

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1736—2009

---

## 微生物肥料菌种鉴定技术规范

Technical specification of strain identification for microbial fertilizers

2009-04-23 发布

2009-05-20 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B、附录 C 和附录 D 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位:农业部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所。

本标准主要起草人:冯瑞华、李俊、沈德龙、姜昕、李力、杨小红、曹凤明、关大伟、陈慧君。

## 微生物肥料菌种鉴定技术规范

### 1 范围

本标准规定了微生物肥料使用菌种鉴定程序与方法的选用原则。  
本标准适用于微生物肥料科研、教学、质检和生产等领域中的菌种鉴定。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

NY/T 1113—2006 微生物肥料术语

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

#### 3.1

##### 细菌 bacterium

形体微小,结构简单,通常以二分裂方式进行繁殖的单细胞原核生物,基本形态有球状、杆状、弧状和螺旋状。

#### 3.2

##### 放线菌 actinomycete

细胞呈丝状、孢子方式繁殖和高(G+C)mol%的革兰氏阳性细菌。

#### 3.3

##### 酵母菌 yeast

单核的单细胞真菌,以芽殖或裂殖方式行无性生殖,或形成孢子行有性生殖。

#### 3.4

##### 丝状真菌 filamentous fungus

菌丝体发达,不产生肉眼可见子实体的真菌。

#### 3.5

##### 种 species

由表型特征相似、遗传性状相近的菌株组成,并与其他类群的菌株存在明显差异。

#### 3.6

##### 菌株 strain

属于同一个种,但来源不同的单细胞或纯培养的后代。

#### 3.7

##### 纯培养物 pure culture

由单个细胞繁殖而来的培养物。

#### 3.8

##### 纯度检测 purity examination

检测菌种是否为纯培养物的过程。

### 3.9

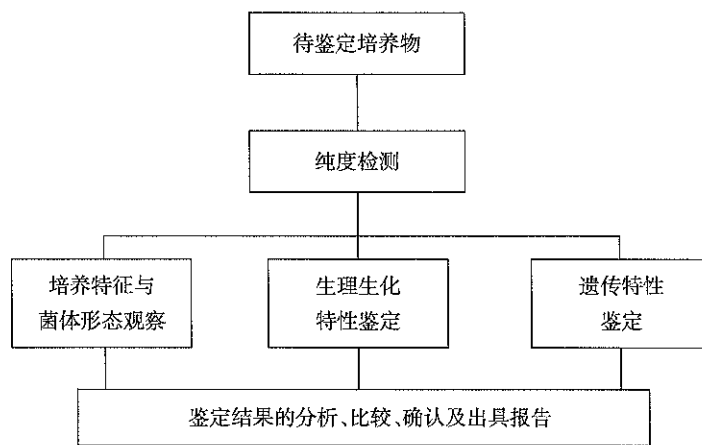
#### 鉴定 identification

根据通用的检索系统,对未知微生物菌株进行性状观察和测定,确定该微生物分类地位的过程。

### 4 鉴定原则

- 4.1 用于鉴定的菌株应为纯培养物。
- 4.2 依据所鉴定菌株的类群和特性,选择相应的鉴定检索系统和鉴定方法。
- 4.3 鉴定结果应与对应的鉴定检索系统或模式菌株性状进行对比,确定菌株的分类地位。

### 5 菌种鉴定常规流程图



### 6 鉴定方法

#### 6.1 纯度检测

##### 6.1.1 菌落形态观察

在适宜培养基平板上,将待鉴定培养物划线或稀释涂布,经适宜条件下培养后,选取划线或稀释涂布分离得到的单菌落,观察其在同一平板上的大小、形状、颜色、质地、光泽等。

##### 6.1.2 菌体形态观察

挑取待鉴定细菌培养物,涂布于载玻片上无菌水滴中,进行简单染色或革兰氏染色,酵母菌和丝状真菌制成水浸片。显微镜下观察菌体形态。

##### 6.1.3 纯度确定

菌落和菌体形态一致者,确定培养物符合要求。

#### 6.2 培养特征观察

##### 6.2.1 细菌菌落特征

将待鉴定培养物划线或稀释涂布于营养肉汤培养基(附录 A.1)或其他适宜的细菌培养基平板上,适宜条件下培养 2 d~5 d 后,观察和记录幼龄和老龄菌落的大小、形状、质地、边缘、隆起、颜色、光泽、透明度等性状。

