

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—xxxx

微生物农药 环境增殖试验准则

第 1 部分：土壤

Environmental reproduction test guidelines for microbial pesticides

Part 1: Soil

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX实施

中华人民共和国农业部发布

前 言

NY/T ×××× 《微生物农药 环境增殖试验准则》，分为 3 部分：

——第 1 部分：土壤

——第 2 部分：水

——第 3 部分：植物叶面

本部分是 NY/T ×××××的第 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

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

本部分由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本部分负责起草单位：农业部农药检定所、环境保护部南京环境科学研究所

本部分主要起草人：

微生物农药 环境增殖试验准则

第 1 部分：土壤

1 范围

本部分规定了微生物农药土壤中增殖试验的材料、条件、试验操作、数据处理、质量控制、试验报告等的基本要求。

本部分适用于微生物农药登记而进行的土壤中增殖试验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文本的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文本。凡是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/T7172 土壤水分测定法

GB/T 15618 土壤环境质量标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微生物农药 microbial pesticides

以细菌、真菌、病毒和原生动物或基因修饰的微生物等活体为有效成分，具有防治病虫害等有害生物作用的农药。

3.2

供试物 test substance

试验中需要测试的物质。

3.3

菌落形成单位 colony forming unit, CFU

由单个菌体或聚集成团的多个菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落。

3.4

细菌芽孢、真菌孢子、细菌或原生动物孢囊 bacterial or fungal spore and bacterial or protozoan cyst

显微镜下一个完整的个体芽孢、孢子或孢囊，通常是指能在合适的培养基上形成单个 CFU 的一个完整的实体。

3.5

细菌营养体 vegetative bacterium

单个活的生物体，通常是指能在合适的培养基上形成一个CFU的实体。

3.6

原生动物 protozoa

原生动物门各个成员的一个完整的营养体、孢子或孢囊。

3.7

宿存 survival

具有活性的微生物在施用后的一段时间内可在动物、土壤或植物内体或表面保持活性的状态。

3.8

生长 growth

细胞物质有规律地、不可逆增加，导致细胞体积扩大。

3.9

增殖 multiply

微生物生长到一定阶段，由于细胞结构的复制与重建并通过特定方式产生新的生命个体，即引起生命个体数量增加的生物学过程。

4 试验概述

将供试物接种到一定量的无菌土壤中，在适宜的条件下培养，定时取样测定其数量，得到供试物在土壤中的动态变化。

5 试验方法

5.1 材料和条件

5.1.1 试验用土

推荐以黑土作为试验用土，或采用供试物拟施用地区土壤作为试验用土，试验用土满足 GB/T 15618 二级标准要求。取土壤表面以下 0 cm~20 cm 的新鲜土样，封口带回实验室，除去粗大枝叶、动物躯壳等，风干保藏。风干土壤含水量测定依据 GB/T 7172 方法。风干土壤研磨过 0.42 mm 筛，用自来水调节土壤含水量为 30% (V/W)，以烘干土计。然后每份 100 g 分装入锥形瓶，至少 8 份，121°C 灭菌 30min，重复灭菌一次。

5.1.2 供试物

5.1.2.1 类型

供试物包括微生物母药、制剂产品等，或与出发菌株生物活性一致的标记菌株。

5.1.2.2 批次

通常情况下，试验中供试物应采用同一批次的产品。

5.1.3 主要仪器设备

超净工作台；

灭菌锅；

显微镜；

分光光度计；

聚合酶链式反应仪；

温度计；

电子天平。

5.2 试验操作

5.2.1 处理组和对照组

5.2.1.1 处理组

设置供试物处理组。设置 4 个重复。

5.2.1.2 对照组

设置培养基空白对照组。PCR 检测法还需设置供试物灭活对照组。每组设置 4 个重复。

5.2.2 接种量

接种浓度为 10^8 CFU/mL，若供试物因含量较低不能达到 10^8 CFU/mL，可以推荐施用量作为接种浓度。接种量为 100 g 试验用土接入 5 mL 浓度为 10^8 CFU/mL 的菌液。

