

研究报告

一株秸秆促腐枯草芽孢杆菌的筛选鉴定及全基因组分析

安妮¹, 徐瑞阳^{1,2}, 吴锡³, 李娟¹, 李冠华^{*1,2}, 张德建^{*1}

1 内蒙古大学 生命科学学院 牧草与特色作物生物学教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010070

2 内蒙古大学 生命科学学院 内蒙古自治区高校生物种质资源保护与利用工程研究中心,
内蒙古 呼和浩特 010070

3 葫芦岛市生态环境保障服务中心, 辽宁 葫芦岛 125000

安妮, 徐瑞阳, 吴锡, 李娟, 李冠华, 张德建. 一株秸秆促腐枯草芽孢杆菌的筛选鉴定及全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1134-1147.

AN Ni, XU Ruiyang, WU Xi, LI Juan, LI Guanhua, ZHANG Dejian. Screening, identification, and genome-wide analysis of a straw-degrading strain of *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1134-1147.

摘要:【背景】提高秸秆腐解效率是改善土壤质量、阻止土壤退化的重要途径。【目的】拟筛选抗逆性强秸秆腐解效率高的微生物, 优化其培养条件, 并分析功能基因。【方法】首先从北方低温干旱区获得土样, 利用水解圈法、相对细胞密度法和酶活测定法等筛选秸秆促腐菌, 表征其生物学特性, 开展田间腐解试验, 基因组测序分析功能基因。【结果】筛选分离出抗逆性好的堆肥芽孢杆菌(*Bacillus stercoris*) HS6-2, 大田腐解试验表明该菌对秸秆 30 d 和 180 d 的腐解率达 55.74% 和 84.77%, 较对照组提高了 25.2% 和 11.99%; 最优条件下该菌内切纤维素酶、外切纤维素酶和滤纸酶活分别可达到 3.63、12.27 和 3.48 U/mL; 全基因组测序分析表明, CAZy 家族基因由 189 个基因编码, 包括 71 个糖苷水解酶, 涉及多种木质纤维素降解的酶基因。【结论】菌株 HS6-2 具有轻度嗜盐、嗜碱、耐干旱、耐低温特性, 在腐解秸秆方面具有很好的应用潜力, 为秸秆还田菌剂的研发提供了重要的技术支持。

关键词: 秸秆促腐菌; 枯草芽孢杆菌; 抗逆性; 发酵优化; 全基因组

资助项目: 国家自然科学基金(22068028, 21868018); 国家重点研发计划(2022YFD1500902-3); 内蒙古自治区科技计划(2022YFDZ0060)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22068028, 21868018), the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1500902-3), and the Science and Technology Program of Inner Mongolia Autonomous Region (2022YFDZ0060).

*Corresponding authors. E-mail: LI Guanhua, liguanhua1984@126.com; ZHANG Dejian, zhangdejian00@163.com

Received: 2024-06-07; Accepted: 2024-07-10; Published online: 2024-08-06

Screening, identification, and genome-wide analysis of a straw-degrading strain of *Bacillus subtilis*

AN Ni¹, XU Ruiyang^{1,2}, WU Xi³, LI Juan¹, LI Guanhua^{*1,2}, ZHANG Dejian^{*1}

1 Key Laboratory of Herbage and Endemic Crop Biology, Ministry of Education, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, Inner Mongolia, China

2 Inner Mongolia Engineering Technology Research Center of Germplasm Resources Conservation and Utilization, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, Inner Mongolia, China

3 Huludao Ecological Environment Protection Service Center, Huludao 125000, Liaoning, China

Abstract: [Background] Increasing the straw degradation efficiency is a key path to improve soil quality and curbing soil degradation. [Objective] To screen out the strains with strong degradation effect on straw, optimize the culture conditions and mine the functional genes of the strain. [Methods] Soil samples were collected from a low-temperature and arid area in northern China. The hydrolysis circle assay, cell density assay, and enzyme activity measurement were employed to screen the isolates and characterize the strain screened out. Field degradation experiments were carried out, and functional genes of the strain were mined by whole genome sequencing. [Results] *Bacillus stercoris* HS6-2 with strong stress tolerance was isolated. In the field, this strain showed the straw degradation rates of 55.74% and 84.77% after rooting for 30 and 180 days, respectively, which were 25.2% and 11.99% higher than those in the control. Under the optimized conditions, the strain showed the endo-cellulase, exo-cellulase, and filter paper enzyme activities of 3.63, 12.27, and 3.48 U/mL, respectively. The results of whole genome sequencing showed that the CAZy family members were encoded by 189 genes, including 71 glycoside hydrolases, some of which were involved in lignocellulose degradation. [Conclusion] HS6-2 as a mildly halophilic and basophilic strain with tolerance to drought and low temperatures demonstrates good application potential in straw degradation, which provides technical support for the research and development of microbial agents serving straw returning. **Keywords:** straw-degrading microorganisms; *Bacillus subtilis*; stress tolerance; fermentation optimization; whole genome

土壤退化是当前全球面临的一个严峻问题,严重影响农业生产和生态环境的可持续发展。秸秆资源的有效利用是目前改善土壤质量的重要途径之一^[1-2]。秸秆作为一种丰富的有机质,可以通过微生物的作用被有效地转化为有益于土壤生态系统的营养物质^[3-4]。尽管秸秆还田应用前景广阔,但在实际应用中仍存在一些需重视和解决的问题,主要包括生物降解效率较低、易受虫害影响等^[5]。特别是在北方寒冷地

区,秋收后,低温干旱的气候条件导致秸秆在来年播种前无法充分腐解,秸秆残体较多,甚至产生虫害,严重影响春耕和农作物生长,成为制约北方秸秆还田的主要因素^[6-7]。挖掘具有耐低温、干旱的高产酶微生物,对于秸秆有效腐解具有重要意义,也是促进北方农业生产可持续发展的的重要手段。

秸秆促腐菌是一类能够通过分泌特定酶类促使有机质降解和腐烂的微生物,进而提高土

壤肥沃度, 维持生态系统平衡^[8]。研究表明, 从自然界筛选到的秸秆腐熟菌种包括细菌中的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)等, 以及真菌中的青霉(*Penicillium*)、木霉(*Trichoderma*)、黑曲霉(*Aspergillus*)等^[9-11]。其中, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为一种需氧革兰氏阳性细菌, 具有产生纤维素酶、 α -淀粉酶及蛋白酶等能力, 有利于秸秆有效分解, 提高速效磷、碱解氮、速效钾和 pH 值, 加速土壤养分循环, 促进有机质分解和土壤肥力提升^[12-15]。Wang 等^[16]将枯草芽孢杆菌接种到牛粪和秸秆堆肥中, 将堆肥的嗜热期延长 1-2 d, 并加速堆肥成熟。将芽孢杆菌接种到稻草中可以改变其细菌群落, 从而促进木质纤维素降解^[17]。本研究从北方低温干旱区收集土壤, 筛选秸秆促腐菌, 表征其生物学特性, 优化发酵条件, 开展大田腐解试验, 并从基因组角度深度解析功能基因。

1 材料与方 法

1.1 样 品

从内蒙古自治区呼和浩特市南湖湿地公园、内蒙古自治区通辽市奈曼旗治安镇、内蒙古自治区锡林郭勒盟苏尼特右旗赛汉塔拉镇草原、吉林张广才岭、吉林东部长白山原始林区共采集到土壤样品 34 份。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基、产纤维素酶筛选培养基、产淀粉酶筛选培养基和产蛋白酶筛选培养基参考文献^[18]配制。细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; *DreamTaq* DNA 聚合酶, Thermo Scientific 股份有限公司; 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)、可溶性淀粉、牛肉膏、蛋白胨、脱脂牛奶、酵母

