

高温秸秆降解菌的筛选及其纤维素酶活性研究

江高飞, 暴彦灼, 杨天杰, 郑海平, 梅新兰, 韦中, 徐阳春, 沈其荣

引用本文:

江高飞, 暴彦灼, 杨天杰, 等. 高温秸秆降解菌的筛选及其纤维素酶活性研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(10): 2465–2472.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0958>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

菌渣纤维素降解菌的筛选与鉴定

刘晓梅, 邹亚杰, 胡清秀, 杨小红, 沈德龙

农业环境科学学报. 2015(7): 1384–1391 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.07.022>

“挂壁”法筛选常温稻秆腐解菌及其降解能力研究

韦中, 徐春淼, 郑海平, 廖汉鹏, 王世梅, 沈其荣, 徐阳春

农业环境科学学报. 2015(10): 2027–2031 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.10.027>

高效纤维素分解菌的分离鉴定及堆肥效果研究

张喜庆, 勾长龙, 姜玉杰, 徐佳萍, 高云航

农业环境科学学报. 2016(2): 380–386 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016.02.024>

畜禽粪便堆肥前期理化及微生物性状研究

曹云, 常志州, 黄红英, 徐跃定, 吴华山

农业环境科学学报. 2015, 34(11): 2198–2207 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.11.023>

固态发酵中2种微生物降解玉米秸秆效果的对比研究

李立波, 任晓冬, 窦森

农业环境科学学报. 2017, 36(10): 2136–2142 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0336>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

江高飞, 暴彦灼, 杨天杰, 等. 高温秸秆降解菌的筛选及其纤维素酶活性研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(10): 2465–2472.

JIANG Gao-fei, BAO Yan-zhuo, YANG Tian-jie, et al. Screening of thermophilic cellulolytic bacteria and investigation of cellulase thermostability[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(10): 2465–2472.



开放科学 OSID

高温秸秆降解菌的筛选及其纤维素酶活性研究

江高飞, 暴彦灼, 杨天杰, 郑海平, 梅新兰, 韦中, 徐阳春*, 沈其荣

(南京农业大学资源与环境科学学院/作物免疫重点实验室/江苏省固体有机废弃物资源化高新技术研究重点实验室/江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心/资源节约型肥料教育部工程研究中心/国家有机类肥料工程技术研究中心, 南京 210095)

摘要:筛选能在高温(55~75 ℃)好氧堆肥中高效降解纤维素的菌株,并评估其降解秸秆的能力与产纤维素酶的热稳定性。从高温期堆肥中采样,以水稻秸秆粉为唯一碳源,通过55、65 ℃和75 ℃连续高温传代驯化并分离筛选耐高温菌,结合水解圈和水稻秸秆崩解试验筛选不同高温下高效降解秸秆的目标菌株。采用16S rRNA测序和系统发育分析鉴定目标菌株分类地位,通过分析目标菌株纤维素降解相关酶在50~90 ℃之间的热稳定性,解析其高温适应性机制,评价其在实际生产中的应用潜力。高温驯化分离得到13株耐高温降解菌,其中B-5、B-6、B-7和B-11的纤维素和秸秆降解能力较强,而只有B-7和B-11在55~65 ℃和75 ℃具有高效降解水稻秸秆的能力,将其认定为目标菌株。系统发育分析表明B-7和B-11菌株与芽孢杆菌科高度相似,分别命名为短小芽孢杆菌B-7和嗜热脂肪芽孢杆菌B-11。酶活热稳定性分析发现B-7和B-11各纤维素酶活性在50~90 ℃之间先升高后降低,其最适温度范围不同,分别为55~65 ℃和70~80 ℃,其中B-11在85 ℃时的相对酶活仍高于60%。研究表明,菌株B-7和B-11是耐高温高效秸秆降解菌,其具有不同高温偏好性,纤维素酶热稳定性强,在秸秆高温好氧堆肥中具有潜在的应用前景。

关键词:好氧堆肥;高温纤维素降解菌;纤维素酶;秸秆

中图分类号:S147.4 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2020)10-2465-08 doi:10.11654/jaes.2020-0958

Screening of thermophilic cellulolytic bacteria and investigation of cellulase thermostability

JIANG Gao-fei, BAO Yan-zhuo, YANG Tian-jie, ZHENG Hai-ping, MEI Xin-lan, WEI Zhong, XU Yang-chun*, SHEN Qi-rong

(College of Resources and Environmental Sciences/Key Laboratory of Plant Immunity/Jiangsu Provincial Key Lab of Solid Organic Waste Utilization/Jiangsu Collaborative Innovation Center of Solid Organic Wastes/National Engineering Research Center for Organic-Based Fertilizers, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The aim of this study was to screen efficient cellulolytic bacteria at high temperatures (55~75 ℃) and evaluate the straw degradation and thermostability of cellulase. Thermophilic cellulolytic bacteria were isolated from composts enriched by a serial subcultivation in rice straw at 55, 65 ℃, and 75 ℃. Targeted strains were screened based on hydrolytic activity and degradation efficiency. The resulting bacteria were subjected to 16S rRNA sequencing and phylogenetic analyses, and enzyme thermostability investigation. Bacterial strain B-7 and B-11 were screened from 13 thermophilic cellulolytic bacterial isolates owing to their high cellulolytic efficiency and the carboxymethyl cellulose activity. The 16S rRNA analysis revealed that B-7 and B-11 belong to *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus pumilus*, respectively. Cellulase thermostability results showed that the cellulase activity of B-7 and B-11 first increased and then decreased at 50~90 ℃ with optimal enzyme activity at 55~65 ℃ and 70~80 ℃, respectively. B-7 and B-11 are efficient thermophilic cellulolytic bacteria with different temperature preferences. These two thermophilic bacteria show great potential for a potential for broad application in high temperature aerobic composting.