5.2.3 接种与培养

将无菌水配制好的供试物接入灭菌试验土壤，用无菌玻璃棒搅拌土壤，使供试物与土壤充分混合均匀，封口膜封口后放入培养箱培养。供试物为母药时参考其最佳生长条件设立培养温度、湿度、氧气、光照等培养参数；供试物为制剂产品时模拟实际施用环境设立培养温度、湿度、氧气、光照等培养参数。

5.2.4 取样

自接菌后第 1d 开始取样，前 4 d 每天取样，每次取 4 组样品各 1.0 g，进行计数测试。4 d 后，每隔一天取一次样品。每次取样前先称重，用当天质量减去上次取样后质量得到差量，然后补充差量的蒸馏水，维持土壤含水量 30%。取样量和取样间隔时间可根据供试物的生长情况调整。

5.2.5 计数方法

5.2.5.1 细菌、放线菌、真菌、酵母

以 CFU 为计数单位，可采用稀释平板菌落计数法（参见附录 A）、抗性标记-平板计数法（参见附录 B）和分子标记-荧光定量 PCR 法（参见附录 C）等测定。

5.2.5.2 原生动物

以个体数目为计数单位，可采用直接计数法（参见附录 D）等测定。

5.2.5.3 其它

根据微生物的类型选择最适当的计数方法。

5.2.6 试验周期

试验时间持续周期能够反映供试物的延滞期、指数期、稳定期和衰亡期；或在 28d 内持续检测确认供试物含量维持稳定或显著低于接种量，则可结束试验。

5.2.7 生长-消亡曲线

以培养时间为横坐标，以供试物含量或含量的对数为纵坐标作图，绘出供试物的生长-消亡曲线。

5.3 数据处理

5.3.1 独立样本 t 检验

两组均值比较时可进行独立样本 t 检验。独立样本 t 检验按式（1）：

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sigma^2_{x1} + \sigma^2_{x2}}{n-1}}} \dots\dots\dots(1)$$

式中： \bar{X}_1 ， \bar{X}_2 —分别为两样本平均数；

σ^2_{x1} ， σ^2_{x2} —分别为两样本方差；

n—样本容量。

5.3.2 One-Way ANOVA 方差分析（LSD 检验）

三组及以上均值比较时可进行方差分析。LSD 检验按式（2）：

$$LSD_{\alpha} = t_{\alpha(df_e)} S_{\bar{x}_i - \bar{x}_j} \dots\dots\dots(2)$$

式中：

$t_{\alpha(df_e)}$ —在 F 检验中误差自由度下，显著水平为 α 的临界 t 值；

$S_{\bar{x}_i - \bar{x}_j}$ —均数差异标准误，由式（3）算得；

$$S_{\bar{x}_i - \bar{x}_j} = \sqrt{2MS_e / n} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

MS_e—F 检验中误差均方；

n— 各处理重复数。

5.4 质量控制

灭菌土壤不得检出微生物菌落。

6 试验报告

试验报告应至少包括下列内容：

试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号；

试验委托单位和联系方式、样品受理日期和封样情况；

试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期；

供试物基本信息（如：含量和组成信息，以及任何改变供试物生物活性物质的含量和组成信息，施用量、施用方法等）；

试验系统的详细描述；

试验条件，包括试验土壤含水量、pH、有机质含量、温度、光照等；

试验结果。

附录 A
(资料性附录)
稀释平板菌落计数法

根据微生物特征选择合适的方法。本方法可用于细菌、放线菌、真菌、酵母等微生物计数。

A.1 方法原理

将供试物经无菌水分散处理后，在固体培养基上由单个细胞生长并繁殖成一个菌落，因而可以根据形成的菌落数来计算微生物的数量。

A.2 试剂

蛋白胨；

牛肉膏；

可溶性淀粉；

葡萄糖；

硝酸钾；

氯化钠 (NaCl) ；

氢氧化钠溶液：1 mol/L；

盐酸溶液：1 mol/L；

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) ；

磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) ；

七水硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ；

七水硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ；

琼脂；

孟加拉红；

蒸馏水；

氯霉素。

A.3 仪器设备

高压蒸汽灭菌锅；

恒温培养箱；

超净工作台；

酸度计等。

A.4 固体培养基平板的制备

A.4.1 细菌培养基平板

称取蛋白胨 10 g、牛肉浸膏 3 g、氯化钠 5 g、琼脂 15 g~18 g，溶于 900 mL 蒸馏水中，置于电炉上加热，搅拌至完全溶解，加蒸馏水至 1000 mL。以 1 mol/L 氢氧化钠溶液或 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 7.0~7.2。分装于 500 mL 三角瓶中，每瓶装 150 mL，塞上棉塞，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，培养基温度降至约 50℃ 后倒入无菌培养皿中，每板约 15 mL。

