|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.080 |
| CCS | B10 |

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX



微生物肥料质量安全评价通用准则

General criteria for quality and safety evaluation of microbial fertilizers

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

`

1. 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准由中国石油和化学工业联合会提出。

本标准由全国肥料和土壤调理剂标准化技术委员会（SAC/TC105）归口。

本文件起草单位：农业农村部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心、农业农村部微生物产品质量安全风险评估实验室（北京）、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所。

本标准为首次发布。

本文件主要起草人：姜昕、马鸣超、李俊、曹凤明、关大伟、李力、陈慧君、葛一凡、杨小红、刘孝颖、朱玲玲、季洪伟、邴晓会、贾聪。

微生物肥料质量安全评价通用准则

* 1. 范围

本标准规定了微生物肥料质量安全评价的术语和定义、原则、菌种安全性分级，以及评价程序、试验方法和结果判定。

本标准适用于中华人民共和国境内生产、销售的微生物肥料。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 15193.3 食品安全国家标准 急性经口毒性试验

GB 20287 农用微生物菌剂

GB 38400 肥料中有毒有害物质的限量要求

NY/T 798 复合微生物肥料

NY 884 生物有机肥

NY/T 1847 微生物肥料生产菌株质量评价通用技术要求

NY/T 2321 微生物肥料产品检验规程

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

微生物肥料 microbial fertilizer；biofertilizer

含有特定微生物活体的制品，应用于农业生产，通过其中所含微生物的生命活动，增加植物养分的供应量或促进植物生长，提高产量，改善农产品品质及农业生态环境。其产品包括微生物菌剂、复合微生物肥料、生物有机肥三大类；微生物菌剂又分为根瘤菌菌剂、固氮菌菌剂、光合细菌菌剂、菌根菌菌剂、解磷类菌剂、硅酸盐菌剂、植物促生菌剂、土壤修复菌剂、有机物料腐熟剂以及提高作物抗逆性菌剂等种类。

质量安全评价 quality and safety evaluation

对菌种、产品等受试物的质量属性和安全性进行分析、测定和评估，以判定其是否符合特定要求的过程。

急性经口毒性 acute oral toxicity

一次或在24 h 内多次经口给予实验动物受试物后，动物在短期内出现的毒性效应。

半数致死量 median lethal dose (LD50)

经口一次或24 h 内多次给予受试物后，能够引起动物死亡率为50%的受试物剂量，该剂量为经过统计得出的计算值。用每千克体重所摄入受试物质的毫克数或克数表示，单位为毫克每千克（mg/kg）或克每千克（g/kg）。

* 1. 原则

用于评价的微生物肥料其产品质量应符合GB 20287、NY 884、NY/T 798等技术指标要求，且其有毒有害物质的限量须符合GB 38400的要求。

根据微生物肥料生产菌种的安全风险，建立的菌种安全分级目录见附录A；按照设立的菌种安全4级层次要求，开展菌种的安全性评价工作。未列入附录A中的菌种，除根瘤菌和乳杆菌(*Lactobacillus*)外，其余均需做毒理学试验。所有生产用菌种均需要做溶血试验，植物病原菌不可用作生产菌种。采用生物工程菌，应具有允许大面积释放的生物安全性有关批文。

依据微生物肥料产品特点、类型及其剂型进行其安全评价，复合微生物肥料、生物有机肥和液体剂型微生物菌剂等产品需做急性经口毒性试验；除有机物料腐熟剂以外的固体微生物菌剂类产品均免做毒理学试验。

* 1. 菌种安全性分级

第一级（A.1）为免做毒理学试验的菌种。

第二级（A.2）为需做急性经口毒性试验的菌种。

第三级（A.3）为需做致病性试验的菌种。

第四级（A.4）为禁用菌种。

* 1. 评价程序
     1. 菌种

应提供微生物肥料生产用菌种的鉴定报告，包括属及种的拉丁学名和中文译名、形态、生理生化特性及鉴定依据、功能评价等资料。

根据产品所含菌种的鉴定信息，按照附录A的规定，确定菌种安全级别、应做的毒理学试验及毒理学检测项目。

对于需要做毒理学试验的菌种，生产者需提供试验用纯菌种斜面，经复核确认与该菌种鉴定资料相符且无杂菌污染后，进行毒理学等试验。

对于使用除第一级（A.1）外的生产菌株，通过分析和确定该菌株的基因组中是否存在毒素、溶血素、抗生素等具安全风险的基因及基因族结构，评估其产生有毒有害物质的可能性及其安全风险。

* + 1. 产品

需对送检产品进行质量检测且符合要求，并在载体物料的真实性确认后，进行毒理学等试验。

* 1. 试验方法
     1. 受试物的准备
        1. 菌种受试物

将试验菌种接种于适宜的培养基中，在适宜的条件下培养一定时间，用生理盐水调整菌液浓度至2.0×108 CFU/mL～2.0×109 CFU/mL，该溶液为菌种受试物。

