



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—20XX

食用菌病害检测鉴定方法

Detection and Identification of Diseases from Edible Fungi

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由全国植物检疫标准化技术委员会（SAC/TC 271）提出并归口。

本文件起草单位：中国检验检疫科学研究

本文件主要起草人：王聪、姜帆、吴品珊、黄英、田茜

食用菌病害检测鉴定方法

1 范围

本文件明确了食用菌病害的检测鉴定方法。

本文件适用于国内生产和进口的各类食用菌中真菌病害、细菌病害和病毒病害的检测鉴定。

2 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，仅注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/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 12728 食用菌术语

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27402 实验室质量控制规范 植物检疫

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

GB/T 12728界定的术语和定义适用于本文件。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct: 循环阈值 (Cyclethreshold)

CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵 (Cetyltrimethylammonium Bromide)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

NCBI: 美国生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information)

OD: 光密度 (Optical Density)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

PDA: 马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato Dextrose Agar)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

RT-PCR: 反转录聚合酶链式反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

4 总体要求

根据病害种类的不同，一般根据形态学特征、分子生物学特征、致病性特征、生理生化特征等进行种类鉴定，需采用多种检测方法综合进行结果判定。

在整个试验操作过程中应采用安全有效的防护措施，具体要求应符合GB 19489、GB/T 27402、GB/T 27403中的规定。

5 仪器及用具

5.1 仪器设备

光照培养箱、高压灭菌器、超净工作台、生物显微镜、高速冷冻离心机、纯水仪、恒温水浴锅、低温冰箱、电子天平、酶标仪、PCR仪、荧光定量PCR仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像分析仪等。

5.2 用具

培养皿、烧杯、酒精灯、微型解剖刀、解剖针、吸管、标签、指形管、镊子、放大镜、载玻片、盖玻片、记号笔、可调式微量进样器（2 μL 、10 μL 、20 μL 、100 μL 、200 μL 、1000 μL ）及相应的进样枪头、研钵、离心管（1.5 mL、10 mL）、PCR管（0.2 mL）、量筒、烧杯等。

5.3 试剂

无水乙醇、75%酒精、无菌水、商品化核酸提取试剂盒、PCR反应预混液、琼脂糖、生理盐水、培养基、电泳缓冲液、结晶紫、番红、七叶灵、柠檬酸铁、L-色氨酸、酸水解酪素、果糖、纤维二糖、L-苯丙氨酸、柠檬酸钠、酒石酸钾、三水合乙酸铅、D-半乳糖等。

除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水应符合GB/T6682中的要求。

6 现场取样

尽量从不同部位多点取样，仔细观察取回的样品，看表面是否有腐烂、斑点、变色、异味、畸形等症状，如发现上述异常，应将样品送实验室鉴定。常见重要食用菌病害病状描述见附录A。

7 实验室鉴定

7.1 形态学鉴定

7.1.1 真菌病害

用接种针或刀片挑取适量寄主发病处的疑似病原菌菌丝，或取分离纯化后生长4-6天的病原菌平板培养物用接种针或刀片挑取适量菌丝，在普通光学显微镜下观察病原菌的形态特征。随机选取10-15个视野，测量并观察病原菌无性态，如分生孢子器、分生孢子等，以及有性态，如子囊壳、子囊孢子等的大小，形态、颜色等，并进行数码显微拍摄，并对测量数值进行记录，一般在10 \times 20、10 \times 40放大倍数下进行观测。对于分离培养的病原菌，同时观察菌落的形态、颜色变化等，并拍照留存。根据权威专著、文献等参考资料，对病原菌进行种类鉴定，以明确病原菌的分类地位。

真菌的分离、纯化及保存方式见附录B。

7.1.2 细菌病害

将食用菌发病部位剪成小块（约0.2 cm \times 0.2 cm）进行分离纯化，借助光学显微镜观察病原菌的形态特征。对于细菌病害，要对其进行染色，观察其菌体；还可以通过各种染色方

