

# 保健食品原料用菌种安全性

## 检验与评价技术指导原则（2020年版）

### 1 范围

本指导原则规定了保健食品原料用细菌、丝状真菌（子实体除外）和酵母的安全性评价中的致病性（毒力）检验与评价程序和方法。

本指导原则适用于保健食品原料用菌种（包括保健食品配方用及原料生产用菌种）的致病性检验与评价。

本指导原则不适用于基因改造微生物菌种和在我国无使用习惯的菌种致病性检验与评价。

### 2 术语和定义

#### 2.1 致病性，Pathogenicity

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，Toxigenicity

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，Toxicity

微生物及其代谢产物对机体可能造成的潜在伤害（不良反应）。

### 3 对拟评价微生物菌种需提交的基本资料要求

在进行致病性评价试验前，菌种送检单位需提供以下资料供评价单位审核。

#### 3.1 基本信息

拟评价菌种名称（包括学名、俗名、曾用名、拉丁名等）、来源及用途。

#### 3.2 菌种分类学资料

提供由有菌种鉴定资质的机构出具的拟评价菌种的规范、科学的分类学（属、种名称及株）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。真菌的分类和命名应按国际藻类、真菌和植物命名法规（International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants）进行。

#### 3.3 菌种鉴定资料

根据目前已有的知识，提供基于表型及基因测序技术鉴定到种水平的资料。作为保健食品的功效成分（活菌），还应提供鉴定到株水平的资料。

#### 3.4 菌种生长环境条件资料

提供拟评价菌种生长最适培养基及培养条件（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 诱变菌种

经过诱变的菌种还需提供详细的菌种诱变方法（包括使用的诱变剂、诱变条件及诱变试验流程等）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

包括但不限于拟评价菌种安全用于保健食品的生产记录、工艺流程、企业标准等资料。

### 3.7 国内外安全性评价资料综述

基于国内外文献数据，提供拟评价菌种的国内外使用历史和安全性评价资料，包括其致病性和产毒能力的报告、研究文献或综述等；若无拟评价菌种的上述资料，应提供在亲缘关系上与其相近种属的安全性评价资料。

### 3.8 其他国家批准资料

提供其他国家已批准拟评价菌种作为膳食补充剂、功能食品或普通食品生产使用的相关证明资料。

### 3.9 其他需要说明的信息。

## 4 评价方法

对已经提供以上资料的拟评价菌株，可以按照以下方法开展评价。

#### 4.1 全基因组测序（Whole Genome Sequencing, WGS）

##### 4.1.1 基因测序

对拟评价菌株进行全基因组测序，分别获得其基因组完成图和框架图，测序报告应包括（但不限于）以下信息：

- 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
- 对真菌而言，还需提供从相关数据库中获得的全基因组注释质量信息。

##### 4.1.2 基因序列分析

将拟评价菌株的全基因组序列与已有的数据库，包括但不限于毒力基因数据库（VFDB）、毒力/致病岛数据库

（PAIDB）、生物防御数据库（MvirDB）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明确相关的已知毒力因子和毒素代谢相关基因的存在情况。应提供包括（但不限于）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、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（毒素产生、侵袭和粘附因子等）

- 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（ $< 10^{-5}$ ）

- 数据库中已有的菌株名称

- 基因组图谱

- 拟评价的真菌菌株还应根据文献报道能够产生的毒素类别，针对性检索是否存在毒素合成关键基因及其基因簇。

#### 4.2 动物致病性试验

由具备菌种致病性检验和评价资质的机构，分别按照附录 A、附录 B 和附录 C 规定的试验方案，对拟评价的保健食品用细菌、丝状真菌、酵母菌株开展致病性检验，对结果做出评价并出具报告。

#### 4.3 产毒试验

对某些能够产生毒素的微生物，应在多种基质和条件下（单品种固体、多品种固体复合、不同成分的液体组合等）进行产毒试验，并按照国家标准检测方法或国际组织/相关国家规定的标准检测方法进行有毒活性代谢产物含量检测。

## 5 结果判定

5.1 满足以下所有条件者，可用于保健食品。

5.1.1 动物试验显示无致病性。

5.1.2 产毒试验结果显示，在受试的任何一种基质中均不产生有毒活性代谢产物。

5.1.3 根据现有知识，全基因组序列分析未发现存在已知的毒力/致病基因（或毒素合成关键基因及其基因簇）。

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及其基因簇），但动物试验显示不具有致病性、或产毒试验检测到已知的有毒活性代谢产物但其水平较低，长期摄入对人体健康无影响，结合国内外使用历史，可用于保健食品。