Keywords: aerobic composting; thermophilic cellulolytic bacteria; cellulase; straw

收稿日期:2020-08-14 录用日期:2020-09-18

作者简介:江高飞(1988—),男,河南商丘人,博士,研究方向为废弃物处理及资源化利用。E-mail:gjiang@njau.edu.cn

*通信作者:徐阳春 E-mail:ycxu@njau.edu.cn

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0800203);江苏省自然科学基金项目(SBK20180527,SBK2019040382,SBK2020042856)

Project supported: National Key R&D Program of China(2017YFD0800203); The Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China(SBK20180527, SBK2019040382, SBK2020042856)

高温好氧堆肥是由微生物主导的生物化学过程,是作物秸秆资源化利用的重要方式。木质纤维素在秸秆中含量丰富、结构复杂、微生物可利用性差,严重阻碍堆肥化进程^[1],因此加速木质纤维素的降解是提高堆肥效率的关键。高温期(>55℃)是堆肥原料中病原菌、虫卵和杂草种子灭活的主要阶段,也是驱动秸秆腐熟的重要时期^[1]。堆肥高温期的过高温会抑制土著微生物的活性,降低堆肥中微生物的丰度和多样性,甚至导致堆肥活性丧失,从而限制了木质纤维素的降解速度^[2-3],而在堆肥过程中添加耐高温纤维素分解菌则可以有效弥补这些缺点^[4]。因此,筛选分离耐高温的纤维素分解菌已成为高温好氧堆肥研究的热点之一,在提升堆体温度、堆肥效率与品质等方面具有重要作用。

国内外有关高温纤维素分解菌筛选的研究较多。吴翔等^[5]从稻草堆肥高温期中分离到1株可在45℃下高效降解纤维素的放线菌 *Streptomyces* sp. CN9。Liu等^[6]从堆肥中筛选到1株最适分解温度为50℃的纤维素分解真菌 *Aspergillus fumigatus* Z5,其可分泌完整的纤维素酶系,有效降解玉米秸秆。韩如旻等^[7]利用纤维素黏附法从高温堆肥中分离到4株嗜热纤维素分解菌,能充分利用滤纸和作物秸秆等富含纤维素的碳源,其最适作用温度为55~60℃。Khelil等^[8]从阿尔及利亚西部地区筛选出16株嗜热细菌和3株嗜热酵母菌,其能在60℃下分泌耐热纤维素酶,对纤维素具有良好的降解效果。综上,已有报道的纤维素分解菌耐受温度大多在65℃以下,且部分为厌氧菌,而在实际生产中好氧堆肥高温期的温度可达70℃以上,此时菌株的活性可能降低甚至休眠,从而导致该阶段的纤维素分解速度大幅下降,难以适应生产需求。

为了更好地满足高温好氧堆肥实际生产需求,筛选耐高温,特别是耐75℃以上高温的纤维素分解菌并了解其纤维素酶的热稳定性,对加速高温好氧堆肥高温期的腐熟进程具有重要意义。本研究从高温期堆肥中取样,并通过连续高温富集与驯化,筛选在55~75℃下能高效降解纤维素的细菌,以期耐受高温期不同高温程度以及高温高效降解菌的复配提供理论基础,为秸秆类农业废弃物工厂化堆肥处理提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

堆肥样品:高温时期的堆肥样品采自某高温好氧

堆肥企业。

秸秆样品:水稻秸秆采自南京市江宁区谷里镇。用清水将水稻秸秆表面尘土洗净,晾干,切成2~3 cm的小段,保存备用。将晾干的水稻秸秆段浸泡于1% NaOH溶液中,80℃恒温水浴20 min,用清水反复冲洗干净,65℃烘干后备用。

1.1.2 培养基

本研究主要采用4种培养基:富集培养基用于高温菌初步富集筛选^[9];无机盐培养基用于高温菌的复筛^[10];产酶培养基^[10-11]和羧甲基纤维素(CMC)-刚果红培养基^[12-13]用于高温菌降解酶活性的检测。培养基制备后,置于115℃下高压蒸汽灭菌30 min备用。

1.2 方法

1.2.1 连续高温富集培养

称取1.0 g样品置于90 mL无菌水的三角瓶中,室温170 r·min⁻¹振荡1 h后静置30 min。吸取10 mL上清液加入到90 mL富集培养基中,分别置于55、65、75℃下170 r·min⁻¹振荡培养。每隔72 h取10%(V/V)转接至新的富集培养基中培养,连续富集驯化5次。将选取的各处理富集培养液用8层无菌纱布过滤,滤液用于分离对应温度下富集获得的秸秆降解菌。

1.2.2 高温降解菌的初筛

将55、65、75℃的富集培养液用无菌水梯度稀释后,在CMC-刚果红培养基平板上均匀涂布,分别置于对应筛选温度下恒温培养48 h,挑选有水解圈的菌株分离纯化。将纯化后的菌株在富集培养基中过夜培养,各菌株菌悬液OD₆₀₀调整至0.1。在CMC-刚果红培养基平板中心接种10 μL菌悬液,分别置于对应筛选温度下恒温培养48 h,测定水解圈直径(D)和菌落直径(d),计算水解圈直径与菌落直径比(D/d),直径比大表示菌株水解CMC的能力强。每株菌株3次重复。

1.2.3 高温降解菌的复筛

通过菌株对水稻秸秆的相对降解率,复筛获得高温秸秆高效降解菌:接种10%(V/V)过夜培养的初筛菌株,在富集培养基中培养6~8 h至对数期备用(OD₆₀₀=0.5~0.6)。接种1%(V/V)对数期菌液150 mL到产酶培养基(±3.00 g水稻秸秆条),分别置于55、65℃和75℃、170 r·min⁻¹恒温培养7 d后,获得不同降解程度的秸秆残渣。复筛主要通过秸秆相对降解率和纤维素酶活两个评价指标筛选。