法观察其是否具有鞭毛、荚膜等，具体方法见附录C。对所观察的形态特征进行拍照留存，根据权威专著、文献等参考资料，对病原菌进行种类鉴定，以明确病原菌的分类地位。

细菌的分离、纯化及保存方式见附录B。

7.1.3 病毒病害

对于病毒病害，借助电子显微镜观察其形态特征。对所观察的形态特征进行拍照留存，根据权威专著、文献等参考资料，对病毒进行种类鉴定，以明确病毒的分类地位。

7.2 分子生物学检测

7.2.1 核酸提取

取分离纯化得到的真菌或细菌菌落进行DNA提取，疑似病毒病害的样品一般进行DNA和RNA提取。核酸提取方法可采用CTAB法、Trizol®法、试剂盒法等，按照不同提取方法的说明书操作。核酸提取后检测核酸浓度和纯度，并做好记录，纯度较高的DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀值应为1.7~1.9，纯度较高的RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀值应为1.8~2.0。提取后的核酸在4℃冰箱保存备用，长期保存置于-20℃或-80℃冰箱。

7.2.2 PCR扩增

根据检测目的和对象的不同，可采用核酸序列测定、常规PCR、实时荧光PCR以及RT-PCR等不同的PCR扩增方法。根据实际情况，选择一种或多种分子检测方法。

对于非靶向检测，采用核酸序列测定的方法，一般适用于真菌病害和细菌病害。常用的扩增引物如表1所述，具体反应条件和程序的设置，根据不同引物的退火温度以及PCR反应酶的说明，进行适当调整。反应过程以目标病原菌的质粒作为阳性对照、健康组织的DNA作为阴性对照、水作为空白对照。扩增结束后，进行琼脂糖凝胶电泳检测，在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下，如待测样品出现目的条带，则将PCR产物送至测序公司进行双向测序。

表 1 真菌、细菌常用通用引物信息

适用类群	基因	引物 (5'-3')	目的片段长度
真菌	ITS	ITS1F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	~700 bp
	ITS	ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGC ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	~700 bp
	ITS	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC ITS5: GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG	~700 bp
	LSU	LROR: GTACCCGCTGAACTTAAGC LR5: ATCCTGAGGGAACTTC	~900 bp
	SSU	0817F: TTAGCATGGAATAARRAATAGGA 1196R: TCTGGACCTGGTGAGTTTCC	~380 bp
细菌	16S	8F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492R: TACGACTTAACCCCAATCGC	~1500 bp
	16S	16SF: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 16SR: GGTTACCTTGTTACGACTT	~1500 bp
	16S	341F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT	~470 bp
	cpn60	F: GACGTCGCCGGTGACGGCACCACCAC R: CGACGGTCGCCGAAGCCCGGGCCTT	~550 bp

对于靶向检测，可选择常规PCR、实时荧光PCR或RT-PCR等方法。扩增引物/探针选择待测目标物种的特异性引物/探针，具体反应条件和程序的设置，根据不同引物/探针的退火温度以及PCR反应酶的说明，进行适当调整。特异性引物/探针的应用根据已发布的标准或权威文献进行选择。反应过程以目标病原菌的质粒作为阳性对照、健康组织的DNA作为阴性对照、水作为空白对照。扩增结束后，常规PCR方法进行琼脂糖凝胶电泳检测，实时荧光PCR方法读取Ct值。

7.2.3 结果分析

对于采用核酸序列测定方法的非靶向检测：将测序公司返回的单峰序列进行拼接，将拼接好的序列去除引物后，提交至NCBI数据库进行序列比对，同时构建系统发育树。综合序列比对的相似度和系统发育树的拓扑结构进行种类判定。如查询序列与NCBI数据库中已知序列相似度高（一般选择 $\geq 98.0\%$ 作为阈值）且查询序列与所有目标物种序列都聚为一个单系分枝，则可判定查询序列为该目标物种；否则，需结合形态学特征进行综合判定。

对于采用常规PCR、实时荧光PCR或RT-PCR等方法的靶向检测：在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下，如待检测样品产生特异性扩增条带，且该条带与阳性对照条带长度一致，则判定检测结果为阳性，样品种类为靶向目标物种；或在反应进行40个循环的前提下，如Ct值小于35，则判定检测结果为阳性，样品种类为靶向目标物种；或根据参照的标准或文献中记载的判定原则进行种类判定。

7.3 致病性测定

按照科赫氏法则接种，测定病原菌的致病性，具体方法见附录D。

7.4 生理生化测定

对于细菌病害，根据细菌在代谢过程中所产生的合成或分解产物的不同，将分离纯化得到的细菌接种于特定的培养物或检测管，通过产酸、产气、颜色变化等反应，检测细菌的耐盐性、好氧性或厌氧性、对碳素化合物的利用和分解能力、对氮素化合物的利用和分解能力、对大分子化合物的分解能力等，以此确定细菌的种属。具体测定指标见附录C。

