

中华人民共和国农业行业标准

NY 227-94

微生物肥料

1 主题内容与适用范围

本标准规定了微生物肥料产品的分类、技术要求、试验方法、检验规则、包装、标志、运输与贮存。
本标准适用于有益微生物制成的,能改善作物营养条件(又有刺激作用)的活体微生物肥料制品。

2 引用标准

- GB 8172 蛔虫卵测定方法
- GB 4789 大肠菌值测定方法
- GB 7468 总汞测定方法
- GB 7471 总镉测定方法
- GB 7466 总铬测定方法
- GB 7485 总砷测定方法
- GB 7470 总铅测定方法

3 产品分类

3.1 根瘤菌肥料:能在豆科植物上形成根瘤(或茎瘤),同化空气中的氮气,供应豆科植物的氮素营养。用根瘤菌属(*Rhizobium*)或慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)的菌株制造。

3.2 固氮菌肥料:在土壤和很多作物根际中同化空气中的氮气,供应作物氮素营养;又能分泌激素刺激作物生长。用下列菌种之一制造。

固氮菌属(*Azotobacter*)

氮单胞菌属(*Azomonas*)

固氮根瘤菌属(*Azorhizobium*)

根际联合固氮菌:固氮螺菌属(*Azospirillum*)

阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacea*)经鉴定为非致病菌

粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)经鉴定为非致病菌

肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)经鉴定为非致病菌

其他经过鉴定的用于固氮菌肥料生产的菌种。

这些菌主要特征是在含一种有机碳源的无氮培养基中能固定分子态氮。

3.3 磷细菌肥料:能把土壤中难溶性磷,转化为作物可以利用的有效磷,改善作物磷素营养。用下列菌种之一制造。

分解有机磷化合物的细菌:

解磷巨大芽胞杆菌(*Bacillus megatherium phosphaticum*)

解磷珊瑚红赛氏杆菌(*Serratia carollera phosphaticum*)

节杆菌属中的一些种(*Arthrobacter* sp.)

转化无机磷化合物的细菌:

中华人民共和国农业部 1994-05-13 批准

1994-05-30 实施

假单胞菌属中的一些种(*Pseudomonas sp.*)

其他经过鉴定的用于磷细菌肥料生产的菌种。

有机磷细菌在含磷矿粉或卵磷脂的合成培养基上有一定解磷作用,在麦麸发酵液中都含刺激植物生长的生长素物质。

无机磷细菌具有溶解难溶性磷酸盐的作用。

3.4 硅酸盐细菌肥料:能对土壤中云母,长石等含钾的铝硅酸盐及磷灰石进行分解,释放出钾、磷与其他灰分元素,改善作物的营养条件。本品的生产菌种为胶质芽胞杆菌(*Bacillus mucilginosus*)的菌株及其他经过鉴定的用于硅酸盐细菌肥料生产的菌种。

该菌在含钾长石粉的无氮培养基上有一定解钾作用,菌体内和发酵液中存在刺激植物生长的生长素物质。

3.5 复合微生物肥料:含有上述(解磷、解钾、固氮微生物)或其他经过鉴定的两种以上互不拮抗微生物,通过其生命活动,能增加作物营养供应量。

4 技术要求

4.1 成品技术指标¹⁾

表 1 成品技术指标¹⁾

项 目	剂 型		液 体	固 体	颗 粒
1. 外观			无异臭味液体	黑褐色或褐色粉状、湿润、松散	褐色颗粒
2. 有效活菌数					
根瘤菌肥料					
慢生根瘤菌,亿/mL	≥		5	1	1
快生根瘤菌,亿/mL	≥		10	2	1
固氮菌肥料,亿/mL	≥		5	1	1
硅酸盐细菌肥料,亿/mL	≥		10	2	1
磷细菌肥料					
有机磷细菌,亿/mL	≥		5	1	1
无机磷细菌,亿/mL	≥		15	3	2
复合微生物肥料,亿/mL	≥		10	2	1
3. 水分,%			—	20~35	<10
4. 细度,mm			—	粒径 0.18	粒径 2.5~4.5
5. 有机质(以 C 计),%	≥			20	25
(以蛭石等作为吸附剂不在此列)					
6. pH			5.5~7	6.0~7.5	6.0~7.5
7. 杂菌数,%	≤		5	15	20
8. 有效期			不得低于六个月		

注: 1) 在产品标明的失效期前有效活菌数应符合指标要求,出厂时产品有效活菌数必须高出本指标 30%以上。

4.2 成品无害化指标

表 2 成品无害化指标

编 号	参 数	单 位	标准限值
1.	蛔虫卵死亡率	%	95~100
2.	大肠杆菌值		10^{-1}
3.	汞及化合物(以 Hg 计)	mg/kg	≤ 5
4.	镉及化合物(以 Cd 计)	mg/kg	≤ 3
5.	铬及化合物(以 Cr 计)	mg/kg	≤ 70
6.	砷及化合物(以 As 计)	mg/kg	≤ 30
7.	铅及化合物(以 Pb 计)	mg/kg	≤ 60

5 检测方法

5.1 外观

感观检验符合 4.1 成品技术指标。

5.2 有效活菌数和杂菌含量测定

5.2.1 试剂和溶液

- a. 无菌水、蒸馏水；
- b. 选择培养基(附录 A)；
- c. 刚果红染液(0.5%)。

5.2.2 仪器

- a. 显微镜 1 000×；
- b. 摇床 旋转式 200 r/min；
- c. 恒温培养箱；
- d. 恒温烘干箱；
- e. 灭菌锅；
- f. 扭力天平(分度值 0.01 g)；
- g. 玻璃仪器(灭菌的 9 cm 平皿、10 mL、5 mL、1 mL 吸管、三角瓶、玻璃刮刀)。

5.2.3 测定步骤

5.2.3.1 采样应不少于 500 g,从中称取 10~20 g(精确 0.01 g),加入带玻璃珠的 100~200 mL 的无菌水中(液体菌剂取 10~20 mL,加入 90~180 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。

5.2.3.2 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 和 1:1×10⁴,1:1×10⁵ 等浓度(每个稀释度必须更换无菌吸管)。

5.2.3.3 用 1 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 平皿的琼脂培养基表面,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,培养 2~5 d,每个稀释度取 5~10 个菌落的菌体,涂片染色,显微镜观察识别后计数菌落。

5.2.4 计算公式:

统计算出同一稀释度三个平皿上菌落平均数。

根据式(1)和式(2)计算:

$$\text{菌剂含菌数} = \text{菌落平均数} \times \text{稀释倍数} \times \frac{\text{母液菌悬液的体积}}{\text{菌剂数}} \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{杂菌率}(\%) = \frac{\text{杂菌数}}{\text{有效菌数} + \text{杂菌数}} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

根据菌落特征判定,分别计算出制品中的特定微生物及杂菌数率。固体(包括颗粒)菌剂含菌数以亿/g表示,液体菌剂含菌数以亿/mL表示。

5.2.5 菌落计数

5.2.5.1 以平板上出现 30~300 个菌落数的稀释度平板为计数标准。

5.2.5.2 当只有一个稀释度,其平均菌落数在 30~300 之间时,则以该平均菌落数乘以其稀释倍数(见表 3 例 1)。

5.2.5.3 若有两个稀释度,其平均菌落数均在 30~300 之间,应按两者菌落总数之比值来决定。若其比例小于 2 应计数两者的平均数,若大于 2 则计数其中稀释较小的菌落总数(见表 3 例 2 及例 3)。

5.2.5.4 若三个稀释度的平均菌落数均大于 300,则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数(见表 3 例 4)。

5.2.5.5 若三个稀释度的平均菌落数均小于 30,则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数(见表 3 例 5)。

5.2.5.6 若三个稀释度的平均菌落数均不在 30~300 之间,则以最接近 300 或 30 的平均菌落数乘以稀释倍数(见表 3 例 6)。

表 3 计算菌落总数方法的示例

例次	不同稀释度的平均菌落数			两个稀释度 菌落数之比	菌落总数 个/mL 或个/g
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		
1	1 431	159	22	—	1.6×10 ⁸
2	2 760	235	31	1.3	2.7×10 ⁸
3	2 676	136	34	2.5	1.4×10 ⁸
4	无法计数	1 142	312	—	3.1×10 ⁹
5	28	12	5	—	2.8×10 ⁶
6	无法计数	303	18	—	3.0×10 ⁸

5.3 含水量测定

5.3.1 仪器

- a. 土壤铝盒;
- b. 扭力天平(分度值 0.01 g);
- c. 恒温烘干箱;
- d. 干燥器。

5.3.2 测定步骤

称取样品 30~40 g(精确到 0.01 g)二份放入铝盒中,于 105℃条件下烘烤 4 h 直至恒重,取出后放入干燥器内冷却,一般冷却 20 min,再称其残重和铝盒重,损失量即为水分含量。

5.3.3 计算公式:

$$H_2O\% = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

式中: m_0 ——表示烘干前样品重, g;
 m_1 ——表示烘干后样品重, g。

5.4 pH 值测定

5.4.1 试剂和溶液

无离子水。

5.4.2 仪器

- a. 烧杯;
- b. 酸度计;
- c. 扭力天平(分度值 0.01 g)。

5.4.3 测定步骤

随机称取样品 8 g, 将样品置于干净烧杯内, 按 1:2 加入无离子水, 浸泡振荡均匀。预热 pH 计, 用标准溶液(pH6.86)校正仪器后, 测定样品悬液 pH, 边测边搅拌, 仪器读数稳定后记录。每个样品重复三次。

5.5 细度检验

5.5.1 仪器

- a. 扭力天平(分度值 0.01 g);
- b. 标准筛 孔径 0.18 mm 孔径 0.25 mm。

5.5.2 测定步骤

供检样 100 g, 经过 105℃ 烘干 1 h, 过孔径 0.18 mm 标准筛, 筛下部分占检样重量 ≥ 80%, 其他部分全部通过孔径 0.25 mm 筛, 即为合格。

5.6 有机质测定

5.6.1 仪器

- a. 瓷坩埚;
- b. 烘箱;
- c. 高温电炉;
- d. 干燥器;
- e. 扭力天平(分度值 0.01 g)。

5.6.2 测定步骤

采用灼烧减重法测定。称取样品 10 g, 置已称重的瓷坩埚中于 60℃ 烘箱中烘 4~6 h, 冷却称重 (m_0)。然后在 550~600℃ 高温电炉中灼烧 2 h, 用坩埚钳取至干燥器中, 放冷至室温, 称重 (m_1)。

5.6.3 计算公式

$$\text{有机质 \%} = \frac{m_0 - m_1}{m} \times 100 \dots\dots\dots(4)$$

式中: m_0 ——表示坩埚加烘干样品重, g;
 m_1 ——表示坩埚加灼烧后样品重, g;
 m ——表示风干后样品重, g。

5.7 有毒物质(重金属)的测定

5.7.1 汞

按 GB 7468 操作。

5.7.2 镉

按 GB 7471 操作。

5.7.3 铬

按 GB 7466 操作。

5.7.4 砷

按 GB 7485 操作。

5.7.5 铅

按 GB 7470 操作。

5.8 蛔虫卵的测定

按 GB 8172 操作。

5.9 大肠菌值的测定

按 GB 4789 操作。

6 检验规则

6.1 生产微生物肥料所使用的菌种,须在本标准菌种规定范围之内。若使用规定之外的菌种,必须经过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,效力,安全性等完整资料。以杜绝一切植物检疫对象,传染病病源作为菌种生产的产品。

6.2 本标准规定中的成品无害化指标和有效活菌数、杂菌数及有效期,是微生物肥料质量安全、有效的重要依据,一切微生物肥料的产品必须达到的指标。成品无害化检验可委托省市以上环境监测机构进行,并提供检验证明。有效活菌数、杂菌数,由农业部指定检测机构检验。本标准所规定的外观、水分、细度、有机质和 pH 值等指标,作为微生物肥料质量检验参考指标。

6.3 复合微生物肥料,是指两种以上微生物菌种的复合。不论使用何种微生物菌种、几种菌种生产,其菌种必须符合本标准(6.1)规定。而且有效活菌数:液体型不得低于 10 亿/mL 固体型不得低于 2 亿/g,颗粒型不得低于 1 亿/g。复合微生物肥料的成分中,除主体微生物外,含有其他基质成分的,其基质成分应有利于微生物肥料中的菌体生存,绝不能降低或抑制菌体的存活。因加基质成分过多、不当,微生物肥料有效活菌数过低或有效活菌数测不出来的而不达标者,则该产品不是微生物肥料。

6.4 微生物肥料应由生产厂的技术检验部门进行检验,生产厂应保证所有出厂的微生物肥料都达到本标准的要求,每批出厂的微生物肥料都应附有一定格式的质量合格证明。

6.5 微生物肥料按批检验,以每一发酵罐生产的产品为一批。

6.6 取样方法,随机抽样,以箱或袋为抽样单位。每批固体菌剂抽样 5~10 箱。每箱中抽 1 袋,无菌操作取样 100 g,混匀用四分法缩分到 500 g,供检验用。颗粒菌剂每批抽样 5 或 10 袋,无菌操作,每袋取样 0.5 kg,仔细混匀后,用四分法缩分到 500 g,以供检验用。

液体菌剂每批抽样 5 或 10 箱,每箱抽 1 瓶,无菌操作,每瓶吸取 5 mL 一同放入无菌的三角瓶中,摇均匀,瓶上粘贴标签,标明产品名称、取样日期、批号、取样人,以供检验用。

6.7 如果检验结果不符合标准规定时,应以加倍数量按规定选取试样进行检验,如仍不符合标准规定,该批产品判为不合格。

7 包装、标志、运输与贮存

7.1 微生物肥料固体菌剂内包装材料用聚乙烯薄膜袋,外用纸箱包装。液体菌剂小包装用玻璃质疫苗瓶或塑料瓶,外包装纸箱。颗粒菌剂用编织袋内衬塑料薄膜袋包装,袋口须密封牢固。

7.2 包装箱(袋)上应印有产品名称、商标、标准号、生产许可证号、生产厂名、厂址、生产日期、有效期、批号、净重、防晒、防潮、易碎、防倒置等标记。内包装袋上应印有产品名称、商标、标准号、有效细菌含量,

研制、生产单位,产品性能及使用说明。

7.3 每箱(袋)产品中附有产品合格证和使用说明书。

7.4 适用于常用运输工具,运输过程中应有遮盖物,防雨淋、防日晒及 35℃以上高温。气温低于 0℃时需用保温车(8~10℃)运输。轻装轻卸,避免破损。

7.5 微生物肥料应贮存在常温、阴凉、干燥、通风的库房内,不得露天堆放,以防雨淋和日晒,防止长时间 35℃以上高温。码放高度 \leq 130 cm。

附录 A
有效活菌数测定的选择培养基
(补充件)

A1 根瘤菌培养基:

K ₂ HPO ₄	0.5 g	1%Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2 mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	1%H ₃ BO ₃	2 mL
NaCl	0.1 g	酵母膏 1.0 g(或酵母粉 0.8 g)	
C ₆ H ₁₄ O ₆	10 g	0.5%刚果红	5 mL
CaCO ₃	1.5 g	pH	7.0

A2 固氮菌用阿须贝氏(Ashby)培养基:

KH ₂ PO ₄	0.2 g	CaCO ₃	5.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	C ₆ H ₁₄ O ₆	10.0 g
NaCl	0.2 g	CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.1 g
		pH	7.0

A3 联合固氮菌培养基:

(1)培养基:

γ—CeH ₁₁ O ₇ Na	5 g	NaCl	0.1 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g	CaCl ₂	0.02 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g	FeCl ₃	0.01 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.002 g
酵母膏	1.0 g	pH	6.8~7.0

(2)培养基:

C ₄ H ₄ O ₅ Na ₂	5 g	CaCl ₂	0.02 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.002 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g	FeCl ₃	0.01 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	BTB(0.5 g/L)	5 mL
NaCl	0.1 g	pH	7.0

A4 硅酸盐细菌培养基:

C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	5.0 g	Na ₂ HPO ₄	2.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	FeCl ₃	0.005 g
CaCO ₃	0.1 g	玻璃粉	1.0 g
		pH	7.0

A5 解磷细菌培养基:

(1)有机磷细菌培养基:

C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	10 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
---	------	---	-------

NaCl	0.3 g	KCl	0.3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.03 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.03 g	CaCO ₃	5 g
卵磷脂	0.2 g	pH	7.0~7.5
(2)无机磷细菌培养基:			
C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	10 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
NaCl	0.3 g	KCl	0.3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.03 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.03 g	Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
		pH	7.0~7.5
A6 马丁培养基(测霉菌数)			
KH ₂ PO ₄	1.0 g	C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	10.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g	蛋白胨	5.0 g
1%孟加拉红水溶液 3.3 mL			
A7 放线菌培养基(改良高氏1号)			
KNO ₃	1.0 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g	可溶性淀粉(先加少量冷水调成糊状加入)	20.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g		
NaCl	0.5 g	pH	7.2~7.4

临用时在已融化的高氏1号培养基中加入重铬酸钾溶液,以抑制细菌和霉菌生长。每300 mL培养基中加3%重铬酸钾1 mL(100 mg/kg)。

注:以上各培养基均需加入蒸馏水1 000 mL,琼脂18~20 g。

A8 刚果红染液(0.5%)

刚果红(Congored)	0.5 g
蒸馏水	100 mL

附加说明:

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由农业部中国农科院土肥所负责起草。

本标准主要起草人李元芳、宁国赞。