

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3833—2021

微生物肥料菌种保藏技术规范

Technical specification of culture preservation for microbial fertilizers

2021-05-07 发布

2021-11-01 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并归口。

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、中国农业微生物菌种保藏管理中心。

本文件主要起草人：李世贵、顾金刚、马晓彤、邓晖、张晓霞。

微生物肥料菌种保藏技术规范

1 范围

本文件规定了微生物肥料菌种保藏的术语和定义、基本原则、技术要求和技术方法。

本文件适用于微生物肥料生产和研究的菌种保藏。

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。

NY/T 1113—2006 微生物肥料术语

NY/T 1847—2010 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

NY/T 1113—2006 和 NY/T 1847—2010 界定的以及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的肥料制品。应用于农业生产，通过其中所含微生物的生命活动，增加植物养分供应或促进植物生长、提高产量，改善农产品品质及农业生态环境。

注：目前，微生物肥料包含微生物接种剂、复合微生物肥料和生物有机肥。

[来源：NY/T 1113—2006, 2.1; NY/T 1847—2010, 3.1]

3.2

菌种保藏 **culture preservation**

使菌种保持其活力、固有的遗传和生理生化特性，以及形态特征的微生物学技术。

[来源：NY/T 1113—2006, 3.11]

3.3

定期移植法 **subculturing method**

将菌种接种于适宜的培养基，在最适条件下培养至稳定期后，于4℃~6℃低温保存，并间隔一定时间进行移植培养。

注：亦称传代培养保藏法，包括斜面培养、穿刺培养和液体培养等。

3.4

液体石蜡保藏法 **liquid paraffin preservation method**

将菌种接种在适宜的斜面培养基上，在最适条件下培养至菌种长出健壮菌苔后，注入灭菌的液体石蜡覆盖整个斜面，再直立放置于4℃~6℃低温或室温干燥环境进行保存。

3.5

沙土管保藏法 **sand-soil pipe preservation method**

将培养好的菌种用无菌水制成菌悬液或孢子悬液，滴入灭菌的沙土管中混合均匀，或直接将成熟孢子刮下混于灭菌的沙土管中，使其吸附在沙土载体上，将管中水分抽干后，熔封管口或石蜡密封管口后置干燥器中，置于4℃~6℃低温或室温保存。

3.6

冷冻干燥保藏法 **freeze-drying preservation method**

将欲保藏的菌种加入保护剂制成菌悬液后，分装于安瓿管中冻结，然后在减压条件下利用升华现象除

去水分,达到真空干燥后,熔封管口,放置于4℃~6℃低温保存。

3.7

低温冻结保藏法 cryopreservation method

将欲保藏的菌种加入保护剂后,放置于-20℃或-80℃低温冰箱中保存。

3.8

液氮超低温保藏法 liquid nitrogen cryopreservation method

将欲保藏的菌种加入保护剂后,放置于-196℃的液态氮中或-150℃的氮气中保存。

4 基本原则

- 4.1 使用的微生物肥料菌种应安全、有效,生产者应提供菌种的分类鉴定报告,包括属及种的学名、形态、生理生化特性及鉴定依据等完整资料,以及菌种安全性评价资料。采用生物工程菌,应获准允许大面积释放的生物安全性有关批文。
- 4.2 针对特定的微生物肥料菌种应选择适宜的保藏方法,保持菌种的原有性状,避免菌种死亡、退化、变异或污染。
- 4.3 菌种保藏环境应相对独立和洁净,避免菌种间的交叉污染。
- 4.4 菌种保藏应符合环境保护要求,不应对环境造成污染和危害。
- 4.5 菌种宜采用2种以上的保藏方法进行保存。不同类别微生物肥料菌种适宜采用的菌种保藏方法及保藏时间见表1。

