ICS 65.080
CCS B 10

中华人民共和国国家标准

GB/T 41727—2022

农用微生物菌剂功能评价技术规程

Code of practice for functional evaluation of microbial inoculants in agriculture

2022-10-12 发布　　2023-05-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　发布

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

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/TC 105)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、上海化工院检测有限公司。

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、杨一、葛一凡、冯瑞华。

农用微生物菌剂功能评价技术规程

1 范围

本文件规定了农用微生物菌剂功能评价的菌剂样品要求、评价内容、评价程序、评价项目与测定方法、结果判定和评价报告格式。

本文件适用于农用微生物菌剂的功能评价。

2 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 5009.268 食品安全国家标准 食品中多元素的测定

GB 20287 农用微生物菌剂

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

GB/T 40226 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法

GB/T 41728 微生物肥料质量安全评价通用准则

NY/T 295 中性土壤阳离子交换量和交换性盐基的测定

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 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 1121.5 土壤检测 第5部分：石灰性土壤阳离子交换量的测定

NY/T 1121.6 土壤检测 第6部分：土壤有机质的测定

NY/T 1121.16 土壤检测 第16部分：土壤水溶性盐总量的测定

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 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 2272 土壤调理剂 钙、镁、硅含量的测定

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

NY/T 3606 地理标志农产品品质鉴定与质量控制技术规范 谷物类

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

农用微生物菌剂 microbial inoculants in agriculture

目标微生物(有效菌)经过工业化生产扩繁后加工而成的活菌制剂。

注1：农用微生物菌剂具有直接或间接改良土壤、恢复地力，维持根际微生物区系平衡，降解有毒、有害物质的作用；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、改善农产品品质及农业生态环境。

注2：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、共生固氮菌菌剂、菌根菌菌剂、溶磷类菌剂、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。

[来源：GB 20287—2006，3.1，有修改]

3.2

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。

[来源：NY/T 1113—2006，3.9]

3.3

菌剂功能评价 functional evaluation for microbial inoculant

对农用微生物菌剂进行分析、测定和评价以确定其价值或者效益特性的过程。

注：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。

4 菌剂样品要求

4.1 具有菌种鉴定资质或专业权威单位按照NY/T 1535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GB/T 41728的要求。

4.2 具有同批次的样品检测报告，其检测方法和质量安全指标应符合NY/T 2321、GB 20287等相关标准的要求。

4.3 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。

5 评价内容

5.1 对作物提供和活化养分效果的评价。

5.2 对作物生长、产量、品质、抗逆性等效应的评价。

5.3 对土壤改良和修复效果的评价。

5.4 对有机物料资源腐解转化效果的评价。

6 评价程序

6.1 根据菌剂产品特性，制定功能评价方案，选用相应的评价项目及方法。

6.2 采用菌株功能评价、产品功能评价等方式综合评价农用微生物菌剂功能。菌株功能评价依据NY/T 1847和本文件的要求开展，出具并提交菌株功能评价报告。产品功能评价应开展田间小区试验，田间小区试验按照NY/T 1536规定实施，出具并提交产品功能评价报告。

