

· 环境生物技术 ·

复合菌系降解纤维素过程中微生物群落结构的变化

艾士奇¹, 赵一全¹, 孙志远¹, 高亚梅¹, 晏磊¹, 唐鸿志², 王伟东¹

1 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院 黑龙江省寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室 黑龙江省秸秆资源化利用工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319

2 上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

艾士奇, 赵一全, 孙志远, 等. 复合菌系降解纤维素过程中微生物群落结构的变化. 生物工程学报, 2018, 34(11): 1794–1808.

Ai SQ, Zhao YQ, Sun ZY, et al. Change of bacterial community structure during cellulose degradation by the microbial consortium. Chin J Biotech, 2018, 34(11): 1794–1808.

摘 要: 为明确高效纤维素降解复合菌系降解过程中微生物群落结构的变化规律及关键的降解功能菌, 利用该复合菌系对滤纸和稻秆进行生物处理, 通过底物降解、微生物生长量、发酵液 pH 的变化情况, 选择不同降解时期复合菌系提取的总 DNA 进行细菌 16S rRNA 基因扩增子高通量测序。通过分解特性试验确定在接种后培养第 12、72、168 h 分别作为降解初期、高峰期、末期。该复合菌系分别主要由 1 个门、2 个纲、2 个目、7 个科、11 个属组成。随着降解的进行, 短芽胞杆菌属 *Brevibacillus*、喜热菌属 *Caloramator* 的相对丰度逐渐降低; 梭菌属 *Clostridium*、芽胞杆菌属 *Bacillus*、地芽胞杆菌属 *Geobacillus*、柯恩氏菌属 *Cohnella* 的相对丰度逐渐升高; 解脲芽胞杆菌属 *Ureibacillus*、泰氏菌属 *Tissierella*、刺尾鱼菌属 *Epulopiscium* 在降解高峰期时相对丰度最高; 各时期类芽胞杆菌属 *Paenibacillus*、瘤胃球菌属 *Ruminococcus* 的相对丰度无明显变化。上述 11 个主要菌属均属于厚壁菌门, 具有嗜热、耐热、适应广泛 pH、降解纤维素或半纤维素的特性。好氧型细菌是降解初期的主要优势功能菌, 到中后期厌氧型细菌逐渐增多, 并逐步取代好氧型细菌成为降解纤维素的主要细菌。

关键词: 纤维素, 复合菌系, 降解, 微生物多样性

Received: February 11, 2018; **Accepted:** April 23, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31270536), Special Program for Local Science and Technology Development Guided by Central Government (No. ZY16A06-02), Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, China (No. 2D2018005), Open Foundation of Heilongjiang Provincial Key Laboratory (No. 201703), Program of Graduate Innovation and Research of Heilongjiang Bayi Agricultural University (No. YJSCX2017-Y70).

Corresponding authors: Weidong Wang. Tel/Fax: +86-459-6819298; E-mail: wwdcyy@126.com

Hongzhi Tang. Tel/Fax: +86-21-34206723; E-mail: tanghongzhi@sjtu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31270536), 中央财政引导地方科技发展专项 (No. ZY16A06-02), 黑龙江省自然科学基金 (No. 2D2018005), 黑龙江省重点实验室开放基金 (No. 201703), 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目 (No. YJSCX2017-Y70) 资助。

网络出版时间: 2018-11-01

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20181030.1521.001.html>

Change of bacterial community structure during cellulose degradation by the microbial consortium

Shiqi Ai¹, Yiquan Zhao¹, Zhiyuan Sun¹, Yamei Gao¹, Lei Yan¹, Hongzhi Tang²,
and Weidong Wang¹

¹ Heilongjiang Provincial Engineering Technology Research Center of Straws Resources Utilization, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Agro-Waste in Cold Region, College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

² State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: In order to clarify dynamic change of microbial community composition and to identify key functional bacteria in the cellulose degradation consortium, we studied several aspects of the biodegradation of filter papers and rice straws by the microbial consortium, the change of substrate degradation, microbial biomass and pH of fermentation broth. We extracted total DNA of the microbial consortium in different degradation stages for high-throughput sequencing of amplicons of bacterial 16 S rRNA genes. Based on the decomposition characteristics test, we defined the 12th, 72nd and 168th hours after inoculation as the initial stage, peak stage and end stage of degradation, respectively. The microbial consortium was mainly composed of 1 phylum, 2 classes, 2 orders, 7 families and 11 genera. With cellulose degradation, bacteria in the consortium showed different growth trends. The relative abundance of *Brevibacillus* and *Caloramator* decreased gradually. The relative abundance of *Clostridium*, *Bacillus*, *Geobacillus* and *Cohnella* increased gradually. The relative abundance of *Ureibacillus*, *Tissierella*, *Epulopiscium* was the highest in peak stage. The relative abundance of *Paenibacillus* and *Ruminococcus* did not change obviously in each stage. Above-mentioned 11 main genera all belonged to Firmicutes, which are thermophilic, broad pH adaptable and cellulose or hemicellulose degradable. During cellulose degradation by the microbial consortium, aerobic bacteria were dominant functional bacteria in the initial stage. However, the relative abundance of anaerobic bacteria increased gradually in middle and end stage, and replaced aerobic bacteria to become main bacteria to degrade cellulose.

Keywords: cellulose, consortium, degradation, microbial diversity

我国纤维素类生物质资源丰富,但资源化利用程度低,近年来秸秆的焚烧、堆积等造成的资源浪费和环境污染问题日益突出。纤维素类农业废弃物的生物降解和转化利用与国家的能源、生态、环境和粮食安全问题密切相关。因此,纤维素类农业废弃物的资源化利用问题成为国内外研究的热点^[1]。利用生物法对纤维素进行分解与生物转化是实现其资源化利用的有效途径,而获得能高效转化纤维素资源的微生物是生物法利用的关键^[2]。自20世纪以来,科研工作者们从自然环境中分离了多种纤维素降解能力较强的纯培养菌株,包括真菌、细菌、放线菌等^[3]。但是单一菌株并不符合自然界微生物协同降解作用这一普遍规律,实际应用受到限制^[4]。与此相比,利用限

制性富集培养技术获得的纤维素降解复合菌系,可以通过不同功能微生物之间的协作高效降解与转化纤维素,具有广阔的应用前景^[5]。Yuan等从堆肥中筛选出的复合菌系MC1培养3d可降解88%的滤纸^[6];Wang等从高温期堆肥中富集获得的复合菌系培养10d可降解99%的纤维素^[7],降解效率远高于同类复合菌系;Wang等从产沼气旺盛的发酵罐中筛选的复合菌系BYND-8培养7d可降解48.9%的稻秆^[8];邓兵等从玉米秸秆还田地中筛选的常温复合菌系可降解66.1%的玉米秸秆^[9]。然而,由于复合菌系组成的复杂性、功能菌株的难分离培养等因素,传统的分离培养技术限制了人们了解降解纤维素微生物群落的功能及其协同作用^[10],也影响了纤维素生物转化的进一步提

高。通过现代微生物组学的高通量测序技术,分析纤维素降解微生物群落组成及其降解过程中的演替规律,明确发挥降解功能的关键微生物,对充分了解不同功能微生物之间的协同作用具有重要意义。

