能特性及文献资料排除该基因与宿主致病相关。

b) 动物试验显示无致病性。

c) 产毒试验结果显示在受试的所有基质中均不产生已知的、危害人类健康的活性代谢产物。

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，或产毒试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水平较低，评估结果表明长期摄入对人体健康无影响，结合国内外安全使用历史，可认为该菌种是安全的。

5.3 全基因组测序结果显示存在已知毒力/致病或毒素合成关键基因，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，认为该菌种是不安全的。

5.4 以下耐药性的判定原则仅适用于 5.1 及 5.2 中已确认为安全的细菌菌种：

a) 对受试抗菌药物无耐药性，表现为菌种对 1 种或几种受试抗菌药物的 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，或检测到与耐药表型直接相关的耐药基因但经试验证实其不介导耐药，则认为该菌种是安全的。

- b) 对受试抗菌药物具有固有耐药性,表现为菌种对 1 种或几种受试抗菌药物的 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,认为该菌种是安全的。
- c) 对受试抗菌药物产生获得性耐药,表现为菌种对 1 种或几种受试抗菌药物的 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,一般认为该菌种是安全的。
- d) 菌种对 1 种或几种抗菌药物的 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,则认为该菌种是不安全的。
- e) 若该菌种基因组中存在对世界卫生组织关于人类医学至关重要抗菌药物和高度重要抗菌药物列表中规定的抗生素耐药基因,则应结合其 MIC 值进行综合判定:
 - 若 MIC 值高于设定的阈值,则认为该菌种是不安全的;
 - 若 MIC 值低于设定的阈值,则应评估该耐药基因表达的可能性,若能表达,则认为该菌种是不安全的。

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 ℃±1 ℃。
- A.2.2 离心机:离心力 \geqslant 3 000 g。
- A.2.3 电子天平:感量分别为0.1 g 和0.001 g。
- A.2.4 比浊仪。
- A.2.5 温湿度计。温度计允许误差: ± 1 ℃,湿度计允许误差: $\pm 3\%$ RH。
- A.2.6 显微镜:10 \times ~100 \times 。
- A.2.7 厌氧培养装置:厌氧罐(袋、盒等)或厌氧培养箱。
- A.2.8 无菌锥形瓶:容量100 mL、500 mL。
- A.2.9 无菌吸管:1 mL(具0.01 mL刻度)、10 mL(具0.1 mL刻度)。
- A.2.10 无菌试管:16 mm×160 mm。
- A.2.11 无菌培养皿:直径90 mm。
- A.2.12 无菌量筒:容量100 mL。
- A.2.13 微量移液器及配套吸头:量程为100 μ L~1 000 μ L。
- A.2.14 注射器:量程为100 μ L~1 000 μ L。
- A.2.15 小鼠灌胃针头。
- A.2.16 无菌微孔滤膜:孔径0.22 μ m。

A.3 培养基和试剂

A.3.1 无菌生理盐水:0.85%的商品化生理盐水或8.5 g NaCl溶于1 000 mL蒸馏水中,分装后121 ℃高压灭菌15 min,备用。

A.3.2 LB(Luria-Bertan,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 ℃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 ℃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 μ m无菌微孔滤膜过滤除菌,备用。

A.3.5 含有半胱氨酸盐酸盐的MRS(Man Rogosa Sharpe)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 ℃高压灭菌15 min,待培养基冷却至50 ℃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 μ g/mL,备用。

A.3.6 含有半胱氨酸盐酸盐的MRS琼脂平板:商品化的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 ℃高压灭菌15 min,待培养基冷却至50 ℃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 μ g/mL,制备含有半胱氨酸盐酸盐的MRS琼脂平板,备用。

A.3.7 含有半胱氨酸盐酸盐的双歧杆菌琼脂平板:商品化的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,制备含有半胱氨酸盐酸盐的双歧杆菌琼脂平板,备用。

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。动物质量、实验室管理、试验条件等符合GB/T 35823《实验动物 动物实验通用要求》的规定。

A.5 操作步骤

对于国内外均无使用历史的菌种,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种,必须使用腹腔注射和经口灌胃2种途径给予动物受试物,以评价受试物不同给予途径对动物的致病性。

