

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY 411—2000

固 氮 菌 肥 料

Azotobacter fertilizer

2000-12-22 发布

2001-04-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

中华人民共和国农业
行业标准
固氮菌肥料
NY 411—2000

*

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 23 千字
2001年4月第一版 2001年4月第一次印刷
印数 1—800

*

网址 www.bzcbs.com

*

科目 565—506

版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

前 言

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

主要修改内容如下:

——在技术要求中删除成品无害化指标;

——在检验方法中增加允许差,并增加抽样和判定规则。

本标准自实施之日起,同时代替 NY/T 227—1994 中的固氮菌肥料部分。

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:李元芳、吴观以、李慧荃、葛诚、沈德龙。

中华人民共和国农业行业标准

固 氮 菌 肥 料

NY 411—2000

Azotobacter fertilizer

1 范围

本标准规定了固氮菌肥料产品的分类、技术要求、检验方法、检验规则、包装、标识、运输、贮存等。

本标准适用于含有益的固氮菌、能在土壤和多种作物根际中固定空气中的氮气,供作物氮素营养,又能分泌激素刺激作物生长的活体制品。本标准也适用于以固氮菌为主的含有能促进固氮、生长的植物促生根际细菌(PGPR)的复合固氮菌肥料。

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 625—1989 化学试剂 硫酸
- GB/T 629—1997 化学试剂 氢氧化钠
- GB/T 1250—1989 极限数值的表示方法和判定方法
- GB/T 6543—1986 瓦楞纸箱
- GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法

3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 自生固氮菌

在土壤里能固定空气中的氮,供作物氮素营养,又能分泌激素刺激作物生长的微生物。

3.2 根际联合固氮菌

既依赖根际环境生长,又在根际中固定空气中的氮气,对作物的生长发育产生积极作用的微生物。

3.3 固氮效能

固氮菌每消耗 1 g 碳水化合物(糖)从空气中摄取氮素的毫克数,固氮效能用 mg 氮/g 糖表示。

4 产品分类

4.1 按剂型不同分为:液体固氮菌肥料、固体固氮菌肥料和冻干固氮菌肥料。

4.2 按菌种及特性分为:自生固氮菌肥料、根际联合固氮菌肥料、复合固氮菌肥料。

5 技术要求

5.1 菌种

在含一种有机碳源的无氮培养基中能固定分子氮,并具有一定的固氮效能。菌体一般为短杆状(固氮螺菌属菌体呈螺旋状),革兰氏染色阴性。

5.1.1 自生固氮菌

用固氮菌属 (*Azotobacter*)、氮单胞菌属 (*Azomonas*) 的菌种,也可用茎瘤根瘤菌 (*Azorhizobium caulinodans*) 和固氮芽胞杆菌 (*Paenibacillus azotofixans*) 菌株。

5.1.2 根际联合固氮菌

可用下列菌种:固氮螺旋菌 (*Azospirillum*);阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 经鉴定为非致病菌的菌株;粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) 经鉴定为非致病菌的菌株;肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 经鉴定为非致病菌的菌株。

使用本准则规定之外的菌种生产固氮菌肥料时,菌种必须经过鉴定,并符合 5.1 要求。

生产固氮微生物肥料所使用的菌种,必要时还要进行菌种染色鉴别(见附录 B)和菌种固氮效能测定(见附录 C)。

5.2 成品技术指标(见表 1)

表 1 成品技术指标

项目 \ 指标 \ 剂型	液 体	固 体	冻 干
外观、气味	乳白或淡褐色液体,混浊,稍有沉淀,无异臭味	黑褐色或褐色粉状,湿润、松散,无异臭味	乳白色结晶,无味
水分, %	—	25.0~35.0	3.0
pH 值	5.5~7.0	6.0~7.5	6.0~7.5
细度,过孔径 0.18 mm 标准筛的筛余物, %	≤ 5	20.0	
有效活菌数,个/mL (个/g、个/瓶)	≥ 5.0×10^8	1.0×10^8	5.0×10^8
杂菌率 ¹⁾ , %	≤ 5.0	15.0	2.0
有效期 ²⁾ , 月	≥ 3	6	12

