

一株芽孢杆菌的筛选及其降解木质纤维素性能

张鑫¹, 罗雨帆¹, 许庆方^{1,2,3*}

1 山西农业大学 草业学院, 山西 晋中

2 农业农村部饲草高效生产模式创新重点实验室, 山西 晋中

3 草地生态保护与乡土草种质创新山西省重点实验室, 山西 晋中

张鑫, 罗雨帆, 许庆方. 一株芽孢杆菌的筛选及其降解木质纤维素性能[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1512-1528.

ZHANG Xin, LUO Yufan, XU Qingfang. A *Bacillus* strain capable of degrading lignocellulose[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(4): 1512-1528.

摘要:【目的】为了更好地利用因气候、机械配套等原因导致苜蓿延迟收割而沉积的木质纤维素, 筛选可以降解木质纤维素的菌株, 为苜蓿的高效利用提供菌种资源。【方法】采用碱性木质素、羧甲基纤维素钠培养法初筛菌株; 结合颜色变化和褪色圈复筛能够分泌木质素酶和纤维素酶的菌株; 通过 16S rRNA 基因和全基因组测序进行分类鉴定; 将全基因组测序结果与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 和碳水化合物活性酶 (carbohydrate-active enzymes, CAZy) 数据库比对, 注释基因功能; 利用扫描电镜法评价菌株对苜蓿茎微观结构的降解效果; 采用菌株添加法评价其对苜蓿干草养分和微生物群落变化的影响。【结果】获得 1 株能够分泌木质素酶和纤维素酶的菌株 S1, 经全基因组测序鉴定为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。其基因组中有 305 个基因被注释为参与碳水化合物代谢, 其中包含 139 个编码碳水化合物活性酶的基因。在苜蓿干草中添加该菌株后, 茎中维管束的微观结构发生显著变化, 粗蛋白 (crude protein, CP) 含量随储存时间增加而升高, 木质素、中性洗涤纤维 (neutral detergent fiber, NDF) 和酸性洗涤纤维 (acid detergent fiber, ADF) 含量降低, 同时微生物 α 多样性也有所下降。【结论】筛选鉴定的菌株为蜡样芽孢杆菌, 其具有较强的木质纤维素降解能力。

关键词: 木质纤维素降解; 蜡样芽孢杆菌; 苜蓿; 基因功能注释

资助项目: 国家重点研发计划(2017YFD0502100); 山西省现代农业产业技术体系建设专项资金(2024CYJSTX)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0502100) and the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (2024CYJSTX).

*Corresponding author. E-mail: xuqfsxau@126.com

Received: 2024-11-25; Accepted: 2025-02-22; Published online: 2025-03-12

A *Bacillus* strain capable of degrading lignocellulose

ZHANG Xin¹, LUO Yufan¹, XU Qingfang^{1,2,3*}

1 College of Grassland Science, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi, China

2 Key Laboratory of Efficient Forage Production Mode Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Jinzhong, Shanxi, China

3 Shanxi Key Laboratory of Grassland Ecological Protection and Native Grass Germplasm Innovation, Jinzhong, Shanxi, China

Abstract: [Objective] To screen out a strain that can degrade lignocellulose for the application of lignocellulose deposited by delayed harvest of alfalfa under inappropriate climate and mechanical matching and provide strain resources for the efficient use of alfalfa. [Methods] The primary screening was carried out by culture with alkali lignin and sodium carboxymethyl cellulose. Based on color changes and fading circles, the strain with the ability to secrete ligninase and cellulase was screened out. The target strain was identified by 16S rRNA gene sequencing and whole genome sequencing, and then Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) and carbohydrate-active enzymes (CAZy) were employed to annotate gene functions based on the whole genome sequence. The microstructure of the alfalfa stems degraded by the strain was observed by scanning electron microscopy. The nutrient and microbial community changes in alfalfa hay treated with the strain were evaluated. [Results] A strain S1 producing ligninase and cellulase was identified as *Bacillus cereus* by whole genome sequencing. A total of 305 genes involved in carbohydrate metabolism were annotated, including 139 genes encoding CAZy. After treatment with this strain, the microstructure of vascular bundles in alfalfa stems changed significantly. The crude protein content in alfalfa hay increased, while the lignin, neutral detergent fiber, and acid detergent fiber content and the alpha-diversity of microorganisms decreased over time. [Conclusion] The screened strain identified as *B. cereus* demonstrates a robust ability to degrade lignocellulose.

Keywords: lignocellulose degradation; *Bacillus cereus*; alfalfa; gene function annotation

木质纤维素原料来源广泛，在农作物秸秆中纤维素(cellulose)含量为 30%–50%，半纤维素(hemicellulose)含量为 25%–30%，木质素(lignin)含量为 15%–20%^[1-2]。木质素的致密结构是纤维素酶降解利用的主要物理障碍，影响纤维素和半纤维素的工业转化利用^[3-4]。苜蓿具有较高的营养价值，被誉为“牧草之王”。李彦芳^[5]研究发现，反刍动物适量饲喂苜蓿可以加快生长速度、提高产奶量和饲料转化率，经济效益良好。然而，苜蓿的木质纤维素含量会随生育期推进

而逐渐升高，降低适口性，影响消化率^[6-7]。苜蓿茎的比例可达 50%–70%^[8]，其木质化程度远高于叶，而叶肉组织则永不木质化^[9]。在生产实践中，阴雨天气、机械不配套等原因常导致苜蓿收割延迟，进而加剧木质化，降低品质。

在诸多加工方法中，生物降解因其成本低、降解条件宽泛、效率高等优点而备受关注^[10]。虽然真菌的木质素降解效率高于细菌，但其对极端环境的耐受性较差，限制了其应用^[11-12]。相比之下，细菌具有繁殖速度快、基因组较小

且便于分子遗传和蛋白质表达等优势^[13]。芽孢杆菌属能够形成芽孢,具有耐热、耐干、耐酸碱等特性^[14],可在较宽的温度和 pH 范围内存活和繁殖^[15]。Chukwuma 等^[16]从城市固体废物沉积物中筛选分离出降解木质纤维素的芽孢杆菌。谢长校^[17]分离出一株芽孢杆菌,其漆酶和过氧化物酶活性较高,可将木质素大分子解聚为小分子苯化合物,并进一步降解进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)。燕红等^[18]通过酶活测定、残渣结晶度分析、表面结构观察和傅里叶红外光谱检测,研究了蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)降解麦麸木质纤维素的能力,但未对其基因组进行分析。Tao 等^[19]对蜡样芽孢杆菌 ATCC 14579 的宏基因组进行分析,发现其与蛋白质降解酶相关的基因数量较多,但未预测到与纤维素分解相关的基因。

目前,关于全基因组分析具有木质纤维素降解能力的蜡样芽孢杆菌,以及其对苜蓿干草微生物群落多样性的影响研究报道较少。筛选并鉴定降解木质纤维素的蜡样芽孢杆菌,基于全基因组分析 KEGG 通路,注释碳水化合物活性酶基因,解析其对苜蓿干草养分及微生物多样性的影响,不仅可以为优质苜蓿草产品的生产发掘宝贵的微生物资源,还可为探究木质纤维素降解的内在机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

富含腐殖质的土壤样品采集于山西农业大学校园内及种植中苜一号的试验地,将土壤带回实验室后,在 4 °C 保存。

苜蓿来源:山西农业大学草业学院试验地栽培的中苜一号。

1.2 培养基

LB 肉汤和 LB 营养琼脂、碱性木质素、木

聚糖(来源于玉米芯)均购自北京索莱宝科技有限公司。羧甲基纤维素钠购自天津市光复科技发展有限公司。

碱性木质素固体培养基(g/L): 碱性木质素 5.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄ 1.0, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.2, 琼脂粉 22.0。

羧甲基纤维素钠固体培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 5.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄ 1.0, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.2, 琼脂粉 22.0。

苯胺蓝-NA 培养基: 0.1 g 苯胺蓝溶解在 1 L 营养琼脂培养基。

木聚糖培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 2.0, MgSO₄ 0.5, K₂HPO₄ 1.0, NaCl 0.5, 木聚糖 2.0, 琼脂粉 22.0。

无机盐矿物元素营养液(MSM)(g/L): (NH₄)₂SO₄ 2.0, KH₂PO₄ 2.0, MgSO₄ 0.3, CaCl₂ 0.3, NaCl 0.5, FeSO₄ 0.005, MnSO₄ 0.016, ZnCl₂ 0.017, CoCl₂ 0.002。

1.3 菌株筛选

取样品土壤 10 g 置于 100 mL 灭菌锥形瓶中,加入 90 mL 的 0.9% 生理盐水,在 30 °C、150 r/min 下振荡 30 min,将锥形瓶中液体过滤至新的灭菌锥形瓶中,作为初始液体,备用。

初筛:分别取 100 μL 初始液体至碱性木质素固体培养基和羧甲基纤维素钠固体培养基,涂布均匀,在 37 °C 条件下倒置培养 24 h。挑取直径大于 0.2 cm 的单菌落,于 LB 固体培养基上通过划线培养进行多次纯化,直至获得纯菌株。