* + - 1. 产品受试物

固体产品根据试验要求，配制所需浓度，溶剂首选去离子水，也可选用羧甲基纤维素、明胶、淀粉等。液体产品不可稀释，直接使用。

* + 1. 急性经口毒性试验

按GB 15193.3的规定执行。

* + 1. 致病性试验项目
       1. 急性经口毒性试验

按GB 15193.3的规定执行。

* + - 1. 一次破损皮肤刺激试验

按本文件的附录B的规定执行。

* + - 1. 溶血试验
         1. 目的

检测受试物是否具有溶血特性。

* + - * 1. 操作程序

用无菌棉拭子蘸取菌种受试物，以蛇形线接种于血琼脂平板，置（36 ± 1） ℃培养箱中培养，（24 ± 2）h后观察有无溶血环产生。同时，用已知阳性菌株金黄色葡萄球菌ATCC6538、蜡样芽孢杆菌CMCC（B）63303等作为质控菌株。

* + - * 1. 试验结果

菌落周围有β溶血环或α溶血环的，则溶血试验阳性；否则为阴性。

* + - 1. 抗菌药物敏感试验
         1. 目的

检测受试物对抗菌药物的敏感性强度。

* + - * 1. 试验用抗菌药物

可选用头孢哌酮（CFP）、四环素（TE）、头孢唑啉（CZ）、链霉素（S）、痢特灵（FR）、环丙沙星（CIP）、复方新诺明（SXT）、氯霉素（C）、氨苄青霉素（AM）、庆大霉素（GM）、强力霉素（DO）、丁胺卡那霉素（AN）、甲氟哌酸（PEF）、依诺沙星（ENO）、黄连素（Berberine Hydrochloride）、两性霉素B（Amphotericin B）、伊曲康唑（Itraconazole）等抗菌药物。

* + - * 1. 操作程序

用无菌棉拭子将受试物均匀涂抹于营养琼脂平板表面，共3次。每涂抹1次，平板应转动60º，最后将棉拭子绕平板边缘涂抹1周。盖好平皿，置室温干燥5 min。

用无菌棉拭子蘸取浓度为2.0 × 108 CFU/mL～2.0 × 109 CFU/mL质控菌株菌悬液，均匀涂抹于营养琼脂平板表面，具体方法同6.3.4.3.1，作为对照试验。

以无菌操作取出抗菌药物纸片分别贴在涂有受试物和质控菌株菌悬液的平板培养基表面，每个平板放4个纸片。然后将平板置于（36 ± 1）℃ 恒温培养箱中培养18 h后观察抗菌药物纸片周围有无抑菌环，量取并记录其直径（包括纸片直径）大小，单位为毫米（mm）。试验应做3个平行，取其均值。

质控菌抑菌环应均在质控范围内，说明试验方法准确可靠，否则试验无效。质控菌株可选用大肠埃希氏菌ATCC25922等标准菌株。

* + - 1. 急性腹腔注射致病性试验
         1. 目的

检测受试物的急性致病性。

* + - * 1. 试验动物

清洁级健康成年昆明小鼠（Kunming mice）或BALB/c小鼠（BALB/c mice）。

* + - * 1. 操作程序

选健康成年小鼠40只，体重18 g～20 g，雌、雄各半，剂量为500 mg/kg，按0.1 mL/10 g 经腹腔注射受试物。

于腹腔注射后第3 d、第7 d分别取存活的实验动物雌、雄各5只解剖，并做大体病理学观察。

腹腔注射后第14 d将剩余实验动物处死、解剖并做大体病理学观察。

* + - * 1. 结果观察、评价

根据试验周期内动物有无死亡及出现的中毒体症、大体病理学观察及病理组织学检查发现病变的程度进行分级判定（见表1）。

1. 急性致病性判定标准

| 级 别 | 判定依据 |
| --- | --- |
| 强致病性 | 动物出现死亡，死亡动物及24 h以上存活动物在第3 d、第7 d经解剖肉眼检查和病理组织学检查即可发现脏器的明显病变 |
| 弱致病性 | 动物有中毒体征无死亡，动物第14 d经解剖肉眼检查和病理组织学检查可发现脏器的明显病变 |
| 无致病性 | 动物无中毒体征无死亡，动物第14 d经解剖肉眼检查和病理组织学检查均未发现脏器的明显病变 |