对于国内外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种,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、乳杆菌属、乳酪杆菌属、粘液乳杆菌属、乳植杆菌属、联合乳杆菌属、广布乳杆菌属等,除这些属以外,其他菌种在以下描述中均使用“其他细菌”。根据送检菌种的保存状态,将双歧杆菌、乳杆菌属、乳酪杆菌属、粘液乳杆菌属、乳植杆菌属、联合乳杆菌属、广布乳杆菌属接种含有半胱氨酸盐酸盐的MRS肉汤培养基、其他细菌接种LB肉汤培养基(或适于该菌生长的最适液体培养基中)活化(或传代使活力达到最佳),并置适宜的培养条件(包括培养温度、湿度、厌氧、需氧、微需氧等)下培养一定时间(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;乳杆菌属、乳酪杆菌属、粘液乳杆菌属、乳植杆菌属、联合乳杆菌属、广布乳杆菌属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(包括培养温度、湿度、厌氧、有氧、微需氧等)下培养一定时间(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浊度,使最终菌悬液中的菌浓度为 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、眼睛和黏膜、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,试验结束后称量并记录所有存活小鼠的体重。对于试验期间死亡的小鼠,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A.5.1.1的培养液,分别加至2个无菌离心管中,每管1 mL,3 000 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浊度,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,并分别记录每毫升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种培养液用量,吸取 A.5.1.1 培养液,将培养液一分为二,3 000 g 各离心 10 min 后,将上清液分别转至 100 mL 无菌量筒中,1 份上清液用于菌悬液原液的制备,另 1 份上清液冷冻浓缩至原体积的 1/5,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.5.2.1 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.5.2.1 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,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 体重的体积给小鼠灌胃,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:

- a) 受试物对动物一般健康情况有无不良影响;
- b) 受试物对动物体重等指标的影响;
- c) 受试物组动物死亡情况;
- d) 对受试物组和相对对照组小鼠的体重分别进行独立样本 *t* 检验,检验标准为 $\alpha=0.05$ 。若受试物组动物在试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。温度计允许误差:±1 ℃,湿度计允许误差:±3% RH。

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。

如菌种在上述2种培养基上的生长状态和产孢子量均不理想,可选用适于该菌种生长和产孢的其他培养基。

B.4 实验动物

见A.4。

B.5 操作步骤

对于国内外均无使用历史的菌种,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种,必须使用腹腔注射和经口灌胃2种途径给予动物受试物,以评价受试物不同给予途径对动物的致病性。

对于国内外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种,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 菌种活化

将送检菌种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,并置于适宜的培养条件下(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 产孢子量大的菌种: 将菌种接种于马铃薯葡萄糖琼脂平板(红曲霉属菌种接种麦芽汁琼脂平板)或适于菌种生长的培养基平板,28 ℃±1 ℃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种: 将菌种接种于适宜的培养基上,28 ℃±1 ℃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,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为 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,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体重的体积给小鼠灌胃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 ℃±1 ℃。

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。温度计允许误差:±1 ℃,湿度计允许误差:±3% RH。

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A.3.1。

C.3.2 麦芽汁琼脂平板:见B.3.2。

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 ℃高压灭菌15 min,备用。

如菌种在麦芽汁琼脂培养基上的生长状态不理想,可选用适于该菌种生长的其他培养基。

C.4 实验动物

见A.4。

C.5 操作步骤

对于国内外均无使用历史的菌种,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种,必须使用腹腔注射和经口灌胃2种途径给予动物受试物,以评价受试物不同给予途径对动物的致病性。

对于国内外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种,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 菌种活化:根据送检菌种的保存状态,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，并置于适宜的培养条件（包括培养温度、湿度、通气量等）下培养一定时间（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：将菌种接种麦芽汁琼脂平板， $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $5.0\times10^7\text{ CFU/mL}$ 。

C.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 $1.0\times10^7\text{ CFU}$ 。

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 A.5.1.4。

C.5.2 经口灌胃

C.5.2.1 菌种培养

将菌种接种到麦芽汁培养基中， $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 C.5.2.1 的培养液，分别加至 2 个无菌离心管中，每管 1 mL， $3\ 000\text{ g}$ 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 $2.5\times10^8\text{ CFU/mL}$ 和 $6.25\times10^8\text{ CFU/mL}$ ，并分别记录每毫升培养液离心后所得沉淀物中酵母菌数调整至 $2.5\times10^8\text{ CFU/mL}$ 和 $6.25\times10^8\text{ CFU/mL}$ 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种培养液用量，继而将培养液一分为二， $3\ 000\text{ g}$ 各离心 10 min 后，将上清液分别转至 100 mL 无菌量筒中，1 份上清液作为菌悬液原液的制备，另 1 份上清液冷冻浓缩至原体积的 2/5，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 中获得的酵母菌终浓度达到 $2.5\times10^8\text{ CFU/mL}$ 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菌数达到 $2.5\times10^8\text{ CFU/mL}$ （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 中获得的酵母菌终浓度达到 $6.25\times10^8\text{ CFU/mL}$ 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 $6.25\times10^8\text{ CFU/mL}$ 。

