



降解水稻秸秆的复合菌系及其微生物群落结构演替

王春芳^{1,2}, 马诗淳^{1,2}, 黄艳^{1,2}, 刘来雁^{1,2}, 凡慧^{1,2}, 邓宇^{1,2*}

¹ 农业部沼气科学研究所, 四川 成都 610041

² 农业部农村可再生能源开发利用重点实验室, 四川 成都 610041

摘要: 【目的】比较和分析从堆肥中富集的水稻秸秆降解菌系F1和F2的纤维素分解能力、微生物群落结构及其在秸秆降解过程中的演替, 从而探究微生物群落结构与秸秆降解效率的相关性。【方法】采用DNS (3,5-二硝基水杨酸, 3,5-dinitrosalicylic acid)定糖法测定发酵液中的外切纤维素酶活; 采用范氏(Van Soest)洗涤纤维分析法测定发酵前与发酵后的秸秆纤维素、半纤维素、木质素的含量, 并计算降解率; 采用16S rRNA基因序列分析和实时荧光定量PCR (Quantitative real-time PCR, Q-PCR)对秸秆降解过程中的微生物物种组成及特定的功能微生物进行定性和定量分析。【结果】复合菌系F1的水稻秸秆总降解率、纤维素降解率、半纤维素降解率显著高于复合菌系F2; 2种复合菌系的外切纤维素酶活性与*cel48*基因的拷贝数变化趋势一致; 复合菌系F1的物种较丰富, 优势物种是好氧细菌, 复合菌系F2的物种组成较单一, 培养后期具有较高比例的厌氧纤维素分解菌; 培养前4天, 复合菌系F1和F2的优势物种均为Unclassified Bacillales和*Bacillus*; 第4天之后, 不同复合菌系的优势物种及丰度出现差异, F1的优势物种主要属于Bacteroidetes, F2的优势物种主要属于Firmicutes; 虽然*Petrimonas*和*Pusillimonas*是培养后期的共有优势物种, 但是*Petrimonas*在复合菌系F2中的相对丰度(38.30%)显著高于F1(9.47%), 且培养第8天的F2中的Clostridiales OPB54增加至14.85%。【结论】*cel48*基因拷贝数变化与秸秆纤维素的降解效率、外切纤维素酶活性变化具有一定的相关性, *cel48*基因可作为潜在的生物分子标记监测秸秆纤维素的降解过程; 微生物群落结构对秸秆纤维素的降解效率具有显著影响, Unclassified Bacillales, *Bacillus*, *Petrimonas*, *Pusillimonas*是复合菌系F1和F2降解秸秆纤维素过程中的重要物种。

关键词: 水稻秸秆, 外切纤维素酶, 降解率, 微生物群落

基金项目: 国家“863计划”(2013AA102805-02); 四川省科技计划项目(2012GZ0003, 2014NZ0045); 四川省应用基础研究计划项目(2013JY0006)

*通信作者。Tel: +86-28-85260729; E-mail: dengyu@caas.cn

收稿日期: 2016-03-08; 修回日期: 2016-05-10; 网络出版日期: 2016-05-13

秸秆纤维素的水解效率是秸秆资源化利用的关键技术瓶颈。针对这一问题,国内外科学家不断探索和优化新的纤维素转化和利用技术,其中采用生物技术实现秸秆纤维素的高效转化一直是近二十年来的研究重点^[1]。自上世纪开始,科学家从自然界中筛选获得了大量的纤维素分解菌,其中*Clostridium thermocellum*, *Caldicellulosiruptor obsidiansis*, *C. phytofermentans*等具有较高的纤维素降解效率^[2-4],但是与实际应用之间还具有一定的差距。与单一的纤维素分解菌相比,从自然界中(如堆肥、池塘污泥、沼气池等)富集、驯化获得的复合菌系,或利用纤维素分解菌与非纤维素分解菌人工构建的复合菌系,能够充分发挥不同功能微生物之间的协作关系,解除代谢产物的反馈抑制,促进纤维素的转化^[5-6],崔宗均等^[7]从堆肥中筛选的复合菌系MC1培养72 h滤纸降解率为88%,Wang等^[8]从芦苇池塘污泥中获得的复合菌系LDC培养15 d后可降解60.9%的芦苇秸秆木质素和43.0%的半纤维素。然而,由于微生物群落结构的复杂性、微生物的不可培养性及其协同作用等因素,很难通过传统的分离技术确定协同降解纤维素的微生物成员所发挥的作用,限制了人们对纤维素降解系统中微生物的功能及其相互作用的认识^[9],也影响了纤维素生物转化效率的进一步提高。通过未培养技术分析纤维素水解过程中的微生物组成及其演替规律,揭示该过程中发挥功能的关键微生物,对充分认识、利用不同功能微生物之间的协同作用和提高微生物降解秸秆纤维素的效率具有重要的意义。

本研究以从堆肥中富集的2组秸秆降解复合菌系(F1、F2)为研究对象,通过分析和比较它们的秸秆纤维素降解能力、微生物群落结构及其在秸秆降解过程中的动态变化,揭示了复合菌系降解秸秆纤维素过程中的关键微生物及群落结构演替规律,探讨了物种组成对纤维素降解效率的影响,从而为认识秸秆降解过程中的微生物相互作

用、构建高效稳定降解水稻秸秆的复合菌系提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源: (1) 复合菌系样品: 复合菌系F1来源于以猪粪为接种物的秸秆堆肥样品, F2来源于以河底淤泥为接种物的秸秆堆肥样品,二者均以秸秆为底物进行富集培养,培养温度为40 °C,获得的复合菌系经低温冻干制备为粉状菌剂保存。(2) 质粒与基因标准品: 基因克隆采用的质粒pMD19-T购于TaKaRa, 细菌16S rRNA基因及糖苷水解酶基因(glycoside hydrolases of families 48, *cel48*)定量标准品为本实验室制备的重组质粒。

1.1.2 秸秆原料特性: 水稻秸秆(采集于成都农田,烘干后粉碎,过40-60目筛),总固体含量(Total solids,TS)为89.77%,纤维素、半纤维素、木质素含量分别为38.78%、28.48%、7.56%。

1.1.3 培养基组成(g/L): NaCl 5、尿素 2、酵母粉 1、蛋白胨 2、CaCO₃ 2,加入自来水^[10]。水稻秸秆根据实验要求添加至培养基,1×10⁵ Pa灭菌30 min。

