

附件

直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株 鉴定及其安全性评价指南

(征求意见稿)

1 适用范围

1.1 本指南规定了直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价的基本原则、基本要求、评价方法以及结果判定。

1.2 本指南适用于新饲料、新饲料添加剂评审和已经批准使用的饲料添加剂再评价时，对直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株开展的鉴定及其安全性评价，包括发酵制品中与生产菌株直接相关的安全性评价。

1.3 本指南仅涵盖直接饲喂微生物和发酵制品与生产菌株相关的鉴定及其安全性评价，产品的其他安全性评价按照相关规定和指南开展。

1.4 本指南所称微生物包括细菌、酵母和丝状真菌。其他如古菌、微藻等微生物的相关评价可参照本指南要求，采取个案分析评价。

1.5 本指南适用于通过农业转基因生物安全评价、获得农业转基因生物安全证书的转基因生产菌株及其发酵制品的相关内容评价。

1.6 本指南不适用于直接饲喂的转基因微生物（包括特定生产或无意带入）的相关内容评价。

1.7 发酵饲料、发酵原料生产所用微生物参照本指南进行相关内容评价。

2 术语和定义

以下术语和定义适用于本指南。

2.1 直接饲喂微生物（Direct-Fed microorganisms）

在饲料中添加或直接饲喂给动物的活的微生物饲料添加剂。

2.2 发酵制品（Fermentation products）

微生物在受控制条件下，通过生命活动生产的特定代谢产物或微生物细胞经分离、提取、纯化、精制和干燥等工艺制成的饲料添加剂，如氨基酸、维生素、酶制剂等。

2.3 获得性耐药（Acquired antimicrobial resistance）

在对特定抗菌药物典型敏感的菌种中，由于获取外源基因或基因突变引起某一菌株对该抗菌药物产生的耐药。

2.4 关注基因（Gene of concern）

已知毒力因子的编码基因、耐药基因，以及与已知毒性化合物产生等有关的基因。

2.5 临界值（Cut-off value）

根据抗菌药物对特定微生物类群（种或属）的最低抑菌浓度（MIC）分布而设定的，用于耐药判定的截点值。

2.6 危害（Hazard）

饲料中对人和动物健康有潜在不良影响的生物、化学或物理性因素或条件。

2.7 风险 (Risk)

饲料中危害产生某种不良健康影响的可能性或严重性。

2.8 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。

2.9 致病性 (Pathogenicity)

微生物感染宿主造成健康损害引起疾病的能力。

2.10 毒性 (Toxicity)

微生物有毒代谢产物引起的宿主健康损伤。

3 基本原则

3.1 直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价应基于当前的科学认知开展，具体的评价试验应遵循本指南规定的一般原则，并结合直接饲喂微生物和发酵制品特征属性进行方案设计和试验实施。

3.2 直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价试验应按照国家、行业标准或参照国际组织标准检测方法、技术规范等进行，若无相关标准检测方法、技术规范则按照行业公认的检测方法进行。

3.3 直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价试验（包括检测）应由具备微生物相关专业知识和试验技能的专业人员在具备相应设施设备的试验场所，按照规范的操作程序

进行。试验应在有效的质量控制下开展，并且由试验机构指定的负责人负责。对于新饲料添加剂申报、进口饲料添加剂登记及其他需要依照新饲料、新饲料添加剂评审程序评审的产品申报的，微生物鉴定，全基因组测序，基于全基因组序列的细菌耐药基因、细菌毒力基因、真菌产毒性相关的已知代谢途径分析，动物致病性试验，丝状真菌产毒试验，芽胞杆菌细胞毒性试验，发酵制品中无生产菌株活细胞评价，发酵制品中生产菌株 DNA 检测等评价试验应由农业农村部指定的评价试验机构开展。农业农村部尚未指定评价试验机构的，应由具有相应条件和能力的检测评价机构开展。

3.4 直接饲喂微生物或发酵制品生产中使用多个菌株时，应分别针对每个菌株开展相关评价。

3.5 本指南中涉及的用于菌株安全性分析、比对、评价的相关数据库、药物名单等，应采用最新版本。

3.6 鉴于菌株在使用过程中可能产生变异或衰退，开展安全性评价时应充分考虑菌株鉴定报告及安全性评价相关检测报告的时效性。

4 基本要求

应通过形态观察、生理生化检测和分子生物学分析等技术方法对直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株进行鉴定。通过微生物表型试验、分子生物学试验、全基因组序列（WGS）分析、动物致病性试验、相关文献资料综述等，对直接饲喂微生物和发酵制

品生产菌株安全性进行综合评价。不同微生物及生产菌株评价基本要求见表 1。

表 1 菌株鉴定及其安全性评价基本要求

评价内容	章节	直接饲喂微生物		发酵制品生产菌株	
		细菌	酵母和丝状真菌	细菌	酵母和丝状真菌
微生物鉴定	5.1	√	√	√	√
产毒能力和致病性	5.3	√	√	√	√
抗菌药物敏感性	5.4	√		√	
抗菌药物产生	5.5	√	√	√	√
生产菌株的遗传修饰	5.6	仅适用于转基因微生物	仅适用于转基因微生物	仅适用于转基因微生物	仅适用于转基因微生物
发酵制品中无生产菌株活细胞评价	5.7			√	√
发酵制品中生产菌株 DNA 检测	5.8			必要时	必要时

