



## 微生物菌群协同提高水稻秸秆转化机制的解析

崔鸿亮, 刘长莉\*, 李春雅, 宋志峰, 杨雅静, 王炎伟

东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

**摘要:** 单一微生物降解水稻秸秆效果不明显, 多种微生物组合在一起的微生物菌群能够有效降解水稻秸秆, 是当前降解秸秆类废物的首要选择。【目的】探究微生物菌群比单一菌株转化秸秆效率提高的种间协作机制, 为改善秸秆类物质的生物降解过程提供理论参考。【方法】通过菌种组合, 以水稻秸秆减重率为指标人工构建出降解效果优于单菌培养的微生物群体组合, 利用分子生物学方法对实验菌株进行鉴定, 结合纤维素酶活性、发酵产物 GC-MS 分析等指标得出水稻秸秆降解时微生物群体的种间协作机制。【结果】菌株 B (*Bacillus cereus*) 在 30 °C 培养 8 d 水稻秸秆降解率为 50.9%, 菌株 B 与菌株 D<sub>2</sub> (*Bacillus amyloliquefaciens*)、W<sub>1</sub> (*Ochrobactrum intermedium*)、G<sub>1</sub> 降解 (*Bacillus licheniformis*) 组合构成 4 株菌 BD<sub>2</sub>W<sub>1</sub>G<sub>1</sub> 的复合菌群, 在 30 °C 培养 8 d 水稻秸秆降解率为 73.3%, 比 B 单菌株分解能力提高 22.4%。发酵产物分析结果表明, 菌株 B 单独培养产生大量酸、酚等物质。B+D<sub>2</sub> 联合培养, 发酵液内酸类相对减少 87.4%, 酚类相对减少 61.9% (十五烷酸、正十六烷酸、2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚减少明显), 水稻秸秆降解率为 64.6%。当 B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub> 联合培养, 发酵液内酚类进一步减少 15.7% (6-叔丁基对甲酚减少明显), 水稻秸秆降解率为 71.0%。当 B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> 联合培养, 酚类继续减少 10.7%, 水稻秸秆降解率为 73.3%。【结论】十五烷酸、正十六烷酸、2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚等酸、酚类物质会抑制菌株 B 分解水稻秸秆的效率, 菌株 D<sub>2</sub>、W<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 能够减少包括 4 种物质在内的酸、酚类含量(酸类共减少 82.9%, 酚类共减少 88.2%), 来提高分解效率(共提升 22.4%的分解效果)。水稻秸秆成分复杂, 具有不同功能的菌种组合成复合菌剂, 减少反馈抑制形成代谢互补, 能有效提高水稻秸秆生物降解效果。

**关键词:** 水稻秸秆, 微生物降解, 菌群, 菌种功能

单一微生物降解未经过任何预处理或灭菌的水稻秸秆, 效果并不明显, 由多种微生物组合在

一起的微生物菌剂已经成为当前降解秸秆类废物的首要选择<sup>[1]</sup>。自然界中, 绝大多数微生物物种通

基金项目: 教育部扶贫专项(2572020DF02)

\*通信作者。E-mail: liuchangli@nefu.edu.cn

收稿日期: 2020-11-07; 修回日期: 2021-02-15; 网络出版日期: 2021-06-07

过相互作用而共存,甚至一些微生物只有在和某种生物体结合后才能发挥出最大效果,如产甲烷系统中氢在物种之间的转移<sup>[2]</sup>,卤代化合物的异种生物降解<sup>[3]</sup>等。显然,微生物有时会缺乏一些关键代谢途径,而其他微生物的代谢途径可能会对其进行补充<sup>[4-6]</sup>。大量研究表明,功能不同的各种菌种组合在一起分工协作是降解水稻秸秆的理想选择<sup>[7-9]</sup>,与单一培养方法(即单个菌株)降解相比,微生物群体的降解潜力更大<sup>[10-12]</sup>。Jiménez 等<sup>[13]</sup>提出的“内源性异养演替”也指出,秸秆降解时,先锋种群出现启动秸秆解构,随着代谢产物增多,利用代谢产物的物种会逐渐繁殖并进行进一步代谢。因此,在处理潜在环境波动时,混合种群将执行单个物种难以甚至不可能完成的功能<sup>[14]</sup>。这些生态学原理是木质纤维素降解微生物菌群更有效性的基础,目前正被用于设计能够有效执行一系列秸秆降解过程的微生物群体<sup>[15]</sup>。

目前,微生物群体在水稻秸秆分解过程中,菌株间如何进行协同,各菌种具体发挥什么作用,哪些代谢产物阻碍了水稻秸秆分解过程,仍然了解不够全面。为进一步了解微生物群体在分解水稻秸秆时菌种间的作用关系及各种代谢产物对水稻秸秆分解效果的影响,以能够分解水稻秸秆的好氧菌株 B (*Bacillus cereus*)为基础,采用还原筛选法与生态策略相结合的方法,利用从环境样本中获得的大量菌株与 B 进行一一组合逐个筛选,人工构建出能够显著提高水稻秸秆降解效果的微生物群体并分析其作用机理,将系统内各个菌株和代谢产物的作用逐个分析,了解微生物菌群中菌种间相关代谢特性,改善秸秆类物质的糖化过程<sup>[16-17]</sup>,为进一步提高水稻秸秆的生物降解效果提供理论参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种来源

自黑龙江省漠河市林区、哈尔滨市、五常镇采集牛粪、腐烂秸秆及秸秆下土样,取回后将不同样点的粪便和土壤混合,筛选纤维素分解菌。

### 1.2 培养基

筛选培养基(g/L): 秸秆粉/羧甲基纤维素钠/微晶纤维素/D-水杨苷 5, 酵母粉 2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, 琼脂 20。

固氮培养基(g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{FeCl}_3$  微量,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  微量, 酵母粉 0.5, 甘露醇 20, 琼脂 15, pH 7.2。

实验培养基(g/L): 水稻秸秆 8, 酵母粉 2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5。

### 1.3 接菌方式

(1) 菌培养时接种 5 mL, (2) 菌培养时每株菌各接种 2.5 mL, (3) 菌培养时每株菌各接种 1.66 mL, (4) 菌培养时每株菌各接种 1.25 mL。

### 1.4 菌株组合方法

以分解效率最高的菌株 B 为基础,根据还原筛选与生态策略相结合的方法与纤维素分解菌和固氮菌一一组配筛选,选取水稻秸秆分解率上升效果最大的菌种组合进行下一轮组配,直至分解效果微量提升或不再提升后停止组配。

### 1.5 菌株鉴定

将菌株培养至对数生长期,利用细菌 DNA 提取试剂盒(北京庄盟试剂公司),按使用说明书提取细菌基因组 DNA。以菌种总 DNA 为模板,利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC

AG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGT-3')进行 PCR 扩增。扩增后产物送交生物公司测序以获得实验菌株的 16S rRNA 序列。所得序列结果在 NCBI 中进行 BLAST 分析, 获得与该菌的 16S rRNA 序列同源性最高的已知序列, 并从 GenBank 数据库中调取相似性较高的相关菌株基因序列构建系统发育树。

## 1.6 秸秆降解量

培养样品经 6000 r/min 离心 10 min, 除去上清液后用稀酸冲洗以消除菌体, 继续离心 10 min, 70 °C 烘干后称重, 初秸秆质量与剩余秸秆质量之差为秸秆降解质量, 实验中每个样本设置 3 个重复, 取平均值。

## 1.7 纤维素酶活测定

纤维素酶的活性测定参照国际理论与应用化学联合会(IUPAC)推荐的测定纤维素酶活性方法<sup>[18-19]</sup>: 培养基内取发酵液 3 mL, 10000 r/min、离心 10 min, 取 0.5 mL 上清液, 加入到含有 1% 的微晶纤维素/D-水杨苷/CMC-Na 和 1.5 mL 柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 4.5)的试管中, 30 °C 水浴 30 min, 采用 DNS 法测定还原糖含量。实验中每个样本设置 3 个重复。以 1 h 催化纤维素水解生成 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。