A.4.2 放线菌培养基平板

称取可溶性淀粉 20 g、硝酸钾 1 g、氯化钠 0.5 g、磷酸氢二钾 0.5 g、七水硫酸镁 0.5 g、七水硫酸亚铁 0.01 g、琼脂 15 g，溶于 900 mL 蒸馏水中，置于电炉上加热，搅拌至完全溶解，加蒸馏水至 1000 mL。以 1 mol/L 氢氧化钠溶液或 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 7.2~7.4。分装于 500 mL 三角瓶中，每瓶装 150 mL，塞上棉塞，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，培养基温度降至约 50℃ 后倒入无菌培养皿中，每板约 15 mL。

A.4.3 真菌培养基平板

称取蛋白胨 5 g、葡萄糖 10 g、磷酸二氢钾 1 g、硫酸镁 0.5 g、琼脂 15~18 g、孟加拉红 0.03 g、氯霉素 0.1 g，溶于 900 mL 蒸馏水中，置于电炉上加热，搅拌至完全溶解，加蒸馏水至 1000 mL。分装于 500 mL 三角瓶中，每瓶装 150 mL，塞上棉塞，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，培养基温度降至约 50℃ 后倒入无菌培养皿中，每板约 15 mL。

A.4.4 酵母培养基平板

称取酵母膏 3 g、麦芽汁 3 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 10 g、琼脂 20 g，溶于 900 mL 蒸馏水中，置于电炉上加热，搅拌至完全溶解，加蒸馏水至 1000 mL。分装于 500 mL 三角瓶中，每瓶装 150 mL，塞上棉塞，经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min，培养基温度降至约 50℃ 后倒入无菌培养皿中，每板约 15 mL。

A4.1~A4.4 培养基配方仅供参考，可根据供试物生物学特征选择最适合的培养基配方。

A.5 土壤样品的处理

称取 1.0 g 新鲜土样，加入盛有 100 mL 无菌水的三角瓶中，震荡 10 min 使土壤充分分散，形成土壤悬液。

A.6 样品的稀释涂布

用无菌刻度吸管吸取 1 mL 上述土壤悬液到 9 mL 无菌水中，按 10 倍法依次稀释，通常稀释到 10^{-6} 。根据土壤中微生物的数量选择合适倍数的悬液接种，细菌一般采用 10^{-6} ~ 10^{-4}

用于平板涂布；真菌一般 10^{-3} ~ 10^{-1} 用于平板涂布。吸取 100 μ L 稀释液置于培养基平板表面，立即用无菌玻璃涂棒均匀涂抹于培养基表面。用同一支吸管接种同一样品不同稀释浓度时，应从高稀释度开始，然后依次吸取较低稀释度的悬液。将涂布后的平板倒置于温度适宜的培养箱中黑暗培养。

A.7 菌落计数

细菌培养基平板培养 2~3d 后取出，选择细菌菌落数量 20~200 之间的培养皿进行计数。

真菌培养基平板培养 3~5d 后取出，选择真菌菌落数量 10~100 之间的培养皿进行计数。

结果计算：

$$\text{供试物含量} = \text{菌落平均数} \times \text{稀释倍数}, \text{单位} CFU / g$$

附录 B
(资料性附录)
抗性标记-平板计数法

本方法可用于抗生素标记的微生物计数。

B.1 方法原理

将含有抗生素抗性基因的质粒通过生物化学方法导入到供试微生物体内，转化后的供试微生物能够在含有抗生素的平板中生长，而环境中其它微生物则不能生长，通过平板菌落计数得到供试微生物数量。

B.2 试验材料

胰蛋白胨；

酵母浸出粉；

氯化钠 (NaCl)

