

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—xxxx

---

微生物农药 环境风险评价试验准则

**Risk assessment test guidelines for microbial pesticide**

溞类毒性试验

**Daphnia toxicity test**

(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 环境风险评价试验准则》为系列标准，分为 6 部分：

- 第1部分：鸟类毒性试验
- 第2部分：蜜蜂毒性试验
- 第3部分：家蚕毒性试验
- 第4部分：鱼类毒性试验
- 第5部分：溞类毒性试验
- 第6部分：藻类生长影响试验

本部分是NY/T ××××的第5部分。

本部分按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本部分。由中华人民共和国农业部种植业司提出并归口。

本部分起草单位：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 环境风险评价试验准则

## 溞类毒性试验

### 1 范围

本部分规定了微生物农药对溞类毒性试验的材料、条件、试验操作、质量控制、试验报告等的基本要求。

### 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 2.1 微生物农药 microbial pesticides

是以细菌、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、草、鼠等有害生物作用的农药。

#### 2.2 供试物 test substance

试验中需要测试的物质。

#### 2.3 菌落形成单位 colony forming unit, CFU

由单个芽孢、孢子或孢囊萌发形成的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。

#### 2.4 微生物农药的单位 unit of microbial pesticide

几类有代表的微生物农药的单位定义如下：

##### 2.4.1 细菌芽孢、真菌孢子、细菌或原生动物孢囊的单位 unit of 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。

##### 2.4.2 细菌营养体的单位 unit of 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。

##### 2.4.3 真菌菌丝的单位 unit of fungal mycelium

以菌丝体干重 $1.0 \times 10^{-9}$ g为一个计量单位。

##### 2.4.4 原生动物的单位 unit of protozoa

原生动物门各个成员的一个完整的营养体、孢子或孢囊。

#### 2.4.5 病毒的单位 unit of virus

显微镜下一个完整的病毒颗粒或多面体,通常是指能在合适的宿主细胞中形成一个感染单位的实体。

#### 2.5 最大危害暴露量 maximum hazard exposure level

以微生物农药有效成份在环境中对非靶生物的预测暴露量与安全系数的乘积来表示。

#### 2.6 毒性 toxicity

微生物或毒素或破坏宿主的能力,不一定同时发生微生物的感染、复制和生命活动。

#### 2.7 致病性 pathogenicity

微生物感染宿主后,在宿主体内存活及繁衍,对宿主造成损伤或破坏的能力,与宿主的耐受性或敏感性有关。

#### 2.8 半数致死量 median lethal dose or concentration, LD<sub>50</sub> 或 LC<sub>50</sub>

规定时间内,通过指定感染途径,使一定体重或年龄的受试生物半数死亡所需最小微生物数量或毒素量。

#### 2.9 半数感染量 median infective dose or concentration, ID<sub>50</sub> 或 IC<sub>50</sub>

规定时间内,通过指定感染途径,使一定体重或年龄的受试生物半数感染所需最小微生物数量或毒素量。

### 3 试验概述

一定试验条件下,测试供试物对受试蚤的毒性和致病性等影响。首先进行最大危害暴露量试验,将供试物配置成试验药液加入受试蚤培养液中,静态法或半静态法染毒,观察受试蚤中毒死亡或染病情况。当受试蚤试验期间未发生死亡,则无需进行剂量效应试验和致死(病)验证试验;当受试蚤试验期间出现 50% 及以上的个体死亡或致病,则需进行剂量效应试验和致死(病)验证试验。供试物对受试蚤具有致死毒性时以 LC<sub>50</sub> 表示;受试物对受试蚤具有致病性时,以 IC<sub>50</sub> 表示。

### 4 试验方法

#### 4.1 材料和条件

#### 4.1.1 试验生物

推荐使用大型溞 (*Daphnia magna* Straus), 保持良好的培养条件, 使大型溞的繁殖处于孤雌生殖状态。选用实验室条件下培养 3 代以上、出生 24 h 内的非头胎溞。受试溞应来源于同一母系的健康溞, 未表现任何胁迫现象 (如: 死亡率高、出现雄溞和冬卵、头胎延迟、体色异常等)。