1.2.4 秸秆相对降解率RDE的计算

在秸秆降解试验结束后,将不同处理得到的秸秆

残渣从三角瓶倒入平板中,并用无菌水洗净三角瓶中秸秆残渣,以降低误差,然后65℃烘干8h至恒质量,再从平板中取出烘干秸秆称质量。计算秸秆相对降解率RDE: $RDE(\%) = (W_0 - W) / W_0 \times 100\%$,其中 W_0 为对照秸秆残渣干质量, W 为高温菌降解的秸秆残渣干质量。相对降解率高表示高温菌降解水稻秸秆的效果好,每株菌3次重复。

1.2.5 不同温度下菌株降解水稻秸秆效果的研究

参考1.2.4中高温菌处理水稻秸秆相对降解率的检测方法,分别探究55、65℃和75℃高温下不同菌株对水稻秸秆降解效果的差异,以筛选不同高温下具备高效降解水稻秸秆能力的菌株。

1.2.6 纤维素酶活的测定

粗酶液的制备:参照1.2.3的方法制备对数期菌悬液接种,按照1%(V/V)接种量接种至100 mL无机盐培养基(1%水稻秸秆粉)中,75℃高温、170 r·min⁻¹恒温培养7 d。取发酵液10 000 r·min⁻¹离心5 min收集上清液,即得粗酶液,用于滤纸酶活的测定。

滤纸酶活与CMC酶活测定:采用DNS比色法^[13]。将1 min内水解生成1 μmol还原糖所需的酶量定义为一个活力单位(U)。

外切葡聚糖酶与β-葡萄糖苷酶酶活测定:参照Parry等^[14]的方法。将1 min内水解生成1 μmol对硝基苯酚所需的酶量定义为一个活力单位(U)。

1.2.7 菌株鉴定

采用OMEGA细菌基因组提取试剂盒提取菌株总DNA,具体过程参见说明书。以细菌通用引物27F:5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'和1492R:5'-TACGTTTACCTTGTACGACTT-3'对16S rRNA进行PCR扩增,扩增产物送往上海生物工程有限公司测序。将16S rRNA基因的测序结果在NCBI数据库(<https://ncbi.nlm.nih.gov/>)中BLAST比对分析,选相似性>99.5%的序列在MEGA7软件基于Neighbor-Joining法构建系统发育树(<https://www.megasoftware.net>)。

1.2.8 数据分析

所有结果采用R 4.0版本(<https://www.r-project.org>)分别进行数据处理和统计分析,通过tidyverse、reshape2和tidyr包进行数据转化处理,采用stats和ggpubr包进行统计分析,利用ggplot2进行数据可视化,为了更好地显示数据分布,对纵坐标进行了平方根转化。统计分析主要采用单因素方差分析(ANOVA)、双因素方差分析(Two-way ANOVA)、最小显著