复筛:通过苯胺蓝褪色、愈创木酚液体培养基^[20]变色和革兰氏碘液^[21]褪色圈筛选具有产生过氧化物酶、漆酶和羧甲基纤维素酶的菌株。将复筛得到的菌株接种于 LB 液体培养基中,在 37 °C、150 r/min 振荡培养 24 h,并用于后续

试验。

木聚糖酶定性试验：将复筛菌株点涂于木聚糖培养基，在 37 °C 条件下倒置培养 24 h，之后用 1% 刚果红溶液浸染 30 min，用 1 mol/L NaCl 溶液进行脱色，观察是否出现褪色圈。

1.4 木质素酶活性检测

以苜蓿粉为唯一底物的培养基作为液体产酶培养基，在 37 °C、150 r/min 恒温摇床振荡培养，分别在 0、1、2、3、4、5、6、7 d 进行取样，通过 4 层无菌纱布过滤，滤液在 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 获得粗酶液，每天 3 个重复。

参照田林双^[22]的方法进行酶活测定和计算：通过吸光度变化，利用 2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]、MnSO₄、藜芦醇在 30 °C 下与粗酶液反应 3 min，测定结束与初始吸光度的变化。具体反应体系如下。

漆酶反应体系：100 mmol/L 丙二酸-丙二酸钠缓冲液、0.6 mmol/L ABTS 溶液各 0.5 mL，粗酶液 50 μL，测定 420 nm 处的吸光度变化。

锰过氧化物酶反应体系：100 mmol/L 丙二酸-丙二酸钠缓冲液 0.5 mL，10 mmol/L MnSO₄ 溶液 0.1 mL，粗酶液 50 μL，纯净水 0.4 mL，10 mmol/L H₂O₂ 溶液 0.01 mL 启动反应，测定 270 nm 处的吸光度变化。

木质素过氧化物酶反应体系：200 mmol/L 酒石酸缓冲液 0.5 mL，40 mmol/L 藜芦醇 0.1 mL，粗酶液 50 μL，纯净水 0.4 mL，20 mmol/L H₂O₂ 溶液 0.01 mL 启动反应，测定 310 nm 处的吸光度变化。

1.5 菌株分子鉴定

用 Bacterial DNA Kit (Omega Engineering 公司) 提取总 DNA 后用扩增引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R

(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因。PCR 反应体系 (50 μL)：PrimeSTAR Max Premix (2×) (TaKaRa 公司) 25 μL，上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL，DNA 模板 1 μL，ddH₂O 20 μL。PCR 反应条件：95 °C 预变性 5 min；98 °C 变性 10 s，55 °C 退火 5 s，72 °C 延伸 30 s，35 个循环；72 °C 终延伸 10 min。扩增产物进行 Sanger 测序，16S rRNA 基因测序由南昌科畅生物科技有限公司完成。序列提交至 NCBI 数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对。

用超声波破碎仪将 DNA 样品随机打断成长度约为 350 bp 的片段，制备文库后进行初步定量以及插入片段的检测，采用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行细菌全基因组测序，全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS) 由天津诺禾致源生物信息科技有限公司完成。组装整合后过滤掉 500 bp 以下的片段，最后使用 FastANI 计算平均核苷酸相似度 (average nucleotide identity, ANI)。

1.6 基因功能注释

基于全基因组测序结果，用 BLASTp 比对编码蛋白，利用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg>) 和碳水化合物活性酶 (carbohydrate-active enzymes, CAZy) 数据库 (<http://www.cazy.org/>) 等平台进行功能注释。

1.7 扫描电子显微镜观察

在 MSM 培养基中加入 5 g 切至 1–2 cm 的苜蓿茎，121 °C 灭菌 20 min 后，加入 100 μL 培养好的菌液，在 37 °C、150 r/min 振荡培养 48 h。用 4 层灭菌棉纱布过滤，获得的苜蓿茎进行冷冻干燥后，用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察其微观结构。

扫描电子显微镜显微照片通过 JSM-6701F 系统(JEOL 公司)进行拍摄。在高真空离子喷镀仪中喷镀金属膜后,在 15 kV 分辨率下成像。

1.8 苜蓿茎秆养分分析和细菌群落变化分析

留茬 20 cm 刈割初花期苜蓿,将样品在 60 °C 烘干至恒重,装入灭菌小瓶中,每瓶 15 g,备用。将菌液用蒸馏水稀释至 1×10^6 CFU/mL,均匀喷洒至烘干后的苜蓿干草,使含水量约为 30%,在室温条件下保存。分别在第 0、8、16、32 天取样,每组设 3 个重复。

在 0、8、32 d 的样品中,每个重复取 1 g 样品至无菌冻存管,用液氮速冻 5 min 后,迅速转移至 -80 °C 冰箱保存,送至生工生物工程(上海)股份有限公司,通过高通量测序进行微生物多样性分析。

将 0、8、16、32 d 的样品烘干至恒重后,送至蓝德雷牧草·饲料品质检测实验室,利用近红外光谱 NIRS DS2500 (FOSS 公司)测定养分。扫描波长范围为 850–2 500 nm,每个样品重复 8 次。

1.9 统计分析

酶活和养分指标数据采用 IBM SPSS Statistics v26.0 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 时认为具有统计学显著性差异。数据处理和作图使用 Origin 2021 完成。比对分析后,用 MEGA 11

软件中的邻接法构建基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树。ANI 值的热图使用 OAT (orthologous ANI tool) (<https://www.ezbiocloud.net/tools>)绘制。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

通过初筛培养基,筛选出 4 株在碱性木质素固体培养基和羧甲基纤维素钠固体培养基上均生长良好的菌株,将其分别编号为 S1、S2、S3、S4。

初筛菌株接种于复筛培养基,培养 24 h 后对复筛结果进行统计(表 1)。在初筛菌株中, S1 产生的革兰氏碘液褪色圈直径大于 S2,表明 S1 产羧甲基纤维素酶的能力优于 S2; S3 未产生苯胺蓝褪色圈,说明其无过氧化物酶活性; S4 不能使愈创木酚培养基变色,说明其无漆酶活性。因此,选择表现最优的 S1 菌株进行后续试验。

S1 菌株接种于苯胺蓝-NA 固体培养基,在 37 °C 下培养 24 h 后,菌落周围出现明显酶解圈(图 1A);培养结束后,将羧甲基纤维素钠培养基用革兰氏碘液浸泡染色,出现明显褪色圈(图 1B);愈创木酚液体培养基在 37 °C、150 r/min 下振荡 24 h 后,与未接种的培养基相比,颜色显著变红(图 1C);通过刚果红染色,木聚糖培养基未出现褪色圈(图 1D),表明该菌无木聚糖酶活性。

表1 菌株复筛情况

Table 1 Second screening of strains

编号 No.	苯胺蓝褪色圈直径 The decolorization of aniline blue (cm)	革兰氏碘液褪色圈直径 The decolorization of Gram's iodine solution (cm)	愈创木酚变色 Color change of guaiacol
S1	0.4–0.6	1.4–1.8	Yes
S2	0.3–0.5	0.6–0.8	Yes
S3	–	0.3–0.4	Yes
S4	0.8–0.9	0.7–0.8	No

–: 表示未出现水解圈。

–: Indicates that no hydrolysis circle occurs.

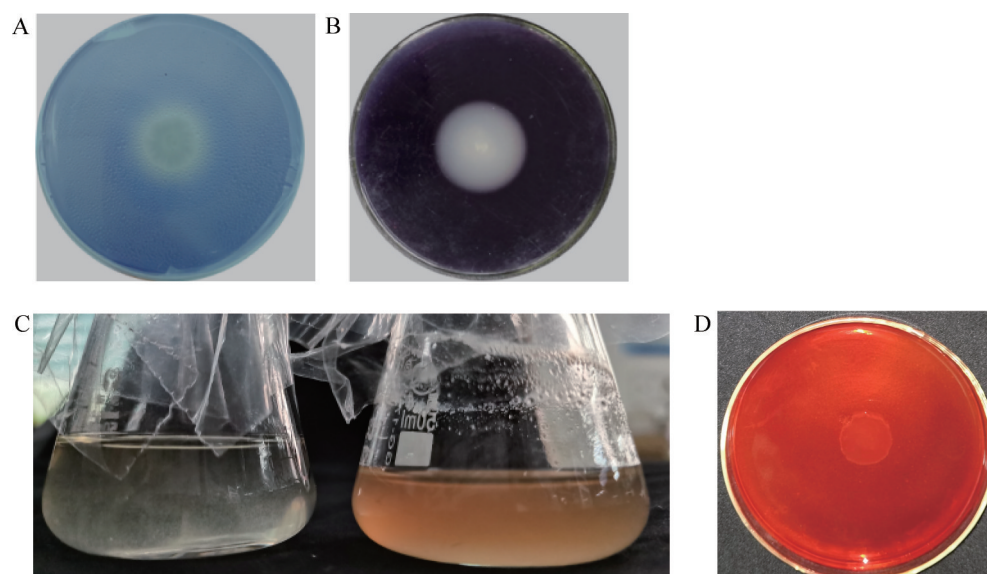


图1 木质纤维素降解菌的筛选。A: 过氧化物酶的鉴定; B: 羧甲基纤维素酶的鉴定; C: 漆酶的鉴定; D: 木聚糖酶的鉴定。

Figure 1 Screening of lignocellulose-degrading bacteria. A: Identification of peroxidase; B: Identification of carboxymethylcellulases; C: Identification of laccase; D: Identification of xylanase.