本研究以高效、稳定降解稻秆纤维素的复合菌系^[7]为研究对象,该复合菌系是从牛粪堆肥高温期通过限制性富集培养筛选获得,经前期试验验证,其经传代培养和保存后,菌种组成和功能均已达到稳定;复合菌系具有较广泛的初始 pH 耐受能力,在起始 pH 5.0–9.0 的范围内,纤维素降解能力极其稳定,且较适宜生长^[11]。本研究利用 16S rRNA 基因扩增子高通量测序方法,分析复合菌系降解纤维素过程中各微生物分类单元的群落组成及其相对丰度变化,明确复合菌系群落结构的动态变化规律,揭示复合菌系中关键优势微生物及群落结构的演替规律,为明确降解纤维素过程中微生物之间的协同作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 培养条件

利用蛋白胨纤维素 (PCS) 培养基,培养基成分如下:蛋白胨 5.0 g,纤维素(滤纸和稻秆) 5.0 g (滤纸 1 g、稻秆 4 g), NaCl 5.0 g, CaCO₃ 2.0 g, 酵母粉 1.0 g,溶解在 1 L 水中,pH 自然。将培养基分装至三角瓶中,装液量为 80% (体积比),瓶中提前放入纤维素碳源,其中,滤纸贴壁放置,锡纸封口,1×10⁵ Pa、121 °C 灭菌 15 min。接种量为 10% (体积比),50 °C 静置培养。

稻秆的预处理方法如下:配制 1% 的 NaOH 溶液,把成熟的干稻秆剪成 10 cm 小段,放入容器中,使溶液覆盖稻秆,浸泡 24 h。流水冲洗数次,清水浸泡 1–2 d,测定 pH,用流水冲至中性,80 °C 烘干备用。以下不做特殊说明,试验所用稻秆均为碱处理的稻秆。

1.2 复合菌系降解纤维素(稻秆、滤纸)过程中总降解率及其纤维素、半纤维素、木质素降解率的变化

利用失重法测定稻秆总降解率的变化。分别取培养第 2、4、6、8、10、12、24、48、72、96、120、144、168、192、216、240 h 复合菌系中的稻秆,每次取 3 个重复。将稻秆置于 50 mL 离心管中,7 000 r/min 离心 15 min,倒上清液,用盐酸和硝酸的混合液冲洗以消除菌体,离心,用无菌水冲洗,离心,105 °C 烘干至恒重后称重,计算稻秆的失重量和降解率^[9]。烘干后的稻秆利用 FIWE3/6 纤维素测定仪(意大利 VELP)测定其纤维素、半纤维素、木质素的含量,并计算其降解率。

在培养过程中加入滤纸的目的是为了更直观地反映复合菌系对纤维素的降解程度,对各时期的纤维素降解情况具有指示作用,利用肉眼观察即可判断纤维素是否被降解。在测定滤纸的总降解率时,将没有分解的滤纸取出单独烘干称重,失重法计算其降解率。因为滤纸的成分主要为纤维素,因此滤纸的减重即是其纤维素的分解量,没有分别测定其纤维素、半纤维素和木质素含量。

同时,设置一组空白对照,将已灭菌的培养基不接种复合菌系菌液而是加入等接种量的无菌水,放入 50 °C 恒温培养箱静置,按照上述取样时间观察滤纸的变化情况,测定稻秆的失重量及其木质素、纤维素、半纤维素的失重量。

为了更真实观察到不同降解时期稻秆表面形态的变化,分别取未经生物处理、复合菌系处理第 12、72、168 h 的稻秆,将其剪成 5 mm×5 mm 的小条,用 1% 戊二醛 4 °C 固定后,经 PBS 冲洗,乙醇梯度脱水,叔丁醇置换,冷冻干燥仪(德国 CHRIST)干燥后用导电胶带粘在样品台上,用离子溅射仪(日本 HITACHI)喷金,最后用低真空超高分辨场发射扫描电子显微镜(美国 NOVA)观察并拍照记录。

1.3 复合菌系降解纤维素过程中生长量的变化

利用双光束紫外可见分光光度计(中国普析) OD_{600} 吸光值测定复合菌系生长量的变化。分别在无菌条件下取适量的培养第 0、12、24、48、72、96、120、144、168、192、216、240 h 的复合菌系,置于比色杯中,每次测 3 个重复,绘制其生长曲线。

1.4 复合菌系降解纤维素过程中培养体系 pH 的变化

利用微型 pH 计(日本 HORIBA)测定发酵液 pH 的变化。分别在无菌条件下取适量的培养第 0、12、24、48、72、96、120、144、168、192、216、240 h 的发酵液,每次测 3 个重复。

1.5 不同降解时期复合菌系的细菌 16S rRNA 基因扩增子高通量测序

1.5.1 测序样品的采集

在无菌条件下分别取纤维素降解初期、高峰期、末期,即培养 12、72、168 h 的复合菌系。取复合菌系培养液 12 000 r/min 离心 10 min,获得菌体,即复合菌系培养液中微生物样品 S1。

取复合菌系中的稻秆,置于新的三角瓶中,加入适量 PBS,150–200 r/min 振荡 30–60 min,超声 5 min,再振荡,取上清液置于离心管中,12 000 r/min 离心 10 min 得菌体,即稻秆表面微生物样品 S2。

将 S1 与 S2 混合后作为测序样品。

1.5.2 总 DNA 的提取及高通量测序

取适量样品,利用改良的氯苯法提取总 DNA^[12]。经 Nanodrop 及琼脂糖凝胶电泳检测,选择浓度大于 10 ng/ μ L、总量超过 500 ng、 $OD_{260/230}$ 超过 1、 $OD_{260/280}$ 在 1.8–2.2 之间、琼脂糖凝胶电泳主带清晰的 DNA。利用细菌 16S rRNA 基因 V4 区引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 909R (5'-CCCCGYCAATTCMTT RAGT-3') 进行 PCR 扩增,对其产物进行纯化、

定量。利用 Illumina MiSeq 测序仪对构建合格的文库进行 PE250 测序,测序工作在四川博贝特生物科技有限公司完成。

1.5.3 生物信息学分析

测序数据预处理:使用软件 FLASH V1.2.7 对每个样品的两端测序序列进行拼接,得到原始序列。利用软件 Qiime V1.9.0 将原始序列过滤处理得到高质量序列。利用软件 Usearch v8.0 检测嵌合体序列,去除后得到有效序列。

OTU 聚类:利用软件 Qiime 的 cd-hit 方法对所有样品的有效序列进行聚类,默认以 97% 相似性将序列聚类成为 OTU,同时选取 OTU 的代表序列。并去除 OTU 中的 Singleton (在所有样品中只有 1 条序列的 OTU)。

物种注释:利用软件 RDP Classifier Version 2.2 对 OTU 代表序列进行物种注释分析,设定阈值为 0.8。

均一化处理:对 OTU 表中各样品的数据进行均一化处理,以样品中数据量最少的为标准进行均一化处理。后续的 Alpha 多样性和 Beta 多样性分析都是基于均一化处理的数据。

Alpha 多样性分析:利用软件 Qiime Version 1.9.0 对 Observed-species、Chao1、Shannon、Simpson 等多样性指数进行计算,用 Origin8.5 软件绘制稀释曲线。

Beta 多样性分析:根据 OTU 表和系统发育树生成加权的 Unifrac 距离矩阵,绘制主坐标分析 (PCoA) 图。使用 R 软件以聚类热图 (Heatmap) 的形式展现各样品物种相对丰度分布的相似程度。

冗余分析 (RDA):根据复合菌系不同降解时期纤维素、半纤维素含量的测定结果,结合不同降解时期复合菌系的微生物群落结构,运用 Canoco 5.0 软件对其进行冗余分析,探究复合菌系的微生物群落结构变化与纤维素降解的关系。

