

DOI:10.11686/cyxb2024385

http://cyxb.magtech.com.cn

陈丹丹, 王焱, 郭田心, 等. 纤维素降解菌的筛选以及对水稻秸秆的代谢利用. 草业学报, 2025, 34(9): 185—193.

CHEN Dan-dan, WANG Yao, GUO Tian-xin, et al. Screening of cellulose-degrading bacteria involved in metabolic utilization of rice straw. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(9): 185—193.

纤维素降解菌的筛选以及对水稻秸秆的代谢利用

陈丹丹, 王焱, 郭田心, 梁秋雨, 张庆, 骈瑞琪*

(华南农业大学林学与风景园林学院, 广东木本饲料工程技术研究中心, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:为提高秸秆的利用率,从白蚁肠道中通过刚果红初筛、滤纸降解复筛试验筛选到了两株纤维素降解菌,经NCBI同源序列比对百分比分别鉴定为沙福芽孢杆菌(BS)和伊朗纤维单胞菌(CE),其内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶活力测定结果分别为0.102、0.321、0.112 U·mL⁻¹和0.202、0.434、0.131 U·mL⁻¹。两株菌的滤纸发酵差异代谢物主要是氨基酸及其代谢产物、苯及其衍生物、醛酮酯类、生物碱、有机酸及其衍生物和杂环化合物等物质。其差异代谢途径以苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成和芳香族化合物的降解等为主。以水稻秸秆为唯一碳源培养沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌14 d后,秸秆出现不同程度降解,与对照组相比,沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌处理下秸秆的酸性洗涤纤维(48.80%、35.43% DM)和半纤维素含量(19.90%、17.53% DM)以及可溶性碳水化合物含量(0.11%、0.18% DM)均显著降低,伊朗纤维单胞菌处理下秸秆的失重率(43.12% DM)显著增加、中性洗涤纤维含量(52.95% DM)显著降低。

关键词:纤维素降解菌;滤纸;水稻秸秆

Screening of cellulose-degrading bacteria involved in metabolic utilization of rice straw

CHEN Dan-dan, WANG Yao, GUO Tian-xin, LIANG Qiu-yu, ZHANG Qing, PIAN Rui-qi*

College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangdong Province Research Center of Woody Forage Engineering Technology, Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, Guangzhou 510642, China

Abstract: To enhance the utilization rate of straw, two cellulose-degrading bacteria were isolated from the intestinal tract of termites. The bacteria were initially screened using Congo red and subsequently re-screened with a filter paper degradation test. They were identified as *Cellulomonas iranensis* (CE) and *Bacillus safensis* (BS) through NCBI homologous sequence alignment. The enzymatic activities of endoglucanase, exoglucanase, and β -glucosidase were quantified to two bacterial species. The measured activities for BS were 0.102, 0.321, and 0.112 U·mL⁻¹, respectively, whereas those for CE were 0.202, 0.434, and 0.131 U·mL⁻¹, respectively. The differential metabolites identified during filter paper fermentation by BS and CE were primarily amino acids and their metabolites, benzene and its derivatives, aldehydes, ketones, esters, alkaloids, organic acids and their derivatives, as well as heterocyclic compounds. The differential metabolic pathways were dominated by the biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, as well as the degradation of aromatic compounds. After 14 days fermentation, BS and CE were cultivated with rice (*Oryza sativa*) straw as the sole carbon source. The straw was

收稿日期:2024-10-10;改回日期:2024-11-28

基金项目:广州市科技计划项目(2024E04J0301),广东长隆慈善基金会(CLPF2021007Z)和国家重点研发项目(2022YFE0111000-2)资助。

作者简介:陈丹丹(1997—),女,贵州遵义人,在读博士。E-mail: 1744301540@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: rqpian2003@scau.edu.cn

degraded to varying degrees. Both of BS and CE significantly ($P < 0.05$) reduced the contents of acid detergent fiber (48.80%, 35.43% DM), hemicellulose (19.90%, 17.53% DM) and water soluble carbohydrate (0.11%, 0.18% DM). In addition, the inoculation of CE also obviously increased ($P < 0.05$) the weight loss rate of straw (43.12% DM) and reduced the content of neutral detergent fiber (52.95% DM).

Key words: cellulose-degrading bacteria; filter paper; rice straw

作物秸秆作为农作物副产物,每年全球大约会产生50亿t^[1]。其中,水稻(*Oryza sativa*)是我国主要的粮食作物之一,据统计2021年我国的水稻种植面积高达2992万hm²,其中产生的副产物(水稻秸秆)数量高达2.3亿t,占总农作物秸秆比例的22.4%^[2-3]。如此巨大的生物质资源通常通过填埋、焚烧等传统的方法进行处理,这些不当的方式在一定程度上增加了环境的降解压力,同时返回田间的新鲜秸秆由于不能迅速被分解还会使得土壤当中滋生大量的病虫害^[4]。如果露天焚烧则会产生大量的烟雾,从而导致严重的雾霾问题,且直接排放到大气中的二氧化碳(CO₂)还会导致全球变暖^[5]。因此为避免秸秆的不当处理给环境造成负担以及实现资源的有效整合,近年来对秸秆的利用呈现多元化的态势。这主要是秸秆中的木质纤维素是众多工艺的低成本原料来源,它们降解后的产物可用于多个领域如粪肥、基料、饲料、能源等^[6-10]。在对纤维素降解利用的预处理当中,通过微生物酶促水解来处理纤维素是实现全球碳循环的关键步骤^[11]。一方面,微生物具有生长周期短、可重复利用、环境适应范围广等应用优势,另一方面,相比爆破、碾碎等物理处理,微生物可快速繁殖,保藏菌种后不需要大量持续的资金投入,从而降低了生产成本;与酸、碱添加等化学处理相比,微生物产酶安全性高且无副产物^[12-13]。为此,从自然界中筛选具备降解纤维素功能的微生物成为当前比较普遍的一种处理农业副产物的方式^[14]。