##### 6.2.2 放线菌培养特征

将待鉴定培养物点植、划线或稀释涂布于适宜的培养基(附录 A.3~A.7)平板上,28℃ 培养 5 d~15 d,观察菌落的大小、形状、表面状况、气生菌丝、基内菌丝的颜色及可溶性色素。

##### 6.2.3 酵母菌培养特征

将待鉴定培养物划线或稀释涂布于麦芽汁琼脂(附录 A. 9)平板上,25℃~28℃培养 3 d~7 d,观察菌落的大小、形状、质地、隆起、边缘、颜色、光泽等性状。

将待鉴定培养物接种于麦芽汁液体培养基中,25℃~28℃培养 3 d,观察是否形成膜、菌环或岛及沉淀。

#### 6.2.4 丝状真菌培养特征

将待鉴定培养物点植或稀释涂布于 PDA 培养基(附录 A. 11)或察氏培养基(附录 A. 8)平板上,25℃~28℃培养 2 d~14 d,观察菌落质地、颜色、生长速度、色素的产生情况、渗出液、菌落背面的颜色等。

### 6.3 菌体形态特征观察

#### 6.3.1 细菌形态特征

挑取在适宜培养基上生长的幼龄培养物,涂片、革兰氏染色,显微镜下观察菌体形状、大小、革兰氏染色反应等;观察芽孢的有无、形态和着生位置。

#### 6.3.2 放线菌形态特征

以斜角将灭菌盖玻片插入将要凝固的培养基中,每个培养皿可插 4~9 片。沿盖玻片与培养基的交接处划线接种放线菌,培养平板正置于 28℃培养 2 d、5 d、7 d、10 d、15 d,定期取出盖玻片,显微镜或扫描电子显微镜下观察气生菌丝、基内菌丝、孢子丝的形态,孢子着生方式、颜色或孢囊着生位置(气丝或基丝)、孢囊的形状。

#### 6.3.3 酵母菌形态特征

将待鉴定培养物接种于麦芽汁液体培养基中,25℃~28℃培养 3 d,挑取一环培养物,制成水浸片,观察细胞大小、形态和无性繁殖方式。在玉米粉琼脂(附录 A. 10)平板上划线接种 2~3 条待鉴定培养物,上覆盖玻片,25℃~28℃培养 3 d~5 d,低倍显微镜下观察划线处是否形成假菌丝。在适宜生孢子培养基上观察孢子的形态特征。

#### 6.3.4 丝状真菌形态特征

将待鉴定培养物接种于 PDA 培养基(附录 A. 11)或察氏培养基(附录 A. 8)平板或斜面上,25℃~28℃培养 2 d~14 d,挑取少量培养物制成水浸片,或采用玻片培养法(附录 B. 1),显微镜下观察菌体形态特征、无性繁殖体和有性繁殖体的形态特征(附录 B. 2)。

### 6.4 生理生化特性鉴定

按附录 C 所列的待鉴定培养物类群,测定对应的生理生化项目。可以利用微生物自动鉴定系统进行鉴定。

### 6.5 遗传特性鉴定

细菌和放线菌进行 16S rDNA 序列分析;酵母菌进行 26S rDNA 中 D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> 区域序列分析或 ITS 序列分析或 18S rDNA 序列分析;丝状真菌进行 ITS 序列分析或 18S rDNA 序列分析。序列测定的扩增引物见附录 D。

