

ICS 65.100.01
B 13



中华人民共和国国家标准

GB 20287—2006

农用微生物菌剂

Microbial inoculants in agriculture

2006-05-25 发布

2006-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 产品分类	1
5 要求	1
5.1 菌种	1
5.2 产品外观(感官)	1
5.3 产品技术指标	1
6 试验方法	3
6.1 仪器、设备	3
6.2 试剂	3
6.3 产品参数的检测	3
7 检验规则	5
7.1 抽样	5
7.2 检验分类	6
7.3 判定规则	6
8 包装、标识、运输和贮存	6
8.1 包装	6
8.2 标识	6
8.3 运输	7
8.4 贮存	7
附录 A(规范性附录) 常用检测培养基	8
附录 B(资料性附录) 常用染色剂	11
附录 C(规范性附录) 稀释法(MPN 5 管法)	12
附录 D(规范性附录) 酶活的测定	14

前 言

本标准的 5.1、5.3、第 8 章为强制性条款,其余为推荐性条款。

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

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

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、中国农业科学院土壤肥料研究所。

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

农 用 微 生 物 菌 剂

1 范围

本标准规定了农用微生物菌剂(即微生物接种剂)的术语和定义、产品分类、要求、试验方法、检验规则、包装、标识、运输和贮存。

本标准适用于农用微生物菌剂类产品。

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—1989 极限数值的表示方法和判定方法

GB/T 8170 数值修约规则

GB 18877—2002 有机-无机复混肥料

GB/T 19524.1 肥料中粪大肠菌群的测定

GB/T 19524.2 肥料中蛔虫卵死亡率的测定

QB/T 1803—1993 工业酶制剂通用试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

农用微生物菌剂 **microbial inoculants in agriculture**

目标微生物(有效菌)经过工业化生产扩繁后加工制成的活菌制剂。它具有直接或间接改良土壤、恢复地力,维持根际微生物区系平衡,降解有毒、有害物质等作用;应用于农业生产,通过其中所含微生物的生命活动,增加植物养分的供应量或促进植物生长、改善农产品品质及农业生态环境。

4 产品分类

按内含的微生物种类或功能特性分为根瘤菌菌剂、固氮菌菌剂、解磷类微生物菌剂、硅酸盐微生物菌剂、光合细菌菌剂、有机物料腐熟剂、促生菌剂、菌根菌剂、生物修复菌剂。

产品按剂型分为液体、粉剂、颗粒型。

5 要求

5.1 菌种

生产用的微生物菌种应安全、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。生产者应提供菌种安全性评价资料。采用生物工程菌,应具有允许大面积释放的生物安全性有关批文。

5.2 产品外观(感官)

粉剂产品应松散;颗粒产品应无明显机械杂质、大小均匀、具有吸水性。

5.3 产品技术指标

5.3.1 农用微生物菌剂产品的技术指标见表1,其中有机物料腐熟剂产品的技术指标按表2执行。

表 1 农用微生物菌剂产品的技术指标

项 目	剂 型		
	液 体	粉 剂	颗 粒
有效活菌数(cfu) ^a /(亿/g 或 亿/mL) ≥	2.0	2.0	1.0
霉菌杂菌数/(个/g 或 个/mL) ≤	3.0×10 ⁶	3.0×10 ⁶	3.0×10 ⁶
杂菌率/(%) ≤	10.0	20.0	30.0
水分/(%) ≤	—	35.0	20.0
细度/(%) ≥	—	80	80
pH 值	5.0~8.0	5.5~8.5	5.5~8.5
保质期 ^b /月 ≥	3	6	

a 复合菌剂,每一种有效菌的数量不得少于 0.01 亿/g 或 0.01 亿/mL;以单一的胶质芽胞杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)制成的粉剂产品中有效活菌数不少于 1.2 亿/g。

b 此项仅在监督部门或仲裁双方认为有必要时检测。

表 2 有机物料腐熟剂产品的技术指标

项 目	剂 型		
	液 体	粉 剂	颗 粒
有效活菌数(cfu)/(亿/g 或 亿/mL) ≥	1.0	0.50	0.50
纤维素酶活 ^a /(U/g 或 U/mL) ≥	30.0	30.0	30.0
蛋白酶活 ^b /(U/g 或 U/mL) ≥	15.0	15.0	15.0
水分/(%) ≤	—	35.0	20.0
细度/(%) ≥	—	70	70
pH 值	5.0~8.5	5.5~8.5	5.5~8.5
保质期 ^c /月 ≥	3	6	