纤维素降解菌是一类能产生纤维素复合酶的功能性微生物总称^[15]。所产生的纤维素酶是糖基水解酶家族的一员,根据酶的作用位点及功能的不同被分为了3种基本类型的协同酶类:内切葡聚糖酶(endoglucanase)、外切葡聚糖酶(exoglucanase)和 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)^[16]。其依据是内切葡聚糖酶作用于纤维素分子的无定形区域,在内部随机将葡聚糖长链切断成短链,释放长度较短的低聚链;外切葡聚糖酶再攻击这些低聚链的末端并缩短其长度,将其水解成纤维二糖或更短的低聚糖;最后再由 β -葡萄糖苷酶将纤维二糖水解开成葡萄糖等单糖^[17]。在自然环境中,能降解纤维素的微生物种类繁多,白蚁肠道被认为是能够降解木质纤维素生物质不同种类细菌的储存库,因此,从白蚁肠道中分离木质纤维素降解细菌可能会发现在木质纤维素生物转化中起重要作用的新型细菌^[18]。Thayer^[19]已经从木材喂养的白蚁中分离出来能降解纤维素的细菌:粘质沙雷氏菌和蜡样芽孢杆菌。也有研究学者从白蚁肠道细菌中分离出各种能降解纤维素的酶,如纤维二糖水解酶、羧甲基纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶和 β -木糖苷酶,它们将纤维素和半纤维素链降解为还原性糖^[20-21]。尽管在白蚁肠道中的微生物具有降解纤维素的能力,但关于这些微生物如何利用纤维素满足自身生长代谢的过程尚未可知。此外,降解后产生的葡萄糖等本身可作为微生物生长利用的单糖,但是否能够产生其他功能性物质也不清楚。因此,为探究不同菌株对纤维素的降解能力、将纤维素降解成单糖的过程中代谢物差异以及应用过程中对秸秆的降解效果,本次试验从白蚁肠道中筛选具有高效降解纤维素的菌株,并分析它们降解纤维素后的差异代谢物和秸秆降解效果,为后续该菌剂在功能上的进一步挖掘以及应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 纤维素降解菌的初筛

2023年1月从华南农业大学林学与风景园林学院昆虫生物防治实验室取100只白蚁进行养殖后,在超净工作台内用75%酒精消毒5min后收集新鲜的白蚁肠道组织,放置于研磨仪(TGrinder H24R,北京)中加入10mL 0.9%生理盐水研磨成匀浆^[22]。对菌液进行10倍梯度逐层稀释至10⁻⁷梯度,随后分别取100 μ L各梯度菌液涂布到LB固体培养基上(蛋白胨10.0g \cdot L⁻¹,氯化钠5.0g \cdot L⁻¹,葡萄糖1.0g \cdot L⁻¹,酵母膏粉5.0g \cdot L⁻¹,琼脂15.0g \cdot L⁻¹,调节pH至6.8~7.2)^[23]。待菌液放干后倒置放于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱培养2d后,挑取单菌落划线培养,二代划线后转移至LB液体培养基(蛋白胨10.0g \cdot L⁻¹,氯化钠5.0g \cdot L⁻¹,葡萄糖1.0g \cdot L⁻¹,酵母膏粉5.0g \cdot L⁻¹,调节

pH至6.8~7.2)中培养1 d。取出上述菌液以0.5 μL根据三点法接种到羧甲基纤维素钠固体培养基(磷酸氢二钾2.5 g·L⁻¹,磷酸氢二钠2.5 g·L⁻¹,羧甲基纤维素钠20.0 g·L⁻¹,蛋白胨2.0 g·L⁻¹,酵母膏浸粉0.5 g·L⁻¹,调节pH至6.8~7.2)中进行培养,待长出菌落后利用刚果红染色,根据菌株的透明圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)大小(比值越大,说明其降解作用越好)来初步筛选纤维素降解菌^[24]。

1.2 纤维素降解菌的复筛

初筛的具有透明圈的菌液以2%的添加量接种到20 mL灭菌的滤纸崩解培养基(1 cm×6 cm不含淀粉的滤纸3条,磷酸二氢钾1.0 g·L⁻¹,七水硫酸镁0.4 g·L⁻¹,硫酸铵3.0 g·L⁻¹,酵母膏0.1 g·L⁻¹,调节pH至7.2~7.5)中,置于恒温摇床(37℃,180 r·min⁻¹)培养,以未接种菌株的培养液作空白对照,每隔24 h观察滤纸的崩解情况与对照组的差异^[25]。根据48 h各菌株的滤纸崩解状态对纤维素降解菌进行复筛。

1.3 纤维素降解菌的菌种鉴定

利用SK8255 Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒(上海)所获得的纤维素降解菌的DNA,细菌通用引物27F(AGTTTGATCMTGGCTCAG);1492R(GGTTACCTTGTTACGACTT)扩增16S rDNA序列。PCR反应程序为:94℃,4 min,预变性;94℃,45 s,变性;55℃,45 s,退火;72℃,1 min,延伸,共34个循环;72℃,10 min,修复延伸;4℃,终止反应,PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测跑出清晰条带后,送至擎科生物科技有限公司进行检测,测序结果经过NCBI网站物种同源性比对百分比后确定菌株种属^[26]。

1.4 纤维素降解菌的酶活力测定

取7个10 mL的离心管并编号,配置成不同含量的葡萄糖溶液,采用3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid,DNS)法测定540 nm波长下不同葡萄糖溶液的吸光度值并绘制葡萄糖标准曲线和线性回归方程^[27]。随后,按2%的接种量将生长至对数期的新鲜菌液接种到发酵产酶培养基上,以37℃,180 r·min⁻¹的转速培养2 d后,参照Li等^[28]的研究方法测定伊朗纤维单胞菌(*Cellulomonas iranensis*,CE)和沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*,BS)的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶活力。