提取物、酵母浸粉和羧甲基纤维素钠等, 天津科茂化学试剂有限公司。光学显微镜, 卡尔·蔡司有限公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 电穿孔系统和 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.3 秸秆促腐菌的筛选

取 5.0 g 土壤样品加入 45.0 mL 无菌水混匀, 37 °C、200 r/min 培养 30 min 后 80 °C 水浴 30 min, 37 °C、200 r/min 富集培养 24 h。按照 10 倍梯度稀释法配制 10^{-4} - 10^{-6} 系列土壤悬液, 各梯度取 0.1 mL 悬液涂布于 LB 培养基, 37 °C 倒置培养 24-48 h 至形成单菌落。依据菌落形态, 挑取单菌落四区划线于 LB 培养基分离纯化, 37 °C 倒置培养 24-48 h 后于 4 °C 保存。

将纯化的菌株点种于产纤维素酶筛选培养基, 37 °C 倒置培养 24-48 h 至形成单菌落, 加入 1.0 mg/mL 刚果红染液 30 min, 经 1.0 mol/L NaCl 溶液脱色 30 min, 测量透明圈与菌落直径。将纯化的菌株点种于产淀粉酶和蛋白酶培养基, 直接测量透明圈与菌落直径。根据水解圈直径和菌落直径比值确定菌株产酶能力, 值越大则产酶能力越强^[19]。对产酶能力高的菌株进一步开展形态学、生理生化和分子学鉴定。

1.4 秸秆促腐菌的鉴定

形态学及生理生化鉴定: 通过观察菌落形状、颜色、边缘、干湿等形态特征进行初步鉴定, 参考文献^[20]对菌株进行生理生化鉴定。

分子生物学鉴定: 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA, 选择通用引物 27F (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增目的菌株的 16S rRNA 基因。PCR 反应体系: 模板 DNA (10 ng/ μ L) 1 μ L, Primer 27F (10 μ mol/L) 0.5 μ L, Primer 1492R (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 10 \times Buffer (含

Mg²⁺) 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL, *DreamTaq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, ddH₂O 补足 25 μL^[21]。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 58 °C 40 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 终止反应。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。获得 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 序列比对, 选取同源性较高的比对结果利用 MEGA 11 软件进行 Clustal 多序列比对后采用 neighbor-Joining 法构建系统发育树^[22]。

1.5 抗逆性分析

种子液的制备: 挑取目的菌株菌落 2 环接种于 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 摇床培养 12 h, 即为种子液。

利用筛选获得的目的菌株, 以 LB 液体培养基为基础, 根据实验目的, 依次改变培养基组成或培养条件。分别设置 NaCl 浓度为 10、30、70、110 和 150 g/L, 初始 pH 值为 7.0、9.0、11.0 和 13.0, PEG6000 浓度为 0、100.0、150.0、250.0 和 350.0 g/L, 培养温度为 37、28、20、15 和 4 °C。以 3% 为接种量, 180 r/min 培养 24 h, 分光光度法测定 OD_{600} , 稀释涂布法计算细胞密度, 分别开展菌株盐耐受性、碱耐受性、干旱耐受性和低温耐受性实验。以最适培养条件下的菌体细胞密度为基准, 按公式(1)计算相对细胞密度。以相对密度表示菌株生长率, 每个实验条件 3 次重复。

相对细胞密度=不同实验条件下菌株的细胞密度/最适条件下菌株的细胞密度)×100% (1)

1.6 发酵条件优化

最适 pH 的确定: 以 LB 液体培养基为基础, 采用 3 种缓冲液(pH 3.0–6.0 用柠檬酸缓冲液, pH 7.0–8.0 用磷酸盐缓冲液, pH 9.0–11.0 用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液)^[23], 调节培养基初始 pH 值分别达到 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 接种量

3%, 37 °C、180 r/min 培养 48 h, 测定纤维素酶活力及细胞密度。

最适碳源及碳源浓度的确定: 以 LB 液体培养基为基础, 不添加酵母膏, 分别添加 10 g/L 葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、乳糖、山梨醇和羧甲基纤维素钠, 并进一步改变最适碳源浓度分别为 5、10、15、20、25 和 30 g/L, 接种量 3%, 37 °C、180 r/min 培养 48 h, 测定纤维素酶活力及细胞密度。

最适氮源及氮源浓度的确定: 以 LB 液体培养基为基础, 不添加酵母膏, 分别添加 10 g/L 豆粕、脱脂奶粉、氯化铵、硫酸铵、脲素和蛋白胍, 并进一步改变最适氮源浓度分别为 5、10、15、20、25 和 30 g/L, 接种量 3%, 37 °C、180 r/min 培养 48 h, 测定纤维素酶活力及细胞密度。

最适接种量确定: 以 LB 液体培养基为基础, 分别以 1%、2%、3%、4%、5% 为接种量, 180 r/min 培养 48 h, 测定纤维素酶活力及细胞密度。

1.7 纤维素酶活力的测定

发酵结束后, 取发酵液 2.0 mL 于 5 000 r/min 离心 30 min, 所得上清液即为粗酶液。DNS 试剂显色法测定上清液纤维素酶活力^[24]。在具塞试管中加入 1.5 mL 1% 羧甲基纤维素钠溶液(内切纤维素酶)或微晶纤维素溶液(外切纤维素酶)或 50.0 mg 滤纸片(滤纸酶活), 空白管加入 1.5 mL 0.05 mol/L、pH 4.8 的柠檬酸缓冲液, 加入 0.5 mL 粗酶液, 50 °C 保温 30 min, 取出后再加入 2.0 mL DNS 溶液, 在沸水浴中煮沸 5 min 后迅速冷却, 再加入 11.0 mL 蒸馏水, 上下颠倒均匀后测定 540 nm 波长下的吸光度。1 min 底物被酶解产生 1 μmol 葡萄糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位。

$$\text{酶活(U/mL)} = \frac{m \times 10^3}{180 \times t \times V_0} \quad (2)$$

式(2)中: m 为生成还原糖质量; 10^3 为 mg 转换

μg 的系数; V_0 为酶液体积, mL; t 为反应时间, min; 180 为葡萄糖分子量。

1.8 秸秆还田促腐试验

试验设 2 个处理: 秸秆不加菌剂(CK)和秸秆加菌剂。选取粗细与长度接近的完整秸秆镰刀切成小段(约 2.0 cm)备用。取上述秸秆 25.0 g, 加入 4.0 mL 菌液(活菌数约为 10^7 CFU/mL), 加土壤 5.0 kg, 混匀后装入 300 目尼龙网袋, 于播种玉米后埋入 10–20 cm 土层。实验样地为内蒙古呼伦贝尔市阿荣旗现代农业示范园区(122°2′–124°5′E, 47°56′–49°19′N), 网袋埋土时间为 2023 年 5 月 3 日。分别于 30 d 和 180 d 后取出网袋 3 个, 冲洗干净烘至恒重, 计算秸秆失重率^[25]。

1.9 基因组测序及生物信息学分析

基因组测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成, 利用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)功能数据库, 将预测基因与各功能数据进行 BLAST 比对, 对菌株基因组进行功能注释^[26]。

1.10 数据分析

数据采用 Microsoft Excel 和 SPSS 软件进行统计分析, 单因素方差分析(one-way ANOVA)进行显著性检验。结果以“mean \pm SD”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 秸秆促腐菌 HS6-2 的鉴定结果

2.1.1 形态学鉴定结果

共从采集土壤中分离获得 151 株菌, 经革兰氏染色筛选出具有芽孢的 102 株, 最终获得一株产蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的菌株 HS6-2 (图 1A–1C)。菌株 HS6-2 菌落呈粗糙不

透明的污白色, 表面干燥且有皱褶, 边缘整齐。经革兰氏染色法初步鉴定, 确定该菌为革兰氏阳性, 芽孢中生且不着色, 显微形态呈杆状(图 1D、1E)。根据形态学特征初步判定该菌为芽孢杆菌属。

