

## 研究报告

# 生物炭-牛粪堆肥中产 $\beta$ -葡聚糖苷酶微生物群落应答碳代谢抑制效应

苏尔烈, 张欣悦, 李闪闪, 陈燮晖, 范志华, 李洪涛\*

东北农业大学资源与环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

苏尔烈, 张欣悦, 李闪闪, 陈燮晖, 范志华, 李洪涛. 生物炭-牛粪堆肥中产  $\beta$ -葡聚糖苷酶微生物群落应答碳代谢抑制效应[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2124-2134

Su Erlic, Zhang Xinyue, Li Shanshan, Chen Xiehui, Fan Zhihua, Li Hongtao. Beta-glucosidase-producing microbial community in response to the carbon catabolite repression during the composting of cattle manure with biochar[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2124-2134

**摘要:**【背景】在高浓度葡萄糖引起的碳代谢抑制效应下, 产  $\beta$ -葡聚糖苷酶( $\beta$ -glucosidase)功能微生物群落为适应碳代谢压力的变化, 会差异化表达糖耐受和非糖耐受的功能基因。在堆肥中添加生物炭可以改变微生物生存的环境, 进而影响微生物群落的组成与功能。【目的】分析在不同碳代谢压力下添加生物炭对产  $\beta$ -葡聚糖苷酶功能微生物群落的结构组成与功能的影响。【方法】在生物炭牛粪-稻草堆肥中添加葡萄糖、纤维二糖及  $\beta$ -葡聚糖苷酶抑制剂, 构建不同的碳代谢压力。以细菌来源 GH1 家族的  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因为分子标记基因构建基因克隆文库。同时测定羧甲基纤维素酶酶活和  $\beta$ -葡聚糖苷酶酶活。【结果】放线菌、变形菌和拟杆菌是功能微生物群落中的优势菌群。其中,  $C_L$  处理组变形菌数量有所下降, 在添加了抑制剂的处理组中, 拟杆菌的数量明显上升。高浓度葡萄糖显著抑制了羧甲基纤维素酶酶活, 但对  $\beta$ -葡聚糖苷酶酶活影响不大, 其中低浓度纤维二糖的处理可以显著诱导  $\beta$ -葡聚糖苷酶活性。 $G_H C_H$  处理组中  $\beta$ -葡聚糖苷酶表现出高浓度葡萄糖激活特性。【结论】添加生物炭未明显影响参与纤维素降解的功能微生物群落对碳代谢抑制效应的应答。与自然堆肥相比, 在添加了生物炭的堆肥中, 产  $\beta$ -葡聚糖苷酶的微生物群落对添加了高浓度葡萄糖引起的碳代谢抑制效应或添加了低浓度纤维二糖的诱导效应更敏感。

**关键词:** 生物炭牛粪-稻草堆肥; 纤维素分解; 微生物群落;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 碳代谢抑制效应

基金项目: 国家自然科学基金(31870113, 31300428); 黑龙江省自然科学基金(C2015005)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31870113, 31300428); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (C2015005)

\*Corresponding author: E-mail: HTL@neau.edu.cn

Received: 2021-10-18; Accepted: 2022-01-11; Published online: 2022-03-08

## Beta-glucosidase-producing microbial community in response to the carbon catabolite repression during the composting of cattle manure with biochar

SU Erlie, ZHANG Xinyue, LI Shanshan, CHEN Xiehui, FAN Zhihua, LI Hongtao\*

College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

**Abstract:** [Background] High concentration of glucose will cause carbon catabolite repression, and the functional microbial community producing  $\beta$ -glucosidase adapts to such pressure by differentially regulating the expression of glucose-tolerant and non-glucose tolerant  $\beta$ -glucosidases. Adding biochar in compost can change the environment where microorganisms live and affect the composition and function of the microbial community. [Objective] The effects of biochar addition on the structure and function of  $\beta$ -glucosidase-producing microbial community were analyzed under different carbon metabolism pressures. [Methods] Different carbon metabolism pressures were constructed by adding glucose, cellobiose, and  $\beta$ -glucosidase inhibitor into the biochar-cattle manure-maize straw compost. We used the  $\beta$ -glucosidase gene of the GH1 family derived from bacteria as a molecular marker to construct a gene clone library and measured the activities of carboxymethyl cellulase (CMCase) and  $\beta$ -glucosidase. [Results] *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Bacteroidetes* were dominant in the functional microbial community. The relative abundance of *Proteobacteria* was lower in the low-concentration cellobiose group, and that of *Bacteroidetes* was significantly higher in the groups with the addition of inhibitor. High glucose significantly inhibited CMCase activity while had little effect on  $\beta$ -glucosidase activity, and low cellobiose markedly induced  $\beta$ -glucosidase activity. The  $\beta$ -glucosidase was activated by high glucose in the high-concentration glucose+high-concentration cellobiose group. [Conclusion] The addition of biochar did not significantly affect the response of the functional microbial community involved in cellulose degradation to carbon catabolite repression. Compared with the natural compost, the addition of biochar in the compost increased the sensitivity of  $\beta$ -glucosidase-producing microbial community to the carbon catabolite repression induced by high concentrations of glucose and to the inductive effect of low-concentration cellobiose.