5 评价方法

5.1 微生物鉴定

5.1.1 基本信息

明确直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株的属名、种名（包括中文学名、拉丁学名等）和菌株名称或编号。对于尚未有统一中文学名的菌种，由国家级菌种保藏中心给出正式的中文学名。细菌的命名应遵循原核生物系统学国际委员会（ICSP）的规定，并符合原核生物国际命名法规（ICNP）要求。酵母和丝状真菌的命名应符合国际藻类、真菌和植物命名法规（ICN）的要求。明确菌株的来源和改良史，包括实施的诱变步骤和遗传修饰。转基因生产菌株的遗传修饰按照 5.6 的要求进行描述。

5.1.2 鉴定

直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株应明确鉴定至少到种或亚种水平。

5.1.2.1 细菌鉴定

综合形态观察、生理生化检测、分子生物学分析对细菌进行鉴定。

——形态观察：包括菌落颜色、形状、边缘、透明度等宏观形态观察，以及菌体大小、形状、革兰氏染色反应、是否有芽胞、芽胞的着生位置等微观形态观察。

——生理生化检测：包括碳源利用、氮源利用、氧化酶反应、过氧化氢酶反应等关键生理生化特征检测。

——分子生物学分析：如 16S rDNA 序列、持家基因序列或 WGS 等分析。对于新饲料添加剂申报、进口饲料添加剂登记及其他需要依照新饲料、新饲料添加剂评审程序评审的产品申报的，应利用 WGS 数据进行分析鉴定。

5.1.2.2 酵母菌鉴定

综合形态观察、生理生化检测、分子生物学分析对酵母菌进行鉴定。

——形态观察：包括菌落质地、颜色、边缘等宏观形态观察，以及菌体大小、形状、是否有真假菌丝、生殖方式等微观形态观察。

——生理生化检测：包括碳源利用、糖类发酵、氮源利用等关键生理生化特征检测。

——分子生物学分析：如 26S rDNA、ITS rDNA 等特征序列或 WGS 分析。

5.1.2.3 丝状真菌鉴定

综合形态观察、分子生物学分析对丝状真菌进行鉴定。

——形态观察：包括菌落的质地、颜色、生长速度、色素的产生等宏观形态观察，以及菌丝的颜色、产孢结构的大小及发生方式、孢子颜色、形状、是否具有有性生殖结构等微观形态观察。

——分子生物学分析：如 18S rDNA 序列、ITS rDNA 序列及其他特征基因（如微管蛋白基因、钙调蛋白基因、翻译延伸因子等）序列或 WGS 分析。

5.2 WGS 测序

采用二代和三代测序技术对直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株进行全基因组测序，获得其基因组框架图和完成图，测序报告至少应包括以下信息：

DNA 提取方法；测序方案和仪器；序列组装方法，如生物信息学方法、从头测序或重测序等；序列质量评价，如平均 Phred 得分、reads 数目、覆盖度、N50 和 K-mer 等；WGS 的 FASTA 文件；相对于预期基因组大小的 contigs 总长度；基因注释方法；对于酵母和丝状真菌，还需提供从相关数据库（如 BUSCO 数据库）获得的注释质量信息。

5.3 产毒能力和致病性

应通过国内外安全性评价资料综述、WGS 分析和动物致病性

试验对直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株的产毒能力和致病性进行综合评价，其中丝状真菌还应开展产毒试验。

鉴于屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 和芽胞杆菌 (*Bacillus* spp.) 的致病性风险比较清晰，已有成熟的致病性评价方法，可分别按 5.3.6 和 5.3.7 开展评价。

5.3.1 国内外文献资料综述

通过国内外文献数据检索（具体要求见附录 B），收集整理菌株的国内外使用历史、安全性评价资料，包括对人和靶动物的产毒能力和致病性的相关信息；若无该评价菌株的上述资料，应收集整理同种内其他菌株或与其相近种属的相关信息。若对菌株进行了任何降低毒性和致病性的选育（包括诱变和/或遗传修饰），应予以说明。

5.3.2 WGS 分析

5.3.2.1 细菌

将菌株 WGS 与最新数据库（包括但不限于 VFDB、PAI DB、MvirDB、CGE 等）中存储的序列进行比对，分析菌株遗传物质中是否存在已知毒力因子的编码基因。分析结果重点关注该种或近缘种中已知毒力因子（如毒素、入侵与粘附因子）的完整编码基因。结果以表格形式表示，至少应包括如下信息：基因名称、定位（染色体或质粒）、编码蛋白的功能、覆盖度（序列长度覆盖度 $\geq 70\%$ ）、相似性百分比（输入序列与数据库中序列的匹配度 $\geq 80\%$ ）和 e 值（ $< 10^{-5}$ ）等。

5.3.2.2 酵母和丝状真菌

若菌株有 WGS 数据，则通过定向搜索确定菌株是否存在与产毒性相关的已知代谢途径。

5.3.3 动物致病性试验

制备直接饲喂微生物或发酵制品生产菌株的菌悬液，将其作为受试物，通过腹腔注射和经口灌胃等途径给予实验动物，评价不同暴露途径下受试物对实验动物的致病性。动物致病性试验应由农业农村部指定的评价试验机构，或具有相应 CMA 资质认定或 CNAS 实验室认可的第三方检测评价机构，按照相关行业已有方法开展。

5.3.4 产毒试验

对于丝状真菌，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，并按照国家标准检测方法或国际组织规定的标准检测方法进行已知毒性化合物含量检测。

