

ICS 65.080
CCS B 10

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4543—2025

微生物肥料功能菌株筛选与鉴评通则

General principles for screening and evaluation of functional
strains of microbial fertilizer

2025-01-09 发布

2025-05-01 实施

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部种植业管理司提出。

本文件由农业农村部肥料标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、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）。

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

微生物肥料功能菌株筛选与鉴评通则

1 范围

本文件规定了微生物肥料功能菌株筛选与鉴评的一般要求、技术流程和实施要求。

本文件适用于微生物肥料功能菌株的筛选、鉴定和评价。

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/T 41727 农用微生物菌剂功能评价技术规程

GB/T 41728 微生物肥料质量安全评价通用准则

NY/T 1113 微生物肥料术语

NY/T 1536 微生物肥料田间试验技术规程及肥效评价指南

NY/T 1735 根瘤菌生产菌株质量评价技术规范

NY/T 1736 微生物肥料菌种鉴定技术规范

NY/T 1847 微生物肥料生产菌株质量评价通用技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微生物肥料 microbial fertilizer

含有特定微生物活体应用于农业生产的制品,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,增强抗逆性,提高产量,改善农产品品质及农业生态环境。

[来源:NY/T 1113—2006,2.1,有修改]

3.2

微生物肥料效应 microbial fertilizer effect

微生物肥料对植物产量和抗逆能力、农产品品质、土壤质量改善的效果。

[来源:NY/T 1113—2006,7.16,有修改]

3.3

功能菌株 functional strain

具有养分活化、植物促生、植物抗逆、有机物料促腐、土壤改良与修复等效应的微生物。

3.4

筛选 screening

从微生物的群体中,采取相关的技术,选择出目标菌株的过程。

[来源:NY/T 1113—2006,3.7,有修改]

3.5

富集 enrichment

利用不同微生物间的生长代谢及环境耐受差异,通过设置特定条件,促进微生物群体中目标微生物大量生长,实现其数量优势的培养过程。

3.6

驯化 domestication

在微生物培养过程中,通过渐进式加入靶向物质或进入靶向环境等措施,使微生物逐步适应某特定营养或环境的过程。

3.7

分离 isolation

从含有目标微生物的样品中,将目标微生物培养出来的过程。

[来源:NY/T 1113—2006,3.5,有修改]

3.8

纯化 purification

从微生物群体中,去除杂菌,获得同一种目标微生物个体的过程。

[来源:NY/T 1113—2006,3.6,有修改]

3.9

鉴评 identification and evaluation

对目标微生物进行分类鉴定及菌株功能性、安全性评价的过程。

4 一般要求

4.1 筛选

4.1.1 依据设定的功能目标,确定菌株的筛选方案、程序及技术方法。

4.1.2 根据目标菌最可能存在的环境位置,确定适宜的采样地点与取样方案,采集目标菌筛选的环境样品。

4.1.3 依据目标菌类别及其应用环境条件,确定适宜的培养基、培养条件、筛选方法等技术方案。

4.1.4 菌株的初筛以菌种数量为主,采用快速、有效及易识别的方法进行。

4.1.5 菌株的复筛以菌种功能为主,筛选条件应接近生产应用实际,可同时选用2种及2种以上的方法进行,以增加功能菌株的筛选效率。

4.1.6 宜从土壤、动植物体、特定水体等环境中筛选功能菌株。菌种来源也可以是菌种保藏机构、科研机构等保存的资源。

4.2 鉴评

筛选出的待测菌株先进行菌种鉴定和安全性评价,待其安全性符合要求后再进行功能性评价。

5 技术流程

微生物肥料功能菌株筛选与鉴评程序主要包括功能菌株的筛选(6.1)和功能菌株的鉴评(6.2)两部分。其中,功能菌株的筛选(6.1)包括6个阶段:样品采集(6.1.1)、富集(6.1.2)、驯化(6.1.3)、初筛(6.1.4)、分离、纯化(6.1.5)和复筛(6.1.6)。功能菌株的鉴评(6.2)包括菌株的分类鉴定(6.2.1)、安全性评价(6.2.2)和功能性评价(6.2.3)。功能菌株筛选与鉴评技术流程如图1所示。

6 实施

6.1 筛选实施

6.1.1 样品采集操作如下:

- a) 依据样品类型和目标菌株特性,确定采样的地理位置、气候特征、土壤及植被类型、深度、时间等;
- b) 用无菌器具(铁锹、小铲或其他器具),采用对角线法或随机法5点采样,每点取样500 g(mL)左右,充分混匀,而后采用四分法取大约500 g(mL),固体样品过筛处理,放入无菌采样袋或瓶中;
- c) 封口并做好标记,低温储运至实验室,4℃保存;
- d) 取部分样品,进行理化和生物指标的分析;
- e) 剩余样品可进入富集、驯化、初筛或分离、纯化。