**Keywords:** biochar-cattle manure-maize straw composting; cellulose degradation; microbial community;  $\beta$ -glucosidase; carbon catabolite repression

堆肥是有机固体废弃物及畜禽粪便资源化、无害化处理的常用技术手段之一<sup>[1]</sup>。堆肥是一个复杂的生态系统过程,其中,纤维素主要是由肥堆中微生物产生的纤维素酶所分解。纤维素酶可按照其催化作用特点主要分成3种:内切葡聚糖苷酶、外切葡聚糖苷酶和 $\beta$ -葡萄糖苷水解酶<sup>[2-4]</sup>。 $\beta$ -葡聚糖苷酶( $\beta$ -glucosidase)是纤

维素降解过程中的重要限速酶<sup>[5]</sup>。同其他纤维素酶一样,高浓度产物引起的负反馈抑制效应也会影响 $\beta$ -葡聚糖苷酶基因的表达。在自然堆肥中,外源添加高浓度葡萄糖和纤维二糖对产 $\beta$ -葡聚糖苷酶功能微生物的群落组成和功能影响较大<sup>[5]</sup>。在非碳代谢抑制效应(carbon catabolite repression, CCR)下,对酶活贡献更大的非葡萄

糖耐受  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因的表达水平要显著高于糖耐受  $\beta$ -葡聚糖苷酶<sup>[5]</sup>。但在 CCR 效应下, 功能微生物群落上调了糖耐受  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因的表达, 而非糖耐受  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因的表达受到抑制<sup>[6]</sup>。在耐糖/非耐糖  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因差异化表达调控过程中, 上调/下调的  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因在系统发育的分类水平上表现出一定的种属特征<sup>[7]</sup>。

生物炭是指农林废弃物等生物质材料在缺氧条件下热裂解形成的富含芳香烃和单质碳或具有类石墨结构的碳产物, 具有理化性质稳定、抗分解能力强等特点<sup>[8]</sup>。添加生物炭可以改善生态系统的物理组成结构, 并对其中的微生物生态组成和功能产生影响<sup>[9-10]</sup>。已有相当的研究表明, 将生物炭添加至好氧堆肥中能够增强有益微生物的生命活动并加快腐熟<sup>[11-12]</sup>。在施加生物炭的背景下, 环境的改变对参与碳循环过程中纤维素降解的功能微生物群落的结构组成与功能的影响尚缺乏系统性的研究。特别是对产  $\beta$ -葡聚糖苷酶 (纤维素降解的限速酶) 功能微生物群落组成及功能的研究可以更好地帮助解析生物炭添加系统中纤维素的高效降解。

本研究在生物炭牛粪-稻草堆肥中的纤维素主要降解时期即高温后期, 通过添加不同浓度的葡萄糖、纤维二糖及  $\beta$ -葡聚糖苷酶抑制剂 [D-(+)-glucono-1,5-lactone] 共设置 7 个处理, 并测定羟甲基纤维素酶(CMCase)和  $\beta$ -葡聚糖苷酶酶活及构建基因克隆文库的方法, 探究生物炭牛粪-稻草堆肥中功能微生物群落相较于自然堆肥, 在不同碳代谢压力下功能微生物群落结构组成与功能的变化及其内在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验采取牛粪-玉米秸秆堆肥, 堆肥场地及

堆肥材料奶牛粪便、玉米秸秆、生物炭全部来自东北农业大学阿城实验基地。将干燥粉碎后的秸秆、牛粪、生物炭充分混合后添加水分, 干重比为 6:4:1 (添加占牛粪秸秆总重的生物炭), 控制混合物的含水量在 60% 左右。混合物将被分为 3 份, 分别建成 2.5 m×1.5 m×1 m 的堆垛式肥堆。在持续 46 d 的堆肥过程中对肥堆进行定时添加水分, 以保证肥堆的含水率控制在 40%–60% 之间。为保证肥堆的氧气充足, 在堆肥过程的 11、20 和 29 d 对每个堆垛进行翻堆, 共 3 次。原料基本参数见表 1。