C.5.2.4 灌胃

小鼠不少于 80 只，雌雄各半，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 体重的体积给小鼠灌胃 1 次，使受试物组每只小鼠灌胃菌量分别为 $1.0\times10^8\text{ CFU}$ （原液组）和 $2.5\times10^8\text{ CFU}$ （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 A.5.1.4。

C.6 结果与报告

对 C.5.1 和 C.5.2 的动物试验结果进行统计学分析和综合评价，内容同 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 ℃±1 ℃。

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:温度计允许误差:±1 ℃,湿度计允许误差:±3% RH。

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 100 μL~1 000 μL。

D.2.13 注射器:量程 100 μL~1 000 μL。

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 ℃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 ℃高压灭菌 15 min,制备葡萄糖天门冬素平板,备用。

D.3.2 高氏 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、琼脂粉 15.0 g,加蒸馏水 1 000 mL,调节 pH 至 7.2~7.4,分装后 121 ℃高压灭菌 20 min,备用。商品化高氏 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 ℃高压灭菌 20 min,制备高氏 1 号平板,备用。

如菌种在葡萄糖天门冬素培养基或高氏 1 号培养基上的生长状态不理想,可选用适于该菌种生长的其他培养基。

D.4 实验动物

见 A.4。

D.5 操作步骤

对于国内外均无使用历史的菌种,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种,必须使用腹腔注射和经口灌胃 2 种途径给予动物受试物,以评价受试物不同给予途径对动物的致病性。

对于国内外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种,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 菌种活化:将放线菌菌种接种于葡萄糖天门冬素培养基或改良高氏1号培养基或适于该菌种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,使最终菌悬液中的菌浓度约为 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A.5.1.4。

D.5.2 经口灌胃

D.5.2.1 菌数预估

同A.5.2.1。

D.5.2.2 菌悬液制备

D.5.2.2.1 培养上清液的制备:同A.5.2.2.1。

D.5.2.2.2 菌悬液原液的制备:同A.5.2.2.2。

D.5.2.2.3 5倍浓缩菌悬液的制备:同A.5.2.2.3。

D.5.2.3 灌胃

同A.5.2.3。

D.5.2.4 观察

同A.5.2.4。

D.6 结果与报告

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

附录 E
食品用细菌菌种抗菌药物耐药性的测定
(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菌药物耐药性的测定方法。

本方法适用于食品用细菌菌种抗菌药物耐药性的测定。

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±1 °C、32 °C±1 °C 和 36 °C±1 °C。

E.2.2 厌氧培养装置:厌氧罐(袋、盒等)或厌氧培养箱。

E.2.3 比浊仪。

E.2.4 分光光度计:625 nm。

E.2.5 恒温水浴:28 °C~55 °C。

E.2.6 pH 计:25 °C下精度为±0.1。

E.2.7 电子天平:感量分别为 0.1 g 和 0.001 g。

E.2.8 具盖(或塞)试剂瓶:容量分别为 150 mL、250 mL、500 mL、1 000 mL。

E.2.9 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),或同等量程的移液器及配套吸头。

E.2.10 无菌培养皿:直径 90 mm。

E.2.11 标准微孔板:96 孔。

E.2.12 无菌滤膜:孔径 0.22 μm。

E.2.13 具盖(塞)无菌试管:10 mL、20 mL。

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(浸粉)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、三水乙酸钠($NaCH_3CO_2 \cdot 3H_2O$)5.0 g, 柠檬酸铵[$(NH_4)_2HC_6H_5O_7$]2.0 g、七水硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)0.1 g、四水硫酸锰($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)0.05 g、琼脂粉 10.0 g~15.0 g(视琼脂的凝胶强度可酌情增减琼脂粉的量),加入蒸馏水 1 000 mL(当用于耐药性测定时,不加琼脂粉,且加入蒸馏水的量为 500 mL),加热充分溶解后,调节 pH 至 6.4±0.1,分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。于水浴中冷却至 48 °C 后倾注平板,每板 15 mL~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~8 °C 下避光保存,1 周内使用完毕。

