|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020.01 |
| CCS |  |

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX



农用微生物菌剂功能评价技术规程

Technical regulation for functional evaluation of microbial inoculants in agriculture

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

`

1. 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020 给出的规则起草。

本文件由中国石油和化学工业联合会提出。

本文件由全国肥料和土壤调理剂标准化技术委员会（SAC/TC105）归口。

本文件起草单位：农业农村部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心、农业农村部微生物产品质量安全风险评估实验室（北京）、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所。

本文件主要起草人：关大伟、李俊、姜昕、马鸣超、曹凤明、李力、杨小红、陈慧君、葛一凡、冯瑞华、毛聪琳、朱玲玲、季洪伟、邴晓会、贾聪。

农用微生物菌剂功能评价技术规程

* 1. 范围

本标准规定了农用微生物菌剂功能评价的术语和定义、内容、程序、参数与方法、结果判定和报告格式。

本标准适用于农用微生物菌剂的功能评价。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 20287 农用微生物菌剂

GB/T 32951 有机肥中土霉素、四环素、金霉素与强力霉素的含量测定 高效液相色谱法

LY/T 1243 森林土壤阳离子交换量的测定

NY/T 395 农田土壤环境质量监测技术规范

NY/T 525 有机肥料

NY/T 1109 微生物肥料生物安全通用技术准则

NY/T 1113 微生物肥料术语

NY/T 1121.1 土壤检测 第1部分：土壤样品的采集、处理和贮存

NY/T 1121.2 土壤检测 第2部分：土壤pH的测定

NY/T 1121.4 土壤检测 第4部分：土壤容重的测定

NY/T 1121.6 土壤检测 第6部分：土壤有机质的测定

NY/T 1121.19 土壤检测 第19部分：土壤水稳性大团聚体组成的测定

NY/T 1535 肥料合理使用准则 微生物肥料

NY/T 1536 微生物肥料田间试验技术规程及肥效评价指南

NY/T 1735 根瘤菌生产菌株质量评价技术规范

NY/T 1736 微生物肥料菌种鉴定技术规范

NY/T 1847 微生物肥料生产菌株质量评价通用技术要求

NY/T 2271 土壤调理剂效果试验和评价要求

NY/T 2321 微生物肥料产品检验规程

NY/T 2722 秸秆腐熟菌剂腐解效果评价技术规程

NY/T 3082 水果、蔬菜及其制品中叶绿素含量的测定 分光光度法

NY/T 3442 畜禽粪便堆肥技术规范

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

农用微生物菌剂 microbial inoculant in agriculture

指在农业上应用的含有目的微生物的一类活体制品。制品中的目的微生物经工业化生产增殖，经浓缩、稀释或载体吸附而成。依据菌剂产品中特定的微生物种类或作用机理可分为根瘤菌菌剂、固氮菌菌剂、光合细菌菌剂、菌根菌菌剂、解磷类菌剂、硅酸盐菌剂、植物促生菌剂、土壤修复菌剂、有机物料腐熟剂以及提高作物抗逆性菌剂等。



载体 carrier

用于吸附目的微生物，并且适宜其存活，对人、动植物和环境安全的固体物料。

[NY/T 1113，定义6.9]

菌剂功能评价 functional evaluation for microbial inoculant

对农用微生物菌剂进行分析、测定和评估以确定其价值或者状态特性的过程。包括菌剂产品应用后对营养元素、作物、土壤、有机物料等产生的特定效应。

* 1. 菌剂样品的要求

应提供由具有菌种鉴定资质或专业权威单位按照NY/T 1736要求出具菌剂生产所用的菌种鉴定报告，且菌种的安全性符合NY/T 1109的要求。

应提供与评价样品同批次的产品质量检测报告和安全评价报告，其检测方法和质量安全指标应符合 NY/T 2321、GB 20287、NY/T 1109等相关标准的要求。