1.1.4 试剂与仪器: 酵母粉与蛋白胨(Oxoid),其他化学试剂(分析纯,国药),基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN),琼脂糖凝胶纯化试剂盒(Omega),pMD19-T载体(TaKaRa),*E. coli* DH5 α 感受态细胞(TaKaRa),Ex *Taq*酶(TaKaRa),SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad),纤维素分析仪(VELP-FIWE6),荧光定量PCR仪(Bio-Rad CFX96),多功能酶标仪(Thermo Varioskan Flash),PCR仪(ABI 2720)。

1.2 复合菌系的培养

配制145 mL培养基,加入4.5 g秸秆至锥形瓶中,分别接种复合菌系F1、F2的冻干粉1 g,对照组不接种,每个实验组设置3个重复。实验组和对

照组均置于恒温摇床上培养, 培养温度40 °C, 转速为185 r/min。实验周期为10 d, 每2 d取1次培养液, 用于测定发酵液中的外切纤维素酶活性。

1.3 外切纤维素酶测定

测定秸秆降解过程取第0、2、4、6、8、10天发酵液3 mL, 10000 r/min, 离心7 min, 取0.5 mL上清液, 加入到含有50 mg微晶纤维素和1.5 mL柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.5)的具塞刻度试管, 50 °C水浴中保温45 min, 采用DNS法测定还原糖含量^[10]。实验中每个样本设置3个重复。以1 h催化微晶纤维素水解生成1 μmol葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位U, 以U/mL表示。

1.4 秸秆降解率的测定

秸秆降解10 d后, 秸秆残渣经过滤、蒸馏水洗涤1次, 使用稀酸冲洗消除菌体以及溶解碳酸钙沉淀, 再使用蒸馏水洗涤2次。采用烘干恒重法测定秸秆TS^[13], 采用范氏(Van Soest)洗涤纤维分析法测定秸秆中纤维素、半纤维素、木质素的含量^[14], 以不接种实验组的秸秆作为对照, 计算秸秆、纤维素、半纤维素和木质素降解率。

1.5 微生物群落结构分析

利用TIANGEN细菌基因组提取试剂盒提取、纯化基因组DNA, DNA样品保存于-80 °C待用。

1.5.1 细菌16S rRNA基因克隆文库分析: 以第10天基因组DNA为模板, 采用细菌通用引物

B27F和B907R(表 1)对细菌16S rRNA基因进行PCR扩增。PCR反应体系(30 μL): Ex *Taq*酶(5 U/L) 0.2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各0.8 μL, DNA模板(约为10 ng/μL) 1 μL, BSA 0.2 μL, 剩余体积用无菌ddH₂O补足。PCR反应程序: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 90 s, 72 °C 90 s, 循环数25; 72 °C 10 min。PCR产物使用E.Z.N.A.[®]琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收和纯化。将纯化的PCR产物与pMD19-T载体(TaKaRa)按照操作说明进行连接。采用热激法将连接产物转化至DH5α大肠杆菌感受态细胞中, 最后进行蓝白斑筛选。

每个复合菌系随机挑取140–150个白色菌落, 由北京博迈德基因技术有限公司进行测序, 测序引物为载体通用引物M13-47F。测序结果使用MEGA 5去除载体序列, 根据bellerophon结果去除嵌合体(<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>), 使用mothur进行OTU分析, 分析结果使用MEGA 5建立系统进化树。

1.5.2 微生物群落结构分析: 基因组DNA由苏州金唯智生物科技有限公司进行测定, 采用Illumina MiSeq测序平台检测16S rRNA的V3-V5高变区[每个样本产出至少5万条读长(reads)], 并通过QIIME Pipeline-Version 1.7.0 (<http://qiime.org/tutorials/tutorial.html>)在线分析软件进行数据分析, 采用R语言包在属水平绘制heatmap图。

表1. 本研究使用的引物
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Reference
B27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	[11]
B519F	CAGCMGCCGCGGTAANWC	
B907R	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	
cel48_490F	TNATGGTTGAAGCTCCDGAYTAYGG	[12]
cel48_920R	CCAAANCCRTACCAGTTRTCAACRTC	
M13F	GTTTTCCAGTCACGAC	Promega
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	

1.6 细菌和纤维素酶的基因定量分析

细菌16S rRNA基因定量采用细菌通用引物B519F、B907R^[11]。糖苷水解酶基因定量选择特异性引物*cel48_490F*、*cel48_920R*。定量PCR反应体系(10 μ L): SsoFastTM Eva Green[®] Supermix 5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L, DNA模板(约为1 ng/ μ L) 2 μ L, 剩余体积用无菌ddH₂O补足, 每个样品做3个重复, 并使用标准品制作标准曲线。细菌16S rRNA基因定量PCR的程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 54 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 循环数40, 在延伸阶段进行荧光检测。熔解曲线分析程序为: 从65 $^{\circ}$ C逐渐升温至95 $^{\circ}$ C, 再升高0.5 $^{\circ}$ C保持5 s, 检测此间荧光信号变化。糖苷水解酶基因定量程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 循环数40, 荧光检测在延伸阶段, 熔解曲线分析程序为: 从65 $^{\circ}$ C逐渐升温至95 $^{\circ}$ C, 再升高0.5 $^{\circ}$ C保持5 s, 检测这一阶段的荧光信号变化。

2 结果和分析

2.1 复合菌系的秸秆降解能力

以秸秆为底物, 40 $^{\circ}$ C培养, 分别从猪粪和河底淤泥作为接种物的秸秆堆肥样品中富集获得复合菌系F1和F2, 培养10 d后检测秸秆及其各组成成分的降解率。如图1所示, 复合菌系F1和F2对秸秆均有明显的降解作用。其中, F1的秸秆总降解率为52.55%, 显著高于复合菌系F2的40.95% ($P < 0.05$); 另外, 复合菌系F1和F2的纤维素降解率分别为58.28%和43.89%, 半纤维素降解率分别为48.25%和38.65%, 降解效率差异显著($P < 0.05$); 但是复合菌F1和F2对木质素降解能力较弱, 木质素降解率分别为2.90%和2.57%, 差异不显著($P > 0.05$)。因此, 复合菌系F1的秸秆降解效率显著高于复合菌系F2。