2.1.2 生理生化鉴定结果

参考文献[20]和主要生化指标作为鉴定芽孢杆菌的依据。菌株 HS6-2 显示氧化酶试验和接触酶试验均为阳性, 苯丙氨酸脱氨试验为阴性, 此外, 该菌可利用淀粉、蛋白质等常规碳源, 能还原硝酸盐, 但不具有苯丙氨酸脱氨酶活性。

2.1.3 分子生物学鉴定结果

选择通用引物 PCR 扩增菌株 HS6-2 的 16S rRNA 基因序列并进行 BLAST 序列比对, 采用 neighbor-joining 方法构建系统发育树。菌株 HS6-2 与参考菌株堆肥芽孢杆菌(*Bacillus stercoris*) D7XPN1 处于同一独立分支(图 2), 亲缘关系最近^[27]。综合形态学鉴定和生理生化鉴定结果, 判断该菌为堆肥芽孢杆菌, 命名为 *B. stercoris* HS6-2。

2.2 菌株 HS6-2 的抗逆性分析

以 1% NaCl 培养的细胞密度为基准, 计算不同 NaCl 浓度梯度下菌株相对细胞密度, 以分析该菌耐盐性。菌株相对细胞密度在 NaCl 浓度为 3% 时最高, 达到 98.70%; 随着 NaCl 浓度增加, 相对细胞密度逐渐减少, 当 NaCl 浓度增加到 70、110 和 150 g/L 时, 相对细胞密度依次下降至 34.20%、11.69% 和 5.54% (图 3A), 这表明该菌株对高浓度的 NaCl 逐渐失去适应能力, 其生长受到影响。根据 Trüper 等^[28]提出的耐盐性分类系统, 判断该菌为轻度嗜盐微生物。以 pH 7.0 培养的细胞密度为基准, 分析该菌耐碱性。菌株的相对细胞密度在 pH 9.0 时能达到 79.26%, 并且与 pH 7.0 时相比无显著差异; 随着 pH 值上升, 相对细胞密度逐渐减少, 当 pH 值升至 11.0 和 13.0 时, 几乎无法生长(图 3B), 这表明菌株 HS6-2 在

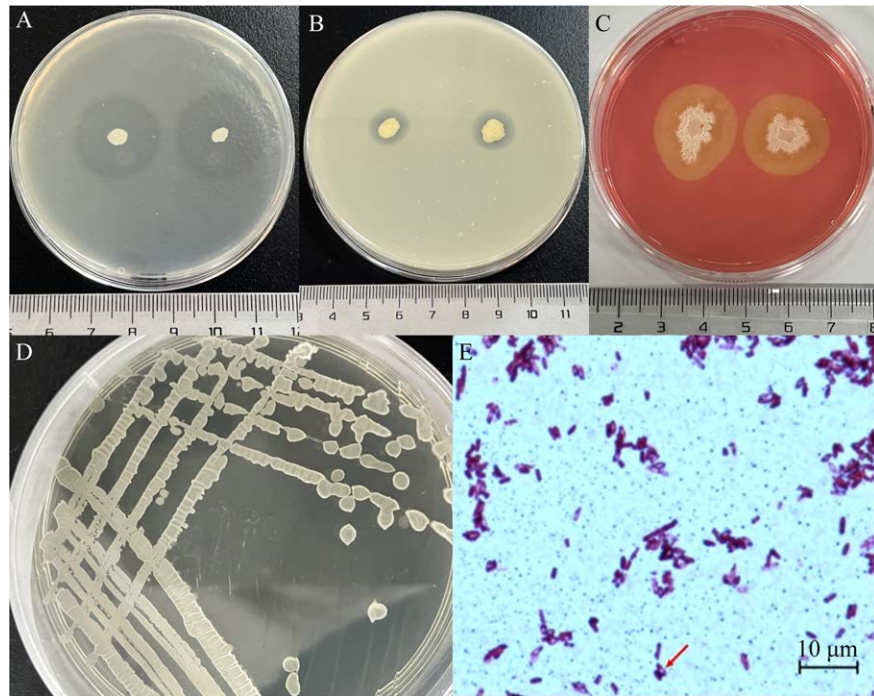


图 1 秸秆促腐菌 HS6-2 产酶分析、菌落形态和革兰氏染色结果 A: 蛋白酶分析; B: 淀粉酶分析; C: 纤维素酶分析; D: 菌落形态; E: 革兰氏染色结果。

Figure 1 Enzyme production of straw-degrading microorganism HS6-2 and its characteristics of colony and Gram staining. A: Protease test; B: Amylase test; C: Cellulose test; D: Colony morphology; E: Gram staining.

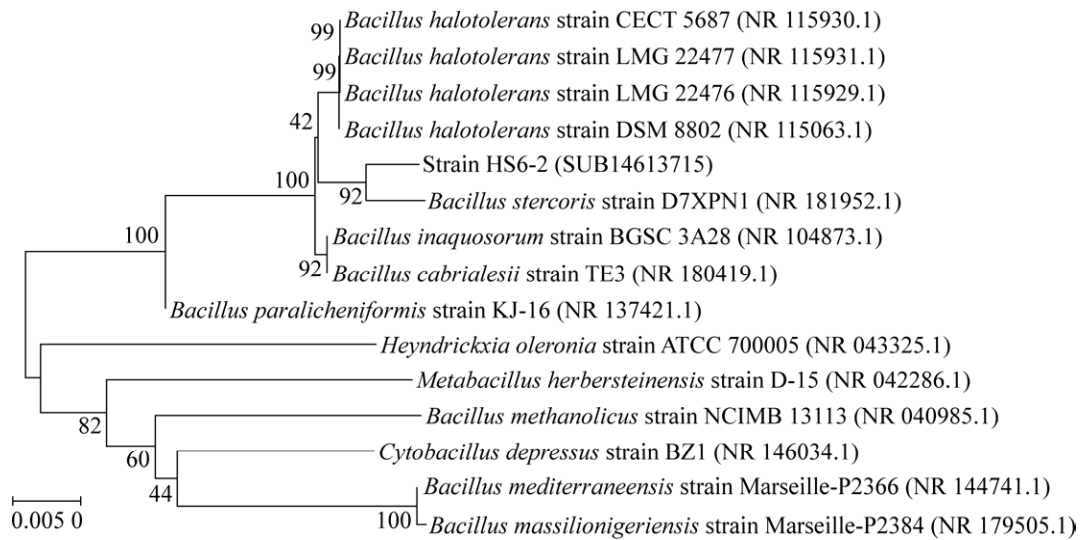


图 2 基于菌株 HS6-2 的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树 括号中数值为 GenBank 登录号; 分支的数值为 bootstrap 支持率; 标尺 0.005 0 为序列进化差异。

Figure 2 Phylogenetic tree of HS6-2 constructed based on 16S rRNA gene sequence. The value in parentheses represents the GenBank login number; The numerical values on the branch indicates the support rate of bootstrap; Ruler 0.005 0 suggests evolutionary differences in sequences.