a 以农作物秸秆类为腐熟对象测定纤维素酶活。

b 以畜禽粪便类为腐熟对象测定蛋白酶活。

c 此项仅在监督部门或仲裁双方认为有必要时检测。

5.3.2 农用微生物菌剂产品中无害化指标见表 3。

表 3 农用微生物菌剂产品的无害化技术指标

参 数	标准极限
粪大肠菌群数/(个/g 或 个/mL) ≤	100
蛔虫卵死亡率/(%) ≥	95
砷及其化合物(以 As 计)/(mg/kg) ≤	75
镉及其化合物(以 Cd 计)/(mg/kg) ≤	10
铅及其化合物(以 Pb 计)/(mg/kg) ≤	100
铬及其化合物(以 Cr 计)/(mg/kg) ≤	150
汞及其化合物(以 Hg 计)/(mg/kg) ≤	5

6 试验方法

6.1 仪器、设备

- 6.1.1 生物显微镜。
- 6.1.2 恒温培养箱。
- 6.1.3 恒温干燥箱。
- 6.1.4 超净工作台或洁净室。
- 6.1.5 电子天平(或精密天平)。
- 6.1.6 摇床。
- 6.1.7 蒸汽灭菌锅。
- 6.1.8 试验筛。
- 6.1.9 酸度计。

6.2 试剂

- 6.2.1 无离子水、无菌水(或生理盐水)、蒸馏水。
- 6.2.2 检测用培养基:按附录 A 的规定执行。
- 6.2.3 染色试剂:参见附录 B。

6.3 产品参数的检测

6.3.1 外观(感官)的测定

取少量样品放到白色搪瓷盘(或白色塑料调色板)中,仔细观察样品的颜色、形状、质地。

6.3.2 有效活菌数的测定

采用平板计数法,根据所测微生物的种类选用适宜的培养基。

若采用稀释法[最大可能数(MPN)5管法],按附录 C 的规定执行。

6.3.2.1 系列稀释

称取样品 10 g(精确到 0.01 g),加入带玻璃珠的 100 mL 无菌水(或生理盐水)中[液体菌剂取 10.0 mL 加入 90 mL 无菌水(或生理盐水)中],静置 20 min,在旋转式摇床上 200 r/min 充分振荡 30 min,即成母液菌悬液(基础液)。

用无菌移液管分别吸取 5.0 mL 上述母液菌悬液,加入 45 mL 无菌水(或生理盐水)中,按 1→10 进行系列稀释,分别得到 1→ 1×10^1 、1→ 1×10^2 、1→ 1×10^3 、1→ 1×10^4 ……稀释的菌悬液(每个稀释度应更换无菌移液管)。

6.3.2.2 加样及培养

每个样品取 3 个连续适宜的稀释度,用无菌移液管分别吸取不同稀释度菌悬液 0.1 mL,加至预先制备好的固体培养基平板上,分别用无菌玻璃刮刀将不同稀释度的菌悬液均匀地涂于琼脂表面。

每一稀释度重复 3 次,同时以无菌水(或生理盐水)作空白对照,于适宜的条件下培养。

6.3.2.3 菌落识别

根据所检测菌种的技术资料,每个稀释度取不同类型的代表菌落通过涂片、染色、镜检等技术手段确认有效菌。当空白对照培养皿出现菌落数时,检测结果无效,应重做。

6.3.2.4 菌落计数

以出现 20 个~300 个菌落数的稀释度的平板为计数标准(丝状真菌为 10 个~150 个菌落数),分别统计有效活菌数目和杂菌数目。当只有一个稀释度,其平均菌落数在 20 个~300 个之间时,则以该平均菌落数计算。若有两个稀释度,其平均菌落数均在 20 个~300 个之间时,应按两者菌落总数之比决定。若其比值小于等于 2 应计算两者的平均数;若大于 2 则以稀释度小的菌落平均数计算。有效活菌数按式(1)或式(2)计算:

$$n_m = \frac{\bar{x}kV_1}{m_0V_2} \times 10^{-8} \dots\dots\dots(1)$$

$$n_v = \frac{\bar{x}kV_1}{V_0V_2} \times 10^{-8} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- n_m ——质量有效活菌数,单位为亿每克(亿/g);
- \bar{x} ——菌落平均数,单位为个;
- k ——稀释倍数;
- V_1 ——基础液体积,单位为毫升(mL);
- m_0 ——样品量,单位为克(g);
- V_2 ——菌悬液加入量,单位为毫升(mL);
- n_v ——体积有效活菌数,单位为亿每毫升(亿/mL);
- V_0 ——样品量,单位为毫升(mL)。

6.3.3 霉菌杂菌数的测定

采用马丁培养基,测定方法同 6.3.2。

6.3.4 杂菌率的测定

除样品有效菌外其他的菌均为杂菌。样品中杂菌率按式(3)计算,数值以%表示:

$$m = \frac{n_1}{n_1 + n} \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- m ——样品杂菌率,%;
- n_1 ——杂菌数,单位为亿每克(亿/g)或亿每毫升(亿/mL);
- n ——有效活菌数,单位为亿每克(亿/g)或亿每毫升(亿/mL)。

6.3.5 水分的测定

将空铝盒置于干燥箱中 105℃±2℃烘干 0.5 h,冷却后称量记录空铝盒的质量。然后称取 2 份平行样品(颗粒型样品,应先粉碎过 1.0 mm 试验筛),每份 20 g(精确到 0.01 g),分别加入铝盒中并记录质量。将装好样品的铝盒置于干燥箱中 105℃±2℃下烘干 4 h~6 h。取出置于干燥器中冷却 20 min 后进行称量。水分含量按式(4)计算(结果为两次测定的平均值),数值以%表示:

$$w = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \dots\dots\dots(4)$$

式中:

- w ——样品水分含量,%;
- m_1 ——样品和铝盒的质量,单位为克(g);
- m_2 ——烘干后样品和铝盒的质量,单位为克(g);
- m_0 ——空铝盒的质量,单位为克(g)。

6.3.6 细度的测定

6.3.6.1 粉剂样品

称取样品 50 g(精确到 0.1 g),放入 300 mL 烧杯中,加 200 mL 水浸泡 10 min~30 min 后倒入孔径 0.18 mm 的试验筛中,然后用水冲洗,并用刷子轻轻地刷筛面上的样品,直至筛下流出清水为止。将试验筛连同筛上样品放入干燥箱中,在 105℃±2℃烘干 4 h~6 h。冷却后称量筛上样品质量。样品细度按式(5)计算,数值以%表示:

$$s = \left[1 - \frac{m_1}{m_0(1-w)} \right] \times 100 \dots\dots\dots(5)$$

式中:

- s ——筛下样品质量分数, %;
 m_1 ——筛上干样品质量, 单位为克(g);
 m_0 ——样品质量, 单位为克(g);
 w ——样品含水量, (%)。

6.3.6.2 颗粒样品

称取样品 50 g(精确到 0.1 g), 将两个不同孔径的试验筛(1.0 mm 和 4.75 mm)擦在一起放在底盘上(大孔径试验筛放在上面)。样品倒入大孔径试验筛内筛样品, 然后称小孔径试验筛上的样品质量。颗粒细度按式(6)计算, 数值以%表示:

$$g = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots(6)$$

式中:

- g ——样品质量分数, %;
 m_1 ——小孔径试验筛上样品质量, 单位为克(g);
 m_0 ——样品质量, 单位为克(g)。

6.3.7 pH 值的测定

打开酸度计电源预热 30 min, 用标准溶液校准。

pH 值的测定, 每个样品重复三次, 计算三次的平均值。

6.3.7.1 液体样品

用量筒取 40 mL 样品放入 50 mL 的烧杯中, 直接用酸度计测定, 仪器读数稳定后记录。

6.3.7.2 粉剂样品

称取样品 15 g, 放入 50 mL 的烧杯中, 按 1+2(样品+无离子水)的比例将无离子水加到烧杯中(如果样品含水量低, 可根据基质类型按 1+3~1+5 的比例加无离子水), 搅拌均匀。然后静置 30 min, 测样品悬液的 pH 值, 仪器读数稳定后记录。