2.2 复合菌系外切纤维素酶活性分析

外切纤维素酶是纤维素水解的重要纤维素酶

组分, 为了分析复合菌系F1和F2水解纤维素的差异, 以秸秆作为底物培养复合菌系F1和F2, 监测复合菌系培养液中的外切纤维素酶活性变化。复合菌系外切纤维素酶活性如图2所示, 其中, 菌系F1的外切纤维素酶活性在第4天达到最高, 为0.58 U/mL, 而菌系F2的外切纤维素酶活性在第

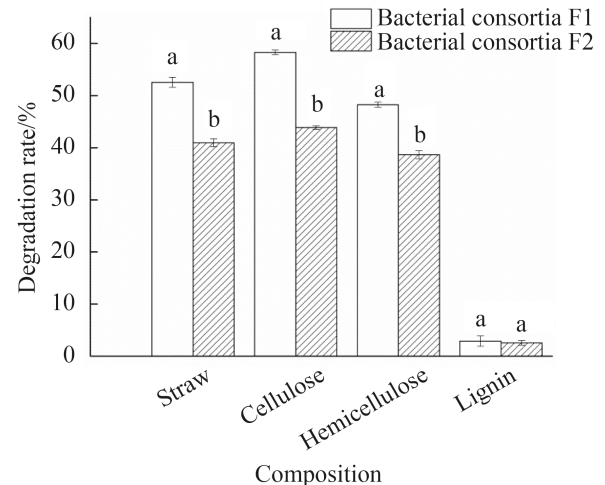


图1. 复合菌系F1和F2对水稻秸秆不同组分的降解效率
Figure 1. Degradation rates of various rice straw compositions by bacterial consortia F1 and F2. Note: the columns with different small letter have significant difference ($P < 0.05$).

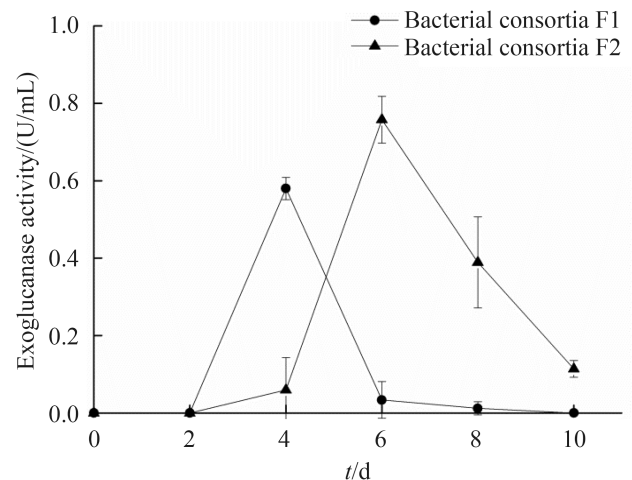


图2. 纤维素降解复合菌系F1和F2的外切纤维素酶活性的变化
Figure 2. The variation trend of exoglucanase of bacterial consortia F1 and F2.

6天达到最高, 为0.76 U/mL。

2.3 细菌和纤维素酶的基因定量分析

培养体系中的微生物数量与其代谢速率有直接的联系, 为了分析复合菌系F1和F2降解纤维素的能力与其中的微生物数量之间的联系, 采用Real time-PCR对细菌数量进行了定量分析。结果如图3-A所示, 培养前4天, 复合菌系F1的细菌数量较高, 16S rRNA基因拷贝数约为 8×10^9 ; 随后细菌数量减少, 培养第6天, 16S rRNA基因拷贝数约为 1.29×10^9 , 最后趋于稳定, 培养第10天时16S rRNA基因拷贝数为 1.38×10^9 。复合菌系F2的

细菌数量略高于F1, 发酵前4天, 复合菌系F2的细菌16S rRNA基因拷贝数约为 9×10^9 , 第10天后减少到 2.94×10^9 。因此, 复合菌系F1和F2细菌16S rRNA基因拷贝数差异不显著。

根据蛋白质结构域中氨基酸序列的相似性, 纤维素酶可划分为17个家族^[15-16], 其中, *cel48*在*Clostridium* spp., *Bacteroides cellulosolvens*, *Ruminococcus albus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Cellulomonas*等细菌中普遍存在^[17-18], 因此, 通过对复合菌系中*cel48*基因进行定量检测, 分析其拷贝数变化与纤维素酶活性之间的关系。如图3-B所示, 培养第2天, 复合菌系F1的, 复合菌系F1的*cel48*基因拷贝数为 5.74×10^5 , 在第4天, 外切纤维素酶活力达到最大, *cel48*基因拷贝数也达到最大值, 约为 2.77×10^7 , 至培养结束时, *cel48*基因拷贝数减少至 4.41×10^4 。复合菌系F2培养第2天时*cel48*基因拷贝数为 4.75×10^5 , 培养第6天, 当外切纤维素酶活性达到最大值时, *cel48*基因的数量也达到最大值为 3.64×10^6 , 培养第8天为 1.36×10^6 , 培养结束时*cel48*基因的拷贝数为 5.64×10^5 。结合纤维素水解过程中外切纤维素酶活力的变化, 结果表明: 复合菌系F1和F2的*cel48*基因拷贝数变化与外切纤维素酶活力变化趋势相似。