性差异法配对比较(LSD检验),显著性水平为0.05。

2 结果与分析

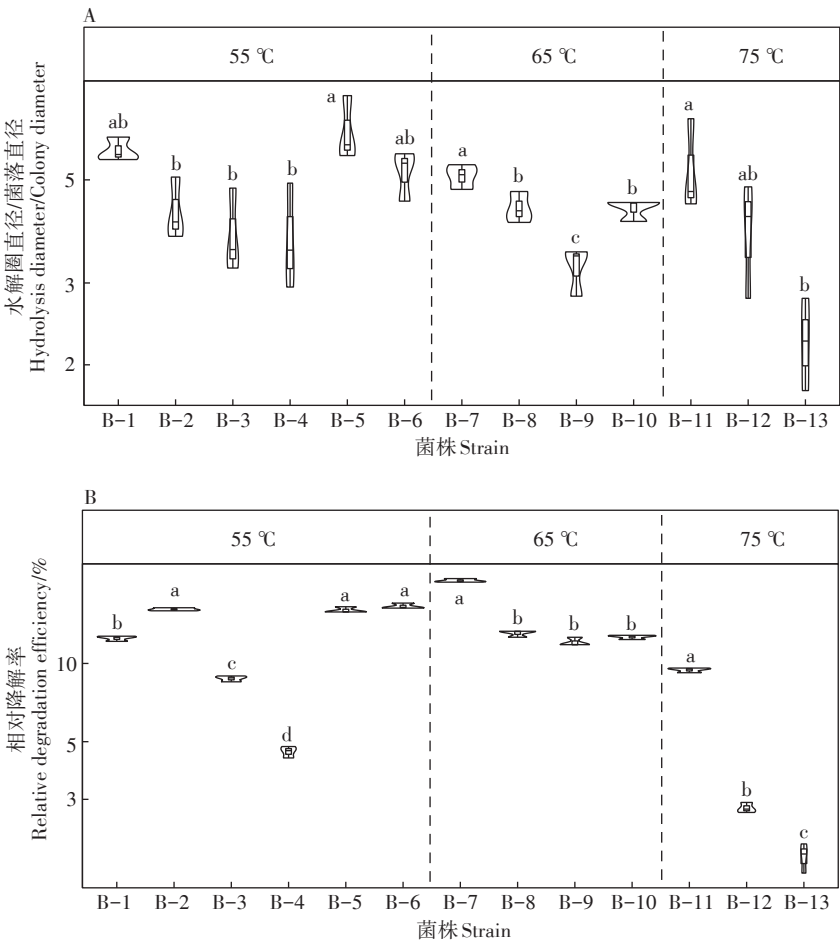
2.1 高温降解菌的分离与筛选

通过连续5次高温驯化获得13株具备分解纤维素能力的耐高温细菌:55℃分离到6株(B-1~B-6),65℃分离到4株(B-7~B-10),75℃分离到3株(B-11~B-13)。水解圈试验结果表明,不同温度下分离菌株的纤维素分解能力存在显著差异,即在CMC-刚果红培养基上水解圈与菌落直径比不同(D/d ,图1A):55、65℃和75℃分离菌株的 D/d 范围分别是3.67~6.30($F_{5,12}=5.5$, $P=0.0074$)、3.21~5.08($F_{3,8}=17.1$, $P=0.0007$)和2.19~5.25($F_{2,6}=7.0$, $P=0.0267$;ANOVA)。其中,55℃下B-1、B-5和B-6的纤维素分解能力差异不显著($P>0.05$),其中B-5最强,且显著高于B-2、B-3和B-4($P<0.05$),B-2、B-3和B-4处理间差异不显著($P>0.05$);65℃下B-7的纤维素分解能力显著高于B-8和B-10($P<0.01$),B-9最差;75℃下B-11的纤维素分解能力最高,B-13最低,B-12的纤维素分解能力介于两者之间且差异不显著($P>0.05$,LSD检验)。

水稻秸秆降解实验表明,不同温度下的分离菌株对水稻秸秆的相对降解率(RDE)差异显著(图1B):55、65℃和75℃分离菌株的RDE范围分别是4.58%~16.61%($F_{5,12}=733.4$, $P<0.0001$)、12.08%~20.84%($F_{3,8}=381.8$, $P<0.0001$)和1.81%~9.44%($F_{2,6}=1394$, $P<0.0001$;ANOVA)。其中,55℃下B-2、B-5和B-6的CMC分解能力差异不显著($P>0.05$),B-1较弱($P<0.01$),B-3次之($P<0.001$),B-4最差($P<0.001$);65℃下B-7的CMC分解能力最强($P<0.05$),B-8、B-9和B-10的CMC分解能力差异不显著($P>0.05$);75℃下B-11的CMC分解能力最强,B-12次之,B-13最差($P<0.01$,LSD检验)。结合水解圈和水稻秸秆降解试验筛选出不同高温情况下,纤维素分解能力和秸秆降解能力较强的耐高温细菌4株,即选取55℃分离菌株B-5和B-6、65℃分离菌株B-7以及75℃分离菌株B-11作为候选菌株,用于后续研究。

2.2 高温高效降解菌的筛选

将上述4株候选耐高温细菌分别在55、65℃和75℃条件下培养,模拟考察堆肥高温期不同潜在高温水平对候选菌株降解水稻秸秆能力的影响。如图2A所示,候选菌株对水稻秸秆的降解能力受菌株类型



不同小写字母表示相同温度下不同处理间差异显著($P<0.05$)。下同
The different lowercase letters at the same temperature indicate significant differences among treatments ($P<0.05$). The same below

图1 耐高温分离菌株水解圈及其水稻秸秆降解能力

Figure 1 Hydrolytic zone and rice straw degrading ability of thermophilic bacterial isolates

($F_{3,24}=17.3, P<0.0001$)和温度($F_{2,24}=273.7, P<0.0001$)的影响很大,其中温度为降解能力变异的主要来源(解释水平为72.67%),且与菌株类型之间存在显著交互响应($F_{2,24}=21.6, P<0.0001$, Two-way ANOVA)。候选菌株在55 °C($F_{3,8}=160.9, P<0.0001$)和75 °C($F_{3,8}=56.2, P<0.0001$)时对水稻秸秆的RDE存在显著差异,在65 °C时($F_{3,8}=3.8, P=0.0574$)的差异不显著(ANOVA):55 °C下候选菌株的RDE范围是14.48%~19.47%,B-7对水稻秸秆的降解能力最强($P<0.05$),B-5和B-6次之($P>0.05$),B-11较弱($P<0.01$);65 °C下的RDE范围是10.87%~15.68%,不同菌株对水稻秸秆的降解能力差异不显著($P>0.05$);75 °C下的RDE范围是1.20%~9.33%,其降解能力的强弱顺序为B-11>B-7>B-5和B-6(LSD检验)。

候选菌株降解水稻秸秆的能力与温度的变化呈负相关关系,即相对降解效率随着温度的升高而降低

(图2A)。与55 °C相比,65 °C下B-6对水稻秸秆RDE的降幅最大(25.23%),B-6次之(19.47%),B-5(8.71%)和B-11的RDE降幅最小(5.31%);75 °C下B-11对水稻秸秆RDE的降幅最小(18.63%),而其他候选菌株的降幅均超过67%,降幅最大的是B-6(92.37%)。75 °C下候选菌株对水稻秸秆的降解效果如图2B所示。比较不同温度下候选菌株对水稻秸秆降解能力的影响发现,B-7在55 °C和65 °C高温下表现较好,在75 °C高温下降解能力较差。B-11尽管在55 °C和65 °C时降解效果较弱,但温度耐受性较强,尤其在75 °C的高温下依然保持较高的水稻秸秆降解能力,因此将B-7和B-11确定为目标高温高效降解菌株,用于后续研究。