* + - 1. 急性眼刺激试验

按本文件的附录C的规定执行。

* + 1. 质量检测

微生物肥料产品按NY/T 2321、GB 38400的规定进行其产品质量检测。生产菌种按照 NY/T 1847的规定进行其质量评价。

* 1. 结果判断
     1. 总则

生产菌种（株）经毒理学试验或其质量评价结果不符合的，均不得作为微生物肥料生产用菌种使用。

产品经毒理学试验评价或其质量检测结果为不符合的，不得生产和销售。

汇总生产菌种及产品的质量安全评价结果，依据本文件的4.1、8.2、8.3的要求进行判定，并出具质量安全评价报告。

* + 1. 急性经口毒性试验

描述由中毒表现初步提示的毒作用特征，根据LD50值确定受试物的急性毒性分级（见附录D）。凡LD50>5 000 mg/kg 的，可通过，即该菌种可作为生产用菌种或该产品可进行生产、销售。

* + 1. 致病性试验
       1. 急性经口毒性试验

结果判定同8.2。

* + - 1. 一次破损皮肤刺激试验

如结果为无刺激或仅具轻度刺激作用，可通过；否则，应放弃使用。

* + - 1. 溶血试验

溶血试验结果为阴性的，可通过；否则，应放弃使用。

* + - 1. 抗菌药物敏感试验

受试菌株必须对2种以上的抗菌药物敏感；否则，应放弃使用。

* + - 1. 急性腹腔注射致病性试验

结果为无急性致病性可通过；否则，应放弃使用。

* + - 1. 急性眼刺激试验

结果对眼无刺激性或具有轻刺激性的，可通过；否则，应放弃使用。

2. （规范性附录）  
   菌种安全分级目录
   1. 第一级：免作毒理学试验的菌种
      1. 根瘤菌类

| *Azorhizobium caulinodans* | 茎瘤固氮根瘤菌（田菁固氮根瘤菌） |
| --- | --- |
| *Azorhizobium doebereinerae* | 德式固氮根瘤菌 |
| *Bradyrhizobium betae* | 甜菜慢生根瘤菌 |
| *Bradyrhizobium* *diazoefficiens* | 有效慢生根瘤菌（高效固氮慢生根瘤菌） |
| *Bradyrhizobium elkanii* | 埃氏慢生根瘤菌 |
| *Bradyrhizobium japonicum* | 日本慢生根瘤菌（大豆慢生根瘤菌） |
| *Bradyrhizobium liaoningense* | 辽宁慢生根瘤菌（慢生大豆根瘤菌） |
| *Bradyrhizobium* sp*.*(*Arachis hypogaea*) | 花生根瘤菌 |
| *Bradyrhizobium* sp*.*(*Vigna radiata*) | 绿豆根瘤菌 |
| *Bradyrhizobium yuanmingense* | 圆明园慢生根瘤菌 |
| *Mesorhizobium huakuii* | 华癸中间根瘤菌 |
| *Mesorhizobium loti* | 百脉根中间根瘤菌 |
| *Rhizobium etli* | 豆根瘤菌（埃特里根瘤菌） |
| *Rhizobium fabae* | 蚕豆根瘤菌 |
| *Rhizobium galegae* | 山羊豆根瘤菌 |
| *Rhizobium leguminosarum* | 豌豆根瘤菌 |
| *Sinorhizobium fredii* | 弗氏中华根瘤菌（快生大豆根瘤菌） |
| *Sinorhizobium meliloti* | 苜蓿中华根瘤菌 |

还包括尚未确定种名的，从一些豆科植物根瘤内分离、纯化、鉴定、回接、筛选后在原宿主植物结瘤、固氮良好的根瘤菌。

* + 1. 自生及联合固氮微生物类

|  |  |
| --- | --- |
| *Azorhizophilus paspali*（*Azotobacter paspali*） | 雀稗固氮嗜根菌（雀稗固氮菌） |
| *Azospirillum brasilense* | 巴西固氮螺菌 |
| *Azospirillum lipoferum* | 具脂固氮螺菌（生脂固氮螺菌） |
| *Azotobacter beijerinckii* | 拜氏固氮菌 |
| *Azotobacter chroococcum* | 圆褐固氮菌（褐球固氮菌） |
| *Azotobacter vinelandii* | 瓦恩兰德固氮菌（棕色固氮菌） |
| *Beijerinckia indica* | 印度拜叶林克氏菌 |

* + 1. 光合细菌类

| *Blastochloris viridis*（*Rhodopseudomonas viridis*） | 绿色绿芽菌（绿色红假单胞菌） |
| --- | --- |
| *Phaeospirillum fulvum*（*Rhodospirillum fulvum*） | 黄褐棕色螺旋菌（黄褐红螺菌） |
| *Rhodobacter azotoformans* | 固氮红细菌 |
| *Rhodobacter capsulatus*（*Rhodopseudomonas capsulata*) | 荚膜红细菌（荚膜红假单胞菌） |
| *Rhodobacter sphaeroides* （*Rhodopseudomonas sphaeroides*) | 类球红细菌（类球红假单胞菌） |
| *Rhodoblastus acidophilus*（*Rhodopseudomonas acidophila*） | 嗜酸红芽菌（嗜酸红假单胞菌） |
| *Rhodopila globiformis*（*Rhodopseudomonas globiformis*） | 球形红球形菌（球形红假单胞菌） |
| *Rhodopseudomonas palustris*（*Rhodopseudomonas rutila*） | 沼泽红假单胞菌（血红红假单胞菌） |
| *Rhodospirillum rubrum* | 深红红螺菌 |
| *Rhodovibrio salinarum*（*Rhodospirillum salinarum*） | 盐场玫瑰弧菌（盐场红螺菌） |
| *Rhodovulum sulfidophilum*（*Rhodobacter sulfidophilus，Rhodopseudomonas sulfidophila*） | 嗜硫小红卵菌（嗜硫红细菌，嗜硫红假单胞菌 ） |
| *Rubrivivax gelatinosus* （*Rhodocyclus gelatinosus，Rhodopseudomonas gelatinosa*） | 胶状红长命菌（胶状红环菌，胶状红假单胞菌） |