2 结果与分析

2.1 复合菌系降解纤维素(稻秆、滤纸)过程中总降解率及其纤维素、半纤维素、木质素降解率的变化

复合菌系降解稻秆过程中, 稻秆总降解率及其木质素、纤维素、半纤维素降解率的变化均呈先升高最后趋于稳定的趋势(图1、图2)。稻秆由12 h开始降解, 但此时的降解率非常低, 稻秆总降解率为11%, 稻秆中木质素、纤维素、半纤维素的降解率分别为0%、7.81%和0.69%, 此时培养基中的滤纸也未降解(图1)。在第48–72 h内稻秆的降解率迅速上升, 降解效率最快。到第72 h时滤纸完全降解, 稻秆的降解率达51.75%, 此时稻秆中木质素、纤维素、半纤维素的降解率分别为21.62%、35.13%和35.93%。在第168–192 h, 稻秆降解趋于稳定, 最终降解率达到85.25%, 稻秆中木质素、纤维素、半纤维素的降解率分别为50.90%、92.14%和73.81%, 复合菌系具有强大的降解木质纤维素的能力。

不同降解时期稻秆在微观下的降解形态如图3所示。图中依次是未经复合菌系处理以及复合菌系处理12、72、168 h的放大2 000倍的稻秆表面电镜照片。表面致密的稻秆随着复合菌系培养的进行, 维管束纤维逐渐大面积被降解, 发酵结束时, 稻秆表面的完整结构被严重破坏, 最难降解的外表皮上的蜡质硅化层大部分降解消失, 只剩下部分严重木质化的表皮组织。

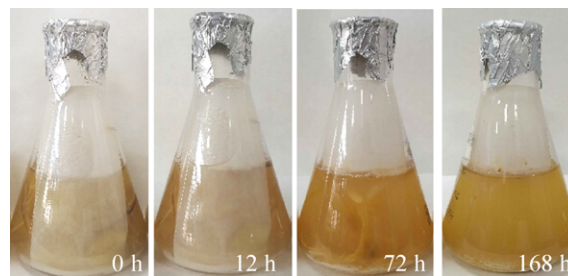


图1 复合菌系对滤纸的降解

Fig. 1 The consortium was on the degradation of filter papers.

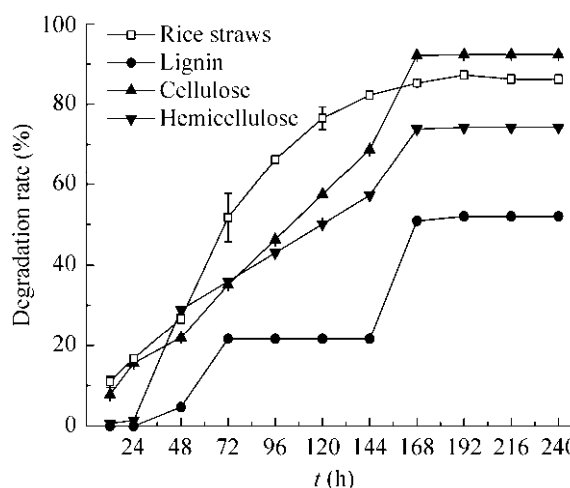


图2 复合菌系降解稻秆过程中总降解率及其纤维素、半纤维素、木质素降解率的变化

Fig. 2 The change of total degradation rate, cellulose degradation rate, hemicellulose degradation rate and lignin degradation rate during rice straws degradation by the consortium. Rice straws weren't degraded before 12 h, so the figure didn't list.

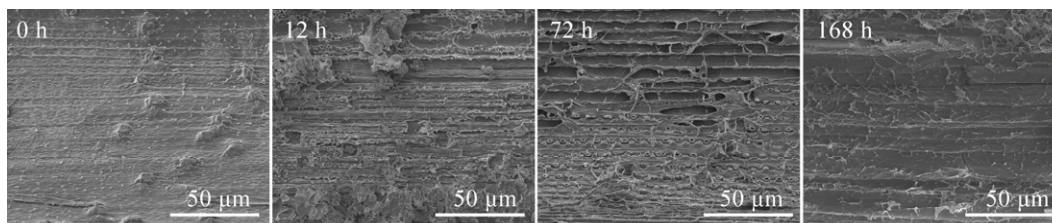


图3 复合菌系降解稻秆过程中稻秆表面的形态变化

Fig. 3 The change of surface morphology of rice straws during rice straws degradation by the consortium.

结合以上结果,本研究选择第 12、72、168 h 分别代表复合菌系降解纤维素初期、高峰期、末期,且这 3 个时期稻秆总降解率及其中木质素、纤维素、半纤维素降解率差异显著 ($P<0.05$)。而我们发现对照组在不接种复合菌系菌液的情况下,滤纸、稻秆均未发生降解。

2.2 复合菌系降解纤维素过程中生长量和培养体系 pH 的变化

从图 4A 可以看出,复合菌系生长量的变化趋势是随着培养的进行先迅速升高,达到最高值后出现下降趋势,较好地反映出了微生物生长曲线中的指数期、稳定期和衰亡期。在培养的前 96 h 里,复合菌系的生长量迅速上升,由接种初期的 0.016 增加到 0.611,在这段时间内纤维素也被快速降解。在培养 96–168 h 里,复合菌系的生长量达到顶峰,进入暂时的平稳阶段。从第 168 h 开始,复合菌系的生长量呈下降,而此时稻秆降解也基本结束,进入了降解末期。到培养结束时,复合菌系的生长量降到 0.472。结合以上结果,上述 3 个时期复合菌系均在指数期与稳定期阶段,其代谢活性高,进而保证了后续 16S rRNA 基因扩增子高通量测序 DNA 量的充足。

从图 4B 可以看出,复合菌系发酵液的 pH 总体呈先下降后上升最后趋于中性的趋势。接种后培养液的初始 pH 为 8.2,在培养的前 48 h,发酵液的 pH 明显下降,到第 48–120 h 维持最低值 6.4 左右,降解高峰期也在此阶段内。随着纤维素降解的逐渐完成,从第 120 h 开始,发酵液的 pH 开始回升,呈持续升高的趋势。直到培养末期的第 240 h,发酵液的 pH 回升至中性水平为 7.0,经后续测定一直维持这一中性水平。发酵液 pH 的变化与纤维素降解产物有机酸的含量息息相关,从降解初期开始,由于纤维素降解产生大量的有机酸,使得发酵液 pH 迅速下降。随着降解的进行,发酵液中有有机酸大量积累,直到降解高峰期时发酵液

pH 降到最低。但积累的有机酸由于培养基中 CaCO_3 的中和作用未使发酵液 pH 一直降低,维持在弱酸水平。到降解后期,随着纤维素降解的逐渐完成,有机酸积累相对减少,同时复合菌系中会存在一些以有机酸为营养物质的细菌,使得发酵液的 pH 才逐渐恢复。复合菌系在降解纤维素时具有自我调节培养体系 pH 的能力,这种能力解除了有机酸对纤维素降解菌的阻遏作用,体现了复合菌系降解纤维素的优势所在。