1) 其中包括 10^{-5} 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,小包装产品以一包装箱为一件。大包装(30~50 kg)产品以一袋(或一桶)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,抽样 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,但总件数不要超过 40 件。

每件包装产品抽取一小袋,在无菌条件下每袋取样 200 g。然后将所有样品混匀,按四分法缩到 2 000 g,分装 4 袋,然后封口。每 2 袋为一份装入牛皮纸封样袋。

液体产品每件吸取 10 mL,一同放入无菌的三角瓶中,混匀后分成两份,每份 250 mL。冻干产品,每件取一支放入无菌的三角瓶中,加无菌液体培养液,溶解混匀后分成两份,每份 50 mL。贴上标签和封条(一份被抽样单位留存,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:φ15 mm×150 mm,φ18 mm×180 mm;
 培养皿:直径 9 cm;
 三角瓶:500 mL;
 无菌吸管:0.5、1、5、10 mL;
 玻璃刮刀;
 滤纸;
 酒精灯;
 标准筛:孔径 0.18 mm 和 0.15 mm;
 1 号羊毛画笔;
 无菌水;
 无离子水。

7.1.2 试剂

选择培养基(见附录 A);
 刚果红染液(0.5%)。

7.2 成品检验

7.2.1 气味检验

取固氮菌肥料样品打开包装,进行感观检验。

7.2.2 外观检验

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

7.2.3 pH 值测定

液体固氮菌肥料的 pH 值测定:取供检菌液直接测定 pH 值,取三次测定结果的平均数。

固体固氮菌肥料的 pH 值测定:取 50 mL 烧杯一个,加入菌肥 25 g,无离子水 25 mL。通过磁力搅拌器使溶液均匀后用酸度计测定 pH 值。取三次测定结果的平均数。

7.2.4 含水量测定

称取固体固氮菌肥三份,每份 20.00 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,移于干燥器内,冷却后称重。根据烘干前后质量差按式(1)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%。

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

式中: m_0 ——烘干前样品质量, g;

m_1 ——烘干后样品质量, g。

7.2.5 吸附剂颗粒细度测定

称样 10.00 g(精确至 0.01 g),置于标准筛中(直径分别为 0.18 mm 或 0.15 mm),用水冲洗,用毛笔轻刷,至粉末不再通过为止。将筛余物置 105~110℃ 温度下烘干,称重。筛余物百分含量按式(2)计算:

$$\text{筛余物}(\%) = \frac{\text{筛余物量} \div (1 - \text{样品含水量百分数})}{\text{样品质量}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

7.2.6 有效活菌数和杂菌含量测定

采用平板计数法测定有效活菌数及杂菌率。

7.2.6.1 测定步骤

采样应不少于 500 g,从中称取 10.00 g,加入带玻璃珠的 100 mL 的无菌水中(液体菌剂取 10 mL,加入 90 mL 的无菌水中),静置 20 min 后在旋转式摇床上 200 r/min 充分振荡 30 min,即成母液的菌悬液。

用无菌吸管吸取 5 mL 上述母液的菌悬液加入 45 mL 无菌水中,混匀成 1:10 稀释的菌悬液,这样依次稀释,分别得到 1:1×10²,1:1×10³,1:1×10⁴,1:1×10⁵ 等浓度(每个稀释度必须更换无菌吸管)。

用 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 平皿的选择培养基(见附录 A)表面,用无菌玻璃刮刀将菌悬液均匀地涂于琼脂表面,或取 1 mL 不同稀释度菌悬液加入培养皿内,与琼脂培养基混匀,每个样品取 3 个连续适宜稀释度,每一稀释度重复 3 次,同时加无菌水的空白对照。28℃ 培养 2~3 d 后每个稀释度取 5~10 个菌落的菌体,涂片染色(见附录 B)。显微镜观察识别后,选一个适宜稀释度(菌落在 30~300 个之间的平板),计算出同一稀释度三个平皿上菌落平均数。