马铃薯；

葡萄糖；

山梨酸；

Tris-HCl；

氯化钙 (CaCl₂)；

溶壁酶；

蜗牛酶；

抗生素；

转化缓冲液STC: 1.0 mol/L 山梨酸，10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)，10 mmol/L CaCl₂；

质粒 (含抗生素抗性基因，如氨苄青霉素抗性、卡那霉素抗性、氯霉素抗性和潮霉素B抗性)。

B.3 仪器设备

超净工作台；

摇床；

恒温水浴锅；

低温高速离心机；

恒温培养箱等。

B.4 抗性标记菌株的制备

B.4.1 细菌

B.4.1.1 细菌感受态细胞制备

取供试细菌划线接种在 LB 固体培养基平板上，37℃ 培养过夜。从长好的平板上挑取一个单菌落，转接在含有 3 mL LB 液体培养基的试管中，37℃ 振荡培养过夜。取 0.3 mL 菌液接种于 20 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中，37℃ 振荡培养 2 h~3 h，待 OD₆₀₀ 值达到 0.3~0.4 时，取下三角瓶，立即置冰浴 10 min~15 min。将细菌转移到一个灭菌的 50 mL 离心管中，4℃ 3000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，收集菌体。加入 20 mL 用冰预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液，重新悬浮菌体，使菌体分散均匀，置冰浴中 30 min。4℃ 3000 r/min 离心 10 min，弃去上清液。再加入 2 mL 用冰预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液，小心重新悬浮菌体。在 4℃ 冰箱中放置 12 h~24 h，即可应用于转化。

B.4.1.2 细菌的转化

取供试细菌新鲜感受态细胞 100 μL 于 1.5 mL Eppendorf 管中，加入 50 ng~100 ng 含抗性基因的质粒，轻轻旋转以混合内容物，在冰浴中放置 30 min。42℃ 热休克 120 sec，不要摇动 Eppendorf 管。加入 LB 液体培养基 900 μL，37℃ 保温 60 min。取 100 μL 转化液涂布在含抗生素的 LB 固体平板上，37℃ 倒置培养 16~24 h。观察平板，长出的菌落可能就是转化子，可进一步提取质粒鉴定。

B.4.2 真菌

B.4.2.1 真菌原生质体制备

分别称取溶壁酶（2%）、蜗牛酶（4%）共溶于 5 mL 0.8 mol/L MgSO₄ 溶液（pH 5.0）中，经 0.22 μm 灭菌微孔滤膜过滤除菌，制备成复合酶液。将马铃薯葡萄糖固体培养基培养 6 d 的真菌用无菌水制备孢子悬液，稀释至 1×10⁷ 个/mL。500 mL 三角瓶中装入 100 mL 马铃薯蔗糖液体培养基，接入上述孢子悬液 1 mL，在 30℃、180 rpm 摇床培养 12 h 后收集菌丝。然后称 1 g 湿菌丝，加入 5 mL 复合酶液，于 30℃ 下缓慢震荡温浴 2 h~3 h，经漏斗过滤，离心收集原生质体，4℃ 保存以备转化。

B.4.2.2 原生质体转化

转化采用 PEG/CaCl₂ 融合法。取上述已纯化的原生质体 100 μL（浓度为 10⁸ 个/mL），加入 5 μL 含抗性基因的质粒（含 10 μL DNA），混匀后冰浴 20 min~30 min；然后键入 1.25 mL PEG 溶液，室温静置 10 min；加入 1 mL STC 溶液稀释，4℃、3000 rpm 离心 30 min；弃上清，将沉淀的原生质体悬浮于 400 μL 高渗再生液体培养基中。30℃ 摇床培养 12 h~16 h