注1:根瘤菌样品的采集按照附录A中A.1的规定执行。

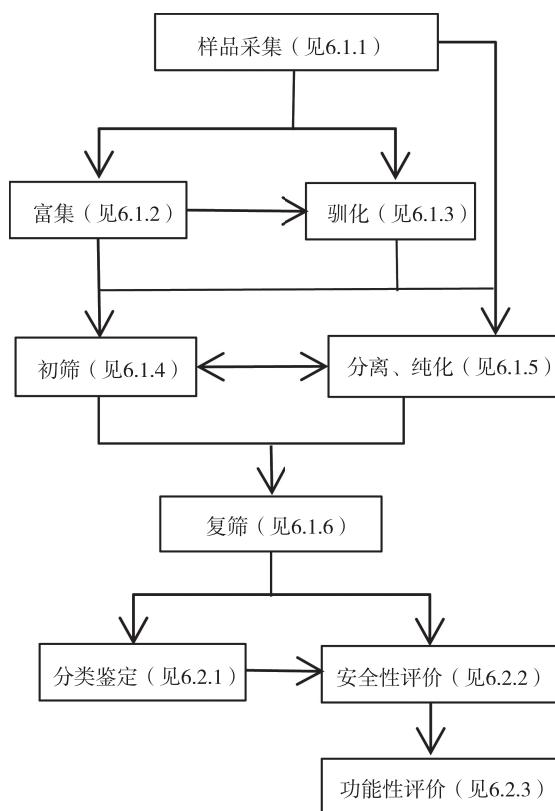


图 1 功能菌株筛选与鉴评技术流程

6.1.2 富集操作如下：

- 配制适宜的富集培养基。
- 制备样品悬液：称取 10.0 g(mL) 样品于装有 90 mL 无菌水(或磷酸缓冲液 pH 7.0 或生理盐水) 和少量玻璃珠的 250 mL 三角瓶中。适宜温度下, 200 r/min 振荡 30 min, 静置, 上清液即为样品悬液。
- 取适量样品悬液或采集的液体样品(可根据需要进行适当稀释)加入富集培养基, 通过控制培养条件(营养、酸碱度、盐度、温度、加入抗生素等)实现富集。
- 按一定接种量转接至培养基中, 依富集程度确定转接次数。如果目标菌数量太少, 可将培养液离心浓缩, 而后再进入分离、纯化、驯化或初筛。

6.1.3 驯化操作如下：

- 配制适宜的驯化培养基；
- 制备样品悬液, 操作方法同 6.1.2 b)；
- 将样品悬液或采集的液体样品或富集培养物按一定量接种到驯化培养基, 在特定驯化条件下进行逐级驯化培养；
- 驯化好的培养物进入分离、纯化或初筛。

6.1.4 初筛操作如下：

- 根据不同目标菌的功能, 选择适宜的方法进行初筛。
 - 拮抗菌平板快速检测法按照附录 B 中 B.1 的规定执行；
 - 非拮抗菌平板快速检测法按照附录 B 中 B.2 的规定执行；
 - 非拮抗菌高通量筛选法按照附录 B 中 B.3 的规定执行；
 - 分子筛选法按照附录 B 中 B.4 的规定执行；
 - 复合系筛选法按照附录 B 中 B.5 的规定执行；
 - 共生匹配能力筛选法按照 NY/T 1735 的规定执行。

b) 初筛结束,符合要求的菌株进入分离、纯化或复筛。

6.1.5 分离、纯化操作如下:

- a) 根据需要制备样品悬液,方法同 6.1.2 b);
- b) 用无菌水对样品悬液进行 10 倍系列稀释;
- c) 取 0.1 mL 适宜梯度稀释液加入适宜的培养基,表面涂布均匀,每稀释度至少 3 次重复;
- d) 置适宜条件进行培养;
- e) 选取典型菌落继续划线分离、纯化直至获得纯培养物;
- f) 获得的纯培养物进入初筛或复筛。

注 2:根瘤菌的分离、纯化分别按照附录 A 中 A.2 和 A.3 的规定执行。

6.1.6 复筛操作如下:

