

中国菌物学会团体标准

低温腐解功能性菌的评估方法 Evaluation methods for low-temperature functional decomposer microorganisms

2026-*发布

2026-*实施

中国菌物学会发布

目 次

前言	1
1.范围	2
2.规范性引用文件.....	2
3 术语和定义	2
4 评价原则	3
5 指标体系与评价框架	4
6 评估方法	4
7 实验流程	6
8 质量控制和安全管理	8
9 评价报告编制	8
附录 A.....	9

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》的规定编制。

本标准由中国菌物学会归口。

本标准起草单位：中国科学院微生物研究所、聊城大学

本标准主要起草人：陈沛霖、李伟、曾昭清、赵大贺、齐莎、刘芳、吴琦、赵瑞琳、郭良栋、高程

本标准首次发布时间：2026年*月

1.范围

本文件规定了低温条件下腐解功能性菌的评价原则、指标体系与评价框架、评估方法、实验流程及综合评价标准。

本文件适用于低温条件（10 C° ~ 20 C°）下，具有木质纤维素降解能力的真菌、细菌等微生物菌株的功能评价。

本文件重点适用于农作物秸秆低温腐解功能性菌株的初筛、复筛和降解验证。

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/T 32725—2016/ISO 10381-6:2009 实验室测定微生物过程、生物量与多样性用土壤的好氧采集、处理及贮存指南

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

NY/T 2722-2015 秸秆腐熟菌剂腐解效果评价技术规程

GB/T 38488-2021 微生物快速测定方法

GB/T 34224-2017 生物产品中功能性微生物检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 低温腐解功能性菌

能够在规定低温条件下保持生长，并通过分泌木质纤维素降解相关酶促进参考玉米秸秆结构或质量损失的微生物。

3.2 腐解功能酶系

参与秸秆木质纤维素解聚的多酶组合，包括漆酶、纤维素酶、半纤维素酶和过氧化物酶。

3.3 漆酶

以氧为电子受体、以 ABTS 为显色底物测定的多铜氧化酶活性，缩写为 Lac。

3.4 纤维素酶

以羧甲基纤维素钠为底物、以还原糖生成量测定的羧甲基纤维素酶活性，缩写为 CMCase。

3.5 半纤维素酶

以木聚糖为底物、以木糖生成量表征的木聚糖水解相关活性，缩写为 Hemi。

3.6 过氧化物酶

以愈创木酚和过氧化氢为底物、以 470 nm 吸光度变化测定的过氧化物酶总活性，缩写为 POD。

3.7 滤纸崩解率

以定性滤纸为唯一碳源，通过观察滤纸在微生物作用下的崩解、碎裂程度，快速评估菌株纤维素降解能力的定性或半定量实验方法。

3.8 秸秆干重降解率

秸秆试样经培养后，扣除无接种全流程空白本底损失和匹配灭活接种对照残留偏差的干质量损失百分比。

3.9 秸秆组分降解率

秸秆中纤维素、半纤维素或木质素的初始质量经培养后减少，并扣除组分特异空白损失和灭活接种残留偏差的百分比。

4 评价原则

4.1 科学性原则

采用统一、标准化的评价方法，确保评价结果具有代表性、准确性和可重复性。

4.2 多指标综合评价原则

不以单一酶活指标作为评价依据，应综合漆酶、纤维素酶、半纤维素酶和过氧化物酶的多酶系协同活性，结合滤纸崩解能力和秸秆实际降解率进行综合评价。

4.3 低温适应性原则

所有评价实验应在低温条件 ($15\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) 下进行，以准确反映菌株在低温环境下的实际降解能力。

4.4 分层评价原则

按“平板初筛 (EI 值) → 液体发酵酶活动定量测定 → 滤纸崩解半定量 → 秸秆实际降解验证”的层级流程逐级筛选验证。

4.5 可操作性原则

评价方法应兼顾实验室常规条件和实际应用场景，采用常规设备与试剂，确保评价工作切实可行、便于推广。

5 指标体系与评价框架

5.1 指标体系构成

低温腐解功能性菌的评价指标体系是基于漆酶—纤维素酶—半纤维素酶—过氧化物酶的多酶系协同评价方法。测定指标共 4 项：①平板初筛 EI 值（快速初筛指标）；②液体发酵酶活（低温定量测定指标）；③滤纸崩解实验等级（纤维素快速降解半定量指标）；④秸秆实际降解率（实际降解能力核心指标）。