6.3 添加载体的产品应开展载体功能评价，评价项目与该产品功能评价一致。

7 评价项目与测定方法

评价项目与测定方法见表1。

表1 评价项目与测定方法

评价内容	评价项目	测定方法
提供和活化养分功能	固氮能力	按照NY/T 1735的规定执行
	溶磷能力	按照NY/T 1847和NY/T 2272的规定执行
	解钾能力	
	活化中量元素和硅元素能力	
	活化微量元素能力	按照GB 5009.268的规定执行
促进作物生长、提高作物产量、品质、抗逆性功能	作物生长评价项目包括叶绿素含量、植株干重、根干重、根冠比等	叶绿素含量测定的取样方法按照附录A中A.2的规定执行，其测定方法按照NY/T 3082的规定执行；植株干重、根干重、根冠比的测定方法按照附录A的规定执行
	作物产量	按照NY/T 1536的规定执行
	品质评价项目依据NY/T 1536和NY/T 3606规定的作物种类的特征进行选用	按照NY/T 1536和NY/T 3606的规定执行
	抗逆性评价项目可选用作物抗倒伏、抗旱、抗涝、抗寒、抗盐碱、连作障碍指数、病虫害发生指数等	按照NY/T 1536的规定执行
土壤改良功能	土壤容重	按照NY/T 1121.4的规定执行
	土壤pH	按照NY/T 1121.2的规定执行
	土壤水稳性大团聚体	按照NY/T 1121.19的规定执行
	土壤阳离子交换量	按照NY/T 295或NY/T 1121.5的规定执行
	土壤盐分含量	按照NY/T 1121.16的规定执行
	土壤有机质含量	按照NY/T 1121.6的规定执行
	土壤脲酶活力	按照附录B的规定执行
	土壤过氧化氢酶活力	按照附录C的规定执行
	土壤蔗糖酶活力	按照附录D的规定执行
	土壤纤维素酶活力	按照附录E的规定执行
	土壤微生物种群结构与数量	按照GB/T 40226的规定执行
土壤修复功能	土壤中农药残留量和重金属含量	按照NY/T 395的规定执行
	土壤中抗生素含量	按照GB/T 32951的规定执行
	土壤有益微生物种群结构与数量	按照GB/T 40226的规定执行

表 1 评价项目与测定方法（续）

评价内容	评价项目	测定方法
有机物料腐熟功能	纤维素酶活力、木聚糖酶活力、蛋白酶活力	按照 NY/T 1847 的规定执行
	有机物料堆体腐熟温度升到 55 ℃所需时间，堆温不低于 55 ℃的时间	按照 NY/T 3442 的规定执行
	有机物料腐熟后的种子发芽指数	按照 NY/T 525 的规定执行
	有机物料失重率和秸秆断裂拉力	按照 NY/T 2722 的规定执行

8 结果判定和评价报告格式

8.1 结果判定

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

8.2 评价报告格式

农用微生物菌剂功能评价汇总报告编写格式参见附录 F。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。

附 录 A
（规范性）
农用微生物菌剂促进作物生长的测定

A.1 田间试验

采用田间试验方式进行菌剂促进作物生长的评价，试验设计、试验地选择、试验地处理、试验作物品种选择、田间管理按 NY/T 1536 的规定执行。

A.2 田间取样

在试验作物营养生长最旺盛时期，每个小区连续取长势一致的代表性植株 5 株～10 株，包括植株的地上和地下部分。

A.3 仪器

A.3.1 电子天平：感量 0.01 g。

A.3.2 鼓风干燥箱。

A.4 参数测定

A.4.1 植株干重

将植株地上部分放入 80 ℃烘箱中烘干至恒重，测定其质量（m_s），单位为克（g），保留一位小数。

A.4.2 根干重

将植株根系剪下，用缓速水流反复冲洗，直至冲洗干净。然后将其放入 80 ℃烘箱中烘干至恒重，测定其质量（m_r），单位为克（g），保留一位小数。

A.4.3 根冠比

根冠比（K）按式（A.1）计算：

$$K = \frac{m_r}{m_s} \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (A.1)$$

式中：

m_r ——根干重，单位为克（g）；

m_s ——植株干重，单位为克（g）。

A.4.4 数据统计分析

A.4.4.1 每个小区各参数的测定结果以植株测定值的算术平均值表示。

A.4.4.2 每个处理各参数的测定结果以其小区测定值的算术平均值表示。

A.4.4.3 比较分析不同处理对各参数影响的平均表现。

A.4.4.4 采用 t 检验或最小显著性差异法，比较处理间各参数的差异显著性。

附 录 B
（规范性）
土壤脲酶活力的测定 苯酚钠-次氯酸钠比色法

B.1 原理

以尿素为基质，根据酶促产物氨与苯酚和次氯酸钠作用生成蓝色的靛酚，来测定脲酶活力。以 1 g 干土 24 h 水解尿素产生 1 mgNH_3－N 为 1 个酶活力单位，单位以 U 表示。