1.5 纤维素降解菌的生理生化鉴定

吸取生长至对数期的纤维素降解菌[光密度(optical density,OD)=600]菌液至平板上进行革兰氏染色,在光学显微镜(Motic,BA210 G62clGBb,中国)下观察菌株的形态特征以及颜色变化。同时吸取上述菌液进行其他生理生化鉴定试验(过氧化氢酶活性、运动性、明胶化、MR、V.P、淀粉水解、硝酸盐还原、柠檬酸盐利用试验)^[29]。将100 μL菌液涂布在碳源基本测定培养基[碳源10 g·L⁻¹(鼠李糖、阿拉伯糖、木糖醇、七叶苷、蔗糖、水杨苷、壳聚糖、葡萄糖、山梨醇、棉子糖、麦芽糖、海藻糖、蜜三糖、半乳糖、菊糖、果糖、纤维二糖、松三糖),磷酸二氢铵0.5 g·L⁻¹,磷酸二氢钠0.5 g·L⁻¹,七水硫酸镁0.2 g·L⁻¹,磷酸二氢钾0.5 g·L⁻¹,氯化钙0.1 g·L⁻¹]上测定纤维素降解菌对不同碳源的利用^[30]。

1.6 纤维素降解菌的滤纸代谢物分析

将离心保存的滤纸发酵液从-80℃冰箱中取出,待样本解冻后,涡旋混匀,取50 μL于离心管中;加入20%乙腈甲醇内标提取液150 μL,涡旋3 min,在4℃条件下,12000 r·min⁻¹离心10 min;取上清液150 μL到新的离心管中,-20℃冰箱中静置30 min;在4℃条件下,12000 r·min⁻¹再离心3 min,取上清液120 μL上机分析。色谱条件:色谱柱(Waters ACQUITY Premier HSS T3 Column 1.8 μm,2.1 mm×100.0 mm);流动相A为0.1%甲酸/水;流动相B为0.1%甲酸/乙腈;仪器柱温为40℃;流速为0.4 mL·min⁻¹;进样量为4 μL,质谱条件参照Lai等^[31]的方法。

1.7 纤维素降解菌有氧发酵水稻秸秆

2023年11月于华南农业大学启林试验田采集稻穗收获后田间自然晾晒两周的枯黄水稻秸秆,带回实验室后立即用铡刀切碎至3~5 cm。用烘箱65℃烘干至恒重,无菌超净工作台条件将菌液按2%添加量添加到50 mL灭菌后的秸秆降解培养基中(5 cm长烘干的水稻秸秆4根,磷酸二氢钾1.0 g·L⁻¹,七水硫酸镁0.4 g·L⁻¹,硫酸铵3.0 g·L⁻¹,酵母膏0.1 g·L⁻¹,调节pH至7.2~7.5),并记录发酵前秸秆的重量,37℃、180 r·min⁻¹条件下每隔24 h观察秸秆状态,待秸秆出现明显降解时结束培养。取出剩余秸秆烘干后分析其失重率;应用Ringbio滤袋技术纤

维分析仪(中国)测定粗纤维、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、半纤维素含量;采用蒽酮比色法测定可溶性碳水化合物含量^[32]。

1.8 数据处理与统计分析

所有统计分析均使用SPSS 23.0版本软件完成,采用独立样本 *T* 检验对不同纤维素降解菌处理的指标平均值进行差异分析($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),所有的图均使用 Origin 2019 软件制作,并用 AI 软件处理后导出。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的筛选

2.1.1 纤维素降解菌刚果红染色 筛选的 198 株纤维素降解菌中挑选 D/d 较大的两株菌(图 1),其中 1 号菌的 D/d 平均值为 6.36, 2 号菌的 D/d 平均值为 8.59。

2.1.2 纤维素降解菌 48 h 滤纸降解效果 对初筛的纤维素降解菌以滤纸为唯一碳源进行培养,培养 48 h 后 1 号菌处理的滤纸变薄,周围出现绒毛状,培养基变浑浊。含有 2 号菌的滤纸培养基中滤纸被完全降解,细菌大量生长,培养基呈淡黄色(图 2)。

2.1.3 纤维素降解菌的菌种和生理生化鉴定 菌种鉴定结果表明,1 号菌株为沙福芽孢杆菌,2 号菌株为伊朗纤维单胞菌(图 3)。

其中,沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌均属于革兰氏阳性菌(图 3),两株菌的生理生化结果表明(表 1):二者过氧化氢酶、运动性、甲基红试验结果均为阳性,都能利用棉子糖、蔗糖、木聚糖、乳糖、菊糖、纤维二糖、麦芽糖、山梨醇、海藻糖、葡萄糖、松三糖、密二糖。此外,沙福芽孢杆菌还能利用阿拉伯糖、D-水杨苷、柠檬酸盐、D-果糖。伊朗纤维单胞菌则能利用 L-鼠李糖。两株菌的明胶化、硝酸盐还原、V-P 试验结果均为阴性且都不能利用淀粉和壳聚糖。

2.1.4 葡萄糖标准曲线的绘制以及纤维素酶活力

以葡萄糖的含量为横坐标,所测的 OD 值为纵坐标绘制葡萄糖标准曲线(图 4),以 3 次重复的均值得到线性回归方程 $y = 2.675x - 0.02155$,线性相关系数 $R^2 = 0.996$,表明该标准曲线的线性良好,达到基本要求。

沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶活力测定结果分别为 0.102、0.321、0.112 $U \cdot mL^{-1}$ 和 0.202、0.434、0.131 $U \cdot mL^{-1}$,两株菌的内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶活力均有较大的差异(表 2)。

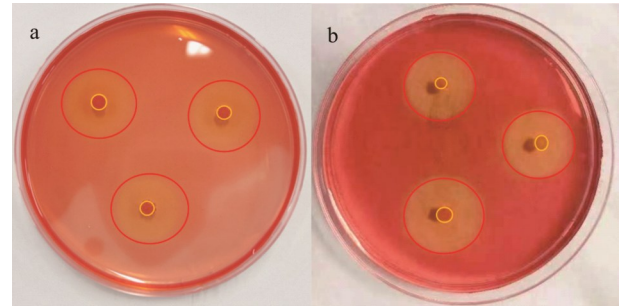


图 1 纤维素降解菌的刚果红染色结果

Fig. 1 Congo red staining results of cellulose-degrading bacteria

a: 1 号菌 No.1 bacterium; b: 2 号菌 No.2 bacterium. 黄色圈: 菌落直径(d); 红色圈: 透明圈直径(D)。Yellow circle: Colony diameter (d); Red circle: Transparent circle diameter (D).