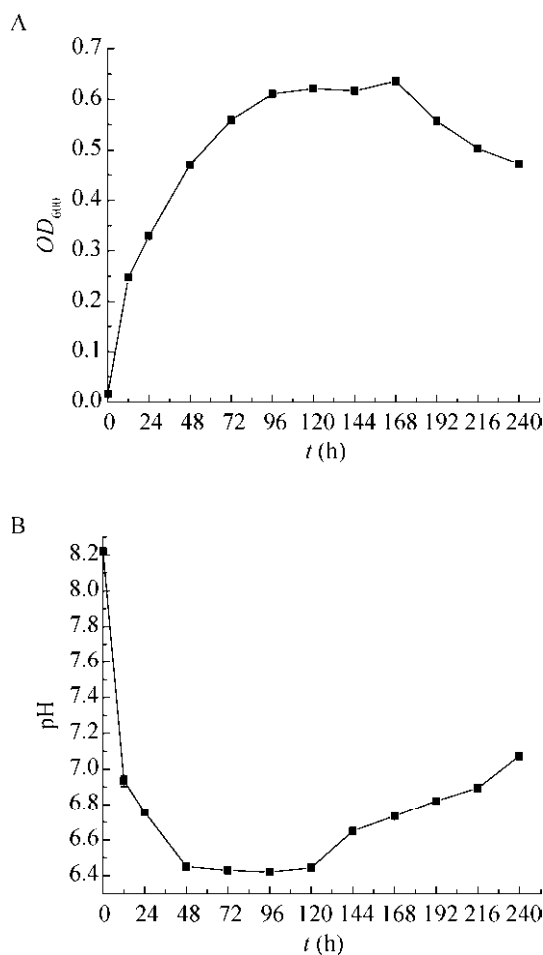


图 4 复合菌系降解纤维素过程中生长量 (A) 与培养体系 pH (B) 的变化

Fig. 4 The change of growth (A) and pH of culture system (B) during cellulose degradation by the consortium.

2.3 不同降解时期复合菌系的微生物组成及其相对丰度变化

对不同降解时期复合菌系质量合格的总 DNA 进行细菌 16S rRNA 基因扩增子高通量测序, 测序得到的下机原始数据经过拼接、质量过滤、去除嵌合体等得到有效数据, 其基本数据信息如表 1 所示。3 个样品测序数据量在 10 Mb 以上, 序列的平均长度在 425–426 bp 之间, GC 含量在 54% 左右。说明测序深度合理, 可用于后续物种分析。已将该测序序列数据提交至 NCBI SRA 数据库 (Accession No. SRP125468)。

对不同降解时期复合菌系总 DNA 进行细菌 16S rRNA 基因扩增子高通量测序, 基于测序的有效数据, 将其微生物群落组成按照数据库中已知、可分类的微生物分别在门、纲、目、科、属 5 个分类水平上给出物种注释, 并统计相应细菌的相对丰度。

在微生物门的分类水平上, 复合菌系包含 11 个门的细菌。按照在任意一个样品中相对丰度超过 1.00% 的细菌进行统计, 以下 4 个分类水平如不作特殊说明, 均按照这种统计方法统计。从图 5A 可以发现, 不同降解时期的复合菌系基本上由厚

壁菌门 Firmicutes 组成, 其相对丰度均占据 99% 以上。

在微生物纲的分类水平上, 复合菌系包含 16 个纲的细菌。不同降解时期的复合菌系主要由芽胞杆菌纲 Bacilli 和梭菌纲 Clostridia 组成 (图 5B)。从培养 12 h 起, 随着纤维素降解的进行, 芽胞杆菌纲的相对丰度逐渐降低, 由降解初期的 57.08% 降低到末期的 23.14%; 梭菌纲的相对丰度逐渐升高, 由降解初期的 42.24% 升高到末期的 76.07%。

在微生物目的分类水平上, 复合菌系包含 28 个目的细菌。不同降解时期的复合菌系主要由芽胞杆菌目 Bacillales 和梭菌目 Clostridiales 组成 (图 5C)。从培养 12 h 起, 随着纤维素降解的进行, 芽胞杆菌目的相对丰度逐渐降低, 由降解初期的 57.08% 降低到末期的 23.12%; 梭菌目的相对丰度逐渐升高, 由降解初期的 42.21% 升高到末期的 75.76%。

在微生物科的分类水平上, 复合菌系包含 48 个科的细菌。不同降解时期的复合菌系主要由类芽胞杆菌科 Paenibacillaceae、梭菌科 Clostridiaceae、动球菌科 Planococcaceae、芽胞杆菌科 Bacillaceae、梭菌目第 11 家族未定地位的菌科 Clostridiales

表 1 3 个测序样品有效数据统计与微生物组成的 Alpha 多样性指数

Table 1 The statistic of clean data and the alpha diversity indexes of bacterial composition in each sequencing sample

Samples	FHJ1	FHJ2	FHJ3
Sequences count	23 642	24 348	25 414
Bases count (bp)	10 054 542	10 367 569	10 831 874
Mean sequences length (bp)	425±7	425±6	426±4
GC percent (%)	54±2	54±2	54±1
Coverage (%)	99.63	99.44	99.54
Observed OTU	292	312	276
Chao1	329.01	392.33	344.25
Shannon	3.98	3.93	3.62
Simpson	0.84	0.85	0.78
PD whole tree	10.03	10.75	10.00

The sample FHJ1, FHJ2 and FHJ3 represented consortium in initial stage, peak stage and end stage of degradation respectively. The sequencing depth was 20 653 sequences per sample.

Family XI. Incertae Sedis、疣微菌科 Ruminococcaceae、消化球菌科 Peptococcaceae 组成 (图 5D)。从培养 12 h 起, 随着纤维素降解的进行, 类芽胞杆菌科的相对丰度逐渐降低, 由降解初期的 46.39% 降低到末期的 8.11%; 梭菌科 (39.18%–70.80%)、芽胞杆菌科 (2.16%–11.77%) 的相对丰度由降解初期到末期逐渐升高; 动球菌科、梭菌目第九家族未定地位菌科、消化球菌科在降解高峰期时的相对丰度高于其他 2 个时期, 其在降解高峰期的相对丰度分别为 16.24%、5.53%、1.42%; 疣微菌科在 3 个时期的相对丰度无明显变化, 其相对丰度在 1.06%–1.27% 之间。

在微生物属的分类水平上, 复合菌系包含 103 个属的细菌。与其他 4 个微生物分类水平相比, 复合菌系的群落组成在属的分类水平上比较丰富。不同降解时期的复合菌系主要由短芽胞杆菌属 *Brevibacillus*、梭菌属 *Clostridium*、解脲芽胞杆菌属 *Ureibacillus*、喜热菌属 *Caloramator*、芽胞杆菌属 *Bacillus*、泰氏菌属 *Tissierella*、类芽胞杆菌属 *Paenibacillus*、瘤胃球菌属 *Ruminococcus*、刺尾鱼菌属 *Epulopiscium*、地芽胞杆菌属 *Geobacillus*、柯恩氏菌属 *Cohnella* 组成 (图 5E)。从培养 12 h 起, 随着纤维素降解的进行, 短芽胞杆菌属 (45.10%–6.01%)、喜热菌属 (3.10%–0.36%) 的相对丰度由降解初期到末期逐渐降低; 梭菌属 (39.18%–70.80%)、芽胞杆菌属 (2.16%–11.77%)、地芽胞杆菌属 (0.12%–4.53%)、柯恩氏菌属 (0.07%–1.85%) 的相对丰度由降解初期到末期逐渐升高; 解脲芽胞杆菌属、泰氏菌属、刺尾鱼菌属在降解高峰期时的相对丰度高于其他 2 个时期, 其相对丰度分别为 15.60%、5.21%、4.79%; 类芽胞杆菌属 (1.09%–0.22%)、瘤胃球菌属 (0.91%–1.07%) 在 3 个时期的相对丰度无明显变化。同时, 在微生物属的分类水平上, 对不同降解时期复合菌系的物种组成相对丰度进行聚类分析, 如图 5F 所示。降解高峰期与末期的复合菌系