B.2 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。

B.2.1 甲苯。

B.2.2 尿素溶液(0.1 g/mL)：称取 10.0 g 尿素，用水溶解后定容至 100 mL。

B.2.3 柠檬酸盐缓冲溶液(pH＝6.7)：184.0 g 柠檬酸($C_6H_8O_7$)和 147.5 g 氢氧化钾(KOH)分别溶于水中，然后将两溶液混合，用 0.1 g/mL NaOH 溶液将 pH 调至 6.7，用水稀释定容至 1 000 mL。

B.2.4 苯酚钠溶液(1.35 mol/L)：62.5 g 苯酚(C_6H_5OH)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 水中(B 液)；将 A 液、B 液各取 20.0 mL 混合，用水定容至 100 mL。

B.2.5 次氯酸钠溶液[w(Cl)＝0.9%]：称取 9.0 g 次氯酸钠溶液[w(Cl)＝10%]，加入 91.0 g 水后混匀。

B.2.6 氮标准溶液(0.1 mg/mL)：称取 0.471 7 g 硫酸铵[$(NH_4)_2SO_4$]溶于水后定容至 1 000 mL，得到氮含量 0.1 mg/mL 的标准溶液。

B.2.7 氮标准工作溶液(0.01 mg/mL)：吸取 10.0 mL 氮标准溶液定容至 100 mL。

B.3 仪器

B.3.1 电子天平：感量 0.000 1 g 和感量 0.01 g。

B.3.2 紫外可见分光光度计。

B.3.3 恒温培养箱。

B.4 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，风干样品粉碎粒度应通过 1 mm 孔径筛。

B.5 分析测定

警示——整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应避光(直射阳光)，具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个试验过程中，操作者应按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

B.5.1 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、13.0 mL 氮标准工作溶液，移于 50 mL 容量瓶中，然后加水至 20 mL，再加入 4.0 mL 苯酚钠溶液和 3.0 mL 次氯酸钠溶液，边加边摇匀，显色 20 min 后用水定容至 50 mL，配成质量浓度为 0 mg/mL、0.000 2 mg/mL、0.000 6 mg/mL、0.001 0 mg/mL、0.001 4 mg/mL、0.001 8 mg/mL、0.002 2 mg/mL 和 0.002 6 mg/mL 氮系列标准溶液。1 h 内，以 0 mg/mL 氮标准溶液为空白调零，在 578 nm 波长处测定氮系列标准溶液吸光度。以吸

光度值为横坐标，对应的氮质量浓度为纵坐标，绘制标准曲线。

B.5.2 样品测定

称取土壤样品 5.0 g(精确到 0.000 1 g)，放入 50 mL 锥形瓶中，加 1.0 mL 甲苯，摇匀后静置 15 min，再加入 10.0 mL 尿素溶液和 20.0 mL 柠檬酸盐缓冲溶液，摇匀后置入 37 ℃恒温培养箱内培养 24 h。培养结束后过滤，取 1.0 mL 滤液加入到 50 mL 容量瓶中，再加 4.0 mL 苯酚钠溶液和 3.0 mL 次氯酸钠溶液，边加边摇匀。显色 20 min 后，用水定容至 50 mL。1 h 内，以 0 mg/mL 氮标准溶液为空白调零，在 578 nm 波长处测定样品吸光度。

如果样品吸光度超过标准曲线的最大值，可增加分取倍数或减少土样称样量。

B.5.3 无尿素空白试验

每个样品应做无尿素空白试验，即不加尿素溶液，以等体积的水代替尿素溶液，其他操作与 B.5.2 相同。

B.5.4 无土空白试验

每次测定应做无土空白试验，不加土样，其他操作与 B.5.2 相同。

B.6 结果计算

土壤脲酶活力 X_1，单位为 U，按式(B.1)计算：

$$X_1 = \frac{(\rho_1 - \rho_2 - \rho_3) \times V \times D \times 24}{m \times t} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (B.1)$$