杂菌数是指在选择培养基上,除有效活菌外的其他菌的菌落数与马丁培养基上霉菌数之和。马丁培养基 10⁻⁴ 稀释度菌悬液加样,操作步骤同样品有效活菌数检测操作。

7.2.6.2 允许差

平行样品误差按式(3)计算,并应符合表 2 的规定。

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中: δ ——单一标准差;

x ——同一个稀释度任一个平板测定值;

\bar{x} ——同一个稀释度平板测定的平均值;

n ——重复次数。

表 2 平板上菌落数对应的单一标准差

平板上菌落数,个/皿	30~50	51~99	100~300
单一标准差,±	10.0	20.0	50.0

7.2.6.3 测定结果的计算

按式(4)、式(5)计算样品的有效活菌数及杂菌率。

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

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

7.2.7 有效期检验在产品说明书标明的有效期到达前 10 d 测定成品各项指标,方法同 7.2.1~7.2.6。

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

型式检验的检验项目按 5.2 要求进行。出厂检验不检有效期。

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) 产品有效活菌数符合指标,杂菌率不符合指标,但小于本标准规定的两倍时(液体 10%、固体 30%、冻干瓶 4%),而且在马丁培养基平板上霉菌数小于 30×10^5 ,其他指标有一项不符合,也可判为合格产品；

c) 产品有效活菌数及杂菌率符合指标,在水分、外观、pH 值、细度等次要检测项目中,有 3 项不符合技术指标,也判为合格产品。

8.3.2 不合格产品：

a) 产品有效活菌数不符合技术指标或投入菌种没有完全相应的检验出,判为不合格产品；

b) 产品杂菌率超过本标准规定的两倍(液体 10%、固体 30%、冻干瓶 4%),判为不合格产品；

c) 产品有效活菌数符合指标,杂菌率不符合指标,但小于本标准规定的两倍时(液体 10%、固体 30%、冻干瓶 4%),其他指标有两项不符合指标,判为不合格产品；

d) 产品检验在马丁培养基平板上霉菌数 $\geq 30 \times 10^5$,判为不合格产品；

e) 产品水分、pH 值、细度、外观等次要检测项目中,有 4 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)的固氮菌肥料产品检测时,只测固氮菌数量,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。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 的要求。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

在包装箱(袋)上印有产品名称、商标、标准编号、肥料登记证号、生产单位、厂址、生产日期、批号和净重,并印有防晒、防潮、防冻等标记,若有必要还要加印易碎、防倒置等标记。内包装上有产品名称、商标、标准编号、肥料登记证号、有效菌含量、生产日期、有效期、产品性能、使用说明书及生产单位、厂址等。

9.3 运输

适用于常用运输工具,运输过程中有遮盖物,防止雨淋、日晒及 35℃ 以上高温。气温低于 0℃ 时采取

保温措施,防止菌肥冻冰。运输过程中轻装轻卸,避免包装破损。

9.4 贮存

产品贮存在阴凉、干燥、通风的库房内,最适温度为 $10^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$,不得露天堆放,以防雨淋和日晒,避免冻冰及长时间 35°C 以上高温。

附录 A

(标准的附录)

有效活菌数和杂菌(霉菌)测定的选择培养基

A1 固氮菌用阿须贝氏(Ashby)培养基

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
氯化钠(NaCl)	0.2 g
碳酸钙(CaCO_3)	5.0 g
甘露醇($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$)	10.0 g
硫酸钙($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1 g
pH	7.0

A2 固氮(茎瘤)根瘤菌培养基

乳酸钠($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$)	10.0 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	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
氯化铁(FeCl_3)	0.004 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1 g
酵母膏	1.0 g
(或酵母粉)	0.8 g
pH	6.8

A3 联合固氮菌培养基

D-葡萄糖酸钠($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7\text{Na}$)	5.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.4 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	0.1 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
酵母膏	1.0 g
(或酵母粉)	0.8 g
氯化钠(NaCl)	0.1 g
氯化钙(CaCl_2)	0.02 g
氯化铁(FeCl_3)	0.01 g
钼酸钠(Na_2MoO_4)	0.002 g
pH	6.8~7.0