添加载体的样品，应提供载体的配方及其物理、化学性质等资料。

* 1. 评价内容

菌剂产品施用后对作物提供和活化养分效果的评价。

菌剂产品施用后对作物生长、产量、品质、抗逆性等效应的评价。

菌剂产品施用后对土壤改良和修复效果的评价。

菌剂产品施用后对有机物料资源腐解转化效果的评价。

* 1. 评价程序

根据菌剂产品特性，制定功能评价方案，选用相应的评价参数及方法。

依据菌剂产品中的载体成分，确定是否需要开展载体的功能评价。

采用室内、田间小区试验等方式综合评价菌剂产品功能。菌剂中的功能菌株评价依据NY/T 1847的要求开展，出具并提交菌株功能评价报告。田间小区试验按照NY/T 1536规定实施，出具并提交菌剂产品功能评价报告。

* 1. 评价参数与测定方法
     1. 提供和活化养分效果评价
        1. 评价参数

菌剂产品及功能菌株的固氮、溶磷、解钾、溶解中量元素和微量元素等参数。

* + - 1. 测定方法

根瘤菌固氮效果测定方法按NY/T 1735规定执行；溶磷、解钾、溶解中量元素和微量元素等按NY/T 1847规定执行。

* + 1. 对作物生长、产量、品质、抗逆性效果评价
       1. 评价参数

促进作物生长的参数包括根系长度、根系干重、发芽率、根冠比、分蘖数、叶绿素含量、植株高度、植株干重等。

作物产量评价以NY/T 1536规定的试验面积实收统计其产量。

品质评价依据NY/T 1536选用具有作物特征的品质参数。

抗逆性评价参数可选用作物的抗倒伏、抗旱、抗寒、抗盐碱、连作障碍指数、病虫害发生指数等。

* + - 1. 测定方法

叶绿素含量的测定按NY/T 3082规定执行，其他促进作物生长的参数测定方法按NY/T 2271规定执行；作物产量、品质、抗逆性效果的测定按NY/T 1536规定执行。

* + 1. 土壤改良和修复效果评价
       1. 评价参数

土壤改良效果评价参数可选用土壤pH、土壤容重、阳离子交换量、土壤水稳性大团聚体、土壤有机质含量、土壤脲酶活性、土壤过氧化氢酶活性、土壤蔗糖酶活性和土壤纤维素酶活性，以及土壤中的微生物种群结构与数量等。

土壤修复效果评价参数可选用土壤中的残留农药、重金属、抗生素等有毒有害物质的含量，以及土壤中的微生物种群结构与数量等。

* + - 1. 测定方法

土壤pH、土壤容重、土壤水稳性大团聚体、土壤阳离子交换量、土壤有机质含量、土壤中的微生物种群结构与数量、土壤脲酶活性、土壤过氧化氢酶活性、土壤蔗糖酶活性和土壤纤维素酶活性，以及方法分别按NY/T 1121.1、NY/T 1121.4、NY/T 1121.19、LY/T 1243、NY/T 1121.6、NY/T 1536和本标准附录A、B、C、D的规定执行。

土壤中的残留农药、重金属、抗生素测定方法分别按NY/T 395和GB/T 32951的规定执行。

* + 1. 促进有机物料腐熟效果评价
       1. 评价参数

菌株或菌剂的纤维素酶活力、木聚糖酶活力、蛋白酶活力。堆腐温度、种子发芽指数、秸秆等有机物料失重率、秸秆断裂拉力等参数。

* + - 1. 测定方法

纤维素酶活力、木聚糖酶活力、蛋白酶活力测定方法按NY/T 1847规定执行。

堆腐温度、种子发芽指数、秸秆等有机物料失重率、秸秆断裂拉力测定方法分别按NY/T 3442、NY/T 525、NY/T 2722规定执行。

* 1. 结果判定和评价报告格式
     1. 结果判定

农用微生物菌剂功能评价参数测定结果符合相应标准规定要求，或经统计分析达到显著差异，判定该产品具有相应的功能。

* + 1. 评价报告格式

农用微生物菌剂功能评价汇总报告按本文件附录E规定格式编写。单项评价结果报告按照相应标准要求的格式撰写，并作为汇总报告的支撑依据。

(规范性）

土壤脲酶活性的测定 苯酚钠-次氯酸钠比色法

* 1. 范围

本方法规定了测定土壤中脲酶活性的方法。

本方法适用于土壤中脲酶活性的测定。

* 1. 原理

本方法以尿素为基质，根据酶促产物氨与苯酚—次氯酸钠作用生成蓝色的靛酚，来测定脲酶活性。以1g干土24 h水解尿素产生1mg NH3－N为1个酶活力单位，以u/g表示。