极端碱性条件下生长能力受到严重影响,但在中性到弱碱性条件下显示出良好的碱耐受性。以温度 37 °C 培养的细胞密度为基准,分析该菌耐低温性。菌株的最适温度为 28–37 °C,此时菌株的相对细胞密度可达 87%;当温度降至 20、15 和 4 °C 时,菌株的相对细胞密度也逐渐下降至 31.72%、13.22% 和 1.01% (图 3C),表明该菌能在较低温度下生长。以不添加 PEG6000 时培养的细胞密度为基准,分析该菌耐干旱性。菌株的相对细胞密度在 PEG6000 浓度为 350.0 g/L 时最低,仅为 11.71%;相比之下,在浓度为 100、150 和 250 g/L 时均表现良好,相对细胞密度分别

能够达到 90.54%、83.33% 和 80.18%,与不添加 PEG6000 时无显著差异(图 3D),因此,推断该菌具较强耐旱性。

2.3 菌株 HS6-2 发酵条件优化

由图 4 可知,不同 pH、碳源、氮源和接种量对菌株 HS6-2 生长及产酶影响不同。pH 值在 5.0–9.0 范围内,该菌细胞密度均达到 10^8 以上,并且 pH 7.0 时最优,活菌数、内切纤维素酶与外切纤维素酶分别达到 7×10^8 CFU/mL、1.13 U/mL 和 9.02 U/mL,滤纸酶活在 pH 9.0 时最高,为 1.03 U/mL (图 4A),所以选择 pH 7.0 作为最适 pH 值。6 种碳源条件下细胞密度均达到 10^9 数量级,

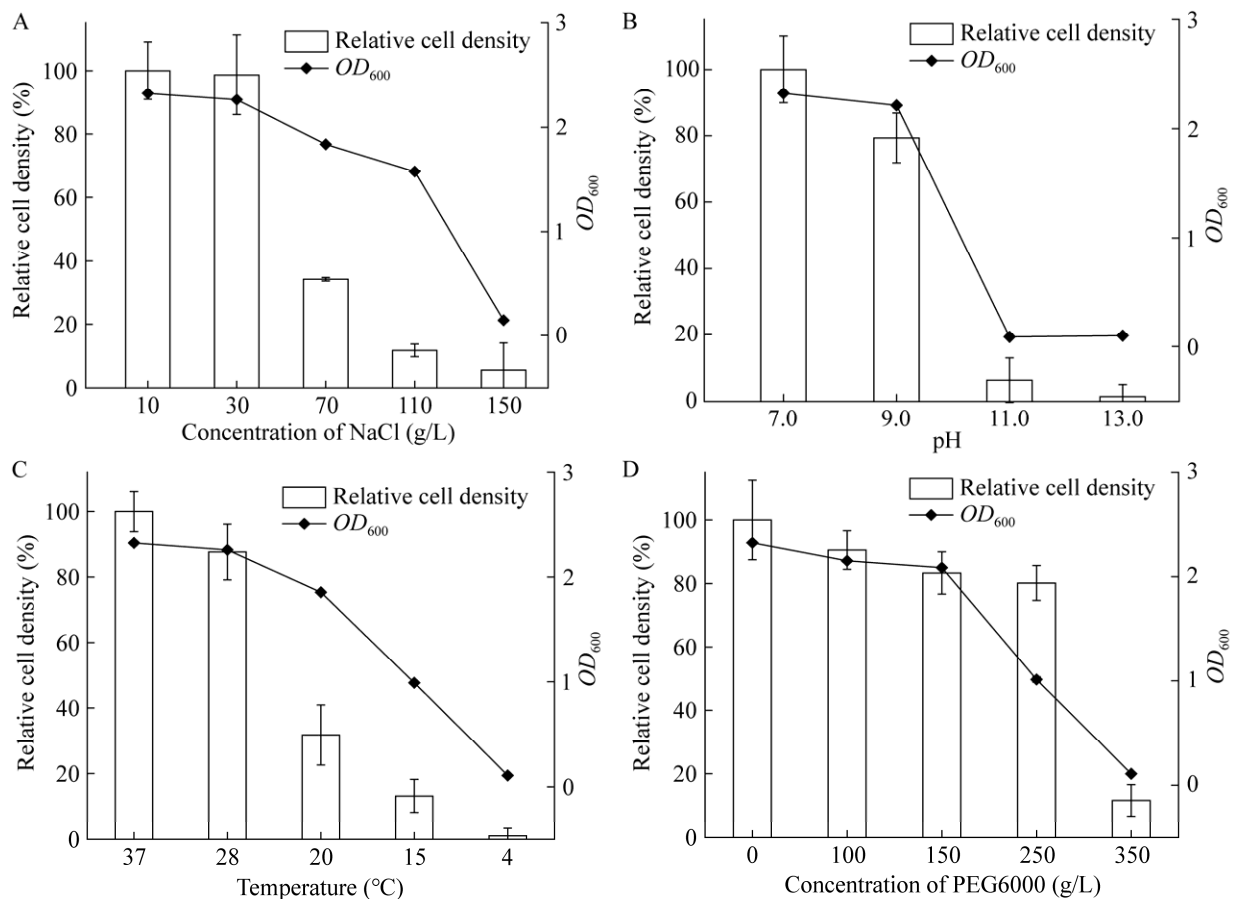


图 3 菌株 HS6-2 抗逆性分析 A: 耐盐; B: 耐碱; C: 耐低温; D: 耐干旱。

Figure 3 Stress resistance analysis of HS6-2. A: NaCl resistance; B: Alkali resistance; C: Low temperature resistance; D: Drought resistance.

