

## 前 言

本标准在原有标准 NY/T 227—1994《微生物肥料》的基础上,对其中的硅酸盐细菌肥料部分进行修改。

主要修改内容如下:

——增加术语、抽样和判定规则部分。在检验方法中增加允许差;

——在技术要求中删除成品无害化指标。

本标准自生效之日起,同时代替 NY/T 227—1994 中的硅酸盐细菌肥料部分。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 都是标准的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

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、中国农业科学院土壤肥料研究所。

本标准主要起草人:李慧荃、吴观以、李元芳、葛诚、沈德龙。

# 中华人民共和国农业行业标准

## 硅酸盐细菌肥料

NY 413—2000

Silicate bacteria fertilizer

### 1 范围

本标准规定了硅酸盐细菌肥料产品的分类、技术要求、试验方法、检验规则、包装、标识、运输与贮存。

本标准适用于能释放钾、磷与灰分元素,改善作物营养条件的有益微生物发酵制成的活体微生物肥料制品。

### 2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 1250—1989 极限数值的表示方法和判定方法

GB/T 6543—1996 瓦楞纸箱

NY 411—2000 固氮菌肥料

NY/T 227—1994 微生物肥料

### 3 定义

本标准采用下列定义。

#### 3.1 硅酸盐细菌肥料

在土壤中通过其生命活动,增加植物营养元素的供应量,刺激作物生长,抑制有害微生物活动,有一定的增产效果。

### 4 产品分类

按剂型不同分为:液体菌剂、固体菌剂和颗粒菌剂。

### 5 技术要求

#### 5.1 菌种

非致病菌,能在含钾的长石粉、云母及其他矿石的无氮培养基上生长,菌体内和发酵液中存在钾及刺激植物生长的激素物质。

5.1.1 菌种用胶冻样芽胞杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)的一个变种菌株或环状芽胞杆菌(*B. cirulans*)及其他经过鉴定用于硅酸盐细菌肥料生产的菌种,严格控制各种遗传工程微生物菌种(GEM)的使用。凡用本标准以外的菌种必须经过鉴定。

5.1.2 菌体大小为 $4\sim 7\ \mu\text{m}\times 1\sim 1.2\ \mu\text{m}$ ,长杆状,两端钝圆,胞内常有1~2个大脂肪颗粒,革兰氏染色呈阴性,有荚膜,有椭圆形芽胞。

中华人民共和国农业部 2000-12-22 批准

2001-04-01 实施

5.1.3 在无氮培养基上生长的菌落粘稠,富有弹性,呈圆形,边缘整齐、光滑、有光泽,隆起度大,无色透明。

5.1.4 在牛肉膏蛋白胨培养基上基本不生长。

5.2 成品技术指标(见表1)

表1 成品技术指标

项 目 \ 剂 型	液 体	固 体	颗 粒
外观	无异臭味	黑褐色或褐色粉状,湿润、松散,无异臭味	黑色或褐色颗粒
水分,%	—	20.0~50.0	<10.0
pH 值	6.5~8.5	6.5~8.5	6.5~8.5
细度筛余物,% 孔径 0.18 mm	—	≤20	—
孔径 5.0 mm~2.5 mm	—	—	≤10
有效期内有效 活菌数,10 <sup>8</sup> /mL(g)	5	1.2	1.0
杂菌率 <sup>1)</sup> ,% ≤	5.0	15.0	15.0
有效期 <sup>2)</sup> ,月 ≥	3	6	6
1) 其中包括 10 <sup>-6</sup> 马丁培养基平板上无霉菌。 2) 此项仅在监督部门或仲裁检验双方认为有必要时才检测。			

## 6 抽样

按每一发酵罐菌液制成的产品为一批,逐批抽样检验。抽样过程要严格避免杂菌污染。

### 6.1 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、剪刀、封口机、牛皮纸封样袋、标签、抽样封条和胶水。

### 6.2 抽样数量及抽样方法

在成品库抽样,可按“∴”形分层设点抽取,抽样以件为单位,小包装产品以一个包装箱为一件。大包装(30~50 kg)产品一袋(一桶)为一件。抽样件数由样品基数的大小确定。1~10 件全部抽样;11~200 件抽取 10 件;201~400 件抽取 20 件。样品基数大于 400 件者,按超过部分的 2%增加抽样件数。总件数不要超过 40 件。