聚类在一起, 说明它们在物种组成的相对丰度分布上相似程度更大, 而具体的主要优势菌的相对丰度变化与图 5E 一致。

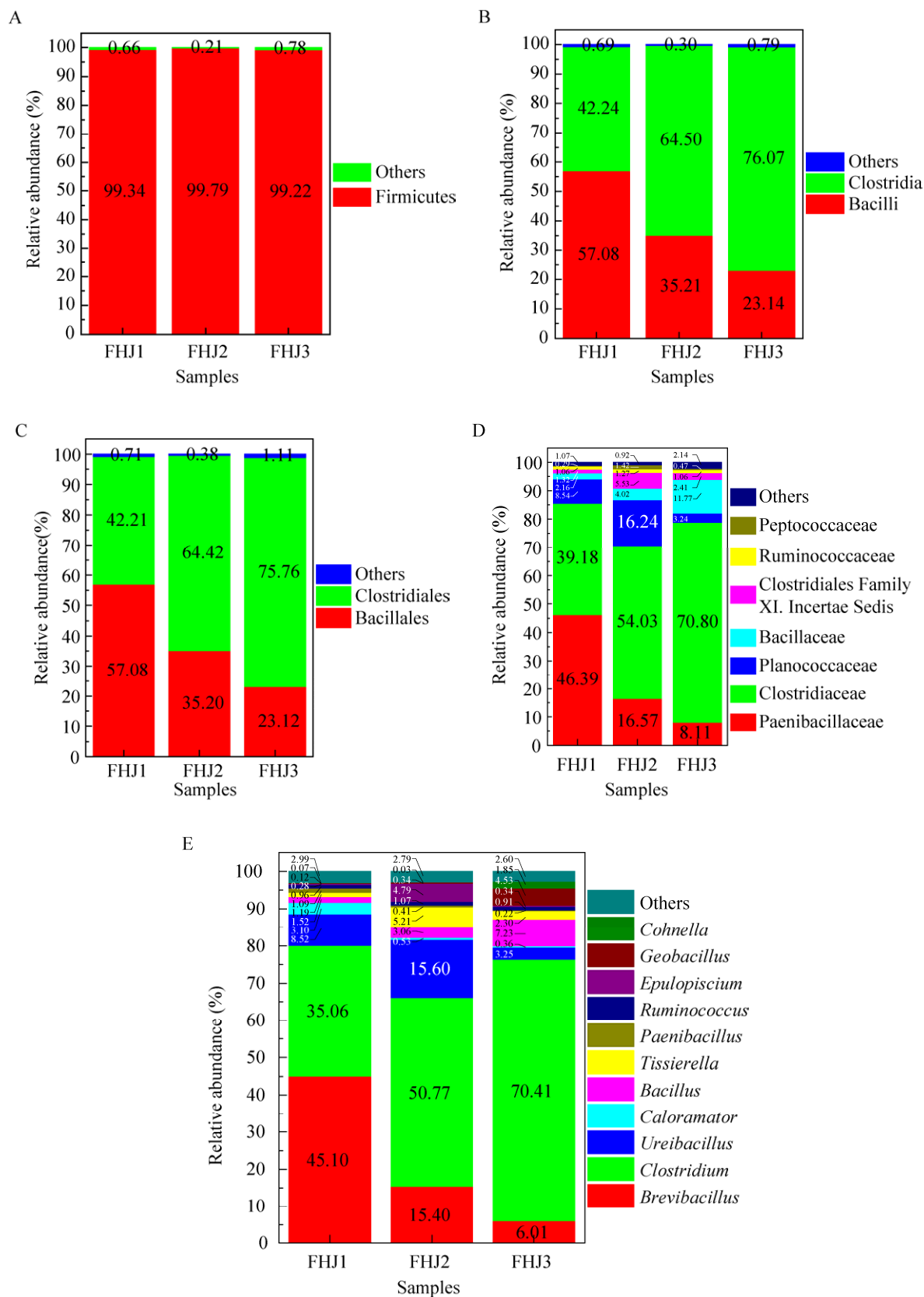
2.4 不同降解时期复合菌系组成的 Alpha 与 Beta 多样性分析

对不同降解时期复合菌系的 16S rRNA 基因扩增子高通量测序所获得的 OTU 表经过随机重抽样后进行 Alpha 多样性分析。如表 1 所示, 3 个样品的测序饱和度均在 99% 以上, 说明测序数据基本覆盖样品中的物种, 降解高峰期时的复合菌系较其他 2 个时期相比, 所观察到的 OTU 数最多, Chao1 指数最高, Simpson、PD whole tree 多样性指数也最大。即在降解高峰期时, 复合菌系的微生物组成多样性最丰富。

对不同降解时期复合菌系的 16S rRNA 基因扩增子高通量测序所获得的 OTU 表经过随机重抽样后进行 Beta 多样性分析, 主要进行了基于加权 Unifrac 距离的主坐标分析 (PCoA), 如图 6 所示。在第一主坐标解释 95.35% 的群落差异、第二主坐标解释 4.65% 的群落差异的情况下, 3 个样品之间存在一定的距离, 说明不同降解时期复合菌系在物种组成、相对丰度、系统发育关系具有一定的差异。

2.5 复合菌系的微生物群落结构与纤维素降解的关系

将不同降解时期复合菌系的主要属水平上的细菌与不同降解时期纤维素、半纤维素含量的变化进行冗余分析, 如图 7 与表 2 所示。不同降解时期复合菌系的微生物群落结构与纤维素降解相关环境因子的相关系数为 1, 第 1 排序轴变化量为 0.664 6, 第 2 排序轴变化量为 0.335 4, 说明排序轴能较好地反映不同降解时期复合菌系的微生物群落结构同纤维素降解相关环境因子的相关性, 进而说明纤维素的降解直接影响了复合菌系微生物群落结构的变化 (表 2)。



