中国生态农业学报(中英文)
Chinese Journal of Eco-Agriculture
中文核心期刊
中国科技核心期刊
中国精品科技期刊
百种中国杰出学术期刊
中国科学引文数据库源刊

玉米秸秆低温降解复合菌系降解能力及微生物组成研究

青格尔，于晓芳，高聚林，王志刚，胡万吉，闹干朝鲁，王振，胡树平，孙继颖，屈佳伟

引用本文:
青格尔, 于晓芳, 高聚林, 等. 玉米秸秆低温降解复合菌系降解能力及微生物组成研究[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2020, 28(11): 1753–1765.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.200128

(向下翻页，阅读全文)

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

秸秆还田条件下腐熟剂对不同质地土壤真菌多样性的影响

Effect of straw maturing agents on fungal diversity in soil with different textures under returned straw conditions

中国生态农业学报(中英文). 2020, 28(7): 1061–1071 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.190900

施肥及秸秆还田对砂姜黑土细菌群落的影响

Effects of fertilization and straw incorporation on bacterial communities in lime concretion black soil

中国生态农业学报. 2015, 23(10): 1302–1311 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.150267

外源腐解微生物的物种组合对土壤微生物群落结构及代谢活性的影响

Effects of species–combined exogenous decomposing micro–organisms on soil microbial community structure and metabolic activity

中国生态农业学报. 2018, 26(7): 1056–1066 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.171216

玉米秸秆生物炭对褐土微生物功能多样性及细菌群落的影响

Effect of corn–stalk biochar on soil microbial functional diversity and bacterial community in cinnamon soils

中国生态农业学报. 2016, 24(6): 736–743 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.151212

不同秸秆还田方式对和田风沙土土壤微生物多样性的影响*

Effectsofstrawincorporationmodesonmicrobialactivityandfunctionaldiversityinsandysoil

中国生态农业学报. 2016, 24(4): 489–498 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.150882

中国生态农业学报(中英文) 2020 年 11 月 第 28 卷 第 11 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Nov. 2020, 28(11): 1753−1765

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.200128

青格尔,于晓芳, 高聚林, 王志刚, 胡万吉, 闹干朝鲁, 王振, 胡树平, 孙继颖, 屈佳伟. 玉米秸秆低温降解复合菌系降解能力及微生物组成研究[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2020, 28(11): 1753−1765

Qinggeer, YU X F, GAO J L, WANG Z G, HU W J, Naoganchaolu, WANG Z, HU S P, SUN J Y, QU J W. Straw degradation ability and composition of microbial consortium for corn straw decomposition at low temperature[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2020, 28(11): 1753−1765

玉米秸秆低温降解复合菌系降解能力及微生物组成研究*

青格尔[1,2], 于晓芳[1,2**], 高聚林[1,2**], 王志刚[1,2], 胡万吉[1], 闹干朝鲁[2,3], 王 振[2,3], 胡树平[2,4], 孙继颖[1,2], 屈佳伟[1,2]

(1. 内蒙古农业大学农学院 呼和浩特 010019; 2. 内蒙古自治区作物栽培与遗传改良重点实验室 呼和浩特 010019; 3. 内蒙古农业大学园艺与植保学院 呼和浩特 010019; 4. 内蒙古农业大学职业技术学院 包头 014100)

摘 要: 根据还田秸秆配施尿素的生产实际, 对玉米秸秆低温高效降解复合菌系 GF-20 进行氮源培养基驯化, 探明其菌种组成和功能多样性及其与菌源菌种结构差异, 完善复合菌系筛选方法, 促进其开发利用。本文以低温高效降解复合菌系 GF-20 为研究对象, 在硫酸铵和尿素不同配比下连续继代培养 10 代, 获得不同氮源菌系(硫酸铵处理 N1, 硫酸铵和尿素混合处理 N2-N5, 尿素处理 N6), 测定其玉米秸秆降解率, 评价复合菌系秸秆降解效率; 采用 MiSeq 高通量测序对菌源土壤样品及不同氮源下继代培养的复合菌系菌种组成和功能多样性进行研究。结果显示 N2 处理玉米秸秆降解率显著高于其他处理; 菌源土壤的 Alpha 多样性指数显著高于继代培养后的复合菌系, 不同处理间 N2 处理显著高于其他氮处理; 菌源和复合菌间以及不同氮处理间菌种组成具有显著差异, N2 处理菌种组成多样性较高, 菌群结构更加丰富、均匀, 且碳水化合物的代谢通路丰度较高。菌源经限制性继代筛选后得到了参与玉米秸秆降解过程的功能菌, 能有效提高秸秆降解率, 其在硫酸铵和尿素氮源为 0.16%+0.04%的条件下, 菌系的秸秆降解效率较高, 这为复合菌的生产实际开发利用提供了理论依据。

关键词: 菌源; 复合菌系; 氮源; 高通量测序; 菌种组成多样性; 玉米秸秆降解

中图分类号: S145.6 开放科学码(资源服务)标识码(OSID):

Straw degradation ability and composition of microbial consortium for corn straw decomposition at low temperature*

Qinggeer[1,2], YU Xiaofang[1,2**], GAO Julin[1,2**], WANG Zhigang[1,2], HU Wanji[1], Naoganchaolu[2,3], WANG Zhen[2,3], HU Shuping[2,4], SUN Jiying[1,2], QU Jiawei[1,2]

* 国家自然科学基金项目(31760353)、内蒙古自然基金项目(2020MS03086, 2018ZD02)、国家重点研发计划项目(2017YFD0300804)、国家玉米产业技术体系项目(CARS-02-63)、农业部华北黄土高原地区作物栽培科学观测实验站(25204120)和内蒙古农业大学高层次人才引进科研启动项目(NDYB2016-15)资助

** 通信作者: 于晓芳, 主要从事作物生理生态研究, E-mail: yuxiaofang75@163.com; 高聚林, 主要从事作物生理生态研究, E-mail: nmgaojulin@163.com
青格尔, 主要从事玉米生理生态研究。E-mail: qinggeer001@163.com

收稿日期: 2020-02-26 接受日期: 2020-06-21

* This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31760353), the Inner Mongolia Natural Sciences Foundation (2020MS03086, 2018ZD02), the National Key Research and Development Project of China (2017YFD0300804), the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-02-63), the Crop Science Observation & Experiment Station in Loess Plateau of North China, Ministry of Agriculture, China (25204120) and the Advanced Talented Scholars of Inner Mongolia Agricultural University, China (NDYB2016-15).

** Corresponding authors: YU Xiaofang, E-mail: yuxiaofang75@163.com; GAO Julin, E-mail: nmgaojulin@163.com

Received Feb. 26, 2020; accepted Jun. 21, 2020

(1. Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China; 2. Key Laboratory of Crop Cultivation and Genetic Improvement in Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010019, China; 3. Horticulture and Plant Protection College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China; 4. Vocational and Technical College, Inner Mongolia Agricultural University, Baotou 014100, China)

Abstract: It is common practice to return field straw with urea to accelerate decomposition. To improve the microbial screening methodology and investigate the microbes responsible for decomposition of corn straw, nitrogen acclimatization of the microbial consortium GF-20 (GF-20) was performed. Compositional differences in the cultured microbial consortium and the microbe source were also evaluated. GF-20 was cultured until the 10th generation in variable nitrogen conditions [ammonium sulfate (N1), mixtures of ammonium sulfate and urea (N2-N5), and urea (N6)]. The corn straw decomposition ratio was determined to estimate the activity of the composite microbial system, and the composition diversity and function were analyzed by MiSeq high-throughput sequencing. The results showed that the N2 degradation rate was significantly higher than the other treatments. The bacterial source alpha diversity index (ADI) was significantly higher than the cultured microbial consortium, and the N2 ADI was significantly higher than the other nitrogen treatments. The bacterial composition also significantly differed between the source and consortium, as well as among the nitrogen treatments. The N2 treatment yielded the most diverse bacterial composition, with richer and more uniform flora structures and a higher carbohydrate metabolic pathway activity (which promotes corn straw degradation). Functional microbial strains involved in corn straw degradation were obtained after restrictive sub-generation of the microbial sources, which can accelerate corn straw degradation. The highest corn straw degradation efficiency of microbial consortium was observed with the 0.16% ammonium sulfate + 0.04% of urea nitrogen (N2) treatment. These findings provide a basis for developing microbial consortium used in commercial production decomposition.

Keywords: Original microbe source; Microbial consortium; Nitrogen resources; High throughput sequencing; Composition diversity; Corn straw degradation

秸秆还田是提高秸秆资源综合利用率、平衡农田生态系统和实现农业可持续发展的有效措施[1]。由于玉米(*Zea mays*)秸秆木质纤维素的结晶区域组成，使得还田玉米秸秆难以降解[2]；而北方高寒地区秋冬季低温、干燥等气候因素进一步限制了还田玉米秸秆的有效腐解。因此，在低温条件下施加外源菌剂加速分解木质纤维素对玉米秸秆资源的开发利用具有重要意义。根据秸秆酶解过程以及微生物间的协同关系，直接从自然环境中筛选或组配秸秆高效降解复合菌群，用以提高还田秸秆的降解效率是目前秸秆高效降解的有效途径之一[3-4]。其中，菌源的选择、复合菌群的筛选驯化方法对于获得秸秆高效降解微生物成败至关重要。前人研究表明，根据应用目的从相似的生态环境中可筛选到更高效适宜的菌种[5]。Li 等[6]和 Feng 等[7]以高温期堆肥、腐烂作物秸秆和秸秆还田土壤为菌源，筛选得到一系列中高温复合菌系，其秸秆降解率达 30%~50%，被应用于堆肥腐熟或南方高温区秸秆还田。