5.3 动物试验显示具有致病性，或产生高水平已知有毒代谢产物，长期摄入可能影响人体健康，不能用于保健食品。

## 附录 A

### (规范性附录)

#### 保健食品原料用细菌致病性检验方法

##### 1 范围

本方法规定了保健食品原料用细菌的致病性检验方法。

本方法适用于保健食品原料用细菌的致病性检验。

##### 2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌和培养设备外，其他设备与材料如下：

2.1 恒温培养箱： $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 离心机：离心力 $\geq 3000 \times g$ 。

2.3 电子天平：感量 0.1 g 和 0.001 g。

2.4 比浊仪。

2.5 温湿度计。

2.6 显微镜： $10\times\sim 100\times$ 。

2.7 厌氧培养装置：厌氧罐、厌氧箱。

2.8 无菌锥形瓶：容量 100 mL、500 mL。

2.9 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。

2.10 无菌试管：16 mm×160 mm。

2.11 无菌培养皿：直径 90 mm。

2.12 无菌量筒：容量 100 mL。

2.13 微量移液器及配套枪头：量程为 100  $\mu$ L~1000  $\mu$ L。

2.14 注射器：量程为 100  $\mu$ L~1000  $\mu$ L。

2.15 小鼠灌胃针头。

### 3 培养基和试剂

3.1 无菌生理盐水：商品化的生理盐水或 8.5 g NaCl 溶于 1000 mL 蒸馏水中，分装后 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 min，备用。

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 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 min，备用。

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 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 min，制备 LB 琼脂平板，备用。

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  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌后备用。

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℃高压灭菌 15 min，待培养基冷却至 50℃左右时，加入按 3.4 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。

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℃高压灭菌 15 min，待培养基冷却至 50℃左右时，加入按 3.4 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。

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℃高压灭菌 15 min，待培养基冷却至 50℃左右时，加入 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。

#### 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。

#### 5 操作步骤

所有拟评价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，以评价不同受试物暴露途径对动物的致病性。

## 5.1 腹腔注射

### 5.1.1 菌株活化

目前我国已批准的可用于保健食品的细菌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）。

### 5.1.2 菌悬液制备

将 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、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）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  $5.0 \times 10^7$  CFU/mL，用于小鼠腹腔注射。

### 5.1.3 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。每只小鼠注射 0.2 mL，即受试物组每只小鼠注射菌量不少于  $1.0 \times 10^7$  CFU。

### 5.1.4 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振颤、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。

## 5.2 经口灌胃

### 5.2.1 菌数预估

无菌吸取上述 5.1.1 的培养液，分别加至两个无菌离心管中，每管 1 mL， $3000 \times g$  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  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL 和  $1.25 \times 10^9$  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  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL 和  $1.25 \times 10^9$  CFU/mL 时需加入的无菌生理盐水的体积（mL）。

## 5.2.2 菌悬液制备

### 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 5.1.1 培养液，将培养液一分为二， $3000 \times g$  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。

### 5.2.2.2 菌悬液原液的制备

按照 5.2.1 中获得的细菌终浓度达到  $2.5 \times 10^8$  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 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  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL（上清液量不够时可用空白培养基补齐）。

### 5.2.2.3 浓缩菌悬液的制备

按照 5.2.1 中获得的细菌终浓度达到  $1.25 \times 10^9$  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 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  $1.25 \times 10^9$  CFU/mL。

### 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，连续灌胃 3 d，首次灌胃前小鼠应禁食过夜（16 h），灌胃后 3 h~4 h 喂食。

### 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 5.1.4。

## 6 结果与报告

对 5.1 和 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）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

定该菌株无致病性；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，即可判定该菌株具有致病性。

## 附录 B

### (规范性附录)

#### 保健食品原料用丝状真菌的致病性检验方法

##### 1 范围

本方法规定了保健食品原料用丝状真菌的致病性检验方法。

本方法适用于保健食品原料用丝状真菌的致病性检验。

##### 2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1 恒温培养箱： $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 电子天平：感量为 0.1 g。

2.3 锥形瓶：容量为 500 mL。

2.4 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。

2.5 显微镜： $10\times\sim 100\times$ 。

2.6 微量移液器及配套枪头：量程为  $100\ \mu\text{L}\sim 1000\ \mu\text{L}$ 。

2.7 血球计数板。

2.8 注射器：量程为 100  $\mu\text{L}$ ~1000  $\mu\text{L}$ 。

2.9 小鼠灌胃针头。

2.10 温湿度计。

2.11 接种钩。

2.12 球磨仪或功能相当的仪器。

2.13 无菌培养皿：直径 90 mm。

### 3 培养基和试剂

3.1 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 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，制备麦芽汁琼脂平板，备用。