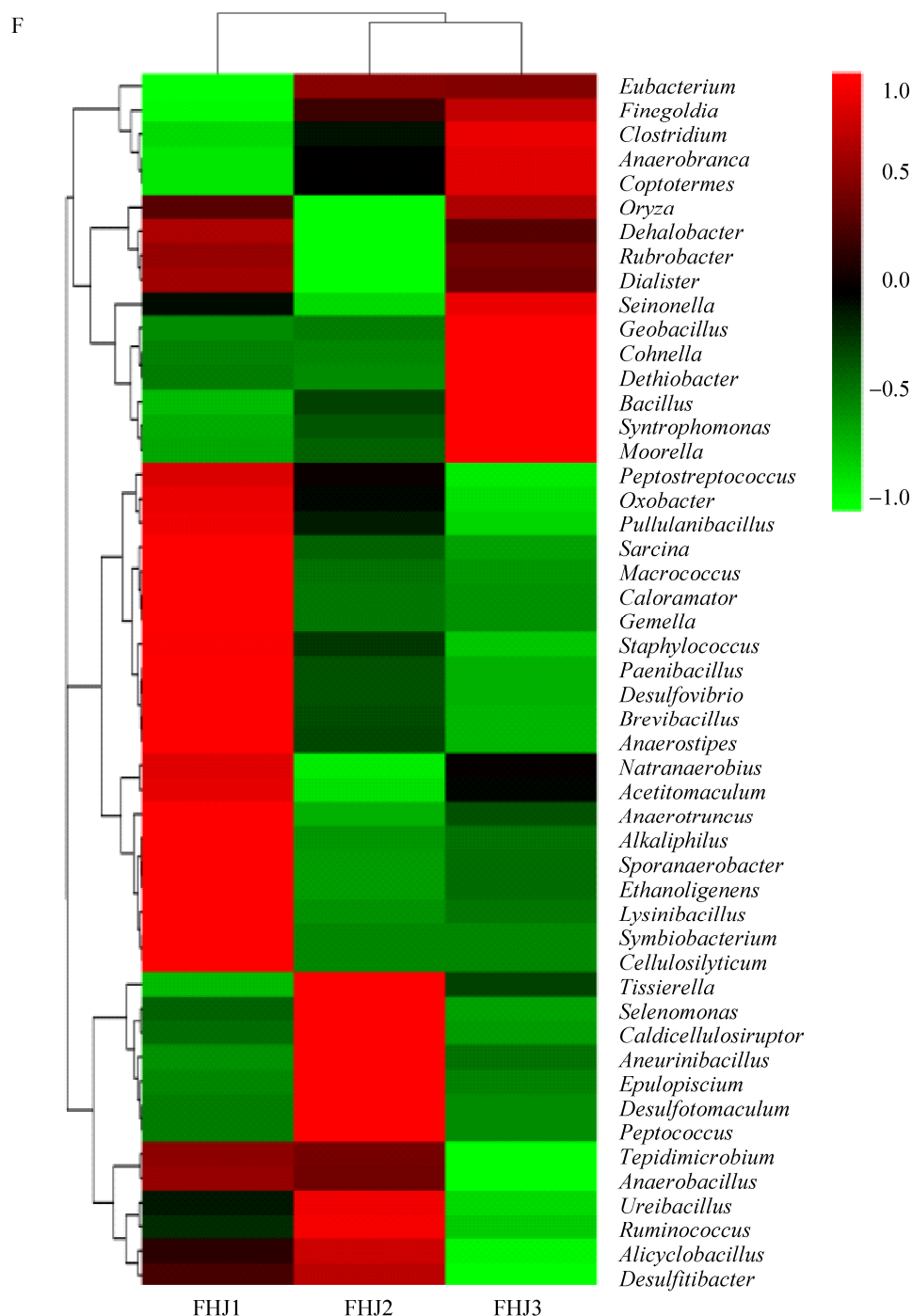


图5 不同降解时期复合菌系在门 (A)、纲 (B)、目 (C)、科 (D)、属 (E) 分类水平上的群落组成及在属分类水平上的聚类分析热图 (F)

Fig. 5 Bacterial composition of consortium at the phylum (A), class (B), order (C), family (D) and genus (E) taxon respectively, and the heatmap of clustering analysis of consortium in different degradation stages at the genus taxon (F). The sample FHJ1, FHJ2 and FHJ3 represented consortium in initial stage, peak stage and end stage of degradation respectively. Others represented the bacteria which relative abundance was less than 1.00% in each sample. Genera of top 50 in relative abundance were listed in the figure F.

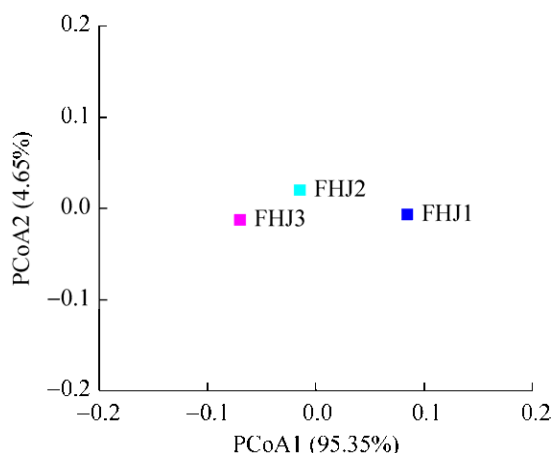


图 6 不同降解时期复合菌系的 PCoA 图

Fig. 6 PCoA diagram of consortium in different degradation stages. The sample FHJ1, FHJ2 and FHJ3 represented consortium in initial stage, peak stage and end stage of degradation respectively.

不同降解时期的 3 个样品分别分布在 3 个象限上, 3 个样品之间存在一定的距离, 说明不同降解时期复合菌系的微生物群落结构具有差异, 这也与 Beta 多样性结果一致 (图 7)。其中, *Caloramator*、*Paenibacillus*、*Brevibacillus* 依次分布在降解初期样品所在象限, 说明在降解初期复合菌系中主要以这些细菌存在并发挥降解功能。而 *Epulopiscium*、*Tissierella*、*Ruminococcus*、*Ureibacillus* 依次主要分布在降解高峰期样品所在象限, 且这些细菌的相对丰度在此时期最高, 说明它们在降解高峰期发挥了一定降解功能。*Cohnella*、*Geobacillus*、*Bacillus*、*Clostridium* 依次相对集中在降解末期样品所在位置, 同时 *Clostridium*、*Bacillus*、*Geobacillus*、*Cohnella* 射

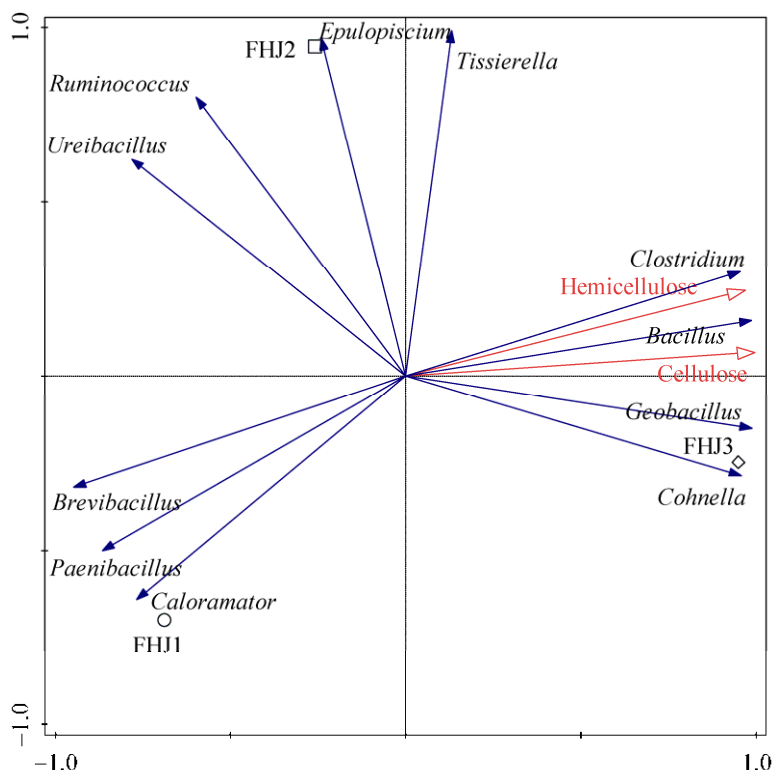


图 7 不同降解时期复合菌系的群落结构与纤维素降解的 RDA 图

Fig. 7 The RDA diagram of community structure of bacterial consortium and cellulose degradation in different degradation stages. The sample FHJ1, FHJ2 and FHJ3 represented consortium in initial stage, peak stage and end stage of degradation respectively.