## 1.8 氨氮含量测定

利用连华科技公司的水质监测仪测定培养基内氨氮含量, 实验中每个样本设置 3 个重复, 取平均值。

## 1.9 分解产物 GC-MS 分析

样品处理: 取 0.1 g 秸秆分解产物, 加 1 mL 甲醇, 充分振荡, 静置 12 h 后, 用注射器挤出汁液, 过 0.22 μm 孔径的微孔过滤器, 取 1 μL 进样测定。气质联用条件: 测定仪器及测定条件: 使用日本岛津产 QP 5050 型气质联机(GC-MS)测定。分析柱: CP-Chirasil-Dex CB 型毛细管柱(25 m×0.25 mm); 载气为氦气, 流速为 1.0 mL/min, 进样口温度 250 °C。柱温初始温度 50 °C, 保持 2 min, 以 6 °C/min 升至 280 °C、保持 10 min。分流进样, 分流比 10:1。MS: 电子能量 70 eV (EI), 电荷质量范围  $m/z$ : 40–600。扫描速度 1 scan/s。电离温度 230 °C。接口温度 250 °C<sup>[20-21]</sup>。

## 1.10 代谢产物绝对定量

按照表 1 方法配置 4 种代谢产物的标准液, 标准液进行 GC-MS 分析后建立峰面积与含量标准曲线, 以确定 4 种代谢产物的绝对含量。

表 1. 4 种代谢物标准曲线测定配比

Table 1. Four kinds of metabolites standard curve determination ratio

Number	Standard solution/%	Pentadecanoic acid/g	n-Hexadecanoic acid/g	2,4 Di-tert-butylphenol/g	6-tert-butyl-p-cresol/g	Methanol/mL
0	0	0	0	0	0	100
1	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	100
2	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	100
3	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	100
4	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	100
5	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	100

1.11 数据处理

利用 GraphPad Prism 6 软件作数据图，图表中数据为平均值±标准差，Excel 软件制作标准曲线，MEGA 5.2 软件制作系统发育树。

2 结果和分析

2.1 纤维素分解菌的分离和筛选

用 4 种不同碳源的筛选培养基分离筛选土样中纤维素分解菌，共得到 19 株细菌。用固氮培养基分离筛选土样中固氮菌，共得到 3 株细菌。筛

选材料及菌种代号如表 2 所示。

菌株筛选后对各纤维素分解菌进行水稻秸秆降解效果和纤维素酶活(AC 酶活、CB 酶活，CMC 酶活)测定，对固氮菌进行氨氮含量测量，结果如图 1 所示。实验发现，筛选出的 19 株纤维素分解菌除菌株 W<sub>2</sub> 外，都能不同程度上降解水稻秸秆，但水稻秸秆降解效率仍是菌株 B 最高，菌株 D<sub>2</sub> 的分解效果其次。纤维素酶活方面，D<sub>2</sub> 菌株的 AC 酶活为 18.97 U/mL，CB 酶活为 6.09 U/mL，为 19 株菌中最高。菌株 F<sub>1</sub> 的 CMC 酶活最高，为 13.71 U/mL。对 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 和 G<sub>3</sub> 的氨氮含量测量发现，3 株菌的

表 2. 筛选培养基碳源及菌株代号  
Table 2. Screening materials and experimental strain codes

Straw powder	Microcrystalline cellulose	D-Salicin	CMC-Na	Nitrogen fixation medium
F <sub>1</sub>	W <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>
F <sub>2</sub>	W <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	—
F <sub>3</sub>	W <sub>3</sub>	D <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	G <sub>2</sub>
F <sub>4</sub>	W <sub>4</sub>	D <sub>4</sub>	C <sub>4</sub>	—
—	W <sub>5</sub>	D <sub>5</sub>	C <sub>5</sub>	G <sub>3</sub>

—: None.

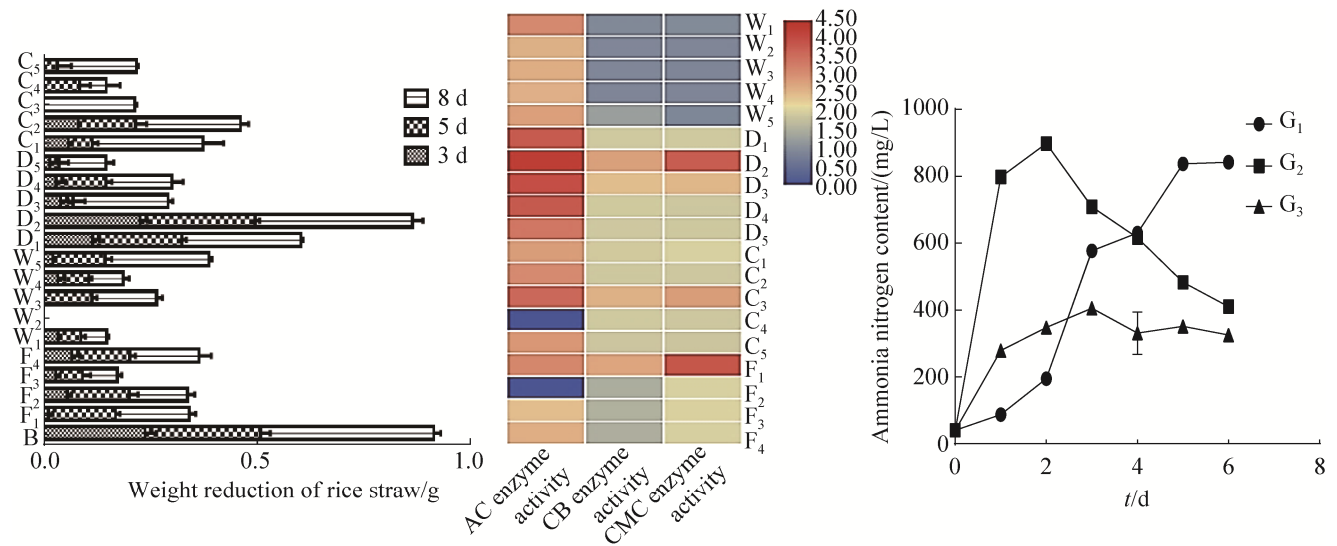


图 1. 十九株纤维素分解菌的各纤维素酶活及水稻秸秆降解率对比和 3 株固氮菌培养基中氨氮含量变化  
Figure 1. Comparison of cellulase activity and degradation rate of rice straw of 19 cellulolytic bacteria and changes of ammonia nitrogen content in 3 strains of nitrogen-fixing bacteria.

氨氮含量均有上升, 其中,  $G_1$  菌株在培养 5 d 时培养基中氨氮含量为 837.43 mg/L, 随后趋于平稳, 氨氮含量上升缓慢但后期平稳。 $G_2$  菌株在培养 2 d 时培养基中氨氮含量达到最大, 为 898.13 mg/L, 随后开始下降, 氨氮含量上升迅速下降也迅速。 $G_3$  菌株氨氮上升幅度小, 3 d 时达到 405 mg/L 后趋于平稳。说明筛选的 19 株纤维素分解菌具有分解纤维素能力, 3 株固氮菌也都具有固氮能力。

## 2.2 人工构建水稻秸秆降解菌群

实验筛选出 19 株纤维素分解菌与 3 株固氮菌, 与菌株 B 组合, 根据组合后分解水稻秸秆能力确定最佳菌株, 结果如图 2 所示。菌株 B 单独培养 3、5、8 d 秸秆减重率分别为 29.9%、34.0%、50.9%。菌株 B+ $D_2$  组合培养 3、5、8 d 秸秆减重率分别为 41.0%、47.9%、64.6%, 说明菌株  $D_2$  能够促进 B 分解秸秆能力的提升。菌株 B+ $D_2$ + $W_1$