本研究团队为了获得玉米秸秆低温高效降解菌以用于北方低温种植区玉米秸秆原位促腐还田，从低温(−7~8 ℃)生态环境中采集多年秸秆还田土壤作为玉米秸秆低温高效降解复合菌系筛选的菌源材料，经长期的碳源限制性继代培养与低温驯化培养获得一组微生物复合菌系 GF-20[8]，其实验室秸秆降解率达 30%。但菌源材料与复合菌系 GF-20 间的菌种组成相关性及不同尿素含量处理对菌种组成的差异性尚不明确。这无疑关系到该菌系秸秆高效降解机理的揭示，以及其能否被继续开发、应用于生产实际。因此，本研究以菌源样品、筛选得到的复合菌系 GF-20 及其尿素氮源驯化后的系列菌系为材料，通过对各复合菌系菌种多样性、玉米秸秆分解能力和菌群结构特性等指标的测定及分析，揭示复合菌系 GF-20 与菌源材料间，以及不同尿素氮源含量驯化得到的复合菌系间的菌种异同，通过与 COG(蛋白质直系同源簇)和 KEGG(代谢通路)数据库比对及菌株功能性分析从而确定复合菌系中的关键功能菌，以及菌系适宜的尿素氮源条件，为该复合菌系的开发利用提供理论依据和技术支持，也给其他高效降解菌系的筛选和利用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

试验于 2018—2019 年在内蒙古农业大学玉米中心微生物实验室(内蒙古包头市土默特右旗沟门镇)进行。

1.2 供试材料

菌源土壤(编号为 Q，为本文复合菌系 GF-20 的筛选菌源)取自内蒙古通辽市常年秸秆还田土壤(43.37°N、122.16°E，海拔 400 m，年平均气温 5.5 ℃)和吉林省长春市连续秸秆还田土壤(43.82°N、125.32°E,

海拔 250 m，年平均气温 4.8 ℃)的混合样品，供试复合菌系为本实验室筛选驯化的玉米秸秆降解复合菌系 GF-20(编号为 N1)[8]。玉米秸秆取自内蒙古农业大学蒙西综合试验站(内蒙古包头市土默特右旗沟门镇)试验田收获的玉米秸秆(C/N 为 48.98，纤维素、半纤维素和木质素含量分别为 51.24%、32.72%和 9.15%，全氮 6.67 $g \cdot kg^{-1}$，全磷 2.78 $g \cdot kg^{-1}$，全钾 11.48 $g \cdot kg^{-1}$)，洗净烘干后剪成 1~2 cm 短节。滤纸选用 Whatman No. Ⅰ滤纸，裁成 1 cm×10 cm 大小。

1.3　培养条件

以基础培养基[$(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g、K_2HPO_4 1.0 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g、$CaCO_3$ 2.0 g、NaCl 0.2 g、蒸馏水 1 L]为继代培养基，复合菌以 5%~10%(*v*/*v*)的接种量接入装有 40 mL 基础培养基和 1 g 玉米秸秆碳源的 100 mL 三角瓶中，置于 10 ℃恒温条件下静置培养[9]。

1.4　试验设计

基础培养基中氮源设硫酸铵+尿素，含量分别为 0.16%+0.04%(N2)、0.12%+0.08%(N3)、0.08%+0.12%(N4)、0.04%+0.16%(N5)、0+0.2%(N6)。对复合菌系 GF-20 进行尿素驯化处理，原始培养基为硫酸铵 0.2%+尿素 0 (N1)，在以上处理条件下连续继代培养 10 代以上，获得不同菌系，每处理均 3 次重复。

1.5　主要测定指标与方法

1)复合菌系玉米秸秆降解率的测定。将所得复合菌系以 5%的接种量接入玉米秸秆培养基[9]中，以不接菌的为对照(CK)，在 10 ℃恒温条件下培养 15 d 和 30 d 后，采用失重法测定玉米秸秆降解率，3 次重复。秸秆降解率(%)=$(W_0-W_1)/W_0 \times 100\%$。$W_0$ 表示接种前培养基中的秸秆重(g)，W_1 表示培养结束烘干后降解剩余物重(g)。

2)MiSeq 16S rDNA 扩增子测序。采用土壤基因组 DNA 提取试剂盒和细菌基因组 DNA 提取试剂盒(中国，天根生化科技有限公司)提取菌源土壤和各复合菌系的基因组 DNA，利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。获得的基因组 DNA 由北京奥维森基因科技有限公司(Allwegene Tech. Co. Ltd., Beijing)完成 MiSeq 高通量测序，对获得的数据通过序列拼接、过滤和去嵌合体得到优化序列，进行 OTU(Operational Taxonomic Units)聚类及各分类水平注释。

3)功能注释。基于测序得到的序列，与 COG(蛋白质直系同源簇)和 KEGG(代谢通路)数据库进行比对[10]。

4)数据统计分析。利用 QIIME(v1.8.0)软件以 97%相似度水平将序列进行聚类物种分类的 OTU，获得物种分类水平的比例信息及不同分类水平的群落结构；通过 Uclust(Version 1.8)、Usearch(Version 8.1.1861)等数据库进行物种比对，得到各水平的分类信息，进行样本组成及样本间群落结构差异分析；采用 R(v3.4.4)软件绘制各样品在各分类水平的比较图，基于聚类结果，进行 Alpha 多样性分析和 Beta 多样性分析。

2　结果与分析

2.1　不同氮源下复合菌系玉米秸秆降解率

不同氮源条件下复合菌系 GF-20 的玉米秸秆降解率如图 1 所示。不同氮源处理降解率均显著高于 CK；不同处理随着尿素比例的增加，复合菌系 GF-20 玉米秸秆降解率呈先上升后下降趋势。培养至 15 d 和 30 d，均以 N2 条件下复合菌系的玉米秸秆降解率最高，分别为 22.64%和 37.58%，较 CK 高 15.85%和 21.43%，且显著高于其他处理。

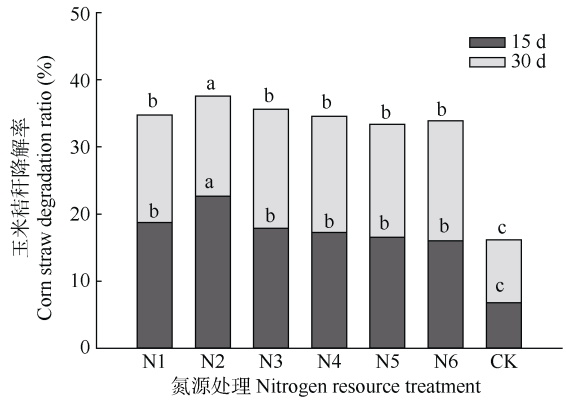


图 1　不同氮源处理复合菌系玉米秸秆降解率

Fig. 1　Corn straw degradation ratios of microbial consortium under different treatments of nitrogen resources

N1、N2、N3、N4、N5 和 N6 的氮源为硫酸铵+尿素，比例为分别 0.2%+0、0.16%+0.04%、0.12%+0.08%、0.08%+0.12%、0.04%+0.16%、0+0.2%。CK 为不加菌对照，培养条件同 N1。不同小写字母表示不同处理间差异显著。The nitrogen resources of N1, N2, N3, N4, N5 and N6 are ammonium sulfate+urea with ratios of 0.2%+0, 0.16%+0.04%, 0.12%+0.08%, 0.08%+0.12%, 0.04%+0.16%, and 0+0.2%, respectively. CK is non-inoculated microbial consortium (control), and the culture conditions are the same as N1. Different lowercase letters mean significant differences among different treatments.

2.2　菌源样品及不同氮源下复合菌系 Alpha 多样性指数分析

所有样品及处理覆盖深度指数均在 0.99 以上，说明本次测序结果基本能代表样品的真实情况。菌源土壤平均 OUT 数为 1 705，显著高于筛选获得的复合菌系，处理 N1-N6 平均 OUT 数为 58；由 Shannon、PD whole tree、Observed species 和 Chao 指数可知，菌源土壤显著高于处理 N1-N6；不同氮源培养基获得的复合菌系表现为混合氮源处理

(N2-N5)高于单一氮源处理(N1, N6), 且 N2 处理显著高于其他处理, 其 Shannon、PD whole tree、Observed species 和 Chao 多样性指数分别为 4.36、6.14、59.93 和 62.45(图 2)。

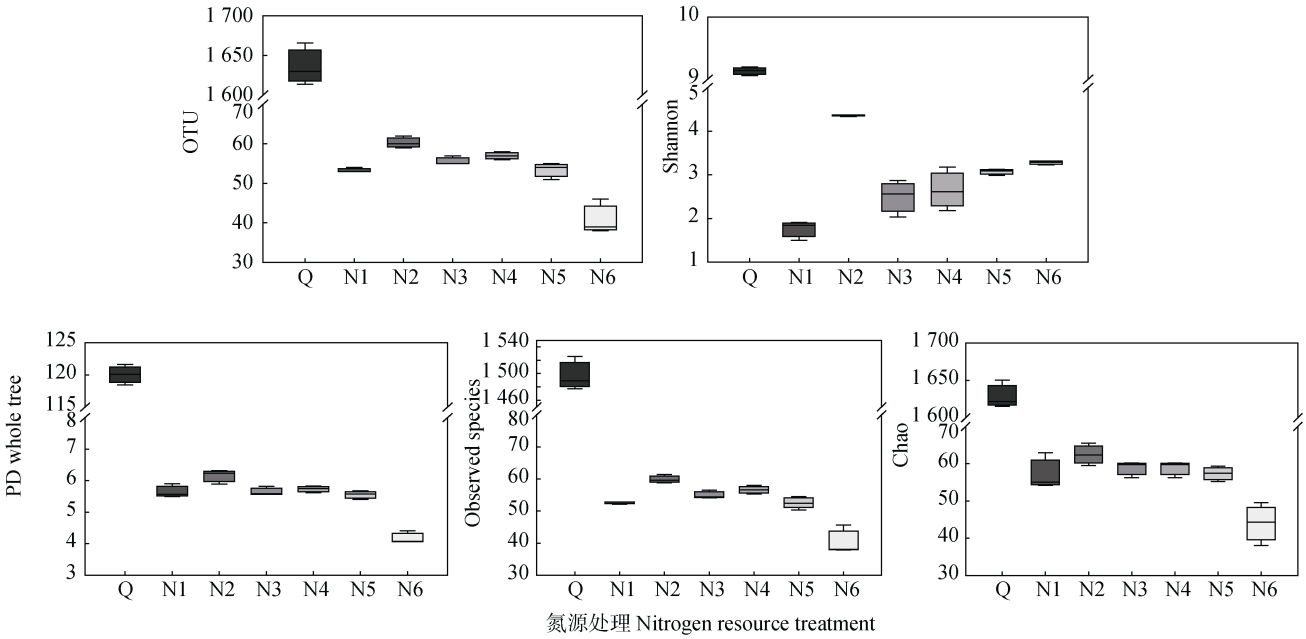


图 2 菌源样品及不同氮源处理复合菌系 Alpha 多样性指数

Fig. 2 Alpha diversity indexes of source samples and microbial consortium under different treatments of nitrogen resources

Q 为菌源土壤。N1、N2、N3、N4、N5 和 N6 的氮源为硫酸铵+尿素, 比例为分别 0.2%+0、0.16%+0.04%、0.12%+0.08%、0.08%+0.12%、0.04%+0.16%、0+0.2%。Q is original microbe source. The nitrogen resources of N1, N2, N3, N4, N5 and N6 are ammonium sulfate+urea with ratios of 0.2%+0, 0.16%+0.04%, 0.12%+0.08%, 0.08%+0.12%, 0.04%+0.16%, and 0+0.2%, respectively.