表1 不同类别微生物肥料菌种适宜采用的菌种保藏方法及保藏时间

序号	保藏方法	保藏时间	适用菌种类别
1	定期移植法	3个月~6个月	细菌、放线菌、酵母菌、真菌等各类微生物肥料菌种
2	液体石蜡保藏法	2年~3年	不能分解液体石蜡的细菌、放线菌、酵母菌和丝状真菌等微生物肥料菌种
3	沙土管保藏法	2年~10年	芽孢杆菌、产孢放线菌以及产孢真菌等微生物肥料菌种
4	冷冻干燥保藏法	5年~20年	大多数细菌、放线菌、酵母菌和部分丝状真菌等微生物肥料菌种
5	低温冻结保藏法	2年~5年	细菌、放线菌、酵母菌、真菌等各类微生物肥料菌种
6	液氮超低温保藏法	20年以上	细菌、放线菌、酵母菌、真菌等各类微生物肥料菌种

5 技术要求

- 5.1 菌种保藏需选择合适的培养基,可参考《中国菌种目录》和NY/T 1114及NY/T 2321。
- 5.2 菌种保藏过程中应注意无菌操作,避免污染。
- 5.3 菌种保藏时应做好标记,标明菌种编号、菌种名称和保藏日期等信息。
- 5.4 菌种培养至稳定期或产生成熟孢子后进行保藏。