#### 4.1.2 供试物

##### 4.1.2.1 类型

包括微生物母药、制剂产品等。

##### 4.1.2.2 批次

应采用同一批次的供试物产品进行试验。当无法使用同一批次产品时, 应在试验报告中记录供试物的批次。

##### 4.1.2.3 计数方法

- (1) 细菌以营养体细胞的 CFU 为计数单位, 可采用平板菌落计数法、荧光定量 PCR 等测定;
- (2) 真菌孢子以 CFU 为计数单位, 可采用平板菌落计数法, 或血球计数板法等测定;
- (3) 真菌菌丝体以  $1.0 \times 10^{-9}$  g 克干重为计数单位, 以称重法等测定;
- (4) 原生动物以个体数目为计数单位, 可采用血球计数板法等测定;
- (5) 病毒以包涵体等感染单位为计数单位, 可采用荧光定量 PCR、血球计数板法、酶联免疫法等测定;
- (6) 其它单位, 根据微生物的类型选择最适当的计数方法。

以上推荐计数方法, 参见附录 A、B、C、D、E。

#### 4.1.3 主要仪器设备

- 超净工作台;
- 灭菌锅;
- 显微镜;
- 解剖镜;
- 分光光度计;
- 聚合酶链式反应仪;

——水质测定仪；  
——温湿度计；  
——玻璃器皿；  
——天平等。

#### 4.1.4 试验条件

溞类的培养、驯化及试验推荐使用重组水，当选择其他水应符合附录 F 的规定。重组水推荐使用 ISO 标准稀释水、Elendt M4 培养液和 Elendt M7 培养液，配置方法见附录 G。试验用水中杂菌微生物总数不高于 100 计数单位/mL。试验期间水质应保持稳定，满足 pH 在 6.0~9.0 之间，溶解氧大于 3 mg/L。对于大型溞，水质硬度（以  $\text{CaCO}_3$  计）在 140 mg/L~250 mg/L 之间，对于其它溞类，可适当降低水质硬度。试验中光照周期（光暗比）为 16h: 8h，光照强度不超过 1000~1500 lux。试验条件在满足溞类生长条件下，应充分保证供试物的生长和活性要求。

## 4.2 试验操作

### 4.2.1 方法的选择

根据供试物特性选择静态试验法或半静态试验法。

### 4.2.2 暴露途径

将供试物按试验设计配置成一定浓度的试验药液加入溞大型溞培养液中，混匀后加入受试溞进行静态法或半静态法染毒。

### 4.2.3 处理组和对照组

试验设置供试物处理组、空白对照组和灭活对照组。每组设置 4 个平行，每个平行 5 只受试溞。

### 4.2.4 效应观察

试验期间每日对受试溞的死亡和异常症状进行观察和记录。轻晃试验容器，溞在 15s 内不能游动视为死亡。

### 4.2.5 试验周期

试验观察时间持续至 21d。如果在试验观察时间末期，处理组受试溞开始出现死亡或明显异常，则要延长暴露时间，直至能够判断供试物对受试溞的最终影响。

#### 4.2.6 最大危害暴露量试验

供试物最大危害暴露量为  $10^6$  单位/mL，或按照微生物农药推荐施用量在 15cm 水体中浓度的 1000 倍计算。两者均能达到时，以较大值作为最大危害暴露量。当供试物剂型、水质等条件限制，供试物溶液浓度不能达到计算值时，可采用供试物在水中能达到的最大量进行试验。试验开始后，每日记录受试蚤的死亡和异常症状。当受试蚤在试验期间未发生死亡，则无需进行剂量效应试验和致死（病）验证试验；当受试蚤在试验期间出现 50% 及以上的个体死亡或致病，则需进行剂量效应试验和致死（病）验证试验。

#### 4.2.7 剂量效应试验

根据最大危害暴露量试验结果，供试物设置 5~7 组系列浓度，将受试蚤按 4.2.2 方法暴露于含不同浓度的供试物的培养液中，试验开始后，每日记录受试蚤的死亡数及异常症状，求出试验结束时供试物对蚤类的  $LC_{50}$  值或  $IC_{50}$  值及其 95% 置信限。

#### 4.2.8 致死（病）验证试验

将用无菌水清洗后的死亡蚤进行组织破碎，然后接种至选择培养基或靶标生物，将培养物置于适宜生长条件下培养，分离纯化疑似菌株，疑似菌株经形态学、生理生化及核酸等方法鉴定并确认为目标菌株后，再以相同暴露途径感染健康的受试蚤，如果受试蚤出现与先前试验相同的病症，则证实目标菌株对蚤类具有致死（病）能力。

### 4.3 数据处理

#### 4.3.1 差异显著性检验

推荐采用独立样本 t 检验或单因子方差分析 (One-Way ANOVA, LSD 检验) 等。显著水平取  $p < 0.05$ （差异显著）； $p < 0.01$ （差异极显著）。