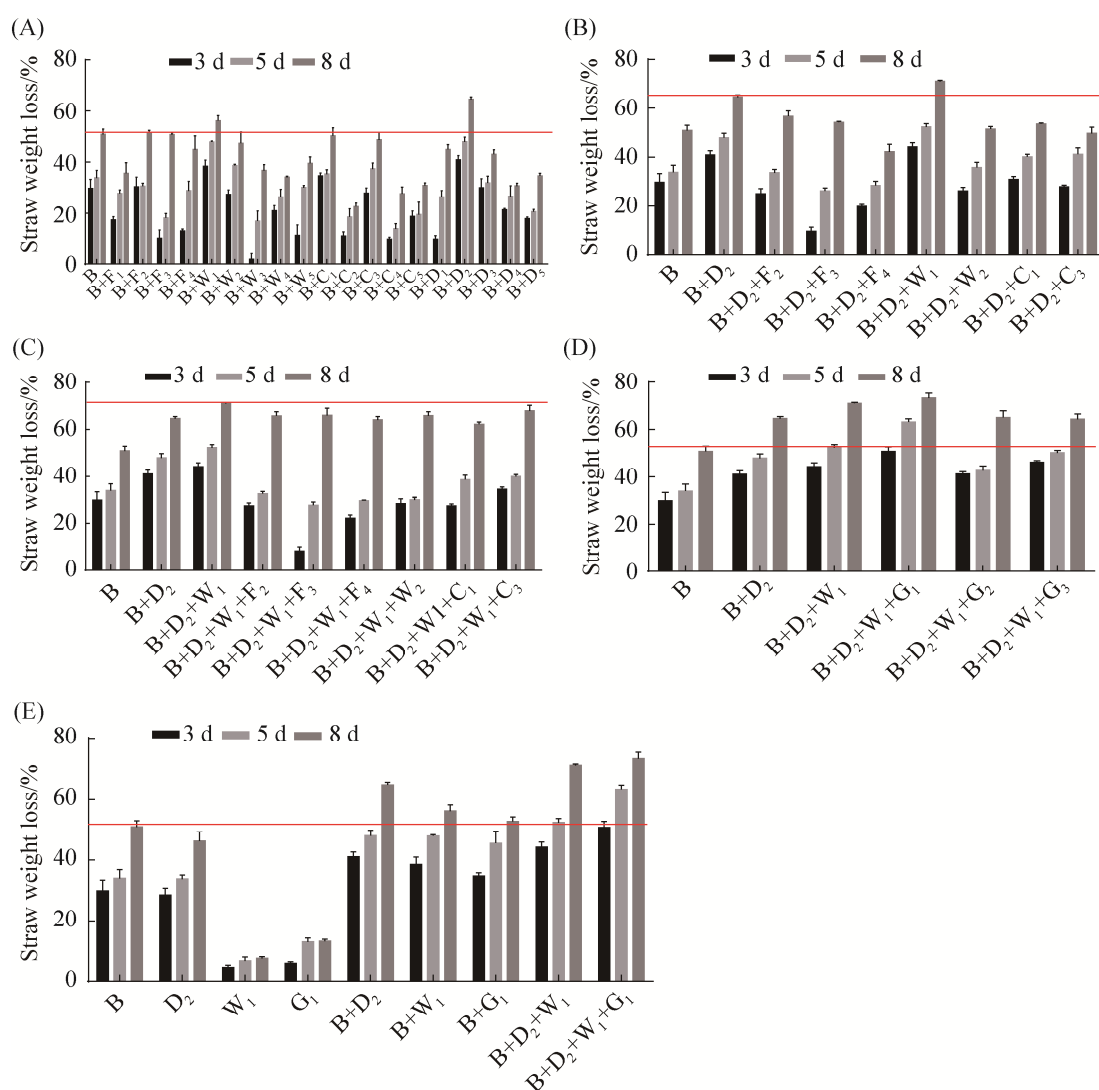


图 2. 人工组合菌群过程(A、B、C、D)和最终组合结果(E)

Figure 2. The process of artificial combination of flora (A, B, C, D) and the final combination result (E).

混合培养 3、5、8 d 秸秆减重率分别为 44.3%、52.4%、71.0%，分解秸秆的能力比 B 单独培养和 B+D<sub>2</sub> 组合培养均有显著提升，说明菌株 W<sub>1</sub> 能有效促进 B+D<sub>2</sub> 组合秸秆转化。与 G<sub>1</sub> 菌组合形成 B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> 组合时，8 d 时秸秆分解率为 73.3%，说明菌株 G<sub>1</sub> 能促进 B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub> 组合提升水稻秸秆降解效果，但是菌株 G<sub>1</sub> 的作用贡献度要小于菌株 D<sub>2</sub> 和 W<sub>1</sub>。需要注意的是，B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> 组合中培养 5 d 时分解效果相对 B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub> 组提升明显，水稻秸秆在 5 d 和 8 d 时的分解量更为接近图 2-D，说明 G<sub>1</sub> 菌的加入某种程度上缩短了秸秆分解的周期。

### 2.3 菌株分类地位确定鉴定

实验菌株 B、D<sub>2</sub>、W<sub>1</sub> 和 G<sub>1</sub> 进行 16S rRNA 提取、测序。将所得测序序列分别命名为 HLB、HLD、HLW、HLG 后上传至 GenBank，获取登录号分别为 MW131641、MW131625、MW131626、MW131624。所得序列利用 BLAST 程序进行比对，选择高同源性序列，用 MEGA 5.2 软件从 GenBank 数据库中调取相似性较高的相关菌株基因序列构建系统发育树，实验结果如图 3 所示，实验菌株 B、D<sub>2</sub>、W<sub>1</sub> 和 G<sub>1</sub> 的近缘种分别是 *B. cereus*、*B. amyloliquefaciens*、*O. intermedium* 和 *B. licheniformis*。

### 2.4 菌种组合后纤维素酶活性与固氮效果探究

纤维素酶是秸秆类物质生物降解的重要条件，实验定期测定与木质纤维素分解相关的 3 种纤维素酶活。B 菌株单独培养时 AC、CB、CMC 的酶活均在第 4 天达到最大，分别为 51.98、43.71、50.86 U/mL。在第 8 天时，AC、CB、CMC 酶活分别下降至 28.20、23.87、29.05 U/mL。而组合 B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> 的 AC、CB、CMC 酶活最高值分别为 17.70、9.41、16.90 U/mL，8 d 时 AC、CB、CMC 三种酶活稳定至 15.03、6.38、14.98 U/mL。菌株

B 纤维素酶活性高，D<sub>2</sub>、W<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 三株菌加入后，纤维素酶活明显被稀释减小，但并没有完全稀释消失，说明菌株 D<sub>2</sub>、W<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 的纤维素酶活较小，加入后纤维素酶活也没有出现协同增加现象，是其他方面的原因导致水稻秸秆降解率增加(图 4)。

氮源是微生物生长的重要营养物质，所以本实验向微生物群体中添加固氮菌 G<sub>1</sub> 并检测氨氮含量变化，以期通过增加培养基中的营养元素来增加水稻秸秆的分解效率。实验结果如图 5 所示，B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> 组在 0–4 d 增加迅速，4–8 d 与 B 菌株单独培养时并无太大区别。G<sub>1</sub> 加入后，整个群体氨氮含量增加不明显，并没有像预期一样表现出明显的固氮能力，结合 B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> 组在培养 8 d 时整体的水稻秸秆分解效果仅仅提升 2.3%，提升效果小，所以，此微生物菌群对水稻秸秆的转化率高与系统内氨氮源含量多少无关。