* + 1. 促生、分解磷钾化合物细菌类

| *Acidithiobacillus thiooxidans（Thiobacillus thiooxidans）* | 硫氧化酸硫杆状菌（硫氧化硫杆菌） |
| --- | --- |
| *Bacillus amyloliquefaciens* | 解淀粉芽孢杆菌 |
| *Bacillus coagulans* | 凝结芽孢杆菌 |
| *Bacillus firmus* | 坚强芽孢杆菌 |
| *Bacillus licheniformis* | 地衣芽孢杆菌 |
| *Bacillus megaterium* | 巨大芽孢杆菌 |
| *Bacillus methylotrophicus* | 甲基营养型芽孢杆菌 |
| *Bacillus mycoides* | 蕈状芽孢杆菌 |
| *Bacillus pumilus* | 短小芽孢杆菌 |
| *Bacillus safensis* | 沙福芽孢杆菌 |
| *Bacillus simplex* | 简单芽孢杆菌 |
| *Bacillus subtilis* | 枯草芽孢杆菌 |
| *Bacillus thuringiensis* | 苏云金芽孢杆菌 |
| *Brevibacillus laterosporus* | 侧孢短芽孢杆菌 |
| *Brevibacillus reuszeri* | 茹氏短芽孢杆菌 |
| *Geobacillus stearothermophilus* | 嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌（嗜热脂肪地芽孢杆菌） |
| *Paenibacillus azotofixans（Paenibacillus durus）* | 固氮类芽孢杆菌（坚韧类芽孢杆菌） |
| *Paenibacillus mucilaginosus* | 胶冻样类芽孢杆菌 |
| *Paenibacillus peoriae* | 皮尔瑞俄类芽孢杆菌 |
| *Paenibacillus polymyxa* | 多粘类芽孢杆菌 |

* + 1. 乳酸菌类

| *Lactobacillus acidophilus* | 嗜酸乳杆菌 |
| --- | --- |
| *Lactobacillus brevis* | 短乳杆菌 |
| *Lactobacillus buchneri* | 布氏乳杆菌 |
| *Lactobacillus casei* | 干酪乳杆菌 |
| *Lactobacillus delbrueckii* | 德氏乳杆菌 |
| *Lactobacillus helveticus* | 瑞士乳杆菌 |
| *Lactobacillus parabuchneri* | 类布氏乳杆菌 |
| *Lactobacillus paracasei* | 类干酪乳杆菌 |
| *Lactobacillus parafarraginis* | 类谷糠乳杆菌 |
| *Lactobacillus plantarum* | 植物乳杆菌 |
| *Lactobacillus rhamnosus* | 鼠李糖乳杆菌 |
| *Lactococcus lactis（Streptococcus lactis）* | 乳酸乳球菌（乳酸链球菌） |
| *Pediococcus pentosaceus* | 戊糖片球菌 |
| *Streptococcus thermophilus* | 嗜热链球菌 |

* + 1. 酵母菌类

|  |  |
| --- | --- |
| *Candida ethanolica* | 乙醇假丝酵母 |
| *Candida membranifaciens* | 膜醭假丝酵母 |
| *Clavispora lusitaniae* | 葡萄牙棒孢酵母 |
| *Cyberlindnera fabianii*（*Pichia fabianii*） | 费比恩塞伯林德纳氏酵母（费比恩毕赤酵母） |
| *Cyberlindnera jadinii*（*Candida utilis，Pichia jadinii*） | 杰丁塞伯林德纳氏酵母（产朊假丝酵母、杰丁毕赤酵母 ） |
| *Issatchenkia orientalis*（*Candida krusei*） | 东方伊萨酵母 |
| *Kazachstania exigua*（*Saccharomyces exiguus*） | 少孢哈萨克斯坦酵母（少孢酵母） |
| *Kluyveromyces lactis* | 乳酸克鲁维酵母 |
| *Komagataella pastoris*（*Pichia pastoris*) | 巴斯德驹形氏酵母（巴斯德毕赤酵母） |
| *Meyerozyma guilliermondii*（*Candida guillermondii，Pichia guilliermondii*） | 季也蒙迈耶氏酵母（季也蒙假丝酵母，季也蒙毕赤酵母） |
| *Millerozyma farinosa*（*Pichia farinosa*） | 粉状米勒氏酵母（粉状毕赤酵母 ） |
| *Pichia membranifaciens* | 膜醭毕赤酵母 |
| *Rhodotorula mucilaginosa*（*Rhodotorula rubra* ) | 胶红酵母（深红酵母 ) |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 酿酒酵母 |
| *Saccharomycopsis fibuligera*（*Endomycopsis fibuligera*） | 扣囊复膜孢酵母（扣囊拟内孢霉） |
| *Wickerhamomyces anomalus*（*Pichia anomala*） | 异常威克汉姆酵母（异常毕赤酵母） |
| *Yarrowia lipolytica*（*Candida lipolytica*) | 解脂耶罗威亚酵母（解脂假丝酵母） |