对于发酵制品生产菌株，若产毒试验检测到已知毒性化合物，还应通过检测分析证明发酵制品中不含该化合物或该含量下风险无需关注。

5.3.5 结果分析

5.3.5.1 动物致病性试验显示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时，则判定菌株具有致病性。

5.3.5.2 产毒试验检测到已知毒性化合物时，则判定丝状真菌菌株具有产毒能力。

5.3.5.3 动物致病性试验显示无致病性的微生物，但存在以下情况的，需结合国内外文献资料综述、生产工艺、终产品中菌株和已知毒性化合物的存在情况等综合判断。

——WGS 分析显示存在已知毒力因子的编码基因（或产毒代谢相关基因）的细菌或酵母；

——产毒试验未检测到已知毒性化合物，但 WGS 分析显示存在产毒代谢相关基因的丝状真菌。

5.3.6 屎肠球菌的致病性评价

屎肠球菌（*E. faecium*）包括两个类群。其中一个类群主要由分离自健康个体粪便的菌株组成，其特征是对氨苄西林敏感。另一个类群包括了大部分的临床分离株，其特征是对氨苄西林耐药。除对氨苄西林耐药性进行评价外，致病岛标记基因 *esp*、类糖基水解酶基因 *hylEfm* 和标记物 *IS16* 也是屎肠球菌安全评价的关注点。

按照 5.4.1 的方法测定屎肠球菌的氨苄西林耐药性。

——若 MIC > 2 mg/L，则判定该菌株具有致病性危害。

——若 MIC ≤ 2 mg/L，还应利用 WGS 分析是否含有遗传元件 *IS16*、*hylEfm* 和 *esp*。若未检测到上述三种遗传元件，则判定该菌株不具有致病性危害。若检测到上述三种遗传元件中的一种或多种，则认为该菌株具有危害。

5.3.7 芽胞杆菌的致病性评价

蜡样芽胞杆菌群 (*Bacillus cereus* group) 的菌种普遍存在产毒能力, 故不建议将其用于直接饲喂微生物和发酵制品生产。如确需使用, 应对菌株进行 WGS 分析。若发现菌株具有肠毒素的编码基因 (如非溶血性肠毒素基因 *nhe*、溶血素 BL 基因 *hbl* 和细胞毒素 K 基因 *cytK* 等) 及呕吐素合成酶基因 *ces* 或相似基因, 应证明该基因不具有功能性。具有产毒潜力的菌株具有危害。

对于蜡样芽胞杆菌群 (*Bacillus cereus* group) 以外的其他芽胞杆菌 (*Bacillus* spp.), 应通过开展细胞毒性试验来确定菌株是否产生高水平的非核糖体合成肽。因缺少可以区分有害和无害菌株的动物模型, 采用基于细胞水平的体外试验方法 (见附录 C) 开展细胞毒性效应评价。

5.4 抗菌药物敏感性

直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株为细菌的, 应开展抗菌药物敏感性评价。通过开展测定抗菌药物 MIC 值的表型试验和 WGS 分析, 评价菌株是否具有获得性耐药。

5.4.1 表型试验

至少对菌株进行附录 A 所列抗菌药物 MIC 值的测定。对于附录 A 中未列出的细菌, 革兰氏阳性菌应选择附录 A 中“棒状杆菌和其他革兰氏阳性菌”规定的抗菌药物, 革兰氏阴性菌应选择附录 A 中“肠杆菌科”规定的抗菌药物。

MIC 值测定应采用琼脂或肉汤二倍梯度稀释法进行定量测定, 采用国际或国内标准方法, 如 EUCAST、CLSI、ISO、WS

等标准方法。除非抗菌药物不适用定量方法进行测定，否则不得采用定性或半定量方法（如扩散法）间接测定 MIC 值。

MIC 值测定通常应选择药物敏感性试验专用培养基，如 Mueller-Hinton 或 IsoSensitest 培养基。对于某些特定菌种或菌株，可以根据微生物特性选择其他针对性培养基，如某些乳酸菌和双歧杆菌的乳酸菌药物敏感性试验培养基 (LSM)。试验过程中应同时关注培养基组分（如对氨基苯甲酸、胸苷、甘氨酸、二价阳离子等）、试验类型（肉汤微量稀释或琼脂稀释）和培养条件（如 pH、温度、培养时间）等因素对某些抗菌药敏感水平的潜在影响。

通过将测定的 MIC 值与附录 A 中给出的各抗菌药物的临界值进行比较，以区分耐药菌株和敏感菌株。

——MIC 值 \leq 临界值时，认为菌株对该抗菌药物敏感；

——MIC 值 $>$ 临界值时，认为菌株对该抗菌药物耐药。

对于附录 A 中未列出的细菌，测定的 MIC 值应与该种或相关种的已发表文献值进行比较。

5.4.2 WGS 耐药基因分析

对菌株 WGS 进行分析，检测对用于人或动物的抗菌药物（世界卫生组织（WHO）发布的极为重要抗菌药物（CIAs）或高度重要抗菌药物（HIAs）耐药的编码基因或起促进作用的基因。对菌株 WGS 进行分析时，应将其与最新耐药基因分析数据库进行比对，如 CARD、ARG-ANNOT 和 ResFinder 等。分析结果以表格形式表示，重点关注抗菌药物耐药性完整编码基因，至少应包括