2.2 木质素酶活性分析

通过对菌株 S1 分泌的漆酶进行活性分析, 发现漆酶活性在第 1 天达到峰值, 随后活性呈下降趋势。在第 4 天, 漆酶活性下降至与第 0 天无显著差异, 甚至在第 7 天时酶活显著低于第 0 天(图 2A)。锰过氧化物酶活性在前 5 天呈

上升趋势, 随后活性下降(图 2C)。在 3 种胞外酶中, 锰过氧化物酶活性高于其他 2 种酶, 并且在高酶活状态下持续时间较长。

2.3 分子鉴定

菌株 S1 的测序结果完成后, 将测序结果上传至国家微生物科学数据中心(<http://nmdc.cn/>),

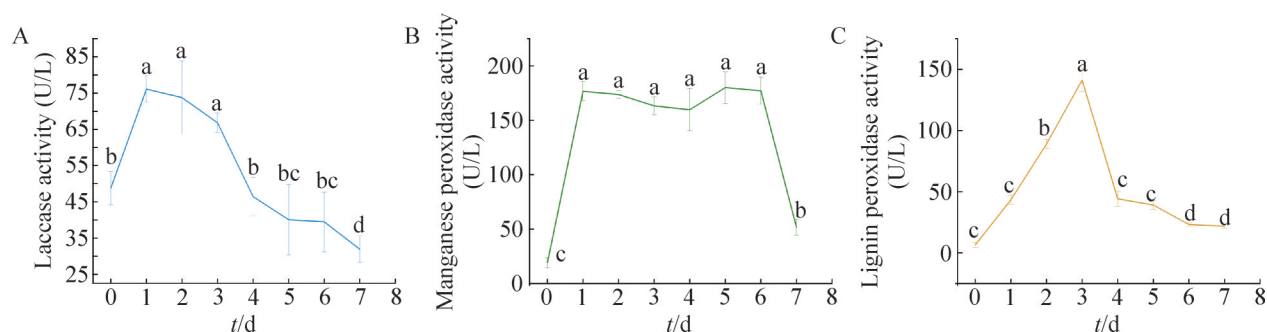


图2 酶活性定量。A: 漆酶活性; B: 锰过氧化物酶活性; C: 木质素过氧化物酶活性。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Figure 2 Quantification of the enzyme activity. A: Laccase activity; B: Manganese peroxidase activity; C: Lignin peroxidase activity. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

编号为 NMDCN0006AUT。该序列在 NCBI 数据库中进行比对, 与其亲缘关系最近的 3 株菌株均属于芽孢杆菌属, 分别为 *B. proteolyticus* strain MCCC 1A00365、*B. sanguinis* strain BML-BC004 和 *B. wiedmannii* strain FSL W8-0169, 这 3 株菌与菌株 S1 的序列比对一致度均为 99.45%, 因此无法在种水平对菌株 S1 进行精确分类鉴定(图 3A)。

对菌株 S1 进行全基因组测序, 并计算 ANI 值, 通过热图进行可视化。结果显示, S1 与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的 ANI 值最高, 且大于 95% (图 3B)。据此, 鉴定该菌为蜡样芽孢

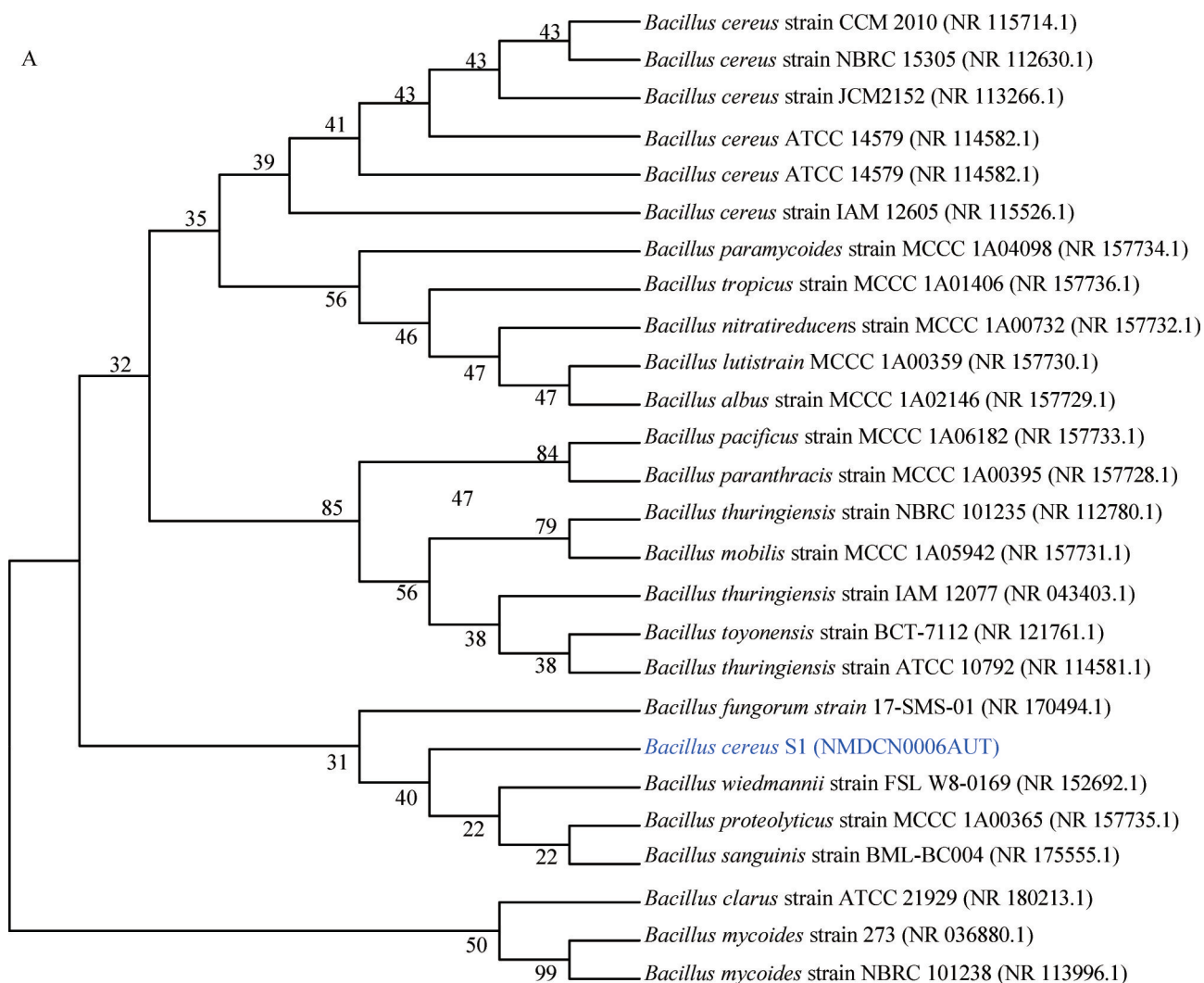
杆菌, 并将其命名为 *Bacillus cereus* S1。

2.4 基因组特征

通过全基因组测序, 蜡样芽孢杆菌 S1 的全基因组大小为 5 926 808 bp, G+C 含量为 34.76%, 编码 5 948 个基因, 平均编码基因长度为 831.99 bp。测序结果显示, 蜡样芽孢杆菌 S1 含有 57 个 tRNA 和 3 个 rRNA, 其中 rRNA 由 1 个 23S rRNA、1 个 5S rRNA 和 1 个 16S rRNA 组成(图 4)。

