

中华人民共和国农业行业标准

NY 527—2002

光合细菌菌剂

Inoculant of photosynthetic bacteria

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 是规范性附录。

本标准由农业部种植业管理司提出。

本标准起草单位：农业部微生物肥料质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人：姜昕、曹凤明、樊蕙、李力、韩永锋、饶汉东。

光合细菌菌剂

1 范围

本标准规定了光合细菌制剂的分类、技术要求、检验方法、检验规则、标志、包装、运输及贮存。

本标准适用于以紫色非硫细菌(*Purple nonsulfur Bacteria*)中所属的一种或多种光合细菌为菌种,采用有机、无机原料,经发酵培养而成的光合细菌活菌制品。

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。

- GB/T 1250 极限数值的表示方法和判定方法
- GB 4789.3 食品微生物学检验 大肠菌群测定
- GB 7959 粪便无害化卫生标准
- GB/T 8170 数值修约规则
- GB/T 14539.2 复混肥料中砷的测定方法
- GB/T 14539.3 复混肥料中镉的测定方法
- GB/T 14539.4 复混肥料中铅的测定方法
- GB/T 15555.1 固体废物 总铬的测定 二苯碳酰二肼分光光度法
- GB/T 15555.5 固体废物 总汞的测定 冷原子吸收分光光度法
- NY/T 227—1994 微生物肥料
- NY 411—2000 固氮菌肥料
- NY 413—2000 硅酸盐细菌肥料

3 产品分类

3.1 液体菌剂

以有机、无机原料培养液接种光合细菌,经发酵培养而成的光合细菌菌液。

3.2 固体菌剂

由某种固体物质作为载体吸附光合细菌菌液而成。

4 要求

4.1 菌种

生产光合细菌菌剂所使用的菌种,都应经过农业部认定的国家级科研单位的鉴定,包括菌种属及种的学名、形态、生理生化特性及鉴定依据、活性、安全性等完整资料,以杜绝一切植物检疫对象、传染病病原作为菌种生产的产品。

4.2 产品指标

4.2.1 产品技术指标见表1。

表 1 光合细菌菌剂技术指标

项 目	剂 型		
	液 体	粉 剂	颗 粒
外观、气味	紫红色、褐红色、暗红色、棕红色、棕黄色等液体,略有沉淀、略具清淡的腥味	粉末状、略具清淡的腥味	颗粒状、略具清淡的腥味
pH 值	6.0~8.5	6.0~8.5	6.0~8.5
水分/(%)	—	20.0~35.0	5.0~15.0
细度筛余物/(%)			
孔径 0.18 mm	—	≤20.0	—
孔径 1.00 mm~4.75 mm	—	—	≤20.0
有效活菌数/[个/mL(个/g)] ≥	5.0×10 ⁸	2.0×10 ⁸	1.0×10 ⁸
杂菌率/(%) ≤	10.0	15.0	20.0
霉菌杂菌/[10 ⁶ /g(mL)] ≤	3.0	3.0	3.0
有效期	不得低于 6 个月	不得低于 6 个月	不得低于 6 个月
蛔虫卵死亡率/(%) ≥	95		
粪大肠菌群/[个/g(mL)] ≤	100		

注：有效期限在监督部门或仲裁双方认为有必要时才检验。

4.2.2 五种重金属限量指标见表 2。

表 2 五种重金属限量指标

参 数	标 准 极 限
汞及化合物(以 Hg 计)/(mg/kg)	≤5
镉及化合物(以 Cd 计)/(mg/kg)	≤10
铬及化合物(以 Cr 计)/(mg/kg)	≤150
砷及化合物(以 As 计)/(mg/kg)	≤75
铅及化合物(以 Pb 计)/(mg/kg)	≤100