## 7 鉴定结果

根据实验结果,对照通用的鉴定系统,确定待鉴定菌株的分类地位。菌种名称采用国际命名规则,使用属名和种加词的拉丁词,并附加中文译名。有异名的应同时标注。

## 8 鉴定报告

菌种鉴定结果报告应列出送检单位、送检时间、样品编号、名称、数量、鉴定操作人签字、鉴定技术负责人签字、鉴定内容、结果及参考文献等信息。采用微生物自动鉴定系统和(或)序列测定的,还应附上原始数据。

## 附录 A

(规范性附录)

## 菌种培养和形态特征观察常用培养基配方

## A.1 营养肉汤培养基

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.0~7.2

## A.2 乳酸细菌培养基(MRS培养基)

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	10.0 g
酵母膏	5.0 g
柠檬酸氢二铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]$	2.0 g
葡萄糖 $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O})$	20.0 g
吐温 80	1.0 g
乙酸钠 $(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O})$	5.0 g
磷酸氢二钾 $(\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$	2.0 g
硫酸镁 $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.58 g
硫酸锰 $(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$	0.25 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	6.2~6.5

## A.3 高氏合成一号琼脂

硝酸钾 $(\text{KNO}_3)$	1.0 g
磷酸氢二钾 $(\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$	0.5 g
硫酸镁 $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.5 g
氯化钠(NaCl)	0.5 g
硫酸亚铁 $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.01 g
可溶性淀粉 $[(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n]$	20.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.2~7.4

## A.4 葡萄糖—天门冬素琼脂

葡萄糖( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ )	10.0 g
天门冬素	0.5 g
磷酸氢二钾( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ )	0.5 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.2~7.4

#### A.5 无机盐淀粉琼脂

可溶性淀粉 $[(C_6H_{10}O_5)_n]$	10.0 g
磷酸氢二钾( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ )	1.0 g
硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	1.0 g
氯化钠(NaCl)	1.0 g
硫酸铵 $[(NH_4)_2SO_4]$	2.0 g
碳酸钙( $CaCO_3$ )	2.0 g
微量元素盐溶液	1.0 mL
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.0~7.4

微量元素盐溶液:

硫酸亚铁( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.1 g
氯化锰( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ )	0.1 g
硫酸锌( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.1 g
蒸馏水	100 mL

#### A.6 燕麦粉琼脂

燕麦片	20.0 g
微量元素盐溶液	1.0 mL
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.2~7.4

微量元素盐溶液:同 A.5。

在 1 000 mL 蒸馏水中煮沸 20.0 g 燕麦片,通过纱布过滤,加微量元素盐溶液,补加蒸馏水至 1 000 mL。

#### A.7 葡萄糖酵母膏麦芽膏琼脂(GYM 琼脂)

葡萄糖( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ )	4.0 g
酵母膏	4.0 g
麦芽提取物	10.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.2~7.4

**A. 8 察氏(Czapeks)培养基**

蔗糖(C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	30.0 g
磷酸氢二钾(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O)	1.0 g
硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.5 g
硝酸钠(NaNO <sub>3</sub> )	3.0 g
氯化钾(KCl)	0.5 g
硫酸亚铁(FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.01 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	6.0~6.5

**A. 9 麦芽汁琼脂培养基**

麦芽提取物	20.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	5.4~6.0

**A. 10 玉米粉琼脂**

玉米粉	12.5 g
琼脂	5.4 g
蒸馏水	300 mL
pH	6.0~6.5

称取玉米粉,加 300 mL 蒸馏水搅匀,60℃热水浴保温 1 h,用滤纸过滤,滤液加水至 300 mL。

**A. 11 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA培养基)**

马铃薯	200 g
葡萄糖(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O)	20.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	6.0~6.5