式中：

ρ_1——样品吸光度由标准曲线求得 NH_3-N 质量浓度，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

ρ_2——无尿素空白吸光度由标准曲线求得 NH_3-N 质量浓度，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

ρ_3——无土空白吸光度由标准曲线求得 NH_3-N 质量浓度，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；

24——时间换算系数；

m——土壤样品质量，单位为克(g)；

t——反应时间，单位为小时(h)。

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。

B.7 精密度

在同一实验室，由同一操作者使用相同设备，按相同的测试方法，并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试，获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 20%，以大于这两个测定值的算术平均值的 20%的情况不超过 5%为前提。

附 录 C
（规范性）
土壤过氧化氢酶活力的测定 高锰酸钾滴定法

C.1 原理

土壤过氧化氢酶能酶促过氧化氢分解水和氧气。通过加入定量的过氧化氢与土壤作用一段时间后，用高锰酸钾滴定酶促反应中剩余过氧化氢的量，加入量与剩余量之差即为与酶反应的量，以此来测定过氧化氢酶的活力。过氧化氢酶活力以 1 g 干土 1 h 内消耗的 1 mL0.02 mol/L$KMnO_4$ 为 1 个酶活力单位，单位以 U 表示。反应式为：

$$2KMnO_4+5H_2O_2+3H_2SO_4 \longrightarrow 2MnSO_4+K_2SO_4+8H_2O+5O_2$$

C.2 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。

C.2.1 甲苯。

C.2.2 硫酸溶液(0.2 mol/L)：量取 5.43 mL 的浓硫酸(ρ=1.84 g/mL)，用水定容至 500 mL，置于冰箱贮存。

C.2.3 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，使用时用草酸标准溶液标定。

C.2.4 草酸标准溶液(0.1 mol/L)：称取优级纯草酸($H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$)3.334 g，用水溶解后定容至 250 mL。

C.2.5 过氧化氢溶液(w=3%)：称取 10.0 g 过氧化氢溶液(w=30%)，加 90.0 g 水后混匀，置于冰箱贮存。

C.3 仪器

C.3.1 电子天平：感量 0.000 1 g 和感量 0.001 g。

C.4 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，风干样品粉碎粒度应通过 1 mm 孔径筛。

C.5 分析测定

警示——整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应避光(直射阳光)，具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个试验过程中，操作者应按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

C.5.1 高锰酸钾溶液标定

吸取草酸标准溶液 10.0 mL 加入 150 mL 锥形瓶中，用高锰酸钾溶液滴定至淡粉红色终点。根据高锰酸钾溶液的消耗量按式(C.1)计算其浓度：

$$c=\frac{2\times V_1\times c_1}{5\times V_2} \qquad \cdots\cdots(C.1)$$

式中：

c ——高锰酸钾溶液标定浓度，单位为摩尔每升(mol/L)；

V_1 ——吸取草酸标准溶液的体积，单位为毫升(mL)；

c_1 ——草酸标准溶液的浓度，单位为摩尔每升(mol/L)；

V_2 ——滴定时消耗高锰酸钾溶液的体积，单位为毫升(mL)。

C.5.2 样品测定

称取土壤样品 5.0 g(精确到 0.000 1 g)，放入 100 mL 锥形瓶中，加入 1 mL 甲苯，摇匀后于 4 ℃冰箱中放置 30 min。取出后立刻加入冰箱贮存的过氧化氢溶液 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硫酸溶液 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 硫酸溶液，用高锰酸钾溶液滴定至浅粉红色终点。

C.5.3 无土空白试验

每次测定应做无土空白试验，不加土样，其他操作与 C.5.2 相同。

C.6 结果计算

土壤过氧化氢酶活力 X_2，单位为 U，按式(C.2)计算：

$$X_2 = \frac{(V_4 - V_3) \times D \times c}{m \times c_2 \times t} \qquad \cdots\cdots(C.2)$$