每件小包装产品抽取一小袋,在无菌条件下每袋取样 200 g。然后将所有的样品混匀,按四分法缩到 2 000 g,分装 4 袋,封口。每 2 袋为一份装入牛皮纸封样袋。最后贴上抽样标签和抽样封条。液体产品每件吸取 10 mL,一同放入无菌三角瓶中,混匀后,分成两份,每份 250 mL。一份留存被抽样单位,一份交检测中心检测。

## 7 检验方法

### 7.1 仪器设备及试剂

#### 7.1.1 仪器设备

- 生物显微镜(10×100);
- 菌落计数器;
- 恒温培养箱;

恒温干燥箱；  
 恒温摇床；  
 灭菌锅；  
 无菌室或超净工作台；  
 酸度计；  
 试管： $\phi 15\text{ mm} \times 150\text{ mm}$ 、 $\phi 18\text{ mm} \times 180\text{ mm}$ ；  
 培养皿：直径 9 cm；  
 三角瓶：500 mL、150 mL；  
 无菌吸管：1、2、5、10 mL；  
 玻璃刮刀；  
 滤纸；  
 酒精灯；  
 天平（千分之一）；  
 标准筛：孔径 0.18 mm、2.5 mm、50.0 mm；  
 1 号羊毛画笔；  
 无菌水；  
 无离子水。

#### 7.1.2 试剂（见附录 A）

### 7.2 成品检验

#### 7.2.1 气味检验

取硅酸盐细菌肥料样品打开包装，进行感观检验。

#### 7.2.2 外观检验

将固体硅酸盐细菌肥料包装打开，装在白色搪瓷盘中，将液体硅酸盐细菌肥料摇匀，在明亮光线下进行感观检验。

#### 7.2.3 pH 值测定

液体型样品：用 50 mL 量筒取 40.0 mL 样品放入 50 mL 烧杯中，直接在酸度计上测定，记下每个试样的 pH 值。每个样品重复三次。

粉末型、颗粒型样品：称取样品 15.0 g，放入 50 mL 烧杯中，按 1：2（样品和无离子水）的比例用 50 mL 量筒量取 30 mL 无离子水，加入到放有样品的烧杯中（样品含水量低于百分之一，可按 1：3~5 的比例加无离子水）。将每个样品搅拌 1 min，静止 30 min 后测样品 pH。每个样品重复 3 次。取平均值，精确到十分之一位。颗粒型样品应先磨碎过 1 mm 筛，步骤和粉末型相同。

#### 7.2.4 含水量测定

称取固体型菌肥三份，每份 20.0 g，精确到 0.01 g，放入已称恒重的铝盒中。置 105℃ 干燥箱内烘烤 4 h，移至干燥器内，冷却后称重。根据烘干前后质量差计算含水量。取三个样品测定数的平均值。平行样品绝对偏差应低于 1%。

含水量按式(1)计算：

$$\text{含水量}(\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中： $m_0$ ——烘干前样品的质量，g；

$m_1$ ——烘干后样品的质量，g。

#### 7.2.5 细度测定

准确称取粉末型样品 50.0 g，放入 300 mL 烧杯中，加 250 mL 的自来水浸泡 5 min，将浸泡好的样品倒入 0.18 mm 的筛上，用自来水冲洗（冲洗时严防样品溅出），在冲洗过程中，用刷子轻轻地刷，直至

流下清水为止。将筛子连同筛上样品放到烘箱中,在 105℃ 下烘 4 h。冷却后称筛上样品。

筛上样品百分含量按式(2)计算,样品通过 0.18 mm 孔径筛子的百分数按式(3)计算:

$$\text{筛上样品}(\%) = \frac{\text{筛余物干重} \div (1 - \text{样品含水百分数})}{\text{样品质量}} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

注:筛上样品的百分数不得 > 20%。

$$\text{样品通过 } 0.18 \text{ mm 孔径筛子的百分数} = 1 - \text{筛上样品百分数} \dots\dots\dots(3)$$

颗粒样品通过筛子测量时,不须水浸泡,将孔径 5.0 mm 和 2.5 mm 两筛擦在一起,大孔径在上,一次通过。筛上物须 < 10%。

#### 7.2.6 有效活菌数和杂菌数的测定

平板测数法,采用选择培养基(见附录 B),按 NY/T 227—1994 中 5.2 执行。

##### 7.2.6.1 测定步骤

准确称取待测样品 10.0 g,加入带玻璃珠的 100 mL 的无菌水中(500 mL 的三角瓶),如是液体菌剂取 10~20 mL 加入 90~180 mL 的无菌水。静置 20 min 后,室温下在旋转式摇床上以 200 r/min 充分振荡 30 min,即制成母液。