2.3 高温高效秸秆降解菌纤维素酶的热稳定性

分别测定了B-7和B-11分泌的滤纸酶(FPase)、纤维素内切酶(CMCase)、外切葡聚糖酶(EGLase)和

β -葡萄糖苷酶(BGLase)在55~90℃范围内相对酶活的变化规律,以此表征与木质纤维素降解过程相关的

酶的热稳定性。如图3所示,两株高温高效秸秆降解菌的4种纤维素酶活性随着温度的升高总体呈先升

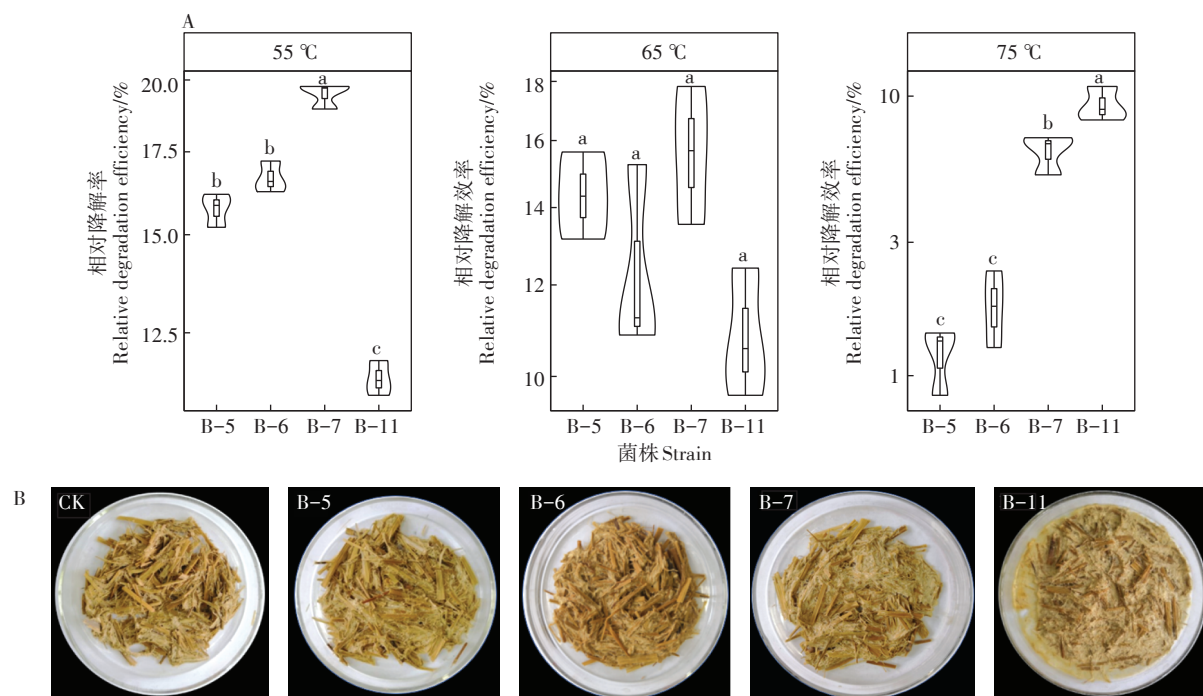


图2 候选菌株在不同温度下的相对降解率和75℃下的降解效果

Figure 2 Relative degradation efficiency at different temperatures and degradation effect at 75 °C of candidate strains