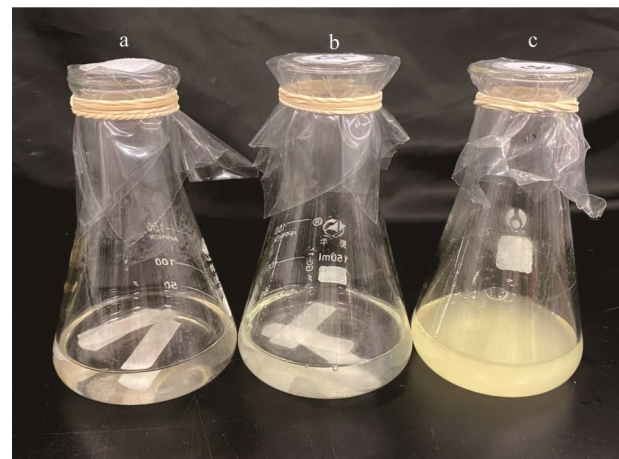


图 2 培养 2 d 后纤维素降解菌的滤纸降解情况

Fig. 2 Filter paper degradation of cellulose-degrading bacteria after 2 days of cultivation

a: 对照组 Control group; b: 1 号菌 No.1 bacterium; c: 2 号菌 No.2 bacterium.

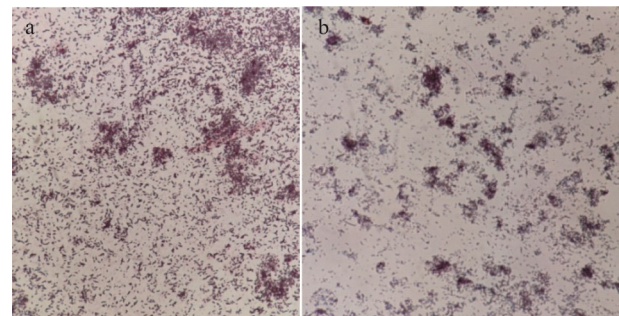


图 3 沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌的革兰氏染色结果

Fig. 3 Gram staining results of *B. safensis* and *C. iranensis*

a: 沙福芽孢杆菌 *B. safensis*; b: 伊朗纤维单胞菌 *C. iranensis*.

表 1 沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌的生理生化结果

Table 1 Physiological and biochemical results of *B. safensis* and *C. iranensis*

项目 Item	沙福芽孢杆菌 <i>B. safensis</i>	伊朗纤维单胞菌 <i>C. iranensis</i>	项目 Item	沙福芽孢杆菌 <i>B. safensis</i>	伊朗纤维单胞菌 <i>C. iranensis</i>
革兰氏 Gram	+	+	D-水杨苷 D-salicylic acid glycoside	+	-
过氧化氢酶 Catalase	+	+	纤维二糖 Cellobiose	+	+
运动性 Motile	+	+	柠檬酸盐 Citrate	+	-
淀粉 Starch	-	-	麦芽糖 Maltose	+	+
甲基红试验 Methylred test	+	+	山梨醇 Sorbitol	+	+
明胶化 Gelatinization	-	-	海藻糖 Trehalose	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-	葡萄糖 Glucose	+	+
棉子糖 Raffinose	+	+	D-果糖 D-fructose	+	-
蔗糖 Sucrose	+	+	L-鼠李糖 L-rhamnose	-	+
木聚糖 Xylan	+	+	松三糖 Melezitose	+	+
乳糖 Lactose	+	+	密二糖 Melibiose	+	+
菊糖 Inulin	+	+	壳聚糖 Chitosan	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	+	-	V-P 试验 V-P test	-	-

+: 阳性 Positive; -: 阴性 Negative.

2.2 纤维素降解菌液态发酵秸秆后纤维含量变化

2.2.1 伊朗纤维单胞菌和沙福芽孢杆菌的差异代谢物 对伊朗纤维单胞菌和沙福芽孢杆菌菌株的滤纸差异代谢产物进行分析(图 5),共检测到 2485 种代谢物,由两种菌株所产生代谢物之间相对含量差异倍数的对数值可知,相对于沙福芽孢杆菌降解滤纸后的代谢产物而言,伊朗纤维单胞菌中有 76 种代谢物含量显著高于沙福芽孢杆菌所产生的对应产物($P < 0.05$),而有 48 种代谢物含量显著低于沙福芽孢杆菌所产生的对应产物($P < 0.05$)。

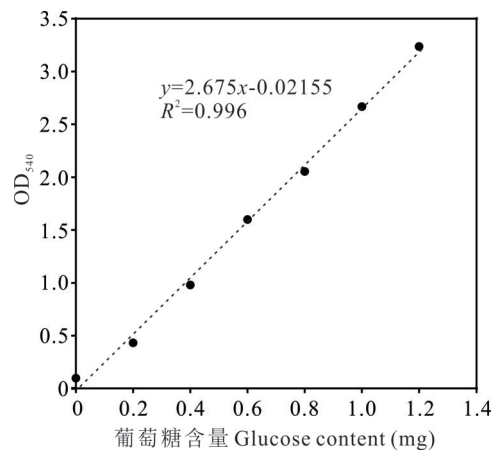


图 4 葡萄糖标准曲线

Fig. 4 Glucose standard curve

表 2 沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌纤维素酶的活力

Table 2 Enzyme activities of cellulases from *B. safensis* and *C. iranensis* ($n=3, U \cdot mL^{-1}$)