注：液体菌剂可免作重金属检测。

5 抽样

5.1 按每一发酵罐菌液制成的产品为一批,采用随机方法对某一批次或不同批次产品进行抽样检验。抽样过程严格避免杂菌污染。

5.2 抽样工具及用品:抽样前预先准备好无菌塑料袋(或塑料瓶)、金属勺(或量筒)以及剪刀、封口机、封样袋、胶水、抽样封条等。

5.3 抽样方法及抽样数量:在成品库抽样,小包装(2 kg/袋或 2 000 mL/瓶以下)产品以一个包装箱为一件,在同一批次的产品中随机抽取 3 件,每件中抽取 1 袋(或 1 瓶)。大包装(2 kg/袋或 2 000 mL/桶以上)产品一袋(桶)为一件,在同一批次产品中随机抽取 3 件,从每件中取样 1 000 g(mL),并将所取样品混匀,然后装取 3 袋(瓶),每袋不少于 500 g 或每瓶不少于 500 mL。将抽取的同一批次的三份样品分别装入封样袋,贴上抽样封条。一份留被抽样单位,两份交抽样单位。

6 检测方法

6.1 仪器、设备及试剂

6.1.1 仪器、设备

烧杯;酸度计;电子天平;土壤铝盒;恒温干燥箱;干燥器;试验筛:孔径 0.18 mm、1.0 mm 和 4.5 mm;无菌室或洁净工作台;酒精灯;蒸汽消毒器;显微镜;光照培养箱;摇床;恒温培养箱;玻璃仪器;灭菌的螺口试管、1 mL、5 mL、10 mL 移液管、三角瓶、灭菌的 9 cm 平皿、玻璃刮刀。

6.1.2 试剂

无离子水、蒸馏水、无菌水;培养基(见附录 A)。

6.2 外观及气味检验

液体样品装在小烧杯中,固体样品装在白色搪瓷盘中,在明亮光线下进行感官检验。

6.3 pH 值测定

应符合 NY 413—2000 中 7.2.3 的规定。

6.4 水分测定

应符合 NY 413—2000 中 7.2.4 的规定。

6.5 细度检验

应符合 NY 413—2000 中 7.2.5 的规定。

6.6 有效活菌数的测定

有效活菌数的测定见附录 B。

6.7 杂菌率的测定(好氧或兼性厌氧杂菌)

从用来测定有效活菌数且已经过 10 倍系列稀释的样品中,选取 3 个连续适宜稀释度进行杂菌率测定。平板测数法,按 NY/T 227—1994 中 5.2 操作。

6.8 有效期的检验

在产品说明书中标明的有效期到达前三周,按 4.2.1 所列项目对产品进行检验。

6.9 粪大肠菌群值测定

应符合 GB 4789.3 的规定。

6.10 蛔虫卵死亡率测定

应符合 GB 7959 的规定。

6.11 五种重金属测定

6.11.1 砷含量测定

应符合 GB/T 14539.2 的规定。

6.11.2 镉含量测定

应符合 GB/T 14539.3 的规定。

6.11.3 铅含量测定

应符合 GB/T 14539.4 的规定。

6.11.4 铬含量测定

应符合 GB/T 15555.1 的规定。

6.11.5 汞含量测定

应符合 GB/T 15555.5 的规定。

7 检验规则

本标准中产品质量指标合格判定,采用 GB/T 1250 中修约值比较法;数字修约按 GB/T 8170 进行。

7.1 检验分类

7.1.1 出厂检验(交收检验)

产品出厂时,须由生产厂的质量检验部门,按表 4.2.1 规定的技术指标进行检验,检验合格并签发质量合格证的产品,方可出厂。出厂检验时不检有效期。

7.1.2 型式检验(例行检验)

一般情况下,一个季度进行一次。有下列情况之一者,也需要进行型式检验:

- a) 新产品鉴定;
- b) 产品的工艺、材料等有较大更改与变化;
- c) 出厂检验结果与上次型式检验有较大差异时;
- d) 国家质量监督机构进行抽查或产品登记检验。