也可借助生化测定试剂盒、微生物鉴定分析系统（BIOLOG）等进行快速鉴定。

8 结果判定

综合形态学鉴定、分子生物学检测、致病性测定和/或生理生化测定结果，进行结果判定。如多种检测方法的鉴定结果均符合某一病原菌的性状，即可判定该病原菌的种类。

9 结果记录

对样品的基本信息、所采用的检测方法及依据、使用的仪器设备、检测结果、结果判定、检测人员信息、检测日期、检测单位等进行详细记录。结果记录内容应包括但不限于：

10 样品保存

保存可重复检测结果的所有材料，如剩余样品、核酸、分离纯化后得到的菌种等；一般保存期至少1年，以备复验、谈判和仲裁。

附 录 A
(资料性)
常见重要食用菌病害病状描述

A.1 真菌病害

A.1.1 湿腐病 *Mycogone perniciosa* Magnus

又称褐腐病、湿泡病，为寄生性病害，发生普遍。只危害子实体，不感染菌丝体。发病轻的菌梗肿大成泡状，发病重的形成畸形菇。子实体未分化时被感染，形成不规则形似马勃状的组织块，上面覆盖一层白色绒毛状菌丝，后变暗褐色；子实体分化后被感染，菌梗变褐色。

A.1.2 轮枝霉病 *Verticillium* spp.

也称干泡病、褐斑病，为寄生性病害。在蘑菇收获期间过度的潮湿加上空气不流通助长了该病的发生。轻度受感染的病菇表现为在发育中的原基菌柄的基部和上部以及菌盖上出现褐色斑点或条痕，受侵染的蘑菇时常向一侧弯曲，成熟的病菇呈现出畸形的菌盖，有时具有一“毛唇”。病菇内部整个组织干燥而呈黄褐色皮革质且有弹性，始终不臭不烂。

A.1.3 胡桃肉状菌病 *Diehliomyces microsporus* (Diehl. et Lambert) Gilkey

也称块菌病、花菜病，是危害双孢蘑菇最大的竞争性真菌，也可以抑制蘑菇菌丝生长，危害严重时会造成绝收。该病最早发现于北美的蘑菇房内，现广泛分布于全世界双孢蘑菇生产国家。该真菌菌丝的形态与蘑菇相似，但可嗅到较浓的漂白粉气味，子实体直径0.5~3cm，群生，近球形、不规则形至盘形，表面有不规则的脑状皱纹，形似胡桃仁，白色至红褐色。菌块解体后，子囊孢子散落在覆土、培养料及床架上，成为下一季的主要污染源。

A.1.4 绿木霉病 *Trichoderma viride* Pers. ex Fr.

绿霉又名木霉。是食用菌生产中危害最大的竞争性杂菌，尤其是困扰香菇菌棒生产的杂菌病害。绿霉的寄主范围很广，几乎危害所有的食用菌；分布范围很大，是世界性的食用菌危害菌；危害期长，食用菌的整个生产过程都会受到侵害；危害程度大，严重时可使整批食用菌绝收。初期菌丝为白色、细而密，逐渐变为浅绿色。菌落中央为深绿色，边缘呈白色。后期变为深绿色，严重时使整个菌袋全部变为墨绿色。

A.1.5 曲霉病 *Aspergillus* spp.

曲霉种类繁多，常见的有白曲霉、黄曲霉、黑曲霉、红曲霉等。曲霉菌丝有隔、无色、淡色或表面凝集有色物质，分生孢子梗直立生长，不分枝，梗顶端膨大成球形或棍棒形的顶囊，其表面生满辐射状小梗，在小梗顶端串生分生孢子。分生孢子单胞，球形、卵圆形或椭圆形，孢子呈黄、绿、褐、黑等各种颜色，菌落颜色因不同种而各异，分生孢子随空气气流飘浮扩散。曲霉菌丝短而粗。

A.1.6 青霉病 *Penicillium* spp.