如下信息：基因名称、定位（染色体或质粒）、编码蛋白的功能、覆盖度（序列长度覆盖度 $\geq 70\%$ ）、相似性百分比（输入序列与数据库中序列的匹配度 $\geq 80\%$ ）和 e 值（ $< 10^{-5}$ ）等。

5.4.3 结果分析

5.4.3.1 当测定的 MIC 值 \leq 临界值（附录 A），若通过 WGS 分析未发现选定抗菌药物的耐药基因，则认为菌株不具有获得性耐药；若通过 WGS 分析检测到选定抗菌药物的耐药基因时，应评估耐药基因变为活性基因的可能性（如与活性基因序列进行比较），并进行综合判断。

5.4.3.2 当测定的 MIC 值 $>$ 临界值（附录 A），若通过 WGS 分析未发现与选定抗菌药物表型相关的已知耐药基因，则认为菌株不具有危害；若通过 WGS 分析检测到与抗菌药物表型直接相关的已知耐药基因，则认为菌株具有危害。

5.4.3.3 对所有菌株，若通过 WGS 分析，发现存在除附录 A 中选定抗菌药物以外的其他 CIAs 或 HIAs 的耐药基因，则应分别测定对应抗菌药物的 MIC 值，并与文献值进行比较：

——当 MIC 值 \leq 文献值，应评估耐药基因变为活性基因的可能性（如与活性基因序列进行比较），并进行综合判断；

——当 MIC 值 $>$ 文献值，则认为菌株具有危害。

5.5 抗菌药物产生

应对直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株是否产生人或动物用抗菌药物进行评价，已知不产生人或动物用抗菌药物的微生物

菌种除外。产品生产过程中若使用任何临床用相关抗菌药物，应予以说明。

应评价培养物上清液对抗菌药物敏感的参考菌株的抑菌活性。推荐 GB4789.43、EUCAST、CLSI 等相关方法中的参考菌株，也可使用国家级菌种保藏中心的等效菌株，也可根据实际生产情况增加参考菌株。若检测结果显示拟评价菌株培养物上清液对一种或一种以上参考菌株出现抑菌活性，应对抑菌物质进行鉴定，确定其是否为人或动物用抗菌药物。

若用于发酵制品的生产菌株能产生人或动物用抗菌药物，应证明发酵制品中无抗菌药物残留。应明确说明用于抗菌药物残留检测样品的具体采样阶段。样品应来自工业化生产线，若尚无工业化产品，可采用中试产品。

5.6 生产菌株的遗传修饰

若发酵制品生产菌株为《农业转基因生物安全管理条例》《农业转基因生产安全评价管理办法》中定义的转基因微生物，应对菌株遗传修饰信息进行如下描述。

5.6.1 遗传修饰目的

说明遗传修饰的目的，以及遗传修饰后微生物表型和代谢相关的特性及其变化。

5.6.2 遗传修饰的序列特征

详细描述插入、缺失、碱基对置换或移码突变等遗传修饰的序列特征。

5.6.2.1 插入序列

转基因微生物的插入序列可来自于特定生物体，也可以通过设计获得。当插入的 DNA 是由不同来源的序列组合而成时，应分别提供每条序列的相关信息。

(1) 来源于特定供体的 DNA

提供供体生物属和种水平的分类学信息。若序列来自环境样品，应提供与其最近的直系同源基因。对插入序列的描述应包括以下内容：

——所有插入元件的核苷酸序列，包括功能注释以及所有功能元件的物理图谱；

——插入元件的结构和功能，包括编码和非编码区；

——编码蛋白质的名称，推导的氨基酸序列和功能，提供编码酶的 EC 编号（如有）。

(2) 设计序列

设计的序列是自然界中未知存在的基因序列，如密码子优化基因、合理设计嵌合/合成基因或包含嵌合序列的基因等。描述应包括以下内容：

——设计原理和策略；

——DNA 序列和功能元件的物理图谱；

——推导氨基酸序列和编码蛋白质的功能；

——应通过与最新数据库（如 ENA、NCBI、UniProt 等）比对，确定重组蛋白的功能结构域，并描述数据库中与插入序列相似

性最高的蛋白信息。

5.6.2.2 缺失序列

对有意缺失的序列进行描述，并说明预期效果。

5.6.2.3 碱基对替换和移码突变

应对引入的碱基对替换和/或移码突变进行说明，并说明其预期效果。

5.6.3 遗传修饰的结构

推荐采用 WGS 进行生产菌株遗传修饰结构的特征分析。

5.6.3.1 WGS 分析遗传修饰结构

对于新饲料添加剂申报、进口饲料添加剂登记及其他需要依照新饲料、新饲料添加剂评审程序评审的产品，细菌应利用 WGS 分析其遗传修饰的结构特征。应提供包括遗传修饰的所有基因组区域（染色体、重叠群或质粒）图谱或/图示的详细说明，包括：

——插入、修饰或缺失的 ORF。应详细描述每个 ORF 的基因产物信息，至少包括氨基酸序列、功能和代谢作用。重点描述引入的关注基因，包括产毒、产临床相关抗菌药物、耐药性等相关基因。