7.2 判定规则

7.2.1 合格产品

具下列任何一条款者,均为合格产品:

- a) 检验结果全部技术指标都符合标准要求的产品;
- b) 在产品的外观、pH 值、水分、细度等非关键指标检测项目中,有两项(含)以下不符合技术指标,但其他指标符合标准要求;
- c) 产品其有效活菌数符合技术指标,而杂菌率超过标准的规定,但小于标准规定的 2 倍时,在产品的外观、pH 值、水分、细度等非关键指标检测项目中不超过一项不合格者。

7.2.2 不合格产品

具下列任何一条款者,均为不合格产品:

- a) 有效活菌数不符合技术指标;
- b) 杂菌率超过标准规定的 2 倍;
- c) 霉菌杂菌超过标准的规定;
- d) 粪大肠菌群指标不合格;
- e) 蛔虫卵死亡率指标不合格;
- f) 重金属中任一项超标;
- g) 在 pH 值、水分、细度、外观等次要检测项目中,有三项(含)以上不符合技术指标。

8 包装、标识、运输与贮存

应符合 NY 411—2000 中 9.1、9.2、9.3 和 9.4 的规定。

附录 A

(规范性附录)

测定有效活菌数及杂菌率的培养基¹⁾

A.1 有效活菌数测定的培养基配方

溶液 I :

氯化钙(CaCl ₂)	75 mg
乙酸钠	1.6 g
烟酸	40 mg
氯化钠(NH ₄ Cl)	1.5 g
生物素	40 mg
蒸馏水	800 mL
酵母膏	2.0 g
硫胺素	40 mg
氯化镁(MgCl ₂)	200 mg
乙二胺四乙酸铁(EDTA-Fe)溶液	5 mL
微量元素溶液	1 mL

溶液 II :

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	600 mg
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O)	1.18 g
蒸馏水	200 mL

将溶液 I、溶液 II 分别于 121℃ (kg/cm²) 高压灭菌 15 min, 冷却后将溶液 I、溶液 II 混匀。

微量元素溶液:

EDTA-2Na	2.0 g
硼酸(H ₃ BO ₃)	100 mg
氯化锌(ZnCl ₂)	100 mg
高钼酸钠(Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	20 mg
氯化铜(CuCl ₂ · 2H ₂ O)	10 mg
蒸馏水	1 000 mL
硫酸铁(FeSO ₄ · 7H ₂ O)	2.0 g
氯化钴(CoCl ₂ · 6H ₂ O)	100 mg
氯化锰(MnCl ₂ · 4H ₂ O)	100 mg
氯化镍(NiCl ₂ · 6H ₂ O)	20 mg
(Na ₂ SeO ₃)	1 mg
乙二胺四乙酸铁(EDTA-Fe)溶液:	
乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)	20.0 g

1) 有效活菌数测定用培养基 A.1、A.2、A.3 三种培养基均适用于紫色非硫细菌(*Purple nonsulfur Bacteria*)中所属的一种或多种光合细菌, 无特殊要求者, 均应选用本培养基。

硫酸铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2 有效活菌数测定的培养基配方

蛋白胨	3.0 g
酵母膏	3.0 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
氯化钙(CaCl_2)	0.3 g
蒸馏水	1 000 mL
pH	6.8

A.3 有效活菌数测定的培养基配方

乙酸钠	1 640 mg
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	200 mg
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	900 mg
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	600 mg
氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	75 mg
乙二胺四乙酸(EDTA)	20 mg
硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	1 320 mg
硫酸铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	11.8 mg
微量元素溶液	1 mL
无离子水	1 000 mL
pH	6.8
微量元素溶液:	
硼酸(H_3BO_3)	280 mg
硝酸铜 $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$	4 mg
高钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	75 mg
硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	210 mg
硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	24 mg
无离子水	100 mL

A.4 肉汤培养基(测好氧或兼性厌氧细菌杂菌)