### 2.5 秸秆分解产物 GC-MS 分析结果

实验选取对照组(CK)、B 菌株单独培养 8 d、B+D<sub>2</sub> 组合培养 8 d、B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub> 组合培养 8 d、B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> 组合培养 8 d 的秸秆分解产物进行 GC-MS 分析。经 GC-MS 检测发现，发酵产物主要为酯、酸、烯、烷、醇、酚 6 类。计算各菌剂组合与未接菌 CK 峰面积结果如图 6 所示，B 菌株单独培养 8 d 时，出现大量的酸、酚类物质。B+D<sub>2</sub> 菌群比 B 菌株单独培养时，酸类减少 87.4%，酚类减少 61.9%。B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub> 组合比 B+D<sub>2</sub> 组合酚类减少 41.1%。B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> 组合中酚类继续减少，减少程度不如 B+D<sub>2</sub> 和 B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub> 组。结合每株菌加入后水稻秸秆降解效率的提升程度(图 2)，表明水稻秸秆降解效率的提升程度可能与系统内酸、酚类的含量负相关。

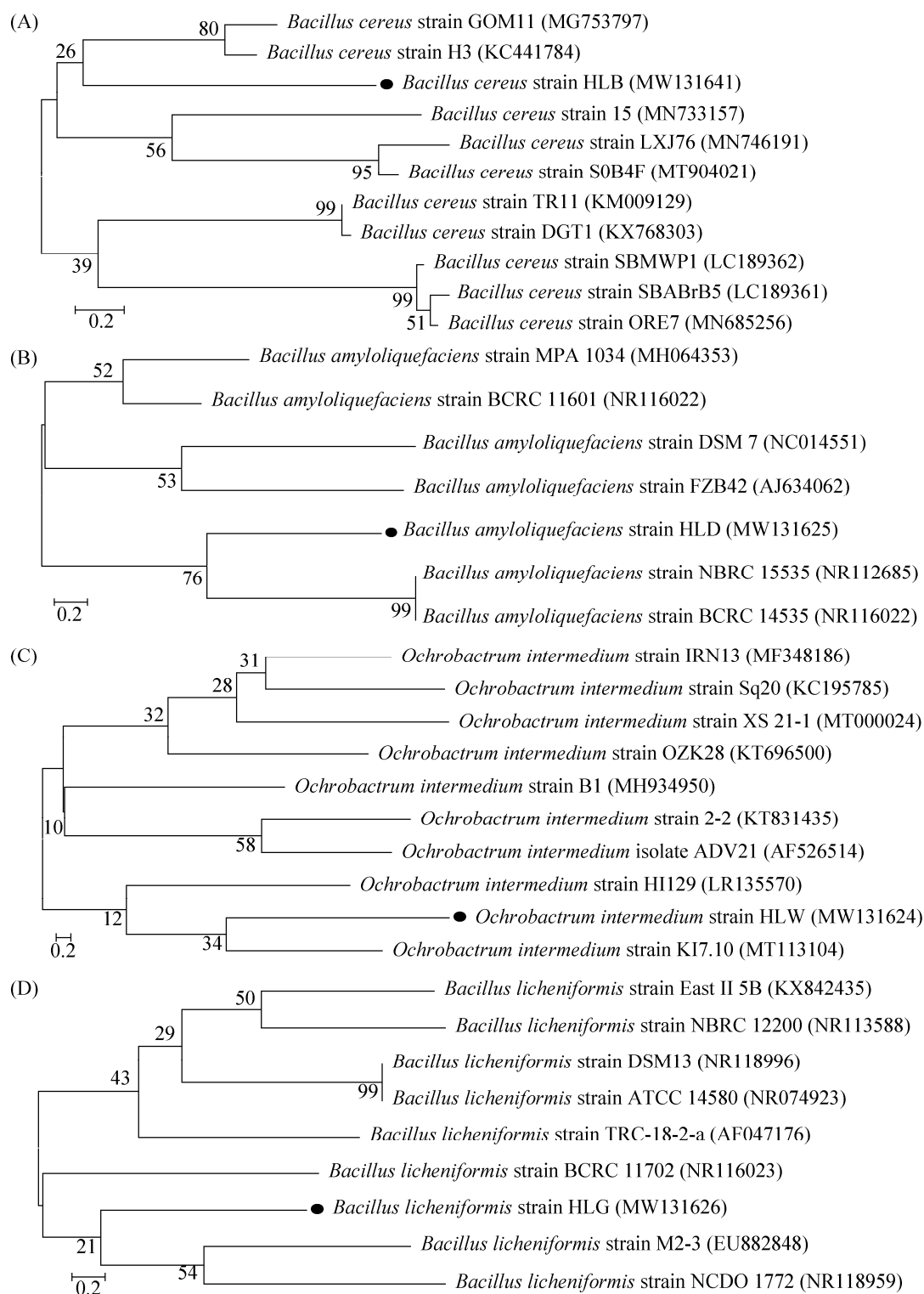


图 3. 木质纤维素组合 B (A)、D<sub>2</sub> (B)、W<sub>1</sub> (C)、G<sub>1</sub> (D) 菌株系统发育分析树

Figure 3. Phylogenetic tree of B (A), D<sub>2</sub> (B), W<sub>1</sub> (C) and G<sub>1</sub> (D). The GenBank accession numbers are given in parentheses. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar 0.2 at the bottom is the sequence divergence.

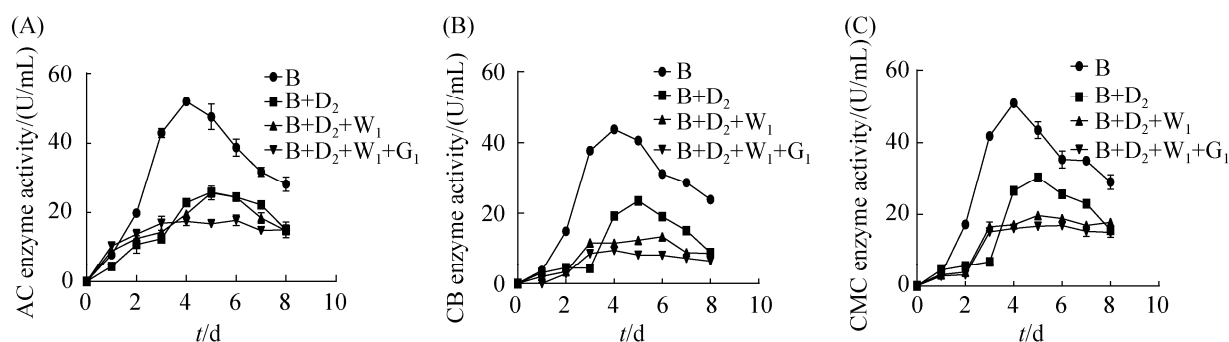


图 4. 各组合培养时纤维素酶活变化情况

Figure 4. Changes of cellulase activity in each group during culture. A: AC enzyme activity; B: CB enzyme activity; C: CMC enzyme activity.

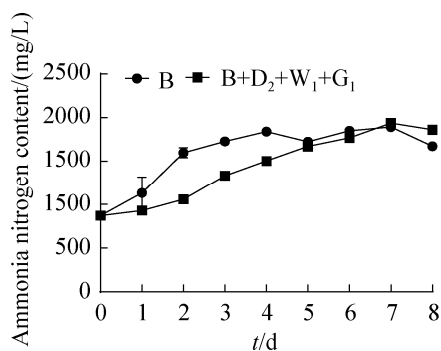


图 5. B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub>组与B单独培养氨氮含量变化情况  
Figure 5. Changes of ammonia nitrogen content in B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> group and B alone culture.