编号 Number	菌种 Strains	内切葡聚糖酶 Endoglucanase	外切葡聚糖酶 Exoglucanase	β -葡萄糖苷酶 β -glucosidase
1	沙福芽孢杆菌 <i>B. safensis</i>	0.102 ± 0.003	0.321 ± 0.002	0.112 ± 0.004
2	伊朗纤维单胞菌 <i>C. iranensis</i>	0.202 ± 0.003	0.434 ± 0.001	0.131 ± 0.002

两种菌株所产生的差异代谢物主要是氨基酸及其代谢产物、苯及其衍生物、醛酮酯类、生物碱、有机酸及其衍生物和杂环化合物(图 6)。

对沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌降解滤纸后代代谢物做 KEGG 富集分析,结果(图 7)表明,两种菌株将滤纸降解的过程中,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成(phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis)、芳香

族化合物的降解 (degradation of aromatic compounds)、苯甲酸盐降解 (benzoate degradation)、胆汁分泌 (bile secretion) 和苯甲酸家族 (benzoic acid family) 等代谢途径有显著差异。

2.2.2 伊朗纤维单胞菌和沙福芽孢杆菌发酵秸秆后纤维成分的变化 秸秆取出后烘干至恒重, 分析其失重率、纤维和可溶性碳水化合物含量 (表3), 与对照组相比, 伊朗纤维单胞菌对秸秆的粗纤维、中性洗涤纤维均有显著性影响 ($P < 0.05$), 对失重率、酸性洗涤纤维、半纤维素和可溶性碳水化合物有极显著影响 ($P < 0.01$)。沙福芽孢杆菌显著减少了酸性洗涤纤维、半纤维素和可溶性碳水化合物含量 ($P < 0.05$)。

3 讨论

沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌虽然都具有对纤维素的降解能力, 但是它们的纤维素复合酶活性各有不同, 且由于其物种的差异, 它们对糖的代谢途径可能有很大的差异。滤纸被降解成单糖后, 为满足生

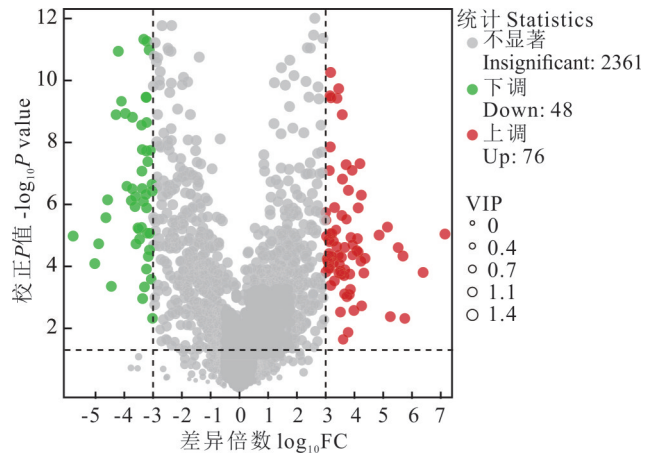


图5 沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌的差异代谢物

Fig. 5 Differential metabolites between *B. safensis* and *C. iranensis*

红色: 伊朗纤维单胞菌相对沙福芽孢杆菌显著上调的代谢物; 绿色: 伊朗纤维单胞菌相对沙福芽孢杆菌显著下调的代谢物; 灰色: 两株菌无显著差异的代谢物; VIP: 变量重要性投影; FC: 差异倍数。Red: Metabolites significantly upregulated by *C. iranensis* relative to *B. safensis*; Green: Metabolites significantly downregulated by *C. iranensis* relative to *B. safensis*; Gray: No significant differences in metabolites between the two strains; VIP: Variable importance in the projection; FC: Fold change. VIP value > 1 ; $P < 0.05$; $|\log_2 FC| > 3$.