- a) 根据不同目标菌的功能,选择适宜的方法进行复筛。
 - 1) 摆瓶法按照附录 C 中 C.1 的规定执行;
 - 2) 盆栽法按照附录 C 中 C.2 的规定执行;
 - 3) 失重法按照附录 C 中 C.3 的规定执行;
 - 4) 抑菌圈法(打孔法)按照附录 C 中 C.4 的规定执行;
 - 5) 离体叶片法按照附录 C 中 C.5 的规定执行。
- b) 复筛结束,符合要求的菌株进入分类鉴定和安全性评价。

6.2 鉴评实施

6.2.1 分类鉴定

菌株的分类鉴定应按照 NY/T 1736 的规定执行。

6.2.2 安全性评价

菌株的安全性评价应按照 GB/T 41728 的规定执行。不符合安全性要求的菌株,灭活后弃用;符合安全性要求的菌株,进入功能性评价。

6.2.3 功能性评价

菌株的功能性评价应按照 NY/T 1847、NY/T 1536 或 GB/T 41727 的规定执行。

附录 A
(规范性)
根瘤菌的样品采集和分离、纯化

A.1 根瘤菌的样品采集

在野外或田间寻找叶色浓绿、生长健壮的植株作为根瘤采集的对象,用工兵铲或其他工具将选定的植株连同根系及周围土壤一起挖出,或者用水将根系浇湿,再挖出根系。轻轻抖去根系上土壤,或在水中漂洗,用剪刀剪下正常的根瘤,瘤的两侧各保留5 mm~10 mm的根组织。将根瘤装入硅胶干燥管或者装有50%甘油的试管中,盖严盖子,贴好标签;也可将采集的根瘤用适量的潮湿土壤包埋放入自封塑料袋中,带回实验室尽快分离。

A.2 根瘤菌的分离

采回的新鲜根瘤直接用自来水冲洗干净;干燥的根瘤,须先在无菌水中4 ℃浸泡5 h~6 h,再用无菌水冲洗干净。用剪刀将根瘤两侧的根组织裁留5 mm左右,放入离心管中,加95%的乙醇浸泡30 s消除表面张力,弃去酒精,再加0.2%的氯化汞或者5%(*w/V*)次氯酸钠消毒2 min~5 min(视根瘤大小而定),用无菌水冲洗5次,每次振荡清洗5 min~30 min。用无菌镊子夹碎根瘤,将根瘤碎片组织和汁液放在含有刚果红的酵母—甘露醇琼脂(YMA)平板边缘,用接种环划线后置28 ℃温箱培养3 d~20 d。

A.3 根瘤菌的纯化

从分离平板上选择典型的根瘤菌单菌落,继续在YMA平板上划线纯化2次~3次,直至获得纯的根瘤菌菌株。将纯化的根瘤菌悬浮在20%甘油中,−80 ℃~−40 ℃保存。

附录 B

(规范性)

微生物肥料功能菌株初筛方法

B.1 拮抗菌平板快速检测法(抑菌圈法)

B.1.1 在适宜的培养基和培养条件下分别培养待测菌和病原菌。

B.1.2 病原真菌拮抗菌检测,用灭菌的手术刀或小环刀将供试的病原菌苔切成圆形或方形菌块(直径或边长 0.5 cm),置于培养基平板中央,在距病原菌菌块中心 2.5 cm 处的对角线接种待测菌,每平板接种 4 个不同菌株,每菌株重复 3 次,以不接种待测菌的平板为对照。适宜条件下培养,当对照菌落长至培养皿边缘时,测量病原菌菌落直径,记录结果并计算抑制率。抑制率(%)=100×(对照菌落半径-处理菌落半径)/对照菌落半径。

B.1.3 病原细菌拮抗菌检测,将适宜的琼脂培养基冷却至 45 ℃~50 ℃,在超净工作台上加入病原菌菌悬液(也适用于病原真菌孢子悬液),充分摇匀,倒入无菌培养皿中,置水平台面上冷却,制成含菌平板;取灭菌打孔器在长有待测菌的平板上,垂直挖取含待测菌的琼脂块(直径 5 mm)数块;用接种针挑取琼脂块接于含病原菌平板上,以不接种待测菌的平板为对照。适宜条件下培养,正置培养 12 h 后再倒置培养 24 h,观察琼脂块周围病原菌的生长情况,用游标卡尺测量抑菌圈大小。

B.2 非拮抗菌平板快速检测法

B.2.1 配制鉴别性初筛培养基,制备平板。

B.2.2 将待分离样品或样品悬液用无菌水进行 10 倍系列稀释。

B.2.3 取 0.1 mL 不同梯度稀释液加入适宜的初筛培养基平板表面,每稀释度至少 3 次重复,涂布均匀。

B.2.4 将涂布好的平板于适宜条件下培养。

B.2.5 观察、记录菌落生长情况,测量菌落直径(d)和平板特异反应圈(透明圈、变色圈、水解圈或生长圈等)直径(D),计算 R 值($R=D/d$)。

B.3 非拮抗菌高通量筛选法(以堆肥纤维素降解菌为例)