##### 4.3.1.1 独立样本 t 检验

独立样本 t 检验按式 (1)：

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

式中：

$\overline{X}_1, \overline{X}_2$ ——分别为两样本平均数;

$\sigma^2_{x1}, \sigma^2_{x2}$ ——分别为两样本方差;

n——样本容量。

#### 4.3.1.2 One-Way ANOVA 方差分析 (LSD 检验)

LSD 检验按式 (2) :

$$LSD_{\alpha} = t_{\alpha(df_e)} S_{\overline{x_i} - \overline{x_j}} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

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

$S_{\overline{x_i} - \overline{x_j}}$ ——均数差异标准误, 按式 (3) 计算;

$$S_{\overline{x_i} - \overline{x_j}} = \sqrt{2MS_e / n} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$MS_e$ ——F 检验中误差方差均方;

n——各处理重复数。

#### 4.3.2 校正半数致死量或校正半数感染量计算

鱼类校正半数致死量  $LC_{50}$  或校正半数感染量  $IC_{50}$  的计算可采用寇氏法、直线内插法或概率单位图解法估算, 也可应用有关毒性数据计算软件进行分析和计算。

##### 4.3.2.1 寇氏法

用寇氏法可求出鱼类的  $LC_{50}$  值或  $IC_{50}$  及其 95% 置信限。

$LC_{50}$  或  $IC_{50}$  的计算见式 (4):

$$\log LC_{50}(IC_{50}) = X_m - i(\sum P - 0.5) \dots\dots\dots (4)$$

式中:

$X_m$ ——最高浓度的对数;

$i$ ——相邻浓度比值的对数;

$\sum P$ ——各组死亡率的总和 (以小数表示)。

95% 置信限的计算见式 (5):

$$95\% \text{ 置信限} = \log LC_{50}(IC_{50}) \pm 1.96 S \log LC_{50}(IC_{50}) \dots\dots\dots (5)$$



标准误的计算见式 (6):

$$S \log LC_{50}(IC_{50}) = i \sqrt{\sum \frac{pq}{n}} \dots\dots\dots (6)$$

式中:

$p$ ——1 个组的死亡率;

$q$ —— $1-p$ ;

$n$ ——各浓度组受试蚤的数量。

#### 4.3.2.2 直线内插法

采用线性刻度坐标, 绘制试验物质浓度对死亡或致病百分率的曲线, 求出 50%死亡时的  $LC_{50}$  值或  $IC_{50}$  值。

#### 4.3.2.3 概率单位图解法

用半对数纸, 以浓度对数为横坐标, 死亡百分率对应的概率单位为纵坐标绘图。将各实测值在图上用目测法画一条相关直线, 从直线中读出致死 50% 的浓度对数, 估算出  $LC_{50}$  值或  $IC_{50}$  值。

### 4.4 质量控制

- 对照组试验蚤死亡数不超过20%;
- 在20℃条件下, 参比物质重铬酸钾对大型蚤的 $EC_{50}$  (24 h) 应处于0.6 mg/L~2.1 mg/L之间;
- 试验过程中溶解氧大于3mg/L。

## 5 试验报告

试验报告应包括下列内容:

- 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;
- 试验摘要;
- 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);
- 供试生物的名称、来源、大小及饲养情况等;

- 试验条件和方法；
- 试验系统的详细描述；
- 温度、光照、氧含量、pH 等；
- 试验结果；
- 试验结论。

## 附 录 A

### (资料性附录)

#### 平板菌落计数法

##### 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供试物中微生物的数量。

##### A.2 试剂

- 蛋白胨；
- 牛肉膏；
- 氯化钠（NaCl）；
- 氢氧化钠溶液：1 mol/L；
- 盐酸溶液：1 mol/L。
- 葡萄糖；
- 磷酸二氢钾（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ）；
- 硫酸镁（ $\text{MgSO}_4$ ）；
- 琼脂；
- 孟加拉红；
- 蒸馏水；
- 氯霉素。

##### A.3 主要器具

- 高压蒸汽灭菌锅；
- 恒温培养箱；
- 超净工作台；
- 锥形瓶；
- 培养皿：直径9cm；
- 酸度计或pH精密试纸等。

##### A.4 固体培养基平板的制备

###### A.4.1 细菌培养基平板

依次称取蛋白胨 10g、牛肉浸膏 3g、氯化钠 5g、琼脂 15~18g，溶于 900mL 蒸馏水中，

置于电炉上加热，搅拌至完全溶解，加蒸馏水至 1000mL。以 1 mol/L 氢氧化钠溶液或 1mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 7.0~7.2。分装于 500mL 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 真菌培养基平板