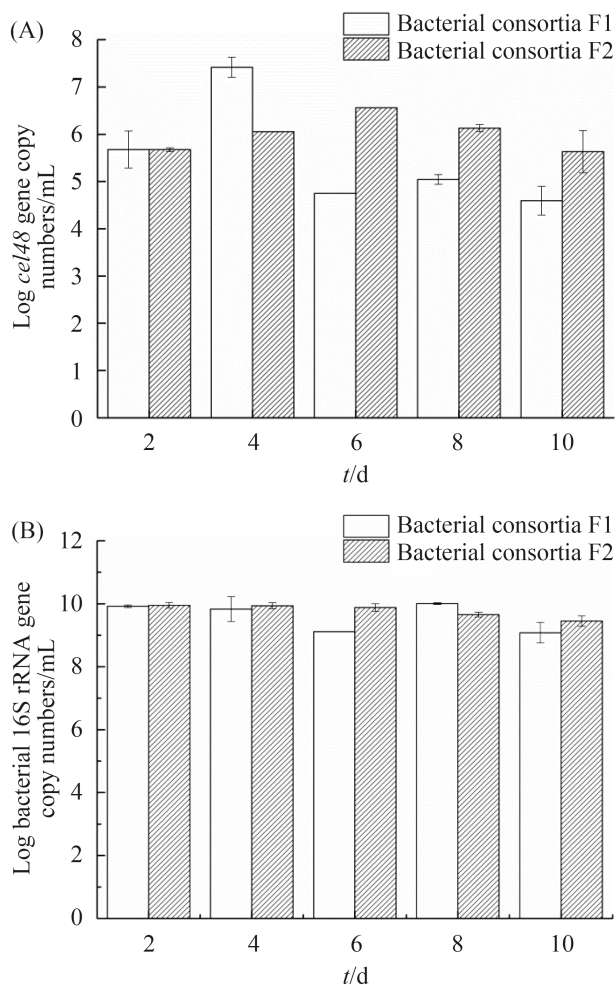


图3. 复合菌系F1和F2的细菌16S rRNA (A)和*cel48*基因(B)拷贝数变化

Figure 3. The copy numbers of bacterial 16S rRNA (A) and *cel48* (B) gene in culture.

2.4 复合菌系的微生物多样性分析

2.4.1 16S rRNA基因克隆文库: 随机挑取140-150个白斑进行测序, 序列长度约为880 bp。将测序结果在RDP数据库中进行比对, 将序列相似性>97%的克隆子定义为一个OTU, 复合菌系F1和F2共得到62个OTUs, 其中, 复合菌系F1得到28个OTUs, 复合菌系F2得到39个OTUs。以每个OTU代表克隆子的序列构建系统进化树, 其中, OTU所含的克隆子数量见表2。系统发育学分析结果显示, OTUs分别属于 γ -变形菌亚门、拟杆菌门、 β -变形菌亚门、厚壁菌门、疣微菌门。复合菌系F1以拟杆菌门为主(47.67%), 拟杆菌是化能有机营养菌, 代谢碳水化合物, 可以降解蛋白质、

碳水化合物等许多复杂的有机大分子化合物^[19]；复合菌系F2以厚壁菌门为主(62.33%)，也具有降解蛋白质、碳水化合物等许多复杂的有机大分子化合物的能力^[20]。

克隆文库结果显示，复合菌系F1和F2的物种组成和丰度具有差异。复合菌系F1的86个克隆子分属15个科，28个属，28个种，丰度范围为1.16%–16.28%。其中OTU2占16.28%，与*Flavobacterium* sp. 9_10相似性为93%；OTU3占13.95%，与Candidate division TM6 bacterium相似性为85%；OTU5占10.47%，与*Flavitalea populi* strain HY-50R相似性为95%；OTU4占9.30%，与*Pusillimonas noertemannii* strain 3-5-1相似性为98%；OTU7占5.81%，与

Porphyromonadaceae bacterium ING2-E5B相似性为100%；OTU8占5.81%，与Cytophagaceae bacterium R050相似性为94%。复合菌系F2的77个克隆子分属15科，28个属，39个种，丰度范围为1.30%–40.26%。其中OTU1占40.26%，与*Clostridium* sp. 6–31相似性为89%；OTU6占3.90%，与*Rhodothermus R050*相似性为94%。复合菌系F2的77个 *marinus* strain ir-1相似性为86%；OTU11占3.90%，与Clostridiales bacterium Yos55相似性为86%；OTU15占3.90%，与*Paenibacillus* sp. BAB-4180°相似性为93%。

2.4.2 复合菌系降解秸秆纤维素过程中的微生物群落结构演替：秸秆发酵是动态变化的过程，为

表2. 复合菌系F1和F2细菌16S rRNA克隆文库结果

Table 2. Data of bacterial 16S rRNA clone library in bacterial consortia F1 and F2

Clone ID	Number of OTUs		Frequency/%		Closest bacteria (accession number)	Similarity/%	Phylogenetic classification
	F1	F2	F1	F2			
OTU9	4	0	4.65	0.00	<i>Pelagicoccus croceus</i> strain N5FB36-5 (NR_041583.1)	91	Verrucomicrobia
OTU12	3	0	3.49	0.00	<i>Paenibacillus</i> sp. JCR0815 (JN688957.1)	94	Firmicutes
OTU15	0	3	0.00	3.90	<i>Paenibacillus</i> sp. BAB-4180 (KJ794157.1)	93	Firmicutes
OTU1	0	31	0.00	40.26	<i>Clostridium</i> sp. 6-31 (FJ808611.1)	89	Firmicutes
OTU17	0	2	0.00	2.60	<i>Clostridium</i> sp. 6-31 (FJ808611.1)	89	Firmicutes
OTU11	0	3	0.00	3.90	Clostridiales bacterium Yos55 (AB260040.1)	86	Firmicutes
OTU16	2	0	2.33	0.00	Gamma Proteobacterium CN40 (FN554395.1)	94	Gammaproteobacteria
OTU4	8	1	9.30	1.30	<i>Pusillimonas noertemannii</i> strain 3-5-1 (JX966649.1)	98	Betaproteobacteria
OTU13	2	1	2.33	1.30	<i>Pusillimonas</i> sp. EBR-8-1 (KF056995.1)	98	Betaproteobacteria
OTU14	1	2	1.16	2.60	<i>Pusillimonas noertemannii</i> strain 3-5-1 (JX966649.1)	99	Betaproteobacteria
OTU3	12	0	13.95	0.00	Candidate division TM6 bacterium (CP011212.1)	85	Bacteroidetes
OTU10	3	0	3.49	0.00	<i>Armatimonas rosea</i> strain YO-36 (NR_113009.1)	80	Bacteroidetes
OTU7	5	1	5.81	1.30	Porphyromonadaceae bacterium ING2-E5B (KP233810.1)	100	Bacteroidetes
OTU8	5	0	5.81	0.00	Cytophagaceae bacterium R050 (KC252879.1)	94	Bacteroidetes
OTU2	14	0	16.28	0.00	<i>Flavobacterium</i> sp. 9_10 (KC569793.1)	93	Bacteroidetes
OTU5	9	0	10.47	0.00	<i>Flavitalea populi</i> strain HY-50R (NR_117796.1)	95	Bacteroidetes
OTU6	3	3	3.49	3.90	<i>Rhodothermus marinus</i> strain ir-1 (EU214606.1)	86	Bacteroidetes

The OTUs (number of OTUs ≥ 2) in bacterial 16S rRNA clone library in F1 and F2.