5.2 评价框架

低温腐解功能性菌的综合评价框架如图 1 所示，平皿初筛（EI 值）快速判定菌株产酶能力强弱，液体发酵酶活进一步定量表征产酶活性，滤纸崩解对纤维素降解能力快速定级，秸秆实际降解实验验证真实降解效果，层层筛选，对腐解菌的酶活特性以及腐解能力进行全面评价。



图一、低温腐解功能性菌的综合评价框架

6 评估方法

6.1 平板初筛 EI 值计算

$EI = D/d$ ，式中： D ：菌株水解（变色/褪色/透明）圈直径，单位为毫米（mm）； d ：菌落直径，单位为毫米（mm）。

$EI \geq 1.0$ 判为阳性。各酶所用筛选平板及显色方式见表 1。

表 1 平皿酶活快速筛选关键参数

产酶类型	筛选平板	显色/观察方式
漆酶	愈创木酚平板	菌落周围橙红/红褐色变色圈
纤维素酶	CMC-Na 平板	0.1% 刚果红染色后 NaCl 脱色，透明水解圈
半纤维素酶	木聚糖平板	刚果红染色后 NaCl 脱色，透明水解圈
过氧化物酶	苯胺蓝平板	菌落周围褪色（透明）圈

6.2 液体发酵酶活计算

6.2.1 酶活单位。在规定的测定条件下，每分钟催化转化 $1\ \mu\text{mol}$ 底物所需的酶量定义为 1 个酶活单位 (U)，以每毫升粗酶液的酶活 U/mL 表示。

6.2.2 分类等吸收测定的直接计算式（漆酶、过氧化物酶）为：

酶活 (U/mL) = $(\Delta A \times V \times 10^6) \div (\varepsilon \times t \times v)$ ，式中：

ΔA ：反应时间内吸光度变化值 ($\Delta A = A_{\text{终}} - A_{\text{始}}$)；

V ：反应总体积，单位为毫升 (mL)； ε ：摩尔消光系数，单位为 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ；

t ：反应时间，单位为分钟 (min)； v ：粗酶液体积，单位为毫升 (mL)。

6.2.3 还原糖显色法（纤维素酶、半纤维素酶）的酶活按 DNS 法标准曲线换算。先建立底物水解产生的还原糖（葡萄糖/木糖）含量与吸光度的标准曲线（附录 A），再按下列式换算：

酶活 (U/mL) = $(n \times 1000) \div (M \times t \times v)$ ，式中：

N ：由标准曲线查得的反应液中还原糖质量，单位为毫克 (mg)；

M ：还原糖（葡萄糖/木糖）摩尔质量，单位为 g/mol；

t ：酶促反应时间，单位为分钟 (min)； v ：粗酶液体积，单位为毫升 (mL)。

四种酶具体测定条件（底物、缓冲液、反应温度、测定波长、消光系数等）见表 2。

表 2 酶活测定关键参数

酶	底物/试剂	缓冲液	反应条件	测定波长
漆酶	ABTS (0.5mmol/L)	乙酸-乙酸钠缓冲液 pH 5.0	30 C°, 3 min	420 nm
纤维素酶	1% CMC-Na	柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH 4.8	50 C°, 30 min	540 nm
半纤维素酶	1% 木聚糖	柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH 5.0	50 C°, 30 min	540 nm
过氧化物酶	$\text{MnSO}_4 + \text{DMP} + \text{H}_2\text{O}_2$	乳酸-乳酸钠缓冲液 pH 4.5	30 C°, 3 min	468 nm

注：标准曲线相关系数 R^2 应 ≥ 0.99 ，每批新配试剂需重绘曲线。

6.3 滤纸崩解实验等级评定

以定性滤纸为唯一碳源，记录培养第 7 d、14 d、21 d、28 d 的滤纸崩解程度，按表 3 评定级别。

表 3 滤纸崩解率等级

等级	崩解程度描述
I 级（强崩解）	滤纸完全崩解为碎片或糊状，培养基浑浊
II 级（中崩解）	滤纸明显断裂、变薄，部分区域透明化
III 级（弱崩解）	滤纸部分变薄，边缘碎裂，整体结构保持
IV 级（无崩解）	培养 28 d 后滤纸形态无明显变化