2.3 菌源样品及不同氮源下复合菌系细菌群落结构分析

对所有样品测序结果进行物种比对, 得到各水平的分类信息。门分类水平, 变形菌门(Proteobacteria)在所有样本中丰富度最高(图 3a)。菌源样品中变形菌门丰度为 36.98%, 其他优势门是放线菌门(Actinobacteria)和绿弯菌门(Chloroflexi), 丰度分别为 24.06%和 10.64%; 复合菌系 GF-20 中变形菌门丰度为 85.52%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)丰度为 13.86%。纲分类水平, 在所有样本中 α 变形菌(Alphaproteobacteria)、β 变形菌(Betaproteobacteria)和 γ 变形菌(Gammaproteobacteria)丰度较高。而黄杆菌纲(Flavobacteriia)在复合菌中丰富度较高, 在菌源中仅有 0.32%(图 3b)。属分类水平(图 4), 菌源主要由 *norank_c__Subgroup*(5.00%)、*norank_f__Gemmatimonadaceae*(3.73%)、*norank_f__A4b*(3.13%)、节细菌属(*Arthrobacter*, 2.26%)、*norank_f__Microscillaceae*(2.24%)、壤霉菌属(*Agromyces*, 2.01%)组成, 复合菌系主要由纤维弧菌属(*Cellvibrio*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、土地杆菌属(*Pedobacter*)、假单孢菌属(*Pseudomonas*)、纤维菌属(*Cellulomonas*)等组成, 且不同氮源处理丰度具有显著差异。说明复合菌系及菌源样品的菌群结构差异较大, 长期限制性继代培养及低温驯化培养显著影响菌系菌种组成, 大量菌属被淘汰。

不同氮源处理间, 在门分类水平, N1、N2 和 N6 中拟杆菌门丰度较高, 为 13.86%、37.01%和 17.72%; 放线菌门在 N2-N5 中含量分别为 1.18%、5.71%、6.29%和 26.11%, 表现为随着尿素含量的增加而增加。属水平, N1-N6 处理复合菌系的细菌菌群结构差异显著(图 3c, 图 4), 复合菌系 GF-20 在 N1 条件下的优势菌属为纤维弧菌属(74.54%), 其次为固氮螺菌属(7.40%); N2 的优势菌属为纤维弧菌属(22.24%)、黄杆菌属(9.35%)、土地杆菌属(8.60%)和 norank_c__*Cyanobacteria* (9.03%); N3 主要由纤维弧菌属(14.3%)、假单胞菌属(55.72%)和纤维菌属(5.48%)组成; N4 主要由假单胞菌属(56.82%)、纤维菌属(5.80%)、德沃斯氏菌属(*Devosia*, 5.44%)、芽殖杆菌属(*Gemmobacter*, 4.57%)和纤维弧菌属(4.44%)组成; N5 主要由纤维菌属(25.98%)、*Niveispirillum* (28.11%)、食酸菌属(*Acidovorax*, 10.97%)和噬氢菌属(*Hydrogenophaga*, 6.36%)组成; N6 的优势菌属为纤维弧菌属(31.13%)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*, 18.5%)、黄杆菌属(12.8%)和无色杆菌属(*Achromobacter,* 12.56%)等。可见尿素含量对复合菌

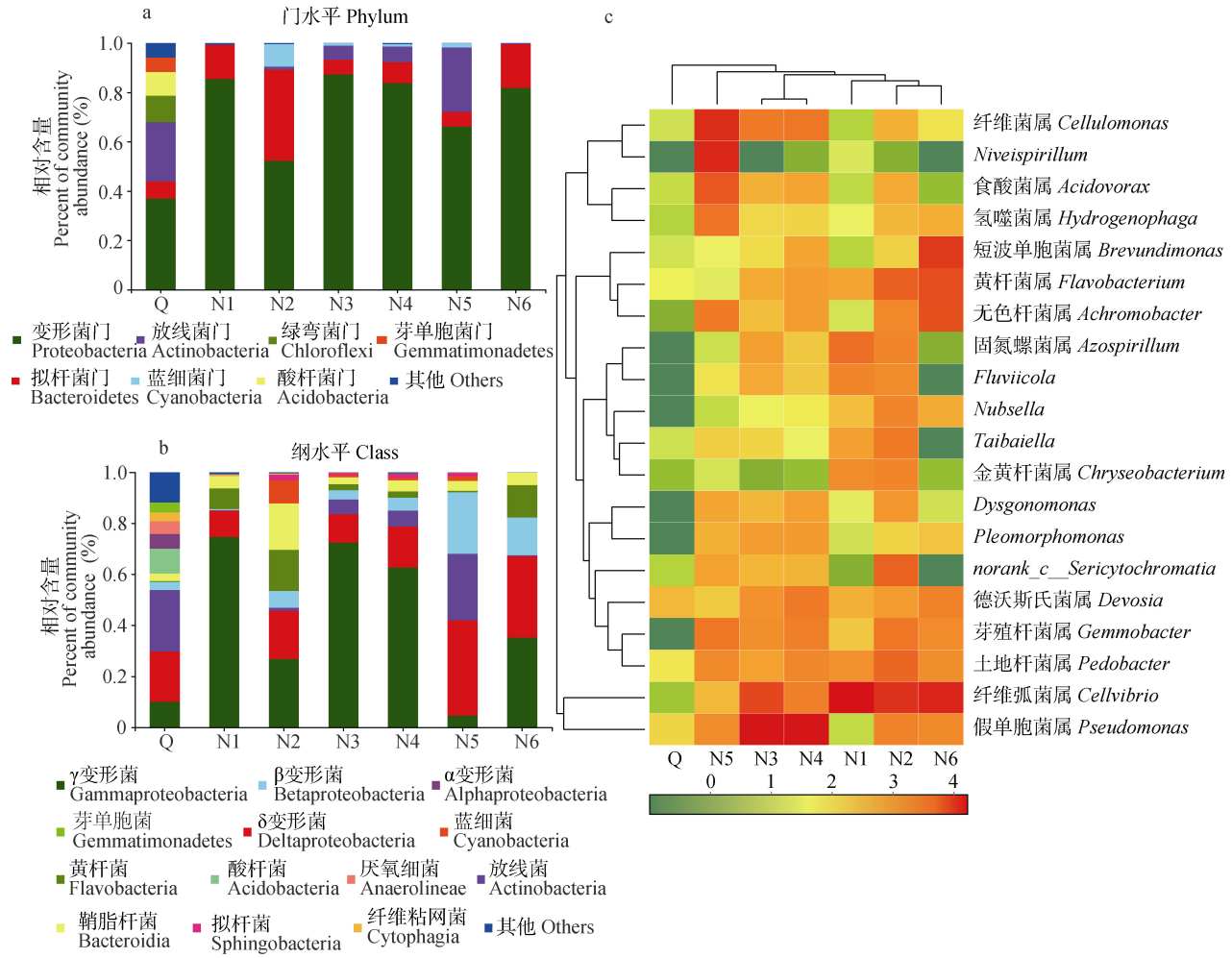


图 3　菌源样品及不同氮源处理复合菌系门(a)和纲(b)水平群落结果及属水平(c)Heatmap 图分析

Fig. 3　Analysis of community structure at phyla (a) and class (b) level and Heatmap at genus level (c) of source samples and microbial consortium under different treatments of nitrogen resources

将在所有样本中丰度占比均小于 0.02%的物种归为 Others。Q 为菌源土壤。N1、N2、N3、N4、N5 和 N6 的氮源为硫酸铵+尿素，比例分别为 0.2%+0、0.16%+0.04%、0.12%+0.08%、0.08%+0.12%、0.04%+0.16%和 0+0.2%。Microbes with less than 0.02% abundance in all samples are classified as others. Q is original microbe source. The nitrogen resources of N1, N2, N3, N4, N5, and N6 are ammonium sulfate+urea with ratios of 0.2%+0, 0.16%+0.04%, 0.12%+0.08%, 0.08%+0.12%, 0.04%+0.16% and 0+0.2%, respectively.