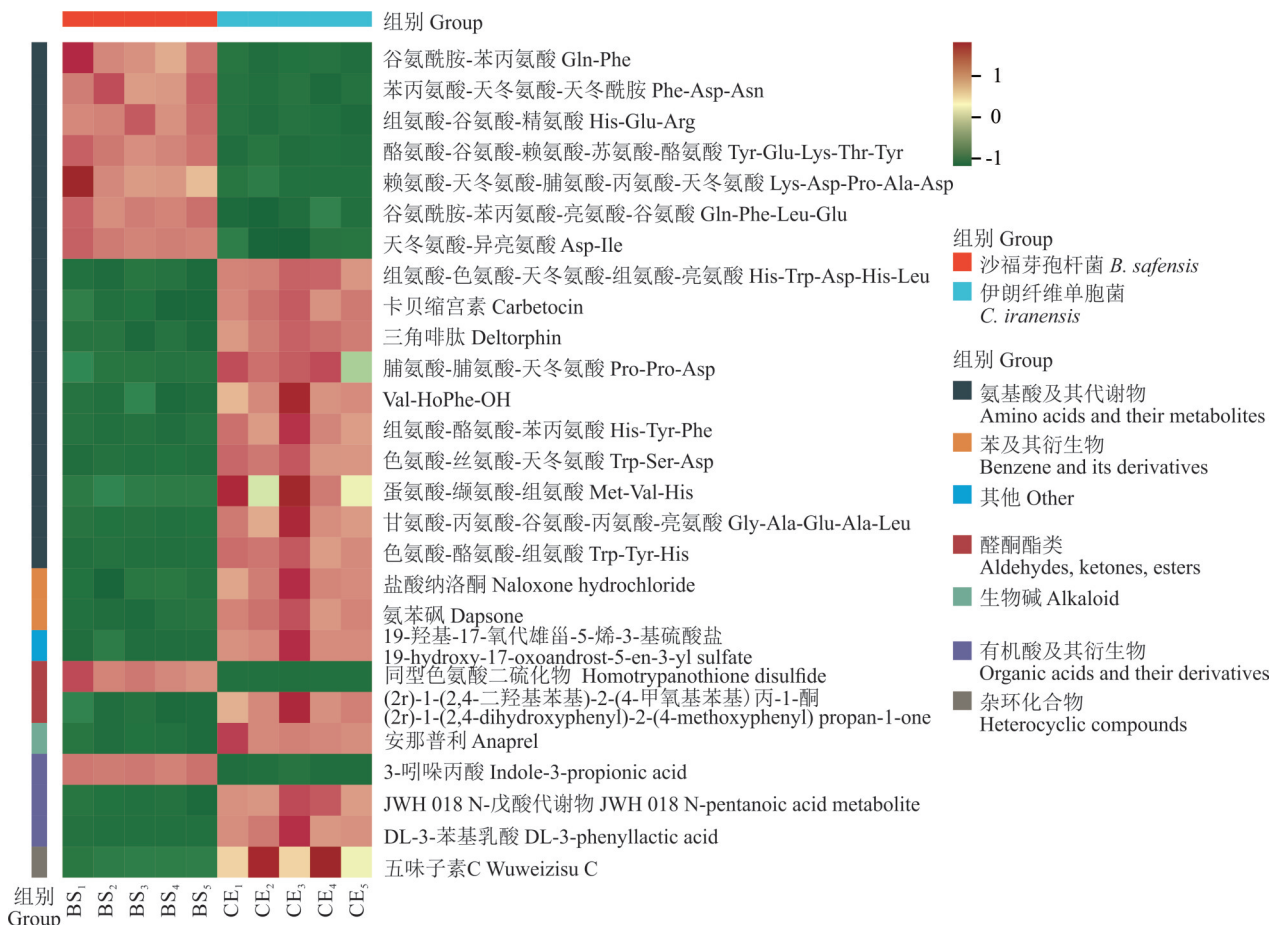


图6 沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌降解滤纸后差异显著重要代谢物热图

Fig. 6 Thermogram of significant differences in important metabolites after degradation of filter paper by *B. safensis* and *C. iranensis*

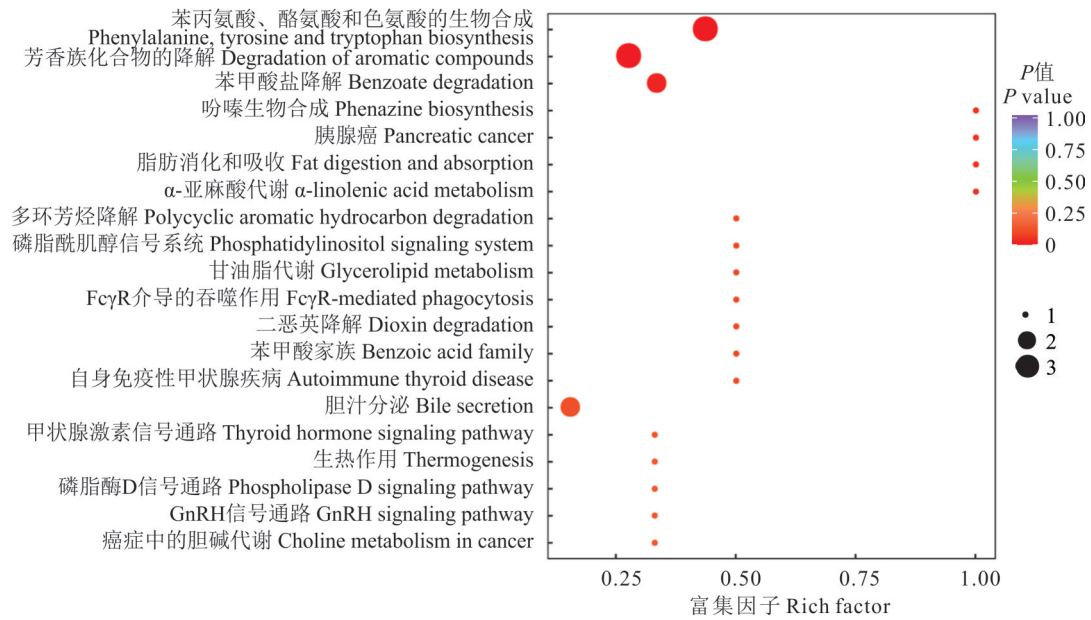


图 7 沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌降解滤纸后代谢物富集分析

Fig. 7 Enrichment analysis of metabolites after degradation of filter paper by *B. safensis* and *C. iranensis*

横坐标表示每个通路对应的富集因子,纵坐标为通路名称(按照 P 值排序),点的颜色为 P 值大小,越红表示富集越显著。点的大小代表富集到差异代谢物的个数。The abscissa represents the rich factor to each pathway, the ordinate is the pathway name (sorted by P value), and the color of the point is the P -value, and the redder the point is, the more significant the enrichment. The size of the dot represents the number of differential metabolites enriched.

表 3 秸秆液态发酵 14 d 后纤维含量变化

Table 3 Changes in fiber content of straw after 14 days of liquid fermentation ($n=3$, % DM)

处理 Treatment	失重率 Weight loss rate	粗纤维 Crude fibre	中性洗涤纤维 Neutral detergent fibre	酸性洗涤纤维 Acid detergent fibre	半纤维素 Hemicellulose	可溶性碳水化合物 Water soluble carbohydrate
对照 Control	29.18±0.91b	45.34±0.84a	69.50±0.45a	51.41±0.43a	26.81±0.03a	0.99±0.01a
沙福芽孢杆菌 <i>B. safensis</i>	32.30±0.52b	45.68±0.79a	70.91±0.31a	48.80±0.30b	19.90±0.52b	0.11±0.03b
伊朗纤维单胞菌 <i>C. iranensis</i>	43.12±0.19a	36.72±0.65b	52.95±0.45b	35.43±0.34b	17.53±0.49b	0.18±0.01b
P 值 P value	<0.01	0.03	0.02	<0.01	<0.01	<0.01

DM: 干物质 Dry matter. 同列不同小写字母表示有显著差异 ($P<0.05$)。Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

