

## 前 言

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

主要修改内容如下:

——增加定义、抽样和判定规则部分;

——增加菌种部分,包括菌种有效性、菌体特性特征、菌落形态;

——删除成品无害化指标。因为根瘤菌肥料一般以草炭为载体,而且每公顷每年仅用 750~7 500 g 根瘤菌肥拌种,不存在重金属的危害。草炭经高温灭菌后,大肠菌群和蛔虫卵不再存活。

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

本标准的附录 A 为标准的附录。

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:宁国赞、刘惠琴、马晓彤、葛诚、李俊。

# 中华人民共和国农业行业标准

## 根瘤菌肥料

NY 410—2000

Rhizobium fertilizer

### 1 范围

本标准规定了豆科根瘤菌肥料的分类、技术要求、检验方法、检验规则、标志、包装、运输及贮存。

本标准适用于以共生固氮性能优良的根瘤菌菌株为生产用菌,经液体发酵生产而成的根瘤菌液体肥料,菌液以持水性能良好的载体为吸附剂制成的根瘤菌固体肥料;也适用于以根瘤菌为主的含有能促进结瘤、固氮作用的芽胞杆菌、假单胞菌或其他有益的促生细菌制成的复合根瘤菌肥料。

### 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 6543—1986 瓦楞纸箱

NY 411—2000 固氮菌肥料

### 3 定义

本标准采用下列定义。

#### 3.1 根瘤菌肥料

用于豆科作物接种,使豆科作物结瘤、固氮的接种剂。

#### 3.2 复合根瘤菌肥料

以根瘤菌为主,加入少量能促进结瘤、固氮作用的芽胞杆菌、假单胞细菌或其他有益的促生微生物的根瘤菌肥料,称为复合根瘤菌肥料。加入的促生微生物必须是对人畜及植物无害的菌种。

### 4 产品分类

4.1 按形态不同,分为液体根瘤菌肥料和固体根瘤菌肥料。

4.2 以寄主种类的不同,分为菜豆根瘤菌肥料、大豆根瘤菌肥料、花生根瘤菌肥料、三叶草根瘤菌肥料、豌豆根瘤菌肥料、苜蓿根瘤菌肥料、百脉根根瘤菌肥料、紫云英根瘤菌肥料和沙打旺根瘤菌肥料等。

### 5 技术要求

#### 5.1 菌种

##### 5.1.1 菌种的有效性

用于生产根瘤菌肥料的菌种系属于根瘤菌属(*Rhizobium*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、固氮根瘤菌(*Azorhizobium*)、中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium*)等各属中的不同的根瘤菌种,这些菌种必须是经过鉴定的菌株,或有二年多点田间试验获得显著增产的菌株。该菌种必须在菌肥生产前一年内经无氮营养液盆栽接种试验鉴定,结瘤固氮性能优良,接种植株干重比对照显著增加。

##### 5.1.2 菌体特征特性

中华人民共和国农业部 2000-12-22 批准

2001-04-01 实施

短杆状,无芽胞,革兰氏染色阴性。

### 5.1.3 菌落形态特征

圆形、边缘整齐、稍突起,在含有刚果红的甘露醇-酵母培养基平板上呈乳白色或无色半透明。

## 5.2 产品技术指标

### 5.2.1 液体根瘤菌肥料(见表1)

表1 液体根瘤菌肥料技术指标

| 项 目                       | 指 标                       | 备 注                      |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 外观、气味                     | 乳白色或灰白色均匀混浊液体,或稍有沉淀。无酸臭气味 |                          |
| 根瘤菌活菌个数, $10^8/\text{mL}$ | $\geq 5.0$                |                          |
| 杂菌率, %                    | $\leq 5$                  |                          |
| pH 值                      | 6.0~7.2                   | 用耐酸菌株生产的菌液, pH 值可以大于 7.2 |
| 寄主结瘤最低稀释度                 | $10^{-6}$                 | 此项仅在监督部门或仲裁检验双方认为有必要时才检测 |
| 有效期, 月                    | $\geq 3$                  | 此项仅在监督部门或仲裁检验双方认为有必要时才检测 |

### 5.2.2 固体根瘤菌肥料(见表2)

表2 固体根瘤菌肥料技术指标

| 项 目                      | 指 标   | 备 注                      |
|--------------------------|---|--------------------------|
| 外观、气味                    | 粉末状、松散、湿润无霉块, 无酸臭味, 无霉味   |                          |
| 水分含量, %                  | 25~50   |                          |
| 根瘤菌活菌个数, $10^8/\text{g}$ | $\geq 2.0$  |                          |
| 杂菌率, %                   | $\leq 10$   |                          |
| pH 值                     | 6.0~7.2   |                          |
| 吸附剂颗粒细度                  | 大粒种子(大豆、花生、豌豆等)用的菌肥, 通过孔径 0.18 mm 标准筛的筛余物 $\leq 10\%$<br>小粒种子(三叶草、苜蓿、紫云英)用的菌肥通过孔径 0.15 mm 标准筛的筛余物 $\leq 10\%$ |                          |
| 寄主结瘤最低稀释度                | $10^{-6}$   | 此项仅在监督部门或仲裁检验双方认为有必要时才检测 |
| 有效期, 月                   | $\geq 6$  | 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, 按批抽样检验。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(或封口胶带)、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,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,按超过部分的2%增加抽样件数。总件数不超过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。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。最后贴上抽样标签和抽样封条(液体根瘤菌肥小包装产品抽样参照此法进行)。所抽样品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;

温室或植物光照培养箱:植物叶面光照强度大于8 000 lx,温度控制范围20~30℃;

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:1、2、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

##### 7.1.2.1 革兰氏染色试剂

结晶紫;

番红;

碘液;

95%酒精。

##### 7.1.2.2 根瘤菌琼脂培养基

甘露醇(C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) 5 g

蔗糖(C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) 5 g

酵母粉 0.5 g

磷酸氢二钾(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O) 0.5 g

硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 0.2 g

|  |          |
|--|----------|
| 氯化钠(NaCl)  | 0.1 g    |
| 硫酸钙(CaSO <sub>4</sub> )  | 0.1 g    |
| 钼酸钠(Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)溶液   | 1 mL     |
| 硫酸锰(MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)溶液  | 1 mL     |
| 柠檬酸铁(FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> )1%溶液  | 1 mL     |
| 硼酸(H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )1%溶液  | 1 mL     |
| 刚果红(C <sub>32</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> )1%溶液 | 2.5 mL   |
| 琼脂   | 18~20 g  |
| 水  | 1 000 mL |
| pH 值   | 7.0      |

## 7.1.2.3 马丁培养基(测霉菌数)

|  |          |
|--|----------|
| 磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)            | 0.5 g    |
| 葡萄糖(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ·H <sub>2</sub> O) | 10.0 g   |
| 硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)                            | 0.5 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 |
| 氯霉素  | 0.1 g    |

## 7.1.2.4 豆科植物结瘤试验琼脂斜面培养基

|   |          |
|---|----------|
| 磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                                 | 0.22 mg  |
| 氯化钾(KCl)  | 155 mg   |
| 硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)                               | 50 mg    |
| 硫酸锌(ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)                               | 0.25 mg  |
| 硫酸铜(CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)                               | 0.25 mg  |
| 硼酸(H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )                                     | 0.25 mg  |
| 钼酸钠(Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)                | 0.05 mg  |
| 柠檬酸铁(FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ·xH <sub>2</sub> O) | 30 mg    |
| 硝酸钠(NaNO <sub>3</sub> )   | 30 mg    |
| 琼脂  | 5~10 g   |
| 水   | 1 000 mL |
| pH  | 7.0      |

## 7.2 成品检验

## 7.2.1 气味检验

取根瘤菌肥料样品打开包装,进行感官检验。

## 7.2.2 外观检验

将固体根瘤菌肥料包装打开,装在白色搪瓷盘中,将液体根瘤菌肥料摇匀。在明亮光线下进行感官检验。

## 7.2.3 pH 值测定

液体根瘤菌肥料的 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。

固体根瘤菌肥料的 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

称取固体根瘤菌肥料三份,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,移至干燥器内,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 g(精确至 0.01 g),置于标准筛中(直径分别为 0.18 mm 和 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:

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

#### 7.2.6 根瘤菌活菌数及杂菌率的测定

采用平板计数法测定根瘤菌活菌数及杂菌率。

##### 7.2.6.1 制作根瘤菌培养基平板(7.1.2.2)及马丁培养基平板(7.1.2.3)

##### 7.2.6.2 样品稀释培养

称取 10 g 供检样品(精确到 0.01 g),装入带玻璃珠及 100 mL 无菌水的三角瓶中(供检样品为液体,则取 10 mL 加入内装 90 mL 无菌水的三角瓶中),置摇床振荡 20 min,转速 200 r/min。振荡好的样品静置 20 min 后采用 10 倍稀释法稀释至  $10^{-7}$ (液体样品稀释至  $10^{-8}$ )。从最后三个浓度悬液中各取 0.1 mL,加至直径为 9 cm 的培养基平板上,用玻璃刮刀将菌液涂匀。每个稀释度重复三次。25~28℃温度下培养 3~7 d。用同样方法将  $10^{-3}$  稀释度菌悬液 0.1 mL 加到马丁培养基平板上。28℃培养 48 h。

##### 7.2.6.3 菌落鉴别及计数

根据被检产品标准描述的菌落特征,鉴别根瘤菌菌落与杂菌菌落。必要时进行革兰氏染色(方法见附录 A)、镜检,以区分根瘤菌菌落和其他菌落。取菌落 30~300 的平板计数。算出三个重复的根瘤菌及杂菌菌落平均数。杂菌是指样品所含有效活菌(包括根瘤菌及促生细菌)以外的其他种类微生物的总称。杂菌总数是马丁培养基上出现的霉菌数与根瘤菌培养基上出现的杂菌数(霉菌除外)之和。

根瘤菌数按式(3)计算,杂菌率按式(4)计算:

$$\text{根瘤菌数}[\text{亿个/g(mL)}] = \text{菌落平均数} \times \text{稀释倍数} \times \frac{\text{基础液体积}}{\text{样品量} \times \text{加样量}} \quad \dots\dots\dots(3)$$

$$\text{杂菌率}(\%) = \frac{\text{杂菌总数}}{\text{根瘤菌数} + \text{杂菌总数}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(4)$$

#### 7.2.7 稀释结瘤检验

寄主植物种子用 0.1% 升汞溶液表面消毒后催芽,种芽长 1~2 mm 时用供试样品的  $10^{-5}$ ~ $10^{-7}$  稀释度的悬液接种,植于试管琼脂斜面上。设不接种的阴性对照和接种已知菌的阳性对照。重复 6 次。植物培养温度 20~25℃,植物叶面光照强度大于 8 000 lx,每天光照 12 h。10~20 d 后观察结瘤状况。如空白对照结瘤,试验需要重做。空白对照不结瘤,正对照结瘤,可以进行判定。在  $10^{-5}$  稀释度中 70% 植株结瘤为稀释结瘤合格。

#### 7.2.8 有效期的检验

在产品说明书标明的有效期到达前 10 d 测定活菌数,或按产品说明书标明的使用量对寄主进行接种试验(7.2.7)。活菌数达到标准要求或 70% 植株结瘤为有效期合格。

## 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

型式检验的检验项目按 5.2.1 或 5.2.2 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 5.2.1(或 5.2.2)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,但液体样品杂菌率不超过 10%,固体样品杂菌率不超过 20%,在  $10^{-6}$ 根瘤菌平板上无霉菌出现,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) 根瘤菌活菌数不符合技术指标,判为不合格产品；
  - b) 液体样品杂菌率超过 10%,固体样品杂菌率超过 20%,判为不合格品；
  - c) 在  $10^{-6}$ 根瘤菌培养基平板上出现霉菌判为不合格产品；
  - d) 小粒种子用的根瘤菌肥,吸附剂通过孔径 0.15 mm 标准筛的筛余物 $\geq 30\%$ ,判为不合格产品。
- 8.3.3 含有芽胞杆菌或假单胞杆菌等促生细菌的根瘤菌肥料产品检测时,芽胞杆菌和假单胞杆菌的判断按产品企业标准提供的依据进行。

## 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。

#### 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

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。

#### 9.2.1 产品名称

根瘤菌肥料的产品名称与产品中根瘤菌的名称应符合。例如:用大豆根瘤菌生产的肥料,其产品名称为大豆根瘤菌肥料。

#### 9.2.2 产品性能

在产品性能中应标明产品可接种的豆科寄主名称。

### 9.3 运输和贮存

根瘤菌肥料的运输和贮存按 NY 411—2000 中 9.3 和 9.4 执行。

附 录 A  
(标准的附录)  
革 兰 氏 染 色

革兰氏染色阳性细菌与革兰氏染色阴性细菌的细胞壁,对结晶紫-碘复合物的渗透性不同,而形成染色阳性或染色阴性反应。

### A1 染剂

#### A1.1 结晶紫液(赫克尔 Hucker 氏配方)

|         |       |
|---------|-------|
| 甲液:结晶紫  | 2 g   |
| 乙醇(95%) | 20 mL |
| 乙液:草酸铵  | 0.8 g |
| 蒸馏水     | 80 mL |

甲、乙液相混合,静置 48 h 后使用。此染液较稳定,在不透气的暗色瓶中可储存数月。

#### A1.2 卢哥(Lugol)氏碘液

|         |        |
|---------|--------|
| 碘(I)片   | 1 g    |
| 碘化钾(KI) | 2 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,加水稀释。此染液稳定,在不透气的暗色瓶中可存数月。

#### A1.3 脱色液(95%的乙醇)

#### A1.4 复染液(0.5%的番红水溶液)

取 2.5 g 番红,溶于 100 mL 无水酒精中。取番红酒精溶液 20 mL,加入 80 mL 蒸馏水,即成 0.5% 的番红水溶液。

### A2 涂片

A2.1 在无油迹的干净载片上用蜡笔划好格,片端注明日期、片号。

A2.2 在载片上的每个格内滴一小滴无菌水或蒸馏水。用接种环挑取少许菌苔,于水滴边缘轻轻涂几下。

A2.3 自然风干或微热促其快干,干后在火焰上通过 1~2 次,以固定涂片。

### A3 染色步骤

A3.1 滴加结晶紫液,覆盖约 1 min。

A3.2 用水冲净结晶紫液。

A3.3 滴加碘液冲去残水。并覆盖约 1 min。

A3.4 用水冲去碘液,将片上水甩净或用滤纸吸干。

A3.5 将片倾斜,并衬以白背景,流滴 95%酒精液约 20~30 s。立即用水冲净酒精。

A3.6 用番红液染 1~2(或更长)min。

A3.7 用水洗净番红,用滤纸吸干表面水或风干,备镜检。

### A4 观察结果

用显微镜油镜直接在载玻片上检查。红色为革兰氏染色阴性,蓝紫色为革兰氏染色阳性。



## A5 注意事项

A5.1 革兰氏染色的配方很多,但染色成功与否,很大程度上取决于经验。在没有把握时,最好在同一个载玻片上,用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为革兰氏染色阴性和阳性的对照菌。

A5.2 革兰氏染色操作中,以涂片和脱色两步最为重要。涂片切不可过于浓厚。对于易于乳化的细菌,将沾有菌苔的接种环在水滴边缘轻轻涂一二下即可。镜检时,以分散开的细菌的革兰氏染色反应为准。过于密集的细菌,常常呈假阳性。对纯细菌的涂片,以95%乙醇脱色易于掌握。乙醇中含有更多的水分,则脱色力加强,易形成假阴性。要尽量减少载玻片上的残水。只是甩净或用乙醇冲去残水,以脱色20 s为宜;用滤纸吸净残水,可用乙醇脱色近30 s。

A5.3 用火焰固定时不可过热,以载玻片不烫手为宜。过热会使染色反应不正确。实际上对斜面纯细菌涂片,风干后不经火焰固定即可染色。

A5.4 建议复染液用0.5%番红液。其他复染液,如稀释的石碳酸复红液等,可根据具体情况选用。

A5.5 由于龙胆紫不是单一成分的染料,与结晶紫不同,按前述配方染色后,常常不易脱色,出现假阳性。遇到这种情况可将染色剂稀释后使用。试用的龙胆紫稀释成十分之一的浓度可以使用,但颜色仍然不如结晶紫。

A5.6 对一般容易生长的异养细菌,以检查培养18~24 h的菌为宜。革兰氏染色阴性细菌的染色反应稳定,不易受菌龄的影响。革兰氏染色阳性细菌的染色反应,有的受菌龄的影响;较幼的细胞,培养18~24 h或更短的,呈阳性反应,较老的细胞,培养24 h或48 h以上的细胞,则部分或全部细胞转变为阴性反应。区分革兰氏染色反应时应注意。