6.3.7.3 颗粒样品

样品先研碎过 1.0 mm 试验筛, 按照 6.3.7.2 的方法测定执行。

6.3.8 粪大肠菌群数的测定

应符合 GB/T 19524.1 的规定。

6.3.9 蛔虫卵死亡率的测定

应符合 GB/T 19524.2 的规定。

6.3.10 纤维素酶活、蛋白酶活的测定

应符合附录 D 的规定。

6.3.11 砷、镉、铅、铬、汞的测定

应符合 GB 18877—2002 中的 5.12~5.17 的规定。

6.3.12 保质期的检验

在产品说明书标明的保质期前, 按 6.3.1~6.3.11 测定产品相应指标。

7 检验规则

本标准中产品技术指标的数字修约应符合 GB/T 8170 的规定; 产品质量合格判定应符合 GB/T 1250—1989 中修约值比较法的规定。

7.1 抽样

按每一发酵罐菌液(或每批固体发酵)加工成的产品为一批, 进行抽样检验, 抽样过程严格避免杂菌污染。

7.1.1 抽样工具

无菌塑料袋(瓶)、金属勺、抽样器、量筒、牛皮纸袋、胶水、抽样封条及抽样单等。

7.1.2 抽样方法和数量

一般在成品库中抽样,采用随机法抽取。

抽样以件为单位,小包装以每一包装箱为一件。随机抽取3件~5件,每件中随机抽取一袋(瓶);若每袋(瓶)包装小于500g(或500mL)的产品,应多抽几件。大包装产品以一袋(桶)为一件,随机抽取5件~10件,在无菌条件下,每件取样500g(或500mL),然后将抽取样品混匀,按四分法分装3袋(瓶),每袋(瓶)不少于500g(或500mL)。

7.2 检验分类

7.2.1 出厂检验

7.2.1.1 产品出厂时,应由生产厂的质量检验部门,按产品标准规定逐批进行检验,检验合格并签发质量合格证的产品,方可出厂。出厂检验时不检保质期。

7.2.1.2 出厂检验项目为5.2和5.3.1规定的各个项目,但不包括保质期。

7.2.2 型式检验

7.2.2.1 有下列情况之一者,应进行型式检验。

- a) 新产品鉴定时;
- b) 产品的工艺、材料等有较大更改与变化时;
- 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时。

7.2.2.2 型式检验项目为5.2和5.3规定的各个项目。

7.3 判定规则

7.3.1 具下列任何一条款者,均为合格产品

- a) 检验结果各项技术指标均符合标准要求的产品;
- b) 在产品的外观、水分、细度、pH值等检测项目中,有一项不符合要求,而其他各项技术指标符合要求的。

7.3.2 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) 霉菌杂菌数不符合技术指标;
- c) 杂菌率不符合技术指标;
- d) 粪大肠菌群不符合技术指标;
- e) 蛔虫卵死亡率不符合技术指标;
- f) 砷、镉、铅、铬、汞中任一含量不符合技术指标;
- g) 有机物料腐熟剂产品中所测酶活不符合技术指标;
- h) 在外观、水分、细度、pH值等检测项目中,有两项(含)以上不符合要求。

8 包装、标识、运输和贮存

8.1 包装

根据不同产品剂型选择适当的包装材料、容器、形式和方法,以满足菌剂产品包装的基本要求。

产品包装中应有产品合格证和使用说明书,在使用说明书中标明使用范围、方法、用量及注意事项等内容。

8.2 标识

标识所标注的内容,应符合国家法律、法规的规定。

8.2.1 产品名称及商标

应标明国家标准、行业标准已规定的产品通用名称,商品名称或者有特殊用途的产品名称,可在产品通用名下以小一号字体予以标注。

国家标准、行业标准对产品通用名称没有规定的,应使用不会引起用户、消费者误解和混淆的商品名称。

企业可以标注经注册登记的商标。

8.2.2 产品规格

应标明产品在每一个包装物中的净重,并使用国家法定计量单位。标注净重的误差范围不得超过其明示量的 $\pm 5\%$ 。

8.2.3 产品执行标准

应标明产品所执行的标准编号。

8.2.4 产品登记证号

应标明有效的产品登记证号。

8.2.5 生产者名称、地址

应标明经依法登记注册并能承担产品质量责任的生产者名称、地址、邮政编码和联系电话。进口产品可以不标生产者的名称、地址,但应当标明该产品的原产地(国家/地区),以及代理商或者进口商或者销售商在中国依法登记注册的名称和地址。