系 GF-20 的细菌菌群结构影响较大，培养基中加入尿素后使优势菌种种类增加，混合氮源效果尤其明显。综上所述可知，菌源样品和所筛选获得的复合菌系，以及不同氮源下的菌系间菌种组成差异显著，主要体现在放线菌门、拟杆菌门、变形菌门的纤维弧菌属、假单胞菌属、*Niveispirillum*、黄杆菌属、无色杆菌属、纤维菌属等参与秸秆降解微生物丰度的差异。

2.4　不同氮源下复合菌系菌群群落结构 Heatmap 分析

根据所有样品在属水平的物种注释及丰度信息，选取丰度 top 20 的属，绘制属水平的 Heatmap 图(图 3c)。在属水平上，不同氮处理复合菌系优势菌属不同，混合氮源处理 N2-N5 的优势属数量多于单一氮源 N1 和 N6 处理，N1 处理中的固氮螺菌属、*Taibaiella*、*Fluviicola* 等属丰度在 N6 中显著降低，而丰度较低的如无色杆菌属、短波单胞菌属、噬氢菌属、*Pleomorphomonas*、根瘤菌属(*Rhizobium*)、*Dysgonomonas*、贪噬菌(*Variovorax*)等属在混合氮源处理中成为优势属。

由图 3c 和图 4 可知，复合菌系 GF-20 在 N1 条件下，纤维弧菌属的丰度为 74.50%，但在含有不同尿素比例氮源条件下继代培养数量显著变化，尤其在混合氮源条件下随着尿素含量的增加而逐渐减少至 0.81%；德沃斯氏菌属在 N1 条件下丰度为 0.99%，但在 N4 处理中增加至 5.61%；黄杆菌属、地杆菌属、短波单胞菌属、无色杆菌属等在 N1 条件下丰度均很低，但在含有尿素氮源的菌系中大量存在，成为优势菌属。说明限制性继代培养是有选择性的进行筛选，大量富集与秸秆纤维素降解相关的菌属，提

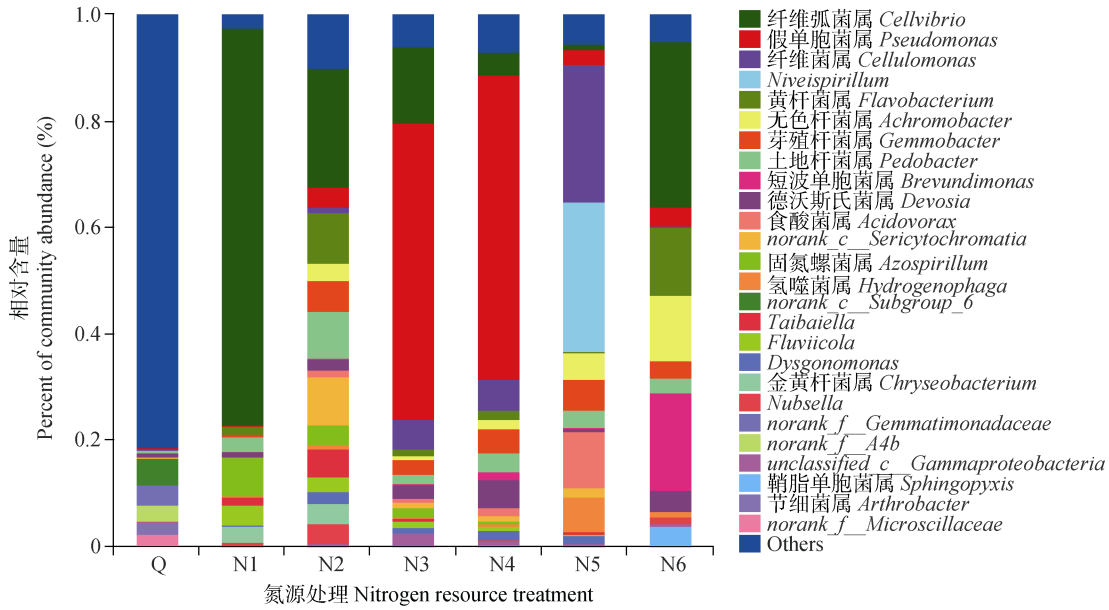


图 4 菌源及不同氮源处理复合菌系细菌群落结构分布(属水平)

Fig. 4 Bacterial community structure at genus level of source samples and microbial consortium under different treatments of nitrogen resources

Q 为菌源土壤。N1、N2、N3、N4、N5 和 N6 的氮源为硫酸铵+尿素，比例分别为 0.2%+0、0.16%+0.04%、0.12%+0.08%、0.08%+0.12%、0.04%+0.16%、0+0.2%。Q is original microbe source. The nitrogen resources of N1, N2, N3, N4, N5 and N6 are ammonium sulfate+urea with ratios of 0.2%+0, 0.16%+0.04%, 0.12%+0.08%, 0.08%+0.12%, 0.04%+0.16%, 0+0.2%, respectively.

高菌属数量比，从而促进秸秆的降解。纤维菌属在 N1 条件下丰度仅仅为 0.03%，但在混合氮源处理下含量逐渐增加，在 N5 处理下含量达 27.31%；假单胞菌属在 N1 条件下含量为 0.04%，但在混合氮源 N3 和 N4 处理下数量剧增至 57.68%和 59.25%；无色杆菌属和鞘脂单胞菌属(*Sphingopyxis*)在 N1 处理中为 0.08%和 0.06%，但随着尿素含量的增加，含量逐渐增加，N6 处理增加至 12.84%和 3.59%；*Nubsella* 和 *Dysgonomonas* 在 N1 处理中含量为 0.70%和 0.14%，在混合氮源 N2 处理中增加至 3.91%和 2.35%；*Niveispirillum* 在混合氮源处理 N5 中含量最高，为 29.75%；*Taibaiella* 在 N1 处理中含量为 1.68%，在处理 N2 中增加至 5.42%，随着尿素氮源的增加含量逐渐降低，在 N6 处理中减少至 0；固氮螺菌属、*Fluviicola* 和金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)在 N1 处理中的丰度分别为 7.2%、3.78%和 2.86%，但随着尿素氮源的增加，其含量逐渐减少，尿素处理 N6 的含量减少至 0。由此可知，硫酸铵和尿素含量对复合菌系 GF-20 繁殖有明显的影响，由 Alpha 多样性指数及菌群组成(图 2，图 4)可知，N2 处理中富集了更多的参与秸秆降解的微生物，菌种组成多样性较高，菌群结构更加丰富。

2.5 不同氮源下复合菌系菌群结构 PCoA 分析及 Rank Abundance 分析

根据不同氮源处理菌种组成及进化关系进行 PCoA 分析，结果表明样品分布较为分散(图 5a)，说明不同氮源处理菌系间物种丰度及差异度均存在差异，其中 GF-20(N1)、N2 及 N6 与 N4 和 N5 处理的距离较远，而 N3、N4 和 N5 的距离较近，再次说明不同氮源处理，显著影响复合菌系菌种物种组成，且相同氮源的组成菌群结构更加相似。Rank-Abundance 说明物种丰富度和均匀度。由图 5b 可知，N2 处理水平方向曲线宽度最宽且平滑，结合 OTU 指数分析发现，N2 处理 OUT 数为 60±0.88，显著高于其他处理，较 N1 及 N3-N6 分别高 13.12%、8.38%、5.84%、13.12%和 47.15%(图 2)，说明 N2 处理物种组成更加丰富和均匀。

2.6 不同氮源下复合菌系菌群 Venn 图分析

进一步在属水平进行 Venn 图分析，统计样本中所共有和独有菌属数目，直观体现各样本的菌属组成相似性及重叠情况。由图 6 可知，有 32 个属为 6 个处理共有的，被称为核心微生物，直接或间接参与玉米秸秆降解代谢，主要由放线菌、α 变形菌、γ变形菌、拟杆菌纲的纤维弧菌属、假单胞菌属、黄杆菌属、纤维菌属、德沃斯氏菌属、无色杆菌属等组成。

2.7 不同氮源下复合菌系功能多样性预测分析

将不同氮源处理复合菌系测序获得的序列与 COG 和 KEGG 数据库进行系统功能预测分析。通过 COG 分析对潜在功能进行分类，结果表明 amino

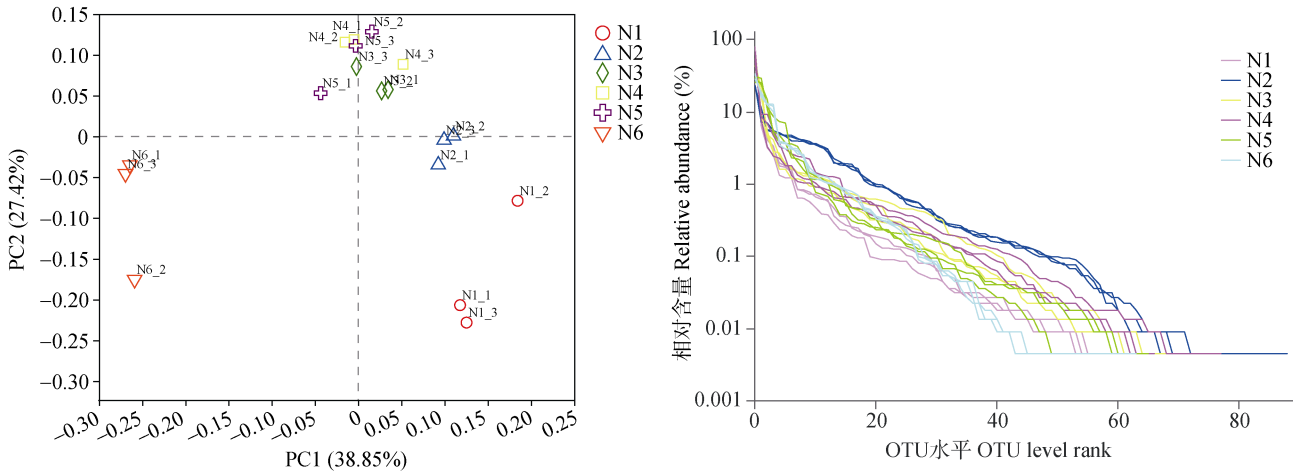


图 5　不同氮源处理复合菌系属水平 PCoA (a)和 Rank Abundance (b)分析

Fig. 5　PCoA analysis (a) and rank abundance analysis (b) at genus level of microbial consortium under different treatments of nitrogen resources

N1、N2、N3、N4、N5 和 N6 的氮源为硫酸铵+尿素，比例分别为 0.2%+0、0.16%+0.04%、0.12%+0.08%、0.08%+0.12%、0.04%+0.16%和 0+0.2%。The nitrogen resources of N1, N2, N3, N4, N5 and N6 are ammonium sulfate+urea with ratios of 0.2%+0, 0.16%+0.04%, 0.12%+0.08%, 0.08%+0.12%, 0.04%+0.16%, and 0+0.2%, respectively.