* + 1. AM真菌类

|  |  |
| --- | --- |
| *Funneliformis mosseae（Glomus mosseae）* | 摩西管柄囊霉 |
| *Rhizophagus intraradices（Glomus intraradices)* | 根内根生囊霉（根内球囊霉） |

* + 1. 放线菌类

|  |  |
| --- | --- |
| *Frankia* sp*.* | 弗兰克氏菌（固氮放线菌） |
| *Streptomyces fradiae* | 弗氏链霉菌 |
| *Streptomyces microflavus* | 细黄链霉菌 |

* 1. 第二级：需做急性经口毒性（LD50）试验的菌种

| *Arthrobacter arilaitensis* | 阿氏团队节杆菌（研究团队节杆菌） |
| --- | --- |
| *Arthrobacter aurescens* | 变金黄节杆菌（金黄节杆菌） |
| *Aspergillus candidus* | 亮白曲霉 |
| *Aspergillus chevalieri*（*Eurotium chevalieri*) | 谢瓦曲霉（谢瓦散囊菌） |
| *Aspergillus japonicus* | 日本曲霉 |
| *Aspergillus niger* | 黑曲霉 |
| *Aspergillus oryzae* | 米曲霉 |
| *Aspergillus penicillioides* | 帚状曲霉 |
| *Aspergillus sydowii* | 聚多曲霉 |
| *Aspergillus wentii* | 温特曲霉 |
| *Bacillus atrophaeus* | 深褐芽孢杆菌（萎缩芽孢杆菌） |
| *Bacillus circulans* | 环状芽孢杆菌 |
| *Brevundimonas vesicularis（Pseudomonas vesicularis）* | 泡囊短波单胞菌（泡囊假单胞菌） |
| *Chaetomium cochliodes* | 螺卷毛壳 |
| *Chaetomium globosum* | 球毛壳 |
| *Chaetomium trilaterale* | 三侧毛壳 |
| *Clonostachys rosea*（*Gliocladium roseum*） | 粉红螺旋聚孢霉（粉红粘帚霉） |
| *Clostridium pasteurianum* | 巴斯德梭菌（巴氏梭菌） |
| *Dipodascus geotrichum*（*Geotrichum candidum*） | 地丝双足囊菌（白地霉） |
| *Hydrogenophaga flava* | 黄色食氢产水嗜菌（黄色嗜氢菌） |
| *Laceyella sacchari* | 糖莱西氏菌（甘蔗兰希氏菌） |
| *Lysinibacillus sphaericus*（*Bacillus sphaericus*） | 球形赖氨酸芽孢杆菌（球形芽孢杆菌） |
| *Myceliophthora thermophila*（*Sporotrichum thermophie*） | 嗜热毁丝霉（嗜热侧孢霉） |
| *Metarhizium anisopliae* | 金龟子绿僵菌 |
| *Paenibacillus macerans* | 浸麻类芽孢杆菌 |
| *Penicillium albicans* | 白色青霉 |
| *Penicillium bilaiae* | 拜赖青霉（比莱青霉） |
| *Penicillium citreonigrum*（*Eupenicillium hirayamae*） | 黄暗青霉（平山正青霉） |
| *Penicillium corylophilum* | 顶青霉 |
| *Penicillium expansum* | 扩展青霉 |
| *Penicillium glabrum*（*Penicillium frequentans*） | 光孢青霉（常现青霉） |
| *Penicillium oxalicum* | 草酸青霉 |
| *Phanerodontia chrysosporium*（*Phanerochaete chrysosporium*） | 异原黄孢原毛平革菌（黄孢原毛平革菌） |
| *Promicromonospora citrea* | 柠檬原小单胞菌 |
| *Pseudomonas fluorescens* | 荧光假单胞菌 |
| *Pseudomonas putida* | 恶臭假单胞菌 |
| *Pseudomonas stutzeri* | 施氏假单胞菌 |
| *Purpureocillium lilacinum*（*Paecilomyces lilacinus*） | 淡紫紫孢菌（淡紫拟青霉） |
| *Rhizopus nigricans* | 黑根霉 |
| *Rhizopus oryzae* | 米根霉 |
| *Sphingobacterium multivorum*（*Flavobacterium multivorum*) | 多食鞘氨醇杆菌（多食黄杆菌） |
| *Streptomyces albidoflavus* | 微白黄链霉菌 |
| *Streptomyces albogriseolus* | 白浅灰链霉菌 |
| *Streptomyces alboniger* | 白黑链霉菌 |
| *Streptomyces albovinaceus* | 白酒红链霉菌 |
| *Streptomyces albus* | 白色链霉菌 |
| *Streptomyces avermitilis* | 阿维菌素链霉菌（除虫链霉菌） |
| *Streptomyces cellulosae* | 纤维素链霉菌 |
| *Streptomyces corchorusii* | 黄麻链霉菌 |
| *streptomyces globisporus* | 球孢链霉菌 |
| *Streptomyces griseoincarnatus* | 灰肉色链霉菌（灰肉红链霉菌） |
| *Streptomyces hiroshimensis* (*Streptomyces salmonis* ) | 广岛链霉菌（鲑色链霉菌） |
| *Streptomyces lavendulae* | 淡紫灰链霉菌 |
| *Streptomyces pactum* | 密旋链霉菌 |
| *Streptomyces rochei* | 娄彻链霉菌 |
| *Streptomyces tendae* | 唐德链霉菌 |
| *Streptomyces thermoviolaceus* | 热紫链霉菌 |
| *Streptomyces venezuelae* | 委内瑞拉链霉菌 |
| *Streptomyces vinaceusdrappus* | 酒红土褐链霉菌 |
| *Streptomyces caelestis* | 天青链霉菌 |
| *Stretomyces canus* | 暗灰链霉菌 |
| *Stretomyces costaricanus* | 哥斯达黎加链霉菌 |
| *Trichoderma asperellum* | 棘孢木霉 |
| *Trichoderma atroviride* | 深绿木霉 |
| *Trichoderma ghanense* | 加纳木霉 |
| *Trichoderma harzianum* | 哈茨木霉 |
| *Trichoderma koningii* | 康宁木霉 |
| *Trichoderma longibrachiatum* | 长枝木霉 |
| *Trichoderma pseudokoningii* | 拟康宁木霉 |
| *Trichoderma reesei* | 里氏木霉 |
| *Trichoderma virens* | 绿木霉 |
| *Trichoderma viride* | 绿色木霉 |