——插入、缺失、修饰的非编码序列。对序列（如启动子、终止子等）的作用和功能进行描述。

上述分析可通过比较转基因微生物与未经修饰的亲本/受体菌株的 WGS 完成。应对用于分析和比较的序列/数据库及方法进行详细说明。

5.6.3.2 非 WGS 分析遗传修饰结构

对于无法获得 WGS 的酵母或丝状真菌，应对遗传修饰的所有步骤进行描述。所提供的信息应能识别所有可能引入受体/亲本微生物中的所有遗传物质。主要包括载体特征、遗传修饰过程、残留的载体或供体 DNA 结构及关注基因。

(1) 载体特征

描述载体的来源和类型（质粒、噬菌体、病毒、转座子），若使用了辅助质粒，也应予以描述；提供所有功能元件和其他载体元件位置图谱，并附对该图谱详细阐述的表格，用以标识每个元件，包括编码和非编码序列、复制和转移的位点、调控元件、耐药基因及其大小、来源和作用等信息。

(2) 遗传修饰过程信息

应对遗传修饰过程进行详细描述，包括 DNA 插入、缺失、替换或改造至受体/亲本的方法，以及筛选转基因微生物的方法；说明引入的 DNA 在微生物中的存在位置，明确插入基因是否在载体上，或是插入到染色体和/或真核微生物的细胞器（如线粒体）中。

(3) 转基因微生物中残留的载体和/或供体核酸结构

详细说明实际插入、替换或修饰序列的位置图谱；对于序列缺失的情况，必须提供缺失区域的大小和功能。

(4) 关注基因

对插入到转基因微生物中的任何关注基因（如耐药、毒素和毒力因子的编码基因）进行明确说明。

应通过试验证明转基因微生物中无不应存在的关注序列（如耐药基因、毒素和毒力因子的编码基因），包括遗传修饰过程中瞬时使用的序列（包括载体、辅助质粒），以及从中获取片段并用于转化的质粒/复制子中的序列，确定其中不含关注基因。

检测应采用适宜的方法，如 Southern 分析或 PCR 方法。

——Southern 印迹杂交验证应包括适宜的阳性和阴性对照。应说明所使用探针的长度、位置，琼脂糖凝胶中 DNA 的上样量及印迹前的凝胶图像。阳性对照的浓度应为生产菌株每个基因组中靶片段的 1~10 个拷贝。若使用多个探针，则应采用独立的试验分别进行测定。

——PCR 试验应包括阳性对照和阴性对照。阳性对照应含有遗传修饰所使用的相同基因，还应包含适宜的阳性对照以排除 PCR 抑制，确保试验灵敏度。

5.7 发酵制品中无生产菌株活细胞评价

发酵制品中应不含有生产菌株活细胞。详细描述生产过程中去除或灭活微生物的处理工艺步骤，并通过检测证明发酵制品中无生产菌株活细胞。

采用可培养方法检测产品中是否存在生产菌株活细胞。具体的采样、样品处理、培养条件、质控和鉴定要求见附录 D。

对于由相同上游发酵工艺（包括发酵、提取等）生产的中间产品，经不同后处理工艺（如与载体或稀释剂混合、包被等）获得的不同配方添加剂产品，应至少对发酵中间产品进行评价。若

为不同发酵生产体系生产的产品，应对每个添加剂产品分别评价。

5.8 发酵制品中生产菌株 DNA 检测

以下两类发酵制品应开展生产菌株 DNA 残留检测：

- (1) 生产菌株为非转基因微生物，但携带获得性耐药基因的；
- (2) 生产菌株为转基因微生物。

采用特异 PCR 方法或其他标准方法对生产菌株 DNA 特异性片段（如获得性耐药基因、遗传修饰目的基因）进行检测。特异 PCR 方法涉及的采样、DNA 提取、PCR 扩增和质控要求见附录 E。

6 结果判定

本部分仅涉及微生物（直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株）相关安全性评价结果。

6.1 直接饲喂微生物

6.1.1 无获得性耐药基因、不产生临床相关抗菌药物、无致病性/无产毒能力的细菌菌株判定为无危害，对靶动物、消费者和环境不具有风险。

6.1.2 无致病性/无产毒能力、不产生临床相关抗菌药物的酵母和丝状真菌菌株判定为无危害，对靶动物、消费者和环境不具有风险。

6.1.3 携带获得性耐药基因的细菌菌株判定为具有危害，对靶动物和添加剂暴露物种具有风险。

6.1.4 有致病性或产毒能力，或产生人或动物用抗菌药物的菌株判定为具有危害，对敏感靶动物和添加剂暴露物种具有风险。

6.2 非转基因微生物生产的发酵制品

6.2.1 无获得性耐药基因、不产生临床相关抗菌药物、无致病性/无产毒能力的菌株判定为无危害，产品（指发酵制品，下同）无生产菌株自身代谢引起的风险。

6.2.2 携带获得性耐药基因的发​​酵制品生产菌株（仅指细菌）判定为具有危害。若生产菌株（细菌）携带获得性耐药基因，并且产品中检测到长度足以覆盖耐药基因的完整 DNA 片段，则产品对靶动物和暴露物种具有风险；若产品中未检出生产菌株（细菌）相关 DNA 片段，则认为不具有风险。

6.2.3 有产毒能力或产临床相关抗菌药物的发酵制品生产菌株判定为具有危害，产品对敏感靶动物和暴露物种具有风险，除非证明产品中不存在相关毒素或抗菌药物。

6.3 转基因微生物生产的发酵制品

6.3.1 无获得性耐药基因、无致病性/无产毒能力、不产生临床相关抗菌药物、遗传修饰未引入/改变关注基因，且按照 5.8 所述方法，在产品（指发酵制品，下同）中未检出生产菌株重组 DNA 的菌株判定为无危害，产品无生产菌株自身代谢引起的风险。