青霉病也叫蓝绿霉。是食用菌制种过程中常见的污染杂菌，主要危害各种食用菌的菌丝体。青霉常污染菌种和菌袋。侵染幼菇发病一般顶部呈黄褐色枯萎，生长停止，表面很快长

出绿色粉状霉层，其邻近的正常生长的健菇可被传染。菌柄基部呈黄褐色腐烂，很快长了绿色粉状霉层。金针菇基腐病，子实体生长发育阶段，菌柄基部变黑褐色至黑色腐烂，基部腐烂后子实体倒伏。幼菇丛发病虽不倒伏，但不能继续向上生长发育。严重发生时，针状的幼菇成丛变黑腐烂。

A.1.7 丝枝霉病 *Aphanocladium* spp.

又叫斑点病或凹斑病。主要危害双孢菇子实体，少量寄生于香菇、白灵菇、平菇和猴头菇等。子实体感病后在菌盖和菌柄上会出现褐色稍凹陷的病斑，病斑形状大小不一、边缘色较深。潮湿条件下长出灰白色的霉状物，即病菌的分生孢子梗和分生孢子。菌肉组织溃烂、病斑有时出现裂纹。

A.1.8 褶霉病 *Cephalosporium* spp.

褶霉病除危害双孢菇外还可危害香菇、白灵菇、茶树菇等。病原菌侵染蘑菇子实体的菌褶和菌盖，尤其是菌褶受害后症状明显。发病部位的菌褶连在一起，并出现杂色斑纹。子实体变形。菌盖上的症状为暗褐色斑点，病斑组织变硬，菌肉一般腐烂。

A.1.9 枯萎病 *Fusarium* spp.

又称萎缩病、猝倒病。可危害双孢菇、白灵菇、平菇、银耳等食用菌子实体。蘑菇子实体被侵染后生长发育受阻，颜色淡黄。菌柄从外到内变褐，有的整个菇体变褐，干腐但不烂。平菇幼菇受害，停止生长，呈黄褐色萎缩，直至幼菇枯萎死亡。高湿条件下，病菇菌柄基部可见白色菌丝和粉状物。

A. 2 细菌病害

A.2.1 细菌性褐斑病 *Pseudomonas* spp.

又称细菌性斑点病、细菌性麻脸病，为寄生性病害。在蘑菇子实体表面出现圆形或不规则形的黄色病斑，尤其在湿蘑菇上繁殖迅速。随着年龄增大，病斑变成褐色且有粘液，同时具有强烈的臭味。

A.2.2 金针菇褐腐病 *Erwinia* spp.

金针菇子实体被感染后，菌盖、菌柄上都能形成褐色斑点，然后腐烂。这种病菌还能溶解金针菇的菌丝，危害极大。

A.2.3 杏鲍菇黄萎病 *Pantoea* spp.

侵染初期在菌盖或菌柄上形成水渍状病斑，病斑逐渐扩大，导致菌盖或菌柄腐烂，有脓状物产生。

A. 3 病毒病害

A.3.1 法兰西病毒病 La France Isometric Virus (LIV)

又称顶死病、木乃伊病，由病毒引起的寄生性病害，引起菌株变质。当病毒侵入整个菌丝体时，菌丝体生长速度减慢，一般不能形成子实体，少数形成的子实体表现矮小、畸形或死亡。

A.3.2 香菇病毒病

香菇带毒是香菇栽培中的常见问题，香菇感染病毒后的症状主要表现为菌丝生长缓慢、长势减弱、子实体畸形、质量和产量降低等。国内外的研究人员先后从生长不正常的香菇子实体和菌丝体中分离到了包括球状、杆状和蝌蚪状（噬菌体）的病毒颗粒或类似病毒颗粒 Virus Like Particles (VLPs)。

A.3.3 侧耳病毒病

病害症状因病原不同而表现为子实体畸形或不显症，但产量均显著下降。病毒主要有与法兰西病毒病相关的糙皮侧耳球形病毒（oyster mushroom spherical virus, OMSV）、感染后不产生明显症状的糙皮侧耳病毒I（*Pleurotus ostreatus virus*I, PoVI）、感染后在菌丝体和子实体阶段均出现明显表型不正常症状的糙皮侧耳等轴状病毒（oyster mushroom isometric virus, OMIV）以及在糙皮侧耳菌株（Shin-Nong）上发现的糙皮侧耳病毒SN（*Pleurotus ostreatus virus* SN, PoV-SN）病毒。

附录 B

(资料性)

病原菌的分离、纯化及保存方式

B.1 真菌的分离、纯化及保存方式

选取发病部位，直接刮取病原菌霉层放在PDA培养基上，于26℃黑暗条件下培养，3-7天后用接种钩挑取病原菌边缘菌落至PDA平板上进行纯化，5-7天后将纯化的病原菌转接至PDA斜面培养基中4℃保存。