8.2.6 生产日期或生产批号

应在生产合格证或产品包装上标明产品的生产日期或生产批号。

8.2.7 保质期

用“保质期____个月(或若干天、年)”表示。

8.3 运输

运输过程中有遮盖物,防止雨淋、日晒及高温。气温低于 0°C 时采取适当措施,以保证产品质量。轻装轻卸,避免包装破损。严禁与对微生物菌剂有毒、有害的其他物品混装、混运。

8.4 贮存

产品应贮存在阴凉、干燥、通风的库房内,不得露天堆放,以防日晒雨淋,避免不良条件的影响。

附 录 A
(规范性附录)
常用检测培养基

A.1 营养琼脂

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 值	7.2~7.5

A.2 阿须贝氏(Ashby)培养基

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.2 g
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2 g
氯化钠(NaCl)	0.2 g
碳酸钙(CaCO ₃)	5.0 g
甘露醇(C ₆ H ₁₄ O ₆)	10.0 g
硫酸钙(CaSO ₄ ·2H ₂ O)	0.1 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	6.8~7.0

A.3 根瘤菌培养基

磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	0.5 g
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2 g
氯化钠(NaCl)	0.1 g
甘露醇(C ₆ H ₁₄ O ₆)	10.0 g
酵母膏	1.0 g
0.5%刚果红	5.0 mL
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	6.8~7.0

A.4 硅酸盐细菌培养基

蔗糖(C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	5.0 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	2.0 g
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.5 g
碳酸钙(CaCO ₃)	0.1 g
三氯化铁(FeCl ₃ ·6H ₂ O)	0.005 g

琼脂	18 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	7.5~8.0

A.5 固氮(茎瘤)根瘤菌培养基

乳酸钠($C_3H_5O_3Na$)	10.0 g
磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	1.67 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.87 g
氯化钠($NaCl$)	0.05 g
氯化钙($CaCl_2$)	0.04 g
三氯化铁($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.004 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1 g
酵母膏	1.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	6.8~7.0

A.6 马丁(Martin)培养基

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.0 g
葡萄糖($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	10.0 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 g
蛋白胨	5.0 g
1%孟加拉红水溶液	3.3 mL
氯霉素	0.1 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:上述各成分加入蒸馏水溶解后,再加孟加拉红水溶液;另用少量乙醇溶解氯霉素,加入培养基中,分装后灭菌。

A.7 高氏合成一号琼脂

硝酸钾(KNO_3)	1.0 g
磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	0.5 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 g
氯化钠($NaCl$)	0.5 g
硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01 g
可溶性淀粉($C_6H_{10}O_5$) _n	20.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	7.2~7.4

制法:先将淀粉用少量水加热溶解,再与其他成分混合。

A.8 联合固氮菌培养基

D-葡萄糖酸钠($C_6H_{11}O_7Na$)	5.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.4 g

磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	0.1 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 g
酵母膏	1.0 g
氯化钠(NaCl)	0.1 g
氯化钙($CaCl_2$)	0.02 g
三氯化铁($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.01 g
钼酸钠($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.002 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	6.8~7.0

A.9 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)

马铃薯	200 g
葡萄糖($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	20.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

制法:称取去皮马铃薯 200 g,切块煮沸 30 min,然后用纱布过滤取汁,再加葡萄糖及琼脂,溶化后补足水至 1 000 mL,121℃灭菌 30 min。

A.10 乳酸细菌培养基(MRS)

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	10.0 g
酵母膏	5.0 g
柠檬酸氢二铵 $[(NH_4)_2HC_6H_5O_7]$	2.0 g
葡萄糖($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	20.0 g
吐温 80	1.0 mL
乙酸钠($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)	5.0 g
磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	2.0 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.58 g
硫酸锰($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.25 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	6.2~6.6

A.11 光合细菌培养基

酵母粉	3.0 g
蛋白胨	3.0 g
硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 g
氯化钙($CaCl_2$)	0.3 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	6.8~7.0