后，涂布于含抗生素的培养基平板上，30℃静置培养 5 d~7 d，筛选含有抗性基因的菌株（即转化子）。

B.5 样品的处理

称取 1.0 g 新鲜土样，加入盛有 100 mL 无菌水的三角瓶中，震荡 10 min 使土壤充分分散，形成土壤悬液。

B.6 样品的稀释涂布

用无菌刻度吸管吸取 1 mL 上述土壤悬液到 9 mL 无菌水中，按 10 倍法依次稀释，通常稀释到 10^{-6} 。根据土壤中微生物的数量选择合适倍数的悬液接种，细菌一般采用 10^{-6} ~ 10^{-4} 用于平板涂布；真菌一般 10^{-3} ~ 10^{-1} 用于平板涂布。吸取 100 μ L 稀释液置于含抗生素培养基平板表面，立即用无菌涂布棒均匀涂抹于培养基表面。用同一支吸管接种同一样品不同稀释浓度时，应从高稀释度开始，然后依次吸取较低稀释度的悬液。将涂布后的平板倒置于温度适宜的培养箱中黑暗培养。

B.7 菌落计数

细菌在含抗生素培养基平板培养 2 d~3 d 后取出，选择细菌菌落数量 20~200 之间的培养皿进行计数。

真菌在含抗生素培养基平板培养 3 d~5 d 后取出，选择真菌菌落数量 10~100 之间的培养皿进行计数。

结果计算：

供试物含量 = 菌落平均数 \times 稀释倍数，单位 *CFU* / g

附录 C

(资料性附录)

荧光定量PCR-TaqMan荧光探针法

本方法可用于细菌、真菌等微生物计数。

C.1 方法原理

在普通聚合酶链式反应的基础上，加入一条特异的荧光探针。该探针为一寡核苷酸，两段分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收，PCR 扩增时，Taq 酶的 5'-3'外切酶活性将探针酶切降解，使报告基团和淬灭基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的积累与 PCR 产物形成完全同步。最后通过参照标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

C.2 试验材料

10×buffer;

dNTP;

rTaq酶;

TaqMan探针;

水体基因组DNA提取试剂盒。

C.3 主要仪器

荧光定量PCR仪;

普通PCR仪;

超净工作台;

紫外分光光度计等。

C.4 土壤微生物基因组 DNA 提取

土壤基因组 DNA 的提取参照提取试剂盒的步骤进行，将最终获得的土壤基因组 DNA 在-20 °C下保藏。

C.5 荧光 PCR 检测

荧光 PCR 扩增反应体系如下：10×buffer 2.5μL；dNTP (10mmol/L) 2 μL；正反引物各 1μL；rTaq 酶 0.5 μL；ddH₂O 15μL；探针(2 μmol/L)1 μL；模板 2 μL；共计 25 μL。PCR 扩增反应程序如下：95 °C 预变性 3 min；95 °C 10 s 变性，60 °C 30 s 退火延伸，60 °C时收集 FAM

荧光；共 40 个循环，阴性对照使用灭菌双蒸水。反应完毕后，荧光定量 PCR 仪检测系统根据阈值自动生成的动力曲线及 CT 值。

C.6 标准曲线的建立

将梯度稀释的含目的片段（ 10^1 拷贝/ μL ~ 10^8 拷贝/ μL ）作为模板，进行荧光定量 PCR，以模板拷贝数的对数值为 X 轴，CT 值为 Y 轴作图，建立检测标准曲线。

C.7 样品中基因拷贝数计算

根据样品反应结束后生成的 CT 值和已建立的标准曲线，计算各样品中目的基因片段的拷贝数。

附录 D
(资料性附录)
直接计数法

本方法可用于原生动物、真菌孢子、酵母等微生物计数。

D.1 方法原理

将土样与无菌水混合，制备成悬浊液，直接在显微镜下计数。

D.2 仪器设备

显微镜；

锥形瓶；

滴管；

载玻片、盖玻片；

超净工作台等。

D.3 样品的制备

取 5 g 新鲜土壤，加入 50 mL 无菌水，充分震荡摇匀，避免土壤颗粒粘附在容器壁上。

D.4 样品的检测

取 1 mL 土壤悬液分多次滴加在载玻片上，显微镜下计数，直到将全部 1 mL 悬浮液检测查完为止。

D.5 数量计数

供试物含量 = 1 mL 悬液中平均数 × 稀释倍数，单位个/g

参考文献

- [1] GB 4789.2-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定。
 - [2] Primrose S, Twyman R, Old B 著. 基因操作原理(第六版)。
 - [3] SN/T 2101-2016 出口乳及乳制品中结核分枝杆菌检测方法-荧光定量 PCR 法。
-