

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—2016

微生物农药 环境风险评价试验准则

Risk assessment test guidelines for microbial pesticide

蜜蜂毒性试验

Honeybee 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。

2016-XX-XX发布

2016-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2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 环境风险评价试验准则

蜜蜂毒性试验

1 范围

本部分规定了微生物农药对蜜蜂毒性试验的材料、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 1.0×10^{-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对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, LD₅₀/ LC₅₀

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, ID₅₀/IC₅₀

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

在一定试验条件下,测试供试物对试验用蜂的致死毒性和致病性等影响。首先进行最大危害暴露量试验,将试验用蜂通过经口或接触途径暴露于供试物中,每日对试验用蜂的中毒症状、死亡等进行观察和记录。若试验用蜂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;若试验用蜂在试验期间出现 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 试验方法

4.1 材料和条件

4.1.1 试验生物

推荐使用意大利工蜂 (*Apis mellifera* L.)、中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 等。选择羽化 3d 内的幼年工蜂,试验用蜂应来自姐妹蜂王,健康、大小一致。

4.1.2 供试物

4.1.2.1 类型

包括微生物母药、制剂产品。

4.1.2.2 批次

应采用同一批次供试物的产品进行试验。当无法使用另一批次产品时,应在试验报告中记录供试物的批次。

4.1.2.3 计数方法

各类微生物的计数方法如下:

- (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 1.0×10^{-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, 可参见附录 B、C、D、E、F。

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;
- 温度计;
- 玻璃容器;
- 天平等。

4.1.4 试验条件

一般情况下, 试验温度为 $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度为 50%~75%。在进行具体试验时, 还需充分考虑供试物的生长和致病条件。

4.2 试验操作

4.2.1 试验方法

蜜蜂毒性试验包括经口毒性试验方法和接触毒性试验方法, 根据农药登记管理法规及其他规定选择相关方法进行试验。

4.2.2 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等。每组 3 个平行, 每个平行 20 只蜂。考虑微生物的传染性, 各处理组及对照组应避免交叉污染。

4.2.3 效应观察

试验期间每日对受试蜜蜂中毒症状、死亡等进行观察和记录。当蜜蜂不对刺激产生反应时认为蜜蜂已死亡。

4.2.4 试验周期

试验时间持续 14d。如果在试验周期结束时处理组试验蜜蜂开始出现死亡或明显病征，则要延长暴露时间，直至能够判断供试物对试验蜜蜂的最终影响。

4.2.5 最大危害暴露量试验

以 10^8 单位·mL⁻¹或供试物推荐田间施用量的100倍作为最大危害暴露量（两者均能达到时，取较大值作为最大危害暴露量），如由于制剂剂型等条件限制，供试物最大危害暴露量不能达到计算值时，以供试物能配制得到的最大剂量进行试验。不同暴露途径的试验方法见4.2.5.1和4.2.5.2。在14d的试验期间每天记录蜜蜂的中毒症状及死亡数。若试验用蜂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；若试验用蜂在试验期间出现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。

4.2.5.1 经口暴露

将供试物分散在蔗糖溶液中，用以饲喂试验用蜂，饲喂48小时后更换为不含供试物的蔗糖溶液并测定饲料消耗量。

4.2.5.2 接触暴露

将供试物药液点滴在试验用蜂的中胸背板处，并立即将染毒蜜蜂转入试验笼中，用脱脂棉浸泡适量蔗糖水饲喂。

4.2.6 剂量效应试验

根据最大危害暴露量试验结果，按一定梯度设置5~7个供试物处理组，将试验蜜蜂暴露于不同浓度的供试物下，试验开始后，每日对受试蜜蜂的中毒症状、死亡等进行观察和记录。求出试验结束时供试物对蜜蜂的LD₅₀值或ID₅₀值及其95%置信限。

4.2.7 致死（病）验证试验

在无菌条件下解剖死蜂或病蜂，分离感染组织并接种至适合的培养基质中，将培养物置于适宜目标菌株生长条件下培养，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试验用蜂，如果试验用蜂出现与先前试验相同的病症，则证实目标菌株对蜜蜂具有致死（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；

σ^2_{x1} , σ^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）：

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

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；

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

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

式中：

MS_e —F 检验中误差方差均方；

n— 各处理重复数。

4.3.2 校正半数致死量或半数感染量计算

4.3.2.1 寇氏法

用寇氏法可求出 LD_{50} 值或 ID_{50} 及其 95% 置信限。

LD_{50} 或 ID_{50} 的计算按式 (4)：

$$\log LD_{50}(ID_{50}) = X_m - i \left(\sum P - 0.5 \right) \dots\dots\dots (4)$$

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)：

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

标准误的计算见式 (6)：

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

式中：

P ——1 个组的死亡率；

q —— $1-p$ ；

n ——各浓度组试验用蜂的数量。

4.3.2.2 直线内插法

采用线性刻度坐标，绘制供试物浓度对死亡或致病百分率的曲线，求出 50% 死亡时的 LD_{50} 值或 ID_{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 LD_{50} 值或 ID_{50} 值。

4.4 质量控制

质量控制条件包括：

——试验结束时，空白对照组死亡率不得超过 20%。

——实验室应定期（至少每两个月一次）进行参比物质试验，推荐参比物质为乐果。

5 试验报告

试验报告应包括以下内容：

——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）；

——受试生物的名称、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、湿度等；

——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（ KH_2PO_4 ）；
- 硫酸镁（ 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 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 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。按下列计算公式计算：

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

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;ddH₂O 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 ddH₂O 进行 10 倍梯度稀释至 10~10⁸ 拷贝/μL,于-20℃保存。

D.5 荧光定量 PCR 反应

采用 20 μ L 反应体系：模板 2 μ L，SYBR Green Supermix 10 μ L，正反引物各 0.6 μ L，ddH₂O 6.8 μ L。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（10~10⁸ 拷贝/ μ L）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

将供试物标本或样品使用包被缓冲液稀释后加入酶标板中,每孔 200 μL ,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 μL ,37℃

孵育 1 小时，用 PBS 缓冲液洗三次。加入 200μL 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 200μLTMB-过氧化氢尿素溶液，1 小时后加入 50μL 2M H₂SO₄ 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；

S₀—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。