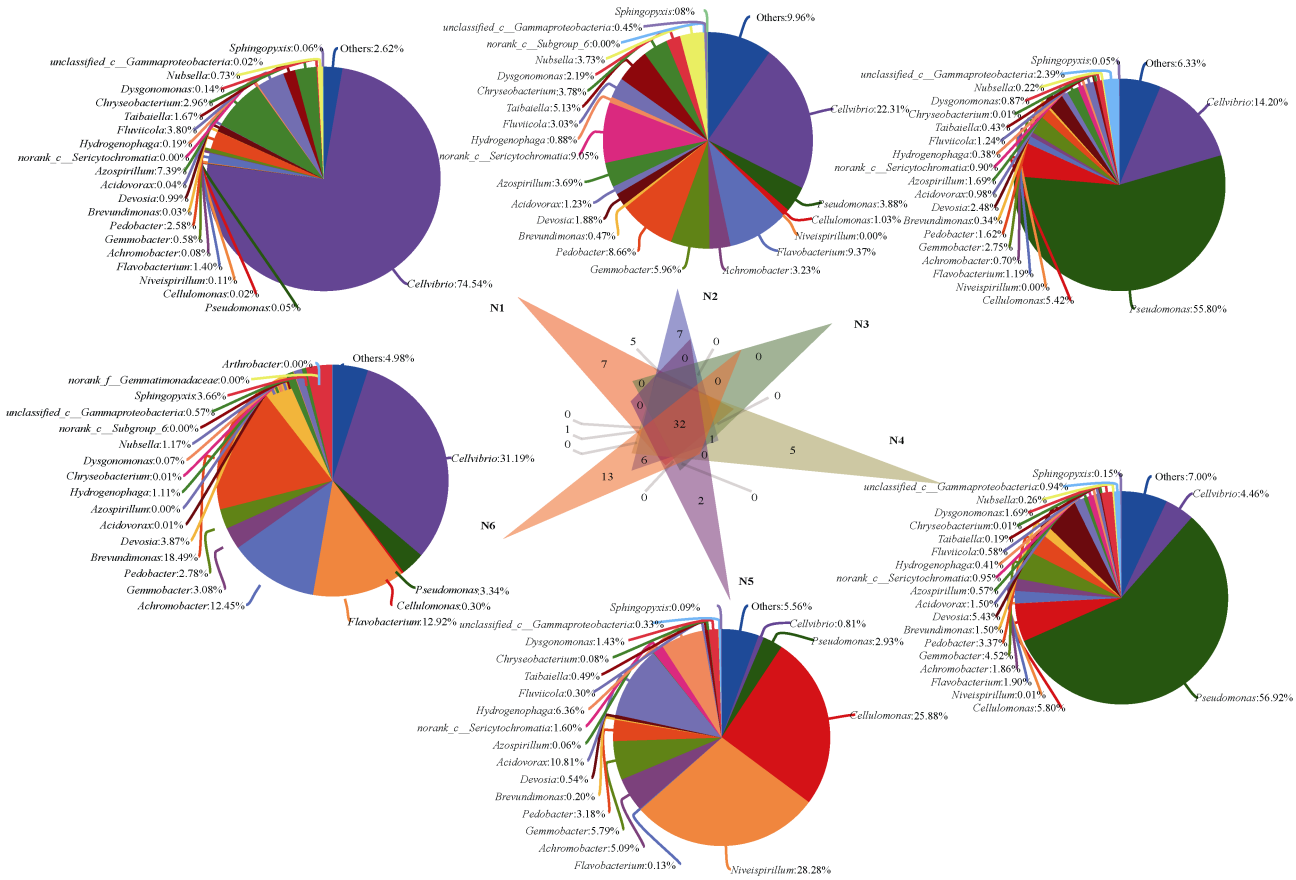


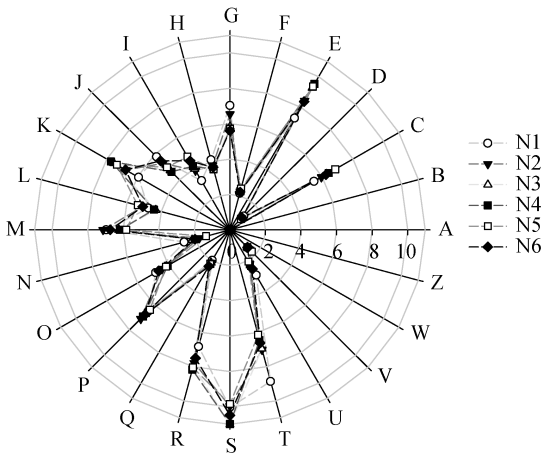
图 6　不同氮源处理复合菌系属水平菌种分布比较的 Venn 图分析

Fig. 6　Venn analysis at genus level of microbial consortium under different treatments of nitrogen resources

N1、N2、N3、N4、N5 和 N6 的氮源为硫酸铵+尿素，比例分别为 0.2%+0、0.16%+0.04%、0.12%+0.08%、0.08%+0.12%、0.04%+0.16%和 0+0.2%。The nitrogen resources of N1, N2, N3, N4, N5 and N6 are ammonium sulfate+urea with ratios of 0.2%+0, 0.16%+0.04%, 0.12%+0.08%, 0.08%+0.12%, 0.04%+0.16%, and 0+0.2%, respectively.

acid transport and metabolism (氨基酸运输/代谢, E)、general function prediction only (一般功能预测, R)、signal transduction mechanisms (信号转导机制, T)、function unknown (未知功能, S)的注释丰度最多为主导功能(图 7)。将 24 个类别概括为 4 类: 信息存储与处理(第 1 类)、细胞过程和信号传导(第 2 类)、代谢(第 3 类)以及功能较差类别(第 4 类), 其中 carbohydrate transport and metabolism(碳水化合物转运和代谢)的相对丰度在 N1 和 N2 处理明显高于其他处理, 说明其通过增加碳水化合物的运输和代谢功能, 促进秸秆的降解。

通过 KEGG 数据库比对(表 1)发现, metabolism (代谢)功能注释到的结果最多, 占全功能分类的 60%以上, 不同处理间 N2 处理明显高于其他处理。为进一步分析代谢途径, 在 KEGG 第 3 分类水平进行分析, 选取丰度大于 1.00%的路径进行统计(图 8), 共获得 21 条代谢路径, ABC transporters(ABCT)和 two-component system(TCSP)注释最多, 其中 9 条代谢途径丰度呈 N2 大于其他处理, 其中包含 fructose and mannose metabolism(果糖和甘露糖代谢)、starch and sucrose metabolism(淀粉和蔗糖代谢)和 amino sugar and nucleotide sugar metabolism(氨基糖和核苷酸糖代谢)等相关碳水化合物的代谢路径。再次说明复合菌系在氮源为硫酸铵和尿素含量为 0.16+0.04% (N2)条件下, 增加碳水化合物代谢功能, 促进秸秆物质的降解。



A: RNA转录及修饰; B: 染色质结构/动力学; C: 能量产生转换; D: 细胞周期控制/分裂/染色体分裂; E: 氨基酸运输/代谢; F: 核苷酸运输/代谢; G: 碳水化合物运输/代谢; H: 辅酶的运输/代谢; I: 脂质运输/代谢; J: 翻译/核糖体结构/生物起源; K: 转录; L: 复制/重组/修复; M: 细胞壁/细胞膜/包膜形成; N: 细胞移动; O: 翻译后修饰/蛋白质代谢/伴侣蛋白; P: 无机离子运输/代谢; Q: 次生代谢产物合成/运输/分解代谢; R: 一般功能预测; S: 未知功能; T: 信号转导机制; U: 细胞内运输/分泌/囊泡运输; V: 防御机制; W: 细胞外结构; Z: 细胞骨架。

A: RNA processing and modification; B: chromatin structure and dynamics; C: energy production and conversion; D: cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E: amino acid transport and metabolism; F: nucleotide transport and metabolism; G: carbohydrate transport and metabolism; H: coenzyme transport and metabolism; I: lipid transport and metabolism; J: translation, ribosomal structure and biogenesis; K: transcription; L: replication, recombination and repair; M: cell wall/membrane/envelope biogenesis; N: cell motility; O: posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P: inorganicion transport and metabolism; Q: secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R: general function prediction only; S: function unknown; T: signal transduction mechanisms; U: intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V: defense mechanisms; W: extracellular structures; Z: cytoskeleton.

图 7 不同氮源处理复合菌系 COG 功能注释相对丰度

Fig. 7 Relative abundance of the COG annotations of microbial consortium under different treatments of nitrogen resources

N1、N2、N3、N4、N5 和 N6 的氮源为硫酸铵+尿素, 比例分别为 0.2%+0、0.16%+0.04%、0.12%+0.08%、0.08%+0.12%、0.04%+0.16%和 0+0.2%。The nitrogen resources of N1, N2, N3, N4, N5 and N6 are ammonium sulfate+urea with ratios of 0.2%+0, 0.16%+0.04%, 0.12%+0.08%, 0.08%+0.12%, 0.04%+0.16%, and 0+0.2%, respectively.

表 1 不同氮源处理复合菌系 KEGG 注释结果的第 2 类水平统计

Table 1 Statistics of the KEGG pathway annotations at the second level of microbial consortium under different treatments of nitrogen resources

KEGG 第二代谢水平注释 KEGG pathway level 2	N1		N2		N3		N4		N5		N6	
	RA%	log	RA%	log	RA%	log	RA%	log	RA%	log	RA%	log
氨基酸代谢 Amino acid metabolism	12.23	6.27	12.06	6.25	11.59	6.31	11.60	6.35	12.02	6.30	12.52	6.44
碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism	12.71	6.31	14.11	6.24	13.73	6.26	13.99	6.29	13.53	6.28	13.24	6.41
其他次生代谢产物的生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites	0.90	5.26	0.98	5.21	0.83	5.17	0.85	5.20	0.96	5.18	1.04	5.32
辅助因子和维生素的代谢 Metabolism of cofactors and vitamins	6.63	5.98	6.93	5.87	6.58	5.91	6.59	5.94	6.82	5.87	6.79	6.04
其他氨基酸的代谢 Metabolism of other amino acids	2.51	5.56	2.63	5.53	2.71	5.61	2.75	5.65	2.80	5.62	2.88	5.74
萜类和聚酮化合物的代谢 Metabolism of terpenoids and polyketides	3.52	5.54	3.11	5.54	3.15	5.58	3.01	5.62	3.83	5.62	3.04	5.74