系列稀释:用 10 mL 无菌吸管吸取 5 mL 振荡均匀的母液,加到 45 mL 无菌水中,混匀成 1:10 的菌悬液,用 5 mL 无菌吸管吸取 5 mL 1:10 的菌悬液于另一只装有 45 mL 无菌水的三角瓶中,混匀后成 1:1×10<sup>-2</sup> 的菌悬液,逐级稀释,分别得到 1:1×10<sup>-3</sup>、1:1×10<sup>-4</sup>、1:1×10<sup>-5</sup> 等系列稀释度菌悬液,稀释时每个稀释度必须更换无菌吸管。

加样:用 1 mL 或 0.5 mL 无菌吸管分别吸取不同稀释度菌悬液 0.1 mL,加至直径为 9 cm 平皿的硅酸盐细菌培养基表面,用无菌刮刀将菌悬液均匀涂于整个琼脂表面。每个样品取三个连续适宜的稀释度,每个稀释度加样时必须更换无菌吸管,每一稀释度重复 3 次,同时用加无菌水的空白作对照。

培养:加样后将平板用无菌纸包好,放入 28~30℃ 培养箱中培养 48 h。

菌落计数:根据所检测的样品的有关技术资料,通过染色、镜检等技术确认有效菌的菌落形态、染色反应和个体形态后,分别统计有效菌数目和杂菌数目。当空白对照每平皿出现菌落数大于 4 时,检测结果无效,须重做。

每个稀释倍数取 5~10 个菌落的菌体,涂片染色(见附录 A、附录 B),显微镜观察识别后,取菌落为 30~300 个的平板计数。统计出同一稀释度三个平皿上菌落平均数。

有效活菌数按式(4)计算:

$$\begin{aligned} \text{菌剂含菌数}(\text{个/g}) &= \text{菌落平均数} \times \text{稀释倍数} \\ &\times \frac{\text{母液菌悬液的体积}(\text{mL})}{\text{菌剂克数或毫升数}} \times \frac{1}{\text{加样量}(\text{mL})} \dots\dots\dots(4) \end{aligned}$$

杂菌是指样品所含有效活菌数以外的其他种类微生物的总称。目前所用的细菌微生物肥料中,其杂菌数为马丁培养基上出现的霉菌数与选择培养基上出现的杂菌数(霉菌除外)之和。选择培养基上出现的杂菌数目可由检测样品有效活菌数的菌落计数时得出。

##### 7.2.6.2 霉菌数测定

将 10<sup>-2</sup> 或 10<sup>-3</sup> 稀释度菌悬液 0.1 mL 加到马丁培养基的平板上(操作步骤同 7.2.6.1),在 28℃ 培养 48 h。杂菌率按式(5)计算:

$$\text{杂菌率}(\%) = \frac{\text{杂菌数}}{\text{有效菌数} + \text{杂菌数}} \times 100 \dots\dots\dots(5)$$

霉菌数的上限要求:拌种用的菌剂,霉菌数不得超过每克或每毫升 10×10<sup>4</sup> 个;非拌种用菌剂中霉菌数不得超过每克或每毫升 30×10<sup>5</sup> 个。杂菌数是指在选择培养基上,除有效活菌外的其他的菌落数与马丁培养基上霉菌数之和。用马丁培养基测霉菌时取 10<sup>-4</sup> 稀释度的菌悬液测定。28℃ 培养。

##### 7.2.7 有效期的检验

在产品说明书中标明的有效期到达前 10 d 测定成品各项指标的方法按 7.2.1~7.2.6,达到标准要

求为有效期合格。

## 8 检验规则

### 8.1 检验分类

#### 8.1.1 产品出厂检验

产品交货时进行的检验。

#### 8.1.2 产品型式检验

新产品鉴定或国家质检机构质量监督检验。

### 8.2 检验项目

型式检验项目按 5.2 执行。出厂检验时不检有效期。

### 8.3 判定规则

#### 8.3.1 合格产品：

- a) 检验结果符合 5.2 所规定的技术指标的产品为合格产品；
- b) 杂菌率不符合指标,但小于本标准规定的 2 倍时,在  $10^{-3}$  马丁培养基平板上无霉菌出现,其他各项指标符合,也可判为合格产品；
- c) 在 pH 值、水分、吸附剂颗粒细度、外观和气味等次要检测项目中,有两项不符合技术指标,但活菌数及杂菌率符合指标要求,也可判为合格产品。