* 1. 试剂和溶液配制

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

* + 1. 甲苯。
    2. 尿素（10%）：称取10.0 g尿素，用水溶至100 mL。
    3. 柠檬酸盐缓冲液（pH=6.7）：184 g柠檬酸（C6H8O7）和147.5 g氢氧化钾（KOH）分别溶于水中，然后将两溶液混合，用10% NaOH溶液将pH调至6.7，用水稀释定容至1 000 mL。
    4. 苯酚钠溶液（1.35 mol/L）：62.5 g苯酚（C6H5OH）溶于少量乙醇，加入2.0 mL甲醇和18.5 mL丙酮后，用乙醇定容至100 mL（A液）；27.0 g氢氧化钠（NaOH）定容至100 mL水（B液）；将A液、B液各取20.0 mL混合，用水定容至100 mL。
    5. 次氯酸钠溶液：用水稀释试剂，至活性氯的浓度为0.9%。
    6. 氮标准溶液： 精确称取0.4717 g硫酸铵[(NH4)2SO4]溶于水后定容至1 000 mL，得到0.1 mg/mL氮含量的标准液；
    7. 氮标准工作溶液（0.01 mg/mL）：吸取10.0 mL氮标准溶液（A.3.6）定容至100 mL。
  1. 仪器
     1. 电子天平：感量0.001g。
     2. 紫外可见分光光度计。
  2. 样品采集与制备

按照NY/T 1121.1规定采集土壤样品、制备试样，试样粉碎粒度应通过1 mm分析筛。

* 1. 分析测定
     1. 标准曲线绘制：

分别取0 mL、1.0 mL、3.0 mL、5.0 mL、7.0 mL、9.0 mL、11.0 mL、13.0mL氮标准工作溶液（A.3.7），移于50 mL容量瓶中，然后加水至20 mL，再加入4.0 mL苯酚钠溶液（A.3.4）和3 mL次氯酸钠溶液（A.3.5），边加边摇匀，显色20 min后用水定容至50mL，配成浓度为0.0000 mg/mL、0.0002 mg/mL、0.0006 mg/mL、0.0010  mg/mL、0.0014 mg/mL、0.0018 mg/mL、0.0022 mg/mL和0.0026 mg/mL的氮系列标准溶液。1 h内，用分光光度计于578 nm波长处以 0.0000 mg/mL氮标准溶液为空白，分别测定其吸光度。然后以吸光度A为横坐标，氮标准工作溶液为纵坐标，绘制标准曲线。

* + 1. 样品测定

称取5 g土样，精确到0.001 g，放入50 mL三角瓶中，加1.0 mL甲苯（A.3.1），振荡均匀，静置15 min后，加入10.0 mL尿素（A.3.2）和20.0 mL柠檬酸盐缓冲溶液（A.3.3），摇匀后置入37℃恒温箱内反应24  h。反应结束后过滤，取1.0 mL滤液加入到50 mL容量瓶中，再加4.0 mL苯酚钠溶液（A.3.4）和3.0 mL次氯酸钠溶液（A.3.5），边加边摇匀。显色20 min后，用水定容至50mL。1 h内，在分光光度计上于578 nm波长处，以 0.0000 mg/mL氮标准溶液为空白，测定其吸光度。