续表 1

KEGG 第二代谢水平注释 KEGG pathway level 2	N1		N2		N3		N4		N5		N6	
	RA%	log	RA%	log	RA%	log	RA%	log	RA%	log	RA%	log
异生物素的生物降解与代谢 Xenobiotics biodegradation and metabolism	4.02	5.69	3.87	5.74	4.01	5.83	4.08	5.89	4.57	5.87	4.67	5.98
聚糖的生物合成与代谢 Glycan biosynthesis and metabolism	2.37	5.73	3.22	5.61	2.45	5.61	2.54	5.63	2.35	5.51	2.55	5.74
脂质代谢 Lipid metabolism	3.70	5.81	3.90	5.80	3.67	5.85	3.69	5.90	3.82	5.87	3.75	6.00
能量代谢 Energy metabolism	6.37	6.01	6.77	5.97	6.62	6.00	6.69	6.04	6.56	6.02	6.68	6.14
核苷酸代谢 Nucleotide metabolism	4.70	5.84	5.07	5.75	4.86	5.76	4.91	5.79	4.78	5.78	4.79	5.90
信号转导 Signal transduction	10.17	5.78	8.95	5.62	9.27	5.77	8.92	5.78	8.54	5.63	9.29	5.83
信号分子与相互作用 Signaling molecules and interaction	0.00	4.39	0.00	4.51	0.00	4.67	0.00	4.72	0.00	4.61	0.00	4.73
膜运输 Membrane transport	10.92	6.34	9.29	6.30	11.88	6.45	11.95	6.49	11.30	6.43	9.62	6.46
运输和分解代谢 Transport and catabolism	0.34	4.76	0.49	4.81	0.32	4.78	0.34	4.84	0.42	4.88	0.38	4.91
细胞生长与死亡 Cell growth and death	1.82	0.00	1.62	0.00	1.58	0.00	1.58	0.00	1.34	0.00	1.90	0.00
细胞群落 Cellular community	0.77	5.06	0.54	5.01	0.68	5.00	0.63	5.07	0.50	4.96	0.63	5.27
细胞能动性 Cell motility	3.23	6.06	2.08	5.81	2.67	5.92	2.47	5.92	1.61	5.72	2.90	6.05
循环系统 Circulatory system	0.01	4.11	0.01	3.94	0.01	4.05	0.01	4.07	0.01	3.93	0.02	4.25
消化系统 Digestive system	0.16	4.28	0.26	4.07	0.12	3.92	0.13	3.88	0.14	3.95	0.20	4.14
内分泌系统 Endocrine system	0.35	4.81	0.34	4.75	0.36	4.77	0.35	4.81	0.47	5.04	0.37	4.93
环境适应性 Environmental adaptation	0.26	4.65	0.24	4.44	0.24	4.39	0.23	4.39	0.20	4.38	0.27	4.69
排泄系统 Excretory system	0.01	3.05	0.02	3.60	0.02	3.65	0.02	3.71	0.03	3.93	0.02	3.58
免疫系统 Immune system	0.04	4.12	0.06	3.97	0.05	3.97	0.05	3.95	0.05	4.06	0.05	4.03
神经系统 Nervous system	0.15	3.92	0.13	4.09	0.13	4.40	0.12	4.44	0.12	4.13	0.12	4.13
感官系统 Sensory system	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
免疫疾病 Immune disease	0.06	4.09	0.05	3.93	0.06	4.08	0.06	4.07	0.07	4.14	0.05	4.09
传染病 Infectious disease	1.65	5.09	1.57	4.95	2.14	5.05	2.09	5.07	1.56	4.87	1.50	5.18
内分泌和代谢疾病 Endocrine and metabolic disease	0.05	4.17	0.05	4.09	0.05	4.18	0.05	4.21	0.06	4.09	0.05	4.23
神经退行性疾病 Neurodegenerative disease	0.20	4.79	0.21	4.83	0.20	4.89	0.20	4.95	0.17	4.88	0.20	5.10
癌症 Cancer	0.20	4.51	0.18	4.53	0.20	4.58	0.20	4.64	0.19	4.58	0.25	4.74
心血管疾病 Cardiovascular disease	0.00	3.18	0.00	3.63	0.00	3.66	0.00	3.80	0.00	3.63	0.01	4.07
复制和修复 Replication and repair	3.81	6.16	4.31	6.08	3.77	6.10	3.79	6.13	4.31	6.12	3.78	6.25
转录 Transcription	0.18	5.72	0.19	5.65	0.17	5.72	0.17	5.75	0.21	5.67	0.18	5.81
翻译 Translation	3.66	6.02	4.23	5.88	3.66	5.87	3.71	5.89	4.26	5.86	3.91	6.05
折叠、分类和降解 Folding, sorting and degradation	2.16	5.78	2.36	5.63	2.10	5.66	2.10	5.67	2.26	5.62	2.14	5.80

N1、N2、N3、N4、N5 和 N6 的氮源为硫酸铵+尿素，比例分别为 0.2%+0、0.16%+0.04%、0.12%+0.08%、0.08%+0.12%、0.04%+0.16% 和 0+0.2%。RA%指相对丰度，log 指注释数量的 log10。The nitrogen resources of N1, N2, N3, N4, N5 and N6 are ammonium sulfate+urea with ratios of 0.2%+0, 0.16%+0.04%, 0.12%+0.08%, 0.08%+0.12%, 0.04%+0.16%, 0+0.2%, and respectively. RA% refers to relative abundance, and log refers to log10 of the number of annotations.

3　讨论

本研究中菌源材料取自内蒙古通辽市常年秸秆还田和吉林长春市连续秸秆还田混合土壤样品，主要由放线菌(24.06%)、变形菌(36.98%)、酸杆菌(9.71%)、绿弯菌(10.64%)、拟杆菌(6.94%)、芽单胞菌(5.74%)等门组成，富含降解纤维素、半纤维素、木质素的菌属，如鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 0.99%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 0.22%)、梭菌属(*Clostridium*, 0.1%)、纤维弧菌属(*Cellvibrio*, 0.01%)、*Cellulosilyticum*(0.02%)、纤维菌属(*Cellulomonas*, 0.07%)、*Actinotalea*(0.04%)、*Paeniclostridium*(0.14%)等，从菌源样品中经长期限制性继代培养筛选出了

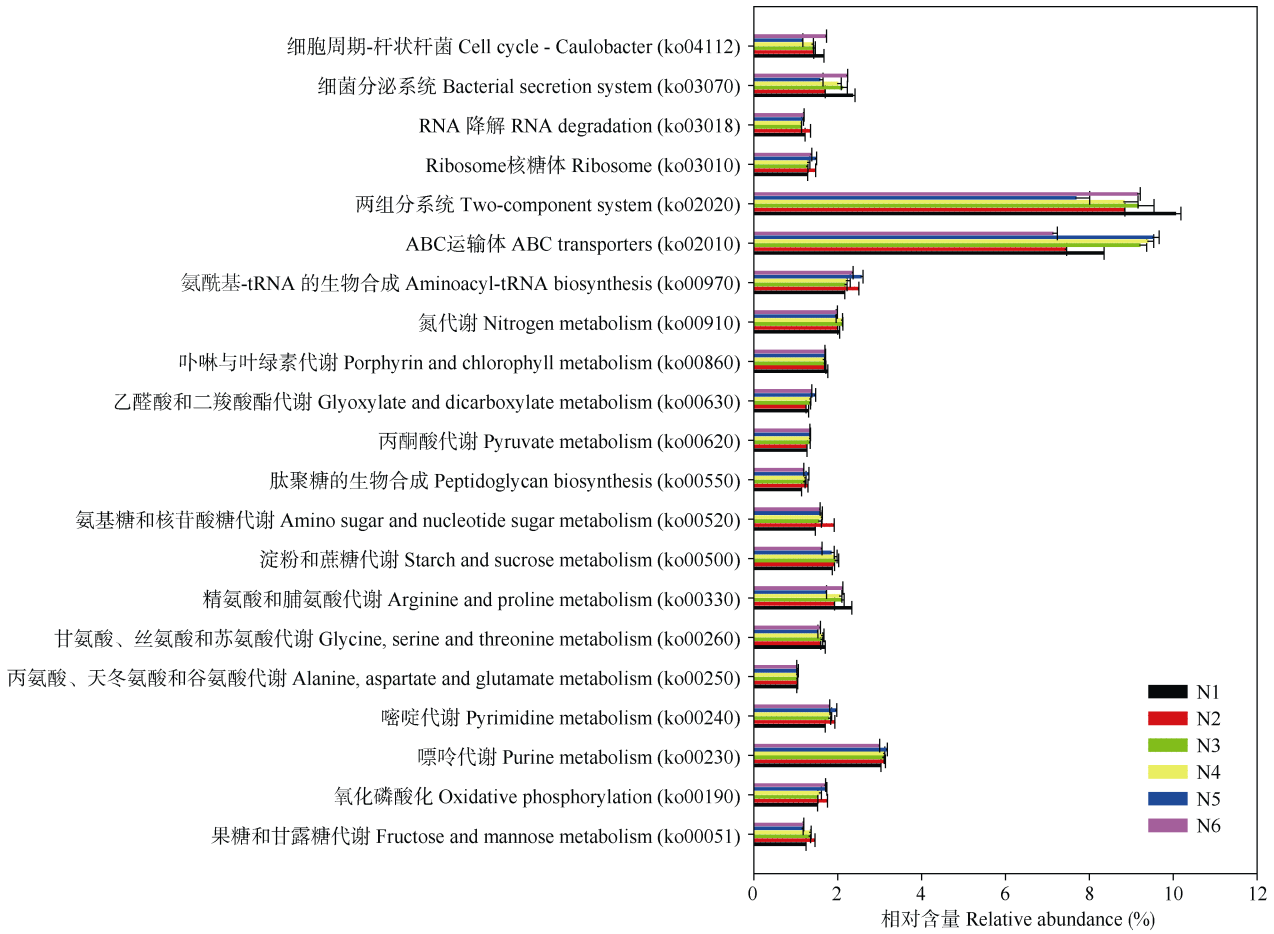


图 8 不同氮源处理复合菌系 KEGG 主要代谢途径的相对丰度(>1.00%)

Fig. 8 Relative abundances of dominant KEGG pathway (>1.00%) of microbial consortium under different treatments of nitrogen resources

N1、N2、N3、N4、N5 和 N6 的氮源为硫酸铵+尿素，比例分别为 0.2%+0、0.16%+0.04%、0.12%+0.08%、0.08%+0.12%、0.04%+0.16%和 0+0.2%。The nitrogen resources of N1, N2, N3, N4, N5 and N6 are ammonium sulfate+urea with ratios of 0.2%+0, 0.16%+0.04%, 0.12%+0.08%, 0.08%+0.12%, 0.04%+0.16%, and 0+0.2%, respectively.