6.3.2 携带获得性耐药基因的发​​酵制品生产菌株（仅指细菌）判定为具有危害。若发酵制品生产菌株（细菌）携带获得性耐药基因，并在产品中检测到耐药基因的完整 DNA 片段，则产品对靶动物和暴露物种具有风险；若产品中未检出生产菌株（细菌）相关 DNA 片段，则认为不具有风险。

6.3.3 若发酵制品的生产菌株具有产毒能力或产临床相关抗菌药物，则菌株判定为具有危害，产品对敏感靶动物和暴露物种具有风险，除非证明产品中不存在相关毒素或抗菌药物。

附录 A

细菌不同抗菌药物的临界值 (mg/L)

	青霉素类 Penicillins	糖肽类 Glycopeptides	氨基糖苷类 Aminoglycosides			大环内酯和酮内酯类 Macrolides and ketolides	林可酰胺类 Lincosamides	四环素类 Tetracyclines	酰胺醇类 Ampenicols	喹诺酮类 Quinolones	多粘菌素类 Polymyxins	磷酸类衍生物类 Phosphonic acid derivatives	
	氨苄西林 Ampicillin	万古霉素 Vancomycin	庆大霉素 Gentamicin	卡那霉素 Kanamycin	链霉素 Streptomycin	红霉素 Erythromycin	泰乐菌素 Tylosin	克林霉素 Clindamycin	四环素 Tetracycline	氯霉素 Chloramphenicol	环丙沙星 Ciprofloxacin	粘菌素 Colistin	磷霉素 Fosfomicin
专性同型发酵乳杆菌 ^(a) <i>Lactobacillus obligate homofermentative</i>	2	2	16	16	16	1	n.r.	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.
嗜酸乳杆菌群 <i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	n.r.	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.
专性异型发酵乳杆菌 ^(b) <i>Lactobacillus obligate heterofermentative</i>	2	n.r.	16	64	64	1	n.r.	4	8 ^(c)	4	n.r.	n.r.	n.r.
罗伊氏乳杆菌 <i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	n.r.	4	32	4	n.r.	n.r.	n.r.
兼性异型发酵乳杆菌 ^(d) <i>Lactobacillus facultative heterofermentative</i>	4	n.r.	16	64	64	1	n.r.	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.
植物乳杆菌/戊糖乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	n.r.	4	32	8	n.r.	n.r.	n.r.
鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	n.r.	4	8	4	n.r.	n.r.	n.r.
干酪乳杆菌/类干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	n.r.	4	4	4	n.r.	n.r.	n.r.
双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i> sp.	2	2	64	n.r.	128	1	n.r.	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.
片球菌属 <i>Pediococcus</i> sp.	4	n.r.	16	64	64	1	n.r.	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.
明串珠菌属 <i>Leuconostoc</i> sp.	2	n.r.	16	16	64	1	n.r.	1	8	4	n.r.	n.r.	n.r.
乳酸乳球菌 <i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	n.r.	1	4	8	n.r.	n.r.	n.r.
嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	n.r.	64	2	n.r.	2	4	4	n.r.	n.r.	n.r.
芽胞杆菌属 <i>Bacillus</i> sp.	n.r.	4	4	8	8	4	n.r.	4	8	8	n.r.	n.r.	n.r.
丙酸杆菌属 <i>Propionibacterium</i> sp.	2	4	64	64	64	0.5	n.r.	0.25	2	2	n.r.	n.r.	n.r.
屎肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	2	4	32	1024	128	4	4	4	4	16	n.r.	n.r.	n.r.
棒杆菌属和其他革兰氏阳性菌 <i>Corynebacterium</i> and other Gram-positive	1	4	4	16	8	1	n.r.	4	2	4	n.r.	n.r.	n.r.
肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae</i>	8	n.r.	2	8	16	n.r.	n.r.	n.r.	8	n.r.	0.06	2	8

备注:

n.r.: 不需要。

(a): 包括德氏乳杆菌 (*L. delbruecki*)、瑞士乳杆菌 (*L. helveticus*)。

(b): 包括发酵乳杆菌 (*L. fermentum*)。

(c): 布氏乳杆菌 (*L. buchneri*) 的四环素 cut-off 值为 128。

(d): 包括同型发酵的唾液乳杆菌 (*L. salivarius*)。

附录 B

数据检索要求

文献数据应以结构化方式进行检索。申请人应尽可能检索所有相关信息源，并说明采用该信息源的理由。应对文献数据库（至少包括农业/水产、医学/兽医数据库）中以期刊、报告、会议记录和书籍等形式记录的文献进行全面检索。此外，还应考虑文献数据库以外的信息源，如全文期刊的参考文献列表、会议或组织机构网站等。

文献检索至少应涵盖最近 20 年的相关信息源。相关文献列表应通过参考文献管理软件进行编辑，并以.RIS 格式提交。对重要文献应提供复印件。对于新饲料添加剂申报、进口饲料添加剂登记及其他需要依照新饲料、新饲料添加剂评审程序评审的产品申报的，申请者必须确保提交的出版物或信息满足其版权所有者规定的条款。