E.3.2 MRS-半胱氨酸琼脂(MRS-Cys 琼脂)培养基

E.3.2.1 L-半胱氨酸储备液的配制:称取 0.3 g L-半胱氨酸盐酸盐,加入 10 mL 蒸馏水中,充分溶解后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,过滤除菌后的 L-半胱氨酸储备液可于 2 °C~8 °C 下避光保存,1 周内使用。

完毕。

E.3.2.2 MRS-Cys 琼脂培养基平板制备:取 E.3.1 在水浴锅中冷却至 48 ℃左右的 MRS 基础培养基 100 mL, 加入 E.3.2.1 中制备好的 L-半胱氨酸储备液 1 mL, 混匀后倾注平板, 每板 15 mL~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 ℃~8 ℃下避光保存, 1 周内使用完毕。

E.3.3 M17-乳糖琼脂培养基

E.3.3.1 M17-基础培养基的配制:胰蛋白胨 5.0 g、大豆蛋白胨 5.0 g、牛肉粉 5.0 g、酵母提取物(浸粉) 2.5 g、抗坏血酸($C_6H_8O_6$) 0.5 g、七水硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 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(视琼脂的凝胶强度可酌情增减琼脂粉的量), 加蒸馏水 950 mL, 加热溶解, 调节 pH 至 7.4±0.1, 分装后 121 ℃高压灭菌 15 min, 置于水浴中冷却至 48 ℃备用。

E.3.3.2 乳糖储备液的配制:称取 5.0 g 乳糖于 50 mL 蒸馏水中, 充分溶解后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

E.3.3.3 M17-乳糖琼脂培养基的制备:取 E.3.3.1 中制备好的 M17 基础培养基 95 mL, 加入 E.3.3.2 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 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 ℃~8 ℃下避光保存, 2 周内使用完毕。

E.3.4 Elliker 琼脂培养基

胰酶消化的酪蛋白 20.0 g、酵母提取物(浸粉) 5.0 g、明胶 2.5 g、葡萄糖 5.0 g、乳糖 5.0 g、蔗糖 5.0 g、氯化钠 4.0 g、三水乙酸钠($NaCH_3CO_2 \cdot 3H_2O$) 1.5 g、抗坏血酸($C_6H_8O_6$) 0.5 g、琼脂粉 10.0 g~15.0 g(视琼脂的凝胶强度酌情增减加入琼脂粉的量), 加入蒸馏水 1 000 mL, 加热溶解后, 调节 pH 至 7.0±0.1, 分装后 121 ℃高压灭菌 15 min, 于水浴中冷却至 48 ℃后倾注平板, 每板 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 ℃~8 ℃下避光保存, 2 周内使用完毕。

E.3.5 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、乙酸钠 1.0 g、甘油磷酸镁 0.2 g、葡萄糖酸钙 0.1 g、硫酸钴 0.001 g、硫酸铜 0.001 g、硫酸锌 0.001 g、硫酸铁 0.001 g、氯化镁 0.002 g、维生素 K 0.001 g、维生素 B_{12} 0.001 g、盐酸 L-半胱氨酸 0.02 g、L-色氨酸 0.02 g、维生素 B_6 0.003 g、泛酸 0.003 g、烟碱 0.003 g、维生素 H 0.0003 g、维生素 B_1 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, 加入蒸馏水至 1 000 mL(用于耐药性测定时, 加入蒸馏水至 500 mL), 加热溶解后, 调节 pH 至 7.6±0.1, 分装后 121 ℃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, 2 周内使用完毕。对于 1 000 mL 的 IST 培养基中含量少于 0.001 g 的物质, 可事先配制 100 倍~1 000 倍的浓缩液, 继而按需要量换算成需要添加浓缩液的量。

E.3.6 IST 乳糖培养基

无菌操作取 E.3.5 中制备好的 IST 培养基 90 mL, 加入 E.3.3.2 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 培养基制备时加入蒸馏水的体积减半)。制备好的培养基可密封后于 2 ℃~8 ℃下避光保存, 2 周内使用完毕。

E.3.7 LSM 培养基

取 E.3.5 中制备好的 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 培养基制备时均只加 1/2 体积的蒸馏水。调节 pH 至 6.9 ± 0.1 ,121 ℃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,2 周内使用完毕。

E.3.8 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.3.7 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 培养基制备时均只加 1/2 体积的蒸馏水,调节 pH 至 6.9 ± 0.1 ,121 ℃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 周内使用完毕。