依次称取蛋白胨 5g、葡萄糖 10g、磷酸二氢钾 1g、硫酸镁 0.5g，琼脂 15~18g、孟加拉红 0.03g、氯霉素 0.1g，溶于 900mL 蒸馏水中，置于电炉上加热，搅拌至完全溶解，加蒸馏水至 1000mL。分装于 500mL 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. 5 样品的稀释涂布

称取 1.0g 供试物，加入盛有 100ml 无菌水的 500mL 三角瓶中，震荡 10 min，充分使微生物成单细胞分散。用无菌刻度吸管吸取 1mL 上述菌悬液到 9mL 无菌水中，按 10 倍法依次稀释，细菌通常稀释到  $10^{-8}$ ，并选择  $10^{-8}$ ~ $10^{-6}$  用于平板涂布；真菌通常稀释到  $10^{-7}$ ，并选择  $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$  用于平板涂布。吸取 100 $\mu$ 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 30℃ 的培养箱中黑暗培养。

#### A. 6 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：

微生物数量 = 平板菌落平均数  $\times$  稀释倍数  $\times 10$ ，单位 CFU/g

#### A. 7 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。

## 附 录 B

(资料性附录)

## 血球计数板法

### B.1 方法原理

血球计数板法是将少量待测样品的悬浮液置于一种特别的具有确定面积和容积的载玻片上（血球计数板），于显微镜下直接计数，然后推算出数量的一种方法。

### B.2 主要器具

——血球计数板；  
——显微镜；  
——锥形瓶；  
——滴管；  
——载玻片、盖玻片；  
——超净工作台等。

### B.3 样品的制备

供试物用无菌水稀释 100 倍

### B.4 样品的制片

取洁净的血球计数板一块，在计数区上盖上一块盖玻片。将稀释后的供试物悬液摇匀，用滴管吸取少许，从计数板中间平台两侧的沟槽内沿盖玻片的下边缘滴入一小滴，让悬液利用液体的表面张力充满计数区，并用吸水纸吸去沟槽中流出的多余悬液。静置片刻，使微生物沉降到计数板上。在显微镜下进行计数。

### B.5 数量计数

计数时计数区是由 25 个中方格组成，按对角线方位，数左上、左下、右上、右下、中间的 5 个中方格（即 80 小格）的微生物数。为了保证计数的准确性，在计数时，对沉降在格线上微生物的统计应有统一的规定。如微生物位于大方格的双线上，计数时则数上线不数下线，数左线不数右线，以减少误差。即位于本格上线和左线上的微生物计入本格，本格的下线和右线上的微生物按规定计入相应的格中。按下列公式计算：

$$\text{样品浓度 (个/mL)} = N \times 25/5 \times 10 \times 10^3 \times 100$$

其中 N 为：五个中方格的微生物总数

$N \times 25/5 \times 10 \times 10^3$  为：1mL 中的微生物总数

100 为：稀释倍数。

## 附 录 C

(资料性附录)

## 称重法

### C.1 方法原理

供试物在高温条件下，水分挥发，烘干至恒重后测定其质量。

### C.2 主要器具

——烘箱；

——天平；

——离心机；

——抽滤瓶；

——真空泵等；

### C.3 供试物处理

使用离心或过滤处理将供试物中的主要水分去除，并用无菌水洗涤 2~3 次。将处理后的供试物盛入已于 105℃ 下烘至恒重的坩埚中，再将坩埚置于 105℃ 中烘至恒重，测定供试物干重。

### C.4 重量计算

供试物干重= 供试物与坩埚总重- 坩埚重量

## 附录 D

(资料性附录)

## 荧光定量PCR法

### D.1 方法原理

在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过参照标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

### D.2 试验材料

——10×buffer;  
——dNTP;  
——rTaq酶;  
——SYBR Green Supermix;  
——大肠杆菌。  
——DNA片段载体;  
——DNA提取试剂盒等。

### D.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。

### D.4 标准目的基因片段构建

#### D.4.1 目的基因 PCR 产物扩增、纯化与克隆

目的基因 PCR 扩增反应体系如下: 10×buffer 2.5μL; dNTP (10mmol/L) 2 μL;正反引物 0.5μL;rTaq 酶 0.25μL;ddH<sub>2</sub>O 17.25μL;模板 2μL;共计 25μL。PCR 扩增反应程序如下: 94℃ 预变性 3min; 94℃ 30s 变性, 60℃ 45s 退火延伸; 循环 35 次, 最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。最后用琼脂糖凝胶电泳 DNA 试剂盒纯化回收扩增片段。