6 技术方法

6.1 定期移植法

6.1.1 适用范围

本方法适用于细菌、放线菌、酵母菌、真菌等各类微生物肥料菌种的短期保藏。

6.1.2 原理

低温可减缓菌种的代谢活动,抑制其生长繁殖速度,减少菌株变异、延长菌种保藏的时间。通过定期移植,保持菌种活力,避免菌种大量死亡等。

6.1.3 操作步骤

按照附录A的规定执行。

6.2 液体石蜡保藏法

6.2.1 适用范围

本方法适用于不能分解液体石蜡的细菌(如芽孢杆菌属、醋酸杆菌属等)、放线菌、酵母菌和丝状真菌(如青霉属、曲霉属等)。

6.2.2 原理

在液体石蜡覆盖下,隔绝了空气,使菌种的生长代谢受到抑制。此方法也可防止因培养基的水分蒸发而引起的菌体死亡,延长菌种保藏时间。

6.2.3 操作步骤

按照附录 B 的规定执行。

6.3 沙土管保藏法

6.3.1 适用范围

本方法适用于芽孢杆菌、产孢放线菌以及青霉、曲霉、木霉等产孢真菌。

6.3.2 原理

微生物细胞或孢子可以有效地吸附于惰性载体沙土表面,在营养缺乏、干燥的条件下代谢活动减缓,繁殖速度受到抑制,延长菌种保藏时间。

6.3.3 操作步骤

按照附录 C 的规定执行。

6.4 冷冻干燥保藏法

6.4.1 适用范围

本方法适用于大多数细菌、放线菌、酵母菌和部分丝状真菌等微生物肥料菌种的保藏。

6.4.2 原理

微生物细胞在冷冻、减压条件下,由于发生“升华”脱水,细胞的生理代谢活动趋于停止,在真空干燥条件下,菌种得以长期保存。

6.4.3 操作步骤

按照附录 D 的规定执行。

6.5 低温冻结保藏法

6.5.1 适用范围

本方法适用于细菌、放线菌、酵母菌、真菌等各类微生物肥料菌种。

6.5.2 原理

低温冻结条件可减缓微生物细胞的新陈代谢,以达到长期、有效地保藏。

6.5.3 操作步骤

按照附录 E 的规定执行。

6.6 液氮超低温保藏法

6.6.1 适用范围

本方法适用于细菌、放线菌、酵母菌、真菌等各类微生物肥料菌种。

6.6.2 原理

在 -130°C 以下微生物细胞的新陈代谢趋于停止,以达到长期、有效地保藏。

6.6.3 操作步骤

按照附录 F 的规定执行。

附 录 A
(规范性)
定期移植法

A.1 培养基制备

A.1.1 器皿准备

培养基制备过程中所用的器皿,如锥形瓶、试管、烧杯、吸管等,经充分洗涤、干燥后使用。

A.1.2 培养基配制

A.1.2.1 原料称量与溶解

先在烧杯或搪瓷缸中放适量水,按培养基配方称取各项原料,依次将营养成分、缓冲化合物和微量元素等加入水中溶解,搅拌均匀,最后补足水量。

A.1.2.2 调 pH

配料溶解后冷却至室温,根据要求加稀酸(0.1 mol/L 的 HCl)或稀碱(1% 的 NaOH)调 pH。加酸或碱液时要缓慢、少量、多次搅拌,防止局部过碱或过酸而导致测量不准确和营养成分被破坏。

A.1.2.3 加凝固剂

配制固体培养基和半固体培养基时需加凝固剂,常用的凝固剂是琼脂。固体培养基的琼脂用量一般是 18 g/L~20 g/L,半固体培养基的琼脂用量是固体培养基琼脂用量的 1/3~1/2。将凝固剂加入液体培养基后,加热并不断搅拌至融解,再补足蒸发水分。

A.1.2.4 分装

配好的培养基应趁热分装。斜面培养基分装量约为试管高度的 1/4,穿刺培养基的分装量宜为试管高度的 1/3~1/2,液体培养基分装量宜为试管高度的 1/4~1/3 或锥形瓶容量的 1/3~1/2。分装过程中勿使培养基沾污管口或瓶口,以免造成污染。

A.1.2.5 包扎标记

管口或瓶口加棉塞或胶塞,外面包扎防潮纸(如牛皮纸或铝箔等),注明培养基名称及配制日期。

A.1.3 灭菌

按要求将培养基灭菌,通常为 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。含糖的培养基,采用 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min,防止糖的成分遭到破坏。如果培养基中的某些成分不耐高温,可用过滤除菌的方式单独除菌后,再加入灭菌的培养基中。

A.1.4 斜面摆放

分装试管的固体培养基灭菌后应及时摆放斜面,斜面长度不宜超过试管管长的 1/2。

A.1.5 无菌检查

将灭菌的培养基放入培养箱中,37 °C 培养 1 d~3 d。无菌检查合格后将其保存于 4 °C 备用。菌种保藏用的斜面培养基应尽快使用。

A.2 接种

A.2.1 斜面接种

A.2.1.1 点接

把菌种点接在斜面中部偏下方处。此方法适用于扩散型生长的丝状真菌。

A.2.1.2 划线法

从斜面底部中央自下而上划一直线或“之”字形划线。此方法适用于细菌、放线菌和酵母菌。

A.2.2 穿刺接种

用接种针挑取少量菌体,从柱状培养基中心自上而下刺入,直到接近管底(勿穿到管底),然后沿原穿刺途径慢慢抽出接种针。此方法适用于乳酸菌和酵母菌。

A.2.3 液体接种

用接种环挑取少量菌种或用无菌吸管或滴管等取菌悬液接种于液体培养基中。

A.3 培养

将接种后的培养基,置于菌种培养所要求的适宜温度下培养至稳定期或产生成熟的孢子。

A.4 保藏

培养好的菌种于4℃~6℃低温保存。保藏湿度用相对湿度表示,不宜超过50%~70%。

A.5 恢复培养

定期移植恢复培养的间隔时间,因微生物种类不同而异。按相应间隔时间,将保藏菌种转接到新鲜培养基中,在适宜条件下培养。



附 录 B
(规范性)
液体石蜡保藏法

B.1 液体石蜡的准备

选用优质液体石蜡,将液体石蜡分装到锥形瓶中,装量不超过锥形瓶容量的 1/3,塞好棉塞,包扎防潮纸,121 ℃高压蒸汽灭菌 30 min,放置 2 d~3 d 后再进行 121 ℃高压蒸汽灭菌 1 次~2 次,灭菌后将液体石蜡置于 105 ℃恒温干燥箱中,使其中水分蒸发,备用。