E.3.9 CAMHB 培养基

牛肉浸粉 3.0 g、酸水解酪蛋白 17.5 g、可溶性淀粉 1.5 g、氯化钙 0.05 g,加入蒸馏水 1 000 mL(用于耐药性测定时,加入蒸馏水的量为 500 mL),加热溶解后,调节 pH 至 7.5 ± 0.1 ,分装后 121 ℃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,2 周内使用完毕。

E.4 操作步骤

E.4.1 待测菌种的复苏及活化

- E.4.1.1 冻干的菌种可按表 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 将待测菌种按表 E.1 的规定,在相应推荐的琼脂培养基和培养条件下活化。若菌种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,确保菌种生长良好。

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	36 ± 1	厌氧	24~48
短乳杆菌	MRS 琼脂	28 ± 1	厌氧或兼性厌氧	16~24
植物乳杆菌/戊糖乳杆菌	MRS 琼脂	28 ± 1	厌氧或兼性厌氧	16~24
清酒广布乳杆菌	MRS 琼脂	28 ± 1	厌氧或兼性厌氧	16~24
德氏乳杆菌	MRS 琼脂	36 ± 1	厌氧或兼性厌氧	16~24
其他与乳杆菌属培养条件相似的细菌	MRS 琼脂	36 ± 1	厌氧或兼性厌氧	16~24
乳酸乳球菌	M17-乳糖琼脂或 Elliker 琼脂	32 ± 1	厌氧或兼性厌氧	16~24
唾液链球菌嗜热亚种	M17-乳糖琼脂或 Elliker 琼脂	36 ± 1	厌氧或兼性厌氧	16~24
屎肠球菌	MRS 琼脂	36 ± 1	需氧	24~48

注 1: 短乳杆菌、植物乳杆菌推荐的培养温度为 28 ℃。由于同种内的不同株间对温度的要求会有差异,因此对这 2 个种内某些株的培养温度可视情况适当调整。
 注 2: 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植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)ATCC 14917、副干酪乳杆菌(*Lacticaseibacillus paracasei*)ATCC 334、乳酸乳球菌乳亚种(*Lactococcus lactis* subsp.*lactis*)ATCC 19435、唾液链球菌嗜热亚种(*Streptococcus salivarius* subsp.*thermophilus*)LMG 18311、长双歧杆菌长亚种(*Bifidobacterium longum* subsp.*longum*)ATCC 15707、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)ATCC 29212。或其他等效菌株。

E.4.2.2 质控菌株的使用条件如下：

- 待测乳杆菌属、乳酪杆菌属、粘液乳杆菌属、乳植杆菌属、联合乳杆菌属、广布乳杆菌属在28℃±1℃条件下培养时,推荐用植物乳植杆菌 ATCC 14917 或等效菌株作质控菌株。
- 待测乳杆菌属、乳酪杆菌属、粘液乳杆菌属、乳植杆菌属、联合乳杆菌属、广布乳杆菌属在32℃±1℃条件下培养时,推荐用乳酸乳球菌乳亚种 ATCC 19435 或等效菌株作质控菌株。
- 待测乳杆菌属、乳酪杆菌属、粘液乳杆菌属、乳植杆菌属、联合乳杆菌属、广布乳杆菌属在36℃±1℃条件下培养时,推荐用副干酪乳杆菌 ATCC 334 或等效菌株作质控菌株。
- 对唾液链球菌嗜热亚种进行耐药性测定时,推荐用唾液链球菌嗜热亚种 LMG 18311 或等效菌株作质控菌株。
- 对双歧杆菌进行耐药性测定时,推荐用长双歧杆菌长亚种 ATCC 15707 或等效菌株作质控菌株。
- 对肠球菌进行耐药性测定时,推荐用粪肠球菌 ATCC 29212 或等效菌株作质控菌株。

E.4.3 微量稀释板的制备

E.4.3.1 抗菌药物种类及配制

试验用抗菌药物种类、浓度范围和配制方法见表 E.2。

表 E.2 试验用抗菌药物及配制^a

抗菌药物	所属类别	浓度范围 μg/mL	溶剂 ^b	稀释剂 ^c
庆大霉素	氨基糖苷类	0.5~256	水	水
卡那霉素	氨基糖苷类	2~1 024	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%乙醇或冰乙酸 ^d	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 的磷酸盐缓冲液, pH=8.0	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液, pH=8.0