揭示该过程中微生物的演替规律，采用高通量测序技术，分别对复合菌系F1和F2发酵第2、4、6、8和10天的微生物群落结构进行了分析，从而挖掘参与秸秆降解过程的关键微生物。

复合菌系F1属水平的heatmap图(图 5-A)显示，发酵前4天，优势属为Unclassified Bacillales (第2天相对丰度为40.75%)，Unclassified Bacilli (第2天相对丰度为13.53%)和*Flavobacterium* (第4天相对丰度为10.24%)。发酵第4–10天，优势属主要为

Petrimonas (第4天相对丰度为9.47%)，Candidatedivision TM7 (第8天相对丰度为7.38%)，*Paenibacillus* (第8天相对丰度为11.05%)，*Pusillimonas* (第8天相对丰度为5.27%)，*Luteimonas* (第6天相对丰度为5.57%)，Unclassified Rhodothermaceae (第10天相对丰度为5.74%)，Unclassified Chitinophagaceae (第10天相对丰度为6.04%)。值得关注的是，在第4天，外切纤维素酶活性达到最高的，以发酵纤维二糖、木糖等糖类产氢和二氧化碳为主的细菌

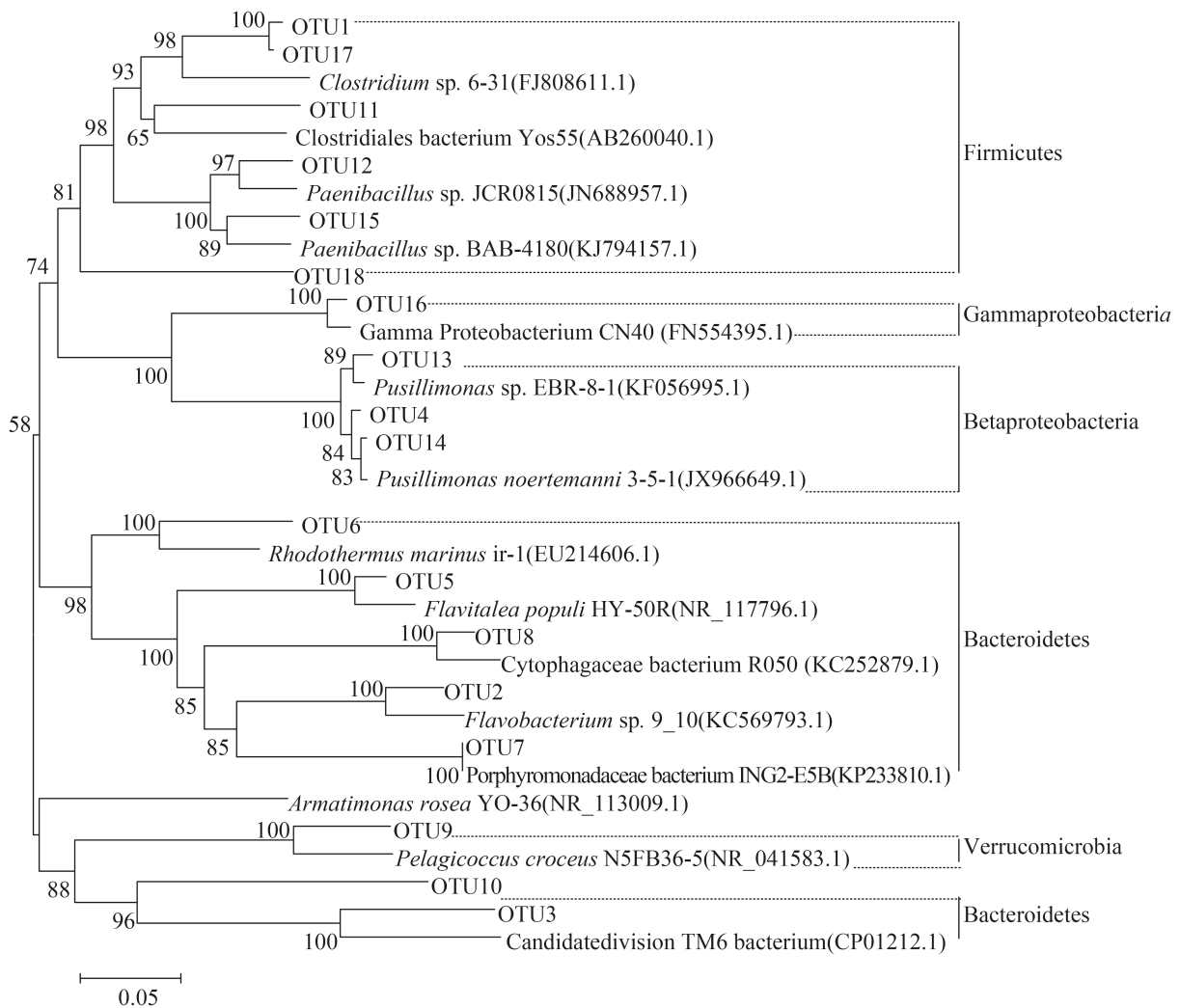


图 4. 复合菌系F1和F2的细菌16S rRNA系统进化树

Figure 4. Neighbour-joining phylogenetic tree of partial bacterial 16S rRNA gene sequences from bacterial consortia F1 and F2. The number in parentheses is accession number in GenBank, node number represents the confidence level of relatives, the length of branches represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.05.

*Petrimonas*出现并达到最高丰度, 至培养结束时一直维持较高的丰度(0.02%–9.47%)。

复合菌系F2属水平的heatmap图(图 5-B)显示, 发酵前4天, 优势属为Unclassified Bacillales(第2天相对丰度为26.81%), Unclassified Bacilli(第2天相对丰度为15.17%), *Bacillus*(第2天相对丰度为6.73%)。发酵第4天至10天, 优势属主要为*Petrimonas*(第6天相对丰度为38.30%), *Pusillimonas*(第8天相对丰度为7.73%), Clostridiales_OPB54(第8天相对丰度为14.85%)。与复合菌系F1相似, 外切纤维素酶活性达到最高时, *Petrimonas*的相对丰度也达到最高值, 为38.30%, 至培养结束时*Petrimonas*一直维持较高的丰度。但是, 与复合菌系F1不同的是, 在复合菌系F2水解纤维素的后期严格厌氧细菌Clostridiales的丰度增加。