玉米秸秆低温高效降解菌系 GF-20，其在低温 10 ℃下的秸秆降解率达 30%。复合菌系筛选驯化的最终目的是应用到秸秆还田土壤中，通常以生态条件与目标菌系相近的常年秸秆还田土壤作为菌源筛选材料，提高筛选效率及应用效果。

3.1 限制性继代培养过程中保留菌属分析

限制性继代培养筛选过程中保留了在低温条件下直接或间接参与木质纤维素降解代谢途径的菌，菌源样品及复合菌系数量比高于 0.1%的共有菌属有 9 个(图 3，图 4，图 6)，其中纤维弧菌属可分泌 3~4 种纤维素降解酶系，具有木聚糖酶基因，降解羧甲基纤维素、纤维素、半纤维素、几丁质等，如混合纤维弧菌(*Cellvibrio mixtus* subsp.)、*Cellvibrio mixtus strain* J3-8、*Cellvibrio japonicus* 等[11-12]，其中混合纤维弧菌属于产纤维素酶类的兼性厌氧微生物，分泌的纤维素酶属于典型的低温纤维素酶[13]；土地杆菌属和黄杆菌属大多源自于土壤，可利用秸秆降解中间代谢产物促进秸秆分解，如 *Pedobacter ardleyensis* sp.可分泌葡糖苷酶、糖苷水解酶，可利用碳水化合物、醇类和糖苷类等[14-15]，*Pedobacter bambusae* sp.、*Pedobacter caeni*、*Flavobacterium aciduliphilum* sp.分泌过氧化氢酶、氧化酶、葡糖苷酶、半乳糖苷酶等，利用丙酸、乳酸等秸秆降解中间产物，消除底物反馈抑制作用[16-17]；复合菌系中还含有鞘氨醇单胞菌属、根瘤菌、氢噬菌属、*Bosea*、柄杆菌属(*Caulobacter*)等含量低但起到关键作用的菌，其中鞘氨醇单胞菌属和鞘脂菌属(*Sphingobium*)是降解多环芳烃(PAHs)的重要功能微生物，如 *Sphingomonas* sp. GD542 参与石油降解途径[18]，*Sphingobacterim cladoniae* 分泌过氧化氢酶和氧化酶，代谢产生丙酸、琥珀酸、L-丙氨酰胺等有机酸类，在秸秆分解初期调节培养体系 pH 值[19]；氢噬菌属通常分泌水解酶，如 *Hydrogenopha gacaeni* 为兼氧细菌，分泌氧化酶[20]；La 等[21]报道 *Boseaeneae* sp.等菌分泌氧化酶、过氧化氢酶，促进秸秆物质的分解；德沃斯氏

菌属的 *Devosia nitraria* sp.、*Devosia insulae*、*Devosia limi* 等分泌过氧化氢酶, 利用木糖、戊醛糖、纤维素等[22-23]; 柄杆菌属中的 *Caulobacter segnis* 能降解水杨苷[24], *Caulobacter ginsengisoli* 分泌糖苷酶、*Caulobacter segnis*、*Caulobacter vibrioides* 均可在 4 ℃低温条件下生长, 分泌水解酶类, *Caulobacter flavus* 以纤维二糖、木糖为碳源产酸, 分泌葡萄糖苷酶[25]; 根瘤菌属大多存在于根瘤菌中, 既可合成纤维素也降解木质素, 其中 *Rhizobium* YS-1r 具有木质素降解能力, 能够降解各种木质素单体、二聚体以及柳枝草和紫花苜蓿的天然木质素, 并且分泌木质素过氧化物酶(LiP)[26-27]。由此可知, 复合菌系 GF-20 中保留了菌源土壤中的功能菌, 通过限制性培养使其大量扩繁, 大大提高丰度, 从而促进玉米秸秆的降解。

3.2　复合菌系菌种功能多样性分析

复合菌系的限制性继代筛选过程既是淘汰与秸秆降解无关或不适应培养基条件的菌属过程, 也是富集木质纤维素降解菌的过程。复合菌系中保留的菌属均直接或间接参与秸秆降解代谢过程, 或是分泌纤维素、半纤维素、木质素酶等直接降解木质纤维素, 如纤维弧菌属、德沃斯氏菌属、根瘤菌属、鞘氨醇杆菌属、*Niveispirillum*、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)、*Dysgonomonas* 等; 或是分泌葡萄糖苷酶、水解酶、过氧化氢酶等消耗中间代谢产物纤维二糖、木糖、醛糖等, 促进秸秆的持续降解, 如氢噬菌属、土地杆菌属、黄杆菌属、*Bosea*、柄杆菌属、*Leadbetterella*、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)等; 有些菌产生氧化酶类, 调节发酵体系酸碱度维持中性水平, 协调降解秸秆, 如鞘氨醇杆菌属、黄杆菌属、*Bosea* 等分泌氧化酶类, 利用乙酸、乳酸等中间产物, 调节发酵体系酸碱度维持中性水平, 协调降解秸秆; 有些菌可能与秸秆降解没有直接关系, 是因为适应筛选培养基而得以保留。

通过 COG 和 KEEG 数据库对复合菌系功能多样性进行预测比对发现, ABCT 和 TSCP 相对含量最多。就功能概况而言, ABCT 可将氨基酸、脂质、脂糖、肽和无机离子(如金属离子)转运至细胞外部, 从细胞中摄取寡糖、多糖、单糖(例如纤维二糖、纤维糊精、葡萄糖、半乳糖和甘露糖); 而 TCSP 感知细胞外可溶性糖的存在, 并调节大多数糖苷水解酶(GH)和相关的 ABCT, 调节糖类的转运, 以促进复杂植物材料(例如半纤维素)的利用, 并将各种结构的产物(例如木糖)转运到细胞中[28]。代谢功能注释相对丰度大多表现为 N2 处理含有更多的碳水化合物代谢功能, 包括果糖和甘露糖代谢、淀粉和蔗糖代谢以及氨基糖和核苷酸糖代谢等, 促进秸秆降解中间产物的代谢, 从而提高玉米秸秆木质纤维素的降解(图 1); 而部分代谢基因在 N6 处理中注释丰度明显高于其他处理, 说明在尿素氮源条件下, 复合菌系通过促进自身代谢, 从而适应培养环境(表 1)。

3.3　复合菌系间差异菌属分析

菌源土壤与其经过长时间限制性继代培养筛选驯化获得的复合菌系细菌群落结构具有显著差异, 限制性继代培养过程是微生物淘汰的过程, 具有随机性。同样, 将筛选获得的复合菌系培养于不同条件下时, 细菌群落结构也有差异, 说明菌系内部关键菌株的数量比例随着外界培养条件的变化而变化(图 5, 图 6)。根霉菌属(*Rhizomicrobium*)在 N2 中含量较高, *Rhizomicrobium palustre* 可直接利用纤维二糖、木聚糖等参与秸秆降解代谢途径[29], 而 *Rhizomicrobium electricum* 可利用纤维二糖、木糖等代谢中间产物[30]; 短波单胞菌属和无色杆菌属在 N1 和 N2 中丰度为 0.05%、0.08%和 0.59%、3.37%, 在 N6 中为 18.90%和 12.84%, 说明尿素为唯一氮源促进其生长, *Brevundimonas nasdae*、*Brevundimonas bullata* 等均可分泌纤维素酶, 参与秸秆物质的降解, 短波单胞菌属的 *Brevundimonas poindexterae* sp.、*Brevundimona slenta*、*Brevundimonas halotolerans* sp. 等可分泌葡萄糖苷酶, 参与秸秆降解代谢[31], *Brevundimonas poindexterae* sp.、*Brevundimonas staleyi* sp.等可利用纤维二糖等代谢产物; 司美茹等[32]从被石油污染的土壤和焦化污泥中分离出无色杆菌属的 *Achromobacter xylosoxidans* XL 和 SQ-1, 几乎能彻底降解 C12−C23 和 C27−C43 的烷烃和多环芳香烃, *Achromobacter xylosoxidans* 能氧化木糖, 具有过氧化氢酶和氧化酶活性[32-33]; 纤维菌属在混合氮源条件下丰度较高, 许多纤维菌属的细菌应用于秸秆生物降解和生物修复领域, 其中 *Cellulomonas fimi* 分泌的纤维素酶活性高, 包括 β-葡萄糖苷酶(GH1, GH3)、内切酶(GH6, GH9)、β-1,4-葡聚糖酶(GH48, GH5)和纤维二糖磷酸化酶(GH94)[33-34]; *Dyadobacter* 在 N2 中的丰度显著高于其他处理菌系, *Dyadobacter* 菌属中的 *Dyadobacter fermentans* NS114T、*Dyadobacter tibetensis* Y620-1 等具有纤维素降解能力[34-35]。

根瘤菌属等 6 个丰度高于 0.1%的属在 N1 和 N2 中存在, 但 N6 中未检测到, 可能是由于以上菌属不能以尿素为唯一氮源, 在继代过程中逐渐被淘汰或含量显著降低; 短波单胞菌属等 8 个属在 N1 处理中含量很低, 但在 N6 中含量显著增加, 说明尿素为唯一氮源促进以上菌种繁殖。另外, *Niveispirillum* 等 9

个属在菌源土壤中未检测到，而在复合菌系中检测出，说明在继代培养的条件下新增加了 9 个微生物属，可能来源于空气，随继代过程中被保留下，或这 9 个微生物属在继代培养的条件下得到了大量繁殖，数量增加，在 16S rDNA 扩增测序中被检测到。*Niveispirillum* 菌属在 N1 中含量高于 0.1%，具有直接降解木质素的功能，固氮螺菌属丰度为 7.40%，*Niveispirillum* 与固氮螺菌属具有协同降解作用[36]；寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)属于纤溶微生物，多报道于石油降解菌种，具有降解烷烃类物质的作用[37]；*Pleomorphomonas* 可分泌脲酶和糖苷酶，常以尿素为氮源[38]；Lewin 等[39]和 Abt 等[40]报道的纤维素降解复合菌系中有 *Leadbetterella* 属的 *Leadbetterella byssophila*；在牛粪中富含降解纤维素和木质素的 *Dysgonomonas* 菌属[41]；类芽孢杆菌属中的 *Paenibacillus terrae* 等筛选自土壤，具有较高的纤维素酶活性，可直接降解纤维素类物质[42]；*Nubsella* 和 *Parapusillimonas* 在相关文献中暂没有报道具有秸秆或纤维素降解功能。