表 E.2 试验用抗菌药物及配制^a(续)

抗菌药物	所属类别	浓度范围 μg/mL	溶剂 ^b	稀释剂 ^c
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	冰乙酸 ^d	水
黏菌素	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可根据相关资料进行适当调整。
^b 用于溶解粉末状抗菌药物的溶液。
^c 用于稀释抗菌药物溶液的试剂。
^d 使用冰乙酸做溶剂时,先加1/2体积的水做溶剂,然后逐滴加冰乙酸直至药物溶解,并用水补充至所需体积。

E.4.3.2 微量稀释板中抗菌药物布局

微量稀释板中抗菌药物布局见表 E.3。

表 E.3 微量稀释板中抗菌药物布局
A 板

单位为微克每毫升(μg/mL)

抗菌药物	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 ^c	P	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1 024	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

^a P 代表阳性对照孔,不添加任何抗菌药物,只添加待测菌悬液和含有用于溶解抗菌药物溶剂(最高浓度)的培养基。

^b N 代表阴性对照孔,既不加抗菌药物也不加待测菌株,只添加培养基。

^c 对屎肠球菌而言,所使用的卡那霉素质量浓度范围为 4 μg/mL~2 048 μg/mL。

表 E.3 微量稀释板中抗菌药物布局 (续)
B 板

单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)

抗菌药物	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
泰利霉素	P	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	N
黏菌素	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

^a P 代表阳性对照孔,不添加任何抗菌药物,只添加待测菌悬液和含有用于溶解抗菌药物溶剂(最高浓度)的培养基。

^b N 代表阴性对照孔,既不加抗菌药物也不加待测菌种,只添加培养基。

^c 对屎肠球菌而言,所使用的卡那霉素质量浓度范围为 $4 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 2048 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

E.4.3.3 抗菌药物储备液的制备

所配制抗菌药物储备液的浓度可根据其溶解性而定,但质量浓度至少应在 $1024 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上。储备液应按表 E.2 要求选用适宜的溶剂,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菌药物而降低药效的现象。所有的抗菌药物储备液均应现用现配,特殊情况(如需要特殊储存条件以确保储备液的稳定性)除外。

E.4.3.4 所需抗菌药物质量或稀释液体积的计算

使用以下公式来计算所需抗菌药物的质量(式 E.1)或稀释液体积(式 E.2):

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

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

式中:

m —— 抗菌药物(粉状)的质量,单位为克(g);

V —— 稀释液的体积,单位为升(L);

ρ —— 储备液的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

P —— 抗菌药物的效力,单位为毫克每克(mg/g)。

E.4.3.5 2 倍质量浓度抗菌药物工作液的制备

以庆大霉素为例,将抗菌药物储备液按照表 E.4 要求进行稀释,分别制备系列 2 倍质量浓度庆大霉素工作液。

表 E.4 2 倍质量浓度庆大霉素工作液的制备

步骤	庆大霉素溶液	庆大霉素溶液质量浓度 μg/mL	吸取体积 mL		2 倍质量浓度庆大霉素工作液 μg/mL
			庆大霉素溶液	稀释剂	
1	庆大霉素储备液	5 120	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 中其他抗菌药物系列 2 倍质量浓度的工作液。

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 μL 质量浓度为 512 μg/mL、256 μg/mL、128 μg/mL、64 μg/mL、32 μg/mL、16 μg/mL、8 μg/mL、4 μg/mL、2 μg/mL 和 1 μg/mL 的 2 倍质量浓度庆大霉素工作液, 加到 96 孔标准微孔板庆大霉素所在行对应的第 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菌药物的系列 2 倍质量浓度工作液分别加至相对应的微孔板中, 备用。制备好的抗菌药物微量稀释板应尽快使用, 如不能及时使用, 应将其密封并在低于−20 ℃条件下保存。微量稀释板中的抗菌药物在低于−20 ℃条件下可稳定保存数月。保存期间可用质控菌种检测其稳定性。

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种新鲜菌落, 用比浊仪于盛有 2 mL~5 mL 无菌生理盐水的玻璃试管中制成 1.0 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(OD 值), 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。由于唾液链球菌嗜热亚种和德氏乳杆菌的某些株可能出现 1.0 麦氏浊度菌悬液中菌的浓度低于 3×10^8 CFU/mL 的现象, 在此情况下应调整麦氏浊度稍高于 1.0, 确保菌浓度达 3×10^8 CFU/mL 时方可使用。对于双歧杆菌而言, 应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, 其他细菌菌悬液的制备参照 CLSI 中相近种属进行。