表 2 不同降解时期复合菌系的群落结构与纤维素降解的 RDA 结果

Table 2 The RDA of community structure of bacterial consortium and cellulose degradation in different degradation stages

Statistic	Axis1	Axis2
Eigenvalues	0.664 6	0.335 4
Explained variation (cumulative)	66.460 0	100.000 0
Pseudo-canonical correlation	1.000 0	1.000 0

线分别与纤维素、半纤维素射线呈锐角,且夹角较小、射线长度大体相同,因此呈较强的正相关性,即在复合菌系降解纤维素的过程中,纤维素、半纤维素含量对上述 4 种细菌的影响作用最大,反过来说明在复合菌系中这 4 种细菌对纤维素的降解贡献度最大。

3 讨论

本研究所用的纤维素降解复合菌系与其他同类复合菌系相比,其在短时间内对天然纤维素材料的降解率更高,华彬彬^[13]从牛粪堆肥样品中筛选的复合菌系在 50 °C 静置培养结束后仅降解 50% 左右的稻秆。而本研究的复合菌系在相同培养条件下可降解 80% 以上的稻秆,降解效果优越。

不同降解时期的复合菌系主要由厚壁菌门的细菌组成。在自然界中,厚壁菌门的细菌在纤维素降解中起重要作用^[14],且能适应极端 pH,具有耐热特性^[15],这一点也说明了复合菌系在高温、pH 剧烈浮动的培养条件下仍能发挥降解功能。另一方面也说明在人为创造的纤维素降解的非自然微生态环境中,厚壁菌门应该占主要地位^[16]。

在属水平上,随着纤维素的不断降解,复合菌系中的细菌主要有 3 种变化趋势。第 1 种趋势是复合菌系中短芽胞杆菌属、喜热菌属的相对丰度逐渐降低。尤其短芽胞杆菌属在降解初期占了近一半的比例,但到中后期失去了优势地位。冯

红梅等^[17]从堆肥高温期样品中分离出高效降解纤维素的高温短芽胞杆菌。该属绝大多数严格好氧,可利用糖类产酸^[18]。说明短芽胞杆菌属在复合菌系培养初期降解纤维素发挥了巨大的作用,也导致了有机酸的大量积累,使得从培养开始 pH 一直下降,直到高峰期时 pH 最低。但是,该复合菌系的呼吸类型属微好氧型,初期培养体系内氧气充足适宜它的生长,当氧气被消耗掉,到降解的中后期它的相对丰度自然就降低了。李莹等^[19]重新组配该复合菌系的单菌,通过克隆文库的方法同样发现在培养初期短芽胞杆菌属占主要地位,随着培养的进行,它的比例持续下降。其次,复合菌系中喜热菌属仅在降解初期相对丰度较大,Zhang 等^[20]从纤维素降解复合菌系 RXS 分离到高温纤维素、半纤维素降解菌,属于喜热菌,说明该属对于初期纤维素的降解起了一定的作用。

第 2 种趋势是梭菌属等厌氧、兼性菌的相对丰度逐渐升高。梭菌属的相对丰度从降解开始就很高,占 35.06%,这与接种都选择在降解后期有关,因为到降解后期梭菌属占到 70% 以上,本底水平就很高;另一方面也说明梭菌属从始至终对纤维素的降解发挥着不可替代的作用^[21],尤其在降解的高峰期与后期,是该复合菌系降解纤维素的关键菌。温雪等^[22]通过常规分离方法验证了梭菌属是该复合菌系的核心功能菌。李莹等^[19]也验证了在该复合菌系中梭菌属的比例随着培养的进行持续增加,到末期占主导地位。这也说明复合菌系的好氧菌在降解初期消耗掉大部分氧气,进而像梭菌属这一类的厌氧菌大量生长^[3],相对丰度升高。同时,梭菌属可发酵有机酸^[21],而像短芽胞杆菌属、解脲芽胞杆菌属、芽胞杆菌属等这类产酸菌的相对丰度已经远不及梭菌属的高,这也是在降解高峰期过后 pH 回升的原因之一。在复合菌系中,芽胞杆菌属、地芽胞杆菌属、柯恩氏菌属的相对丰度也逐渐升高。虽然前三者的相

对丰度远不及梭菌属升高的明显,但是能降解纤维素、半纤维素的它们在降解中后期生存^[23-25],与梭菌属一起对中后期的降解起一定作用。

第3种趋势是解脲芽胞杆菌属、泰氏菌属、刺尾鱼菌属高峰期时相对丰度最高。Ting等^[26]从堆肥及热泉中分离出了严格好氧、嗜热、释放木聚糖酶与纤维素酶的解脲芽胞杆菌,能发酵木糖、葡萄糖、甘露糖等小分子糖^[27]。说明在降解初期纤维素降解产生的糖产物可被解脲芽胞杆菌属利用,进而相对丰度升高;然而到降解末期培养体系缺氧,它的相对丰度自然又降低了。刘震东等^[28]利用 DGGE 法也发现解脲芽胞杆菌属在复合菌系纤维素降解中期时为优势菌群,而在末期数量极少。此外,在复合菌系中泰氏菌属^[29]、刺尾鱼菌属^[30]同样具有纤维素水解作用。高峰期时复合菌系对纤维素的转化率高,而它们在此阶段相对丰度最高,说明它们在高峰期时降解活性最强。

另外,复合菌系中类芽胞杆菌属、瘤胃球菌属的相对丰度在纤维素降解过程中无明显变化,仅占整体水平的1%左右。但它们也具有降解纤维素或半纤维素的能力^[31-32],然而它们的相对丰度在各降解时期均无明显变化,可能它们在复合菌系里发挥的作用不及其他细菌明显。

通过对不同降解时期复合菌系微生物组成的Alpha、Beta多样性分析发现,尽管3个时期的主要微生物组成相同,但是整体的群落结构还是有一定差异的,降解高峰期时微生物组成多样性最丰富。可能因为复合菌系本身微生物组成多样性丰富,只是在培养初期,培养基中能利用的碳源等营养物质有限,某些主要利用纤维素降解产物的细菌不足以生长繁殖;随着纤维素的降解,产生了可溶的营养代谢产物,这些细菌得以生存繁殖,细菌多样性增加;但纤维素降解完全后,营养已被耗尽,某些菌体死亡,又减少了微生物群落的多样性。

4 结论

本研究的复合菌系是由好氧型细菌、兼性厌氧型细菌、严格厌氧型细菌组成的复杂微生物群体,在降解纤维素的过程中其微生物群落结构发生了显著变化。降解初期好氧菌在群落中处于数量优势地位,厌氧菌次之;从降解高峰期开始到降解末期,厌氧菌、兼性菌逐渐成为优势菌,占主导地位。正是因为复合菌系有着丰富的微生物多样性以及多样性的不断交替变化,复合菌系中微生物在降解纤维素过程中协同作用,使得它有强大的纤维素降解能力。

REFERENCES

- [1] Fang X, Qin YQ, Li XZ, et al. Progress on cellulase and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 864–869 (in Chinese).
方诒, 秦玉琪, 李雪芝, 等. 纤维素酶与木质纤维素生物降解转化的研究进展. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 864–869.
- [2] Jönsson LJ, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour Technol*, 2015, 199: 103–112.
- [3] Wang CF, Ma SC, Huang Y, et al. Characterization and microbial community shifts of rice straw degrading microbial consortia. *Acta Microbiol Sin*, 2016, 56(12): 1856–1868 (in Chinese).
王春芳, 马诗淳, 黄艳, 等. 降解水稻秸秆的复合菌系及其微生物群落结构演替. *微生物学报*, 2016, 56(12): 1856–1868.
- [4] Yan L, Gao YM, Wang YJ, et al. Diversity of a mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production. *Bioresour Technol*, 2012, 111(5): 49–54.
- [5] Chandel AK, Singh OV. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of 'Biofuel'. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(5): 1289–1303.
- [6] Yuan XF, Ma L, Wen BT, et al. Enhancing anaerobic digestion of cotton stalk by pretreatment with a microbial consortium (MC1). *Bioresour Technol*, 2016,