B.2 细菌的分离、纯化及保存方式

将食用菌发病部位剪成小块（约0.2 cm × 0.2 cm），用75%酒精消毒5-10 s，再用无菌水漂洗两次，然后在无菌条件下将发病组织捣碎，取组织液在牛肉膏蛋白胨培养基上划线培养（28℃）。待长出单菌落后挑取单菌落进行纯化。

病原细菌液体摇床培养后（170 rpm，26℃），使之浓度达到 3×10^8 cfu/ml。然后取摇好的液体培养物0.5 ml转移到灭菌的细菌保存管中，加入等体积的40%甘油，密封保存在-20℃甘油中。

附录 C

(资料性)

病原细菌的形态学观察及生理生化指标测定

C.1 形态学观察

C.1.1 革兰氏染色

- (1) 制片：取24 h菌种培养物常规涂片、干燥、固定；
- (2) 初染：滴加结晶紫染色1-2 min，水洗；
- (3) 媒染：用碘液冲去残水，并用碘液覆盖约1 min，水洗；
- (4) 脱色：用滤纸吸去玻片上的残水，将玻片倾斜，用滴管流加95%乙醇脱色20-30 s直至流出的乙醇无紫色，立即水洗；
- (5) 复染：用番红液复染约2 min，水洗。

玻片干燥后，用100×油镜观察，并照相。

以金黄色葡萄球菌为阳性对照菌，以大肠埃希氏菌为阴性对照菌。深紫色为革兰氏染色阳性细菌；红色为革兰氏染色阴性细菌。

C.1.2 运动性（半固体琼脂穿刺法）

根据有鞭毛的细菌可以在半固体培养基中游动但又不能任意游走的想象，观察细菌的生长情况，判定试验菌是否有运动性。可使用试验菌能良好生长的培养基，在其中加0.3%-0.6%的琼脂，一般半固体培养基应是放倒试管不流动，而在手上轻轻敲打时琼脂即破裂为宜。

用直针穿刺接种试验菌于半固体培养基上，适温培养。细菌的运动性可用透射光目测。如生长物只生长在穿刺线上，边缘十分清晰，则表示试验菌无运动性；如生长物由穿刺线向四周呈云雾状扩散，其边缘呈云雾状，则表示试验菌株有运动性。

对于生长较快的细菌应培养1天后观察；如第一天不能判定可在第2-3天再观察；如2-3天时仍不能判定是否具有流动性，可延迟5-6天再观察一次。如试验菌在半固体培养基中产气，气泡会使穿刺线上的生长物产生扩散情况，不可误判为有运动性。如试验菌是好氧菌，穿刺线上生长物很少，可检查从培养基表面向下深入的生长物的情况。

C.2 生理生化指标测定

C.2.1 菌落形态观察

取一点菌苔或一环细菌悬液，在倒好的无冷凝水的平板一侧边缘处，反复涂抹直径大约为1 cm大小的面积；烧灼接种环，冷却后，从上述涂菌处划出7-8条直线，前3-4条线从涂菌处划出，后3-4条直线可不通过涂菌处，划线时接种环与平板表面成30°-40°角，轻轻接触，不要使接种环划破表面；上述烧灼、划线操作再重复数次，以划满整个平板为宜。倒置平板。

适宜温度培养1-2天，出现单菌落。观察形状、大小、边缘、表面、隆起形状、透明度、菌落及培养基的颜色。

C.2.2 丙二酸利用

用幼龄菌种接种，适温培养1-2天，培养基由绿变蓝为阳性，培养基不变色为阴性，同时不加丙二酸作为空白对照。

C.2.3 耐盐性和需盐性

取幼龄菌种液接种至不同浓度NaCl（2%、5%、7%、10%）培养，3和7天分别观察，与未接种的对照管对比，观察生长情况。

C.2.4 荧光色素

以24 h菌龄的培养物接种于荧光色素培养基斜面，置于30℃培养1、3、5天后，在紫外灯下观察有无荧光。

C.2.5 氧化酶

在干净培养皿里放一张滤纸，滴上二甲基对苯撑二胺的1%水溶液，仅使滤纸湿润即可。用灭菌的牙签取18-24 h的菌苔，涂抹在湿润的滤纸上，在10 s内涂抹的菌苔现红色为阳性，10-60 s现红色为延迟反应，60 s以上现红色则不计，按阴性处理。