附 录 B
(资料性附录)
常用染色剂

B.1 革兰氏染色剂

B.1.1 结晶紫染色液(Hucker氏配方)

甲液:结晶紫(crystal violet)	2.0 g
乙醇(95%)	20.0 mL
乙液:草酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$	0.8 g
蒸馏水	80.0 mL

甲、乙两液相混,过滤,棕色瓶保存。

B.1.2 卢哥(Lugol)氏碘液

碘(I ₂)片	1.0 g
碘化钾(KI)	2.0 g
蒸馏水	300 mL

先溶碘化钾于少量蒸馏水中,再将碘溶于碘化钾溶液中,可稍加热,最后加足蒸馏水,棕色瓶保存。

B.1.3 脱色液

95%的乙醇液。

B.1.4 复染液[0.5%的番红水溶液(safranin O)]

2.5%的番红酒精溶液	20 mL
蒸馏水	80 mL

B.2 芽胞染色液

B.2.1 孔雀绿染色液(malachite green)

孔雀绿	5.0 g
蒸馏水	100 mL

B.2.2 0.5%番红染色液

B.3 石碳酸复红染色液

甲液:碱性复红(basic fuchsin)	0.3 g
95%酒精	10.0 mL
乙液:石碳酸(phenoecrystals C. P)	5.0 g
蒸馏水	95 mL

将甲、乙两液混合后即得石碳酸复红染色液原液。染色时,将原液稀释5倍~10倍使用。

附 录 C
(规范性附录)
稀释法(MPN 5 管法)

C.1 稀释

称取样品 10.0 g,加入带玻璃珠的 100 mL 的无菌水中(液体菌剂取 10.0 mL 加入 90 mL 的无菌水中),静置 20 min,在旋转式摇床上 200 r/min 充分振荡 30 min,即得到 1×10^1 稀释度的菌悬液。

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 稀释度的菌悬液,依此方法制成 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 ……稀释度的菌悬液(每个稀释度应更换无菌移液管)。

C.2 加样

选择适宜的 5 个连续稀释度,用无菌移液管分别吸取不同稀释度的菌悬液 1.0 mL,加到已准备好的盛有 9.0 mL 无菌培养基的螺口试管中,每一稀释度重复接 5 支试管(不同稀释度间更换无菌移液管),同时用无菌培养液作对照。

C.3 培养

接种后立即拧紧塑料帽并摇匀,将接种好的试管放到适宜的条件下培养。

C.4 计算

根据各稀释系列试管中有无待测微生物生长或其生理反应的正或负得出数量指标,并在相应的 MPN 统计表中查出近似值(见表 C.1),即可计算出待测样品的有效活菌数,以亿个/mL 或亿个/g 表示。

计算方法:

$1 \text{ mL(或 } 1 \text{ g) 样品中的有效活菌数} = \text{菌数近似值} \times \text{数量指标第一位数的稀释倍数}$

C.5 计数规则

在稀释系列中必须最后一个稀释度所有重复间都没有微生物生长。确定数量指标系取稀释系列中所有重复都有生长(或是正反应)的最高稀释度为数量指标的第一位数字,总共取三个连续稀释管的结果查表。

C.5.1 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;

C.5.2 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.5.3 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 lgMPN,然后算出其真数的平均值。在此列中,数列 5-4-3 的 lgMPN 为 1.447,数列 4-3-0 的 lgMPN 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), $(1.447+1.431) \div 2 = 1.439$,所以 $MPN = 27.5$ 。

表 C.1 MPN、lgMPN 表

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

附录 D
(规范性附录)
酶活的测定

D.1 纤维素酶活的测定**D.1.1 原理**

用羧甲基纤维素钠盐(CMC)作底物,经纤维素酶水解后生成还原糖;3,5-二硝基水杨酸(DNS)是一种氧化剂,能与还原糖作用,使硝基还原成氨基,溶液变为橙色,橙色的深度与还原糖的浓度成正比。因此,可采用比色法求得还原糖的含量,进而从还原糖的数量来求得纤维素酶活的大小。