* 1. 第三级：需做致病性试验的菌种

|  |  |
| --- | --- |
| *Achromobacter denitrificans*（*Alcaligenes denitrificans*） | 反硝化无色小杆菌（反硝化产碱菌） |
| *Achromobacter xylosoxidans*（*Alcaligenes xylosoxidans*） | 木糖氧化无色小杆菌（木糖氧化产碱菌） |
| *Acinetobacter baumannii* | 鲍氏不动杆菌 |
| *Acinetobacter calcoaceticus* | 乙酸钙不动杆菌 |
| *Alcaligenes faecalis* | 粪产碱菌 |
| *Bacillus cereus* | 蜡样芽孢杆菌 |
| *Brevundimonas diminuta*（*Pseudomonas diminuta*) | 缺陷短波单胞菌（缺陷假单胞菌、微小假单胞菌) |
| *Burkholderia fungorum* | 真菌伯克霍尔德氏菌 |
| *Enterobacter cloacae* | 阴沟肠杆菌 |
| *Enterobacter gergoviae* | 日勾维肠杆菌 |
| *Gordonia amarae*（*Nocardia amarae*） | 沟戈登氏菌（沟诺卡氏菌） |
| *Mucor circinelloides* | 卷枝毛霉 |
| *Nocardia* sp*.* | 诺卡氏菌 |
| *Nocardiopsis* sp*.* | 拟诺卡氏菌 |
| *Pantoea agglomerans*（*Enterobacter agglomerans*） | 成团泛菌（成团肠杆菌） |
| *Pseudomonas alcaligenes* | 产碱假单胞菌 |
| *Rhizobium radiobacter*（*Agrobacterium radiobacter, Agrobacterium tumefaciens*) | 放射杆状根瘤菌（放射形农杆菌、根癌农杆菌） |
| *Proteus* sp*.* | 变形菌 |