#### D.4.2 目的基因序列测序及其浓度测定

将目的片段与载体连接, 转化至大肠杆菌中, 挑单克隆菌株, 摇菌。使用试剂盒提取菌株中含目的片段的质粒, 送至测序服务公司进行测序, 确认是否与目的基因片段碱基序列完全一致。将测序正确的含目的片段质粒使用紫外分光光度计测定其浓度, 并使用 ddH<sub>2</sub>O 进行 10 倍梯度稀释至 10~10<sup>8</sup> 拷贝/μL, 于-20℃保存。

### D.5 荧光定量 PCR 反应

采用 20μL 反应体系: 模板 2μL, SYBR Green Supermix 10μL, 正反引物各 0.6μL, ddH<sub>2</sub>O

6.8μ。反应程序为：95℃ 预变性 3min；95℃ 10s 变性，60℃ 30s 退火延伸；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。

#### D.6 标准曲线的建立

将梯度稀释的含目的片段质粒（ $10\sim 10^8$  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。反应后取 PCR 反应液，用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

#### D.7 样品中基因拷贝数的测定及计算

使用基因组提取试剂盒参照使用说明提取样品中总 DNA，直接进行实时荧光定量 PCR 反应。荧光定量反应体系及反应条件同 A.5，反应结束后，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。

#### D.8 参考文献

- [1] NY/T 2743-2015 甘蔗白色条纹病菌检验检疫技术规程 实时荧光定量 PCR 法；
- [2] SN/T 2358-2009 国境口岸炭疽芽胞杆菌荧光定量 PCR 检测方法。

## 附 录 E

（资料性附录）



## 酶联免疫吸附法

### E.1 方法原理

把抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性,将抗原或抗体与某种酶连接成标记抗原或抗体,它既保留了免疫活性,也保留了酶的活性。加入酶反应的底物后,底物被酶催化成有色产物,产物的量与标本中受检测物质的量直接相关,由此进行定性或定量分析。

### E.2 试剂

- 包被缓冲液(pH9.6, 0.05M碳酸盐缓冲液);
- 洗涤缓冲液(pH7.4 PBS);
- 小牛血清蛋白;
- 终止液(2M  $H_2SO_4$ ) ;
- 抗原、抗体和酶标记抗体;
- 底物液: 四甲基联苯胺 (TMB) -过氧化氢尿素溶液;

### E.3 主要器材

- 酶联免疫检测仪;
- 酶标板;
- 移液器;
- 4℃冰箱;
- 37℃恒温培养箱等;

### E.4 操作程序

#### E.4.1 抗原的制备

将供试物(病毒)标准品和样品分别使用灭菌的 PBS 稀释至工作浓度作为抗原。

#### E.4.2 第二抗体

第二抗体采用辣根过氧化物酶结合物,以方阵滴定法测出其与抗血清结合的最佳稀释比例。

#### E.4.3 样品检测

将供试物品或样品使用包被缓冲液稀释后加入酶标板中,每孔 200 $\mu$ L,放置冰箱(4℃)过夜。用 PBS 缓冲液洗三次,每孔加入用含 1%牛血清蛋白的 PBS 稀释的抗血清 200 $\mu$ L,37℃孵育 1 小时,用 PBS 缓冲液洗三次。加入 200 $\mu$ L 稀释的酶标第二抗体球蛋白溶液,孵育 2 小时,再冲洗三次。每孔再加入 200 $\mu$ L TMB-过氧化氢尿素溶液,1 小时后加入 50 $\mu$ L 2M  $H_2SO_4$

终止反应。在酶联免疫检测仪上测定各孔 OD 值（波长 450nm）。

## E. 5 结果分析

### E. 5. 1 计算百分比吸光度值

计算供试物标准品和样品的平均吸光度值，按式（1）分别求得各供试物标准品和样品的百分比吸光度值：

$$A = \frac{S}{S_0} \times 100\% \cdots \cdots \cdots (1)$$

A——百分比吸光度值；

S——供试物标准液或样品液的平均吸光度值；

S<sub>0</sub>——0 PIB/mL 的阴性对照品的平均吸光度值。

### E. 5. 2 结果计算

以百分比吸光度值（算数级）为纵坐标，以供试物标准品溶液浓度（PIB/mL）（对数级）为横坐标，绘制出标准工作曲线。从标准工作曲线上得出试样中相应浓度后乘以相对应的稀释系数获得样品中的实际浓度。