3 讨论和结论

本文对从堆肥中富集获得的秸秆纤维素降解菌系F1和F2进行研究发现, 二者对秸秆纤维素均具有较高的降解能力, 秸秆总降解率分别为52.55%和40.95%。与目前已报道的研究结果相比, 复合菌系F1的纤维素降解能力较为突出。与牛俊玲等^[21]从高温堆肥中筛选构建的复合菌相比, F1的纤维素降解率(58.28%)是该菌系的7.89倍; 与Wang等^[8]从芦苇池塘的污泥中获得的复合菌系LDC相比, F1的纤维素降解率是LDC的29.14倍, 但是LDC的木质纤维素降解率(60.9%)是F1(2.9%)的21倍。

复合菌系F1的的秸秆总降解率、纤维素降解率和半纤维素降解率均显著高于F2 ($P < 0.05$)。细菌和纤维素酶基因定量结果表明, 复合菌系F1和F2的细菌16S rRNA基因拷贝数无明显差异, *cel48*基因拷贝数差异显著, *cel48*基因的Q-PCR的变化趋势与外切纤维素酶活性变化一致。由此推测,

*cel48*基因的表达量可能与复合菌系F1和F2水解秸秆纤维素的效率直接相关。

研究表明 γ -变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门的微生物是参与纤维素水解的主要物种^[22–23]。第10天的细菌16S rRNA克隆文库结果表明, 复合菌系F1和F2中所包含的微生物主要分布于Firmicutes, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria和Bacteroidetes。其中, *Pusillimonas*, Porphyromonadaceae和*Rhodothermus*是复合菌系F1和F2共有的优势物种。二者的特有优势物种差异较大, 复合菌系F1的优势物种主要属于拟杆菌门(47.67%), 如好氧的Candidate division TM6 bacterium, Cytophagaceae, *Flavobacterium*和*Flavitalea*; 复合菌系F2的优势物种则主要属于厚壁菌门(62.33%), 如厌氧纤维素分解菌*Clostridium*, 该物种的比例高达40%以上。高通量测序结果也显示, 复合菌系F1中以好氧纤维素分解菌为主, 而F2的微生物多样性较F1简单, 且以Clostridiales为代表的厌氧微生物比例较高, 多数为未培养物种。因此, 复合菌系的微生物群落组成的这种差异可能是造成二者纤维素降解效率差异的原因。优势物种Candidate division TM6 bacterium的功能现在还不清楚, 但是这类微生物广泛存在于泥炭、热泉等生态环境中^[24], 可能与纤维素的水解有关。Cytophagaceae是复合菌系F1的另一类优势物种, McBride等^[25]报道, Cytophagaceae虽然既不分泌游离的纤维素酶系, 又不形成明显的纤维小体, 但是具有高效的纤维素降解能力, 这类微生物或许也有助于复合菌系F1水解纤维素。而发酵后期, 可能随着培养体系中氧气的消耗, 复合菌系F2的特有优势菌出现了较高比例的Clostridiales, 该种群具有较普遍的纤维素分解能力^[26], 是秸秆纤维素降解的主要物种, 所产生的纤维素酶系各组分聚集在一起, 形成一个复杂的复合体—纤维

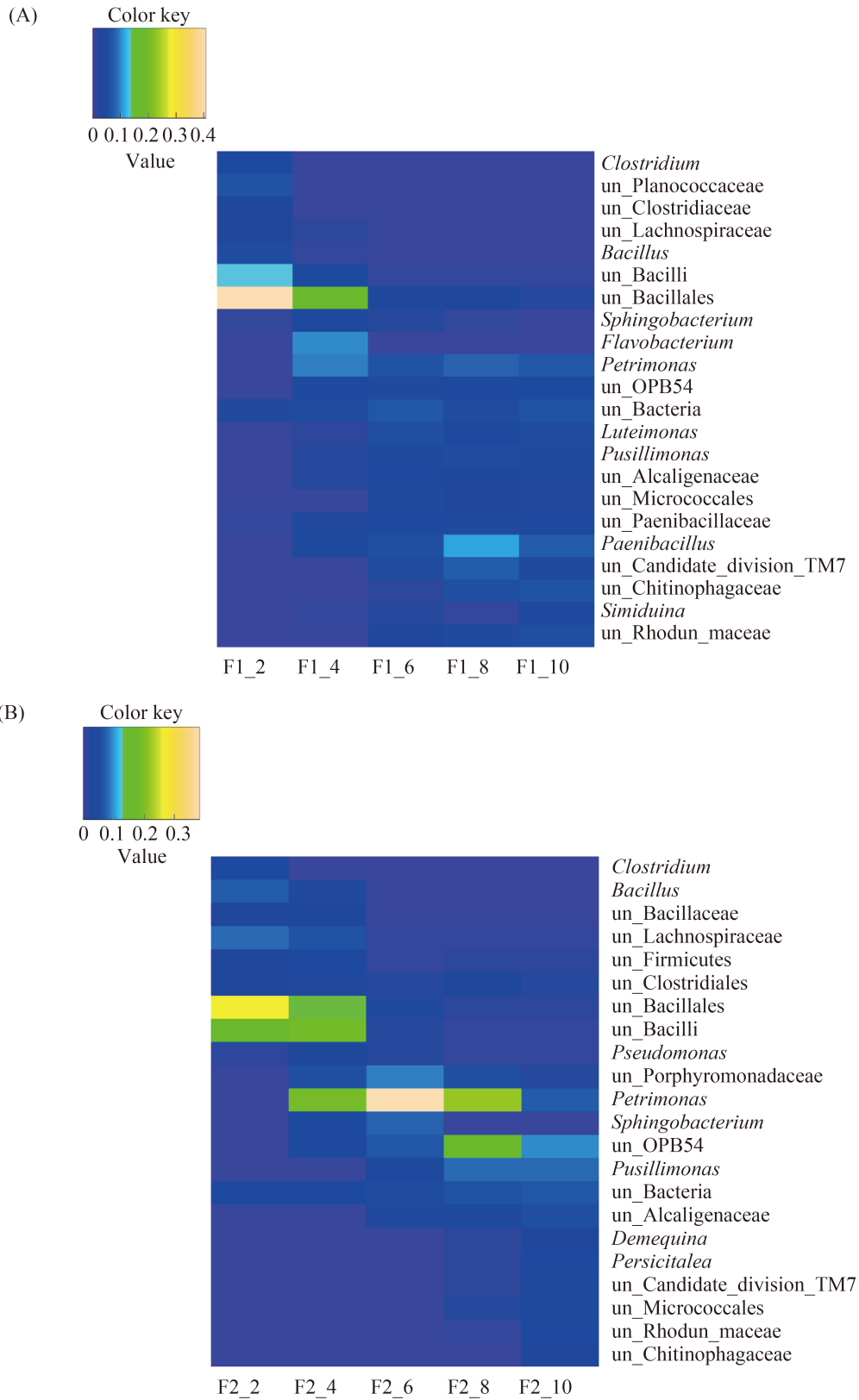


图 5. 培养过程中复合菌系F1 (A)和F2 (B)的细菌相对丰度变化

Figure 5. Variation of bacteria relative abundance of bacterial consortia F1 (A) and F2 (B) in culture.