E.4.5 菌悬液接种

依受试菌种不同, 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 制备好的抗菌药物微量稀释板中, 每孔 50 μL。冷冻保存的抗菌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。如使用包被有抗菌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 中制备好的菌悬液稀释 1 000 倍后加至商品化抗菌药物微量稀释板中，每孔 100 μL 。整个接种过程应在 30 min 内完成。

表 E.5 不同菌种进行抗菌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 ℃	培养条件	培养时间 h
双歧杆菌属	LSM-半胱氨酸培养基	36±1	厌氧	48
短乳杆菌	LSM 培养基	28±1	厌氧	48
植物乳杆菌/戊糖乳杆菌	LSM 培养基	28±1	厌氧	48
清酒广布乳杆菌	LSM 培养基	28±1	厌氧	48
其他与乳杆菌属培养条件相似的细菌	LSM 培养基	36±1	厌氧	48
乳酸乳球菌	IST 培养基	32±1	厌氧	48
唾液链球菌嗜热亚种	IST 乳糖培养基	36±1	厌氧	48
屎肠球菌	CAMHB 培养基	36±1	需氧	48

注：对双歧杆菌进行耐药性测定时，建议在试验前一天将试验用培养基提前置于厌氧环境中平衡，其他细菌进行抗菌药物耐药性测定时，可参照相近种属的细菌所用方法操作。

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，记录每种抗菌药物完全抑制待测菌种生长的 MIC。

E.4.7.2 结果记录前，应首先检查阳性对照孔和阴性对照孔，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种对所有抗菌药物的 MIC 值均在质控范围内，则各抗菌药物对待测菌种的 MIC 值结果可信，否则结果不可信，应重复试验。

E.4.7.3 若出现待测菌种不连续(或间断)生长的情况，则结果不可信，应重复试验。

E.4.8 结果判定

参照表 E.6 列出的折点值，报告待测菌种对受试抗菌药物的敏感(低于或等于折点值)或耐药(高于折点值)结果。

表 E.6 不同抗菌药物对相关菌种的折点值

单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)

菌种名称	氨基西林	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 ^a	氯霉素	环丙沙星	泰利霉素	黏菌素	磷霉素
专性同型发酵乳杆菌 ^b	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 ^c	2	n.r.	16	64	64	1	4	8 ^c	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
罗伊氏粘液乳杆菌	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.
植物乳杆菌/戊糖乳杆菌	2	n.r.	16	64	n.r.	1	4	32	8	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
鼠李糖乳酸杆菌	4	n.r.	16	64	32	1	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
干酪/副干酪乳酸杆菌	4	n.r.	32	64	64	1	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
双歧杆菌属	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
片球菌属	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.
唾液链球菌嗜热亚种	2	4	32	n.r.	64	2	2	4	4	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
芽胞杆菌属	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.
屎肠球菌	2	4	32	1024	128	4	4	16	n.r.	4	n.r.	n.r.	n.r.
棒状杆菌属和其他革兰氏阳性菌	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,若是革兰氏阳性菌,可参考棒状杆菌和其他革兰氏阳性菌判定;若是革兰氏阴性菌,可参考肠杆菌科判定,产生的 MIC 值应与相关菌种公开的和/或自行研究产生的折点值进行比较。

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数据进行比对。

注 4: 当折点值发生更新时,折点值的判定应以更新后的最新折点值为准。

^a 对布氏乳杆菌而言,四环素的折点 MIC 值为 $128 \mu\text{g/mL}$ 。^b 包括德氏乳杆菌和瑞士乳杆菌。^c 包括发酵粘液乳杆菌。^d 包括同型发酵的唾液联合乳杆菌。

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

单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)

抗菌药物	副干酪乳杆菌 ATCC 334	植物乳杆菌 ATCC 14917	长双歧杆菌长 亚种 ATCC 15707	乳酸乳球菌 乳亚种 ATCC 19435	唾液链球菌 嗜热亚种 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 ^a	—	—	—	—	—
黏菌素 ^a	—	—	—	—	—
磷霉素 ^a	—	—	—	—	—