D.1.2 试剂和溶液

- a) 磷酸钠缓冲液(0.2 mol/L, pH6.0):将 0.2 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)12.3 mL 和 0.2 mol/L 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)87.7 mL 混合即得。
- b) CMC 缓冲液:准确称取 0.625 g 羧甲基纤维素钠盐,溶于 100.0 mL 磷酸钠缓冲液,加热搅拌使之溶解。
- c) DNS 显色剂:称取 10.0 g 3,5-二硝基水杨酸溶于蒸馏水中,加入 20.0 g 氢氧化钠、200.0 g 酒石酸钾钠和 500.0 mL 水,加热溶解后再加入重蒸酚 2.0 g、无水亚硫酸钠 0.5 g 待全部溶解后冷却,定容至 1 000.0 mL。
- d) 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准葡萄糖溶液:准确称取 25.0 mg 葡萄糖,用蒸馏水定容至 25.0 mL。

D.1.3 仪器、设备

- a) 分光光度计;
- b) 电子天平;
- c) 振荡器;
- d) 培养箱。

D.1.4 标准曲线绘制

取 5 支大试管,按表 D.1 用吸管准确吸取标准葡萄糖溶液与磷酸钠缓冲液混匀,即得各种不同浓度的标准葡萄糖液。

表 D.1 不同浓度标准葡萄糖液的制备

试管号	标准葡萄糖溶液/mL	磷酸钠缓冲液/mL	试管中葡萄糖量/ μg
1	0	5.0	0
2	0.4	4.6	400
3	0.8	4.2	800
4	1.6	3.4	1 600
5	3.2	1.8	3 200

每管中各加 3.0 mL DNS 显色液,摇匀后置于沸水浴中准确加热 5.0 min 后,流水冷却,摇匀后于 490 nm 处测定各管的 OD 值,以葡萄糖的微克数为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制标准曲线。

D.1.5 原样酶液的制备

称取样品 10.0 g(或 10.0 mL),加入装有玻璃珠的三角瓶中,再加入一定体积的蒸馏水稀释,静置 20 min,200 r/min 振荡 30 min,然后四层纱布过滤,滤液 3 000 r/min 离心 10 min。离心后的上清液根据酶活力稀释至适当浓度,即为原样酶液,供测试用。

D.1.6 测定步骤

取3支大试管,1支作为空白对照,其余2支作为平行样品管。样品管中加1.0 mL原样酶液,然后3支试管中分别加入4.0 mL已预热至60℃的CMC缓冲液,在60℃的水浴锅中反应20 min取出,每管立即加入3.0 mL DNS显色液,摇匀后在对照管中再加入1.0 mL原样酶液。将3支试管放入沸水浴中,显色5 min后立即取出,流水冷却,用分光光度计于490 nm处测其OD值。

D.1.7 纤维素酶活计算

根据标准曲线将测得的OD值换算成葡萄糖微克数,按式(D.1)计算酶活力:

$$U = k \times \frac{m_1 - m_0}{20} \dots\dots\dots (D.1)$$

式中:

U——样品的酶活,单位为微克每克($\mu\text{g/g}$)或微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

k——样品稀释倍数;

m_1 ——样品葡萄糖量,单位为微克(μg);

m_0 ——对照葡萄糖量,单位为微克(μg);

20——酶与底物反应时间,单位为分钟(min)。

1 mL原样酶液,1 min产生1 μg 葡萄糖定义为1个酶活力单位(U)。

D.2 蛋白酶活的测定**D.2.1 定义**

1 mL原样酶液,在一定条件下,1 min水解酪素产生1 μg 酪氨酸为1个酶活力单位(U)。

D.2.2 试验方法

应符合QB/T 1803—1993中A3.2的规定,其中对A3.2.4.2具体操作中修改如下:

a) 原样酶液的制备

称取样品10.0 g(或10.0 mL),加入装有玻璃珠的三角瓶中,再加入一定体积的磷酸缓冲液,静置20 min,200 r/min振荡30 min,然后四层纱布过滤,滤液于3 000 r/min离心10 min。离心后的上清液根据酶活力用缓冲液稀释至适当浓度,即为原样酶液,供测试用。

b) 测定

在具体测定中有两点改变:一是温浴反应时间由10 min改为30 min;二是原静止10 min过滤改为3 000 r/min离心5 min取上清液。