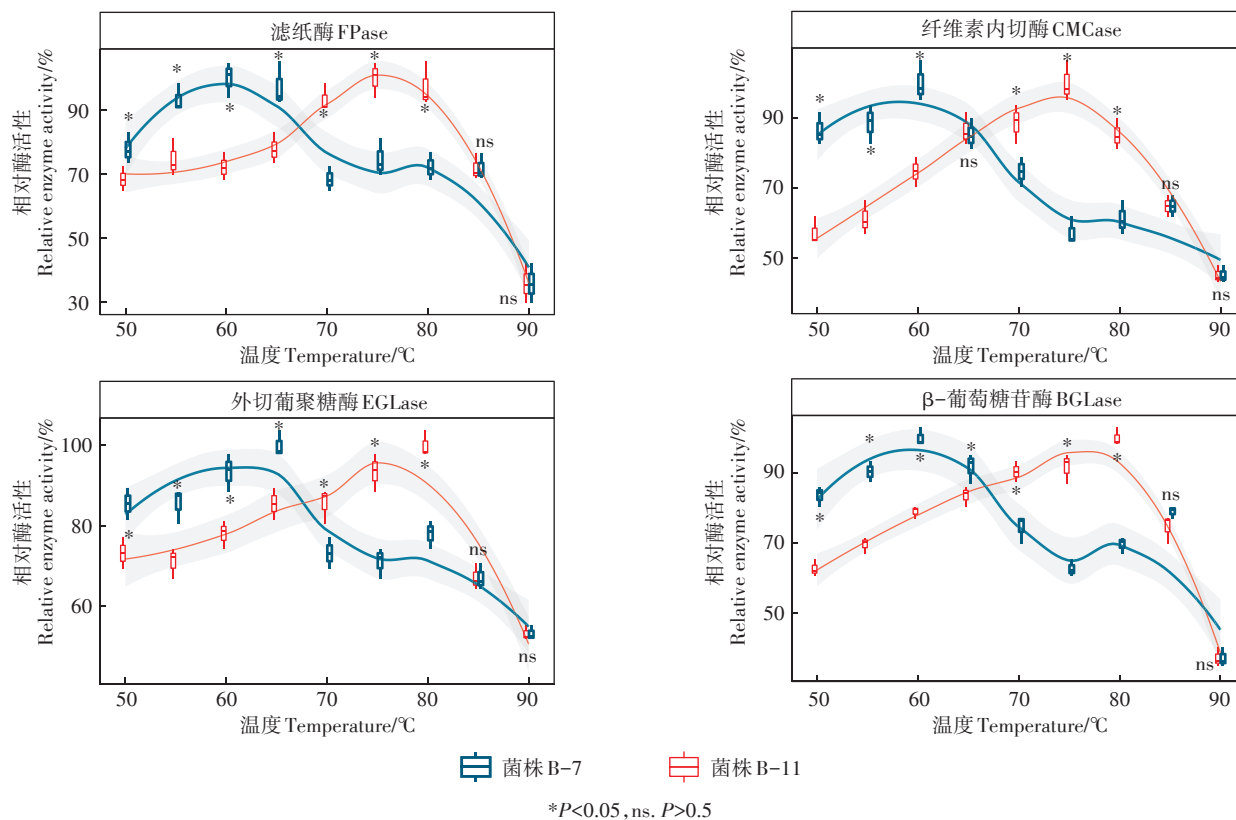


图3 菌株B-7和B-11的4种纤维素酶的热稳定性

Figure 3 Thermostability of four cellulases in strain B-7 and B-11

高后降低的趋势。双因素方差分析发现,各纤维素酶对温度变化的响应存在显著差异($F_{1,50}=12.11\sim14.84$, $P<0.001$),且与菌株存在显著的交换效应($F_{1,50}=5.27\sim14.31$, $P<0.05$),温度对酶活性变异的影响(解释水平为50.91%~70.50%)高于交互作用(解释水平为29.50%~49.09%)。B-7的4种纤维素酶在50~60℃范围内随温度的升高活性增强,超过60℃时活力急剧下降,最适温度均在60℃左右。B-11的4种纤维素酶在50~80℃范围内随着温度的升高而活性增强,滤纸酶、纤维素内切酶和外切葡聚糖酶的最适温度为75℃,β-葡萄糖苷酶则在75~80℃之间,超过最适温度后各酶活迅速下降。两株高温高效降解菌在高温好氧堆肥中具有一定的应用价值:B-7在50~65℃范围各纤维素酶的活性较高($P<0.05$),而B-11在75~80℃范围各纤维素酶的活力更好(LSD检验, $P<0.05$)。

2.4 高温高效秸秆降解菌的分子鉴定

16S rRNA序列比对分析和系统发育分析发现两株目标菌株与芽孢杆菌科的革兰氏阳性菌高度相似(图4)。菌株B-7与芽孢杆菌属纤维素芽孢杆菌(*B. cellulassensis*)、平流层芽孢杆菌(*B. stratosphericus*)、嗜气芽孢杆菌(*B. aerophilus*)、高海拔芽孢杆菌(*B. altitudinis*)和短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)的相似性大于99.5%。菌株B-11与地芽孢杆菌属立陶宛地芽孢杆菌(*Geobacillus lituanicus*)、好热地芽孢杆菌(*G. kaustophilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*G. stearothermophilus*)的相似性大于99.5%。系统发育分析结果表明,芽孢杆

菌属和地芽孢杆菌属的细菌明显形成两个分支。菌株B-7与短小芽孢杆菌的系统发育距离最近,因此命名为短小芽孢杆菌B-7(*Bacillus pumilus* B-7)。菌株B-11与嗜热脂肪芽孢杆菌的系统发育距离最近,因此命名为嗜热脂肪芽孢杆菌B-11(*Geobacillus stearothermophilus* B-11)。

3 讨论

高温好氧堆肥的堆体温度在70℃以上,超高温好氧堆肥的堆体温度一般在80℃以上^[15]。在该温度下,堆体中多数微生物已经休眠或死亡,筛选适应高温的降解菌对高温好氧堆肥具有重要意义。本研究通过高温驯化筛选得到两株能高效降解秸秆的高温降解菌:短小芽孢杆菌B-7和嗜热脂肪芽孢杆菌B-11,其中B-7在55~65℃高温下活性较高,B-11在75℃时效果更好,其纤维素降解相关酶热稳定性强,75~80℃依然保持较高活性,表明菌株B-11可以在75℃以上高温时相对降解率下降不明显,且其产酶稳定性相对较高。短小芽孢杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌均属于芽孢杆菌科的革兰氏阳性细菌,对温度的耐受性较强,是常见的嗜热菌^[16]。有研究表明,短小芽孢杆菌可降解玉米秸秆^[17]、蚕沙^[18]和牦牛粪便^[19]等废弃物中的纤维素,甚至可以降解硝磺草酮等农药残留物^[20-21],应用十分广泛^[16]。尽管有报道研究堆肥场周围土壤^[22]和堆肥样品中^[23]的短小芽孢杆菌分离株对堆肥中纤维素的降解能力,但并未深入解析其在不同温度对降解效果的影响。本研究发现短小芽孢杆