2.5 基因功能注释

KEGG 数据库是一个整合了基因组、化学和系统功能信息的综合数据库。通过与 KEGG



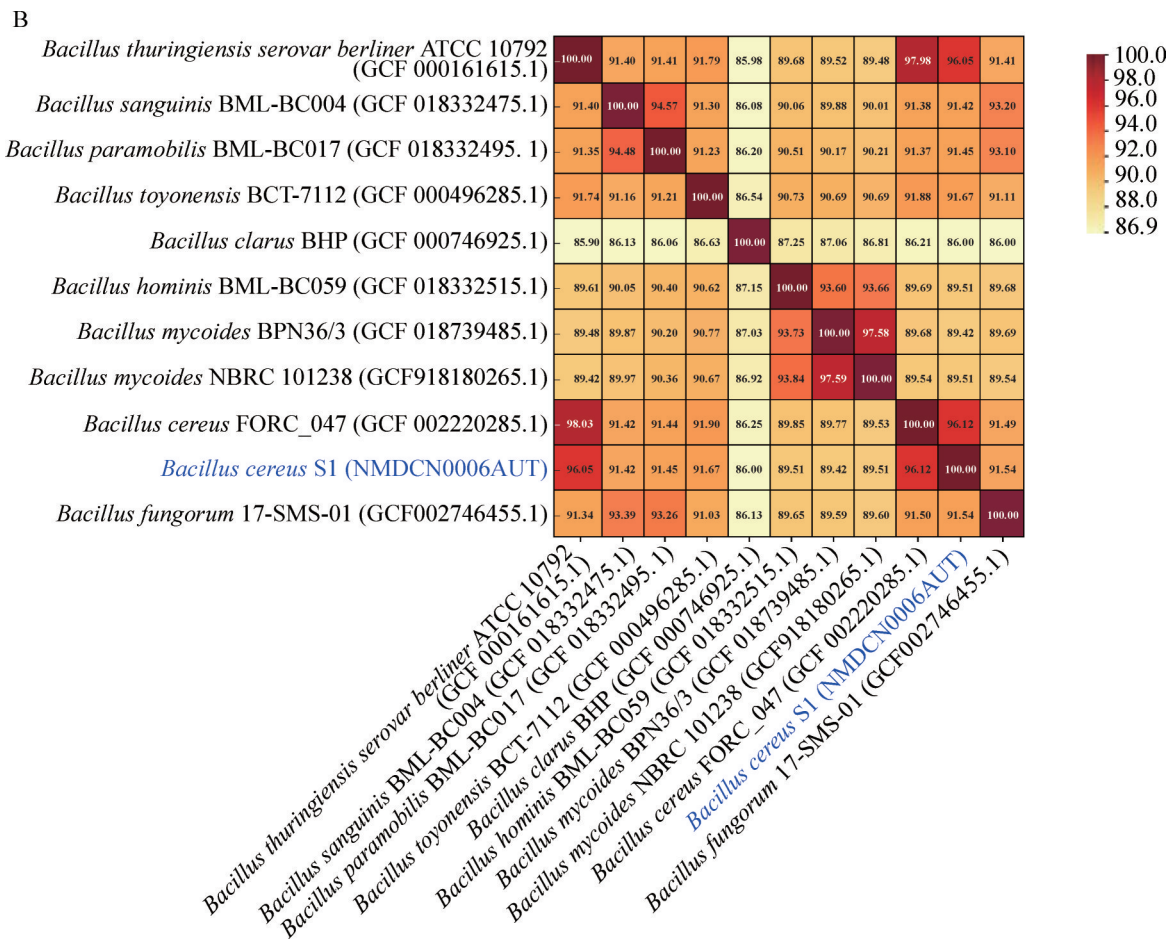


图3 菌株S1的分子鉴定。A: 基于16S rRNA基因序列的原始系统发育树(分支处的值是bootstrap值; 菌株后面的括号中是登录号); B: 基于全基因组序列的ANI热图(图中的值是ANI值)。

Figure 3 Molecular identification of the bacterial strain S1. A: Original phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence (The value at the branch is the bootstrap value; Accession numbers are shown in parentheses after the strain); B: Heatmap of the ANI based on the whole genome sequence (The values are the ANI values).

数据库比对注释, 蜡样芽孢杆菌 S1 共有 3 789 个基因得到功能注释, 其中 2 681 个基因在一级分类中被注释为代谢(metabolism), 在二级分类中, 305 个基因被注释为碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism), 157 个基因被注释为能量代谢(energy metabolism) (图 5A)。

与 KEGG 数据库不同, CAZy 数据库是依据蛋白质结构域内氨基酸序列的相似程度, 将碳水化合物活性酶划分到不同的蛋白质家族中。与 CAZy 数据库比对后, 蜡样芽孢杆菌 S1 共有

139 个基因得到注释, 分为以下 6 大类糖代谢酶家族: 糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)、糖基转移酶(glycosyl transferases, GTs)、多糖裂合酶(polysaccharide lyases, PLs)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)、碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules, CBMs)和辅助氧化还原酶(auxiliary activities, AAs)。其中, 44 个基因被注释为糖基转移酶, 38 个基因被注释为糖苷水解酶, 35 个基因被注释为碳水化合物酯酶(图 5B)。

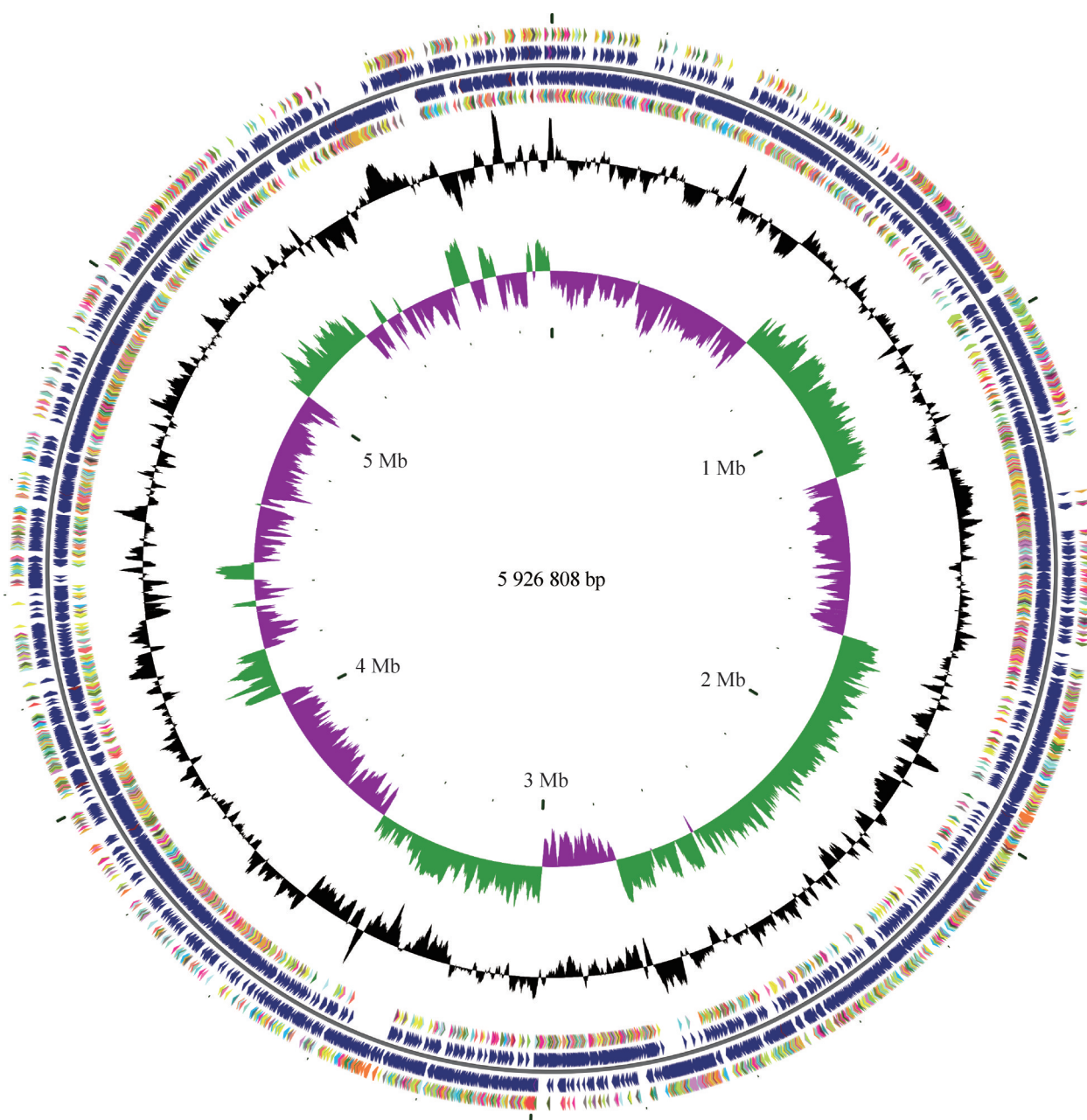


图4 蜡样芽孢杆菌S1的全基因组图谱。最外层为第1圈，第1圈和第4圈指的是每一个CDS所属的COG，第4圈与第1圈含义相同；第2圈以及第3圈代表的是基因组上的CDS、tRNA及rRNA；第5圈代表的是G+C的含量；第6圈代表的是G+C skew；最里面一圈代表的则是刻度；中间的数字代表全基因组序列总长度。

Figure 4 The genome-wide map of *Bacillus cereus* S1. The outermost circle is the first circle; The first circle and fourth circles indicate the COG classification to which each CDS belongs; The second and the third circles indicate CDS, tRNA, and rRNA on the genome; The fifth circle represents the G+C content; The sixth circle represents the G+C skew; The innermost circle represents the scale; The middle number represents the total length of the whole genome sequence.