3.2 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 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，制备马铃薯葡萄糖琼脂平板，备用。

3.3 无菌生理盐水：商品化的生理盐水或 8.5 g NaCl 溶于 1000 mL 蒸馏水中，分装后 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min，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。

### 4 实验动物

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

## 5 操作步骤

所有拟评价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，以评价不同受试物暴露途径对动物的致病性。

### 5.1 腹腔注射

#### 5.1.1 菌悬液制备

5.1.1.1 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， $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  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  $5.0\times 10^7$  CFU/mL。

5.1.1.2 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， $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  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，经生理盐水重悬后，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  $5.0\times 10^7$  CFU/mL。

### 5.1.2 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不少于  $1.0 \times 10^7$  CFU。

### 5.1.3 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 5.1.4。

## 5.2 经口灌胃

### 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  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL 外，其他操作步骤同 5.1.1。

### 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，灌胃前禁食过夜（16 h），灌胃后 3 h~4 h 喂食。

### 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 5.1.4。

## 6 结果与报告

对 5.1 和 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 6。

## 附录 C

### (规范性附录)

#### 保健食品原料用酵母的致病性检验方法

##### 1 范围

本方法规定了保健食品原料用酵母的致病性检验方法。  
本方法适用于保健食品原料用酵母的致病性检验。

##### 2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

2.1 恒温培养箱： $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 电子天平：感量为 0.1 g。

2.3 锥形瓶：容量为 500 mL。

2.4 无菌吸管：1 mL（具 0.01 mL 刻度）、10 mL（具 0.1 mL 刻度）。

2.5 显微镜： $10\times\sim 100\times$ 。

2.6 微量移液器及配套枪头：量程为  $100\ \mu\text{L}\sim 1000\ \mu\text{L}$ 。

2.7 血球计数板。

2.8 注射器：量程为  $100\ \mu\text{L}\sim 1000\ \mu\text{L}$ 。

2.9 小鼠灌胃针头。

2.10 温湿度计。

2.11 接种环。

2.12 离心机：离心力 $\geq 3000 \times g$ 。

2.13 无菌培养皿：直径 90 mm。

2.14 无菌量筒：容量 100 mL。

### 3 培养基和试剂

3.1 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。

3.2 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，制备麦芽汁培养基，备用。

3.3 无菌生理盐水：商品化的生理盐水或 8.5 g NaCl 溶于 1000 mL 蒸馏水中，分装后 121℃高压灭菌 15 min，备用。

如拟评价菌株在麦芽汁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。

### 4 实验动物

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

## 5 操作步骤

所有拟评价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，以评价不同受试物暴露途径对动物的致病性。

### 5.1 腹腔注射

#### 5.1.1 菌悬液制备

将拟评价菌株接种麦芽汁琼脂平板， $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  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  $5.0\times 10^7$  CFU/mL。

#### 5.1.2 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，每只小鼠注射 0.2 mL，即受试物组每只小鼠注射的菌量不少于  $1.0\times 10^7$  CFU。

#### 5.1.3 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 5.1.4。

## 5.2 经口灌胃

### 5.2.1 菌株培养

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

### 5.2.2 菌数预估

无菌吸取上述 5.2.1 的培养液，分别加至两个无菌离心管中，每管 1 mL， $3000 \times g$  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）。

### 5.2.3 菌悬液制备

#### 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， $3000 \times g$  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。

#### 5.2.3.2 菌悬液原液的制备

按照 5.2.2 中获得的酵母终浓度达到  $2.5 \times 10^8$  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 5.2.3.1 获得的上清液，调整离心后的沉淀物使其酵母数达到  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL（上清液量不够时可用空白培养基补齐）。

#### 5.2.3.3 浓缩菌悬液的制备

按照 5.2.2 中获得的酵母菌终浓度达到  $6.25 \times 10^8$  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 5.2.3.1 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  $6.25 \times 10^8$  CFU/mL。

#### 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及雌性小鼠 2.5 倍菌悬液组。各组均以  $20 \text{ mL/kg} \cdot \text{BW}$  的体积给小鼠灌胃 1 次，灌胃前应禁食过夜（16 h），灌胃后 3 h~4 h 喂食。

#### 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 5.1.4。

## 6 结果与报告

对 5.1 和 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 6。