将灭菌的液体石蜡冷却至室温,随机选取。在无菌操作条件下,吸取少量液体石蜡滴入空白麦芽汁培养基和牛肉膏蛋白胨液体培养基中,振荡混匀,于 37 ℃培养 1 d~3 d,检查无菌生长后方可使用。

B.2 斜面培养物的制备

按照附录 A 中 A.1、A.2.1 和 A.3 的规定执行。

B.3 灌注石蜡

在无菌操作条件下,用无菌吸管或滴管吸取灭菌的液体石蜡注入培养好的斜面培养物上,液面高出斜面顶部 1 cm 左右,使斜面培养基和其上生长的菌苔与空气隔绝。

B.4 保藏

注入液体石蜡的菌种斜面应直立放置于 4 ℃~6 ℃低温或室温干燥环境保藏。保藏期间应定期检查,并及时补充蒸发损失的无菌液体石蜡。

B.5 恢复培养

恢复培养时,挑取少量菌体转接至适宜的培养基上,生长繁殖后再重新转接一次。

B.6 注意事项

B.6.1 液体石蜡易燃,应注意火灾。

B.6.2 液体石蜡菌种保藏环境应注意通风。

B.6.3 恢复培养时,接种环或接种钩上带有液体石蜡和菌体,火焰灭菌时易飞溅,操作时应注意安全。

附 录 C
(规范性)
沙土管保藏法

C.1 沙土管制备

C.1.1 沙土准备

将河沙用 60 目过筛,弃去大颗粒及杂质,再用 80 目过筛,去掉细沙。用吸铁石吸去铁质,放入容器用 10% 的 HCl 浸泡,如河沙中有机物较多可用 20% 的 HCl 浸泡。24 h 后倒去盐酸,用水洗泡数次至中性,将沙子烘干或晒干。

另取地面下 40 cm~60 cm 非耕作层贫瘠且黏性较小的土壤,研碎,100 目过筛,水洗至中性,烘干。

C.1.2 沙土管灭菌

将处理后的沙、土按质量比 2:1 混合。混匀的沙土分装入安瓿管或小试管中,高度为 1 cm 左右,塞好棉塞,包扎防潮纸,121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min,室温放置 1 d~2 d 后,再次 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

C.1.3 无菌检查

随机选取几支灭菌后的沙土管,在无菌操作条件下取少许沙土至空白麦芽汁培养基和牛肉膏蛋白胨液体培养基中,于 37 °C 培养 1 d~3 d,检查无菌生长后方可使用。

C.2 斜面培养物的准备

按照附录 A 中 A.1、A.2.1 和 A.3 的规定执行。

C.3 菌种制备

向培养好的斜面培养物中注入 3 mL~5 mL 无菌水,洗下菌苔或孢子制成菌悬液。

液体培养物可离心后弃去部分上清液,留取下部菌体及少量上清液制成菌悬液。

用无菌吸管或滴管吸取菌悬液均匀滴入沙土管中,每管 0.2 mL~0.5 mL。放线菌和霉菌可直接挑取孢子拌入沙土管中。

C.4 干燥

混菌后,将沙土管放干燥器中自然干燥或用真空泵将干燥器抽真空加速样品干燥。

C.5 保藏

干燥后的沙土管用火焰熔封管口或石蜡密封管口后,置于 4 °C~6 °C 低温或室温干燥环境保藏,每隔半年检查一次菌种存活性及纯度。

C.6 恢复培养

在无菌操作条件下,打开沙土管,取部分沙土粒置于适宜的培养基上,长出菌苔后再转接一次。或取沙土粒置于适宜的液体培养基中,增殖培养后再转接斜面培养基。

附 录 D
(规范性)
冷冻干燥保藏法

D.1 冷冻干燥管的选择与清洗

冷冻干燥管一般采用耐温度骤变、耐压、管壁厚度均一、且为中性玻璃的安瓿管。管内径为 8 mm 左右,长度为 100 mm~110 mm。清洗安瓿管时,先用 2% 的 HCl 浸泡过夜,再用自来水冲洗 3 遍以上,接着用蒸馏水冲洗、浸泡至 pH 中性,然后干燥、加棉塞,包扎防潮纸,121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min~60 min,烘干,备用。