* 1. 第四级：禁用菌种

|  |  |
| --- | --- |
| *Alternaria* sp*.* | 链格孢属 |
| *Aspergillus flavus* | 黄曲霉 |
| *Aspergillus fumigatus* | 烟曲霉 |
| *Aspergillus nidulans* | 构巣曲霉 |
| *Aspergillus ochraceus* | 赭曲霉 |
| *Aspergillus parasiticus* | 寄生曲霉 |
| *Aspergillus rugulosus* | 细皱曲霉 |
| *Aspergillus versicolor* | 杂色曲霉 |
| *Bacillus anthracis* | 炭疽芽孢杆菌 |
| *Candida parapsilosis* | 近平滑假丝酵母 |
| *Candida tropicalis* | 热带假丝酵母 |
| Claviceps sp. | 麦角菌 |
| *Erwinia* sp*.* | 欧文氏菌 |
| *Fusarium* sp*.* | 镰孢菌（镰刀菌） |
| *Klebsiella oxytoca* | 产酸克雷伯氏菌 |
| *Klebsiella pneumoniae* | 肺炎克雷伯氏菌 |
| *Penicillium chrysogenum* | 产黄青霉 |
| *Penicillium citrinum* | 桔青霉 |
| *Penicillium cyclopium* | 圆弧青霉 |
| *Penicillium marneffei* | 马尔尼菲青霉 |
| *Penicillium viridicatum* | 鲜绿青霉 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 铜绿假单胞菌 |
| *Pseudomonas marginalis* | 边缘假单胞菌 |
| *Ralstonia solanacearum*（*Pseudomonas solanacearum*） | 茄科罗尔斯通氏菌 （茄科假单胞菌、青枯假单胞菌） |
| *Pseudomonas syringae* | 丁香假单胞菌 |

1. （规范性）  
   一次破损皮肤刺激试验
   1. 目的

检测受试物对实验动物皮肤的刺激/腐蚀作用和强度。

* 1. 实验动物

每次实验至少需要3只皮肤完好的白色健康家兔或豚鼠。

* 1. 操作程序

涂受试物前，将实验动物背部脊柱两侧的毛去掉，去毛范围约2.5 cm × 2.5 cm，用75%酒精清洁、消毒暴露皮肤，待酒精挥发后，用灭菌刀片或注射针头分别在两块皮区内划一个“＃”形的破损伤口。注意皮肤破损仅达表皮，不要伤及真皮。

将受试物0.5 mL直接滴于破损皮肤上，或滴于同样大小的2层～4层纱布上并敷贴于破损皮肤表面，然后用一层无刺激塑料膜或油纸覆盖，再用无刺激胶布固定。另一侧去毛破损皮肤作为空白对照（或溶剂对照），敷贴时间为4 h。试验结束后，用温水或无刺激性溶剂除去残留受试物。

分别于去除受试物后1 h、24 h和48 h观察皮肤局部反应，并按表1进行刺激反应评分。注意鉴别感染和原发性刺激反应的区别，若有感染可疑，应进行重复测试。

* 1. 评价规定

在各个观察时间点，按照表B.1对动物的皮肤红斑与水肿形成情况进行评分，并按时间点将3只动物的评分相加，除以动物数，获得不同时间点的皮肤刺激反应积分均值（刺激指数）。取其中最高皮肤刺激指数，按表B.2评定该受试物对动物皮肤刺激强度的级别。

* 1. 皮肤刺激反应的评分标准

| 皮肤刺激反应 | 皮肤刺激反应评分 |
| --- | --- |
| 红斑形成： |  |
| 无 | 0 |
| 勉强可见 | 1 |
| 明显红斑 | 2 |
| 中等至严重红斑 | 3 |
| 紫红色红斑并有焦痂形成 | 4 |
| 水肿形成： |  |
| 无 | 0 |
| 勉强可见 | 1 |
| 皮肤隆起，轮廓清楚 | 2 |
| 水肿隆起不超过1 mm | 3 |
| 水肿隆起超过1 mm | 4 |

* 1. 皮肤刺激强度分级

| 皮肤刺激指数 | 刺激强度级别 |
| --- | --- |
| 0～0.5（不含） | 无刺激性 |
| 0.5～2.0（不含） | 轻刺激性 |
| 2.0～6.0（不含） | 中等刺激性 |
| 6.0～8.0 | 强刺激性 |

1. （规范性）  
   急性眼刺激试验
   1. 目的

检测受试物对实验动物眼睛的急性刺激和腐蚀作用。

* 1. 实验动物

新西兰家兔3只，体重1 000 g ~ 1 500 g，试验前检查家兔双眼，有异常者不能用于试验。

* 1. 操作程序

吸取受试物0.1 mL，滴入家兔一侧眼结膜囊内，另一侧眼以生理盐水作为正常对照。

滴受试物后，将眼被动闭合4 s，30 s后用生理盐水冲洗。于滴眼后1 h、24 h、48 h、72 h、7 d、14 d和21 d，肉眼观察家兔眼结膜、虹膜和角膜的损伤与恢复情况。如果72 h内未出现刺激反应，或第7 d或第14 d，眼睛刺激反应完全恢复，即可提前终止试验。必要时，用2%荧光素钠溶液或裂隙灯、放大镜检查角膜及虹膜变化。