长需要,沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌会进一步对糖类代谢产物进行利用。可能是菌种的不同导致它们中的部分代谢产物差异较大。在这些差异代谢物中氨基酸及其代谢物、醛酮酯类、苯及其衍生物、有机酸及其衍生物、杂环化合物常被认为是发酵物中的风味物质。侯冬岩等^[33]发现酯类化合物是白酒中重要的风味来源,而醛、酮、酯类是腾鳌老窖白酒的主要成分,这些成分的多少和比例对白腾鳌老窖白酒的风味、滋味及健康作用有着十分重要的影响。原苗苗等^[34]利用 4 种商业酵母对哈密瓜 (*Cucumis melo*) 白兰地的挥发性风味成分进行检测发现主要有 190 种香气成分,其中酯类 38 种、醛酮类 4 种、苯环类化合物 7 种,这些成分在不同酵母发酵的哈密瓜白兰地中的数量和含量也有所差异。汪帮东等^[35]发现红曲霉发酵液共有 42 种可挥发性成分,其中酯类 11 种、醛酮类 7 种、氨基酸 1 种。沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌对滤纸降解后,共有 17 种氨基酸及其代谢物、2 种苯及其衍生物、3 种有机酸及其衍生物、2 种醛酮酯类化合物、1 种杂环类化合物有明显差异,这些物质可能影响着滤纸发酵物的风味。KEGG 结果显示两种菌株主要的差异代谢途径中包含了苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成与芳香族化合物的降解。而苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸又是 3 种风味氨基酸^[36]。芳香族化合物则是一类具有“芳香”气味的

化合物,代谢途径的差异可能是造成两种细菌生命活动中差异代谢物的原因之一。

秸秆的组成复杂,除了纤维素以外,它还含有其他营养成分及化合物^[36]。因此灭菌处理的水稻秸秆在摇床培养14 d后对照组的干物质损失率达到了29.84%,这可能是高温处理过程中部分营养物质转移到了培养基中。纤维素和半纤维素作为多糖,在微生物的酶解作用下可将水稻秸秆中的结构性碳水化合物转化为可溶性碳水化合物^[37]。与对照组相比,虽然添加沙福芽孢杆菌后,干物质损失率、粗纤维、中性洗涤纤维含量没有显著增加,但是显著降低了酸性洗涤纤维和半纤维素含量。通常纤维的降解伴随着单糖类物质含量的增加^[4]。然而添加伊朗纤维单胞菌以后可溶性碳水化合物的含量显著低于对照组,这可能是由于微生物为满足自身的营养需要而将可溶性碳水化合物代谢利用。将伊朗纤维单胞菌接种到秸秆发酵培养基中以后,则表现出了显著的降解纤维的能力,与对照相比,其失重率显著增加,相反,粗纤维、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、半纤维素、可溶性碳水化合物含量均显著降低。

4 结论

从白蚁肠道中筛选到两株均有纤维素降解功能的菌,分别为沙福芽孢杆菌和伊朗纤维单胞菌。两株的滤纸代谢物具有显著差异且均能显著降解秸秆中的纤维成分,其中以伊朗纤维单胞菌的降解效果最佳。

参考文献 References:

- [1] Zhang X, Borjigin Q, Gao J L, *et al.* Community succession and straw degradation characteristics using a microbial decomposer at low temperature. *PLoS One*, 2022, 17(7): e270162.
- [2] Chen D Y, Cheng S, Guo Y F, *et al.* Advances in utilization of rice straw as feed. *Chinese Animal Industry*, 2024(15): 43–44. 陈东颖, 程尚, 郭炎峰, 等. 水稻秸秆饲料化利用研究进展. *中国畜牧业*, 2024(15): 43–44.
- [3] Kou J T, Zhang J X. Effects of adding homo- and hetero-fermentative lactic acid bacteria on nutritional value of rice straw silage feed. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(12): 3980–3987. 寇江涛, 张甲雄. 同/异型乳酸菌添加对水稻秸秆青贮饲料营养价值的影响. *草地学报*, 2024, 32(12): 3980–3987.
- [4] Wei X, Li W, Song Z, *et al.* Straw incorporation with exogenous degrading bacteria (ZJW-6): An integrated greener approach to enhance straw degradation and improve rice growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(14): 7835.
- [5] Gong W B, Zeng Y Y, Li X R, *et al.* Molecular profiling of rice straw degradability discrepancy in *Stropharia rugosoannulata* core germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(45): 25379–25390.
- [6] Kumar A, Pandit S, Sharma K, *et al.* Microbial degradation of cellulose extracted from wheat bran for bioelectricity production using microbial fuel cell. *Process Safety and Environmental Protection*, 2024, 190(11): 574–585.
- [7] Ma Y N, Mongkolthananuk W, Riddech N. Enhancing soil amendment for salt stress using pretreated rice straw and cellulolytic fungi. *Scientific Reports*, 2024, 14(1): 13903.
- [8] Chen X, Liang X, Shi N, *et al.* New wheat straw fermentation feed: recombinant *Schizosaccharomyces pombe* efficient degradation of lignocellulose and increase feed protein. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2024, 55(1): 36–44.
- [9] Gaizauskaite Z, Zvirdauskiene R, Svazas M, *et al.* Optimised degradation of lignocelluloses by edible filamentous fungi for the efficient biorefinery of sugar beet pulp. *Polymers*, 2024, 16(9): 1178.
- [10] Akhlaq M, Uroos M. Evaluating the impact of cellulose extraction via traditional and ionosolv pretreatments from domestic matchstick waste on the properties of carboxymethyl cellulose. *ACS Omega*, 2023, 8(9): 8722–8731.
- [11] Wilson D B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(3): 259–263.
- [12] Chen H, Shi Z H, Wu C H, *et al.* Screening, identification and comparison of enzyme production capacity of cellulose-degrading bacteria from different sources. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(4): 1252–1258. 陈欢, 史子浩, 吴春会, 等. 不同来源纤维素降解菌的筛选、鉴定及产酶能力的比较. *草地学报*, 2024, 32(4): 1252–1258.
- [13] Niu D Z, Zhu P, Pan T T, *et al.* Ensiling improved the colonization and degradation ability of *Irpex lacteus* in wheat straw. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(20): 13668.
- [14] Tachaapaikoon C, Kosugi A, Pason P, *et al.* Isolation and characterization of a new cellulosome-producing *Clostridium thermocellum* strain. *Biodegradation*, 2012, 23(1): 57–68.
- [15] Song K L, Zhou Z C, Leng J H, *et al.* Effects of rumen microorganisms on the decomposition of recycled straw residue. *Journal of Zhejiang University-Science Biomedicine Biotechnology*, 2023, 24(4): 336–344.
- [16] Padhan K, Patra R K, Sethi D, *et al.* Exploitation of cellulose degrading bacteria in bioconversion of agro-wastes.