牛肉膏	3.0 g
琼脂	18 g~20 g
蛋白胨	10.0 g
蒸馏水	1 000 mL
氯化钠(NaCl)	5.0 g
pH	7.0~7.2

A.5 马丁培养基(测霉菌数)

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.0 g
葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10.0 g

1%孟加拉红水溶液	3.3 mL
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.5 g
蛋白胨	5.0 g
琼脂	18 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL

每 1 000 mL 培养基中加入 0.1 g 氯霉素共同灭菌。

附录 B
(规范性附录)
有效活菌数的测定

B.1 有效活菌数的测定步骤(MPN5 管法)

B.1.1 用无菌移液管吸取待测样品 10.0 mL 或称取固体样品 10.0 g, 加入到带玻璃珠的装有 90 mL (固体需 100 mL) 无菌水的三角瓶中, 放置于摇床上充分振荡 30 min, 摇床转速为 200 r/min, 这样得到 $1:10^1$ 稀释的菌悬液。

B.1.2 用无菌移液管吸取 5.0 mL 上述菌悬液加入到装有 45 mL 无菌水的三角瓶中, 充分振荡摇匀, 得到 $1:10^2$ 稀释的菌悬液, 依此方法制成 $1:10^3$ 、 $1:10^4$ 、 $1:10^5$ 、 $1:10^6$ 、 $1:10^7$ 、 $1:10^8$ 、 $1:10^9$ 、 $1:10^{10}$ ……稀释的菌悬液。

B.1.3 用 1 mL 无菌移液管分别吸取 $1:10^6$ 、 $1:10^7$ 、 $1:10^8$ 、 $1:10^9$ 、 $1:10^{10}$ 五个稀释度的菌悬液 1 mL (每个稀释度应更换无菌移液管), 加入到预先制备好的盛有 9 mL 无菌培养基的螺口管中, 每一稀释度重复接 5 支试管, 接种后立即拧紧塑料帽并摇匀。每个待测样品要同时接种 25 支盛有培养基的螺口试管 (5 个稀释度, 每一稀释度接种 5 支螺口试管)。

B.1.4 将以上已接种的螺口试管连同 5 支盛有无菌培养基的对照管置于光照培养箱内, 连续光照培养, 光强 1 000 lx~3 000 lx, 并保持 $28^{\circ}\text{C}\sim 32^{\circ}\text{C}$, 培养期间要经常转动螺口试管, 以使光照均匀, 培养 10 d~12 d 后, 统计出现光合细菌生长的 (培养液颜色应符合 4.2.1) 试管数。

B.2 有效活菌数的计算

根据出现光合细菌生长的阳性试管数, 查表“MPN(最大可能数), MPN 表”(见表 B.1) 即可计算出光合细菌的有效活菌数, 以亿个/mL 或亿个/g 表示。

计算方法: 利用式(A.1)计算原菌液的最大可能数。

$$1 \text{ mL(g) 样品中的菌数} = \text{菌数近似值} \times \text{数量指标第一位数的稀释倍数} \dots\dots (\text{A.1})$$

例如, 某批菌剂测得的光合细菌的结果是, 接种 $1:10^8$ 稀释度的 5 支试管全部出现生长, 接种 $1:10^9$ 稀释度的 5 支试管中有 2 支试管为阳性, 接种 $1:10^{10}$ 稀释度的 5 支试管全部为阴性, 即检验结果为 5-2-0, 查表得知相当于第一稀释管 1 mL 的最大可能数(MPN)为 4.9, 则该被测菌剂含菌数为 4.9×10^8 个/mL(g)。

当实际应用时, 应包含所有试管都生长的稀释倍数直到全部都不生长的稀释倍数, 因此, 要选择适宜的 5 个连续稀释倍数的稀释液进行接种。在这些稀释倍数中, 如何求 MPN 值, 可作如下处理:

- a) 在全部 5 支试管中均出现生长的稀释度中, 把出现生长的稀释度倍数最高的那一级放入数列。例如: 为 5-5-3-0-0 时, 则取 5-3-0 数列。
- b) 在全部 5 支试管中均不出现生长的稀释度中, 把稀释度倍数最低的那一级放入数列。例如: 为 5-3-0-0-0 时, 则取 5-3-0 数列。
- c) 如果应用上述两条规则, 会出现采用如 5-5-4-3-0 这样的 4 个等级的稀释度的情况。此时, 可先取前面的 5-4-3 数列, 后取 4-3-0 数列, 分别求出 $\lg\text{MPN}$, 然后算出其真数的平均值。在此列中, 数列 5-4-3 的 $\lg\text{MPN}$ 为 1.447, 数列 4-3-0 的 $\lg\text{MPN}$ 为 0.431+1 (后一数列与前一数列相应稀释了 10 倍, 故要加 1 进行校正), $(1.447+1.431)/2=1.439$, 所以 $\text{MPN}=27.5$ 。

若待测样品中光合细菌的含量较低, 而 $1:10^6$ 、 $1:10^7$ 、 $1:10^8$ 、 $1:10^9$ 、 $1:10^{10}$ 五个稀释度的菌悬液不适宜测定, 则可选则稀释倍数低的菌悬液接种测定。

表 B.1 MPN,lgMPN 表(10 倍稀释,5 支试管中各接种 1 mL)

阳性试管数			MPN (相当于第一 稀释管 1 mL)	lgMPN	阳性试管数			MPN (相当于第一 稀释管 1 mL)	lgMPN
第一 稀释管	第二 稀释管	第三 稀释管			第一 稀释管	第二 稀释管	第三 稀释管		
0	0	0	0	—	5	0	1	3.1	0.491
0	1	0	0.18	0.255—1	5	1	0	3.3	0.519
1	0	0	0.20	0.301—1	5	1	1	4.6	0.663
1	1	0	0.40	0.602—1	5	2	0	4.9	0.690
2	0	0	0.45	0.653—1	5	2	1	7.0	0.845
2	0	1	0.68	0.833—1	5	2	2	9.5	0.978
2	1	0	0.68	0.833—1	5	3	0	7.9	0.898
2	2	0	0.93	0.968—1	5	3	1	11.0	1.041
3	0	0	0.78	0.892—1	5	3	2	14.0	1.146
3	0	1	1.1	0.041	5	4	0	13.0	1.114
3	1	0	1.1	0.041	5	4	1	17.0	1.230
3	2	0	1.4	0.146	5	4	2	22.0	1.342
4	0	0	1.3	0.114	5	4	3	28.0	1.447
4	0	1	1.7	0.230	5	5	0	24.0	1.380
4	1	0	1.7	0.230	5	5	1	35.0	1.544
4	1	1	2.1	0.322	5	5	2	54.0	1.732
4	2	0	2.2	0.342	5	5	3	92.0	1.964
4	2	1	2.6	0.415	5	5	4	160.0	2.204
4	3	0	2.7	0.431	5	5	5	>180.0	>2.255
5	0	0	2.3	0.362					

中华人民共和国农业
行业标准
光合细菌菌剂
NY 527—2002

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

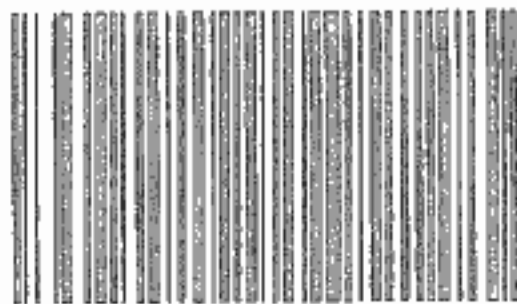
电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 19 千字
2002年12月第一版 2002年12月第一次印刷
印数 1—600

书号: 155066·2-14833 定价 12.00 元
网址 www.bzcb.com

版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



NY 527-2002