式中：

V_4 ——无土空白消耗过氧化氢溶液的体积，单位为毫升(mL)；

V_3 ——土样消耗过氧化氢溶液的体积，单位为毫升(mL)；

D ——分取倍数，浸出液体积/吸取滤液体积；

c ——高锰酸钾溶液标定浓度，单位为摩尔每升(mol/L)；

m ——土壤样品质量，单位为克(g)；

c_2 ——高锰酸钾溶液理论浓度，值为 0.02 mol/L；

t ——反应时间，单位为小时(h)。

测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，质量结果应保留两位小数。

C.7 精密度

在同一实验室，由同一操作者使用相同设备，按相同的测试方法，并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试，获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 20%，以大于这两个测定值的算术平均值的 20%的情况不超过 5%为前提。

附 录 D
（规范性）
土壤蔗糖酶活力的测定 3,5-二硝基水杨酸比色法

D.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活力。土壤蔗糖酶活力以1 g干土24 h生成1 mg葡萄糖为1个酶活力单位，单位以U表示。

D.2 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。

D.2.1 甲苯。

D.2.2 蔗糖溶液(0.08 g/mL)：称取蔗糖($C_{12}H_{22}O_{11}$)8.0 g，加水溶解定容至100 mL。

D.2.3 磷酸氢二钠溶液：称取磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)11.876 g，加水溶解定容至1 000 mL。

D.2.4 磷酸二氢钾溶液：称取磷酸二氢钾(KH_2PO_4)9.078 g，加水溶解定容至1 000 mL。

D.2.5 磷酸缓冲液(pH 5.5)：取磷酸氢二钠溶液0.5 mL，然后加入磷酸二氢钾溶液9.5 mL，混合均匀。

D.2.6 葡萄糖溶液(1 mg/mL)：称取80 ℃干燥至恒重的葡萄糖0.1 g(精确到0.000 1 g)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。

D.2.7 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。

D.2.8 3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS试剂)：称取3,5-二硝基水杨酸6.3 g于500 mL烧杯中，用少量水溶解后，加入氢氧化钠溶液262 mL，再将其倒入500 mL含有185.0 g酒石酸钾钠($NaKC_4H_4O_6$)的热水溶液中，然后加入5.0 g结晶苯酚(C_6H_5OH)、5.0 g无水亚硫酸钠(Na_2SO_3)，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。

D.3 仪器

D.3.1 电子天平：感量0.000 1 g和感量0.01 g。

D.3.2 紫外可见分光光度计。

D.3.3 恒温培养箱。

D.4 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，风干样品粉碎粒度应通过1 mm孔径筛。

D.5 分析测定

警示——整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应避光(直射阳光)，具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个试验过程中，操作者应按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

D.5.1 标准曲线绘制

分别吸取1 mg/mL的葡萄糖溶液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3.0 mL混匀，于沸水浴中准确反应5 min(从水重新沸腾时算起)，取出立即冷水浴冷却至室温后，用蒸馏水定容至20 mL，配成质量浓度为0 mg/mL、

0.005 mg/mL、0.010 mg/mL、0.015 mg/mL、0.020 mg/mL、0.025 mg/mL 葡萄糖系列标准溶液。以0 mg/mL葡萄糖标准溶液为空白调零，在波长 540 nm 处测定葡萄糖系列标准溶液吸光度。以吸光度值为横坐标，对应的葡萄糖质量浓度为纵坐标，绘制标准曲线。