6.4 秸秆实际降解率计算

6.4.1 干重降解率按下式计算：

$$\text{干重降解率 (\%)} = (W_0 - W_t) \div W_0 \times 100\%$$

式中： W_0 ：初始（接菌前）秸秆干重，单位为克（g）； W_t ：降解后剩余秸秆干重，单位为克（g），均以 65 C° 烘干至恒重计。

6.4.2 纤维素、半纤维素、木质素组分降解率按下式计算：

$$\text{某组分降解率 (\%)} = (C_0 \times W_0 - C_t \times W_t) \div (C_0 \times W_0) \times 100\%$$

式中： C_0 ：初始秸秆该组分含量（质量分数，%），由范式（Van Soest）洗涤纤维分析法测得； C_t ：降解后秸秆该组分含量（%）； W_0 、 W_t 含义同 6.4.1。

6.4.3 推荐以玉米秸秆为底物，也可按实际需要选择水稻、小麦等其他农作物秸秆，但须在报告中注明底物种类及初始组分含量。

7 实验流程（各实验操作规程）

7.1 实验准备

7.1.1 菌株活化：在无菌条件下挑取斜面或甘油管保藏菌落，接种于 PDA 平板，于 26 C° 培养 4 d ~ 6 d，再转入 15 ± 1 C° 培养箱适应培养，以 1 cm 直径打孔器制取菌块备用。

7.1.2 培养基与试剂：按本文件附录及第 6 章要求配制各类筛选平板、发酵培养基、显色剂与缓冲液，121 C° 灭菌 20 min。

7.1.3 低温工作条件：所有评价实验均在同一低温培养箱中于 15 C° ± 1 C° 进行；设置常规对照温度 20 ± 1 C° 和 26 ± 1 C°。

7.1.4 平行与对照：每个处理设 ≥ 3 个平行重复，酶活测定设置空白对照与阳性对照，

每批实验设置标准菌株对照。

7.2 平板初筛实验流程

(1) 把 1 cm 菌块接种于愈创木酚 PDA 平板中央, $15 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d~10 d, 观察橙红/红褐色变色圈, 测量变色圈直径 D 与菌落直径 d , 按 6.1 计算 EI 值。

(2) 把 1 cm 菌块接种于 CMC-Na 平板中央, $15 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d~10 d; 倾入 0.1% 刚果红染色 30 min, 弃去染液, 用 1 mol/L NaCl 脱色 15 min, 观察透明水解圈, 测量并计算 EI 值。

(3) 把 1 cm 菌块接种于木聚糖平板中央, $15 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d~10 d; 刚果红染色、NaCl 脱色后观察透明水解圈, 计算 EI 值。

(4) 把 1 cm 菌块接种于苯胺蓝平板中央, $15 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d~10 d, 观察褪色 (透明) 圈, 计算 EI 值。

(5) 凡至少 1 种酶 $\text{EI} \geq 1.0$ 的菌株判为初筛阳性, 进入液体发酵复筛; $\text{EI} < 1.0$ 的菌株不进入后续评价。

7.3 液体发酵与酶活测定实验流程

(1) 种子液制备: 挑取活化菌丝块接种于 PDA 液体培养基, $15 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 5 d~7 d。

(2) 发酵培养基: 玉米秸秆粉 10 g/L、葡萄糖 2 g/L、蛋白胨 2 g/L、 KH_2PO_4 1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, pH 自然, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。

(3) 液体发酵: 按 10% (体积分数) 接种量接入种子液, $15 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 7 d~14 d; 于第 7 d、10 d、14 d 定时取样。

(4) 粗酶液制备: 取发酵液 4 mL, 8000 r/min 离心 15 min, 取上清即粗酶液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 当日测定。

(5) 酶活测定: 按 6.2 规定分别测定漆酶 (ABTS 法)、纤维素酶 (CMC-Na-DNS 法)、半纤维素酶 (木聚糖-DNS 法)、过氧化物酶 (DMP 法) 活性; DNS 法需先按附录 A 绘制标准曲线。