称取去皮马铃薯 200 g 切块,放入水中煮沸 30 min,用双层纱布过滤取汁,补足水至 1 000 mL。



**附录 B**  
**(资料性附录)**  
**常见丝状真菌的形态特征观察**

**B.1 玻片培养法**

将灭菌的载玻片放入培养皿中,接种丝状真菌孢子,用无菌滴管吸取少量冷却到 45℃左右的马铃薯琼脂培养基,滴加到载玻片的孢子上,盖上灭菌的盖玻片,稍压一下,使培养基成一薄层,适温下培养。如需培养的时间较长,就要注意保湿,防止琼脂培养基过早干燥。保湿的方法是在培养皿中放一张滤纸,用无菌水或 20%的甘油润湿,上面放两根细玻璃棒,载玻片放在玻璃棒上。经过一定的时间培养,取出载玻片,显微镜下观察菌体的形态特征。

**B.2 常见丝状真菌的形态特征观察**

常见丝状真菌的菌体形态特征观察见表 B.1。

**表 B.1 常见丝状真菌的菌体形态特征观察**

类 群	菌体形态特征观察主要内容
根 霉 毛 霉	菌丝分隔、分枝情况、假根的有无、发达程度、着生方式;孢囊梗长短、簇生或单生、分枝的类型;孢囊形状、大小、内含孢囊孢子的数量;囊轴形状、大小、颜色;囊托的有无、形状、大小;孢囊孢子形状、大小;厚垣孢子的有无;接合孢子是同宗还是异宗配合、配囊柄对生或并生、配囊柄形状、大小
曲 霉	菌丝分隔、分枝情况;分生孢子梗着生方式;分生孢子头和顶囊的形状、大小、颜色;瓶梗的层次、颜色;梗基的有无;分生孢子的形状、大小、表面情况(光滑或具不同的纹饰)
青 霉	菌丝分隔、分枝情况;分生孢子梗着生方式、分枝情况;帚状枝的形状;瓶梗、梗基和副枝数目、大小;分生孢子的形状、大小
木 霉	菌丝分隔、分枝情况;分生孢子梗的分枝状态;小梗的形状、大小;分生孢子的形状、大小、色泽;厚垣孢子的有无

附 录 C

(资料性附录)

微生物肥料中常见菌种类群的生理生化特征测定

常见菌种类群的生理生化特征测定见表 C.1。

表 C.1 常见菌种类群的生理生化特征测定

类 群	生理生化特征测定
芽孢杆菌	氧化酶;接触酶;卵磷脂酶;厌氧生长;糖、醇类发酵;V-P 测定;淀粉水解;酪素水解;丙酸盐利用;硝酸盐还原;脲酶水解;吲哚产生;苯丙氨酸脱氨酶;对温度、pH 的需求及耐受性;对盐的耐受性等
乳酸细菌	氧化酶;接触酶;葡萄糖产酸产气;碳水化合物发酵产酸;精氨酸产氨;淀粉水解;七叶灵水解;牛奶的凝固与胨化;硫化氢产生;明胶液化等
根瘤菌	氧化酶;接触酶;碳源利用;BTB 反应;石蕊牛奶反应;营养肉汁生长;苯丙氨酸脱氨酶等
放线菌	碳源利用;细胞壁化学组分分析;明胶液化;淀粉水解;牛奶的凝固与胨化;纤维素分解;硝酸盐还原;硫化氢产生;酪氨酸酶产生;类黑色素产生等
酵母菌	碳源利用;糖类发酵;氮源的同化;在无维生素培养基中的生长情况测定;温度生长试验;尿素分解;脂肪酶分解;明胶液化;石蕊牛奶反应;对盐的耐受性;抗放线菌酮测试等

附 录 D  
(资料性附录)  
常用引物序列

常用引物序列见表 D.1。

表 D.1 常用引物序列

引 物	序 列	扩增产物
27f 1492r	正向 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 反向 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	16S rDNA, 约 1 500 bp
NL-1 NL-4	正向 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' 反向 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	26S rDNA D1/D2, 500 bp~600 bp
ITS1 ITS4	正向 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 反向 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS, 400 bp~700 bp
NS1 NS8	正向 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-5' 反向 5'-TCCGCAGGTTACCTAC-3'	18S rDNA, 约 1 800 bp