D.5.2 样品测定

称取土壤样品 5.0 g(精确到 0.000 1 g)，置于 50 mL 锥形瓶中，加 1.0 mL 甲苯，摇匀后静置 15 min 后，再加入 15.0 mL 蔗糖溶液和 5.0 mL pH 5.5 磷酸缓冲液。摇匀混合物后，放入恒温培养箱中，在 37 ℃下培养 24 h。培养结束后取出，迅速过滤。吸取滤液 1.0 mL，加入到 20 mL 具塞刻度管中，加 3.0 mL DNS试剂，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，用水定容至 20 mL。以 0 mg/mL 葡萄糖标准溶液为空白调零，在 540 nm 处测定样品吸光度。

如果样品吸光度超过标准曲线的最大值，可稀释滤液或减少土样称样量。

D.5.3 无蔗糖空白试验

每个样品应做无蔗糖空白试验，不加蔗糖溶液，以等体积的蒸馏水代替蔗糖溶液，其他操作与 D.5.2 相同。

D.5.4 无土空白试验

每次测定应做无土空白试验，不加土样，其他操作与 D.5.2 相同。

D.6 结果计算

土壤蔗糖酶活力 X_1，单位为 U，按式(D.1)计算：

$$X_1 = \frac{(\rho_1 - \rho_2 - \rho_3) \times V \times D \times 2}{m \times t} \quad \cdots\cdots (D.1)$$

式中：

ρ_1——样品吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量浓度，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

ρ_2——无蔗糖空白吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量浓度，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

ρ_3——无土空白吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量浓度，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；

2——时间换算系数；

m——土壤样品质量，单位为克(g)；

t——反应时间，单位为小时(h)。

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。

D.7 精密度

在同一实验室，由同一操作者使用相同设备，按相同的测试方法，并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试，获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 20%，以大于这两个测定值的算术平均值的 20%的情况不超过 5%为前提。

附 录 E
（规范性）
土壤纤维素酶活力的测定 3,5-二硝基水杨酸比色法

E.1 原理

纤维素酶解所生成的还原糖与3,5-二硝基水杨酸反应生成橙色的3-氨基-5-硝基水杨酸。颜色深度与还原糖量相关，因而可通过测定还原糖量来表示纤维素酶的活力。纤维素酶活力以1 g干土72 h生成1 mg葡萄糖为1个酶活力单位，单位以U表示。

E.2 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。

E.2.1 甲苯。

E.2.2 醋酸溶液(0.2 mol/L)：量取11.55 mL冰醋酸(ρ=1.05 g/mL)，用水定容至1 000 mL。

E.2.3 醋酸钠溶液(0.2 mol/L)：称取醋酸钠($C_2H_3O_2Na$)16.4 g(或三水合醋酸钠$C_2H_3O_2Na\cdot 3H_2O$ 27.22 g)，用水溶解后定容1 000 mL。

E.2.4 醋酸盐缓冲液(pH 5.5)：取醋酸溶液11.0 mL和醋酸钠溶液88.0 mL，混匀即成pH 5.5醋酸盐缓冲液。

E.2.5 羧甲基纤维素溶液(5 mg/mL)：称取羧甲基纤维素钠0.5 g，加入适量的pH 5.5醋酸盐缓冲液，加热溶解后移入100 mL容量瓶中，用pH 5.5醋酸盐缓冲液定容至100 mL。

E.2.6 3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS试剂)：配制方法见D.2.8。

E.2.7 葡萄糖溶液(1 mg/mL)：配制方法见D.2.6。

E.3 仪器

E.3.1 电子天平：感量0.000 1 g和感量0.01 g。

E.3.2 紫外可见分光光度计。

E.3.3 恒温培养箱。

E.4 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，风干样品粉碎粒度应通过1 mm孔径筛。

E.5 分析测定

警示——整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应避光(直射阳光)，具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个试验过程中，操作者应按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

E.5.1 标准曲线绘制

分别吸取1 mg/mL的葡萄糖溶液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3.0 mL混匀，于沸水浴中准确反应5 min(从水重新沸腾时算起)，取出立即冷水浴冷却至室温后，用水定容至20 mL，配成质量浓度为0 mg/mL、0.005 mg/mL、0.010 mg/mL、0.015 mg/mL、0.020 mg/mL、0.025 mg/mL葡萄糖系列标准溶液。以0 mg/mL葡萄糖标准溶液为空白调零，在波长540 nm处测定葡萄糖系列标准溶液吸光度。以吸光度值为横坐标，对应的葡萄糖质量浓度为纵坐标，绘制标准曲线。