注：如果样品吸光值超过标准曲线的最大值，则应该增加分取倍数或减少土样称样量。

* + 1. 无土空白试验

每次测定应做两个无土空白试验，不加土样，其他操作与A.6.2相同。

* + 1. 无尿素空白试验

每个样品应做两个无尿素空白试验，不加尿素溶液，以等体积的蒸馏水代替尿素溶液，其他操作与A.6.2相同。

* 1. 结果计算：

土壤脲酶活性按下列公式计算：



式中：

*U*——土壤脲酶活性，单位为u/g；

*c*1——样品吸光值由标准曲线求得的NH3－N浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

*c*2——无土空白吸光值由标准曲线求得的NH3－N浓度，单位为为毫克每毫升（mg/mL）；

*c*3——无尿素空白吸光值由标准曲线求得的NH3－N浓度，单位为为毫克每毫升（mg/mL）；

*V*——显色液体积，单位为毫升（mL）；

D——分取倍数，浸出液体积／吸取滤液体积；

*m*——风干土样质量，单位为克（g）。

测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，所得结果应保留两位小数。

* 1. 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

(规范性）

土壤过氧化氢酶活性的测定 高锰酸钾滴定法

* 1. 范围

本方法规定了测定土壤中过氧化氢酶活性的方法。

本方法适用于土壤中过氧化氢酶活性的测定。

* 1. 原理

本法是基于用高锰酸钾滴定酶促反应前后过氧化氢的量，由二者之间的差求出分解H2O2的量，以此来表示酶的活性。过氧化氢酶活性以每1 g干土1h内消耗的1mL 0.02mol/L KMnO4为1个酶活力单位，单位以u/g表示。

2KMnO4+5 H2O2+3H2SO4=2MnSO4+K2SO4+8H2O+5O2

* 1. 试剂和溶液配制

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

* + 1. 甲苯。
    2. 硫酸溶液（0.2 mol/L）：量取5.43 mL的浓硫酸（H2SO4，95~98%），用水定容至500 mL，置于冰箱贮存。
    3. 高锰酸钾溶液（0.02 mol/L）：称取1.70 g高锰酸钾，加水溶解后定容至500 mL，避光保存，使用时用0.1 mol/L草酸溶液标定。
    4. 草酸标准溶液（0.1 mol/L）：称取优级纯草酸（H2C2O4·2H2O） 3.334 g，用水溶解后，定容至250 mL。
    5. H2O2（3%）：取30% H2O2溶液25.0 mL，用水定容至250 mL，置于冰箱贮存。
  1. 仪器
     1. 电子天平：感量0.001 g。
     2. 紫外可见分光光度计。
  2. 样品采集与制备

按照NY/T 1121.1规定采集土壤样品、制备试样，试样粉碎粒度应通过1 mm分析筛。

* 1. 分析步骤
     1. 0.02 mol/L高锰酸钾溶液标定

吸取0.1 mol/L草酸标准溶液（B.3.4）10.0 mL加入150 mL三角瓶中，用高锰酸钾溶液（B.3.3）滴定至淡粉红色终点。根据高锰酸钾溶液滴定时的消耗量按下式计算其准确浓度：



式中：

*c*1——草酸标准溶液的浓度，mol/L；

*V*1——吸取草酸标准溶液的体积，mL；

*V*2——滴定时消耗高锰酸钾溶液的体积，mL。

* + 1. 样品测定

分别取5 g土壤样品，精确到0.001 g，放入100 mL容量瓶中，加入1 mL甲苯（B.3.1），摇匀，于4℃冰箱中放置30 min。取出后立刻加入冰箱贮存的3% H2O2溶液（B.3.5）25.0 mL，充分混匀后，再置于冰箱中放置1 h。取出后立刻加入冰箱贮存的0.2 mol/L H2SO4溶液（B.3.2）25.0 mL，摇匀后过滤。取1 mL滤液于三角瓶，加入5.0 mL蒸馏水和5.0 mL 0.2 mol/LH2SO4溶液（B.3.2），用高锰酸钾溶液（B.3.3）滴定至淡粉红色终点。