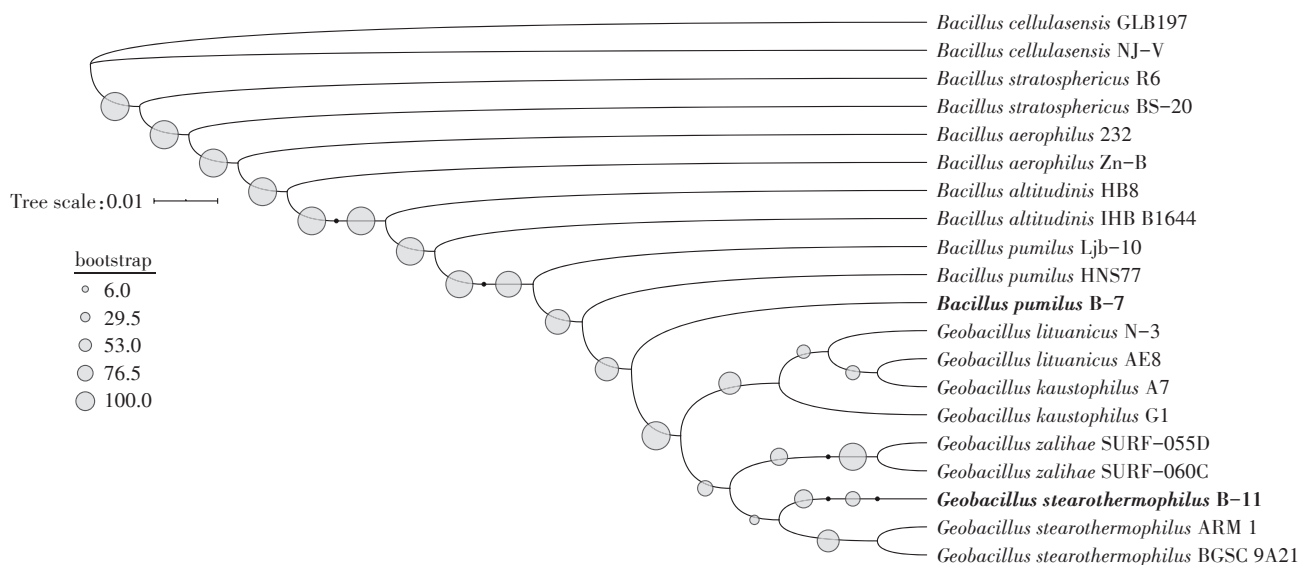


图4 16S rRNA系统发育分析鉴定菌株B-7和B-11

Figure 4 Phylogeny analysis of 16S rRNA sequences for identification of strain B-7 and B-11

菌4种纤维素降解相关酶的适宜温度在60℃左右,且热稳定性好,这与其55~65℃下对秸秆高效降解能力相符。

嗜热脂肪芽孢杆菌最早于1917年由荷兰学者在118℃灭菌75 min的棉花秸秆中分离得到,其与芽孢杆菌形态相似,适宜生长温度为60~65℃,因此被命名为*Bacillus stearothermophilus*^[24]。由于芽孢杆菌属诸多成员间的表型和16S rRNA序列差异巨大,日本学者于2001年将*Bacillus stearothermophilus*等rRNA第五群的成员从芽孢杆菌属中分离出来,命名为地芽孢杆菌属(*Geobacillus*)^[25]。地芽孢杆菌属多数成员表型更为相似,不仅具有嗜热和兼性厌氧特征,还能降解有害物质,在油田和火山口这些高温极端环境中生存能力强^[26]。国外学者从糖厂废水^[27]、温泉^[28]和棕榈油场^[29]等地筛选并研究了地芽孢杆菌在60℃高温下的纤维素等降解酶的活力,然而我国与之相关研究并不深入,特别是在堆肥过程中地芽孢杆菌的降解效果和耐高温机理方面。程旭艳等^[30]从鸡粪锯末好氧堆肥样品中分离得一株地芽孢杆菌HN-5,其纤维素酶活性高,能够促进堆体升温,延长高温期持续时间。此外嗜热脂肪地芽孢杆菌在60~70℃范围内,能促进屠宰厂废弃物好氧堆肥的腐熟进程,改善堆体理化性质,温度超过70℃会导致堆体理化性质异常,影响堆肥进程^[31]。相比之下,本研究筛选的嗜热脂肪地芽孢杆菌B-11,其耐热性更强,在75~80℃甚至85℃下仍保持较高的纤维素酶活力,水稻秸秆降解效果远超其他菌株,包括本研究筛选的耐高温短小芽孢杆菌B-7。

4 结论

本研究筛选的两株高温高效降解菌B-7和B-11具有良好的温度适应性,其秸秆降解能力和纤维素酶活在65~80℃之间表现优异,最适温度分别为55~65℃和75℃。

参考文献:

- [1] 徐杰, 许修宏, 门梦琪, 等. 木质纤维素降解菌剂DN-1促进堆肥腐熟度的评估[J]. 中国土壤与肥料, 2016(6): 146-151.
XU Jie, XU Xiu-hong, MEN Meng-qi, et al. Evaluation on the maturity of the compost promoted by lignocellulose degradation inoculum DN-1[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2016(6): 146-151.
- [2] Zhao Y, Zhao Y, Zhang Z, et al. Effect of thermo-tolerant actinomycetes inoculation on cellulose degradation and the formation of humic substances during composting[J]. *Waste Management*, 2017, 68: 64-73.
- [3] Awasthi M K, Liu T, Chen H, et al. The behavior of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community during poultry manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 280: 70-78.
- [4] Sarkar S, Banerjee R, Chanda S, et al. Effectiveness of inoculation with isolated *Geobacillus* strains in the thermophilic stage of vegetable waste composting[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(8): 2892-2895.
- [5] 吴翔, 陈强, 徐丽华, 等. 一株降解纤维素的高温放线菌的筛选及其产酶条件研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(增刊): 101-104.
WU Xiang, CHEN Qiang, XU Li-hua, et al. Screening of a cellulose-decomposing thermoactinomyces strain and its enzyme-producing conditions[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(Suppl): 101-104.
- [6] Liu D, Zhang R, Yang X, et al. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(5): 717-725.
- [7] 韩如吻, 闵航, 陈美慈, 等. 嗜热厌氧纤维素降解细菌的分离、鉴定及其系统发育分析[J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 138-144.
HAN Ru-yang, MIN Hang, CHEN Mei-ci, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a thermophilic cellulolytic anaerobic bacterium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(2): 138-144.
- [8] Khelil O, Cheba B. Thermophilic cellulolytic microorganisms from western algerian sources: Promising isolates for cellulosic biomass recycling[J]. *Procedia Technology*, 2014, 12: 519-528.
- [9] Kang S W, Park Y S, Lee J S, et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2004, 91(2): 153-156.
- [10] 韦中, 徐春森, 郑海平, 等. “挂壁”法筛选常温稻秆腐解菌及其降解能力研究[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(10): 2027-2031.
WEI Zhong, XU Chun-miao, ZHENG Hai-ping, et al. Degradation of rice straw by degrading strains isolated by a "Hanging-enrichment" method[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(10): 2027-2031.
- [11] 刘占英, 侯先志, 刘玉承, 等. 一株瘤胃纤维素降解菌的分离鉴定及其纤维素降解特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 459-464.
LIU Zhan-ying, HOU Xian-zhi, LIU Yu-cheng, et al. Isolation, identification and characterization of a cellulose-degrading bacterial strain from the rumen of sheep[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(3): 459-464.
- [12] 陈敏. 一种改进的纤维素分解菌鉴别培养基[J]. 杭州师范学院学报(自然科学版), 2001(6): 11-12.
CHEN Min. An improved differential medium for cellulose decomposing microorganisms[J]. *Journal of Hangzhou Normal University(Natural Science Edition)*, 2001(6): 11-12.
- [13] 王洪媛, 范丙全. 三株高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 870-875.
WANG Hong-yuan, FAN Bing-quan. Screening of three straw-cellulose degrading microorganism[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(7): 870-875.
- [14] Parry N J, Beever D E, Owen E, et al. Biochemical characterization