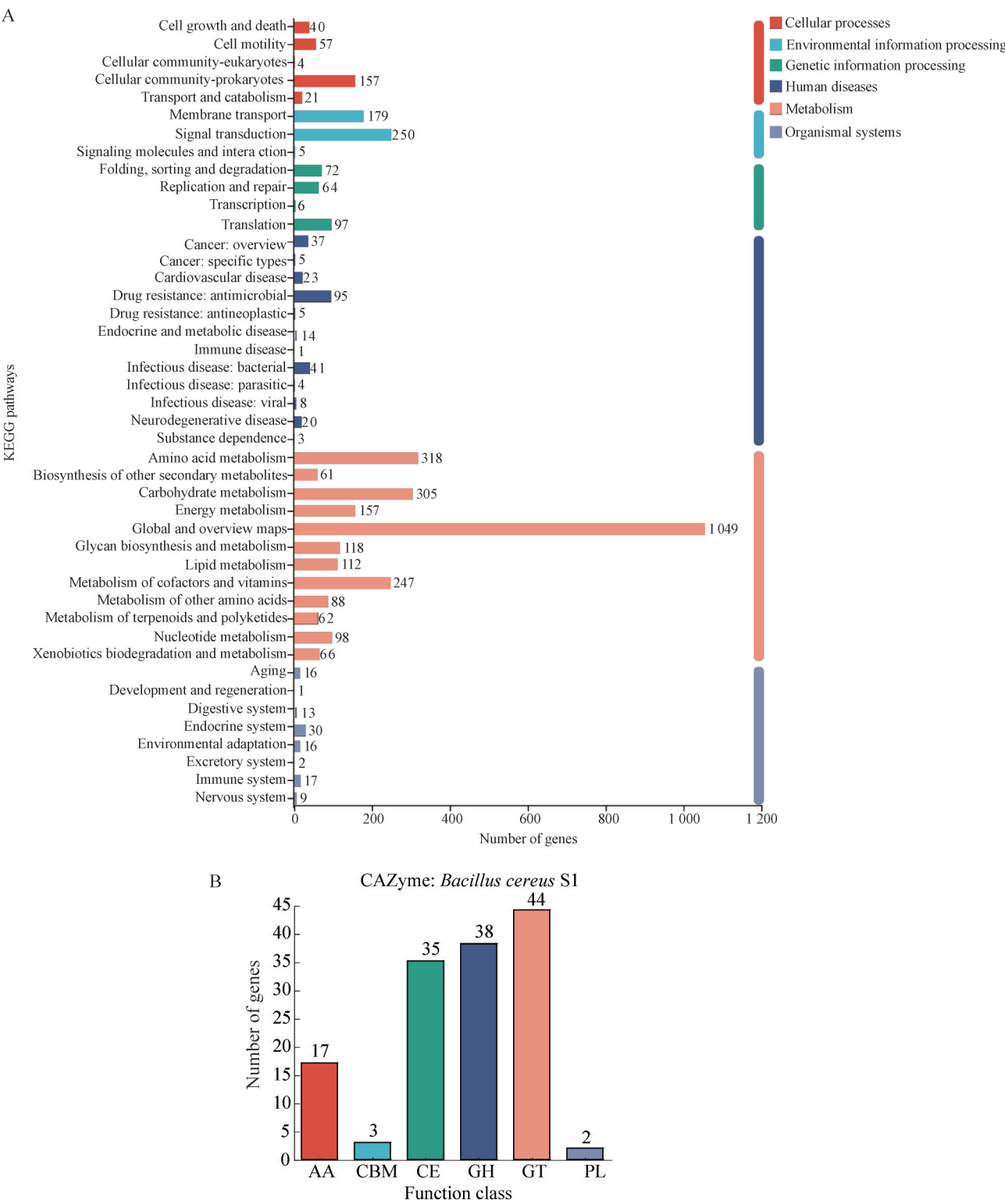


图5 基因功能注释。A: KEGG数据库比对结果; B: CAZy数据库比对结果。

Figure 5 Gene function annotation. A: Alignment results of KEGG database; B: Alignment results of the CAZy database.

通过注释结果分析,发现有 14 个基因编码碳水化合物酯酶 CE1 家族,占编码碳水化合物酯酶类基因数量的 40%。

2.6 扫描电镜

对照组中,苜蓿茎虽有轻微破裂,但各组织结构清晰可辨(图 6A);经蜡样芽孢杆菌 S1 处理后,苜蓿茎结构被严重破坏,出现裂缝和脱落,维管束结构与髓腔发生碎片化,无法对各组织进行区分,并且有大量白色物质附着在被破坏的组织上(图 6B)。

2.7 养分分析

通过对苜蓿干草养分分析发现,木质素含量在第 32 天显著低于第 0、8、16 天($P<0.05$);随着贮存时间延长,酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF)和中性洗涤纤维(neutral

detergent fiber, NDF)含量呈下降趋势,且在第 32 天显著低于第 0 天($P<0.05$)。灰分(ash)含量在第 32 天最低;粗脂肪(ether extract, EE)含量变化不显著;粗蛋白(crude protein, CP)含量在第 8、16、32 天时显著高于第 0 天($P<0.05$) (表 2)。

2.8 微生物群落变化

添加蜡样芽孢杆菌 S1 后, Shannon 指数从 0 天至第 8 天和第 32 天逐渐下降,第 32 天极显著低于第 0 天($P<0.01$) (图 7A)。与 Shannon 指数类似, ACE 指数在第 32 天显著低于第 0 天($P<0.05$) (图 7B)。

3 讨论

3.1 菌株筛选和分子鉴定

微生物分泌的降解木质素的 3 种主要胞外

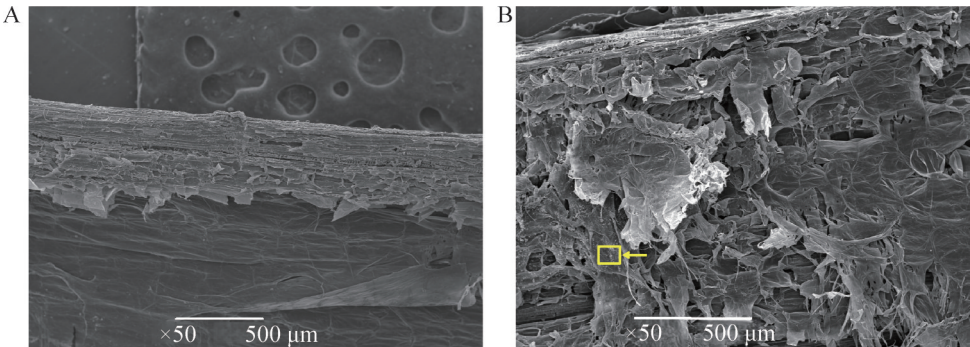


图6 苜蓿茎纵切面的扫描电镜结果。A: 对照组; B: 蜡样芽孢杆菌S1处理组。
Figure 6 SEM results of the longitudinal section of alfalfa stems. A: Control group; B: Treated with *B. cereus* S1.

表2 添加蜡样芽孢杆菌S1后的养分含量变化

天数 Day	灰分 Ash (% DM)	粗脂肪 EE (% DM)	粗蛋白 CP (% DM)	木质素 Lignin (% DM)	酸性洗涤纤维 ADF (% DM)	中性洗涤纤维 NDF (% DM)
0	9.12±0.15b	1.74±0.10	23.96±0.42d	5.45±0.34a	27.09±0.31a	34.14±1.36a
8	12.19±0.48a	1.73±0.11	28.30±0.37b	5.94±0.42a	22.63±0.25b	28.66±0.72b
16	11.68±0.44a	1.74±0.28	29.99±0.59a	5.41±0.49a	22.26±1.72b	27.83±0.94b
32	8.88±0.55b	1.74±0.12	26.54±0.30c	3.73±0.51b	20.94±0.49b	28.18±0.54b

表中数据为平均值±标准差。同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
The data in the table are mean±SD. Different lowercase letters in same column indicate significant differences ($P<0.05$).

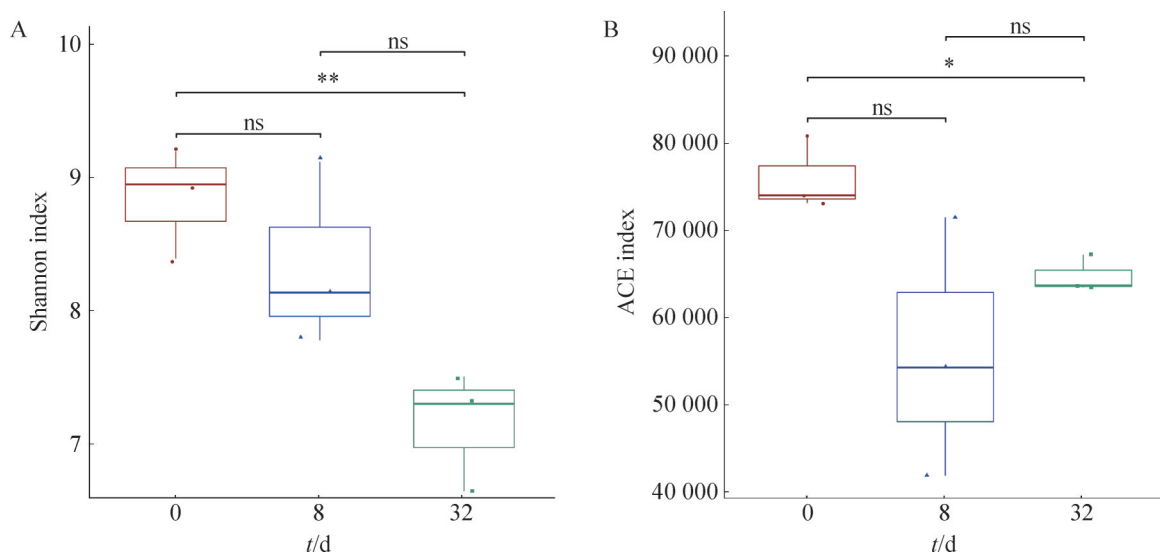


图7 微生物群落多样性。A: Shannon指数; B: ACE指数。ns: 不显著; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