* + 1. 无土空白试验

每次测定应做两个无土空白试验，不加土样，其它操作与B.6.2相同。

* 1. 结果计算**：**

土壤过氧化氢酶活性按下列公式计算：



式中：

*U*——土壤过氧化氢酶活性，单位为u/g

*V*1——土样剩余过氧化氢滴定体积，单位为毫升（mL）；

*V*2——无土空白剩余过氧化氢滴定体积，单位为毫升（mL）；

*T*——高锰酸钾溶液浓度修正值，标定的KMnO4浓度/0.02 mol/L；

*m*——风干土样质量，单位为克（g）。

测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，所得结果应保留两位小数。

* 1. 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

(规范性）

土壤蔗糖酶活性的测定 3,5- 二硝基水杨酸比色法

* 1. 范围

本方法规定了土壤中蔗糖酶活性的测定方法。

本方法适用于土壤中蔗糖酶活性的测定。

* 1. 原理

蔗糖酶酶解蔗糖所生成的还原糖与 3,5- 二硝基水杨酸反应而生成橙色的3-氨基-5-硝基水杨酸，其颜色深度与还原糖含量相关，因而可用测定还原糖含量来表示蔗糖酶的活性。土壤蔗糖酶活性以1 g干土24 h生成1mg葡萄糖为1个酶活力单位，单位以u/g表示。

* 1. 试剂和溶液配制

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

* + 1. 甲苯。
    2. 蔗糖溶液（8%）：称取蔗糖（C12H22O11）8.0 g，加水溶解定容至100 mL。
    3. 磷酸氢二钠（0.07 mol/L）：称取磷酸氢二钠（Na2HPO4·2H2O）11.876 g ，加水溶解定容至1 000 mL。
    4. 磷酸二氢钾（0.07 mol/L）：称取磷酸二氢钾（KH2PO4）9.078 g ，加水溶解定容至1 000 mL。
    5. 磷酸缓冲液（pH5.5）：取0.07 mol/L磷酸氢二钠（C.3.3）0.5 mL，然后加入0.07 mol/L磷酸二氢钾（C.3.4）9.5 mL，混合均匀。
    6. 葡萄糖标准溶液（1.0 mg/mL）

称取80℃干燥至恒重的葡萄糖0.1 g（精确到0.000 1g）于烧杯中，用水溶解后，定容至100 mL，摇匀后于4 ℃冰箱中保存，保存期7 d。若该溶液出现混浊或絮状物，应重新配制。

* + 1. 氢氧化钠溶液（2 mol/L）：称取8.0 g 氢氧化钠（NaOH），用水溶解后，定容至100 mL。
    2. 3,5-二硝基水杨酸试剂（DNS试剂）

称取6.3 g 3,5-二硝基水杨酸于500 mL大烧杯中，用少量水溶解后，加入2 mol/L氢氧化钠溶液（C.3.7）262 mL，再将其倒入500 mL 含有 185.0 g 酒石酸钾钠（NaKC4H4O6）的热水溶液中，然后加5.0 g结晶苯酚（C6H5OH）、5.0 g无水亚硫酸钠（Na2SO3），搅拌至溶解，冷却后用水定容1 000 mL。储存于棕色瓶中，室温放置7 d后使用，有效期6个月。

* 1. 仪器
     1. 电子天平：感量0.0001 g。
     2. 紫外可见分光光度计。
  2. 样品采集与制备

按照NY/T 1121.1规定采集土壤样品、制备试样，试样粉碎粒度应通过1 mm分析筛。

* 1. 分析测定
     1. 标准曲线绘制

分别吸1.0 mg/mL的葡萄糖标准溶液（C.3.6）0.0 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL于20 mL具塞刻度管中，再补加蒸馏水至1.0 mL，加DNS试剂（C.3.8）3.0 mL混匀，于沸水浴中准确反应5 min（从重新沸腾时算起），取出立即冷水浴冷却至室温后，定容至20 mL，配成浓度为0 .000 mg/mL、0.005 mg/mL、0.010 mg/mL、0.015  mg/mL、0.020 mg/mL、0.025 mg/mL葡萄糖标准标准溶液。以0 mg/mL葡萄糖标准溶液调零，在波长540 nm处比色，以OD值为横坐标，以葡萄糖浓度为纵坐标绘制标准曲线。