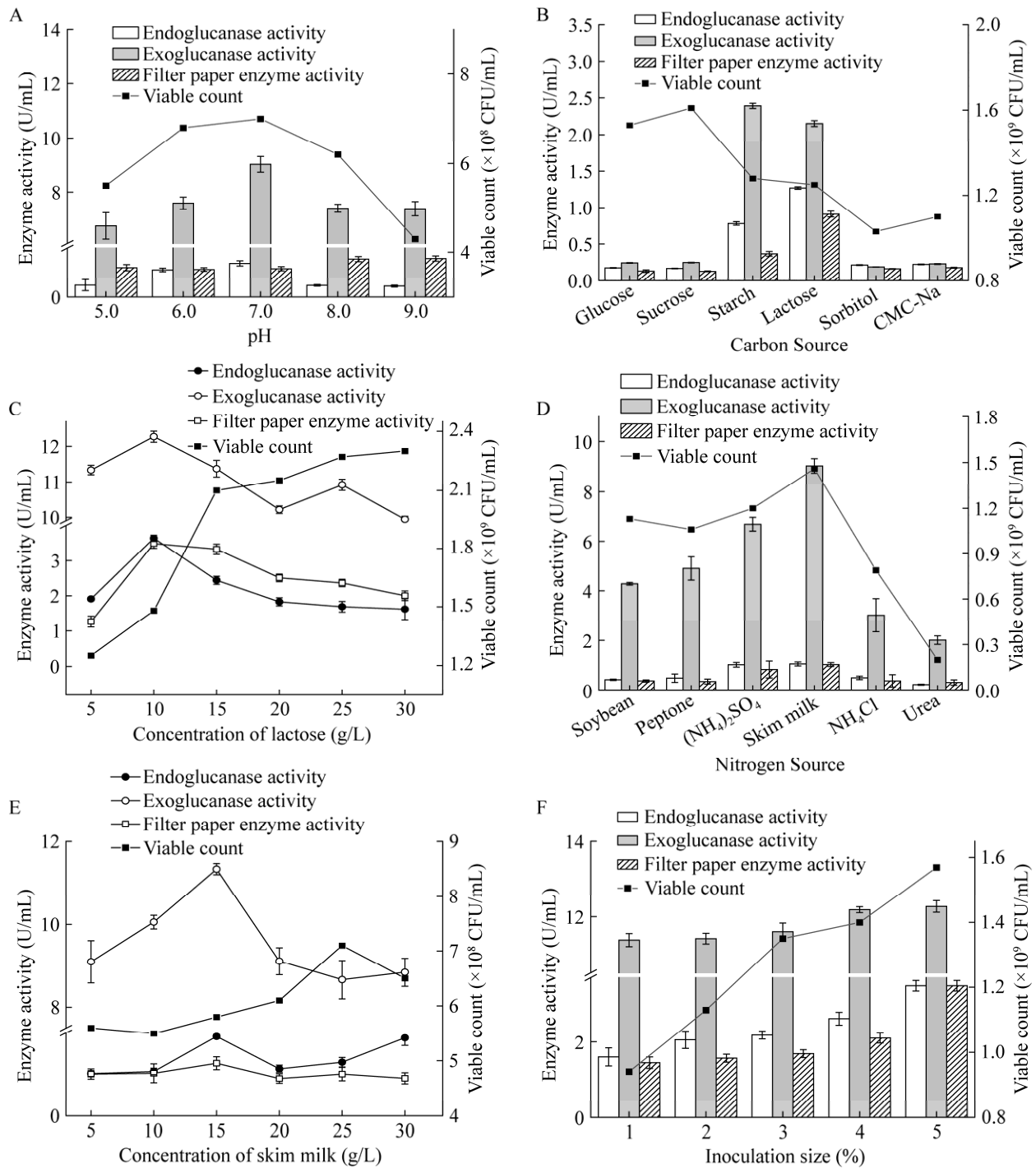


图 4 不同条件下 HS6-2 生长与产酶 A: pH; B: 碳源; C: 碳源浓度; D: 氮源; E: 氮源浓度; F: 接种量。

Figure 4 Cellulase production and growth of HS6-2 under different conditions. A: pH; B: Carbon sources; C: Concentrations of carbon source; D: Nitrogen sources; E: Concentrations of nitrogen source; F: Inoculation size.

其中,当碳源为蔗糖和葡萄糖时生长较为旺盛,但产酶能力较低。这可能是由于代谢产物例如葡萄糖等的积累会抑制产酶;其次,高密度微生物群落在一定程度上会抑制菌体产酶,在有限的培养基中,微生物之间会竞争营养资源,导致部分微生物由产酶的代谢活跃状态转变为生长状态,进而导致酶活降低。当碳源为乳糖时内切纤维素酶、滤纸酶活最高,分别达 1.26、0.9 U/mL (图 4B),所以选择乳糖作为最适碳源。当乳糖浓度为 10 g/L 时,3 种酶活最高,内切纤维素酶、外切纤维素酶和滤纸酶活分别达到 3.6、12.27 和 3.48 U/mL (图 4C),所以选择 10 g/L 乳糖含量作为最适碳源浓度。6 种氮源条件下细胞密度除尿素和氯化铵外均达到 10^9 数量级,其中当氮源为脱脂奶粉时生长最旺盛,并且内切纤维素酶、外切纤维素酶和滤纸酶活最高,分别达到 1.06、9.02 和 1.03 U/mL (图 4D),所以选择脱脂奶粉作为最适氮源。当脱脂奶粉浓度为 15 g/L 时,内切纤维素酶、外切纤维素酶和滤纸酶活最高,分别达到 1.91、11.33 和 1.26 U/mL (图 4E),所以选择 15 g/L 脱脂奶粉含量作为最适氮源浓度。细胞密度随接种量增加呈现上升趋势,其中以 5% 接种量条件下生长最为旺盛,并且 3 种酶活与此趋势一致(图 4F),所以选择 5% 为最适接种量。

菌株 HS6-2 秸秆还田 30 d 和 180 d 土壤 pH 以及秸秆腐解率如表 1 所示。添加菌剂后土壤 pH 值保持相对稳定,秸秆腐解率呈现升高趋势,在 30 d 和 180 d 后腐解率最高达 55.74% 和 84.77%,较 CK 分别提高 25.2% 和 11.99%,其中 30 d 后腐解率较 CK 存在显著差异,表明菌株 HS6-2 的加入可以显著提高秸秆腐解效率,缩短腐解时间。

2.4 菌株 HS6-2 全基因组测序分析

菌株 HS6-2 全基因组序列大小为 4 115 531 bp, C+G 含量 43.84%, 预测基因总数共 4 390 个,

所有编码基因总长度 3 648 690 bp, 其中, 编码区总长度占全基因组比例为 88.66%, 编码基因平均长度 831 bp, 其中假基因 11 个, 非编码 RNA 基因 126 个, 包括 30 个 rRNA、86 个 tRNA 和 10 个 sRNA, 根据基因组组装结果, 获得一条不含缺失区域的完整闭环基因组序列(图 5)。

表 1 秸秆腐解率

Table 1 Straw-degrading rate

Straw-degrading time (d)	Strain	pH	Straw-degrading rate (%)
30	HS6-2	6.30±0.36	55.74±3.51
	CK	6.25±0.03	44.51±1.77
180	HS6-2	6.43±0.08	84.77±1.62
	CK	6.47±0.11	75.69±3.43

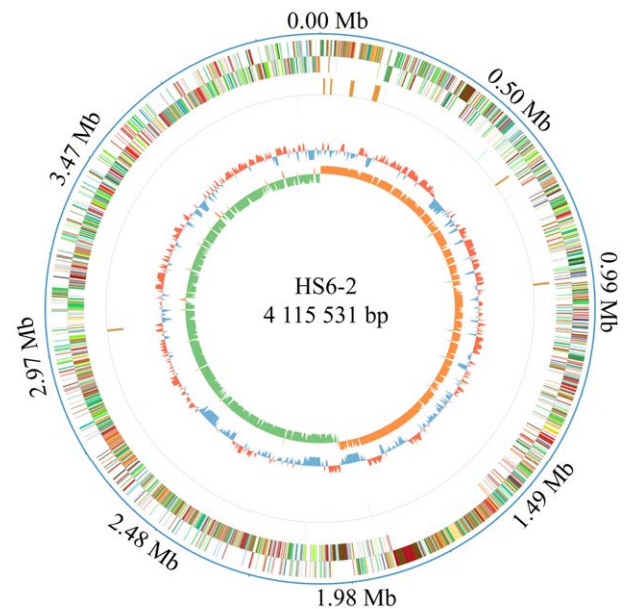


图 5 菌株 HS6-2 全基因组圈图 外圈是基因组序列位置坐标, 由外到里分别是基因功能注释结果、ncRNA、G+C 含量和 G+C skew 值。

Figure 5 Circular genome map of strain HS6-2. The outer circle is the position coordinates of the genome sequence. From the outside to the inside, it is the result of gene function annotation, ncRNA, G+C content and G+C skew value, respectively.

菌株 HS6-2 KEGG 代谢通路分析如图 6A 所示，功能注释基因可分为 6 类，分别是细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、与人类疾病相关基因、与代谢相关基因、与生物系统

相关基因。其中，代谢相关基因占比最多，进一步可细分为 12 类；碳水化合物代谢基因 266 个，氨基酸代谢基因 205 个，辅因子和维生素代谢基因 155 个，能量代谢基因 119 个。代谢相关