* 1. 评价规定

按表C.1对家兔眼角膜、虹膜和结膜的急性刺激反应进行评分，并分别计算每只动物在3个不同观察时间（24 h、48 h和72 h）角膜损害、虹膜损害、结膜充血和结膜水肿四方面的“平均评分”（即每只动物的24 h、48 h和72 h评分之和除以观察数3）。分别以动物眼角膜、虹膜和结膜充血、水肿的平均评分和恢复时间进行评分，按表C.2或表C.3眼刺激反应分级标准判定受试物对眼睛的刺激强度。

* 1. 急性眼刺激反应的评分标准

| 眼损害表现 | 评分 |
| --- | --- |
| 角膜损害：  无溃疡形成或混浊  散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见  半透明区易分辨，虹膜模糊不清  出现灰白色半透明区，虹膜细节不清，瞳孔大小勉强可见  角膜不透明，混浊，虹膜无法辨认 | 0  1  2  3  4 |
| 虹膜损害：  正常  皱褶明显加深，充血，肿胀，角膜周围有中度充血，瞳孔对光仍有反应  出血、肉眼可见破坏，或瞳孔对光无反应 | 0  1  2 |
| 结膜（睑结膜、球结膜）充血：  血管正常  血管充血呈鲜红色  血管充血呈深红色，血管不易分辨  弥漫性充血呈紫红色 | 0  1  2  3 |
| 结膜（睑结膜、球结膜）水肿：  无水肿  轻微水肿（包括瞬膜）  明显水肿，伴有部分眼睑外翻  水肿至眼睑近半闭合  水肿至眼睑大半闭合 | 0  1  2  3  4 |

* 1. 眼刺激反应分级标准

| 级 别 | | 判定依据 |
| --- | --- | --- |
| 可逆性  损伤 | 无刺激性 | 3只动物的平均评分：角膜损害<1、虹膜损害<1、结膜充血<2和结膜水肿<2；或3只动物中至少有2只动物的平均评分符合上述标准，另外1只动物的刺激反应在21 d内完全恢复 |
| 轻刺激性 | 3只动物中有2只动物的平均评分：角膜损害≥1；虹膜损害≥1；结膜充血≥2；结膜水肿≥2，且7 d内全部动物的刺激反应完全恢复 |
| 刺激性a | 3只动物中有2只动物的平均评分：角膜损害≥1；虹膜损害≥1；结膜充血≥2；结膜水肿≥2，且21 d内全部动物的刺激反应完全恢复 |
| 不可逆性损伤 | 腐蚀性b | 至少有1只动物的角膜、虹膜或结膜的刺激反应在21 d的观察期内未完全恢复或/和在3只动物中有2只动物的平均评分：角膜损害≥3；虹膜损害≥1.5 |
| 注：完全恢复是指动物的眼刺激反应评分：角膜损害=0，虹膜损害=0，结膜充血≤1，结膜水肿≤1 | | |
| a 接触受试物后所产生的可逆性炎性反应。  b 接触受试物后所产生的不可逆性组织损伤。 | | |

* 1. 眼刺激性反应分级标准

| 平均评分 | 动物数，只 | 恢复时间a，d | 损伤类型 |
| --- | --- | --- | --- |
| 角膜损害<1和  虹膜损害<1和  结膜充血<2和  结膜水肿<2 | ≥2 | ≤21 | 无刺激性 |
| 角膜损害≥1或  虹膜损害≥1或  结膜充血≥2或  结膜水肿≥2 | ≥2 | ≤7 | 轻刺激性 |
| ≤21 | 刺激性 |
| 角膜损害≥3或  虹膜损害≥1.5 | ≥2 |  | 腐蚀性b |
| 角膜损害≥1或  虹膜损害≥1或  结膜充血≥1或  结膜水肿≥1 | ≥1 | >21 |
| a 为动物刺激反应评分恢复至角膜损害=0、虹膜损害=0、结膜充血≤1、结膜水肿≤1的时间。  b 至少有1只动物于21 d尚存在角膜粘连或血管翳，也可判为腐蚀性。 | | | |

1. （规范性）  
   急性毒性（LD50）剂量分级

D.1 急性毒性（LD50）剂量分级

急性毒性（LD50）剂量分级见表D.1。

* 1. 急性毒性（LD50）剂量分级表

| 级别 | 大（小）鼠口服LD50  mg/kg | 相当于人的致死量 | |
| --- | --- | --- | --- |
| mg/kg | g/人 |
| 极毒 | ＜1 | 稍尝 | 0.05 |
| 剧毒 | 1～50 | 500～4 000 | 0.5 |
| 中等毒 | 51～500 | 4 000～30 000 | 5 |
| 低毒 | 501～5 000 | 30 000～250 000 | 50 |
| 实际无毒 | ＞5 000 | 250 000～500 000 | 500 |