* + 1. 样品测定

称取5 g风干土壤，精确到0.001 g，置于50 mL三角瓶中，加入15.0 mL 8%蔗糖溶液（C.3.2），5.0 mL pH5.5磷酸缓冲液（C.3.5）和5滴甲苯（C.3.1）。摇匀混合物后，放入恒温箱，在37 ℃下保温 24  h。取出后迅速过滤。吸取滤液1.0 mL，加入到20 mL具塞刻度管中，加3 mL DNS试剂（C.3.8），于沸水浴中准确反应5 min（从水重新沸腾时算起），加热后取出立即冷水浴冷却至室温，用蒸馏水稀释至20 mL，在紫外可见分光光度计上于540 nm处进行比色。

注：如果样品吸光值超过标准曲线的最大值，应稀释滤液或减少土样称样量。

* + 1. 无土空白试验

每次测定应做两个无土空白试验，不加土样，其他操作与C.6.2相同。

* + 1. 无蔗糖空白试验

每个样品应做两个无蔗糖空白试验，不加蔗糖溶液，其他操作与C.6.2相同。

* 1. 结果计算：

土壤蔗糖酶活性按下列公式计算：



式中：

*U——*土壤蔗糖酶活性，单位为u/g

*c*1*——*样品吸光值由标准曲线求的葡萄糖质量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

*c*2*——*无土对照吸光值由标准曲线求的葡萄糖质量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

*c*3*——*无蔗糖对照吸光值由标准曲线求的葡萄糖质量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

*V——*显色液体积，单位为毫升（mL）；

*D——*分取倍数，浸出液体积／吸取滤液体积；

*m——*风干土样质量，单位为克（g）。

测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，所得结果应保留两位小数。

* 1. 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

（规范性）

土壤纤维素酶活性的测定 3,5-二硝基水杨酸比色法

* 1. 范围

本方法规定了土壤中纤维素酶活性的测定方法。

本方法适用于土壤中纤维素酶活性的测定。

* 1. 原理

纤维素是植物残体进入土壤的碳水化合物的重要组分之一。在纤维素酶作用下，它的最初水解产物是纤维二糖，在纤维二糖酶作用下，纤维二糖分解成葡萄糖。所以，纤维素酶是碳素循环中的一个重要的酶。纤维素酶解所生成的还原糖与 3,5- 二硝基水杨酸反应而生成橙色的3-氨基-5-硝基水杨酸。颜色深度与还原糖量相关，因而可用测定还原糖量来表示纤维素酶的活性。 纤维素酶活性以1g干土72 h，生成1mg葡萄糖为1个酶活力单位，单位以u/g表示。

* 1. 试剂和溶液配制

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

* + 1. 甲苯。
    2. 醋酸溶液（0.2 mol/L）：取 95% 冰醋酸11.55 mL，用水定容至1 000 mL。
    3. 醋酸钠溶液（0.2 mol/L）：称取醋酸钠（C2H3O2Na）16.4 g （或醋酸钠C2H3O2Na·3H2O 27.22 g），用水溶解后定容1 000 mL。
    4. 醋酸盐缓冲液（pH5.5）：取0.2 mol/L 醋酸溶液（D.3.2）11.0 mL 和 0.2 mol/L 醋酸钠溶液（D.3.3）88.0 mL，混匀即成pH 5.5醋酸盐缓冲液。
    5. 羧甲基纤维素溶液（0.5%）：称取羧甲基纤维素钠0.5 g，加入适量的pH5.5醋酸盐缓冲液（D.3.4），加热溶解后移入100 mL容量瓶中，用pH5.5醋酸盐缓冲液（D.3.4）定容至100 mL。
    6. 3,5-二硝基水杨酸溶液（DNS试剂）：配置同C.3.8。
    7. 葡萄糖标准溶液（1 mg/mL）

称取80℃干燥至恒重的葡萄糖0.1 g（精确到0.000 1g）于烧杯中，用蒸馏水溶解后，移至100 mL容量瓶中，定容，摇匀（冰箱中4 ℃保存，保存期7 d）。若该溶液出现混浊或絮状物，应重新配制。