## E. 6 参考文献

[1] NY/T 680-2003 禽白血病病毒 p27 抗原酶联免疫吸附试验方法；

[2] SN/T 2687-2010 进出口淡水产品中微囊藻毒素的检测方法 酶联免疫吸附法。

## 附 录 F

（规范性附录）

合格试验用水的部分化学特性

合格试验用水的化学特性参见表 F.1。

表 D.1 合格试验用水的部分化学特性

物 质	浓 度
颗粒物	<20 mg/L
总有机碳（TOC）	<2 mg/L
游离氨	<1 μg/L
残留氯	<10 μg/L
总有机磷农药	<50 ng/L
总有机氯农药与多氯联苯（PCB）	<50 ng/L
总有机氯	<25 ng/L

附 录 G

(规范性附录)

重组水的配置

表 G.1 给出了 ISO 标准稀释水的配置方法。

表 G.1 ISO 标准稀释水

贮备液（单一物质）		每升 ISO 标准稀释水中贮备液的 加入量/mL
物质	浓度/(mg/L)	
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	11760	25
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	4930	25
NaHCO <sub>3</sub>	2590	25
KCl	230	25
注：配置用水为纯水，如去离子水、蒸馏水或反向渗透水，其电导率< 10 μS/cm。		

## Elendt M4 和 Elendt M7 培养基配制

用超纯水分别配制贮备液I、贮备液II和混合维生素贮备液。制备Elendt培养基时，用贮备液I（含所有微量元素的混合液）制备贮备液II，在使用前最后加入混合维生素贮备液，见表G.2~表G.6。

表G.2 贮备液I的制备（单一物质）

组分名称	水中加入量（mg/L）	组分名称	水中加入量 （mg/L）
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	57190	ZnCl <sub>2</sub>	260
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	7210	CoCl <sub>2</sub> •6 H <sub>2</sub> O	200
LiCl•1H <sub>2</sub> O	6120	KI	65
RbCl	1420	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43.8
SrCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	3040	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11.5
NaBr	320	Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	5000
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	1260	FeSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	1991
CuCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	335	2L Fe-EDTA溶液 <sup>1</sup>	—

<sup>1</sup> Fe-EDTA 溶液：将Na<sub>2</sub>EDTA 和FeSO<sub>4</sub> 单独配制，混合在一起后立即灭菌。

表 G.3 贮备液 II 的制备 (单一物质)

组分名称	将贮备液 I 加入到水中的量 (mL/L)	
	M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.0	0.25
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	1.0	0.25
LiCl	1.0	0.25
RbCl	1.0	0.25
SrCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	1.0	0.25
NaBr	1.0	0.25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	1.0	0.25
CuCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	1.0	0.25
ZnCl <sub>2</sub>	1.0	1.0
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	1.0	1.0
KI	1.0	1.0
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1.0	1.0
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	1.0	1.0
Fe-EDTA溶液	20.0	5.0

表 G.4 常量营养贮备液的制备 (单一物质)

组分名称	水中加入量 (mg/L)	总体积 (mL)
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	293800	1000
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	246600	1000
KCl	58000	1000
NaHCO <sub>3</sub>	64800	1000
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O	50000	1000
NaNO <sub>3</sub>	2740	1000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1430	1000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1840	1000

表 G. 5 Elendt M4 和 Elendt M7 的制备

组分名称		加入贮备液的量 (mL/L)	
		M4	M7
贮备液 II (微量元素混合液)		50	50
常量营养贮备液(单一物质)	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	1.0	1.0
	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.5	0.5
	KCl	0.1	0.1
	NaHCO <sub>3</sub>	1.0	1.0
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> •9H <sub>2</sub> O	0.2	0.2
	NaNO <sub>3</sub>	0.1	0.1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	0.1
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	0.1
混合维生素贮备液		0.1	0.1

表 G. 6 混合维生素贮备液的制备<sup>1</sup>

组分名称	水中加入量 (mg/L)	总体积 (mL) <sup>2</sup>
盐酸硫胺 (维生素B1)	750	1000
氰钴胺 (维生素B12)	10	
钙长石 (维生素H)	7.5	

<sup>1</sup>混合维生素贮备液以 5 mL 分装后冷藏。

<sup>2</sup>三种维生素组分加入水中并标定到 1000 mL。