小体, 但是*Clostridium*的纤维素降解效率及纤维素酶活力通常不及好氧纤维素分解菌。因此, 尽管复合菌系F2的*cel48*基因的拷贝数高于复合菌系F1, 但是F2对秸秆纤维素的降解效率却低于F1。值得注意的是, 复合菌系F2中, 在系统分类上属于Clostridiales的总OTUs占细菌16S rRNA克隆文库总OUTs的46.76%, 而高通量测序文库中却仅占14.85%, 这可能与细菌16S rRNA基因的多样性有关。研究发现, 一些细菌的16S rRNA基因存在多个拷贝, 且具有基因组内异质性, 当在唯一水平基于16S rRNA基因的全长及不同可变区分析微生物多样性时, 会引起不同程度的高估, 采用V1-V3区可造成82.6%的高估, V3区造成23%的高估, V4-V5区造成27.5%的高估。Clostridiales所属的厚壁菌门16S rRNA平均拷贝数为 6.01 ± 2.82 , 其中*Clostridium*的16S rRNA拷贝数为4-12个不等^[27-28]。本研究中的细菌克隆文库是基于16S rRNA的V1-V5区扩增片段所构建的, 高通量测序结果是基于V3-V5区的扩增片段测序进行的分析, 因此, 16S rRNA的异质性所产生的多样性高估可能是造成两种分析结果差异较大的原因。

本研究揭示了复合菌系F1和F2降解秸秆纤维素过程中微生物群落结构的动态变化。研究结果显示, 纤维素降解前4天两种复合菌系的优势物种具有一致性, 均为Unclassified Bacillales和*Bacillus*; 第4天之后, 两种复合菌系的优势物种出现差异, 复合菌系F1的物种多样性增加, 丰度差异较小, F2的优势物种较为单一, 丰度相对集中。*Petrimonas*和*Pusillimonas*是该阶段复合菌F1和F2的共有优势物。值得关注的是能以糖类作为底物生长的*Petrimonas*^[29], Guo等^[30]报道, 以香菇和双孢菇基质为原料的半连续厌氧发酵过程中, *Petrimonas*是重要的特有优势物种, K. Kampmann也发现*Petrimonas*是猪粪和牛粪厌氧消

化过程中的优势物种^[31]。在本实验中, 复合菌系的外切纤维素酶活性的变化趋势与*Petrimonas*的丰度变化具有一致性, 且当培养液的外切纤维素酶活性达到最高时, *Petrimonas*的丰度也达到了最高值, 其中在F1中的丰度为9.47%, F2中的丰度为38.30%。因此可以推测, *Petrimonas*可能以纤维素水解产生的糖类为底物进行增殖, 在物种竞争较小的复合菌系F2中, *Petrimonas*因具有充足的底物而得以快速生长。

微生物物种组成和群落结构动态变化显示, Unclassified Bacillales, *Bacillus*, *Petrimonas*, *Pusillimonas*是复合菌系F1和F2降解秸秆纤维素过程中的重要物种; 同时, 微生物多样性较丰富的F1比物种组成较单一的F2具有更强的秸秆纤维素降解能力, 这可能暗示着多种微生物的协同增殖有利于解除纤维素水解产物的反馈抑制作用, 从而提高了纤维素降解效率。因此, 为了强化复合菌系F1和F2的纤维素降解效率, 一方面可以利用传统的微生物分离技术从菌系中定向分离*Bacillus*, *Petrimonas*等关键功能微生物, 并通过添加等方式提高特定功能微生物的数量; 另一方面可以通过优化生长条件, 促进*Bacillus*、Clostridiales、*Petrimonas*和*Pusillimonas*等多种微生物的协同增殖, 增强微生物之间的协同作用。

参考文献

- [1] Ma YH, Wang LJ. The latest research progress in straw pretreatment. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2009, 17(3): 71-78. (in Chinese)
马英辉, 王联结. 秸秆预处理的最新研究进展. *纤维素科学与技术*, 2009, 17(3): 71-78.
- [2] Viljoen JA, Fred EB, Peterson WH. The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria. *The Journal of Agricultural Science*, 1926, 16(1): 1-17.
- [3] Hamilton-Brehm SD, Mosher JJ, Vishnivetskaya T, Podar M,