Figure 7 The diversity of the microbial communities. A: Shannon index; B: ACE index. ns: Not significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

酶包括漆酶(laccase, Lac)、木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)和锰过氧化物酶(manganese peroxidase, Mnp)。这些酶可以作用于木质素结构单元间的酯键或醚键,生成小分子化合物,并进一步催化裂解苯丙烯醇间的碳碳键,从而得到更小的化合物^[23]。羧甲基纤维素酶,又称内切纤维素酶或内切- β -1,4-葡聚糖酶,是降解纤维素的关键酶之一,通过在纤维素链的无定形位点切割 β -1,4-糖苷键,释放葡萄糖、纤维素二糖和其他低聚糖,从而实现纤维素的降解^[24]。

在本研究中,通过固体培养基褪色圈和液体培养基颜色变化,表明所筛选的菌株具有木质素酶和羧甲基纤维素酶活性,但缺乏木聚糖酶活性。木聚糖酶是主要的半纤维素降解酶,由于半纤维素主要由戊糖、己糖和葡萄糖醛酸组成,含有较多短支链,相比长链纤维素更容易被水解^[25],因此本文主要研究具有降解木质素和纤维素能力的菌株。

素有“细菌化石”之称的 16S rRNA 基因编

码原核生物核糖体小亚基 rRNA (16S rRNA)。16S rRNA 基因分子生物学鉴定方法具有较高的灵敏度,通过比对菌种间 16S rRNA 基因可变区的特异性核苷酸序列,可鉴定细菌种属^[26]。在本研究中,通过 16S rRNA 鉴定,筛选菌株 S1 与 3 株菌株具有相同的序列相似性,因此无法在种水平进行准确分类鉴定。当 16S rRNA 基因高度保守、突变率低,无法用 16S rRNA 基因分子生物学对相似率极高的近缘种做进一步区分时,可进行全基因组测序^[27-28]。

3.2 酶活定量分析

在本研究中,蜡样芽孢杆菌 S1 在以苜蓿粉为唯一底物的培养基中检测到锰过氧化物酶的活性最高。Kong 等^[29]研究结果表明,锰过氧化物酶是一种能同时降解非酚类和酚类木质素的酶,而漆酶在无介质存在时仅降解酚类木质素模型化合物;并且锰过氧化物酶可分解的低分子量木质素种类多于漆酶。

Zhang 等^[30]研究表明,漆酶是混合酶反应的起始酶,随后协同木质素过氧化物酶和锰过氧

化物酶共同破坏木质素的大分子结构,破坏其关键化学键,打开苯环,并且当漆酶分别与木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶共同作用时,可提升木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶的降解效果。因此,3种胞外酶同时存在时会对木质素的降解产生协同作用,降解率最高、降解效果最好。

3.3 基因功能注释

在木质纤维素降解过程中涉及大量的碳水化合物代谢过程,例如氨基糖和核苷酸糖代谢、丙酮酸代谢、糖酵解/糖异生、淀粉和蔗糖代谢以及磷酸戊糖途径,这些过程与木质纤维素降解密切相关^[31]。这些代谢过程需要消耗大量能量,而能量代谢相关基因的大量存在表明,蜡样芽孢杆菌 S1 菌株具有降解木质纤维素的潜力,并且可以通过物质和能量的持续交换来应对外界环境。

碳水化合物活性酶在木质纤维素降解过程中起主要作用,是一类在生物体内参与碳水化合物代谢的酶。它们依次将多糖侧链和骨架水解成寡糖和单糖,对生物体内碳水化合物的降解、合成和转运起着至关重要的作用^[32-33]。

糖苷水解酶中的纤维素酶系在降解纤维素时发挥关键作用,主要包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶,这3种酶协同作用,逐步将纤维素分解为可被微生物利用的葡萄糖^[34]。

碳水化合物酯酶 CE1 家族中的阿魏酸酯酶是木质纤维素降解的重要酶,能够特异性地水解阿魏酸与多糖之间的酯键,打破半纤维素和木质素之间的连接,原本紧密的结构变得松散,从而使纤维素和半纤维素更易暴露出来,极大地促进了木质纤维素的降解^[35]。

3.4 扫描电镜

用筛选菌株蜡样芽孢杆菌 S1 处理后,苜

蓿茎结构出现严重裂缝和脱落,维管束组织遭到严重破坏。黏附在被破坏组织上的白色物质,与 Weiss 等^[36]研究观察到的结果相似,疑似为糖降解和木质素碎片凝结形成的液滴结构。

3.5 养分分析

近红外光谱是一种分子吸收光谱,主要反映含氢基团的合频和倍频振动,具有丰富的组成和结构信息^[37]。近年来,近红外光谱技术在植物养分测定领域备受关注。付趁等^[38]构建了基于近红外光谱的花生秧营养组分预测模型;郭歌^[39]建立作物籽粒主要成分和生物质灰分的近红外光谱预测模型;Mostafa 等^[40]通过近红外光谱法对饲料营养参数实时监测。

ADF 和 NDF 含量是衡量饲料适口性和消化率的重要指标,ADF 由木质素和纤维素组成,NDF 由木质素、纤维素和半纤维素组成^[41]。木质素是由高分子量芳香族聚合物的分支组成,其生物降解性较低,是限制半纤维素和纤维素与降解酶接触的关键因素^[42]。在本研究中,木质素含量在第8天后才开始逐渐下降,可能是由于木质素结构较为坚固;而 NDF 与 ADF 含量在整个阶段呈下降趋势,可能是蜡样芽孢杆菌 S1 分泌的碳水化合物活性酶发挥作用,使得苜蓿中的纤维素结构发生了降解。

粗蛋白含量是衡量饲草品质的重要指标,高含量通常意味着价值更高、品质更好^[43-44]。在本研究中粗蛋白含量的增加,可能是由于蜡样芽孢杆菌 S1 在降解木质纤维素过程中合成了大量菌体蛋白,从而提高了粗蛋白含量,这与 Zhong 等^[45]研究结果相似。

灰分反映了牧草中矿物质的总体含量,灰分含量越低,牧草品质越高^[46]。在本研究中,灰分含量在第32天最低,与其他养分变化的结果相互印证,表明添加蜡样芽孢杆菌 S1 后,苜

藎干草的品质得到了提升。张闻喜等^[47]的研究也表明,灰分的变化可能受到添加菌株所产生的代谢产物的影响。

3.6 微生物群落变化

α 多样性中的 Shannon 指数与物种多样性呈正相关,Shannon 值越大,说明群落多样性越高;ACE 指数常被用来估计群落中操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)的数目,与物种丰富度呈正相关^[48]。在本研究中,第 32 天微生物多样性和丰富度显著低于第 0 天,微生物群落结构发生变化。苏鑫等^[49]研究中,添加复合菌系后玉米秸秆微生物 α 多样性也存在差异。可能外源细菌加入后迅速占领位点,与其他微生物竞争水分和营养等,抑制了部分微生物的生长,使微生物群落结构发生变化^[50]。

4 结论

本文筛选了一株菌株 S1,该菌株能够产生木质素过氧化物酶、漆酶和锰过氧化物酶,并具有较高的锰过氧化物酶活性。通过基于全基因组的 ANI 分析判定该菌与蜡样芽孢杆菌的 ANI 值最大且大于 95%,因此将其鉴定为蜡样芽孢杆菌,并命名为 *Bacillus cereus* S1。基于全基因组与 KEGG 数据库的比对,该菌拥有大量与碳水化合物代谢和能量代谢相关的基因;与碳水化合物活性酶数据库比对后,发现有 139 个基因注释到碳水化合物活性酶。该菌作用于苜蓿茎后,破坏其结构;作用于苜蓿干草时,能够降低干草中木质纤维素的含量,提高粗蛋白含量,提升干草品质;通过 α 多样性分析表明,该菌对苜蓿干草的微生物群落产生了影响,降低了干草中微生物群落的多样性。该菌可作为木质纤维素降解的候选菌株,但其降解产物和降解机制仍有待进一步探索。