B.3.1 配制适宜培养基:好氧培养基、刚果红纤维素培养基、种子培养基。

B.3.2 从富含纤维素降解菌的环境中采集样品,并置于采样袋内,排净空气,密封,置于 4 ℃ 条件下保存备用。

B.3.3 称取 5 g 不同来源的样品,分别加入装有 50 mL 无菌生理盐水和若干玻璃珠的培养瓶中,置于摇床中充分振荡,混合均匀。将混合物用灭菌的纱布过滤,上清液按 10% 接种量转接入 50 mL 好氧培养基中,在 55 ℃、120 r/min 条件下培养,观察并记录各培养瓶内滤纸条的变化情况,选取降解滤纸纤维素效果好的培养瓶,按 10% 接种量转接到新鲜的好氧培养基中,传代培养 3 代~5 代。

B.3.4 将富集培养液进行系列稀释,取 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 四个梯度的样液各 5 L,涂布于 24 孔板的固体刚果红纤维素培养基上,置于 55 ℃ 条件下培养。挑取产生水解圈的不同形态的单个菌落,进一步分离、纯化。

B.3.5 将初简单菌落接种于装有 2.5 mL 种子培养基的 24 孔板中,置于 55 ℃、120 r/min 条件下振荡培养 12 h,再次梯度稀释和点样分离,直到获得纯培养物。

B.4 分子筛选法

B.4.1 在适宜的培养基和培养条件下培养待测菌株,离心收集菌体。

- B. 4. 2** 采用冻融法、酚氯仿法或其他方法提取待测菌株基因组, -20 ℃保存备用。
- B. 4. 3** 通过文献查询以及 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中目标基因序列的分析, 利用引物设计软件(如 Primer 5.0 软件)设计引物。
- B. 4. 4** 应用设计的引物对制备的待测菌株基因组样品进行目标基因(功能基因或特异基因)扩增, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。
- B. 4. 5** 对阳性菌株进行重复 PCR 扩增, 回收扩增产物进行序列测定与分析。

B. 5 复合系筛选法(以堆肥纤维素分解菌复合系筛选为例)

- B. 5. 1** 制备蛋白胨纤维素液体培养基 (PCS): 蛋白胨 5.0 g, 作物秸秆粉 5.0 g(过 80 目筛), 氯化钠 5.0 g, 无水碳酸钙 2.0 g, 酵母粉 1.0 g, 滤纸条(作为降解的外观指标), 蒸馏水 1 L, pH 自然, 121 ℃灭菌 20 min。
- B. 5. 2** 选取处于半腐解状态的富含纤维素的堆肥样品, 随机 5 点取样, 混匀, 分别编号。
- B. 5. 3** 取 2.5 g 样品接入装有 50 mL PCS 培养基的三角瓶中, 以放入瓶中的滤纸条作为降解的外观指示。在适宜条件下培养, 当滤纸条的降解进入高峰期(约 7 d)后, 按 5%(*v/v*)的接种量转接到新鲜的 PCS 培养基中。如此重复传代培养 10 代以上, 逐步淘汰降解能力弱的菌系, 选留降解能力强的复合菌系, 进行保存和后续研究。或者在转接数代以后, 将 pH 偏酸的和偏碱的培养物混合之后再接种, 逐步筛选出滤纸分解速度快且 pH 保持稳定的菌系, 直至驯化筛选出高效稳定的纤维素分解菌复合系。

附录 C

(规范性)

微生物肥料功能菌株复筛方法

C.1 摆瓶法

- C.1.1 在适宜条件活化待测菌。
- C.1.2 进行最优发酵条件摸索试验,确定最佳发酵工艺。
- C.1.3 按5%或10%接种量接种待测菌于适宜的液体培养基中,在最优发酵条件下进行发酵培养,每菌株3次重复,以无菌水和/或对照菌株的培养瓶为对照。
- C.1.4 培养终止,离心,去沉淀,收集上清液,备用。
- C.1.5 依据目标菌的不同功能,测定上清液中相应的目标物质含量(如全氮、有效磷、速效钾;钙、镁、硫、氯等中量元素;植物激素、游离氨基酸、有机酸等活性物质等)或活性(如纤维素酶活、木聚糖酶活、蛋白酶活等),测定方法可参照NY/T 1536、NY/T 1847和GB/T 41727的规定执行。
- C.1.6 将测得的数据进行方差显著性检验。