* 1. 仪器
     1. 电子天平：感量0.000 1g。
     2. 紫外可见分光光度计。
  2. 样品采集与制备

按照NY/T 1121.1规定采集土壤样品、制备试样，试样粉碎粒度应通过1 mm分析筛。

* 1. 分析测定
     1. 标准曲线绘制

分别吸1 mg/mL的葡萄糖标准溶液（D.3.7）0.0 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL于20mL具塞刻度管中，再补加蒸馏水至1.0 mL，加DNS试剂（D.3.6）3.0 mL混匀，于沸水浴中准确反应5 min（从具塞刻度管放入重新沸腾时算起），取出立即冷水浴冷却至室温后，定容至20 mL，配成浓度为0 .000mg/mL、0.005 mg/mL、0.010 mg/mL、0.015  mg/mL、0.020 mg/mL、0.025 mg/mL葡萄糖标准标准溶液。以0.000 mg/mL葡萄糖标准溶液调零，在波长540 nm处比色，以OD值为纵坐标，以葡萄糖浓度为横坐标绘制标准曲线。

* + 1. 样品测定

称5 g风干土壤，精确到0.001 g，置于50 mL三角瓶中，加入1.5 mL甲苯（D.3.1），摇匀后放置15 min，再加0.5%羧甲基纤维素溶液（D.3.5）5.0 mL和 pH5.5醋酸盐缓冲液（D.3.4）5.0 mL，将三角瓶放在37℃恒温箱中培养72 h。培养结束后，8000 r/min离心5 min， 取1.0 mL上清液，加入到20mL具塞刻度管中，加DNS溶液（D.3.6）3.0 mL混匀，于沸腾水浴中加热5 min，取出立即冷水浴冷却至室温。以0.000 mg/mL葡萄糖标准溶液调零，在波长540 nm处比色。

注：如果样品吸光值超过标准曲线的最大值，应稀释上清液液或减少土样称样量。

* + 1. 无土空白试验

每次测定应做两个无土空白试验，不加土样，其他操作与D.6.2相同。

* + 1. 无羧甲基纤维素空白试验

每个样品应做两个无羧甲基纤维素空白试验，不加羧甲基纤维素溶液，其他操作与D.6.2相同。

* 1. 结果计算

 土壤纤维素酶活性按下列公式计算：



式中：

*U——*土壤纤维素酶活性，单位为u/g

*c*1*——*样品吸光值由标准曲线求的葡萄糖质量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

*c*2*——*无土对照吸光值由标准曲线求的葡萄糖质量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

*c*3*——*无羧甲基纤维素基质对照吸光值由标准曲线求的葡萄糖质量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

*V——*显色液体积，单位为毫升（mL）；

D*——*分取倍数，浸出液体积／吸取滤液体积；

*m——*风干土样质量，单位为克（g）。

测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，所得结果应保留两位小数。

* 1. 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

(资料性）

农用微生物菌剂功能评价汇总报告

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 一、基本信息 | | | |
| 企业名称 | |  | |
| 评价日期 | |  | |
| 菌种名称 | |  | |
| 所用载体名称、成分及配比 | |  | |
| 二、菌剂具体功能评价汇总 | | | |
| 评价项目或内容 | 评价参数 | | 测定结果 |
| 提供和活化养分效果 | 固氮能力 | |  |
| 解磷能力 | |  |
| 解钾能力 | |  |
| 溶解中微量元素能力 | |  |
| 对作物生长、产量、品质、抗逆性效果评价 | 促生长评价（可选择参数：促根、促芽、根冠比、分蘖数、叶绿素含量、植株高度、植株干重） | |  |
| 产量评价 | |  |
| 品质评价 | |  |
| 抗逆性评价 | |  |
| 土壤改良和修复效果评价 | 改良土壤评价 | |  |
| 修复土壤评价 | |  |
| 促进有机物料腐熟效果  评价 | 纤维素酶活 | |  |
| 木聚糖酶活 | |  |
| 蛋白酶活 | |  |
| 堆腐温度 | |  |
| 秸秆失重率 | |  |
| 断裂拉力 | |  |
| 三、菌剂功能评价综合判定**：** | | | |
| 四、菌剂具体功能评价目录表 | | | |
| 1. 评价机构（盖章）：   负责人（签名）：  时间： | | | |