注：“—”表示不适用。

^a 可参考相关资料进行质控。

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在试验条件下的产毒能力的测定,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(5 °C±1 °C)~(42 °C±1 °C)。
- F.2.2 电子天平:感量分别为0.1 g和0.001 g。
- F.2.3 锥形瓶:容量为250 mL、500 mL、1 000 mL。
- F.2.4 显微镜:10×~100×。
- F.2.5 微量移液器及配套吸头:量程为100 μL~1 000 μL。
- F.2.6 生物安全柜。
- F.2.7 无菌吸管:1 mL(具0.01 mL刻度)、10 mL(具0.1 mL刻度)。
- F.2.8 无菌量筒:容量100 mL~1 000 mL。
- F.2.9 温湿度计。温度计允许误差:±1 °C,湿度计允许误差:±3% RH。
- F.2.10 接种针。
- F.2.11 分离针。
- F.2.12 无菌试管:16 mm×160 mm。
- F.2.13 无菌培养皿:直径90 mm。
- F.2.14 载玻片。
- F.2.15 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B.3.2。
- F.3.1.2 马铃薯葡萄糖琼脂:同B.3.3。
- 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 °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 查氏酵母提取物(浸粉)培养基:K₂HPO₄ 1 g、10倍查氏浓缩液10 mL、酵母提取物(浸粉)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 °C高压灭菌15 min后备用。

F.3.2.2 查氏酵母提取物(浸粉)再加 2% 蔗糖培养基: K_2HPO_4 1 g、10 倍查氏浓缩液 10 mL、酵母提取物(浸粉)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 ℃ 高压灭菌 15 min 后备用。

F.3.2.3 查氏酵母提取物(浸粉)加 0.5% NaCl 培养基: K_2HPO_4 1 g、10 倍查氏浓缩液 10 mL、酵母提取物(浸粉)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 ℃ 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 ℃ 高压灭菌 15 min 后备用。

F.3.2.5 马铃薯葡萄糖肉汤培养基: 按产品说明书要求称取商品化马铃薯葡萄糖肉汤培养基, 加入 1 000 mL 蒸馏水溶解后分装至 250 mL 锥形瓶, 每瓶 100 mL, 121 ℃ 高压灭菌 15 min 后备用。

F.3.2.6 酵母提取物(浸粉)蔗糖(yeast extract sucrose, YES)液体培养基: 酵母提取物(浸粉)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 ℃ 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, 分装至 250 mL 锥形瓶中, 每瓶 100 mL, 121 ℃ 高压灭菌 15 min 后备用。

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, 根据不同菌种产生毒素的湿度要求, 用蒸馏水调整培养基的水分及 pH(具体数值视菌株产毒特性要求而异), 121 ℃ 高压灭菌 20 min, 冷却后手心击拍瓶体将结块的米粒打散, 之后每日 121 ℃ 高压灭菌 20 min 1 次, 连续灭菌 3 d, 每次高压灭菌冷却后均应拍击打散, 备用。

F.3.2.9 玉米培养基: 取粉碎后的玉米渣 20 g(粒径 0.2 mm~0.5 mm)至 500 mL 或 1 000 mL 锥形瓶中, 根据不同菌种产生毒素的湿度要求, 用蒸馏水调整培养基的水分及 pH(具体数据视菌种产毒特性要求而异), 121 ℃ 高压灭菌 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 ℃ 高压灭菌 20 min 1 次, 连续灭菌 3 d, 每次高压灭菌冷却后均应拍击打散, 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, 根据不同菌种产生毒素的湿度要求, 用蒸馏水调整培养基的水分及 pH(具体数据视菌种产毒特性要求而异), 121 ℃ 高压灭菌 20 min, 冷却后手心击拍瓶体将结块的麦麸打散, 之后每日 121 ℃ 高压灭菌 20 min 1 次, 连续灭菌 3 d, 每次高压灭菌冷却后均应拍击打散, 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、玉米渣、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, 根据不同菌种产生毒素的湿度要求, 用蒸馏水调整培养基的水分及 pH(具体数据视菌种产毒特性要求而异), 121 ℃ 高压灭菌 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 ℃ 高压灭菌 20 min 1 次, 连续灭菌 3 d, 每次高压灭菌冷却后均应拍击打散, 备用。

在对菌种进行产毒试验时, 所选的产毒培养基除了生产用基质外, 还应从以上所列培养基中至少选择 3 种液体培养基、3 种固体培养基和含有 3 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 ℃ ± 1 ℃ 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 中选取的所有产毒培养基中,充分混匀后,置 28 ℃±1 ℃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

按照食品安全国家标准规定的相关检测方法或其他等效方法进行真菌毒素的测定。