D.2 保护剂的选择和准备

保护剂可以减少冷冻干燥引起的微生物细胞损伤。冷冻干燥保藏法常用的保护剂为脱脂乳。

脱脂乳的准备:将脱脂奶粉溶于蒸馏水,配制浓度为 12% (W/V) 的脱脂乳,也可用新鲜乳液煮沸,冷却后 4 000 r/min 离心 30 min,弃上层乳油,中间部分为脱脂乳。脱脂乳经 118 °C 高压蒸汽灭菌 15 min~20 min。灭菌后于 37 °C 培养 24 h,检查是否灭菌彻底,检验无菌后置于 4 °C~6 °C 冰箱中备用。

D.3 菌悬液的制备

D.3.1 用斜面培养物制备菌悬液

在无菌操作条件下,先将少量灭菌保护剂加入斜面培养物上,轻轻刮下菌苔或孢子,制成菌悬液。注意不宜泡沫过多或刺挖琼脂。菌悬液细胞浓度为 10^7 个/mL~ 10^8 个/mL 或孢子浓度为 10^6 个/mL 以上为宜。

D.3.2 用液体培养物制备菌悬液

离心收集液体培养的菌体,弃上清液,加入保护剂,将菌体与保护剂混匀,制成菌悬液。

D.4 分装

应在无菌操作条件下分装菌悬液。采用较长的滴管,直接将菌悬液滴入安瓿管底部,注意不要溅污上部管壁,每管分装量 0.1 mL~0.2 mL。若是球形安瓿管,装量为半个球部。分装时间尽量要短。

D.5 预冻

将装有菌悬液的安瓿管置于-80 °C 低温冰箱预冻 2 h 以上,使温度下降到-40 °C~-35 °C。

D.6 冷冻干燥

将预冻后的安瓿管迅速置于已充分预冷的冷冻干燥机样品舱内,关闭放气阀,打开真空泵开始冷冻干燥,接近干燥完成时,适当升温(按冷冻干燥机的具体要求进行操作),确认冷冻干燥完毕后,缓慢打开放气阀,取出样品安瓿管置于干燥器内。冷冻干燥时间一般为 8 h~20 h。

判断冷冻干燥已完全的指标:

- a) 安瓿管内冻干物呈酥松块状或松散片状;
- b) 真空度接近空载时的最高值;
- c) 冷冻干燥机显示的样品温度与舱内温度接近;
- d) 蒸馏水对照管中的水分已完全挥发或 1%~2% 氯化钴的对照管已呈深蓝色。

D.7 安瓿管封口及保藏

从干燥器中取出冷冻干燥完全的安瓿管,在距管口 5 cm 左右用喷射火焰(喷灯、焊枪等)将安瓿管拉细,然后将安瓿管口连接到与真空泵相连的橡皮管上,打开真空泵,在真空条件下(一般真空度达到 0.01 mm Hg,即 1.33 Pa),用喷射火焰对准安瓿管细颈部加热熔封。熔封后的冷冻干燥管可采用高频电火花真空测定仪检测真空度。封口完全的冷冻干燥管应 4℃~6℃低温避光保藏。

D.8 恢复培养

用 75% 的酒精棉擦拭安瓿管的上部,再将安瓿管顶部烧热,用无菌棉签沾无菌水在安瓿管顶部擦一圈,顶部出现裂纹,用锉刀或镊子颈部轻叩,敲下已开裂的安瓿管顶端,用少量无菌水或液体培养基溶解菌块后,用无菌吸管或滴管吸取菌液接种至新鲜培养基或直接取出冻干菌粉接种至新鲜培养基,在适宜条件下培养。