- Carroll S, Allman S, Phelps TJ, Keller M, Elkins JG. *Caldicellulosiruptor obsidiansis* sp. nov., an anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from Obsidian Pool, Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(4): 1014–1020.
- [4] Warnick TA, Methé BA, Leschine SB. *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(4): 1155–1160.
- [5] Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 2005, 8(3): 195–204.
- [6] Chandel AK, Singh OV. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of ‘Biofuel’. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(5): 1289–1303.
- [7] Yuan XF, Gao RF, Li PP, Zhu WB, Wang XF, Cui ZJ. Improvement of anaerobic biogasification efficiency by pretreatment of corn straw with composite microbial system of MC1. *Transactions of the CSAE*, 2011, 27(9): 266–270. (in Chinese)
袁旭峰, 高瑞芳, 李培培, 朱万斌, 王小芬, 崔宗均. 复合菌系 MC1 预处理对玉米秸秆厌氧发酵产甲烷效率的提高. *农业工程学报*, 2011, 27(9): 266–270.
- [8] Wang YX, Liu Q, Yan L, Gao YM, Wang YJ, Wang WD. A novel lignin degradation bacterial consortium for efficient pulping. *Bioresource Technology*, 2013, 139: 113–119.
- [9] Jiménez DJ, Dini-Andreote F, Van Elsas JD. Metataxonomic profiling and prediction of functional behaviour of wheat straw degrading microbial consortia. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 92.
- [10] 马诗淳. 沼气发酵微生物代谢调控技术研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2009.
- [11] Tang YQ, Shigematsu T, Morimura S, Kida K. Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 99(2): 150–164.
- [12] Pereyra LP, Hiibel SR, Riquelme MVP, Reardon KF, Pruden A. Detection and quantification of functional genes of cellulose-degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(7): 2192–2202.
- [13] 国家环保局. 水和废水监测分析方法. 3版. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- [14] Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3583–3597.
- [15] Zhang XM, Li DD, Wang LS, Zhao Y, Chen GJ. Molecular engineering of cellulase catalytic domain based on glycoside hydrolase family. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(4): 422–433. (in Chinese)
张小梅, 李单单, 王禄山, 赵越, 陈冠军. 纤维素酶家族及其催化结构域分子改造的新进展. *生物工程学报*, 2013, 29(4): 422–433.
- [16] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Suppl 1): D233–D238.
- [17] Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. REBASE—enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(Suppl 1): D269–D270.
- [18] Xu Q, Bayer EA, Goldman M, Kenig R, Shoham Y, Lamed R. Architecture of the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome: description of a cell surface-anchoring scaffoldin and a family 48 cellulase. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(4): 968–977.
- [19] Hill VR, Kahler AM, Jothikumar N, Johnson TB, Hahn D, Cromeans TL. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(13): 4218–4225.
- [20] Hoppin JA, Brock JW, Davis BJ, Baird DD. Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110(5): 515–518.
- [21] Niu JL, Cui ZJ, Li GX, Wang WD. Selection and construction

- of compositing consortia for degrading lignocellulose efficiently and its capability of straw degradation. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(4): 795–799. (in Chinese)
- 牛俊玲, 崔宗均, 李国学, 王伟东. 高效纤维素分解菌复合系的筛选构建及其对秸秆的分解特性. *农业环境科学学报*, 2005, 24(4): 795–799.
- [22] Kanokratana P, Mhuantong W, Laothanachareon T, Tangphatsornruang S, Eurwilaichitr L, Pootanakit K, Champreda V. Phylogenetic analysis and metabolic potential of microbial communities in an industrial bagasse collection site. *Microbial Ecology*, 2013, 66(2): 322–334.
- [23] Berlemont R, Martiny AC. Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(5): 1545–1554.
- [24] Serkebaeva YM, Kim Y, Liesack W, Dedysh SN. Pyrosequencing-based assessment of the bacteria diversity in surface and subsurface peat layers of a northern wetland, with focus on poorly studied phyla and candidate divisions. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63994.
- [25] McBride MJ, Liu WF, Lu XM, Zhu YT, Zhang WX. The family *Cytophagaceae*//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. *The Prokaryotes*. Berlin Heidelberg: Springer, 2014: 577–593.
- [26] Tsuchidate T, Tateno T, Okai N, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. Glutamate production from β -glucan using endoglucanase-secreting *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(3): 895–901.
- [27] Sun DL, Jiang X, Wu QL, Zhou NY. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962–5969.
- [28] Coenye T, Vandamme P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 228(1): 45–49.
- [29] Ye DY, Montané D, Farriol X. Preparation and characterisation of methylcellulose from annual cardoon and juvenile eucalyptus. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 61(4): 446–454.
- [30] Guo ZC, Zhou AJ, Yang CX, Liang B, Sangeetha T, He ZW, Wang L, Cai WW, Wang AJ, Liu WZ. Enhanced short chain fatty acids production from waste activated sludge conditioning with typical agricultural residues: carbon source composition regulates community functions. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 192.
- [31] Kampmann K, Ratering S, Kramer I, Schmidt M, Zerr W, Schnell S. Unexpected stability of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(7): 2106–2119.

Characterization and microbial community shifts of rice strawdegrading microbial consortia

Chunfang Wang^{1,2}, Shichun Ma^{1,2}, Yan Huang^{1,2}, Laiyan Liu^{1,2}, Hui Fan^{1,2}, Yu Deng^{1,2*}

¹ Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

² Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] To study the relationship between microbial community and degradation rate of rice straw, we compared and analyzed cellulose-decomposing ability, microbial community structures and shifts of microbial consortia F1 and F2. [Methods] We determined exoglucanase activity by 3, 5-dinitrosalicylic acid colorimetry. We determined content of cellulose, hemicellulose and lignin in rice straw by Van Soest method, and calculated degradation rates of rice straw by the weight changes before and after a 10-day incubation. We analyzed and compared the microbial communities and functional microbiology shifts by clone libraries, Miseq analysis and real time-PCR based on the 16S rRNA gene and *cel48* genes. [Results] Total degradation rate, cellulose, and hemicellulose degradation rate of microbial consortia F1 were significantly higher than that of F2. The variation trend of exoglucanase activity in both microbial consortia F1 and F2 was consistent with that of *cel48* gene copies. Microbial diversity of F1 was complex with aerobic bacteria as dominant species, whereas that of F2 was simple with a high proportion of anaerobic cellulose decomposing bacteria in the later stage of incubation. In the first 4 days, unclassified Bacillales and *Bacillus* were dominant in both F1 and F2. The dominant species and abundance became different after 4-day incubation, Bacteroidetes and Firmicutes were dominant phyla of F1 and F2, respectively. Although *Petrimonas* and *Pusillimonas* were common dominant species in F1 and F2, abundance of *Petrimonas* in F2 (38.30%) was significantly higher than that in F1 (9.47%), and the abundance of Clostridiales OPB54 in F2 increased to 14.85% after 8-day incubation. [Conclusion] The abundance of *cel48* gene related with cellulose degradation rate and exoglucanase activity, and *cel48* gene has the potential as a molecular marker to monitor the process of cellulose degradation. Microbial community structure has a remarkable impact on the degradation efficiency of straw cellulose, and *Petrimonas*, *Paenibacillus*, Bacillales, Clostridiales were vital species for microbial consortia F1 and F2 decomposing rice straw.

Keywords: rice straw, exoglucanase, degradation rate, microbial community

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2013AA102805-02), by the Science and Technology Plan Projects in Sichuan Province (2012GZ0003, 2014NZ0045) and by the Applied Basic Research Projects in Sichuan Province (2013JY0006)

*Corresponding author. Tel: +86-28-85260729; E-mail: dengyu@caas.cn

Received: 8 March 2016; Revised: 10 May 2016; Published online: 13 May 2016