- 207: 293–301.
- [7] Wang WD, Lei Y, Cui ZJ, et al. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresour Technol*, 2011, 102(19): 9321–9324.
- [8] Wang WD, Song YB, Wang YJ, et al. Biodiversity of mesophilic microbial community BYND-8 capability of lignocellulose degradation and its effect on biogas production. *Environ Sci*, 2011, 32(1): 253–258 (in Chinese).
王伟东, 宋亚彬, 王彦杰, 等. 复合菌系 BYND-8 的种群组成及其对沼气产量的影响. *环境科学*, 2011, 32(1): 253–258.
- [9] Deng B, Jia J, Ai SQ, et al. The screening and diversity of a bacterial community capable of degrading corn straw at 30 °C. *Renew Energy Resour*, 2017, 35(8): 1127–1134 (in Chinese).
邓兵, 贾军, 艾士奇, 等. 常温降解玉米秸秆复合菌系及其微生物多样性研究. *可再生能源*, 2017, 35(8): 1127–1134.
- [10] Jiménez DJ, Dini-Andreote F, van Elsas JD. Metataxonomic profiling and prediction of functional behaviour of wheat straw degrading microbial consortia. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 92–108.
- [11] Wang WD, Cui ZJ, Yang HY, et al. Stability of a composite microbial system WSC-6 with efficient cellulose degrading. *China Environ Sci*, 2005, 25(5): 567–571 (in Chinese).
王伟东, 崔宗均, 杨洪岩, 等. 高效稳定纤维素分解菌复合系 WSC-6 的稳定性. *中国环境科学*, 2005, 25(5): 567–571.
- [12] Zhu H, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(22): 5279–5280.
- [13] Hua BB. Formation mechanism and application of lignocellulose degradation microbial community[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017 (in Chinese).
华彬彬. 分解木质纤维素复合菌系的形成机理及应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [14] Berlemont R, Martiny AC. Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(5): 1545–1554.
- [15] Miller DA, Suen G, Clements KD, et al. The genomic basis for the evolution of a novel form of cellular reproduction in the bacterium *Epulopiscium*. *BMC Genomics*, 2012, 13: 265–282.
- [16] Güllert S, Fischer MA, Turaev D, et al. Deep metagenome and metatranscriptome analyses of microbial communities affiliated with an industrial biogas fermenter, a cow rumen, and elephant feces reveal major differences in carbohydrate hydrolysis strategies. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 121–140.
- [17] Feng HM, Qin YS, Li XF, et al. Screening and enzyme production characteristics of thermophilic cellulase-producing strains. *Environ Sci*, 2016, 37(4): 1546–1552 (in Chinese).
冯红梅, 秦永胜, 李筱帆, 等. 高温纤维素降解菌群筛选及产酶特性. *环境科学*, 2016, 37(4): 1546–1552.
- [18] Shida O, Takagi H, Kadowaki K, et al. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46(4): 939–946.
- [19] Li Y, Dong GJ, Fang X, et al. Dynamics of microbial community in process of cellulose decomposed by simplified bacterial community F1. *Environ Sci Technol*, 2016, 39(8): 35–39, 76 (in Chinese).
李莹, 董桂军, 方旭, 等. 简化的纤维素分解复合菌系 F1 的菌株组成动态. *环境科学与技术*, 2016, 39(8): 35–39, 76.
- [20] Zhang QH, Tian M, Tang L, et al. Exploration of the key microbes involved in the cellulolytic activity of a microbial consortium by serial dilution. *Bioresour Technol*, 2013, 132: 395–400.
- [21] Buchanan RE, Gibbons NE, et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Translation Group of Berger Bacteria Identification Manual, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. Beijing: Science Press, 1984: 760–761 (in Chinese).
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 8 版. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 760–761.
- [22] Wen X, Fu BR, Wang YJ, et al. Isolation of anaerobic bacterial strains from cellulolytic bacterial community WSC-9. *J Northeast Agric Univ*, 2013, 44(2): 47–52 (in Chinese).
温雪, 付博锐, 王彦杰, 等. 纤维素分解复合菌系 WSC-9 中厌氧细菌的分离. *东北农业大学学报*, 2013, 44(2): 47–52.
- [23] Tian W, Zhang ZH, Wang Z, et al. Lignocelluloses

- degradation and related biological characteristics during thermophilic composting of cow dung. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2014, 26(2): 432–438 (in Chinese).
- 田伟, 张振华, 汪贞, 等. 牛粪高温堆肥过程中木质纤维素降解及相关生物学特性研究. *浙江农业学报*, 2014, 26(2): 432–438.
- [24] Mei F, Lin BX, Zhao C, et al. Isolation and identification of thermophiles degrading cellulose in hot spring. *Hubei Agric Univ*, 2014, 53(7): 1516–1519 (in Chinese).
- 梅凡, 林白雪, 赵超, 等. 温泉中降解纤维素嗜热细菌的分离与鉴定. *湖北农业科学*, 2014, 53(7): 1516–1519.
- [25] Wushke S, Levin DB, Cicek N, et al. Characterization of enriched aerotolerant cellulose-degrading communities for biofuels production using differing selection pressures and inoculum sources. *Can J Microbiol*, 2013, 59(10): 679–683.
- [26] Ting ASY, Tay H, Peh KL, et al. Novel isolation of thermophilic *Ureibacillus terrenus* from compost of empty fruit bunches (EFB) of oil palm and its enzymatic activities. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2013, 2(2): 162–164.
- [27] Fortina MG, Pukall R, Schumann P, et al. *Ureibacillus* gen. nov. a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51(2): 447–455.
- [28] Liu ZD, Li WZ, Liu S, et al. Characteristic of an efficient microbial system with cellulose degradation bacteria. *J Northeast Agric Univ*, 2009, 40(8): 105–109 (in Chinese).
- 刘震东, 李文哲, 刘爽, 等. 高效木质纤维素分解菌复合系的发酵特性. *东北农业大学学报*, 2009, 40(8): 105–109.
- [29] Han R, Chen LS, Li L, et al. Microbial community of rural household biogas digesters in Qinghai by PCR-DGGE. *China Environ Sci*, 2015, 35(6): 1794–1804 (in Chinese).
- 韩睿, 陈来生, 李莉, 等. PCR-DGGE 研究青海农村户用沼气池微生物群落结构. *中国环境科学*, 2015, 35(6): 1794–1804.
- [30] Miyake S, Ngugi DK, Stingl U. Phylogenetic diversity, distribution, and cophylogeny of giant bacteria (*Epulopiscium*) with their Surgeonfish hosts in the Red Sea. *Front Microbiol*, 2016, 7: 285–289.
- [31] Huang GS, Kong LB, Zhu XD, et al. Isolation and identification of cellulose binding protein of a cellulolytic microbial consortium. *Acta Sci Circumstant*, 2015, 35(4): 1026–1031 (in Chinese).
- 黄根树, 孔令保, 朱向东, 等. 纤维素降解复合菌系中纤维结合蛋白的分离及鉴定. *环境科学学报*, 2015, 35(4): 1026–1031.
- [32] Baba Y, Matsuki Y, Mori Y, et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass by cattle rumen fluid for methane production: bacterial flora and enzyme activity analysis. *J Biosci Bioeng*, 2017, 123(4): 489–496.

(本文责编 陈宏宇)