附录 E
(规范性)
低温冻结保藏法

E.1 冻存管的准备

宜选用耐温度骤变、耐压,螺旋口的塑料冻存管。塑料冻存管用蒸馏水浸泡冲洗干净、干燥即可,然后 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min,烘干,备用。

E.2 保护剂的准备

常用的保护剂为 10%~20% 甘油。

10%~20%(V/V)甘油的准备:配制浓度为 10%~20%(V/V)的甘油,然后 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min,备用。

也可以按 20%~40%(V/V)的浓度准备,然后将菌液和甘油按体积比 1:1 混合,使甘油的终浓度在 10%~20%(V/V)。

E.3 菌种的准备

E.3.1 用斜面培养物制备菌悬液

在无菌操作条件下,先将少量灭菌保护剂加入斜面培养物上,轻轻刮下菌苔或孢子,制成菌悬液。

E.3.2 用液体培养物制备菌悬液

将液体培养物与灭菌保护剂按体积比 1:1 混合,制成菌悬液。

E.3.3 其他方法

对于在固体培养基上长成的培养物,可用灭菌打孔器等从固体培养基上切取直径 5 mm~10 mm 的菌块(对丝状真菌,宜取菌落边缘的菌块),放入冻存管内,然后加入保护剂,混匀。

E.4 分装

应在无菌操作条件下分装菌液(菌块),每管分装量约占冻存管容积的 80%。分装完毕后,应立即拧紧螺帽并将含有菌种的冻存管直立放置于冻存盒内。

E.5 保藏

将冻存管置于-80 °C或-20 °C低温冰箱内保藏。

E.6 恢复培养

从-80 °C或-20 °C低温冰箱中取出冻存管,立即放置在 38 °C~40 °C温水中快速复苏(50 s~100 s),并适当摇动,直到内部结冰全部溶解为止。在无菌操作条件下开启冻存管,将管内保藏物接种至适宜的培养基上培养。

附 录 F
(规范性)
液氮超低温保藏法

F.1 冻存管的准备

按照附录 E 中 E.1 的规定执行。

F.2 保护剂的准备

按照 E.2 的规定执行。

F.3 菌种的准备

按照 E.3 的规定执行。

F.4 分装

按照 E.4 的规定执行。

F.5 预冻

预冻时,冷冻速度宜控制在每分钟下降 1℃或直接将冻存管置于-80℃低温冰箱中预冻 4 h 以上,使样品冻结至-40℃~-35℃。

F.6 保藏

将冻存管置于液氮罐中保藏。一般气相温度为-150℃,液相温度为-196℃。

F.7 恢复培养

从液氮罐中取出冻存管,恢复培养方法同 E.6。

F.8 注意事项

F.8.1 操作时应注意安全,戴面罩及皮手套,防止操作人被冻伤。

F.8.2 运送液氮时要用专用特制容器,不可用一般密闭容器存放或运输液氮。

F.8.3 存放液氮容器的室内要注意通风,防止过量氮气使人窒息。

F.8.4 应注意观察液氮容器中液氮的残存量,定期补充液氮。

参考文献

- [1] NY/T 1114 微生物肥料实验用培养基技术条件
- [2] NY/T 2321 微生物肥料产品检验规程
- [3] 国家微生物资源平台. 微生物菌种资源收集整理保藏技术规程汇编[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2011
- [4] 宋渊. 微生物学实验教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2012
- [5] 中国科学院微生物所《菌种保藏手册》编著组. 菌种保藏手册[M]. 北京: 科学出版社, 1980
- [6] 周宇光. 中国菌种目录[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007



中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
微生物肥料菌种保藏技术规范

NY/T 3833—2021

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1.25 字数 25 千字

2021 年 10 月第 1 版 2021 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8664

定价: 40.00 元



NY/T 3833—2021

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261