#### 8.3.2 不合格产品：

- a) 硅酸盐细菌活菌数不符合技术指标,判为不合格产品；
  - b) 杂菌率超过本标准规定的 2 倍,判为不合格产品；
  - c) 在  $10^{-6}$  马丁培养基平板上出现霉菌判为不合格产品；
  - d) 在 pH 值、水分、细度、外观等次要检测项目中,有三项不符合技术指标,判为不合格产品。
- 8.3.3 含有植物促生根际细菌(PGPR)的硅酸盐细菌肥料产品,检测时只测硅酸盐细菌数量,不测植物促生根际细菌的数量,也不视其为杂菌。

8.3.4 本标准中质量指标合格判断,采用 GB/T 1250 中修约值比较。

## 9 包装、标识、运输和贮存

### 9.1 包装

#### 9.1.1 内包装

液体肥料小包装用塑料瓶或玻璃瓶,大包装用塑料桶。固体肥料用不透明聚乙烯塑料袋包装。颗粒硅酸盐细菌肥料亦可用编织袋包装。冻干菌剂用玻璃指形管真空干燥。

#### 9.1.2 外包装

外包装采用纸箱,纸箱质量应符合 GB/T 6543 要求。箱外用尼龙打包带加固。

9.1.3 每箱(袋)产品中附有产品合格证和使用说明书,在使用说明中标明使用方法、用量及注意事项。

### 9.2 标识、运输和贮存

硅酸盐细菌肥料的标识、运输和贮存按 NY 411—2000 中 9.2、9.3 和 9.4 执行。



附 录 A  
(标准的附录)  
染色剂和染色方法

### A1 染色液配制

#### A1.1 石碳酸复红染色液

甲液: 碱性复红	0.30 g
95%酒精	10.0 mL
乙液: 石碳酸	5.0 g
蒸馏水	95.0 mL

将甲、乙两液混合, 稀释 5~10 倍使用。

#### A1.2 美兰染色液(次甲基蓝)

甲液: 美兰	0.30 g
95%酒精	30 mL
乙液: 氢氧化钾	0.01 g
蒸馏水	100.0 mL

将甲、乙两液混合即成。

#### A1.3 孔雀绿染色液

孔雀绿	5.0 g
蒸馏水	100.0 mL

#### A1.4 番红染色液

番红	2.50 g
95%酒精	100.0 mL

取上述番红酒精液 10 mL, 与 90 mL 蒸馏水混匀, 成为稀番红稀释液。

#### A1.5 碱性复红[0.5%(m/V)]

碱性复红	0.50 g
95%酒精	100.0 mL

### A2 菌体染色方法

取一小滴无菌水于干净的载玻片上, 用接种环蘸取少许菌苔或菌液, 与水混合涂成均匀的薄层, 在空气中自然干燥。手持载玻片一端迅速通过酒精灯火焰 2~3 次固定。加石碳酸复红或美兰染色液一滴, 染色约 1 min, 用自来水轻轻冲洗染料, 用吸水纸吸净玻片多余的水, 干燥、镜检。

### A3 荚膜染色方法

制片同 A2。石碳酸复红染 1 min 后, 水洗, 用吸水纸吸去水分, 自然风干, 在载玻片一端加一滴墨汁, 用吸水纸推向另一端, 涂布成一薄层, 干燥后镜检。染色结果, 背景黑色, 菌体红色, 菌体外包一层透明圈, 即为荚膜。也可以加石碳酸复红染色 1 min, 水洗, 干燥后镜检。染色结果, 菌体红色, 包围一层不着色的部分就是荚膜。

### A4 芽胞染色方法

制片同 A2。加孔雀绿染色液 3~5 滴于涂片上, 酒精灯火焰加热至冒气, 但不沸腾, 并随时补加染色液, 维持涂片处不干, 染色约 5~10 min, 自来水冲洗 30 s。用 0.05% 碱性复红或 0.5% 番红染色 1 min, 水洗, 镜检。染色结果, 芽胞绿色, 菌体红色。