C.2 盆栽法

- C.2.1 供试土壤为农田土,采集地表0 cm~20 cm的耕层土,混合均匀后,过2 mm筛进行盆栽实验。取一部分土壤进行理化性质测定(包括有机质、有效磷、速效钾、全氮、pH等),其余土壤保存在常温阴凉处备用。
- C.2.2 选取适宜大小的带拖盘花盆装土、浇水,待土壤湿度合适时,种植植株种子或移栽植株。
- C.2.3 将培养好的菌株离心、收集并用无菌水或磷酸盐缓冲液洗涤3次~5次,最后再用无菌水悬浮菌体,统一调OD值至适宜值,吸取每种菌液50 mL用300 mL无菌蒸馏水稀释后浇灌植株根部,每个处理3次重复,加等量的无菌水为对照处理。
- C.2.4 按照栽培作物的种植条件进行栽培管理。
- C.2.5 根据相关要求测定相关指标,测定方法可参照NY 525和GB/T 41727的规定执行。
- C.2.6 将测得的数据进行方差显著性检验。

C.3 失重法

- C.3.1 以一种纤维素物质(如滤纸、脱脂棉、秸秆粉、锯末等)为唯一碳源制备培养液。
- C.3.2 按5%~10%(V/V)接种量接种待测菌悬液,适宜条件下培养。
- C.3.3 将培养物离心弃上清液。
- C.3.4 用蒸馏水清洗沉淀,离心,弃上清液,105 °C烘干后称重。
- C.3.5 计算失重量和失重率。

C.4 抑菌圈法

- C.4.1 预先培养病原菌和待测菌。
- C.4.2 收集病原菌和待测菌菌体并进行适当稀释制成菌悬液。
- C.4.3 将病原菌悬液加入融化并冷却至适宜温度的培养基中,混匀后倒平板,凝固后备用。
- C.4.4 用灭菌的打孔器或不锈钢圆管在平板上打孔,小心挑去培养基小块以做成圆孔。
- C.4.5 往孔中加入一定量的待测菌悬液或无菌滤液,每菌株3次重复,以加等量无菌水为对照。

C. 4.6 置于一定条件下培养,测量抑菌圈直径。

C. 5 离体叶片法

C. 5.1 水培或盆栽植株育苗,选择完整平展叶片备用。

C. 5.2 液体培养待测菌株,培养结束后吸取一定量的菌液均匀喷洒在叶片表面,每处理选 10 个叶片;对照组喷洒等量无菌水。

C. 5.3 在叶片中央接种 4 mm 左右病原菌菌丝块,叶柄处包吸水脱脂棉保湿。

C. 5.4 将叶片置垫有湿润滤纸的无菌培养皿内保湿,20 ℃~22 ℃培养 5 d~10 d。

C. 5.5 观察叶片发病情况,测量各处理的病斑大小。

参 考 文 献

- [1] 陈文新,汪恩涛.中国根瘤菌[M].北京:科学出版社,2011
 - [2] 王娟娟.肥效微生物筛选及对小麦促生效果的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2019
 - [3] 汪继兵.一株生防功能菌的筛选与鉴定及其生物有机肥研发[D].杭州:浙江大学,2012
 - [4] 汤晓晓.基于高通量技术的高效秸秆类纤维素降解菌筛选及应用[D].沈阳:辽宁大学,2018
 - [5] 于晓溪,吴慧玲,刘铭,等.具有杀镰孢菌素合成功能基因菌株的筛选与鉴定[J].生物技术通报,2012(10):217-222
 - [6] 王伟东,崔宗均,牛俊玲,等.一组木质纤维素分解菌复合系的筛选及培养条件对分解活性的影响[J].中国农业大学学报,2004(5):7-11,44
 - [7] 崔宗均,李美丹,朴哲,等.一组高效稳定纤维素分解菌复合系MC1的筛选及功能[J].环境科学,2002(3):36-39
 - [8] 王凡,李雪,孙芳艳,等.磷钾生物菌肥的菌种筛选及应用研究[J].湖北农业科学,2014,53(12):2763-2767
 - [9] 万兵兵,刘晔,吴越,等.一株玉米根际多功能促生菌的筛选鉴定及效应研究[J].生物技术通报,2016,32(8):169-176
 - [10] 索雅丽,李术娜,李红亚,等.番茄灰霉病菌颉颃菌株的筛选及功能基因的分析[J].中国植保导刊,2010,30(8):7-10
 - [11] 韩玉芬,陈寒松.应用稻苗离体叶片法筛选水稻纹枯病新农药活性的研究[J].植物保护,1999(5):16-17
-