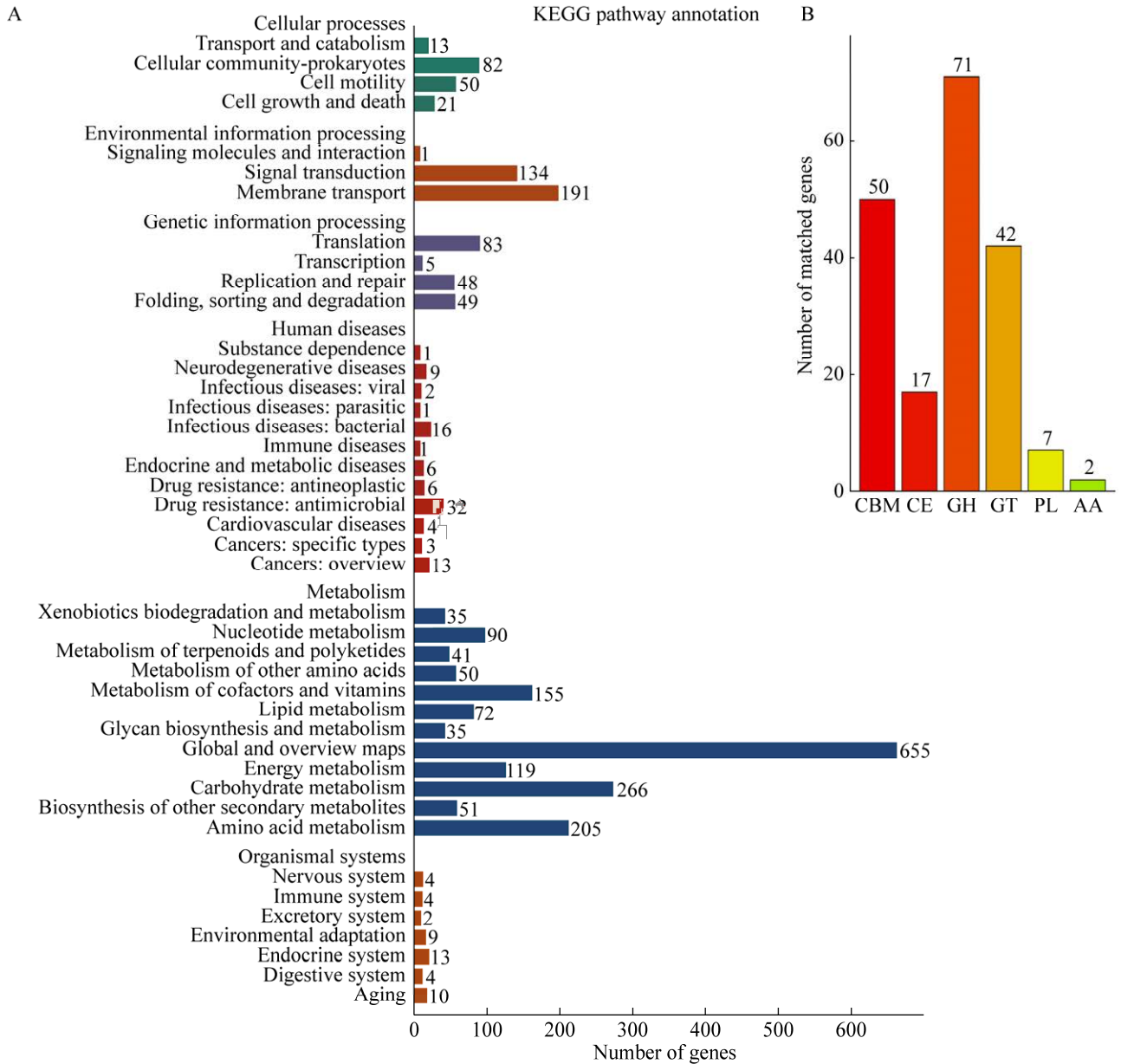


图 6 基因组 KEGG 数据库(A)和 CAZy 数据库(B)注释结果 CBM: 碳水化合物; CE: 糖类酯解酶; GH: 糖苷水解酶; GT: 糖基转移酶; PL: 多糖裂解酶; AA: 氧化还原酶。

Figure 6 Annotation result of genome KEGG database (A) and CAZy database (B). CBM: Carbohydrate-related modules; CE: Carbohydrate esterolytic enzyme; GH: Glycoside hydrolase; GT: Glycosyltransferase; PL: Polysaccharide lyase; AA: Oxidoreductase.

基因的大量存在表明, 菌株可以通过持续的物质和能量交换应对外界环境; 此外, 占比较多的膜运输相关基因(191个)和信号转导相关基因(134个)表明菌株具有较为复杂的调控机制和功能特化。通过 CAZy 数据库注释菌株 HS6-2 基因组, 进一步预测酶系家族蛋白数量。如图 6B 所示, 糖苷水解酶类基因数量最多, 共计 71 个, 其次是与碳水化合物相关的酶类和糖基转移酶类基因, 分别为 50 个和 42 个。他们通过水解糖苷键或将单糖转移至蛋白质、脂类、糖和核酸进行糖基化反应, 在生物体的次生代谢过程

中发挥着不可或缺的作用。相比之下, 糖类酯解酶和多糖裂解酶的基因数量较少, 分别为 17 个和 7 个, 而氧化还原酶的基因数量最少, 仅有 2 个。通过与 CAZy 数据库对比^[29], 菌株 HS6-2 全基因组中有 126 个参与木质纤维素降解的基因, 如 endoglucanase、 α -glucosidase、 α -amylase、pectate lyase、 β -glucosidase、 β -glucuronidase、chitin deacetylase 等。这些功能基因的 GO 富集显示, 在主要的碳水化合物代谢的过程中, 生物学过程更倾向于细胞壁分解与代谢(图 7)。这说明该菌具有较强分解木质纤维素等化学组分

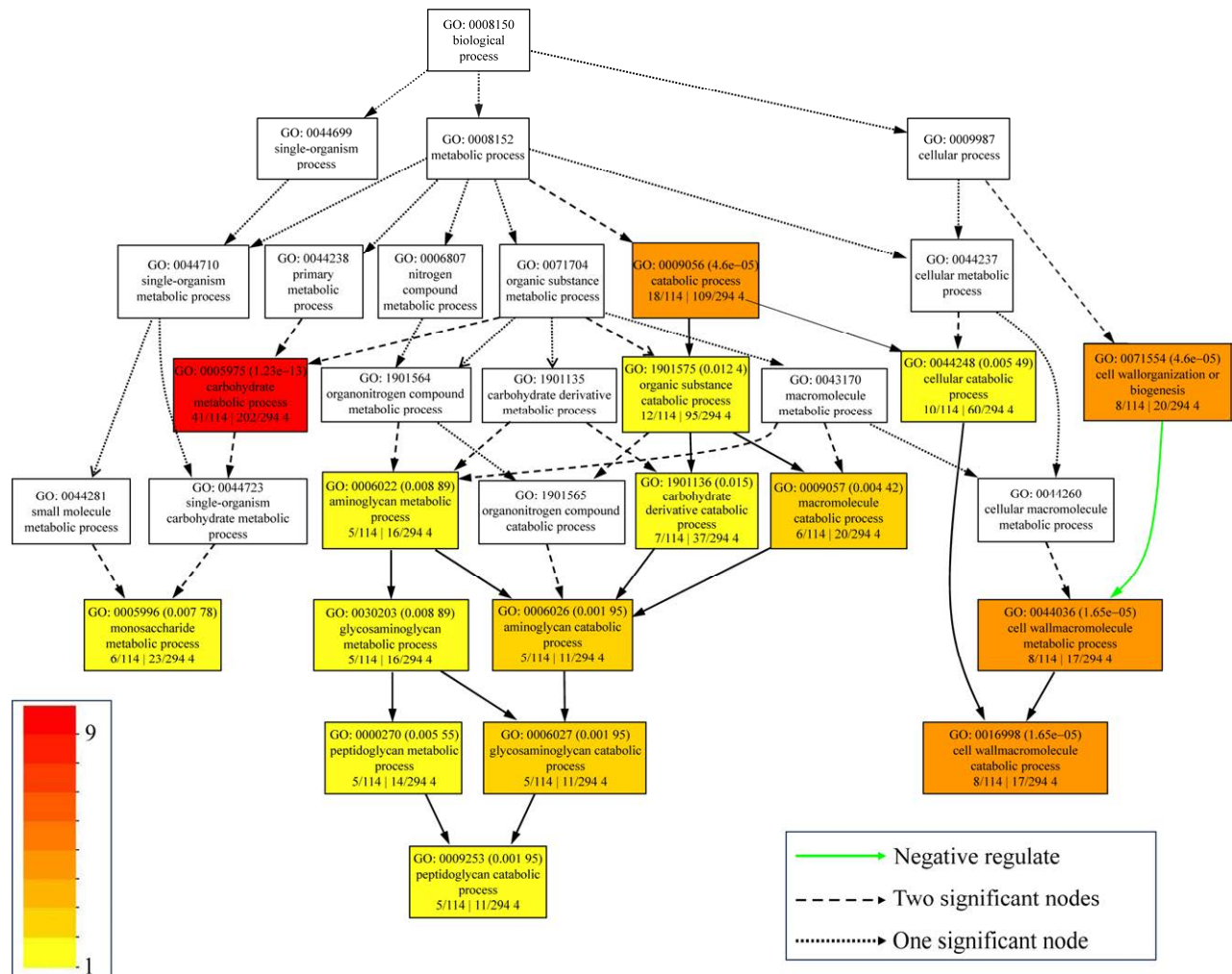


图 7 GO 特异富集分析有向无环树图

Figure 7 Singular enrichment analysis acyclic graph tree.