进一步分析发现, B 菌株单独培养时增加的酸类物质主要包括十五烷酸和正十六烷酸, 酚类

物质主要包括 2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚。B+D<sub>2</sub> 组合培养时减少的酸类物质主要为十五烷酸和正十六烷酸, 减少的酚类物质主要为 2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚, 说明 D<sub>2</sub> 菌株具有减少系统中十五烷酸、正十六烷酸、2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚含量的功能。B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub> 组合培养时进一步减少的酚类物质主要为 6-叔丁基对甲酚, 此外十五烷酸含量也进一步减少, 说明 W<sub>1</sub> 菌株可能具有减少系统中 6-叔丁基对甲酚和十五烷酸含量的功能。B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> 组合培养时 6-叔丁基对甲酚再一次减少, 说明 G<sub>1</sub> 菌株也可能具有减少系统中 6-叔丁基对甲酚含量的功能, 减少程度不如 W<sub>1</sub> 菌株(图 7)。

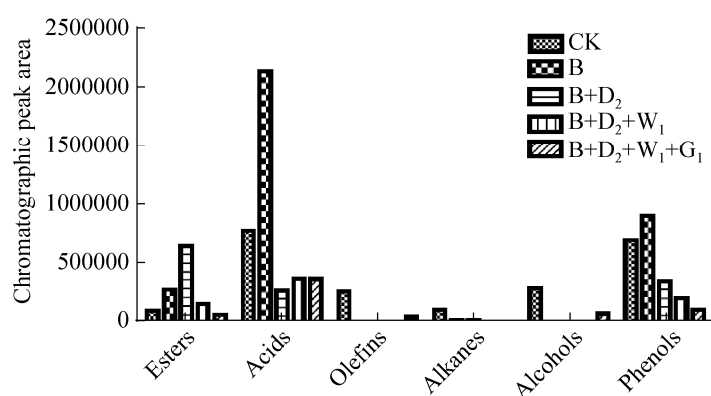


图 6. 不同组合中代谢产物成分比较

Figure 6. Comparison of components of metabolites in different combinations.



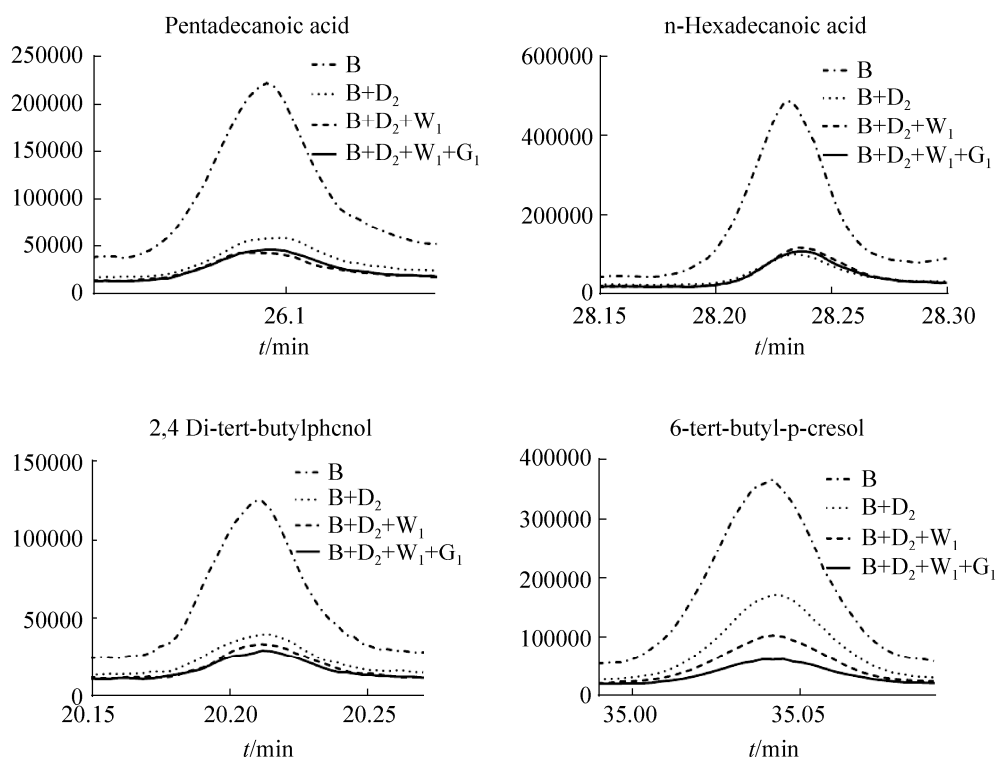


图 7. 含量变化明显的代谢产物的峰图

Figure 7. Peak area graph of metabolites with obvious changes in content.

根据标准曲线(图 8)将菌株 B 单独培养时十五烷酸、正十六烷酸、2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚(表 3)的峰面积换算成绝对含量。结果表明, 菌株 B 单独培养 8 d 时十五烷酸含量为 0.00586%, 100 mL 发酵液中纯质量为 5.86 mg。正十六烷酸含量为 0.00733%, 100 mL 发酵液中纯质量为 7.33 mg。2,4 二叔丁基酚含量为 0.00028%, 100 mL 发酵液中纯质量为 0.28 mg。6-叔丁基对甲酚含量为 0.00137%, 100 mL 发酵液中纯质量为 1.37 mg。

## 2.6 分解产物抑制效果

根据绝对定量实验结果, 将菌株 B 放入单独含不同浓度梯度的十五烷酸、正十六烷酸、2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚 4 种物质的培养基中

进行培养, 观察菌株 B 对水稻秸秆降解效率的变化, 结果如图 9 所示。实验发现十五烷酸、正十六烷酸、2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚 4 种物质对菌株 B 的水稻秸秆降解效率具有抑制作用, 抑制作用大小: 正十六烷酸 > 2,4 二叔丁基酚 > 十五烷酸 > 6-叔丁基对甲酚。培养基中加入与菌株 B 单独培养 8 d 时产生量相近的 6 mg 十五烷酸、8 mg 正十六烷酸、3 mg 2,4 二叔丁基酚和 2 mg 6-叔丁基对甲酚后, 分别产生 1.66%、17.53%、4.27%、3.35% 的抑制效果。实验证明, 十五烷酸、正十六烷酸、2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚 4 种物质对菌株 B 的水稻秸秆降解效率确实具有抑制作用, 菌种组合后水稻秸秆的分解效果提升的部分原因是外加菌株解除了部分抑制物的影响。