作者贡献声明

张鑫:研究构思和设计、数据收集和处理、论文撰写和修改;罗雨帆:协助实验操作、参与论文讨论;许庆方:提供技术支持、研究构思和设计、论文撰写和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 张慧芳,孔祥婕,赵淑忻,薛慧婷,李冠华.木质纤维素青贮研究现状与展望[J].粮食与饲料工业,2021(6): 53-57.
ZHANG HF, KONG XJ, ZHAO SX, XUE HT, LI GH. Recent advances and future developments for silage of lignocellulosic biomass[J]. Cereal & Feed Industry, 2021(6): 53-57 (in Chinese).
- [2] MENON V, RAO ML. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept[J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2012, 38(4): 522-550.
- [3] 张金青,陈奋奇,汪芳珍,方强恩,师尚礼.紫花苜蓿茎秆组织中木质素的分布与沉积模式[J].草业科学,2018, 35(2): 363-370.
ZHANG JQ, CHEN FQ, WANG FZ, FANG QE, SHI SL. The distribution and deposition pattern of lignin in alfalfa stem tissue[J]. Pratacultural Science, 2018, 35(2): 363-370 (in Chinese).
- [4] Van KUIJK SJA, del RÍO JC, RENCORET J, GUTIÉRREZ A, SONNENBERG ASM, BAARS JJP, HENDRIKS WH, CONE JW. Selective ligninolysis of wheat straw and wood chips by the white-rot fungus *Lentinula edodes* and its influence on *in vitro* rumen degradability[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2016, 7(1): 55.
- [5] 李彦芳.苜蓿营养价值与其分子结构和木质素含量相关性的研究[D].哈尔滨:东北农业大学硕士学位论文,2018.
LI YF. Relationship of nutrients in alfalfa with molecular structure and lignin content[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [6] 常乐钦.根瘤菌共生对紫花苜蓿(*Medicago sativa*)木质素含量及品质的影响[D].杨凌:西北农林科技大学硕士学位论文,2016.
CHANG LQ. Effect of rhizobia symbiosis on lignin levels and forage quality in alfalfa (*Medicago sativa*)[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2016 (in Chinese).
- [7] 姜立春,蒋道玉,唐邻凯,赵冬梅,卿逸,丁浦洋.油菜秸秆木质素高效降解菌的筛选、鉴定及降解效果研究[J].饲料研究,2024, 47(15): 79-86.

- JIANG LC, JIANG DY, TANG LK, ZHAO DM, QING Y, DING PY. Screening and identification of efficient lignin-degrading strain in rape straw and their degradation applications[J]. Feed Research, 2024, 47(15): 79-86 (in Chinese).
- [8] 姜超, 辛忠民, 金晓明, 巴德日胡, 杨立霞, 刘福芳, 乔鹏伟, 樊荣, 田芳, 姚宪涛, 尹嘉诚. 北部牧区寒冷苜蓿种植带 14 个苜蓿品种生产性能及养分特性评价[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2025, 51(1): 8-15.
- JIANG C, XIN ZM, JIN XM, BADE RH, YANG LF, LIU FF, QIAO PW, FAN R, TIAN F, YAO XT, YIN JC. Production and nutrient characteristics evaluation of 14 alfalfa varieties in northern pastoral region cold alfalfa planting belt[J]. Journal of Southwest Minzu University (Natural Science Edition), 2025, 51(1): 8-15.
- [9] JUNG HG, ENGELS FM. Alfalfa stem tissues: cell wall deposition, composition, and degradability[J]. Crop Science, 2002, 42(2): 524-534.
- [10] 李鑫, 李建勋, 王雨萌, 张文娟, 武山开, 宋文军. 木质纤维素的微生物法降解及其饲料化研究进展[J]. 饲料工业, 2024, 45(9): 137-144.
- LI X, LI JX, WANG YM, ZHANG WJ, WU SK, SONG WJ. Research progress on biodegradation of straw and its feed conversion[J]. Feed Industry, 2024, 45(9): 137-144 (in Chinese).
- [11] 李强, 吴晓青, 张新建. 微生物降解秸秆木质素的研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4118-4132.
- LI Q, WU XQ, ZHANG XJ. Research progress in microbial degradation of straw lignin[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4118-4132 (in Chinese).
- [12] RESHMY R, ATHIYAMAN BALAKUMARAN P, DIVAKAR K, PHILIP E, MADHAVAN A, PUGAZHENDHI A, SIROHI R, BINOD P, KUMAR AWASTHI M, SINDHU R. Microbial valorization of lignin: prospects and challenges[J]. Bioresource Technology, 2022, 344: 126240.
- [13] YANG J, ZHAO J, JIANG JC, XU H, ZHANG N, XIE JC, WEI M. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. capable of degrading alkali lignin[J]. Frontiers in Energy Research, 2021, 9: 807286.
- [14] 李言, 黎观红, 周华, 皮雄娥, 李孝辉, 付浩. 微生物发酵饲料在生猪生产中的应用[J/OL]. 中国饲料, 2024. <http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=SLGZ2024072300D&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- LI Y, LI GH, ZHOU H, PI XE, LI XH, FU H. The application of microbial fermented feed in pig production[J/OL]. China Industrial Economics, 2024. <http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=SLGZ2024072300D&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ> (in Chinese).
- [15] 才金玲, 胡秦博, 郑薇琳, 李杨偲轩, 佟彤, 时君友. 低温秸秆降解菌研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2312-2325.
- CAI JL, HU QB, ZHENG WL, LI YRX, TONG T, SHI JY. Research progress in straw-degrading psychrotrophic microorganisms[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2312-2325 (in Chinese).
- [16] CHUKWUMA OB, RAFATULLAH M, KAPOOR RT, TAJARUDIN HA, ISMAIL N, SIDDIQUI MR, ALAM M. Isolation and characterization of lignocellulolytic bacteria from municipal solid waste landfill for identification of potential hydrolytic enzyme[J]. Fermentation, 2023, 9(3): 298.
- [17] 谢长校. *Bacillus ligniniphilus* L1 降解木质素机理的初步研究[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2016.
- XIE CX. The study of lignin degradation by *Bacillus ligniniphilus* L1[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2016 (in Chinese).
- [18] 燕红, 杨谦. 一株蜡样芽孢杆菌对麦麸降解作用的研究[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2010, 27(3): 391-395, 406.
- YAN H, YANG Q. Study on the degradation of wheat bran by *Bacillus cereus*[J]. Journal of Natural Science of Heilongjiang University, 2010, 27(3): 391-395, 406 (in Chinese).
- [19] TAO JM, CHEN QS, CHEN SY, LU P, CHEN YQ, JIN JJ, LI JJ, XU YL, HE W, LONG T, DENG XH, YIN HQ, LI ZF, FAN JQ, CAO PJ. Metagenomic insight into the microbial degradation of organic compounds in fermented plant leaves[J]. Environmental Research, 2022, 214: 113902.
- [20] ZHANG W, REN XY, LEI Q, WANG L. Screening and comparison of lignin degradation microbial consortia from wooden antiques[J]. Molecules, 2021, 26(10): 2862.
- [21] KASANA RC, SALWAN R, DHAR H, DUTT S, GULATI A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine[J]. Current Microbiology, 2008, 57(5): 503-507.
- [22] 田林双. 木质素降解相关酶类测定标准方法研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(10): 13-15.
- TIAN LS. Research on standard method for determining ligninolytic enzyme activity[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2009, 30(10): 13-15 (in Chinese).
- [23] 赵丰贝. 木质素降解菌的筛选及降解机理探究[D]. 阜阳: 阜阳师范大学硕士学位论文, 2022.
- ZHAO FB. Screening and degradation pathways of lignin-degrading bacteria[D]. Fuyang: Master's Thesis of Fuyang Normal University, 2022 (in Chinese).
- [24] 董宇. 纤维素降解菌的筛选、鉴定、菌群构建及降解效果评价[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2024.
- DONG Y. Screening, identification, bacterial community construction and degradation effect evaluation of cellulose degrading bacteria[D]. Alaer: Master's Thesis of Tarim University, 2024 (in Chinese).
- [25] 黄泰富. 食用菌对玉米秸秆的生物降解研究[D]. 长春: 长春理工大学硕士学位论文, 2023.
- HUANG TF. Study on biodegradation of corn straw by edible fungi[D]. Changchun: Master's Thesis of Changchun University of Science and Technology, 2023 (in Chinese).
- [26] 李耀门. 基于 MinION 16S rDNA 全长扩增子测序的畜禽病原菌快速检测方法的建立及初步应用[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2023.
- LI YM. Development and preliminary application of a rapid detection method for livestock and poultry pathogens based on MinION 16S rDNA full-length amplicon sequencing[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2023 (in Chinese).
- [27] POIRIER S, RUÉ O, PEGUILHAN R, COEURET G,