的能力。同时作为秸秆促腐菌，具有较强降解肽聚糖的能力，用以与其他微生物的抑制或竞争，从环境中摄取 N 元素。

3 讨论

根据 Larsen 等^[30]和 Vreeland 等^[31]提出的耐盐性分类系统，规定轻度嗜盐微生物的生长最适 NaCl 浓度为 1%–3%，嗜碱微生物生长 pH 为 10.0–12.0。南宏伟等^[32]研究表明菌株在 20% PEG6000 条件下生长即具有较强耐旱能力，在 NaCl 浓度为 2.5%条件下生长即具有较强耐盐能力。本研究中菌株 HS6-2 生物学特性表明该菌能够在 pH 9.0, NaCl 浓度为 70 g/L 和 PEG6000 浓度为 250 g/L 环境中保持良好生长，在温度为 15 °C 环境中虽生长缓慢但可以正常生长，所以判断该菌株为轻度嗜盐、嗜碱、耐干旱、耐低温微生物。微生物的生长及其纤维素酶活性会受到所提供培养条件的影响^[33–35]。因此，有必要根据所研究的特定菌株选择合适的培养条件。本研究采用单因素法对初始 pH、碳源、氮源、接种量等发酵条件进行优化。优化后菌株 HS6-2 的内切纤维素酶、外切纤维素酶和滤纸酶活分别可达到 3.63、12.27 和 3.48 U/mL。Malik 等^[36]研究筛选的 *B. subtilis* CD001 优化后最高纤维素酶活为 1.5 U/mL，与本研究结果相似。基因组注释结果显示该菌在氨基酸转运和代谢及碳水化合物运输等功能上存在大量的基因注释，表明该菌具有较强的碳代谢能力，为农作物秸秆降解提供强有力的理论支撑^[37–38]。CAZy 注释显示菌株糖苷水解酶类基因数量最多，共含有 71 个。Zhang 等^[39]研究分离得到贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) ZY-1-1 纤维素酶活力高达 610.1 U/L，但其基因组中仅有 40 个糖苷水解酶类基因。表明菌株 HS6-2 在纤维素酶开发、纤维素降解方面具有一定应用潜力。

4 结论

提高秸秆腐解效率是秸秆还田首先需要突破的瓶颈，针对这一难题论文开展了促腐菌挖掘以及促腐菌土壤迁移相关研究。筛选出 *B. stercoris* HS6-2，该菌株轻度嗜盐、嗜碱、耐干旱、耐低温，是潜在的秸秆促腐菌。该菌最适发酵条件为：碳源为 10 g/L 乳糖，氮源为 15 g/L 脱脂奶粉，pH 7.0，接种量 5%。基因组分析结果表明 266 个基因参与化合物代谢，CAZy 家族基因由 189 个基因编码，包括 71 个糖苷水解酶，涉及多种木质纤维素降解等。

REFERENCES

- [1] YANG J, CHANG JX, CAO XS, WANG YM, YAO J. Energy, environmental, and socioeconomic potential benefit of straw resources utilization under water availability limit condition[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 392: 136274.
- [2] VIRTO I, IMAZ M, FERNÁNDEZ-UGALDE O, GARTZIA-BENGOETXEA N, ENRIQUE A, BESCANS P. Soil degradation and soil quality in western Europe: current situation and future perspectives[J]. *Sustainability*, 2015, 7(1): 313-365.
- [3] 马志梅, 吕卫光, 裴亚楠, 白娜玲, 王丹莹, 汤勇华, 郑宪清, 李双喜, 张娟琴, 张海韵, 张月, 张翰林. 秸秆还田配施促腐菌剂对稻田土壤理化性质与微生物数量的影响[J]. *土壤通报*, 2023, 54(4): 889-896.
- [4] MA ZM, LÜ WG, PEI YN, BAI NL, WANG DX, TANG YH, ZHENG XQ, LI SX, ZHANG JQ, ZHANG HY, ZHANG Y, ZHANG HL. Effect of straw returning with decomposing inoculants to soil physico-chemical properties and the abundance of bacteria and fungi community[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2023, 54(4): 889-896 (in Chinese).
- [4] 杨苹, 刘京, 周郑雄, 王坡, 谢世爽, 黄莺. 一株耐烟碱木质素降解菌的筛选及其对烟梗的降解效果[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(6): 2182-2192.
- [5] YANG P, LIU J, ZHOU ZX, WANG P, XIE SS, HUANG Y. A lignin-degrading strain with nicotine tolerance: screening and the degradation effect on tobacco stems[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(6): 2182-2192 (in Chinese).
- [5] MA YQ, SHEN YQ, LIU Y. State of the art of straw treatment technology: Challenges and solutions forward[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 313: 123656.
- [6] 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.
- [6] CAI JL, HU QB, ZHENG WL, LI Y, TONG T, SHI JY. Research progress in straw-degrading psychrotrophic microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(7):