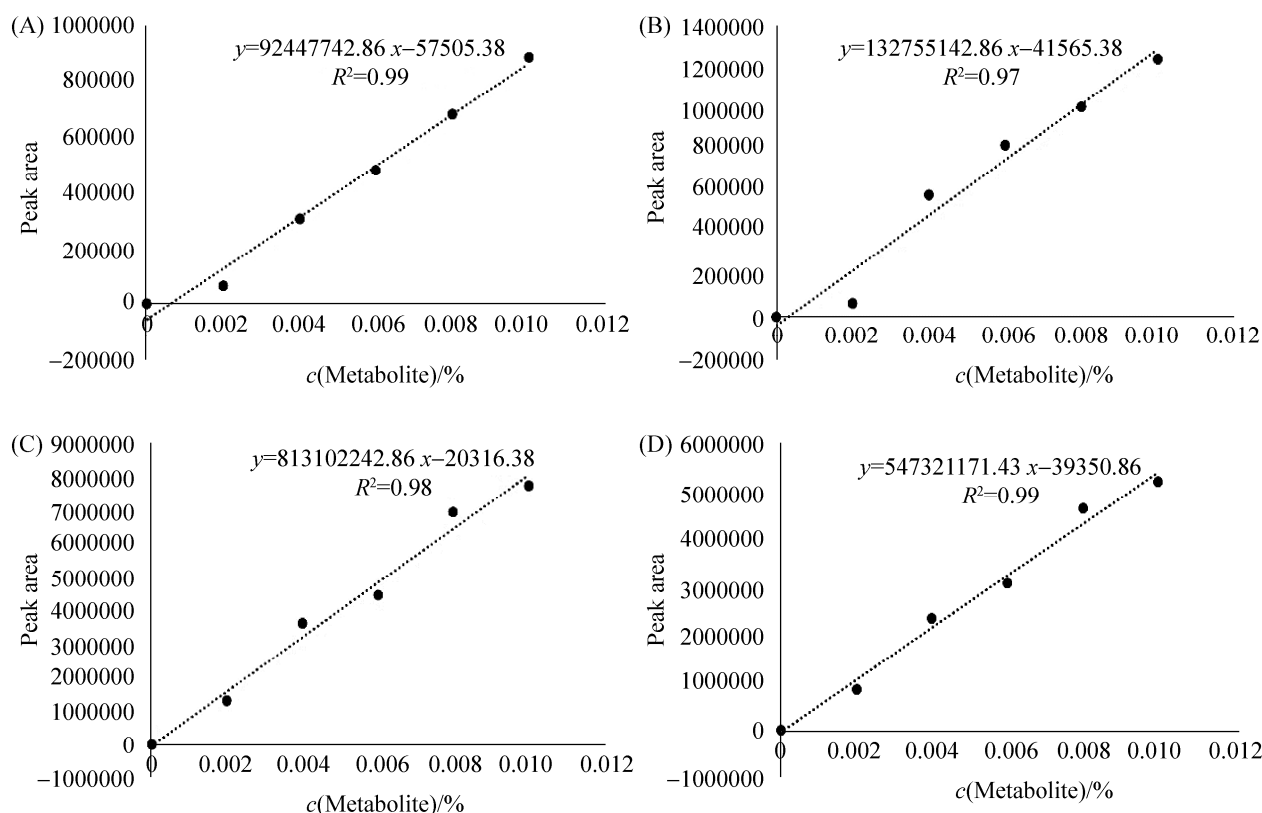


图 8. 4 种代谢产物的峰面积与含量标准曲线

Figure 8. Standard curve of peak area and content of 4 metabolites. A: Pentadecanoic acid; B: n-Hexadecanoic acid; C: 2,4 Di-tert-butylphenol; D: 6-tert-butyl-p-cresol.

表 3. 含量变化明显的代谢产物的峰面积

Table 3. Peak area of metabolites with obvious changes in content

Rt	Name	Mf	Peak area				
			CK	B	B+D <sub>2</sub>	B+D <sub>2</sub> +W <sub>1</sub>	B+D <sub>2</sub> +W <sub>1</sub> +G <sub>1</sub>
25.9	Pentadecanoic acid	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	—	484388	100158	59111	—
28.2	n-Hexadecanoic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	72250	931146	157170	203518	196725
20.2	Phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	29238	209155	53292	41179	37101
35.0	Phenol,2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	112151	709345	296976	164990	80914

Rt: retention time; Mf: molecular formula; CK: control check; Phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-: 2,4 Di-tert-butylphenol; Phenol,2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-: 6-tert-butyl-p-cresol. —: None.

### 3 讨论

*B. cereus* 分布广泛, 常存在于腐烂的有机物、土壤、食物、淡水和海水以及无脊椎动物的肠道中<sup>[22]</sup>, 可生物合成多种水解酶, 很早就已用于生物技术应用等领域<sup>[23]</sup>。*B. cereus* 代谢会产生大量

酸, Eder 等<sup>[24]</sup>利用这一特性增加发酵氢气产量。Patel 等<sup>[25]</sup>的研究也同样利用 *B. cereus* 产酸发酵。有机酸产生会使 pH 值降低, 影响微生物生长和代谢<sup>[26]</sup>。同时, Low 等<sup>[27]</sup>发现木质纤维素降解时主要由酚类单元中  $\alpha$ -和  $\beta$ -醚键断裂以及非酚类单元中  $\beta$ -醚键断裂, 所以水稻秸秆降解时系统内酚类

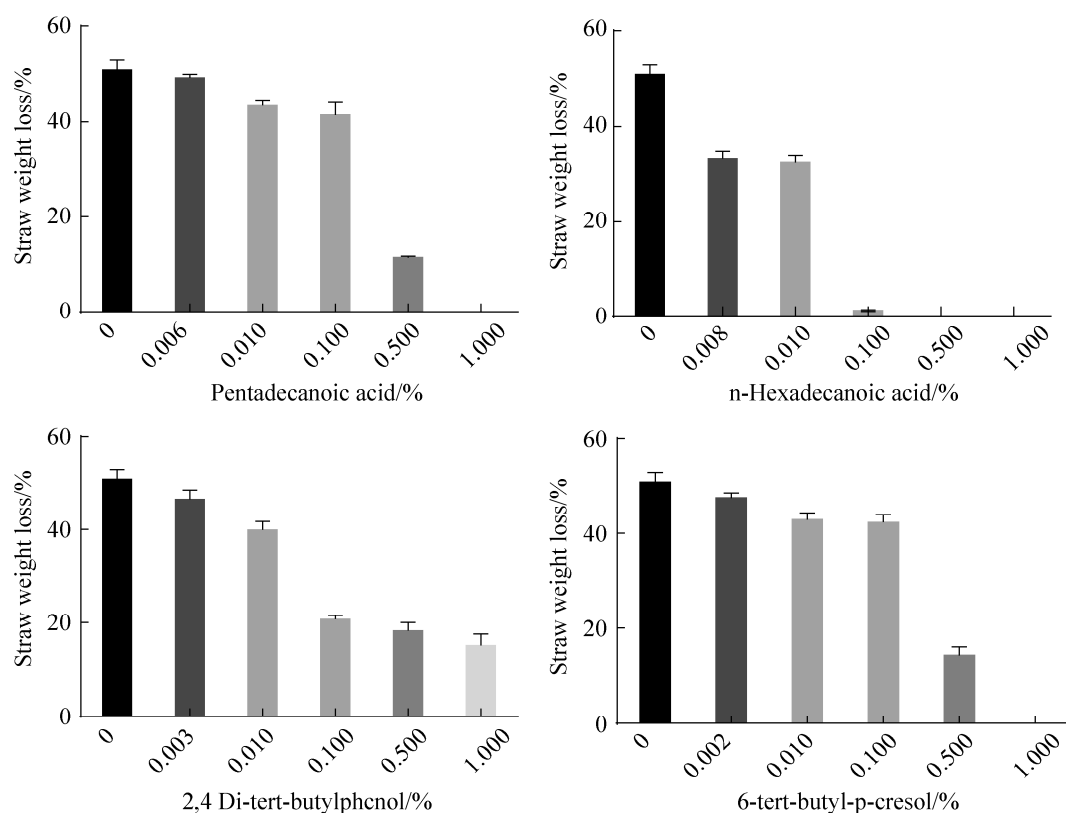


图 9. 不同代谢产物对分解水稻秸秆的抑制效果

Figure 9. Inhibitory effects of different metabolites on decomposition of rice straw.

物质会增加。酚类化合物在低浓度下会插入细菌膜的磷脂层, 干扰脂酰链之间的范德华作用, 使磷脂和膜的完整性受到破坏, 对微生物具有毒性作用<sup>[28-30]</sup>。本实验中菌株 B (*B. cereus*) 单独培养降解水稻秸秆时, 同样出现了大量酸类和酚类物质, 这两类物质是阻碍水稻秸秆进一步生物降解的关键。*B. amyloliquefaciens* 对不同有机酸具有趋化性反应<sup>[31]</sup>。Yuan 等<sup>[32]</sup>研究发现, *B. amyloliquefaciens* 生长过程中会吸收环境中的酚酸类物质, Hui 等<sup>[33]</sup>也研究表示 *B. amyloliquefaciens* 产生的生物膜具有吸附亚硝酸盐的能力, 且 Mei 等的研究表示 *B. amyloliquefaciens* 具有降解水稻秸秆的功能<sup>[34]</sup>, 这与本实验的 D<sub>2</sub> (*B. amyloliquefaciens*) 菌株类似, 当

D<sub>2</sub> 加入后, 培养基酚酸类物质减少明显, 秸秆降解效果增加。WAEL S. 等从富含苯酚的活性污泥中分离出一株以苯酚为唯一碳源的 *O. intermedium*, 该菌株苯酚降解率较高<sup>[35]</sup>。本实验所用的菌株 W<sub>1</sub> (*O. intermedium*) 能够减少系统内 41.1% 的酚类, 对酚类物质也具有去除作用。