- ZAGOREC M, CHAMPOMIER-VERGÈS MC, LOUX V, CHAILLOU S. Deciphering intra-species bacterial diversity of meat and seafood spoilage microbiota using gyrB amplicon sequencing: a comparative analysis with 16S rDNA V3-V4 amplicon sequencing[J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0204629.
- [28] 吕冰, 田祎, 杨艳娜, 甄博琨, 贾蕾, 林长缨, 张新, 黄瑛, 曲梅. 北京市一起由宋内志贺菌引起的细菌性痢疾暴发病原学分析[J]. 疾病监测, 2022, 37(1): 139-143.
- LÜ B, TIAN Y, YANG YN, ZHEN BJ, JIA L, LIN CY, ZHANG X, HUANG Y, QU M. Etiological analysis on a bacillary dysentery outbreak caused by *Shigella sonnei* in Beijing[J]. Disease Surveillance, 2022, 37(1): 139-143 (in Chinese).
- [29] KONG W, CHEN H, LYU S, MA FY, YU HB, ZHANG XY. Characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Echinodontium taxodii* 2538, and its use for the degradation of lignin-related compounds [J]. Process Biochemistry, 2016, 51(11): 1776-1783.
- [30] ZHANG ST, DONG ZJ, SHI J, YANG CR, FANG Y, CHEN G, CHEN H, TIAN CJ. Enzymatic hydrolysis of corn stover lignin by laccase, lignin peroxidase, and manganese peroxidase[J]. Bioresource Technology, 2022, 361: 127699.
- [31] 盛新和, 张智, 姬帅, 王蒙爱, 张晓彤, 孙家佳, 郑莹, 刘建生, 章圣龙. 粘质沙雷氏菌 EC-011 的全基因分析与产酶条件优化[J/OL]. 食品与发酵工业, 2024. [http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx? filename=SPFX20241017003&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ](http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=SPFX20241017003&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ).
- SHENG XH, ZHANG Z, JI S, WANG MA, ZHANG XT, SUN JJ, ZHENG Y, LIU JS, ZHANG SL. Whole gene analysis and enzyme production conditions optimization of *Serratia marcescens* EC-011[J/OL]. China Industrial Economics, 2024. [http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx? Filename=SPFX20241017003&dbname=CJFD=CJFQ](http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?Filename=SPFX20241017003&dbname=CJFD=CJFQ) (in Chinese).
- [32] RAJPUT V, SAMSON R, YADAV R, DASTAGER S, KHAIRNAR K, DHARNE M. Metagenomic mining of Indian river confluence reveal functional microbial community with lignocellulolytic potential[J]. 3 Biotech, 2022, 12(6): 132.
- [33] KATARÍNA Š, FEHÉR C, RAVN JL, BEDŮ S, BIELY P, GEIJER C. Cellulose- and xylan-degrading yeasts: enzymes, applications and biotechnological potential[J]. Biotechnology Advances, 2022, 59: 107981.
- [34] 常帅飞, 任文义, 程雨辰, 李娅楠, 何金童, 张力莉, 徐晓锋. 稻草微贮早期真菌群落演变及其木质纤维素降解酶的预测[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1614-1625.
- CHANG SF, REN WY, CHENG YC, LI YN, HE JT, ZHANG LL, XU XF. Rice straw in early stage of microbial fermentation: fungal community dynamics and lignocellulose-degrading enzymes[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1614-1625 (in Chinese).
- [35] XU ZS, WANG T, ZHANG SS. Extracellular secretion of feruloyl esterase derived from *Lactobacillus crispatus* in *Escherichia coli* and its application for ferulic acid production[J]. Bioresource Technology, 2019, 288: 121526.
- [36] WEISS B, SOUZA ACO, CONSTANCIO MTL, ALVARENGA DO, PYLRO VS, ALVES LMC, VARANI AM. Unraveling a lignocellulose-decomposing bacterial consortium from soil associated with dry sugarcane straw by genomic-centered metagenomics[J]. Microorganisms, 2021, 9(5): 995.
- [37] 陈瀑, 杨健, 褚小立, 李敬岩, 许育鹏, 刘丹. 近五年我国近红外光谱分析技术的研究与应用进展[J]. 分析化学, 2024, 52(9): 1213-1224.
- CHEN P, YANG J, CHU XL, LI JY, XU YP, LIU D. Research and application progress of near infrared spectroscopy analytical technology in China in the past five years[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2024, 52(9): 1213-1224 (in Chinese).
- [38] 付趁, 巴提玛·努尔巴合提, 马慧慧, 孙全友, 周莹, 王改利, 李绍钰, 徐彬, 王琳蕊. 基于近红外光谱的花生秧营养组分预测模型构建[J]. 动物营养学报, 2023, 35(7): 4697-4705.
- FU C, BATIMA NRBHT, MA HH, SUN QY, ZHOU Y, WANG GL, LI SY, XU Bi, WANG LY. Construction of nutrient component prediction model of peanut vines based on near infrared spectroscopy[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2023, 35(7): 4697-4705 (in Chinese).
- [39] 郭歌. 基于划分样品集合建立作物籽粒主要成分和生物质灰分近红外光谱预测模型[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2023.
- GUO G. Near infrared spectroscopic models building for predicting major crop grains components and biomass ash based on samples grouping[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [40] MOSTAFA E, TWICKLER P, SCHMITHAUSEN A, MAACK C, GHALY A, BUESCHER W. Optimisation of dry matter and nutrients in feed rations through use of a near-infrared spectroscopy system mounted on a self-propelled feed mixer[J]. Animal Production Science, 2021, 61(5): 514-524.
- [41] 王娇, 景媛媛, 蒋恒, 王昊然, 孙乐, 王思仪, 高凤芹. 复合乳酸菌对不同含水量紫花苜蓿青贮品质的影响[J]. 中国草地学报, 2024, 46(10): 144-150.
- WANG J, JING YY, JIANG H, WANG HR, SUN L, WANG SY, GAO FQ. The effect of complex lactic acid bacteria on the quality of alfalfa silage with different water content[J]. Chinese Journal of Grassland, 2024, 46(10): 144-150 (in Chinese).
- [42] EDITH AYALA-RODRÍGUEZ A, VALDÉS-RODRÍGUEZ S, ENRIQUE OLALDE-MATHIEU V, ARIAS-PADRÓ M, REYES-MORENO C, OLALDE-PORTUGAL V. Extracellular ligninases production and lignin degradation by *Paenibacillus polymyxa*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2023, 70(1): 1-10.
- [43] 张晴晴, 杜艺, 张玉林, 张志浩, 张波, 鲁艳, 曾凡江. 块茎形成期不同灌溉量对油莎豆产量和品质的影响[J]. 草地学报, 2024, 32(11): 3636-3645.
- ZHANG QQ, DU Y, ZHANG YL, ZHANG ZH, ZHANG B, LU Y, ZENG FJ. Effects of different irrigation levels on the yield and quality of the *Cyperus esculentus* L. at tuber stage[J]. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(11): 3636-3645 (in Chinese).
- [44] 李红琼, 赵永飞, 刘蒙龙, 马诗月, 李慧英. 秸秆类和秕壳类粗饲料营养成分及饲用价值的比较研究[J]. 饲料

- 工业, 2023, 44(17): 23-29.
- LI HQ, ZHAO YF, LIU ML, MA SY, LI HY. Comparative study on nutrient composition and feeding value of straw and hull roughage[J]. *Feed Industry*, 2023, 44(17): 23-29 (in Chinese).
- [45] ZHONG HM, ZHOU JY, WANG F, WU WQ, XIONG HQ, YIN HH, LI X. Isolation and identification of ligninolytic bacterium (*Bacillus cereus*) from buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen and its effects on the fermentation quality, nutrient composition, and bacterial community of rape silage[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1103652.
- [46] 孙林, 薛艳林, 贾玉山, 格根图, 张欣昕, 刘广华, 王志军, 张福金. 苜蓿干草品质评定综述[J]. *中国草地学报*, 2019, 41(4): 158-166.
- SUN L, XUE YL, JIA YS, GE GT, ZHANG XX, LIU GH, WANG ZJ, ZHANG FJ. Review of evaluation methods of alfalfa hay quality[J]. *Chinese Journal of Grassland*, 2019, 41(4): 158-166 (in Chinese).
- [47] 张喜闻, 郭晓农, 王泽兴, 王亚玲. 不同复合益生菌对藜麦秸秆发酵饲料的发酵工艺优化[J]. *浙江农业学报*, 2023, 35(12): 2818-2829.
- ZHANG XW, GUO XN, WANG ZX, WANG YL. Optimization of fermentation process of quinoa straw fermented feed with different com-pound probiotics[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2023, 35(12): 2818-2829 (in Chinese).
- [48] 何波, 胡文革, 陈雪梅, 丁成, 祁晓云. 艾比湖湿地芦苇根际黏细菌群落多样性及其时空分布特征[J]. *微生物学报*, 2024, 64(4): 1064-1080.
- HE B, HU WG, CHEN XM, DING C, QI XY. Spatial and temporal distribution characteristics and diversity of myxobacteria in the rhizosphere of *Phragmites australis* in Ebinur Lake wetland[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(4): 1064-1080 (in Chinese).
- [49] 苏鑫, 王敬红, 张方政, 刘嘉乐, 巩光禄, 欧阳晓伦, 魏丹, 赵洪颜, 宋福强, 晏磊, 王伟东. 复合菌系降解玉米秸秆过程中群落演替与秸秆降解的关系[J]. *微生物学报*, 2020, 60(12): 2675-2689.
- SU X, WANG JH, ZHANG FZ, LIU JL, GONG GL, OUYANG XL, WEI D, ZHAO HY, SONG FQ, YAN L, WANG WD. Microbial community succession associated with corn straw degradation in a bacterium consortium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(12): 2675-2689 (in Chinese).
- [50] 王捷. 苹果腐烂病生防芽孢杆菌的筛选鉴定及其防治效果初探[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2022.
- WANG J. Isolation and identification of antagonistic *Bacillus* to apple valsa canker and preliminary study on its control efficiency[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2022 (in Chinese).