应详细记录并提交检索方法，相关内容如下：

（1）对于数据库检索，至少应包括：

- 数据库名称和服务提供者；
- 检索日期和检索时间范围；
- 检索中使用的任何限制条件，如语言或出版状态；
- 完整的检索策略（所有项目和设置条件组合）和检索得到的记录数量。

（2）文献数据库以外的检索，至少应包括：

a) 网站和期刊目录检索：

——信息源名称（即网站名称。若检索特定目录，提供期刊名称）；

——网址；

——检索日期和检索时间范围。若检索目录，提供检索日期、卷号和期号；

——检索方法，如浏览、使用搜索引擎或扫描表；

——检索中使用的任何限制条件（如出版物类型）；

——检索项目和检索到的相关摘要或全文数量。

b) 参考文献列表检索：

——已扫描参考文献列表文件的书目详情；

——检索到的参考文献数量。

附录 C

细胞毒性试验方法

C.1 供试品制备

将拟评价细菌菌株接种于脑心浸液肉汤（BHI）培养基中，30℃培养约 6 h 至细胞密度至少达到 10^8 CFU/mL，15000 rpm 室温离心 5 min，收集上清液。使用 100 μ L 上清液作为供试品开展 Vero 细胞毒性试验。

C.2 Vero 细胞检测

用添加 5%胎牛血清的最低必需培养基(MEM)培养 Vero 细胞。在检测前 2~3 d，将细胞接种至 24 孔板中，使用前确认 Vero 细胞生长融合后去除培养液，并用 1 mL 预热（37℃）的 MEM 培养基洗涤细胞一次。按如下步骤开始检测：

——配制低亮氨酸培养基。在 4 L MEM 培养基中分别添加 100 mL 200 mM 的 L-谷氨酰胺和 400 mL 0.5 M 的 N-（2-羟乙基）哌嗪-N'-2-乙烷磺酸（HEPES）缓冲液（pH 7.7），用水补至 10 L。过滤除菌并分装至 500 mL 瓶中备用。

——每孔中加入 1 mL 预热（37℃）的低亮氨酸培养基，然后加入供试品，37℃孵育 2h。

——去除含有供试品的低亮氨酸培养基，每孔用 1 mL 预热（37℃）的低亮氨酸培养基洗涤一次。

——将 8 mL 预热的低亮氨酸与 16 μ L 14 C-亮氨酸（比活度 > 300 mCi/mM）混合，每孔中加入 300 μ L 该混合物（每

孔含 25 ~ 100 nCi¹⁴C-亮氨酸), 37°C下孵育 1h。

——去除放射性培养液,每孔中加入 1 mL 5%三氯乙酸,室温培养 10min。去除三氯乙酸,每孔用 1 mL 5%三氯乙酸洗涤两次。

——去除三氯乙酸,每孔加入 300 μL 0.1 M KOH,室温孵育 10min。将每孔中的混合物转移至含有 2 mL 闪烁液的闪烁管中,涡旋混匀后用闪烁计数器计数 1min 放射性。

按以下公式计算蛋白质合成抑制率:

蛋白质合成抑制率 (%) = (阴性对照放射性 - 测试样品放射性) / 阴性对照放射性 × 100

阴性对照为未添加供试品的孔内的 Vero 细胞。抑制率高于 20%认为具有细胞毒性。可同时使用具有已知细胞毒性的蜡样芽胞杆菌菌株的表面活性素(或培养物上清液)作为阳性对照。

也可使用荧光分光光度计测量 Vero 细胞悬浮液的碘化丙啶染色法进行细胞毒性试验。应使用经过 2d 培养的单层融合 Vero 细胞。用含碘化丙啶(5μg/mL)的 2 mL EC 缓冲液(包含 135 mM NaCl、15 mM HEPES、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂和 10 mM 葡萄糖,用 Tris 调节至 pH 7.0-7.1)将细胞稀释为最终浓度为 10⁶个细胞的细胞悬液,置于 1 cm 石英比色皿中,37°C恒温保存。然后向其中加入供试品(100 μL 非浓缩上清液)。使用磁力搅拌器和搅拌子连续混合细胞。在 575/615 nm 的激发/发射波长和 5 nm 狭缝条件下,每隔 30s

进行荧光监测。结果通常无需去除背景荧光。若检测结果大于阳性对照（通常为使用清洗剂处理的细胞）荧光/吸光度的20%以上，则认为具有细胞毒性。

附录 D

发酵制品中无生产菌株活细胞评价试验方法要求

D.1 采样

至少取 3 个批次产品，每个批次至少取 3 个样品进行检测。明确说明样品的具体采样阶段。样品应来自工业化生产线，若尚无工业化产品，可采用中试产品，但应明确中试生产工艺（发酵及后处理工艺）具有工业化生产工艺的代表性。

D.2 样品处理

培养检测时，每个样品至少称取 10 g (mL)，再从中至少称取 1 g (mL) 进行检测。如将 10 g 样品用 90 mL 液体稀释，再取 10 mL 稀释液进行培养。

D.3 培养条件

选择适宜的培养条件（包括培养基、培养温度和时间等），确保活细胞生长。应使用非选择性培养基（如常用于培养革兰氏阴性细菌和芽胞杆菌的胰蛋白胨大豆琼脂培养基、常用于培养酵母的麦芽浸粉琼脂培养基、常用于培养丝状真菌的马铃薯葡萄糖琼脂培养基等）和/或提供更长的培养时间（至少两倍正常培养时间）使应激细胞恢复；若菌株能形成内生孢子，应采用相适应的萌发程序（如细菌热处理），使芽胞萌发后进行后续培养。