- 2312-2325 (in Chinese).
- [7] JEWETT DG, LOGAN BE, ARNOLD RG, BALES RC. Transport of *Pseudomonas fluorescens* strain P17 through quartz sand columns as a function of water content[J]. Journal of Contaminant Hydrology, 1999, 36(1/2): 73-89.
- [8] WU D, REN H, XIE LN, ZHANG GG, ZHAO Y, WEI ZM. Strengthening Fenton-like reactions to improve lignocellulosic degradation performance by increasing lignocellulolytic enzyme core microbes during rice straw composting[J]. Waste Management, 2023, 161: 72-83.
- [9] LIU YT, ZHAO SQ, ZHU Q, DING WM. Image grey value analysis for estimating the effect of microorganism inoculants on straws decomposition[J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2016, 128: 120-126.
- [10] HERMOSILLA E, RUBILAR O, SCHALCHLI H, Da SILVA AS, FERREIRA-LEITAO V, DIEZ MC. Sequential white-rot and brown-rot fungal pretreatment of wheat straw as a promising alternative for complementary mild treatments[J]. Waste Management, 2018, 79: 240-250.
- [11] 刘瑞, 郭琪, 曹颖, 徐刚, 张丽, 孙鹏, 胡尚连, 赵博. 一株竹木质素降解菌的筛选及降解效果[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2170-2181.
- LIU R, GUO Q, CAO Y, XU G, ZHANG L, SUN P, HU SL, ZHAO B. A bamboo lignin-degrading strain: screening and degradation performance[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2170-2181 (in Chinese).
- [12] SU Y, LIU C, FANG H, ZHANG DW. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 173.
- [13] STÜLKE J, GRÜPPEN A, BRAMKAMP M, PELZER S. *Bacillus subtilis*, a Swiss army knife in science and biotechnology[J]. Journal of Bacteriology, 2023, 205(5): e0010223.
- [14] SUN B, BAI ZH, BAO LJ, XUE LX, ZHANG SW, WEI YX, ZHANG ZY, ZHUANG GQ, ZHUANG XL. *Bacillus subtilis* biofertilizer mitigating agricultural ammonia emission and shifting soil nitrogen cycling microbiomes[J]. Environment International, 2020, 144: 105989.
- [15] CHEN WM, WU ZS, LIU CH, ZHANG ZY, LIU XC. Biochar combined with *Bacillus subtilis* SL-44 as an eco-friendly strategy to improve soil fertility, reduce *Fusarium* wilt, and promote radish growth[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 251: 114509.
- [16] WANG LY, WANG TF, XING ZJ, ZHANG QF, NIU XH, YU YS, TENG ZJ, CHEN JX. Enhanced lignocellulose degradation and composts fertility of cattle manure and wheat straw composting by *Bacillus* inoculation[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2023, 11(3): 109940.
- [17] RAN C, GAO DP, BAI TQ, GENG YQ, SHAO XW, GUO LY. Straw return alleviates the negative effects of saline sodic stress on rice by improving soil chemistry and reducing the accumulation of sodium ions in rice leaves[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2023, 342: 108253.
- [18] 李冠华, 苑琳. 发酵工程实验教程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2024: 189-191.
- LI GH, YUAN L. Experimental tutorial of fermentation engineering[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2024: 189-191 (in Chinese).
- [19] 张慧, 赵恪, 林陈强, 林戎斌, 陈龙军, 陈济琛. 纤维素降解菌的分离筛选及产酶条件优化[J]. 福建农业学报, 2023, 38(9): 1117-1123.
- ZHANG H, ZHAO K, LIN CQ, LIN RB, CHEN LJ, CHEN JC. Isolation and enzymatic activity of cellulose-degrading bacteria[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2023, 38(9): 1117-1123 (in Chinese).
- [20] GOODFELLOW M, KÄMPFER P, BUSSE HJ, TRUJILLO ME, SUZUKI KI, LUDWIG W, WHITMAN WB. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology[M]. New York, NY: Springer New York, 2012.
- [21] 姚义, 吕育财, 龚艳丽, 邓志威, 李宁, 郭金玲, 田毅红, 龚大春. *Clostridium thermocellum* 与 *Bacillus licheniformis* 共培养分解纤维素的性质[J]. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2361-2369.
- YAO Y, LÜ YC, GONG YL, DENG ZW, LI N, GUO JL, TIAN YH, GONG DC. Cellulose degradation by co-cultivation of *Bacillus licheniformis* and *Clostridium thermocellum*[J]. Microbiology China, 2017, 44(10): 2361-2369 (in Chinese).
- [22] 王文凡, 刘银秀, 谢晓杰, 杨健, 赵卓群, 王敏, 郑华宝. 牛粪堆肥中纤维素高效降解菌的筛选与产酶条件优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4796-4811.
- WANG WF, LIU YX, XIE XJ, YANG J, ZHAO ZQ, WANG M, ZHENG HB. Screening of efficient cellulose degrading bacteria in cow manure compost and optimization of enzyme production conditions[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4796-4811 (in Chinese).
- [23] 曹平华, 李晓霞, 李旺, 赵龙妹, 丁轲, 李元晓, 何万领. 1 株烟曲霉产耐热纤维素酶发酵条件优化及酶学性质研究[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(11): 4414-4423.
- CAO PH, LI XX, LI W, ZHAO LM, DING K, LI YX, HE WL. Optimization of fermentation conditions and enzymatic characteristics of the thermophilic cellulase from *Aspergillus fumigatus*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(11): 4414-4423 (in Chinese).
- [24] WOOD TM, BHAT KM. Methods for measuring cellulase activities[M]//Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose. Amsterdam: Elsevier, 1988: 87-112.
- [25] 宋芳芳, 任萍, 徐建良, 王惠松, 林同保. 水稻秸秆在旱作土壤中的降解过程及降解菌剂施用效果[J]. 中国土壤与肥料, 2015(2): 103-110.
- SONG FF, REN P, XU JL, WANG HS, LIN TB. Decomposition process of rice straw in upland soil and effects of stalk-degradable microbial preparation[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2015(2): 103-110 (in Chinese).
- [26] 董辉, 李轩豪, 常静林, 贺欣, 侯沁莲, 龙伟. 枯草芽孢杆菌菌株 CGMCC 12426 的全基因组测序与分析[J]. 中国医学科学院学报, 2019, 41(3): 307-314.
- DONG H, LI XH, CHANG JL, HE X, HOU QL, LONG W. Whole genome sequence determination and analysis of *Bacillus subtilis* strain CGMCC 12426[J]. Acta

- Academiae Medicinae Sinicae, 2019, 41(3): 307-314 (in Chinese).
- [27] ADELKOV J, PATEL BKC. A molecular phylogenetic framework for *Bacillus subtilis* using genome sequences and its application to *Bacillus subtilis* subspecies *stercoris* strain D7XPN1, an isolate from a commercial food-waste degrading bioreactor[J]. 3 Biotech, 2016, 6(1): 96.
- [28] TRÜPER HG, SEVERIN J, WOHLFARTH A, MÜLLER E, GALINSKI EA. Halophily, taxonomy, phylogeny and nomenclature[M]//General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms. Boston, MA: Springer US, 1991: 3-7.
- [29] DRULA E, GARRON ML, DOGAN S, LOMBARD V, HENRISSAT B, TERRAPON N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(D1): D571-D577.
- [30] LARSEN PI, SYDNES LK, LANDFALD B, STRØM AR. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose[J]. Archives of Microbiology, 1987, 147(1): 1-7.
- [31] VREELAND RH. Mechanisms of halotolerance in microorganisms[J]. Critical Reviews in Microbiology, 1987, 14(4): 311-356.
- [32] 南宏伟, 林思祖, 曹光球, 吴小平, 王成伟. 相思树根瘤菌优良抗逆性菌株的筛选[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(3): 139-143.
NAN HW, LIN SZ, CAO GQ, WU XP, WANG CW. Screening of *Rhizobium* strains strong resistance to stresses isolated from *Acacia spp*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(3): 139-143 (in Chinese).
- [33] BHAGAT SA, KOKITKAR SS. Isolation and identification of bacteria with cellulose-degrading potential from soil and optimization of cellulase production[J]. Journal of Applied Biology & Biotechnology, 2021: 154-161.
- [34] NANDIMATH ARUSHA P, KHARAT KIRAN R, GUPTA SHANTI G, KHARAT ARUN S. Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates[J]. African Journal of Microbiology Research, 2016, 10(13): 410-419.
- [35] SADHU S, GHOSH PK, ADITYA G, MAITI TK. Optimization and strain improvement by mutation for enhanced cellulase production by *Bacillus* sp. (MTCC10046) isolated from cow dung[J]. Journal of King Saud University-Science, 2014, 26(4): 323-332.
- [36] MALIK WA, JAVED S. Biochemical characterization of cellulase from *Bacillus subtilis* strain and its effect on digestibility and structural modifications of lignocellulose rich biomass[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 800265.
- [37] RABHA M, DAS D, KONWAR T, ACHARJEE S, SARMAH BK. Whole genome sequencing of a novel *Bacillus thuringiensis* isolated from Assam soil[J]. BMC Microbiology, 2023, 23(1): 91.
- [38] KAMADA M, HASE S, FUJII K, MIYAKE M, SATO K, KIMURA K, SAKAKIBARA Y. Whole-genome sequencing and comparative genome analysis of *Bacillus subtilis* strains isolated from non-salted fermented soybean foods[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0141369.
- [39] ZHANG ZY, RAZA MF, ZHENG ZQ, ZHANG XH, DONG XX, ZHANG HY. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* Z Y-1-1 reveals the genetic basis for its hemicellulosic/cellulosic substrate-inducible xylanase and cellulase activities[J]. 3 Biotech, 2018, 8(11): 465.