C.2.6 葡萄糖氧化发酵

以18-24 h幼龄菌作种子，穿刺接种，每株4支。其中2支用灭菌的凡士林石蜡油（熔化的2/3凡士林中加入1/3液体石蜡，高压灭菌）封盖，约0.5~1 cm厚，以隔绝空气为闭管。另2支不封油为开管，同时还要有不接种的闭管和开管作对照。室温培养1、2、3、7、14天观察结果。

只有开管产酸变黄者为氧化型，开管和闭管均产酸变黄者为发酵型。

C.2.7 接触酶

以24 h培养的斜面菌种以接种环取一小环涂抹于已滴有3%过氧化氢的玻片上，如有气泡产生为阳性，无气泡为阴性。

C.2.8 淀粉水解

取新鲜斜面培养物点种于淀粉水解培养基上，适温培养。培养2-5天，形成明显菌落后，在平板上滴加碘液，平板呈蓝黑色，菌落周围如有不变色透明圈，表示淀粉水解阳性，仍是蓝黑色为阴性。

C.2.9 柠檬盐酸利用

在斜面上划线接种，适温培养3-7天。培养基为碱性（指示剂蓝色或桃红色）为阳性，否则为阴性。

C.2.10 七叶灵水解

取新鲜菌种接种后，适温培养3、7、14天观察。产黑褐色色素者为阳性，不产黑褐色色素者为阴性。

C.2.11 脲酶

将测试菌接种在营养琼脂斜面。在第3和7天进行脲酶测定。在空试管中，将斜面菌苔做成2 ml浓菌悬液，加入一滴酚红指示剂，调pH到7，即酚红刚刚转黄呈橙红色，再分作两份，

在其中的一管加入少许结晶的尿素0.05-0.1 g，另一管不加尿素作为对照。如加尿素的试管几分钟变碱，酚红指示剂变红，表示测定菌为脲酶阳性，不变则为阴性。

C.2.12 色氨酸脱氨酶（吲哚产物）

将菌株的幼龄培养物接种于培养液中，适温培养24 h，取2-4滴培养液，与1滴三氯化铁溶液（33%）相混。如呈红褐色，则为色氨酸脱氨酶阳性，无颜色变化则为阴性。

C.2.13 酒石酸盐利用

取新鲜培养物接种（如时间超过14天，需水溶煮沸10 min），每天观察颜色变化，接种后14天，加入等体积的醋酸铅试剂，同时有不接种的作为对照。

如颜色呈绿黄色，有少量醋酸铅沉淀，则为阳性；如为蓝色或绿色，大量的醋酸铅沉淀，则为阴性。

C.2.14 生长温度和耐热性

最高、最适、最低和耐受温度能力的特征常常是某些细菌的鉴定特征之一，设定测定温度为4℃、20℃、30℃、37℃和41℃。

以液体培养物（24 h培养物）以小环转入澄清LB培养基，置于不同温度培养。37℃以上的测定置于水浴中，需3次移种生长者才能确认。

C.2.15 糖、醇类发酵

以幼龄培养物穿刺接种斜面培养基，适温培养，1、3、5天分别观察，如指示剂变黄，表示产酸，为阳性；不变或变蓝（紫）则为阴性。

C.2.16 脂酶

划线接种培养物于平板，培养至7天，每天观察。在生长的周围有模糊的晕圈者为阳性，没有晕圈者为阴性。

C.2.17 硫化氢

（1）纸条法

将纯培养物接种到新鲜斜面培养基。接种后，用无菌镊子夹取一条醋酸铅试纸条用棉塞塞紧，使悬挂于管中，下端接近培养基表面，不接触液面，适温培养。于接种后3、7、14天观察。试纸条变黑色者为阳性，不变者为阴性。

此方法较敏感，不适用于肠杆菌科。纸条高度应放置适当，离液面太远影响灵敏度，太近容易溅湿，同时移动试管架时也要平稳。

（2）肠杆菌

用穿刺法接种，30℃培养，分别于1、3、7天观察，变黑者为阳性，不变者为阴性。

C.2.18 吲哚

把新鲜的菌种接种于培养基中，适温培养。分别测定培养1、2、4、7天的培养液。

沿试管壁缓缓加入3-5 mm高的试剂与培养液表面，在溶液层界面发生红色，即为阳性反应；若颜色不明显，可加4-5滴乙醚至培养液，摇动，使乙醚分散于液体中，将培养液静置片刻，待乙醚浮至液面后再加吲哚试剂；如培养液中有吲哚，其可被提取在乙醚层中，浓缩的吲哚和试剂反应，则颜色明显。