Eiteman 等<sup>[10]</sup>利用一株大肠杆菌 ZSC113 (不能消耗木糖) 和另一株大肠杆菌 ALS1008 (不能消耗葡萄糖) 混合培养, 获得了能高效发酵糖类的微生物群体。Szambelan 等<sup>[12]</sup>将 *Kluyveromyces fragilis* 与 *Saccharomyces cerevisiae* 或者 *Zymomonas mobilis* 一起发酵, 通过菌株间的协同作用使产氢量提高 12%。本实验结果和机制与此相同, 培养

系统中各菌株通过种间互助和代谢互补来提高水稻秸秆的分解效率。秸秆降解过程中, 构建的微生物组合中 B 菌株(*B. cereus*)与 Aiya<sup>[36]</sup>筛选出的 *B. cereus* JD 0404 性状相似, 能够分泌高活性的纤维素酶, 这些酶可以水解木质纤维素并将其溶解为基本单体, 以供其他微生物进一步代谢<sup>[37-38]</sup>, 培养基中每添加一次新菌种, 三种纤维素酶活都会被不同程度稀释下降, 菌株 B 具有较高酶活性是组合菌群降解水稻秸秆的基础, 在整个体系中发挥着降解水稻秸秆的主要角色。菌株 B 在分解水稻秸秆后产生了大量的酸类(十五烷酸、正十六烷酸)、酚类(2,4 二叔丁基酚、6-叔丁基对甲酚)物质, 菌株 B 不具有或不擅长降解这些酸、酚类物质的酶或代谢通路, 所以此类产物逐渐积累致使菌株 B 的水稻秸秆降解率下降, 添加菌株 D<sub>2</sub> (*B. amyloliquefaciens*)后发酵液中挥发性酸类减少 87.4%, 酚类减少 61.9%, 其中十五烷酸、正十六烷酸、2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚等酚、酸类物质减少明显, 秸秆降解效果得到第一次增加。菌株 W<sub>1</sub> (*O. intermedium*)能够减少系统内 41.1% 的酚类, 对十五烷酸和 6-叔丁基对甲酚去除率也比较明显, 秸秆降解效果得到第二次增加, W<sub>1</sub> 菌株的水稻秸秆降解效率和酚、酸类物质的去除性能都不如菌株 D<sub>2</sub>, 所以菌株 W<sub>1</sub> 加入后秸秆分解效率不如菌株 D<sub>2</sub> 加入时增加的多。菌株 G<sub>1</sub> (*B. licheniformis*)接种至培养基后对整体的水稻秸秆分解效果提升不大, 仅仅提升 2.3%, 这与菌株 G<sub>1</sub> 对酚、酸类物质去除能力小有关。但是菌株 G<sub>1</sub> 能提高中期(5 d)水稻秸秆的分解效率, 具有一定缩短分解周期的作用, Liu 等<sup>[39]</sup>研究中表示 *B. licheniformis* 能产生表面活性剂, 对 pH、温度和盐度具有良好的稳定性, 表面活性剂存在时, 疏

水性物质在水中表面积增加, 导致水溶性, 从而增加微生物降解<sup>[40]</sup>, 菌株 G<sub>1</sub> 的具体作用功能可能与此有关, 具体原因还待进一步研究。

## 4 结论

(1) 成功构建出以菌株 B (*Bacillus cereus*)、D<sub>2</sub> (*Bacillus amyloliquefaciens*), W<sub>1</sub> (*Ochrobactrum intermedium*)和 G<sub>1</sub> (*Bacillus licheniformis*)组成的能够在 30 °C 培养 8 d 降解 73.21% 水稻秸秆的 4 菌微生物群体。

(2) 微生物群体比单体对水稻秸秆转化效率高主要由于分解水稻秸秆时产生的代谢产物的反馈抑制, 菌株 B (*B. cereus*)单独接种到以水稻秸秆为唯一碳源的培养基时, 发酵液中检测到大量的酸、酚类物质, 其中酸类物质主要包括十五烷酸和正十六烷酸等, 酚类物质主要包括 2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚。高浓度的酸类和酚类物质对水稻秸秆降解过程起抑制作用, 减少两类物质的含量可以提高菌株 B 的水稻秸秆分解效果。菌株 D<sub>2</sub> (*B. amyloliquefaciens*)能够有效减少系统内酸类和酚类的含量以提升水稻秸秆分解效果, 对正十六烷酸、2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚减少作用明显。菌株 W<sub>1</sub> (*O. intermedium*)也能够有效减少系统内酸类和酚类的含量以提升水稻秸秆分解效果, 对十五烷酸、正十六烷酸、2,4 二叔丁基酚和 6-叔丁基对甲酚也具有减少作用, 作用程度不如菌株 D<sub>2</sub>。

(3) 水稻秸秆成分复杂, 单一菌种与多菌种组合合成的菌剂相比, 单一菌种降解效率不高, 具有不同功能的菌种组合成复合菌剂可减少反馈抑制形成代谢互补, 能有效提高水稻秸秆生物降解效果。

## 参考文献

- [1] Wang CF, Ma SC, Huang Y, Liu LY, Fan H, Deng Y. Characterization and microbial community shifts of rice strawdegrading microbial consortia. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(12): 1856–1868. (in Chinese)  
王春芳, 马诗淳, 黄艳, 刘来雁, 凡慧, 邓宇. 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.
- [2] Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(2): 262–280.
- [3] Wolfaardt GM, Lawrence JR, Roberts RD, Caldwell DE. The role of interactions, sessile growth and nutrient amendments on the degradative efficiency of a microbial consortium. *Canadian Journal of Microbiology*, 1994, 40(5): 331–340.
- [4] Mikesková H, Novotný Č, Svobodová K. Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(4): 861–870.
- [5] Abreu NA, Taga ME. Decoding molecular interactions in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(5): 648–663.
- [6] Ghosh S, Chowdhury R, Bhattacharya P. Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(10): 4283–4295.
- [7] Weimer PJ, Zeikus JG. Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 33(2): 289–297.
- [8] Pohlschroeder M, Leschine SB, Canale-Parola E. *Spirochaeta caldaria* sp. nov., a thermophilic bacterium that enhances cellulose degradation by *Clostridium thermocellum*. *Archives of Microbiology*, 1994, 161(1): 17–24.
- [9] Ng TK, Ben-Bassat A, Zeikus JG. Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 41(6): 1337–1343.
- [10] Eiteman MA, Lee SA, Altman E. A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively. *Journal of Biological Engineering*, 2008, 2: 3.
- [11] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(3): 506–577.
- [12] Szambelan K, Nowak J, Czarnecki Z. Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(10): 845–848.
- [13] Jiménez DJ, Dini-Andreote F, DeAngelis KM, Singer SW, Salles JF, van Elsas JD. Ecological insights into the dynamics of plant biomass-degrading microbial consortia. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(10): 788–796.
- [14] Brenner K, You LC, Arnold FH. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(9): 483–489.
- [15] Mee MT, Wang HH. Engineering ecosystems and synthetic ecologies. *Molecular BioSystems*, 2012, 8(10): 2470.
- [16] Evans R, Alessi AM, Bird S, Mcqueen-Mason SJ, Bruce NC, Brockhurst MA. Defining the functional traits that drive bacterial decomposer community productivity. *The ISME Journal*, 2017, 11(7): 1680–1687.
- [17] Wang AJ, Gao LF, Ren NQ, Xu JF, Liu C, Lee DJ. Enrichment strategy to select functional consortium from mixed cultures: Consortium from rumen liquor for simultaneous cellulose degradation and hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35(24): 13413–13418.
- [18] Wang WD, Wang XF, Liu CL, Li YH, Lü YC, Cui ZJ. Productions analyses and pH dynamics during rice straw degradation by the lignocellulose degradation bacteria system WSC-6. *Environmental Science*, 2008, 29(1): 219–224. (in Chinese)  
王伟东, 王小芬, 刘长莉, 李玉花, 吕育财, 崔宗均. 木质纤维素分解菌复合系 WSC-6 分解稻秆过程中的产物及 pH 动态. *环境科学*, 2008, 29(1): 219–224.
- [19] Sadana JC, Patil RV. Synergism between enzymes of *Sclerotium rolfsii* involved in the solubilization of crystalline cellulose. *Carbohydrate Research*, 1985, 140(1): 111–120.
- [20] Rouches E, Dignac MF, Zhou SM, Carrere H. Pyrolysis-GC-MS to assess the fungal pretreatment efficiency for wheat straw anaerobic digestion. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2017, 123: 409–418.