E.5.2 样品测定

称取土壤样品 5.0 g(精确到 0.000 1 g),置于 50 mL 锥形瓶中,加入 1.5 mL 甲苯,摇匀后放置 15 min,再加 5 mg/mL 羧甲基纤维素溶液 5.0 mL 和 pH 5.5 醋酸盐缓冲液 5.0 mL,摇匀。将锥形瓶封口后放入 37 ℃恒温箱中培养 72 h。培养结束后,将培养物 8000 r/min 离心 5 min,然后取 1.0 mL 上清液,加入到 20 mL 具塞刻度管中,加 DNS 试剂 3.0 mL 混匀,于沸腾水浴中加热 5 min(从水重新沸腾时算起),取出后立即冷水浴冷却至室温,用蒸馏水定容至 20 mL。以 0 mg/mL 葡萄糖标准溶液为空白调零,在波长 540 nm 处测定样品吸光度。

如果样品吸光度超过标准曲线的最大值,可稀释上清液或减少土样称样量。

E.5.3 无羧甲基纤维素空白试验

每个样品应做无羧甲基纤维素空白试验,不加羧甲基纤维素溶液,以等体积的蒸馏水代替羧甲基纤维素溶液,其他操作与 E.5.2 相同。

E.5.4 无土空白试验

每次测定应做无土空白试验,不加土样,其他操作与 E.5.2 相同。

E.6 结果计算

土壤纤维素酶活力 X_t,单位为 U,按式(E.1)计算:

$$X_t = \frac{(\rho_1 - \rho_7 - \rho_6) \times V \times D \times 72}{m \times t} \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (E.1)$$

式中:

ρ_1——样品吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

ρ_7——无羧甲基纤维素空白吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);

ρ_6——无土空白吸光度由标准曲线求得葡萄糖质量浓度,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;

72——时间换算系数;

m——土壤样品质量,单位为克(g);

t——反应时间,单位为小时(h)。

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。

E.7 精密度

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试,获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 20%,以大于这两个测定值的算术平均值的 20%的情况不超过 5%为前提。

附 录 F
（资料性）
农用微生物菌剂功能评价汇总报告编写格式

表 F.1 规定了农用微生物菌剂功能评价汇总报告编写格式。

表 F.1 农用微生物菌剂功能评价汇总报告编写格式

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、菌剂评价项目测定结果汇总		
评价内容	评价项目	测定结果
提供和活化养分功能	固氮能力	
	溶磷能力	
	解钾能力	
	活化中量元素能力	
	活化微量元素能力	
促进作物生长、提高作物产量、品质、抗逆性功能	促进作物生长评价	
	产量评价	
	品质评价	
	抗逆性评价	
土壤改良和修复功能	改良土壤评价	
	修复土壤评价	
有机物料腐熟功能	纤维素酶活力	
	木聚糖酶活力	
	蛋白酶活力	
	物料堆体腐熟温度升到 55 ℃所需时间	
	维温不低于 55 ℃的时间	
	种子发芽指数	
	有机物料失重率	
	秸秆断裂拉力	
三、菌剂功能评价综合判定		
四、菌剂具体功能评价目录表		
五、评价机构（盖章） 负责人（签名） 时间		

参 考 文 献

[1] GB 20287—2006 农用微生物菌剂
[2] NY/T 1113—2006 微生物肥料术语

GB/T 41727—2022

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
农用微生物菌剂功能评价技术规程
GB/T 41727—2022
*
中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销
*
开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 36 千字
2022年10月第一版 2022年10月第一次印刷
*
书号:155066·1-70954 定价 26.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

GB/T 41727-2022

扫上扫一扫 正版服务到