- and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*[J]. *Biochemical Journal*, 2001, 353(1):117-131.
- [15] 廖汉鹏, 陈志, 余震, 等. 有机固体废物超高温好氧发酵技术及其工程应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2017, 46(4):439-444.
- LIAO Han-peng, CHEN Zhi, YU Zhen, et al. Development of hyperthermophilic aerobic composting and its engineering applications in organic solid wastes[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University(Natural Science Edition)*, 2017, 46(4):439-444.
- [16] Sahoo K, Sahoo R K, Gaur M, et al. Cellulolytic thermophilic microorganisms in white biotechnology: A review[J]. *Folia Microbiologica*, 2020, 65(1):25-43.
- [17] 张立静, 李术娜, 朱宝成. 高效纤维素降解菌短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)T-7的筛选、鉴定及降解能力的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7):112-118.
- ZHANG Li-jing, LI Shu-na, ZHU Bao-cheng. Screening, identification and degradation conditions of cellulose decomposing bacteria *Bacillus pumilus* T-7[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(7):112-118.
- [18] 岑贞陆, 胡钧铭, 韦仕岩, 等. 蚕沙纤维素降解菌HB-2菌株的分离、鉴定及酶活性分析[J]. 南方农业学报, 2016, 47(12):2065-2071.
- CEN Zhen-lu, HU Jun-ming, WEI Shi-yan, et al. Isolation and identification of cellulose-degrading bacterium HB-2 and characteristics of its enzyme activity[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2016, 47(12):2065-2071.
- [19] 毛婷, 魏亚琴, 杨红建, 等. 牦牛粪便中纤维素降解菌的筛选及产酶优化[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(11):106-116.
- MAO Ting, WEI Ya-qin, YANG Hong-jian, et al. Screening of cellulolytic bacterium from yak faeces and the optimization of cellulase production conditions[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2019, 24(11):106-116.
- [20] 韩海涛, 刘婕, 高云飞, 等. 硝磺草酮降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(3):62-66.
- HAN Hai-tao, LIU Jie, GAO Yun-fei, et al. Isolation, identification and characterization of a mesotrophic-degrading bacterial strain[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32(3):62-66.
- [21] 张丽珍, 马利平, 乔雄梧, 等. 一株多菌灵降解菌NY97-1的分子鉴定及GFP标记[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(4):555-559.
- ZHANG Li-zhen, MA Li-ping, QIAO Xiong-wu, et al. Identification of carbendazim-degrading NY97-1 bacterium and labeling by GFP [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(4):555-559.
- [22] 刘波, 陈倩倩, 王阶平, 等. 糖厂滤泥堆肥发酵过程中可培养芽孢杆菌种群动态变化研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(1):201-210.
- LIU Bo, CHEN Qian-qian, WANG Jie-ping, et al. Dynamic changes in culturable *Bacillus*-like species populations in the process of sugar-refinery filtering mud composting fermentation to produce bio-organic fertilizers[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(1):201-210.
- [23] 王昭闵. 好气式堆肥嗜高温菌之调查与分解纤维之新菌株研究[D]. 台中:中兴大学, 2008.
- WANG Zhao-min. Investigation of thermophilic bacteria in aerobic composts and characterization of a novel cellulose-degrading isolate [D]. Taichung: National Chung Hsing University, 2008.
- [24] Donk P J. A highly resistant thermophilic organism[J]. *Journal of Bacteriology*, 1920:373-374.
- [25] Zeigler D. The genus *Geobacillus*: Introduction and strain catalog[M]. Bacillus Genetic Stock Center, 2001:3.
- [26] Hussein A H, Lisowska B K, Leak D J. Chapter one: The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2015, 92:1-48.
- [27] Sung M H, Kim H, Bae J W, et al. *Geobacillus toebii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(6):2251-2255.
- [28] Sarkar S, Banerjee R, Chanda S, et al. Effectiveness of inoculation with isolated *Geobacillus* strains in the thermophilic stage of vegetable waste composting[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(8):2892-2895.
- [29] Rahman N Z R A T, Leow T C, Salleh A B, et al. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia[J]. *BMC Microbiology*, 2007, 7(1):77.
- [30] 程旭艳, 霍培书, 尚晓瑛, 等. 堆肥中高温降解菌的筛选、鉴定及堆肥效果[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(5):105-111.
- CHENG Xu-yan, HUO Pei-shu, SHANG Xiao-ying, et al. Isolation and identification of a thermophilic bacterium strain with high degradation from compost and its compost effects[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2012, 17(5):105-111.
- [31] 何秀红, 罗学刚, 贾文甫, 等. 高温快速堆肥处理屠宰废弃物效果研究[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(1):171-177, 182.
- HE Xiu-hong, LUO Xue-gang, JIA Wen-fu, et al. Research on the effect of high temperature rapid compost abattoir waste[J]. *Environmental Science and Technology*, 2016, 39(1):171-177, 182.