- Chemosphere, 2024, 347(1): 140654.
- [17] Qu F, Cheng H, Han Z, *et al.* Identification of driving factors of lignocellulose degrading enzyme genes in different microbial communities during rice straw composting. *Bioresource Technology*, 2023, 381(1): 129109.
- [18] Dar M A, Xie R, Pandit R S, *et al.* Exploring the region-wise diversity and functions of symbiotic bacteria in the gut system of wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus*, toward the degradation of cellulose, hemicellulose, and organic dyes. *Insect Science*, 2022, 29(5): 1414–1432.
- [19] Thayer D W. Carboxymethylcellulase produced by facultative bacteria from the hind-gut of the termite *Reticulitermes hesperus*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1978, 106(1): 13–18.
- [20] Dröge S, Fröhlich J, Radek R, *et al.* *Spirochaeta coccooides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 392–397.
- [21] Cho M J, Kim Y H, Shin K, *et al.* Symbiotic adaptation of bacteria in the gut of *Reticulitermes speratus*: low endo-beta-1,4-glucanase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 395(3): 432–435.
- [22] Azhar S, Aihetasham A, Chaudhary A, *et al.* Cellulolytic and ethanologenic evaluation of *Heterotermes indicola*'s gut-associated bacterial isolates. *ACS Omega*, 2024, 9(10): 12084–12100.
- [23] Xiao Y, Li J, Wu P, *et al.* An alkaline thermostable laccase from termite gut associated strain of *Bacillus stratosphericus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 179(5): 270–278.
- [24] Javaheri-Kermani M, Asoodeh A. A novel beta-1,4 glucanase produced by symbiotic *Bacillus* sp. CF96 isolated from termite (*Anacanthotermes*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131(6): 752–759.
- [25] Li H, Zhang M, Zhang Y, *et al.* Characterization of cellulose-degrading bacteria isolated from silkworm excrement and optimization of its cellulase production. *Polymers (Basel)*, 2023, 15(20): 4142.
- [26] Zhang T, Wei S, Liu Y, *et al.* Screening and genome-wide analysis of lignocellulose-degrading bacteria from humic soil. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14(23): 1167293.
- [27] Li J F, Zhao J, Tang X Y, *et al.* Effect of a rumen cellulolytic microbial consortium on the degradation of structural carbohydrate in sterile rice straw silage. *Acta Prataculturae Sinica*, 2022, 31(7): 85–95.
李君凤, 赵杰, 唐小月, 等. 瘤胃纤维素降解菌系对灭菌水稻秸秆结构性碳水化合物降解的影响. *草业学报*, 2022, 31(7): 85–95.
- [28] Li J, Tang X, Zhao J, *et al.* Improvement of fermentation quality and cellulose convertibility of napier grass silage by inoculation of cellulolytic bacteria from Tibetan yak (*Bos grunniens*). *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 130(6): 1857–1867.
- [29] Khosravi F, Khaleghi M, Naghavi H. Screening and identification of cellulose-degrading bacteria from soil and leaves at Kerman province, Iran. *Archives of Microbiology*, 2021, 204(1): 88.
- [30] Rettenmaier R, Gerbault M, Liebl W, *et al.* *Hungateiclostridium mesophilum* sp. nov., a mesophilic, cellulolytic and spore-forming bacterium isolated from a biogas fermenter fed with maize silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(11): 3567–3573.
- [31] Lai J, Li C, Zhang Y, *et al.* Integrated transcriptomic and metabolomic analyses reveal the molecular and metabolic basis of flavonoids in *Areca catechu* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(12): 4851–4862.
- [32] Sun L, Xue Y, Xiao Y, *et al.* Community synergy of lactic acid bacteria and cleaner fermentation of oat silage prepared with a multispecies microbial inoculant. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): 2165.
- [33] Hou D Y, Li T C, Diao Q P, *et al.* Analysis of flavor components in Anshan Laojiao liquor. *Journal of Anshan Normal University*, 2019, 21(6): 32–38.
侯冬岩, 李铁纯, 刁全平, 等. 腾鳌老窖白酒风味成分组成的分析. *鞍山师范学院学报*, 2019, 21(6): 32–38.
- [34] Yuan M M, Zhang J, Sun Y X, *et al.* The influence of four different yeast strains on volatile aroma composition in hamimelon brandy. *The Food Industry*, 2017, 38(5): 309–314.
原苗苗, 张将, 孙玉霞, 等. 4种商业酵母对哈密瓜白兰地挥发性香气成分的影响. *食品工业*, 2017, 38(5): 309–314.
- [35] Wang B D, Li W D, Yang K, *et al.* GC-MS analysis of volatile flavor components in *Monascus purpureus* Went fermentation broth. *Light Industry Science and Technology*, 2020, 36(10): 18–20.
汪帮东, 李文达, 杨康, 等. 红曲霉发酵液可挥发性风味成分的GC-MS分析. *轻工科技*, 2020, 36(10): 18–20.
- [36] Zhu Y W, Lai P L, Wu X X, *et al.* Fluorescence spectroscopy was used to study the interaction of methylene blue with three aromatic amino acids. *Chemical Research and Applications*, 2015, 27(6): 815–821.
朱燕舞, 赖彭亮, 吴笑笑, 等. 荧光光谱法研究亚甲蓝与三种芳香族氨基酸的相互作用. *化学研究与应用*, 2015, 27(6): 815–821.
- [37] Chen L, Hong F, Yang X X, *et al.* Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. *Bioresource Technology*, 2013, 135(5): 464–468.