D.4 质控

培养检测时，应设置阳性对照，即在样品中加入少量生产菌株活细胞（如每个平板 10 ~ 1000 个细胞），以验证所用

培养基和培养条件是否适合产品中可能存留的生产菌株活细胞生长。

应考虑检测方法的特异性，以防止样品中的污染菌对生产菌株检测的干扰。

D.5 鉴定

对于疑似菌落，应进行鉴定，确认其是否为生产菌株。

附录 E

发酵制品中生产菌株 DNA 检测试验方法要求

E.1 采样

至少取 3 个批次样品，每个批次重复检测 3 次。应明确说明样品的具体采样阶段。样品应来自工业化生产线，若尚无工业化产品，可采用中试产品，但应明确中试生产工艺（发酵及后处理工艺）具有工业化生产工艺的代表性。

E.2 DNA 提取

至少从 1 g (mL) 产品中提取 DNA。若上游发酵中间产品浓度高于终产品浓度，可使用上游发酵中间产品提取 DNA。对于由相同上游发酵工艺生产的中间产品，经不同后处理工艺获得的不同配方添加剂产品，应对浓度最高的产品进行检测。若为不同发酵生产体系生产的产品，应对每个添加剂产品分别进行检测。

应采用适合于生产菌株所有细胞形式（如营养细胞、芽胞）的 DNA 提取方法，确保从可能残留在产品中的非活性细胞中提取 DNA。

E.3 特异 PCR 扩增

针对菌株的 DNA 特异性片段设计引物，通过 PCR 检测生产菌株 DNA 的存在。应详细描述菌株的特异性目的序列、特异性引物、聚合酶以及扩增条件等信息。如果生产菌株含有耐药基因（无论其是否为转基因微生物），所设计引物的

扩增产物应覆盖耐药基因的完整 DNA 片段。若生产菌株为不含耐药基因的转基因微生物，所设计引物应针对遗传修饰目的基因，其扩增产物不超过 1Kb。

E.4 质控

PCR 检测时应当包括以下对照和灵敏度测试：

——将直接从生产菌株中提取的总 DNA 作为 PCR 扩增的阳性对照；

——将直接从生产菌株提取的总 DNA 添加至 DNA 提取前的终产品样品中，设置不同 DNA 稀释浓度至 DNA 无法检出，计算检测限。

——将直接从生产菌株提取的总 DNA 做为阳性对照，添加至从样品中提取的 DNA 样本中，以检查是否存在导致 PCR 失败的因素，如存在 PCR 抑制剂、核酸酶等；

——不含样品 DNA 的阴性对照；

——为达到评价目的，检测阈值应不高于 10 ng DNA/g (mL) 样品。

附录 F

缩略词

BHI	Brain Heart Infusion Broth, 脑心浸液肉汤
<i>ces</i>	cereulide synthetase gene, 呕吐素合成酶基因
CFU	Colony Forming Unit, 菌落形成单位
CIA	Critically Important Antimicrobial, 极为重要抗菌药物
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute, 美国临床和实验室标准协会
<i>cytK</i>	cytotoxin K gene, 细胞毒素 K 基因
<i>esp</i>	enterococcal surface protein gene, 肠球菌表面蛋白基因
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 欧洲抗微生物药敏感试验委员会
DNA	Deoxyribonucleic Acid, 脱氧核糖核酸
<i>hbl</i>	hemolysin BL gene, 溶血素 BL 基因
HEPES	4- (2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, N- (2-羟乙基) 哌嗪-N'-2-乙烷磺酸
HIA	Highly Important Antimicrobial, 高度重要抗菌药物
<i>hylEfm</i>	Putative glycosyl hydrolases gene of <i>Enterococcus faecium</i> , 屎肠球菌类糖基水解酶基因
ICSP	International Committee on Systematics of Prokaryotes, 原核生物系统学国际委员会
ICNP	International Code of Nomenclature of Prokaryotes, 原核生物国际命名法规

ICN	International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants, 国际藻类、真菌和植物命名法规
IS16	Insertion sequence 16, 插入序列 16
ISO	International Organization for Standardization, 国际标准化组织
ITS	Internal Transcribed Spacer, 核糖体 rDNA 翻译间隔序列
LSM	LAB susceptibility test medium, 乳酸菌药物敏感性试验培养基
MEM	Minimum Essential Medium, 最低必需培养基
MIC	Minimum Inhibitory Concentration, 最低抑菌浓度
<i>nhe</i>	non-hemolytic enterotoxin gene, 非溶血性肠毒素基因
ORF	Open Reading Frames, 开放阅读框
PCR	Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链式反应
WGS	Whole Genome Sequence, 全基因组序列
WHO	World Health Organization, 世界卫生组织

附录 G
相关网址

ARG-ANNOT	https://omictools.com/arg-annot-tool
BUSCO	http://busco.ezlab.org
CARD	https://card.mcmaster.ca
CGE	http://www.genomicepidemiology.org
ENA	http://www.ebi.ac.uk/ena
MvirDB	http://mvirdb.llnl.gov
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov
CLSI	http://www.clsi.org
PAI DB	http://www.paidb.re.kr/about_paidb.php
ResFinder	https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder
UniProt	http://www.uniprot.org
VFDB	http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm