

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2321—2013

微生物肥料产品检验规程

Code of practice for inspection of microbial fertilizers

2013-05-20 发布

2013-08-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

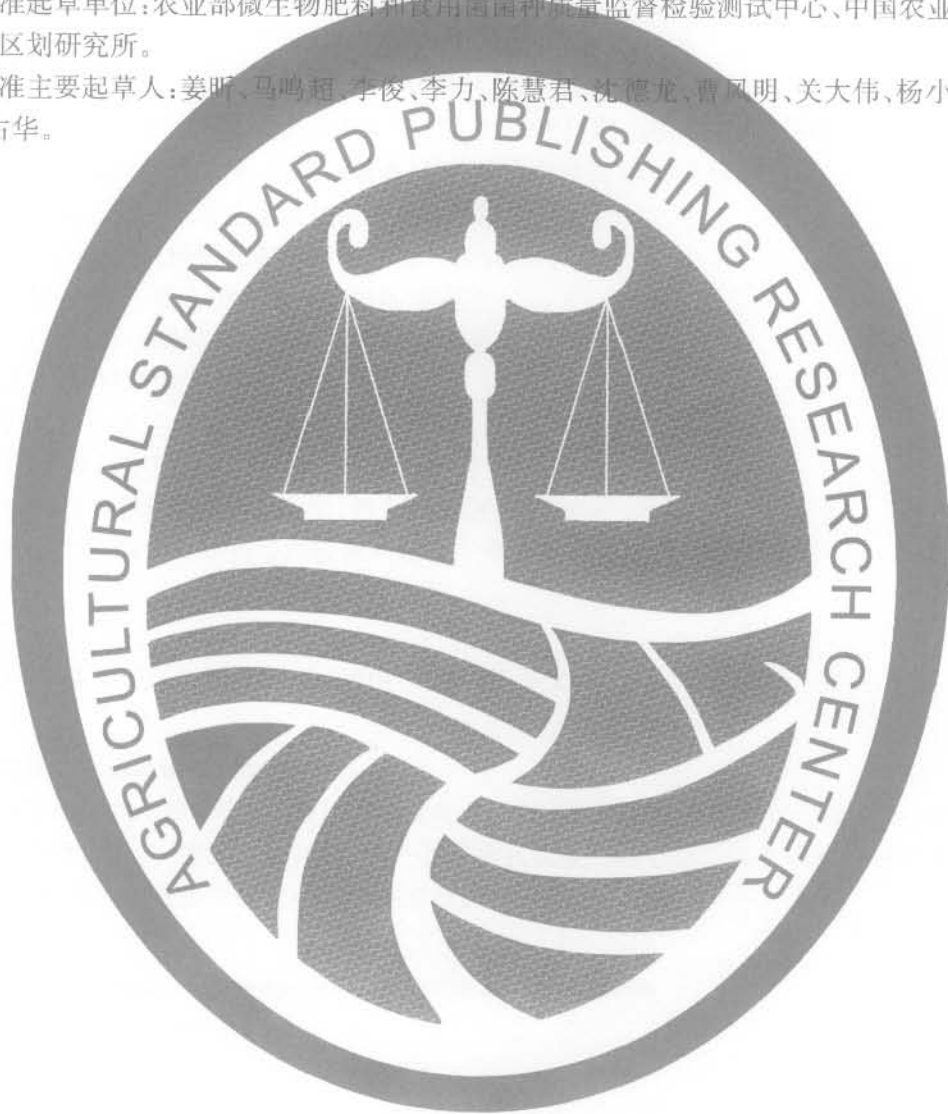
前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所。

本标准主要起草人：姜昕、马鸣超、李俊、李力、陈慧君、沈德龙、曹凤明、关大伟、杨小红、葛一凡、冯瑞华、王占华。



微生物肥料产品检验规程

1 范围

本标准规定了微生物肥料样品要求、试样制备和检测方法。
本标准适用于微生物肥料产品的质量检验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定
- 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
- NY 525 有机肥料
- NY/T 1113 微生物肥料术语
- NY/T 1736 微生物肥料菌种鉴定技术规范
- NY/T 1978 肥料汞、砷、镉、铅、铬含量的测定
- NY/T 2066 微生物肥料生产菌株的鉴别 聚合酶链式反应(PCR)法

3 术语和定义

NY/T 1113 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微生物肥料 **microbial fertilizer**

含有特定微生物活体的制品,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,提高产量,改善农产品品质及农业生态环境。微生物肥料包含农用微生物菌剂(即微生物接种剂)、复合微生物肥料和生物有机肥。

3.2

有效菌 **functional microorganism; effective microorganism**

样品中的目的微生物群体。

3.3

有效(活)菌数 **number of functional microorganism**

每克或每毫升样品中有效菌的数量。

3.4

杂菌 **contaminated microorganism**

样品中有效菌以外的其他菌。

3.5

杂菌数 **number of contaminated microorganism**

每克或每毫升样品中有效菌以外的其他菌的数量。

3.6

杂菌率 percentage of contaminated microorganism

样品中杂菌数占有效菌数与杂菌数之和的百分数。

3.7

菌落 colony

微生物在固体基质上生长繁殖形成的肉眼可见的、具有一定形态特征的细胞聚集体。

3.8

总养分 total primary nutrient

总氮(N)、磷(P₂O₅)和钾(K₂O)含量之和,以质量百分数计。

4 样品要求及试样制备

4.1 样品要求

4.1.1 样品信息记录

对待检样品进行唯一性标记编号,记录样品的名称、来源、外观、数量、生产日期、保质期、菌种名称(拉丁文学名)、取(送)样人及取(送)样时间、执行标准、检测方法、保存条件、流转、处置及保密等信息。记录信息应齐全,内容真实。

4.1.2 样品管理

样品应按产品保存要求冷藏或常温保存,在保存、制备、分样和流转过程中,避免发生混淆、污染、变质、丢失或损坏。出厂检验样品至少保存至检测结果确认后;监督抽查检验样品应按相关规定执行;仲裁检验样品及其他委托检验样品,在客户对检验报告无异议的情况下,应至少保留至检验报告发出后一个月或按有关约定处理。对已检毕的样品或保质期满的样品,应做好清理记录,并按要求处置。

4.2 试样的制备

试样应从混合均匀的样品中分取。用于有效活菌数、杂菌率、粪大肠菌群等微生物相关参数检测的试样制备,应按无菌操作的要求进行。

5 检测方法

5.1 有效活菌数

5.1.1 通则

根据样品中有效菌的种类及其特性,选用平板计数法或最可能数(Most Probable Number, MPN)法。平板计数法包括培养基平板制备、系列稀释、加样及培养、菌落识别和菌落计数5个操作步骤。最可能数(MPN)法采用5管法。采用MPN 5管法测定光合细菌数按附录A的规定执行。

5.1.2 培养基

常用培养基配方及其制备要求遵照附录B的规定。

5.1.3 仪器设备

除微生物实验室常规灭菌及培养仪器设备外,其他仪器设备如下。

5.1.3.1 超净工作台或洁净室:洁净室的洁净等级为1000级~100级。

5.1.3.2 恒温培养箱:温度分辨率不低于0.5℃,温度波动允差±1℃。

5.1.3.3 振荡器(摇床)。

5.1.3.4 电子天平:感量为0.001g。

5.1.3.5 pH计。

5.1.3.6 显微镜。

5.1.3.7 刻度吸管:0.5 mL 刻度吸管(具 0.01 mL 刻度)、5 mL 刻度吸管(具 0.1 mL 刻度)和 10 mL 刻度吸管(具 0.1 mL 刻度)等。

5.1.3.8 锥形瓶:容量 500 mL、150 mL。

5.1.3.9 培养皿:Φ9 cm。

5.1.4 操作步骤

5.1.4.1 培养基平板制备

根据有效菌的种类选用适宜的培养基。将配制并经灭菌(或除菌)的培养基温度保持在 45℃~50℃,在无菌条件下倒入无菌培养皿内,厚度范围在 3 mm~5 mm,水平放置,待其凝固后即制备成培养基平板。检测用平板应无污染,无裂痕,平整且无明显可见的冷凝水。

5.1.4.2 系列稀释

固体试样称取 10 g(精确到 0.01 g),加入带玻璃珠且装有 100 mL 无菌水的 500 mL 具塞(棉塞或硅胶塞)锥形瓶中,静置 20 min;液体试样取 10.0 mL,加入带玻璃珠且装有 90 mL 无菌水的 500 mL 具塞锥形瓶中。在振荡器上 200 r/min 混合振荡 30 min,即制成基础菌悬液。用 5 mL 或 10 mL 无菌刻度吸管吸取 5.0 mL 基础菌悬液,加入到装有 45 mL 无菌水的 150 mL 具塞锥形瓶中,充分振荡摇匀,得到 1:1×10¹ 的菌悬液;按 1:10 进行系列稀释,依次得到 1:1×10²、1:1×10³、1:1×10⁴……稀释度的菌悬液。系列稀释过程中,各个稀释度之间应更换无菌刻度吸管。

5.1.4.3 加样及培养

准确吸取 0.10 mL 菌悬液,加至培养基平板上,用无菌涂布棒将其涂布均匀,在适宜的条件下倒置培养。每个试样至少选取 3 个连续适宜稀释度的菌悬液,每一稀释度至少重复 3 次,各个稀释度之间应更换无菌涂布棒。同时以无菌水作空白对照。

5.1.4.4 菌落识别

培养结束后,观察平板上的菌落形态特征,确定存在的菌落类型;选取各类典型菌落进行涂片和染色,在显微镜下观察菌体形态,并根据有效菌的菌落、菌体等特征进行比较和确认。当不能确认有效菌时,应采用生化试验 NY/T 1736 或 NY/T 2066 中鉴别方法进行有效菌确认。当空白对照平板上出现菌落时,检测结果无效。

5.1.4.5 菌落计数

菌落计数范围应符合丝状真菌 10 个/皿~150 个/皿,其他微生物 20 个/皿~300 个/皿。选取在菌落计数范围内的稀释度平板,分别计数有效值的菌落数和计算每一稀释度上的菌落平均数。若有两个稀释度的菌落平均数均在计数范围内时,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 则以低稀释度的菌落平均数计算。同一稀释度各平板上菌落数之间的标准差按式(1)计算,并符合表 1 中的规定。

$$\delta_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

δ_{n-1} —— 标准差,单位为个每皿(个/皿);

x_i —— 同一稀释度平板的菌落数,单位为个每皿(个/皿);

\bar{x} —— 同一稀释度平板的菌落平均数,单位为个每皿(个/皿);

n —— 重复次数。

表 1 平板上有效菌菌落数对应的允许标准差

| 丝状真菌 | | 其他微生物 | |
|---------------|---------------------|---------------|-------------------------|
| 平板上菌落数 个/皿 | 允许标准差 δ_n | 平板上菌落数 个/皿 | 允许标准差 δ_{n-1} |
| 10~50 | ≤ 10.0 | 20~50 | ≤ 10.0 |
| 51~150 | ≤ 20.0 | 51~100 | ≤ 20.0 |
| | ... | 101~300 | ≤ 50.0 |

5.1.5 结果计算

有效活菌数以质量有效活菌数 n_m 或体积有效活菌数 n_v 计,数值以亿个每克(亿个/g)或亿个每毫升(亿个/mL)表示,按式(2)或式(3)计算。

$$n_m = \frac{\bar{x}k v_1 \times 10^{-8}}{m_0 v_2} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- \bar{x} —— 菌落平均数,单位为个;
- k —— 稀释倍数,为稀释度的倒数;
- v_1 —— 基础菌悬液体积,单位为毫升(mL);
- m_0 —— 固体试样量,单位为克(g);
- v_2 —— 菌悬液加样量,单位为毫升(mL);
- 10^{-8} —— 转换成单位为亿/g(mL)的换算系数。

$$n_v = \frac{\bar{x}k v_1 \times 10^{-3}}{v_2 v_3} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- v_3 —— 液体试样量,单位为毫升(mL)。

计算结果的报出值应对应的产品标准指标要求多保留一位小数,数字修约与数据处理应符合 GB/T 8170 的规定。

5.2 杂菌率

5.2.1 培养基

细菌杂菌测定采用附录 B 中营养肉汤琼脂培养基;霉菌及其他真菌杂菌的测定采用马丁培养基或 PDA 培养基。

5.2.2 仪器设备

按 5.1.3 的规定执行。

5.2.3 操作步骤

细菌杂菌、霉菌及其他真菌杂菌的测定方法同 5.1.4 的规定。

5.2.4 结果计算

细菌杂菌数、霉菌及其他真菌杂菌数的计算同 5.1.5 中式(2)或式(3)。杂菌率以 c 计,数值以%表示,按式(4)计算。

$$c = \frac{n_1 + n_2}{n_1 + n_2 + n} \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- n_1 —— 细菌杂菌数,单位为亿个每克(亿个/g)或亿个每毫升(亿个/mL);
- n_2 —— 霉菌及其他真菌杂菌总数,单位为亿个每克(亿个/g)或亿个每毫升(亿个/mL);
- n —— 有效活菌数,单位为亿个每克(亿个/g)或亿个每毫升(亿个/mL)。

计算结果保留到小数点后两位,数字修约与数据处理应符合 GB/T 8170 的规定。

5.3 有机质

有机质的测定按 NY 525 的规定执行。

5.4 总养分含量

总氮(N)和磷(P_2O_5)含量的测定按 NY 525 的规定执行。钾(K_2O)含量的测定可按附录 C 中规定的方法或 NY 525 的规定执行。

5.5 水分

5.5.1 仪器设备

5.5.1.1 鼓风干燥箱: $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

5.5.1.2 电子天平: 感量为 0.001 g。

5.5.1.3 铝盒。

5.5.2 操作步骤

将铝盒置于干燥箱中 105°C 烘 30 min, 冷却后称量并记录铝盒的质量。向铝盒中加入 20 g(精确到 0.01 g)试样并记录质量; 将加有试样的铝盒置于干燥箱中 105°C 下烘 5 h 取出, 放入干燥器中冷却 20 min 后进行称量并记录。每个试样两次平行。

5.5.3 结果计算

水分含量以 w 计, 数值以 % 表示, 按式(5)计算。

$$w = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中:

m_0 铝盒的质量, 单位为克(g);

m_1 试样和铝盒的质量, 单位为克(g);

m_2 烘干后试样和铝盒的质量, 单位为克(g)。

计算结果保留到小数点后一位, 取平行结果的算术平均值为测定结果, 两次平行结果的绝对差值应不大于 1.0, 数字修约与数据处理应符合 GB/T 8170 的规定。

5.6 细度

5.6.1 一般要求

颗粒剂型或以麸皮、米糠、豆粕、秸秆等为载体的微生物肥料产品的细度测定采用干筛法, 其他产品细度测定采用湿筛法。

5.6.2 仪器设备

5.6.2.1 鼓风干燥箱: $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

5.6.2.2 电子天平: 感量为 0.01 g。

5.6.2.3 试验筛: 孔径 $\Phi 0.18$ mm、 $\Phi 1.0$ mm、 $\Phi 2.0$ mm 和 $\Phi 4.75$ mm 等。

5.6.3 操作步骤与结果计算

5.6.3.1 湿筛法

称取 50 g(精确到 0.1 g)试样放入烧杯中, 加 200 mL 自来水浸泡 10 min~30 min 后倒入试验筛中, 然后用水冲洗, 并用刷子轻刷筛面上的试样, 直至筛下流出清水为止。将试验筛连同筛上试样放入干燥箱中, 在 105°C 烘 5 h。冷却后称量筛上试样质量。试样细度以筛下试样质量分数 s 计, 数值以 % 表示, 按式(6)计算。

$$s = \left[1 - \frac{m_1}{m_0(1-w)} \right] \times 100 \quad \dots\dots\dots (6)$$

式中:

m_0 试样质量, 单位为克(g);

w —— 试样水分含量,单位为百分率(%);

m_1 —— 经烘干后筛上试样质量,单位为克(g)。

计算结果保留到小数点后一位,数字修约与数据处理应符合 GB/T 8170 的规定。

5.6.3.2 干筛法

5.6.3.2.1 颗粒剂型试样

称取 50 g(精确到 0.1 g)试样,将小孔径和大孔径的试验筛依次叠放在底盘上。试样倒入大孔径试验筛内轻筛,直至筛上试样不再下落,然后称量小孔径试验筛上的试样质量。颗粒细度以 g_1 计,数值以%表示,按式(7)计算。

$$g_1 = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \dots\dots\dots (7)$$

式中:

m_1 —— 小孔径试验筛上试样质量,单位为克(g);

m_0 —— 试样质量,单位为克(g)。

计算结果保留到小数点后一位,数字修约与数据处理应符合 GB/T 8170 的规定。

5.6.3.2.2 粉状剂型试样

称取 50 g(精确到 0.1 g)试样放入试验筛中,用刷子轻刷筛面上的试样,直至筛上试样不再下落,称量筛下试样质量。试样细度以筛下试样质量分数 g_2 计,数值以%表示,按式(8)计算。

$$g_2 = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \dots\dots\dots (8)$$

式中:

m_1 —— 筛下试样质量,单位为克(g);

m_0 —— 试样质量,单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后一位,数字修约与数据处理应符合 GB/T 8170 的规定。

5.7 pH

5.7.1 试剂与材料

水应符合 GB/T 6682 中三级水的要求。

5.7.1.1 pH 4.00(25℃)的标准溶液

5.7.1.2 pH 6.86(25℃)的标准溶液

5.7.1.3 pH 9.18(25℃)的标准溶液

5.7.2 仪器设备

5.7.2.1 pH 计。

5.7.2.2 电子天平;感量为 0.1 g。

5.7.3 操作步骤

5.7.3.1 打开 pH 计电源预热 30 min,用标准溶液校准。

5.7.3.2 用量筒量取 40 mL 液体试样放入烧杯中,用 pH 计测定,仪器读数稳定后记录。每个试样两次平行。

5.7.3.3 称取 15 g 固体试样放入烧杯中,根据基质类型按 1:(2~5)(试样:水)的质量比加入无离子水,搅拌均匀。放置 30 min,用 pH 计测定,仪器读数稳定后记录。每个试样两次平行。

5.7.4 结果计算

计算结果保留到小数点后一位,取平行测定结果的算术平均值为测定结果,两次测定结果的绝对差值应不大于 0.1,数字修约与数据处理应符合 GB/T 8170 的规定。

5.8 粪大肠菌群数

按 GB/T 19524.1 的规定执行。粪大肠菌群数测定流程及最可能数(MPN)检索表参见附录 D。

5.9 蛔虫卵死亡率

按 GB/T 19524.2 的规定执行。

5.10 汞(Hg)、砷(As)、镉(Cd)、铅(Pb)、铬(Cr)

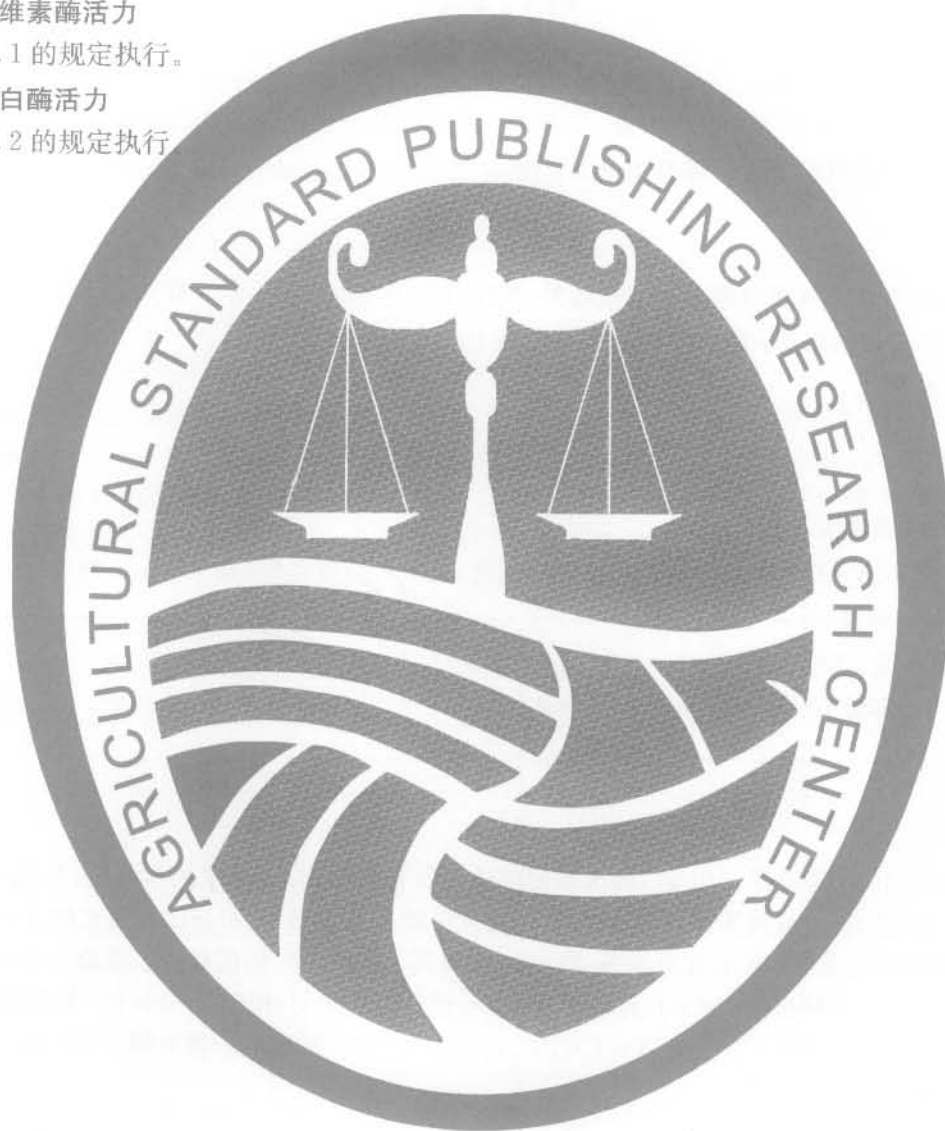
按 NY/T 1978 的规定执行。

5.11 纤维素酶活力

按 E.1 的规定执行。

5.12 蛋白酶活力

按 E.2 的规定执行。



附录 A
(规范性附录)
MPN 5 管法

A.1 试剂和材料

常用培养基配方及其制备要求符合附录 B 的规定。

A.2 仪器设备

除微生物实验室常规灭菌及培养仪器设备外,其他仪器设备如下。

- A.2.1 超净工作台或洁净室:洁净室的洁净等级为 1000~100 级。
- A.2.2 光照培养箱。
- A.2.3 振荡器(摇床)。
- A.2.4 pH 计。
- A.2.5 电子天平:感量为 0.001 g。
- A.2.6 刻度吸管:0.5 mL 刻度吸管(具 0.01 mL 刻度)、5 mL 刻度吸管(具 0.1 mL 刻度)和 10 mL 刻度吸管(具 0.1 mL 刻度)等。
- A.2.7 锥形瓶:容量 500 mL、150 mL。
- A.2.8 螺口试管:容量 10 mL。

A.3 操作步骤

A.3.1 稀释

固体试样称取 10 g(精确到 0.01 g),加入带玻璃珠且装有 100 mL 无菌水的 500 mL 具塞(棉塞或硅胶塞)锥形瓶中,静置 20 min;液体试样取 10.0 mL 加入带玻璃珠且装有 90 mL 无菌水的 500 mL 具塞锥形瓶中。在振荡器上 200 r/min 充分振荡 30 min,即得到 1:1×10¹ 的菌悬液。吸取 5.0 mL 上述菌悬液,加入装有 45 mL 无菌水的 150 mL 具塞锥形瓶中,充分振荡摇匀,得到 1:1×10² 的菌悬液;按 1:10 进行系列稀释,依次得到 1:1×10³、1:1×10⁴、1:1×10⁵……稀释度的菌悬液。系列稀释过程中,各个稀释度之间应更换无菌吸管。

A.3.2 加样

选择适宜的 5 个连续稀释度的菌悬液,分别吸取 1.0 mL 不同稀释度的菌悬液至无菌螺口试管中,并用无菌培养基充满。每一稀释度重复 5 次,不同稀释度间更换无菌吸管。同时以无菌水作空白对照。

A.3.3 培养

加样后拧紧塑料帽并摇匀,将螺口试管放到适宜的条件下培养。

A.4 结果计算

根据出现光合细菌生长的阳性试管数,查“MPN(最大可能数),lgMPN 表”(表 A.1)即可计算出光合细菌的有效活菌数,以 *n* 计,数值以亿个每克(亿个/g)或亿个每毫升(亿个/mL)表示,按式(A.1)计算:

$$n = s \times k \times 10^{-6} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

s —— 函数近似值;

k —— 数量指标第一位数的稀释倍数;

10^{-k} —— 转换成单位为亿/g(mL)的换算系数。

计算结果的报出值保留一位或两位小数,数字修约与数据处理应符合 GB/T 8170 的规定。

A.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均为阳性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。

A.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。

示例:

为 5-5-3-0-0 时,则取 5-3-0 数列。

A.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。

示例:

为 5-3-0-0-0 时,则取 5-3-0 数列。

A.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), $(1.447+1.431)/2=1.439$,所以 MPN=27.5。

表 A.1 MPN,lgMPN 表

| 阳性试管数 | | | MPN (相当于第一 稀释管 1 mL) | lgMPN | 阳性试管数 | | | MPN (相当于第一 稀释管 1 mL) | 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 B
(规范性附录)
常用检测培养基

B.1 营养肉汤琼脂培养基

B.1.1 成分

| | |
|-----------|-----------|
| 蛋白胨 | 10.0 g |
| 牛肉膏 | 3.0 g |
| 氯化钠(NaCl) | 5.0 g |
| 琼脂 | 15 g~20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| pH | 7.0~7.2 |

B.1.2 配制要点

将各种成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 后加入琼脂,加热溶化后分装。121℃ 灭菌 30 min。不耐高温需过滤除菌的成分,应在培养基灭菌后温度不高于 50℃ 时加入。

B.2 阿须贝氏(Ashby)培养基

B.2.1 成分

| | |
|--|-----------|
| 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 |
| 琼脂 | 15 g~20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| pH | 6.8~7.0 |

B.2.2 配制要点

同 B.1.2。

B.3 根瘤菌培养基

B.3.1 成分

| | |
|---|---------------|
| 磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) | 0.5 g |
| 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 0.2 g |
| 氯化钠(NaCl) | 0.1 g |
| 甘露醇($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$) | 10.0 g |
| 酵母浸膏或酵母浸粉 | 1.0 g 或 0.8 g |
| 0.5%刚果红溶液 | 5.0 mL |

| | |
|-----|-----------|
| 琼脂 | 15 g~20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| pH | 6.8~7.0 |

B.3.2 配制要点

将刚果红配制成 0.5% 的溶液,按量加入到其他成分中,其他同 B.1.2。

B.4 硅酸盐细菌培养基

B.4.1 成分

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 蔗糖($C_{12}H_{22}O_{11}$) | 5.0 g |
| 磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) | 2.0 g |
| 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0.5 g |
| 碳酸钙($CaCO_3$) | 0.1 g |
| 0.5%三氯化铁($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)溶液 | 1.0 mL |
| 琼脂 | 15 g~20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| pH | 7.2~7.4 |

B.4.2 配制要点

将三氯化铁配制成 0.5% 的溶液,按量加入到其他成分中,其他同 B.1.2。

B.5 固氮(茎瘤)根瘤菌培养基

B.5.1 成分

| | |
|------------------------------------|---------------|
| 乳酸钠($C_3H_5O_2Na$) | 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($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) | 0.04 g |
| 0.4%三氯化铁($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)溶液 | 1.0 mL |
| 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0.1 g |
| 酵母浸膏或酵母浸粉 | 1.0 g 或 0.8 g |
| 琼脂 | 15 g~20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| pH | 6.8~7.0 |

B.5.2 配制要点

将三氯化铁配制成 0.4% 的溶液,按量加入到其他成分中,其他同 B.1.2。

B.6 马丁(Martin)培养基

B.6.1 成分

| | |
|----------------------------------|--------|
| 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 |

| | |
|-----|-----------|
| 琼脂 | 15 g~20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |

B.6.2 配制要点

将孟加拉红配制成1%的水溶液,按量加入到其他成分中,其他同B.1.2。当需抑制细菌等原核微生物生长时,可添加氯霉素,氯霉素应先用几滴乙醇溶解后,加入到培养基中,使其终浓度达到0.01%。

B.7 改良高氏一号琼脂培养基**B.7.1 成分**

| | |
|--|-----------|
| 硝酸钾(KNO ₃) | 1.0 g |
| 磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O) | 0.5 g |
| 硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 0.5 g |
| 氯化钠(NaCl) | 0.5 g |
| 硫酸亚铁(FeSO ₄ ·7H ₂ O) | 0.01 g |
| 可溶性淀粉(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n | 20.0 g |
| 琼脂 | 15 g~20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| pH | 7.2~7.4 |

B.7.2 配制要点

将可溶性淀粉用适量冷水浸湿后缓慢加热,并轻轻搅拌调成糊状,再加入到其他成分中,其他同B.1.2。当需抑制细菌和真菌生长时,可添加重铬酸钾(K₂Cr₂O₇),重铬酸钾先配制成5%的溶液,倒平板时再加入到培养基中,使其浓度达到0.005%。

B.8 联合固氮菌培养基**B.8.1 成分**

| | |
|--|---------------|
| D-葡萄糖酸钠(C ₆ H ₁₁ O ₇ Na) | 5.0 g |
| 磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄) | 0.4 g |
| 磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O) | 0.1 g |
| 硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 0.2 g |
| 酵母浸膏或酵母浸粉 | 1.0 g 或 0.8 g |
| 氯化钠(NaCl) | 0.1 g |
| 氯化钙(CaCl ₂ ·2H ₂ O) | 0.02 g |
| 三氯化铁(FeCl ₃ ·6H ₂ O) | 0.01 g |
| 0.2%钼酸钠(Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)溶液 | 1.0 mL |
| 琼脂 | 15 g~20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| pH | 6.8~7.0 |

B.8.2 配制要点

将钼酸钠(Na₂MoO₄·2H₂O)配制成0.2%的溶液,按量加入其他成分中,其他同B.1.2。

B.9 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)**B.9.1 成分**

| | |
|-----|-------|
| 马铃薯 | 200 g |
|-----|-------|

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 葡萄糖($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) | 20.0 g |
| 琼脂 | 15 g~20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |

B.9.2 配制要点

称取去皮马铃薯 200 g 切成约 1 cm³ 小块,放入适量蒸馏水中煮沸 30 min,然后用双层纱布过滤取汁,再加葡萄糖和琼脂,加热溶化后补足水至 1000 mL,分装,121℃灭菌 30 min。当需抑制细菌等原核微生物生长时,可添加氯霉素,氯霉素应先用少量乙醇溶解后,加入到培养基中,使其终浓度达到 0.01%。

B.10 乳酸细菌培养基(MRS)

B.10.1 成分

| | |
|--|---------------|
| 蛋白胨 | 10.0 g |
| 牛肉膏 | 10.0 g |
| 酵母浸膏或酵母浸粉 | 5.0 g 或 4.0 g |
| 柠檬酸氢二铵[(NH_4) ₂ HC ₆ H ₅ O 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 | 15 g~20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| pH | 6.2~6.6 |

B.10.2 配制要点

同 B.1.2。

B.11 光合细菌培养基

B.11.1 成分

| | |
|-----------------------------|---------------|
| 酵母浸膏或酵母浸粉 | 3.0 g 或 2.4 g |
| 蛋白胨 | 3.0 g |
| 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0.5 g |
| 氯化钙($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) | 0.3 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| pH | 6.8~7.0 |

B.11.2 配制要点

同 B.1.2。

B.12 固氮类芽孢杆菌培养基

B.12.1 成分

| | |
|-----|--------|
| 蔗糖 | 10.0 g |
| 蛋白胨 | 1.0 g |

| | |
|--|---------------|
| 酵母浸膏或酵母浸粉 | 1.0 g 或 0.8 g |
| 氯化钠(NaCl) | 0.01 g |
| 碳酸钙(CaCO ₃) | 5.0 g |
| 磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O) | 0.08 g |
| 磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄) | 0.2 g |
| 硫酸镁(MgSO ₄ · 7H ₂ O) | 0.5 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| 琼脂 | 15 g ~ 20 g |
| pH | 7.2 ~ 7.4 |

B. 12.2 配制要点

同 B. 1. 2。

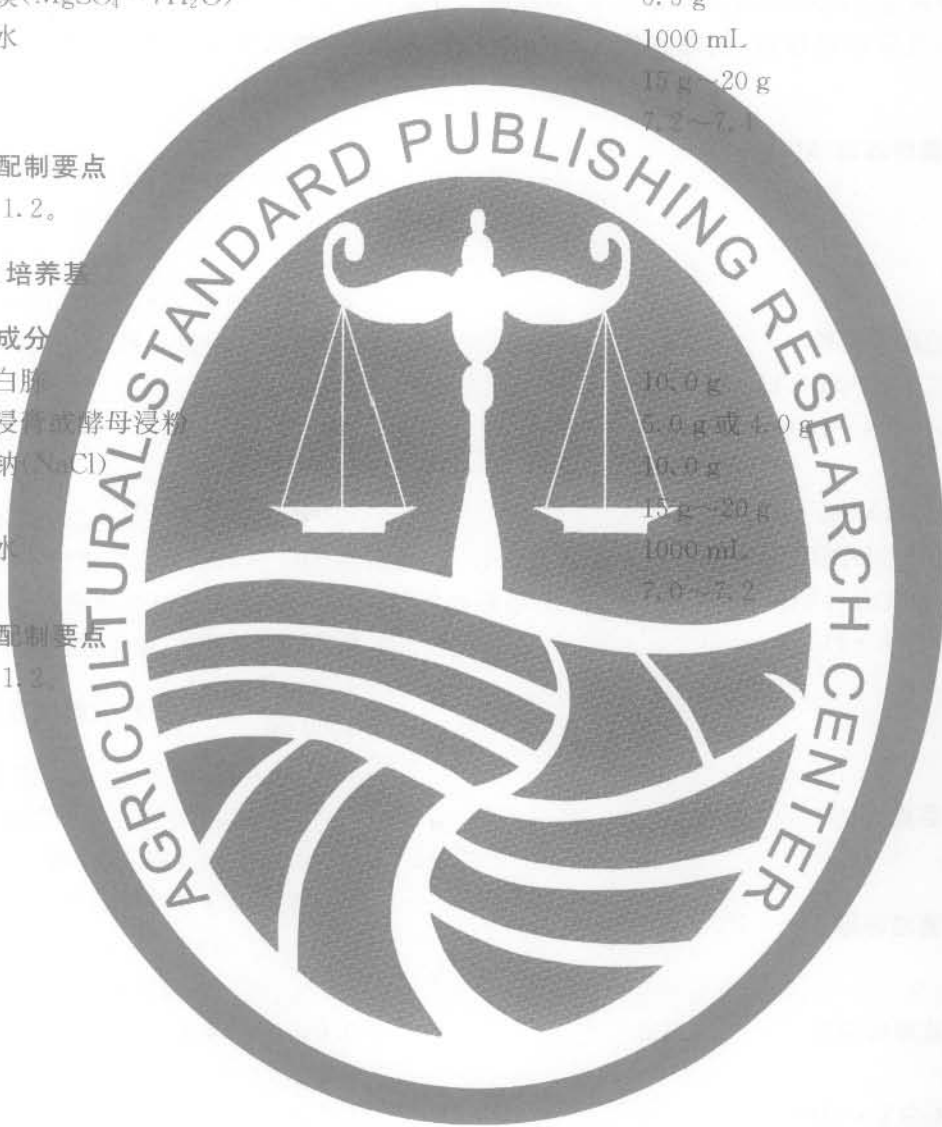
B. 13 LB 培养基

B. 13.1 成分

| | |
|-----------|---------------|
| 胰蛋白酶 | 10.0 g |
| 酵母浸膏或酵母浸粉 | 5.0 g 或 4.0 g |
| 氯化钠(NaCl) | 10.0 g |
| 琼脂 | 15 g ~ 20 g |
| 蒸馏水 | 1000 mL |
| pH | 7.0 ~ 7.2 |

B. 13.2 配制要点

同 B. 1. 2。



附录 C

(规范性附录)

微生物肥料中钾含量的测定 原子吸收分光光度计法

C.1 原理

试样经硫酸和过氧化氢消化,使其中的钾全部消解。消解液稀释后直接吸入空气—乙炔火焰中原子化,其中所产生的钾原子蒸汽吸收特定波长的光,在一定的浓度范围内其吸光度与钾浓度成正比,与标准系列比较定量。

C.2 试剂和材料

除非另有规定,本方法所用试剂均为分析纯,水应符合 GB/T 6682 中二级水要求。

C.2.1 硫酸($\rho=1.84$)。

C.2.2 过氧化氢(30%)。

C.2.3 钾标准储备溶液($\rho=1000$ mg/L,购国家标准溶液或用基准试剂配置)。C.2.4 钾标准溶液($\rho=100$ mg/L):用单标线吸管准确吸取 10 mL 1000 mg/L 钾标准储备溶液于 100 mL 容量瓶中,用水定容,此溶液即浓度为 100 mg/L 钾标准溶液。

C.3 仪器设备

实验室常用仪器设备。

C.3.1 原子吸收分光光度计,附钾空心阴极灯。

C.3.2 可调式电热板或电炉。

C.3.3 天平:感量 0.1 mg。

C.3.4 高腰烧杯,容积 150 mL 或 250 mL,及相配的表面皿。

C.4 操作步骤

C.4.1 建立标准曲线方程

吸取 0 mL、2.00 mL、5.00 mL、7.00 mL、10.00 mL、12.00 mL、15.00 mL 钾标准溶液(100 mg/L)置于 7 个 100 mL 容量瓶中,用水定容,混匀,此溶液为 1 mL 含钾(K)0 μ g、2.00 μ g、5.00 μ g、7.00 μ g、10.00 μ g、12.00 μ g、15.00 μ g 的标准溶液系列。

调节仪器测定条件至适宜的灵敏度及较好稳定性,于波长 766.5 nm 处,依次吸入并测定各标准溶液吸光值,根据其钾浓度和吸光度建立标准曲线方程。

C.4.2 试样制备

将固体试样研磨过 $\Phi 0.5$ mm 试验筛,液体试样摇匀后待用。

C.4.3 试样消解

称取 0.5 g(精确至 0.0001 g)试样,置于高腰烧杯中;用少量水冲洗沾附在瓶壁上的试样,加 5.0 mL 硫酸和 1.5 mL 过氧化氢,小心摇匀,盖上表面皿,放置过夜;在可调电炉上或电热板缓慢升温至硫酸冒烟,取下稍冷;加 15 滴过氧化氢,加热 10 min,取下稍冷后分次再加 5 滴~10 滴过氧化氢并继续消煮,直至溶液呈无色或黄色清液。取下稍冷,小心加水 20 mL~30 mL,加热至沸。取下冷却,用少量水多次冲洗表面皿,洗液收入原高腰烧杯中。移入 250 mL 容量瓶中,加水定容,静置澄清或用无磷滤纸过

滤备用。空白对照除不称取试样外,均按上述步骤进行。每个试样需做两个平行。

C.4.4 待测溶液的测定

用刻度吸管准确吸取 5 mL 澄清或已过滤待测溶液于 50 mL 容量瓶中,用水定容、混匀。吸取量可根据待测溶液中钾含量适当减少,使待测溶液的钾浓度处于标准曲线范围内。与标准曲线同样测试条件下测定待测溶液的吸光值,用标准曲线方程计算待测溶液钾浓度。

C.5 结果计算

钾含量以氧化钾(K₂O)的质量分数 w 计,数值以 % 表示,按式(C.1)计算:

$$w = \frac{(\rho_1 - \rho_0) \cdot V \cdot D \times 1.20}{m \times 10^6} \times 100 \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

- ρ_1 ——由标准曲线求得待测溶液钾浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- ρ_0 ——由标准曲线求得空白对照钾浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- V ——消解试样所定容体积,本操作为 250,单位为毫升(mL);
- D ——稀释倍数,待测溶液定容体积/分取体积;
- m ——称取试样质量,单位为克(g);
- 1.20 ——将 K 换算成 K₂O 的因数;
- 10⁶ ——将 μg 换算为 g 的因数。

计算结果保留至两位小数,数字修约与数据处理应符合 GB/T 8170 的规定。

C.6 允许差

取两次平行测定结果的算术平均值作为试样测定结果,两个平行测定结果允许绝对差值应符合表 C.1 的要求。

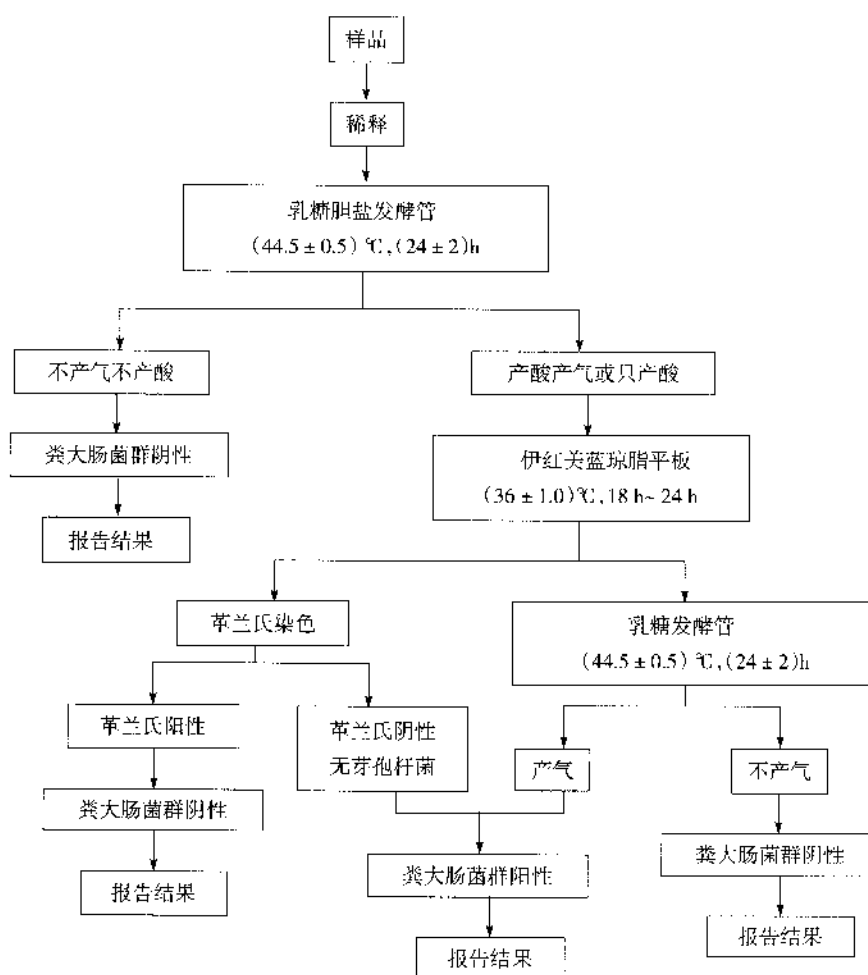
表 C.1 允许绝对差

| 钾含量(K ₂ O) % | 允许差 % |
|-------------------------------|----------|
| K ₂ O ≤ 1.2 | ≤ 0.07 |
| 1.2 < K ₂ O ≤ 2.0 | ≤ 0.09 |
| 2.0 < K ₂ O ≤ 10.0 | ≤ 0.20 |
| K ₂ O > 10.0 | ≤ 0.30 |

附录 D
(资料性附录)

粪大肠菌群数测定流程及最可能数(MPN)检索表

D.1 粪大肠菌群数测定流程



D.2 粪大肠菌群数最可能数(MPN)检索表

表 D.1 最可能数(MPN)检索表

| 阳性管数 | | | MPN 1 g(mL) | 95%可信限 | |
|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|--------|----|
| 10 ⁻¹ ×3 | 10 ⁻² ×3 | 10 ⁻³ ×3 | | 下限 | 上限 |
| 0 | 0 | 0 | <3 | <0.5 | 9 |
| 0 | 0 | 1 | 3 | | |
| 0 | 0 | 2 | 6 | | |
| 0 | 0 | 3 | 9 | | |

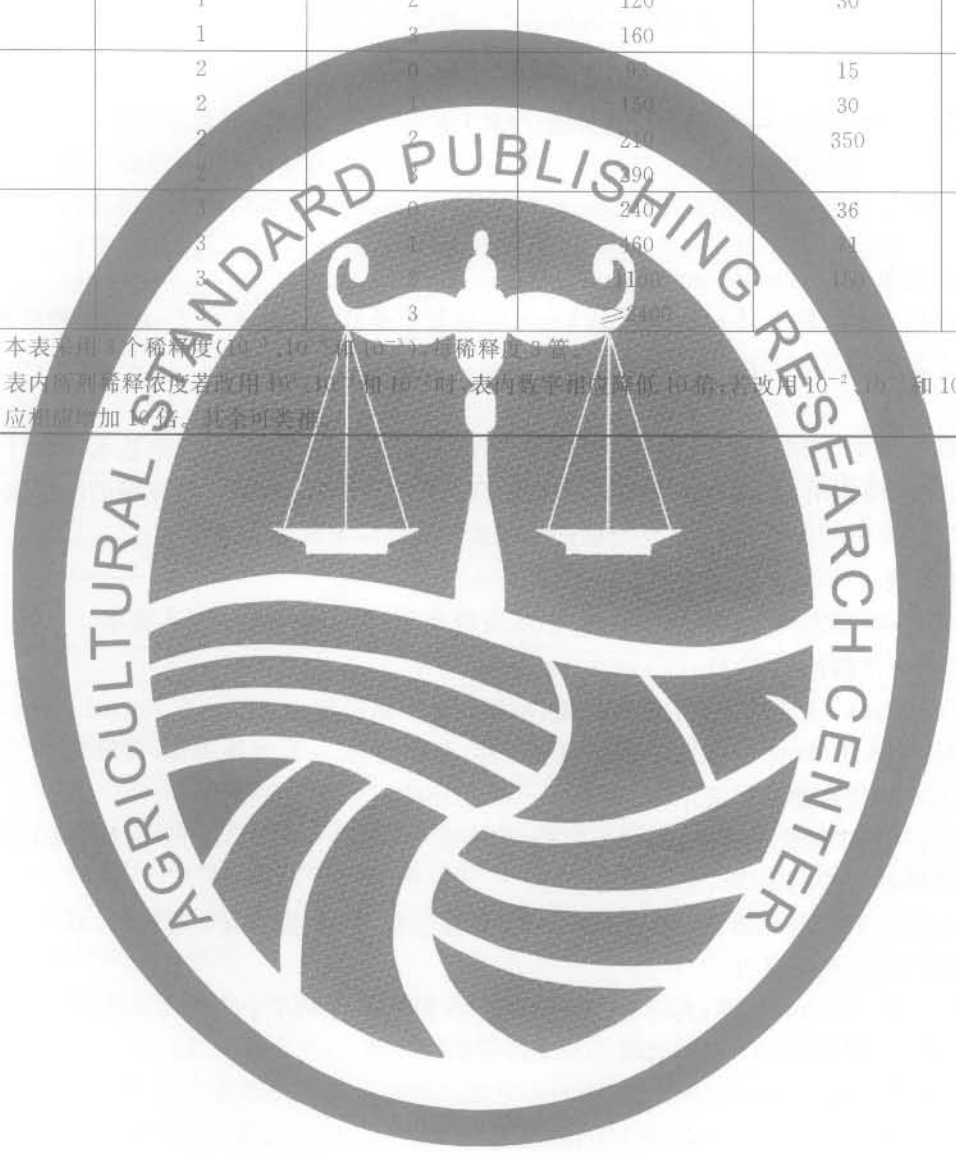
表 D.1 (续)

| 阳 性 管 数 | | | MPN 1 g(mL) | 95%可信限 | |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------|-----|
| $10^{-1} \times 3$ | $10^{-2} \times 3$ | $10^{-3} \times 3$ | | 下限 | 上限 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | <0.5 | 13 |
| 0 | 1 | 1 | 6 | | |
| 0 | 1 | 2 | 9 | | |
| 0 | 1 | 2 | 12 | | |
| 0 | 2 | 0 | 6 | | |
| 0 | 2 | 1 | 9 | | |
| 0 | 2 | 2 | 12 | | |
| 0 | 2 | 2 | 16 | | |
| 0 | 3 | 0 | 9 | | |
| 0 | 3 | 1 | 13 | | |
| 0 | 3 | 2 | 11 | | |
| 0 | 3 | 3 | 15 | | |
| 1 | 0 | 0 | 3 | 0.5 | 20 |
| 1 | 0 | 1 | 7 | 1 | 21 |
| 1 | 0 | 2 | 11 | | |
| 1 | 0 | 3 | 15 | | |
| 1 | 1 | 0 | 7 | | 23 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | | 36 |
| 1 | 1 | 2 | 15 | | |
| 1 | 1 | 3 | 19 | | |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 3 | 36 |
| 1 | 2 | 1 | 15 | | |
| 1 | 2 | 2 | 20 | | |
| 1 | 2 | 3 | 24 | | |
| 1 | 3 | 0 | 16 | | |
| 1 | 3 | 1 | 20 | | |
| 1 | 3 | 2 | 24 | | |
| 1 | 3 | 3 | 29 | | |
| 2 | 0 | 0 | 9 | 1 | 36 |
| 2 | 0 | 1 | 13 | 3 | 37 |
| 2 | 0 | 2 | 20 | | |
| 2 | 0 | 3 | 26 | | |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 3 | 44 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 7 | 89 |
| 2 | 1 | 2 | 27 | | |
| 2 | 1 | 3 | 34 | | |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 4 | 47 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | 10 | 150 |
| 2 | 2 | 2 | 35 | | |
| 2 | 2 | 3 | 42 | | |
| 2 | 3 | 0 | 29 | | |
| 2 | 3 | 1 | 36 | | |
| 2 | 3 | 2 | 44 | | |
| 2 | 3 | 3 | 53 | | |
| 3 | 0 | 0 | 23 | 4 | 120 |
| 3 | 0 | 1 | 39 | 7 | 130 |
| 3 | 0 | 2 | 64 | 15 | 380 |
| 3 | 0 | 3 | 95 | | |

表 D.1 (续)

| 阳性管数 | | | MPN 1 g(mL) | 95%可信限 | |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------|------|
| $10^{-1} \times 3$ | $10^{-2} \times 3$ | $10^{-3} \times 3$ | | 下限 | 上限 |
| 3 | 1 | 0 | 43 | 7 | 210 |
| 3 | 1 | 1 | 75 | 14 | 230 |
| 3 | 1 | 2 | 120 | 30 | 380 |
| 3 | 1 | 3 | 160 | | |
| 3 | 2 | 0 | 95 | 15 | 380 |
| 3 | 2 | 1 | 150 | 30 | 440 |
| 3 | 2 | 2 | 210 | 350 | 470 |
| 3 | 2 | 3 | 290 | | |
| 3 | 3 | 0 | 240 | 36 | 1300 |
| 3 | 3 | 1 | 460 | 71 | 2400 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 190 | 4800 |
| 3 | 3 | 3 | 2400 | | |

注1: 本表采用3个稀释度(10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3}),每稀释度3管。
 注2: 表内所列稀释浓度若改用 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 时,表内数字相应降低10倍;若改用 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 时,表内数字应相应增加10倍,其余可类推。



附录 E
(规范性附录)
有机物料腐熟剂产品酶活力的测定

E.1 纤维素酶活力的测定——羧甲基纤维素钠(CMC)法**E.1.1 术语和定义****E.1.1.1**

纤维素酶活力单位 cellulase activity unit

在 50℃ 和 pH 5.0 条件下,1 g(mL)样品 1 min 降解羧甲基纤维素钠产生 1 μg 葡萄糖所需的酶量,定义为 1 个酶活力单位,以 U/g (mL)表示。

E.1.2 原理

用羧甲基纤维素钠(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。可采用比色法测定还原糖的含量,进而从还原糖的数量来计算纤维素酶活力。

E.1.3 试剂和溶液

除非另有规定,本方法所用试剂均为分析纯,水应符合 GB/T 6682 中三级水要求。

E.1.3.1 葡萄糖标准溶液: $\rho(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = 1 \text{ mg/mL}$ 。

将葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)于 105℃ 下干燥至恒重,称取 0.1 g(精确到 0.001 g)于 100 mL 小烧杯中,用少量蒸馏水溶解后,移入 100 mL 容量瓶中用蒸馏水定容,充分混匀。4℃ 冰箱保存,有效期 14 d。

E.1.3.2 pH 5.0 的柠檬酸缓冲液: $\rho(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7) = 0.05 \text{ mol/L}$ 。

A 液(0.1 mol/L 柠檬酸溶液):称取 21.014 g 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$),用少量蒸馏水溶解后,移入 1000 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,充分混匀。

B 液(0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液):称取 29.412 g 柠檬酸钠,用少量蒸馏水溶解后,移入 1000 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,充分混匀。

取 205 mL A 液,295 mL B 液,充分混匀并用适量 A 液或 B 液调节 pH 至 5.0,移入 1000 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,即为 0.05 mol/L pH 5.0 的柠檬酸缓冲液。

E.1.3.3 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol/L}$ 。

称取 8 g 氢氧化钠(NaOH),溶于 100 mL 蒸馏水中。

E.1.3.4 3,5-二硝基水杨酸(DNS)溶液。称取 6.3 g 3,5-二硝基水杨酸(DNS)于 500 mL 大烧杯中,用少量蒸馏水溶解后,加入 262 mL 氢氧化钠溶液(2 mol/L),再将其倒入 500 mL 含有 185 g 酒石酸钾钠的热水溶液中,然后加 5.0 g 结晶苯酚、5.0 g 无水亚硫酸钠,搅拌均匀至溶解,冷却后移入 1000 mL 容量瓶中定容,充分混匀。储存于棕色瓶中,室温放置 7 d 后使用,有效期 6 个月。

E.1.3.5 0.51%羧甲基纤维素钠(CMC)溶液。称取 0.51 g 羧甲基纤维素钠(CMC)于 100 mL 烧杯中,加入适量 0.05 mol/L pH 5.0 的柠檬酸缓冲液,加热溶解后移入 100 mL 容量瓶中,并用 0.05 mol/L pH 5.0 的柠檬酸缓冲液定容至 100 mL,用前充分摇匀。4℃ 冰箱中保存备用,有效期 3 d。

E.1.4 仪器设备

实验室常用仪器设备。

E.1.4.1 分光光度计。

- E. 1.4.2 电子天平:感量为 0.1 mg。
 E. 1.4.3 恒温水浴锅:50℃±0.2℃。
 E. 1.4.4 离心机。
 E. 1.4.5 粉碎机或研钵。
 E. 1.4.6 试验筛:Φ2.0 mm。
 E. 1.4.7 具塞刻度试管:20.0 mL。

E. 1.5 分析步骤

E. 1.5.1 建立葡萄糖标准曲线方程

取 7 支洗净干燥的 20 mL 具塞刻度试管,编好号后按表 E.1 加入葡萄糖溶液和蒸馏水,配制一系列不同浓度的葡萄糖溶液,摇匀。向各试管中加入 1.5 mL DNS 溶液,摇匀后沸水浴 5 min,取出冷却后用蒸馏水定容至 20.0 mL,混匀;在 540 nm 波长下,依次测定各管的吸光度。以葡萄糖含量(μg)为纵坐标,以对应的吸光度为横坐标,建立线性回归方程。

表 E.1 配置不同浓度的葡萄糖溶液

| 管号 | 葡萄糖标准溶液加入量 mL | 蒸馏水 mL | 葡萄糖含量 μg |
|----|------------------|-----------|-------------|
| 1 | 0 | 2.0 | 0 |
| 2 | 0.2 | 1.8 | 200 |
| 3 | 0.4 | 1.6 | 400 |
| 4 | 0.6 | 1.4 | 600 |
| 5 | 0.8 | 1.2 | 800 |
| 6 | 1.0 | 1.0 | 1 000 |
| 7 | 1.2 | 0.8 | 1 200 |

E. 1.5.2 待测酶液的制备

固体试样应粉碎过 Φ2.0 mm 试验筛,液体试样应充分混合均匀。称取 5.0 g(精确至 0.001 g)固体试样或准确吸取 5.0 mL 液体试样,加入装有 50 mL(固体试样)或 45 mL(液体试样)pH 5.0 柠檬酸缓冲液且带有玻璃珠的 150 mL 锥形瓶中,在振荡器上 200 r/min 振荡 30 min,吸取适量悬液以 3000×g 离心力离心 3 min~5 min;离心后的上清液即为待测酶液。每个试样需做两个平行。

E. 1.5.3 纤维素酶活力测定

E. 1.5.3.1 将待测酶液放入 50℃ 恒温水浴中,预热 5 min。

E. 1.5.3.2 吸取 1.5 mL 0.51% 羧甲基纤维素钠(CMC)溶液放入 20 mL 具塞刻度试管中,加入 1.5 mL DNS 溶液,在 50℃ 水浴中预热 5 min。加入 0.5 mL 待测酶液,充分摇匀,在 50℃ 水浴中反应 30 min 后立即取出,即为空白管。

E. 1.5.3.3 吸取 1.5 mL 0.51% 羧甲基纤维素钠(CMC)溶液放入 20 mL 具塞刻度试管中,50℃ 水浴中预热 5 min。加入 0.5 mL 待测酶液,充分摇匀,在 50℃ 水浴中反应 30 min 后立即取出,加入 1.5 mL DNS 溶液,混合均匀,即为试样管。

E. 1.5.3.4 将试样管和空白管同时沸水浴 5 min,取出后快速冷却,用蒸馏水定容至 20.0 mL,充分摇匀。

E. 1.5.3.5 在分光光度计 540 nm 波长下,以空白管溶液调节仪器零点,并测定试样管溶液的吸光度。若其吸光值超出标准曲线范围,应根据酶活力大小将待测酶液稀释至适当浓度后按上述步骤重新测定。

E. 1.6 纤维素酶活力计算

纤维素酶活力以质量纤维素酶活力 X_m 或体积纤维素酶活力 X_v 计,数值以酶活力单位每克(U/g)或酶活力单位每毫升(U/mL)表示,按式(E.1)或式(E.2)计算。

$$X_m = \frac{(AK + b) \times V_1 \times D}{V_2 \times m \times 30} \dots\dots\dots (E.1)$$

式中:

- A —— 试样吸光度;
- K —— 标准曲线斜率;
- b —— 标准曲线截距;
- V₁ —— 酶液定容体积,本操作为 50,单位为毫升(mL);
- V₂ —— 反应液中待测酶液加入量,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量,单位为克(g);
- D —— 待测酶液的稀释倍数;
- 30 —— 反应时间 30 min(以 1 min 计酶活)。

$$X_v = \frac{(AK + b) \times V_1 \times D}{V_2 \times V \times 30} \dots\dots\dots (E.2)$$

式中:

V —— 试样体积,单位为毫升(mL)。

计算结果保留一位小数,数字修约与数据化处理应符合 GB/T 8170 的规定。

E.1.7 允许差

取两次平行测定结果的算术平均值作为试样测定结果,平行测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

E.2 蛋白酶活力的测定——福林法

E.2.1 术语和定义

E.2.2.1

蛋白酶活力单位 Proteinase activity unit

在 40℃ 和 pH 8.5 条件下,1 g(mL) 样品 1 min 水解酪素产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量,定义为 1 个酶活力单位,以 U/g(mL) 表示。

E.2.2 原理

蛋白酶在一定的温度与 pH 下,水解酪蛋白底物,产生含有酚基的氨基酸(如:酪氨酸、色氨酸等),在碱性条件下,将福林试剂(Folin)还原,生成相蓝与钨蓝,用分光光度计于波长 680 nm 下测定溶液的吸光度。酶活力与吸光度成比例,由此可以计算蛋白酶活力。

E.2.3 试剂和溶液

除非另有规定,本方法所用试剂均为分析纯,水应符合 GB/T 6682 中三级水要求。

E.2.3.1 福林试剂。于 2000 mL 磨口回流装置中加入 100 g 钨酸钠(Na₂WO₄ · 2H₂O)、25 g 钼酸钠(Na₂MoO₄ · 2H₂O)、700 mL 水、50 mL 磷酸(85%)、100 mL 浓盐酸,小火沸腾回流 10 h,取下回流冷却器,在通风厨中加入 50 g 硫酸锂(Li₂SO₄)、50 mL 水和数滴浓溴水(99%),再煮沸 15 min,以除去多余的溴水(冷却后仍有绿色需再加溴水,再煮沸除去过量的溴),冷却,加水定容至 1000 mL。混匀,过滤。试剂应呈金黄色,贮存于棕色瓶内。或使用商品福林试剂。

E.2.3.2 福林使用液。1 份福林试剂与 2 份水混合,摇匀。

E.2.3.3 碳酸钠溶液:c(Na₂CO₃)=0.4 mol/L。

称取 42.4 g 无水碳酸钠(Na₂CO₃),用水溶解并定容至 1000 mL。

E.2.3.4 三氯乙酸(CCl₃ · COOH)溶液:c(CCl₃ · COOH)=0.4 mol/L。

称取 65.4 g 三氯乙酸,用水溶解并定容至 1000 mL。

E.2.3.5 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH})=0.5\text{ mol/L}$ 。

称取 110 g 氢氧化钠,溶于 100 mL 无二氧化碳的水中,摇匀,注入密闭容器中,放置至溶液清亮。取 27 mL 清液,用无二氧化碳水稀释至 1000 mL,摇匀。

E.2.3.6 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=1\text{ mol/L}$ 及 0.1 mol/L 。

各量取 90 mL、9 mL 浓盐酸,分别注入去离子水,定容至 1000 mL,摇匀。

E.2.3.7 磷酸缓冲液($\text{pH}=7.5$)。

称取 6.02 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)和 0.5 g 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),加水溶解并定容至 1000 mL。

E.2.3.8 酪素溶液: $\rho = 10\text{ g/L}$ 。

称取 1 g(精确至 0.001 g)酪素,用少量 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液湿润后,加入约 80 mL 磷酸缓冲液,在沸水浴中边加热边搅拌,直至完全溶解,冷却后用磷酸缓冲液定容至 100 mL。在 4°C 保存,有效期为 3 d。

E.2.3.9 L-酪氨酸标准溶液: $\rho = 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

称 0.100 0 g(精确至 0.000 2 g)取预先于 105°C 干燥至恒重的 L-酪氨酸,用 60 mL 盐酸溶液(1 mol/L)溶解后定容至 100 mL,为 1 mg/mL 酪氨酸标准溶液。吸取 10.00 mL 酪氨酸标准溶液(1 mg/mL),用 0.1 mol/L 盐酸定容至 100 mL 即得到 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ L-酪氨酸标准溶液。

E.2.4 仪器设备

实验室常用仪器设备。

E.2.4.1 分光光度计。

E.2.4.2 电子天平:感量为 0.1 mg 。E.2.4.3 恒温水浴锅, $(40 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 。

E.2.4.4 离心机。

E.2.4.5 粉碎机或研钵。

E.2.4.6 试验筛($\Phi 2.0\text{ mm}$)。

E.2.5 分析步骤

E.2.5.1 建立标准曲线方程

按表 E.2 配制 L-酪氨酸溶液。

表 E.2 配置不同浓度的 L-酪氨酸溶液

| 管号 | L-酪氨酸标准溶液的浓度 $\mu\text{g/mL}$ | $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ L-酪氨酸 标准溶液的体积, mL | 水的体积 mL |
|----|----------------------------------|--|------------|
| 1 | 0 | 0 | 10 |
| 2 | 10 | 1 | 9 |
| 3 | 20 | 2 | 8 |
| 4 | 30 | 3 | 7 |
| 5 | 40 | 4 | 6 |
| 6 | 50 | 5 | 5 |

设两次重复,分取 1.00 mL 上述溶液,各加 5.00 mL 碳酸钠溶液(0.4 mol/L)、1.00 mL 福林试剂使用溶液,置于 40°C 恒温水浴中显色 20 min 后取出。

在分光光度计 680 nm 波长下,以不含酪氨酸的管 1 为空白,调节仪器零点,分别测定管 2 至管 6 的吸光度。以两次重复的吸光度平均值为横坐标,酪氨酸浓度为纵坐标,建立标准曲线。

E.2.5.2 待测酶液的制备

固体试样应粉碎过 $\Phi 2.0\text{ mm}$ 试验筛,液体试样应充分混合均匀。称取 5.0 g(精确至 0.001 g)试样

或准确吸取 5.0 mL 液体试样,加入装有 50 mL(固体试样)或 45 mL(液体试样)pH 7.5 磷酸缓冲液且带玻璃珠的 150 mL 锥形瓶中,在振荡器上 200 r/min 振荡 30 min,吸取适量混合液以 3000×g 离心力离心 3 min~5 min;离心后的上清液即为待测酶液。每个试样需做两个平行。

E.2.6 蛋白酶活力测定

E.2.6.1 将酪素溶液放入 40℃ 水浴中,预热 5 min。

E.2.6.2 吸取 1.0 mL 待测酶液放入试管中,加入 2.0 mL 三氯乙酸,摇匀,于 40℃ 水浴中反应 30 min,再加 1.0 mL 酪素溶液,摇匀后于 3000×g 离心 5 min。取 1.0 mL 上清液加入另一试管中,再依次加入 5.0 mL 碳酸钠溶液、1.0 mL 福林试剂使用液,置于 40℃ 水浴中显色 20 min 后取出,即为空白管。

E.2.6.3 吸取 1.0 mL 待测酶液放入试管中,置于 40℃ 水浴中 2 min。加入 1.0 mL 预热后的酪素溶液,摇匀,于 40℃ 水浴中反应 30 min,取出后立即加入 2.0 mL 三氯乙酸,摇匀,于 3 000×g 离心 5 min。取 1.0 mL 上清液加入另一试管中,再依次加入 5.0 mL 碳酸钠溶液、1.0 mL 福林试剂使用液,置于 40℃ 水浴中显色 20 min 后取出,即为试样管。

E.2.6.4 在分光光度计 680 nm 波长下,以空白管溶液调节仪器零点,测定试样管溶液的吸光度。若其吸光值超出标准曲线范围,应根据酶活力大小将待测酶液稀释至适当浓度后按上述步骤重新测定。

E.2.7 蛋白酶活力计算

蛋白酶活力以质量蛋白酶活力 X_m 或体积蛋白酶活力 X_v 计,数值以酶活力单位每克(U/g)或酶活力单位每毫升(U/mL)表示,按式(E.3)或式(E.4)计算。

$$X_m = \frac{(AK - b) \times 4 \times V_1 \times D}{m \times 30} \dots\dots\dots (E.3)$$

式中:

- A —— 试样吸光度;
- K —— 标准曲线斜率;
- b —— 标准曲线截距;
- 4 —— 反应液的总体积,单位为毫升(mL);
- V_1 —— 酶液定容体积,本操作为 50,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量,单位为克(g);
- D —— 待测酶液的稀释倍数;
- 30 —— 反应时间 30 min(以 1 min 计酶活)。

$$X_v = \frac{(AK - b) \times 4 \times V_1 \times D}{V \times 30} \dots\dots\dots (E.4)$$

式中:

- V —— 试样体积,单位为毫升(mL)。

计算结果表示到小数点后一位,数字修约与数据处理应符合 GB/T 8170 的规定。

E.2.8 允许差

取两次平行测定结果的算术平均值作为试样测定结果,平行测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。