**A5 革兰氏染色法****A5.1 染色剂****A5.1.1 结晶紫染色液**

甲液：结晶紫	2.0 g
95%酒精	20 mL
乙液：草酸铵	0.80 g
蒸馏水	80 mL

甲、乙液相混，静置 48 h 后使用。

**A5.1.2 卢哥(Lugol)氏碘液**

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

先取少量(3~5 mL)蒸馏水溶解碘化钾，再投入碘片，待碘全溶后，加水 100 mL，配成母液，使用时加 2 倍水，稀释成卢哥氏碘液。

**A5.1.3 脱色剂：95%酒精。****A5.1.4 复染液：0.5%番红水溶液。**

2.5%番红酒精溶液	20 mL
蒸馏水	80 mL

**A5.2 染色方法****A5.2.1 制片。****A5.2.2 滴加结晶紫液，覆盖 1 min。****A5.2.3 用水冲净结晶紫，风干(或吹干)。****A5.2.4 滴加碘液，覆盖 1 min。****A5.2.5 用水冲去碘液，用吸水纸吸去水分，风干(吹干)。****A5.2.6 加 95%酒精数滴，并轻轻摇动进行脱色，30 s 后水洗，吸去水分，风干(或吹干)。****A5.2.7 番红染色液染色 1~2(或更长)min 后，自来水冲洗。干燥、镜检。****A5.3 染色结果**

革兰氏阳性菌体呈紫色，阴性菌体呈红色。

**附 录 B**

(标准的附录)

**有效活菌数和杂菌含量测定用培养基****B1 硅酸盐细菌有效活菌数测定的培养基配方**

蔗糖	5.0 g
磷酸氢二钠(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.0 g
硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	0.5 g
碳酸钙(CaCO <sub>3</sub> )	0.1 g
氯化铁(FeCl <sub>3</sub> )	0.005 g
玻璃粉	1.0 g
蒸馏水	1 000 mL
琼脂	18~20 g
pH	7.0



**B2 马丁培养基(测霉菌数)**

磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.0 g
硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.5 g
葡萄糖( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	10.0 g
蛋白胨	5.0 g
1%孟加拉红酒精(无水)溶液	3.3 mL
琼脂	18~20 g
蒸馏水	1 000 mL

临用时每 100 mL 培养基中加 1% 的链霉素溶液 0.3 mL (30 mg/kg), 或每 1 000 mL 培养基中加入 0.1 g 氯霉素共同灭菌。

**附 录 C**

(标准的附录)

**硅酸盐细菌发酵液中全钾含量测定方法——火焰光度法****C1 原理**

火焰光度计是测量某种待测元素通过火焰激发出光谱能量强度的仪器。将样品制备成简单的溶液, 用压缩空气使溶液喷成雾状, 与乙炔或其他可燃气体混合后燃烧。溶液中的钾、钠等离子则发出其特殊的发射明线光谱, 用滤光板分离选择后, 由光电池把火焰发出的光能变成光电流, 再由检流计量出电流大小。光电流的大小与溶液里该元素的含量是呈正相关的, 再从同样条件下测定的标准溶液所作的曲线上查出相对应的浓度而定量。

**C2 氯化钾标准曲线的绘制**

准确称取经 105℃ 烘干 4~6 h 的分析纯氯化钾 1.583 0 g, 溶于蒸馏水中, 定容至 1 000 mL 摇匀, 即为 1 000 mg/kg 氯化钾基准溶液, 将此溶液稀释成 100 mg/kg, 用其配制 2、4、6、8、10、15、20 mg/kg 氯化钾标准溶液系列各 50 mL (或 250 mL), 用火焰光度计测定出电流读数。在方格纸上以电流计读数为纵坐标, 以氯化钾浓度为横坐标, 绘成标准曲线。

**C3 测定步骤**

培养液成分是: 葡萄糖( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 5.0 g, 硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.5 g, 碳酸钙( $\text{CaCO}_3$ ) 0.1 g, 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 42.0 g, 氯化铁( $\text{FeCl}_3$ ) 0.005 g, 钾长石粉(玻璃粉、含钾的矿石粉) 1.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。将上述培养液 100 mL 装 250 mL 三角瓶中, 121℃ 灭菌 30 min。冷却后接种硅酸盐细菌菌悬液。在 28℃ 200 r/min 摇床培养 4 d 后, 将培养物全部转移至蒸发皿中, 在水浴上浓缩到 10 mL 左右, 加入 6% (V/V)  $\text{H}_2\text{O}_2$  少许, 继续蒸煮, 同时不断搅动, 如此反复处理, 直到硅酸盐细菌粘液消失为止。加水过滤到 100 mL 容量瓶中, 定容后, 用火焰光度计进行钾的测定。根据电流读数, 在标准曲线上即可查出硅酸盐细菌解钾( $\text{K}_2\text{O}$ ) 数。结果表示, 每 100 mL 发酵液含氧化钾( $\text{K}_2\text{O}$ ) 的数量以 mg/kg 表示。数值保留小数点后两位。