7.4 滤纸崩解实验流程

(1) 培养基: 采用 Mandels 无机盐培养基, pH 5.0~5.5, 以 Whatman No.1 定性滤纸条 (1 cm×6 cm) 为唯一碳源。

(2) 接种与培养: 无菌条件下将菌块 (或种子液) 接种于滤纸培养基, $15 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置

培养。

(3) 观察记录：分别于培养第 7 d、14 d、21 d、28 d 观察滤纸崩解、碎裂、变薄、透明化程度并拍照记录，按 6.3 表 3 评定等级。

7.5 秸秆实际降解实验流程

(1) 秸秆处理：玉米秸秆于 65 C° 烘干至恒重，粉碎至粒径 2 mm ~ 5 mm，备用。

(2) 称量与灭菌：称取秸秆粉 20 g，加入 Mandels 无机盐营养液 50 mL，121 C° 灭菌 30 min；以不接菌的灭菌秸秆为空白对照。

(3) 接种与培养：按 10% (W/V) 接种量接入种子液并搅拌均匀， 15 ± 1 C° 静置培养 30 d ~ 50 d，每 10 d 取样一次；分别设 20 ± 1 C°、 26 ± 1 C° 对照组。

(4) 干重降解测定：培养结束，发酵物于 65 C° 烘干至恒重，称重，按 6.4.1 计算干重降解率。

(5) 组分含量测定：采用范式洗涤纤维分析法测定降解前后纤维素、半纤维素、木质素含量，按 6.4.2 计算各组分降解率。

(6) 微观结构观察（可选）：选取代表性样品，经固定、脱水、干燥、喷金后，于扫描电镜下观察秸秆表面微观结构变化，辅助评判降解效果。

8 质量控制和安全管理

8.1 所有评价实验应设置至少 3 个平行重复，结果以平均值±标准差表示。

8.2 酶活测定需设置空白对照和阳性对照，确保实验结果的可靠性。

8.3 每批实验应设置标准菌株作为对照，以保证批次间结果的可比性。

8.4 实验记录应完整、规范，原始数据及整理过程需建档保存并电子化备份。

8.5 实验操作人员应经过微生物实验操作培训，掌握无菌操作技术。

8.6 涉及真菌孢子操作应在生物安全柜中进行，防止孢子扩散。

8.7 实验废弃物应经 121 C° 高压灭菌处理后方可排放。

8.8 化学试剂（苯胺蓝、ABTS、DNS 等）应按化学品安全管理规范使用和保存，涉及强酸（72%硫酸等）操作须做好防护。

9 评价报告编制

评价报告应包括以下内容：

1. 菌株信息：菌株名称、来源、保藏编号及分子鉴定结果；

2. 实验方法：平板初筛、液体发酵条件、酶活测定、滤纸崩解、秸秆降解实验方法；
3. 实验结果：平板初筛 EI 值、各酶活测定数据、滤纸崩解等级、秸秆干重降解率及各组分变化；
4. 结论与建议：对菌株低温腐解功能作出评价结论，并提出应用建议。

附录 A

A.1.1 准确称取干燥至恒重的葡萄糖标准品，配制成 1 mg/mL 葡萄糖标准溶液。

A.1.2 分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 标准溶液，加蒸馏水补至 1 mL，加入 1 mL DNS 试剂，沸水浴 5 min，冷却后定容至 10 mL，于 540 nm 处测定吸光度。

A.1.3 以葡萄糖含量 (mg) 为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线， R^2 应 ≥ 0.99 。

A.2.1 准确称取干燥至恒重的木糖标准品，配制成 1 mg/mL 木糖标准溶液。

A.2.2 分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 标准溶液，加蒸馏水补至 1 mL，加入 1 mL DNS 试剂，沸水浴 5 min，冷却后定容至 10 mL，于 540 nm 处测定吸光度。

A.2.3 以木糖含量 (mg) 为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线， R^2 应 ≥ 0.99 。

A.3.1 标准曲线相关系数 R^2 应 ≥ 0.99 。

A.3.2 每批新配 DNS 试剂与底物后需重新绘制标准曲线。