- [21] Chen DY, Wang Y, Liu YX, Cen KH, Cao XB, Ma ZQ, Li YJ. Comparative study on the pyrolysis behaviors of rice straw under different washing pretreatments of water, acid solution, and aqueous phase bio-oil by using TG-FTIR and Py-GC/MS. *Fuel*, 2019, 252: 1–9.
- [22] Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, 23(2): 382–398.
- [23] Laba W, Kopeć W, Chorążyk D, Kancelista A, Piegza M, Malik K. Biodegradation of pretreated pig bristles by *Bacillus cereus* B5esz. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 100: 116–123.
- [24] Eder AS, Magrini FE, Spengler A, da Silva JT, Beal LL, Paesi S. Comparison of hydrogen and volatile fatty acid production by *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterobacter aerogenes* singly, in co-cultures or in the bioaugmentation of microbial consortium from sugarcane vinasse. *Environmental Technology & Innovation*, 2020, 18: 100638.
- [25] Patel SKS, Singh M, Kalia VC. Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of *Bacillus* spp. from glucose in two stage system. *Indian Journal of Microbiology*, 2011, 51(4): 418–423.
- [26] Nakasaki K, Araya S, Mimoto H. Inoculation of *Pichia kudriavzevii* RB1 degrades the organic acids present in raw compost material and accelerates composting. *Bioresource Technology*, 2013, 144: 521–528.
- [27] Low JC, Halis R, Shah UKM, Paridah MT, Abood F, Tuhaila T, Danial MI, Lakarim L, Razali N. Enhancing enzymatic digestibility of alkaline pretreated banana pseudostem for sugar production. *BioResources*, 2015, 10(1): 1213–1223.
- [28] Kumar H, Mohanty K. Kinetic modelling of phenol biodegradation by mixed microbial culture in static batch mode. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, 2012, 9(3): 19–24.
- [29] Liu YJ, Zhang AN, Wang XC. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 44(2/3): 187–192.
- [30] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94(3): 223–253.
- [31] Tan SY, Yang CL, Mei XL, Shen SY, Raza W, Shen QR, Xu YC. The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Applied Soil Ecology*, 2013, 64: 15–22.
- [32] Yuan J, Wu YC, Zhao ML, Wen T, Huang QW, Shen QR. Effect of phenolic acids from banana root exudates on root colonization and pathogen suppressive properties of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Biological Control*, 2018, 125: 131–137.
- [33] Hui C, Guo XX, Sun PF, Khan RA, Zhang QC, Liang YC, Zhao YH. Removal of nitrite from aqueous solution by *Bacillus amyloliquefaciens* biofilm adsorption. *Bioresource Technology*, 2018, 248: 146–152.
- [34] Mei JF, Shen XB, Gang LP, Xu HJ, Wu FF, Sheng LQ. A novel lignin degradation bacteria-*Bacillus amyloliquefaciens* SL-7 used to degrade straw lignin efficiently. *Bioresource Technology*, 2020, 310: 123445.
- [35] El-Sayed WS, Ibrahim MK, Abu-Shady M, El-Beih F, Ohmura N, Saiki H, Ando A. Isolation and identification of a novel strain of the genus *Ochrobactrum* with phenol-degrading activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96(3): 310–312.
- [36] Chantarasiri A. Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2015, 41(3): 257–264.
- [37] López-González JA, López MJ, Vargas-García MC, Suárez-Estrella F, Jurado M, Moreno J. Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 574–584.
- [38] Zhao Y, Zhao Y, Zhang ZC, Wei YQ, Wang H, Lu Q, Li YJ, Wei ZM. Effect of thermo-tolerant actinomycetes inoculation on cellulose degradation and the formation of humic substances during composting. *Waste Management*, 2017, 68: 64–73.
- [39] Liu BQ, Liu JP, Ju MT, Li XJ, Yu QL. Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 107(1): 46–51.
- [40] Karanth NGK, Deo PG, Veenanadig NK. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science*, 1999, 77(1): 116–126.

# Analysis on the mechanism of synergistic improvement of rice straw transformation by microbial flora

Hongliang Cui, Changli Liu\*, Chunya Li, Zhifeng Song, Yajing Yang, Yanwei Wang

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

**Abstract:** The effect of a single microorganism in degrading rice straw is not apparent. The microbial flora, combined with multiple microorganisms, can effectively degrade rice straw, which is currently the primary choice for straw waste degradation. **[Objective]** To explore the interspecies coordination mechanism, the microbial flora can transform rice straw more efficiently than a single strain and provide a theoretical reference for improving the biodegradation process of straw materials. **[Methods]** A microbial population combination with a degradation effect better than monoculture was constructed artificially through the combination of strains and the weight loss of rice straw as an indicator. The experimental strains were identified by molecular biology methods. Combined with cellulase activity and GC-MS analysis of fermentation products revealed the interspecies coordination mechanism of microbial populations during rice straw degradation. **[Results]** Strain B (*Bacillus cereus*) cultured at 30 °C for 8 days, the degradation rate of rice straw was 50.9%. The combination of strain B and strain D<sub>2</sub> (*Bacillus amyloliquefaciens*), W<sub>1</sub> (*Ochrobactrum intermedium*), and G<sub>1</sub> (*Bacillus licheniformis*) constituted 4 strains of BD<sub>2</sub>W<sub>1</sub>G<sub>1</sub>. For the composite flora, rice straw's degradation rate by culturing at 30 °C for 8 days is 73.3%, 22.4% higher than that of single strain B. The fermentation product analysis showed that strain B produced a large amount of acid, phenol, and other substances in a single culture. B+D<sub>2</sub> co-culture, the degradation rate of rice straw is 64.6%, the acid in the fermentation broth is relatively reduced by 87.4%, and the phenol is reduced by 61.9% (pentadecanoic acid, n-hexadecanoic acid, 2,4 Di-tert-butylphenol, and 6-tert-butyl p-cresol is significantly reduced). When B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub> is co-cultured, the fermentation broth phenols are further reduced by 15.7% (6-tert-butyl-p-cresol is significantly reduced), and rice straw is degraded by 71.0%. When B+D<sub>2</sub>+W<sub>1</sub>+G<sub>1</sub> is co-cultured, phenols and acids continue to decrease by 10.7%, and rice straw is degraded by 73.3%. **[Conclusion]** Pentadecanoic acid, n-hexadecanoic acid, 2,4-di-tert-butylphenol and 6-tert-butyl-p-cresol, and other acids phenols can inhibit the efficiency of strain B in decomposing rice straw. Strain D<sub>2</sub>, W<sub>1</sub>, and G<sub>1</sub> can reduce the content of acids and phenols, including the four substances (A total of 82.9% reduction in acids and 88.2% reduction in phenols), improve the decomposition efficiency (A total of 22.4% increase in decomposition effect). The composition of rice straw is complex, and the bacteria with different functions are combined into a compound inoculum, which reduces feedback inhibition and forms metabolic complementarity, which can effectively improve the biodegradation effect of rice straw.

**Keywords:** rice straw, microbial degradation, microbial consortia, strain function

(本文责编: 李磊)

Supported by the Key Poverty Alleviation Project of the Ministry of Education (2572020DF02)

\*Corresponding author. E-mail: liuchangli@nefu.edu.cn

Received: 7 November 2020; Revised: 15 February 2021; Published online: 7 June 2021