A4 马丁培养基(测霉菌数)

磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	1.0 g
-----------------------------------	-------

硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 g
葡萄糖($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	10.0 g
蛋白胨	5.0 g
1%孟加拉红水溶液〔四氯四碘荧光素($C_{20}H_4Cl_4I_4O_5$)〕	3.3 mL

每升培养基中加入 0.1 g 氯霉素,一起灭菌。

注:以上各培养基需蒸馏水 1 000 mL,琼脂 18~20 g。

附录 B

(标准的附录)

染色剂和染色方法

B1 荚膜染色法

B1.1 染色剂

石碳酸复红染色液

甲液:碱性复红(Basicfuchsin)($C_{20}H_{20}ClN_3$)	0.3 g
95%酒精(CH_3CH_2OH)	10.0 mL
乙液:石碳酸(C_6H_5OH)	5.0 g
蒸馏水	95.0 mL

a) 将碱性复红在研钵中研磨后,逐渐加入 95%酒精,继续研磨使之溶解,配成甲液。

b) 将石碳酸溶解在蒸馏水中配成乙液。

c) 把甲液和乙液混合摇匀,成为石碳酸复红,通常可将混合液稀释 5~10 倍使用。

稀释液易变质失效,一次不宜多配。

B1.2 染色方法

B1.2.1 取少量培养菌涂于载玻片水滴中,涂成薄层。

B1.2.2 自然干燥或稍加热。

B1.2.3 在石碳酸复红染 1 min 后,水洗,干后镜检。

B1.3 染色结果

菌体为红色,菌体周围有一层透明圈即为荚膜。

B2 芽胞染色法

B2.1 染色剂

B2.1.1 5%孔雀绿

孔雀绿($C_{23}H_{25}ClN_2$)	5.0 g
蒸馏水	100 mL

B2.1.2 0.05%碱性复红

碱性复红($C_{20}H_{20}ClN_3$)	0.5 g
95%酒精	100 mL

B2.2 染色方法

B2.2.1 制片。

B2.2.2 加孔雀绿染液 3~5 滴于涂片处,酒精灯火焰加热至冒汽,但不沸腾,并随时补加染液,维持涂片处不干,染色约 5~10 min。

B2.2.3 自来水冲洗 30 s。

B2.2.4 用 0.05% 碱性复红染色 1 min, 水洗, 镜检(若 0.05% 碱性复红浓度太高, 可根据具体情况适当稀释)。

B2.3 染色结果

芽胞绿色, 菌体红色。

B3 革兰氏染色法

B3.1 染色剂

B3.1.1 结晶紫染色液

甲液: 结晶紫($C_{25}H_{30}ClN_3 \cdot 9H_2O$)	2.0 g
乙醇(95%)(CH_3CH_2OH)	20 mL
乙液: 草酸铵[(NH_4) $_2C_2O_4 \cdot H_2O$]	0.8 g
蒸馏水	80 mL

甲、乙液相混, 静置 48 h 后使用。

B3.1.2 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

先用少量(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, 使用时加两倍水, 稀释成卢哥氏碘液。

B3.1.3 脱色液: 95% 乙醇。

B3.1.4 复染液: 0.5% 的番红水溶液

2.5% 番红酒精溶液	10 mL
蒸馏水	100 mL

B3.2 染色方法

B3.2.1 制片。

B3.2.2 滴加结晶紫液, 覆盖 1 min。

B3.2.3 用水冲净结晶紫液。

B3.2.4 滴加碘液冲去残水, 并覆盖 1 min。

B3.2.5 用水冲去碘液, 用吸水纸吸去水分。

B3.2.6 加 95% 酒精数滴, 并轻轻摇动进行脱色, 30 s 后水洗, 吸去水分。

B3.2.7 番红染色液染 10 s 后, 自来水冲洗。干燥, 镜检。

B3.3 染色结果

革兰氏正反应菌体呈紫色, 负反应菌体呈红色。

B4 鞭毛染色

B4.1 染色剂

甲液: 丹宁酸($C_{76}H_{52}O_{46}$)	5.0 g
氯化铁($FeCl_3$)	1.5 g
甲醛(15%)($HCHO$)	2.0 mL
氢氧化钠($NaOH$)(1%)	1.0 mL
蒸馏水	100 mL
乙液: 硝酸银($AgNO_3$)	2 g
蒸馏水	100 mL

待硝酸银溶解后,取出 10 mL 备用,其余的 90 mL 硝酸银液中滴加浓氢氧化铵,则形成很浓厚的沉淀,再继续滴加氢氧化铵到刚刚溶解沉淀成为澄清溶液为止。再将备用的硝酸银慢慢滴入,则出现薄雾,但轻轻摇动后,薄雾状的沉淀又消失,再滴入硝酸银,直到摇动后,仍呈现轻微而稳定的薄雾状沉淀为止(如雾重,则银盐沉淀出,不宜使用)。

B4.2 染色方法

B4.2.1 涂片:在载玻片的一端滴一滴蒸馏水,用接种环挑取斜面上少许菌苔,在载玻片的水滴中轻蘸几下。将玻片稍倾斜,使菌液随水滴缓慢流到另一端,然后平放在空气中干燥。

B4.2.2 涂片干燥后,滴加甲液染 3~5 min,用蒸馏水冲洗。加乙液染 30~60 s,并在酒精灯上加热,使其稍冒蒸气而染液不干,然后用蒸馏水冲洗,干后镜检。

B4.3 染色结果

菌体为深褐色,鞭毛为褐色。

附 录 C

(标准的附录)

菌种固氮效能测定方法

在 500 mL 三角瓶中加入 100 mL 无氮培养基(含糖 1%即 1 g),121℃灭菌 30 min。无菌操作,每瓶接入两环待测菌种(或 1 mL 培养 3 d 的培养液),放置摇床上振荡(120 r/min)30℃培养 5~7 d 后,取出定糖测氮。

定糖采用蒽酮光电比色法。

测氮采用半微量光电比色法。

C1 蒽酮光电比色法

C1.1 测定原理

糖类遇硫酸即脱水成为醛类,再变成呋喃衍生物,后者与蒽酮缩合,生成蓝绿色化合物。于 580~650 nm 处进行比色测定(蒽酮可与单糖、双糖、淀粉、糊精等反应),该方法适合于含糖量 0.003%以上的样品。

C1.2 试剂和仪器

分析中除有说明外,限用分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的三级水。

C1.2.1 硫酸。

C1.2.2 0.2%(m/V)蒽酮溶液:称取 0.2 g 蒽酮于 100 mL 硫酸中。充分搅拌,使其溶解。该溶液不稳定,应当天配用。

C1.2.3 葡萄糖标准液:准确称取葡萄糖 1.000 g,溶于水中,定容至 1 000 mL,即为 1.000 mg/mL 标准液。

C1.2.4 分光光度计。

C1.3 分析步骤

C1.3.1 试样处理

取发酵培养的菌液 1.00~4.00 mL(取决于含糖量),稀释至 100.00 mL,取此稀释液 1.00 mL 于比色管中,加水至 2.00 mL,每管加入蒽酮试剂 4.00 mL,摇匀,水浴加热 15 min,使之充分显色,冷却后,于 580~650 nm 处进行比色测定,记录吸光度,同时进行空白试验。

C1.3.2 标准曲线绘制

吸取葡萄糖标准溶液 1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、20.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,该液分别含糖 10、20、40、60、80、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 。

吸取 1.00 mL 放入比色管中,加水至 2.00 mL,按 C1.3.1 方法测定,记录吸光度。

用标准系列的含糖量定义横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

C1.4 分析结果的计算

100 mL 溶液中的含糖量(X)按式(C1)计算:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m} \times 100 \times 10^{-6} \dots\dots\dots(C1)$$

式中: m_1 ——标准曲线上查出的试验含糖量, $\mu\text{g/mL}$;

m_2 ——标准曲线上查出的空白试验的含糖量, $\mu\text{g/mL}$;

m ——吸取发酵溶液体积, mL。

C1.5 允许差

a) 取平行测定的算术平均值为测定结果;

b) 平行测定结果的允许差不大于 0.005 g/100 mL。

C2 固氮菌液全氮比色测定法

C2.1 测定原理

在硫酸铜或硫酸钾存在下,浓硫酸中加入菌液,并加热使试样全部有机氮转化为氨态氮,与奈氏试剂反应,于波长 420 nm 处进行比色测定。

C2.2 试剂和仪器

分析中除非另有说明,限用分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的三级水。

C2.2.1 硫酸(GB/T 625)。

C2.2.2 双氧水

C2.2.3 氢氧化钠(GB/T 629)2 mol/L 溶液:称量 8 g 氢氧化钠溶于水中,定容至 100 mL。

C2.2.4 40%(m/V)氢氧化钠(GB/T 629)溶液:称取 40 g 氢氧化钠溶于 100 mL 水中。

C2.2.5 50%(m/V)酒石酸钾钠溶液:50 g 酒石酸钾钠溶于 100 mL 水中。

C2.2.6 奈氏试剂:7.1 g 碘化钾,10 g 碘化汞(HgI_2)溶于少量水中,另配 16 g 氢氧化钠溶于 70 mL 水中,冷却后将前一溶液缓缓倒入氢氧化钠溶液中,边加边搅拌,最后用水稀释至 100 mL,静置过夜,取清液储于棕色瓶中。

C2.2.7 催化剂:100.0 g 硫酸钾与 10.0 g 硫酸铜共同研磨均匀,储于广口瓶中。

C2.2.8 分光光度计。

C2.3 分析步骤

C2.3.1 试样制备和测试

吸取固氮菌液 1.00 mL 于 30 mL 消化管中,加硫酸(C2.2.1)3 mL,加 0.1 g 催化剂(C2.2.7)和 5 滴双氧水(C2.2.2)煮沸至清亮,若反应液久煮不清,可冷却后加 1~2 滴双氧水(C2.2.2),继续煮至无色透明,取下冷却。加少许蒸馏水,摇匀,滴加 40%氢氧化钠至出现氢氧化铜沉淀(约 11~12 mL),加酒石酸钾钠(C2.2.5)20 滴,以去除氢氧化物沉淀掩蔽钙镁,将试管液全部转移至 100 mL 容量瓶中,消化管洗涤液一并倒入容量瓶,稀释至刻度,摇匀。过滤,滤液 10.00 mL 于比色管中,加氢氧化钠(C2.2.3)1.00 mL,加酒石酸钾钠 1.00 mL,加奈氏试剂 3 mL,摇匀,显色 2~3 min 后,即倒入比色杯中,于 420 nm 处比色计测定。读取吸光度。

C2.3.2 标准曲线的绘制

准确称取在(105±5)℃烘 1 h 直至恒重的优级纯试剂硫酸铵 0.4716 g,溶于水,稀释至 100 mL,该液含氮 1 mg/mL,取此液 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00、2.00 mL 放入 100 mL 容量瓶,用水稀释至刻度,其含氮分别为 0.50、1.00、2.50、5.00、10.00、20.00 $\mu\text{g/mL}$,取标准液各 1 mL 放入比色管中,加水至 2 mL,按 C1.3.1 方法测定,记录吸光度。

用标准液的氮含量为横坐标,相应的吸光度为纵坐标,绘制工作曲线。

C2.4 分析结果的计算

氮(X)含量以 g/100 mL 表示,按式(C2)计算:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m} \times 100 \times 10^{-6} \dots\dots\dots(C2)$$

式中: m_1 ——标准曲线上查出的试验含氮量, $\mu\text{g/mL}$;

m_2 ——标准曲线上查出的空白试验氮含量, $\mu\text{g/mL}$;

m ——吸取发酵溶液体积, mL。

C2.5 允许差

a) 取平行测定的算术平均值为测定结果;

b) 平行测定结果的允许差不大于 0.005 g。

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·2-13632

*

科目 565—506