复合菌系通过调节微生物组成，进一步调节其功能多样性，从而适应不同尿素含量培养条件，进而促进秸秆的降解。不同氮源处理间，N2 处理复合菌系 Alpha 多样性指数显著高于其他处理，菌种组成多样性较高，*Nubsella*、*Dysgonomonas*、根瘤菌、*Niveispirillum*、*Taibaiella* 等参与秸秆降解途径的菌属含量增加，促进其秸秆降解进程，导致 N2 处理秸秆降解效率较高。

4 结论

菌源样品及复合菌系间的Alpha多样指数、OTU丰度和差异度、物种结构及含量均存在显著差异，不同氮源处理间，N2 处理复合菌系的菌种组成多样性较高，菌群结构更加丰富、均匀。在限制性继代培养过程中保留含量高于 0.1%菌属有纤维弧菌、根瘤菌、土地杆菌、噬氢菌、黄杆菌、*Bosea*、德沃斯氏菌、柄杆菌、鞘氨醇单胞菌等，均可分泌水解酶和氧化酶，直接或间接参与秸秆降解进程中；在氮源硫酸铵和尿素含量 0.16+0.04%(N2)配比条件下，优势菌种为纤维弧菌、黄杆菌、土地杆菌，N2 处理较其他处理避免了单一氮源造成的局限性，多样性指数增加，菌群组成结构优化，碳水化合物代谢功能注释相对丰度较高，提高了秸秆降解效率，为进一步开发秸秆还田促腐菌剂提供基础。

参考文献 References

[1] MARSCHNER P, KANDELER E, MARSCHNER B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(3): 453–461

[2] PETERSSON L, KVIEN I, OKSMAN K. Structure and thermal properties of poly (lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials[J]. Composites Science and Technology, 2007, 67(11/12): 2535–2544

[3] YANG H Y, WU H, WANG X F, et al. Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3546–3550

[4] WANG X J, YUAN X F, WANG H, et al. Characteristics and community diversity of a wheat straw-colonizing microbial community[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(40): 7853–7861

[5] ULRICH A, KLIMKE G, WIRTH S. Diversity and activity of cellulose-decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application[J]. Microbial Ecology, 2008, 55(3): 512–522

[6] LI P P, WANG X F, YUAN X F, et al. Screening of a composite microbial system and its characteristics of wheat straw degradation[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(10): 1586–1594

[7] FENG Y J, YU Y L, WANG X, et al. Degradation of raw corn stover powder (RCSP) by an enriched microbial consortium and its community structure[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 742–747

[8] QINGGEER, GAO J L, YU X F, et al. Screening of a microbial consortium with efficient corn stover degradation ability at low temperature[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(10): 2369–2379

[9] YU X F, BORJIGIN Q, GAO J L, et al. Exploration of the key microbes and composition stability of microbial consortium GF-20 with efficiently decomposes corn stover at low temperatures[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(8): 1893–1904

[10] PARKS D H, BEIKO R G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities[J]. Bioinformatics, 2010, 26(6): 715–721

[11] NELSON C E, GARDNER J G. In-frame deletions allow functional characterization of complex cellulose degradation phenotypes in *Cellvibrio japonicus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(17): 5968–5975

[12] MILLWARD-SADLER S J, DAVIDSON K, HAZLEWOOD G P, et al. Novel cellulose-binding domains, NodB homologues and conserved modular architecture in xylanases from the aerobic soil bacteria *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* and *Cellvibrio mixtus*[J]. Biochemical Journal, 1995, 312(1): 39–48

[13] WU Y R, HE J Z. Characterization of a xylanase-producing *Cellvibrio mixtus* strain J3-8 and its genome analysis[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10521

[14] WANG W D, YAN L, CUI Z J, et al. Characterization of a microbial *consortium* capable of degrading lignocellulose[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(19): 9321–9324

[15] DA X Y, JIANG F, CHANG X L, et al. *Pedobacter ardleyensis* sp. nov., isolated from soil in Antarctica[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(11): 3841–3846

[16] WON K H, KOOK M, YI T H. *Pedobacter bambusae* sp. nov., isolated from soil of a bamboo plantation[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 107(2): 565–573

[17] KANG J Y, CHUN J, JAHNG K Y. *Flavobacterium aciduliphilum* sp. nov., isolated from freshwater, and emended description of the genus *Flavobacterium*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(5): 1633–1638

[18] 周丽沙, 李慧, 张颖, 等. 石油污染土壤鞘氨醇单胞菌遗传多样性 16S rDNA-PCR-DGGE 分析[J]. 土壤学报, 2011, 48(4): 804–812
ZHOU L S, LI H, ZHANG Y, et al. Analysis of *Sphingomonas* genetic diversity in petroleum-contaminated soils by using PCR-DGGE technique[J]. Acta Pedologica Sinica, 2011, 48(4): 804–812

[19] DUAN J, LIANG J D, DU W J, et al. Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain *Sphingobacterium* sp. HY-H[J]. Advanced Materials Research, 2014, 955/959: 548–553

[20] XING W, LI J L, LI P, et al. Effects of residual organics in municipal wastewater on hydrogenotrophic denitrifying microbial communities[J]. Journal of Environmental Sciences, 2018, 65: 262–270

[21] LA SCOLA B, MALLET M N, GRIMONT P A D, et al. *Bosea eneae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das *et al.* 1996)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1): 15–20

[22] XU L, ZHANG Y, READ N, et al. *Devosia nitraria* sp. nov., a novel species isolated from the roots of *Nitraria sibirica* in China[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2017, 110(11): 1475–1483

[23] HASSAN Y I, LEPP D, ZHOU T. Genome assemblies of three soil-associated *Devosia* species: *D. insulae*, *D. limi*, and *D. soli*[J]. Genome Announcements, 2015, 3(3): e00514-15

[24] JIN L, LEE H G, KIM H S, et al. *Caulobacter daechungensis* sp. nov., a stalked bacterium isolated from a eutrophic reservoir[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(7): 2559–2564

[25] SUN L N, YANG E D, WEI J C, et al. *Caulobacter flavus* sp. nov., a stalked bacterium isolated from rhizosphere soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(12): 4374–4380

[26] JACKSON C A, COUGER M B, PRABHAKARAN M, et al. Isolation and characterization of *Rhizobium* sp. strain YS-1r that degrades lignin in plant biomass[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(4): 940–952

[27] LAUS M C, VAN BRUSSEL A A N, KIJNE J W. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(6): 533–538

[28] TER BEEK J, GUSKOV A, SLOTBOOM D J. Structural diversity of ABC transporters[J]. Journal of General Physiology, 2014, 143(4): 419–435

[29] UEKI A, KODAMA Y, KAKU N, et al. *Rhizomicrobium palustre* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, fermentative stalked bacterium in the class *Alphaproteobacteria* isolated from rice plant roots[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2010, 56(3): 193–203

[30] KODAMA Y, WATANABE K. *Rhizomicrobium electricum* sp. nov., a facultatively anaerobic, fermentative, prosthecate bacterium isolated from a cellulose-fed microbial fuel cell[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(8): 1781–1785

[31] ABRAHAM W R, ESTRELA A B, NIKITIN D I, et al. *Brevundimonas halotolerans* sp. nov., *Brevundimonas poindexterae* sp. nov. and *Brevundimonas staleyi* sp. nov., prosthecate bacteria from aquatic habitats[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(8): 1837–1843

[32] 司美茹, 赵云峰, 苏涛. 高效降解烷烃的无色杆菌 XL 株的分离鉴定及其降解特性[J]. 土壤通报, 2011, 42(3): 562–567
SI M R, ZHAO Y F, SU T. Isolation and identification of a high-efficiency alkane-degrading *Achromobacter insolitus* XL strain and its degradation characteristics[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2011, 42(3): 562–567

[33] 唐玉斌, 孙常宇, 陈芳艳, 等. 一株[艹屈]高效降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 593–597
TANG Y B, SUN C Y, CHEN F Y, et al. Isolation and identification of a chrysene-degrading strain and its degradation characteristics[J]. Microbiology, 2009, 36(4): 593–597

[34] WAKARCHUK W W, BROCHU D, FOOTE S, et al. Proteomic analysis of the secretome of *Cellulomonas fimi* ATCC 484 and *Cellulomonas flavigena* ATCC 482[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151186

[35] ZHUANG W P, ZHANG S Z, XIA X, et al. Draft genome sequence of *Cellulomonas carbonis* T26^{T} and comparative analysis of six *Cellulomonas genomes*[J]. Standards in Genomic Sciences, 2015, 10: 104

[36] KUPRYASHINA M A, PETROV S V, PONOMAREVA E G, et al. Ligninolytic activity of bacteria of the genera *Azospirillum* and *Niveispirillum*[J]. Microbiology, 2015, 84(6): 791–795

[37] 肖建军, 李亚龙, 杨琦. 寡养单胞菌降解石油污染土壤中的甲苯[J]. 环境工程, 2018, 36(4): 186–189
XIAO J J, LI Y L, YANG Q. Degradation of toluene in petroleum contaminated soil by *Stenotrophomonas* sp. MJ-1[J]. Environmental Engineering, 2018, 36(4): 186–189

[38] MADHAIYAN M, JIN T Y, ROY J J, et al. *Pleomorphomonas diazotrophica* sp. nov., an endophytic N-fixing bacterium isolated from root tissue of *Jatropha curcas* L.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(7): 2477–2483

[39] LEWIN G R, JOHNSON A L, SOTO R D M, et al. Cellulose-enriched microbial communities from leaf-cutter ant (*Atta colombica*) refuse dumps vary in taxonomic composition and degradation ability[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151840

[40] ABT B, TESHIMA H, LUCAS S, et al. Complete genome sequence of *Leadbetterella byssophila* type strain (4M15^{T})[J]. Standards in Genomic Sciences, 2011, 4(1): 2–12

[41] ZIEMER C J. Newly cultured bacteria with broad diversity isolated from eight-week continuous culture enrichments of cow feces on complex polysaccharides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(2): 574–585

[42] LIANG Y L, ZHANG Z, WU M, et al. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27–1[J]. Biomed Research International, 2014, 2014: 512497