C.2.19 硝酸盐还原

将菌种接种于硝酸盐液体培养基中，每个菌做两个重复，另外设置两管不接种的作为对照。

适温培养1、3、5天调查。在比色瓷盘小窝中倒入少许培养1、3、5天的培养液，再加一滴格里斯氏试剂，在对照观众同样加入一滴格里斯氏试剂。加入格里斯氏试剂后，溶液如变为粉红色、玫瑰红色、橙色、棕色等，表示亚硝酸盐存在，为硝酸盐还原阳性。如无红色出现，则可加一、两滴二苯胺试剂，此时如呈蓝色反应，则表示培养液中仍有硝酸盐，无亚硝酸盐反应，表示无硝酸盐还原作用；如不呈蓝色反应，表示硝酸盐和形成的亚硝酸盐都已还原成其他物质，故仍按硝酸盐还原阳性处理。

还原硝酸盐反应是在较为厌氧条件下进行的，但分装试管时液层不宜太薄，对生长缓慢的细菌尤应注意。对未呈现亚硝酸盐反应的测定应检查是否仍有硝酸盐（二苯胺测定），然后才能判断有无硝酸盐的还原反应。

C.2.20 明胶液化

取18-24 h的斜面培养物穿刺接种，并有两支未接种的作为空白对照。

在20℃温箱中培养，2、7、14和30天调查。在20℃以下的室温观察生长情况及明胶是否液化。如菌已生长，明胶表明无凹陷且为稳定的凝块，则为明胶水解阴性。如明胶凝块部分或全部在20℃以下变为可流动的液体，则为明胶水解阳性。如菌已生长，明胶未液化，但明胶表面菌苔下出现凹陷小窝（须与未接种的对照管比较，因培养过久的明胶因水分散失也会凹陷）也是轻度水解，按阳性记录。

如有的菌在20℃不生长，则在30℃培养生长后，观察时放冰箱或冷水中降温，待对照管凝固后再记录。明胶质量不一，以在20℃时凝固成稳定的凝块为宜。

C.2.21 苯丙氨酸脱氨酶

适当的浓度接种，37℃培养4 h或8-24 h测定。

将4-5滴试剂滴到生长菌的斜面上，当斜面上和冷凝水中产生绿色时则为阳性反应，即表明与形成了苯丙酮酸，不变则为阴性。

附录 D
(资料性)
致病性测定

D.1 真菌致病性测定

(1) 将供试真菌转接到PDA培养基上，培养5-7天，取菌丝生长情况基本一致的部位，用打孔器打成菌片（直径3 mm左右）；

(2) 将报纸平铺在保湿盒中，喷水保湿，然后放入试管。将预先清洗好的子实体分组放入保湿盒中，以备接种，每组的子实体菌盖大小接近；

(3) 将打好的菌片贴在子实体菌盖上，每株真菌三组重复。以打好的PDA培养基片贴在子实体菌盖上做对照；

(4) 接种后每天观察发病情况；

(5) 将发病子实体上的致病菌分离纯化，看是否与接种菌一致。

D.2 细菌致病性测定

(1) 将保存在甘油中的细菌转移到牛肉膏蛋白胨液体培养基上，170 rpm，26℃培养，每个菌株转接一瓶培养基（约100ml）即可。待菌悬液浑浊后（1-2天）即可接种；

(2) 将已经生长好的未知浓度的菌悬液按照麦法兰云度计配置成所需要的浓度： 2×10^9 个/ml；

(3) 菌悬液配好后，采用涂抹法接种；

(4) 观察发病情况，记录病级。发病严重程度用发病的病斑占子实体的百分率计算。分级标准如下：

0级：子实体上无病斑；

1级：病斑占子实体面积的5%以下；

3级：病斑占子实体面积的6%-10%；

5级：病斑占子实体面积的11%-25%；

7级：病斑占子实体面积的26%-50%；

9级：病斑占子实体面积的51%以上。

(5) 从发病的子实体上再次分离致病菌，如果能再次分离到原致病菌，则可确定这株细菌为病原菌。