Soli DNA Kit 和 Gel Extraction Kit, Omega 公司; 2×Taq Master Mix, 苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; 上、下游引物由吉林库美生物有限公司合成; pMD18-T 载体、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 宝日医生物技术(北京)有限公司。其余试剂均为分析纯, 北京索莱宝生物科技有限公司。

### 1.2 样品采集

在堆肥的第 23 天进行堆肥样品采集工作, 在取样时分别在堆垛 15、50、90 cm 深处等量取出约 2 000 g 样品, 3 个堆垛总计 6 000 g 样品。将样品经过充分混合后平均分为 7 等份, 每份约为 800 g, 并向样品中分别喷洒 40 mL 不同的溶液。按照不同的处理对样品进行标记, 并将

表 1 堆肥原料基本参数

Table 1 Characteristics of the raw material used for the composting

| 原料<br>Material      | pH   | 含水量<br>Moisture<br>content<br>(%) | 总有机碳<br>Total<br>organic<br>carbon (%) | 总氮<br>Total<br>nitrogen<br>(%) | 碳氮比<br>C/N |
|---------------------|------|-----------------------------------|--|--------------------------------|------------|
| 牛粪<br>Cattle manure | 9.05 | 70.57                             | 39.24                                  | 1.78                           | 22.05      |
| 玉米秸秆<br>Maize straw | 6.23 | 9.30                              | 39.59                                  | 0.80                           | 50.11      |
| 生物炭<br>Biochar      | 6.40 | 0.06                              | 47.46                                  | 0.60                           | 79.10      |

其放回到肥堆 50 cm 深处继续进行孵育 6 h 后取出。取出后立即用液氮冷冻样品并运回实验室储存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

上述 7 种不同的溶液成分分别为: (1) 高浓度葡萄糖+低浓度纤维二糖( $G_H C_L$ ); (2) 高浓度葡萄糖+高浓度纤维二糖( $G_H C_H$ ); (3) 高浓度葡萄糖+高浓度纤维二糖+抑制剂( $G_H C_H D$ ); (4) 低浓度纤维二糖( $C_L$ ); (5) 高浓度纤维二糖( $C_H$ ); (6) 高浓度纤维二糖+抑制剂( $C_H D$ ); (7) 去离子水(CK)。样品处理液浓度见表 2。

### 1.3 酶活性测定

#### 1.3.1 CMCase 酶活测定

葡萄糖标准曲线的绘制: 用葡萄糖标准样品配制成  $1\text{ mg/mL}$  的葡萄糖标准液, 分别吸取  $1\text{ mg/mL}$  葡萄糖标准液  $0$ 、 $0.2$ 、 $0.4$ 、 $0.6$ 、 $0.8$ 、 $1.0$ 、 $1.2$ 、 $1.4$ 、 $1.6$ 、 $1.8\text{ mL}$  于试管中, 每管加入醋酸缓冲液( $0.1\text{ mol/L}$ ,  $\text{pH } 5.0$ )至  $2\text{ mL}$ , 每个试管中加入  $1.5\text{ mL}$  的 DNS 显色剂, 配制成不同葡萄糖含量的反应原液, 各试管摇匀后沸水浴  $5\text{ min}$ 。将每个试管定容到  $25\text{ mL}$  并摇匀, 在  $540\text{ nm}$  波长处测定各试管中溶液的吸光值, 绘制成葡萄糖标准曲线<sup>[13]</sup>。

称取  $1\text{ g}$  堆肥样品至  $10\text{ mL}$  的离心管中, 加入  $8\text{ mL}$  的无菌水, 充分振荡  $1\text{ h}$ ,  $6\text{ 000 r/min}$  离心  $10\text{ min}$  后, 吸取  $2\text{ mL}$  上清液到带塞的试管

中, 在空试管中加入  $2\text{ mL}$  无菌水作为对照组。在各试管中加入  $1.5\text{ mL}$  醋酸缓冲液( $0.1\text{ mol/L}$ ,  $\text{pH } 5.0$ ), 并分别加入  $4\text{ mL}$  已预热的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)底物溶液( $4\text{ mmol/L}$ ), 对照组不加底物, 以无菌水代替。 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴使底物与酶充分反应  $1\text{ h}$  后取出, 立即加入  $1.5\text{ mL}$  DNS 显色液以中止酶促反应。充分摇匀后沸水浴  $5\text{ min}$ , 取出后用水定容至  $25\text{ mL}$ , 在  $540\text{ nm}$  波长下测定酶液的吸光值。利用标准曲线得到葡萄糖浓度和吸光度的关系, 根据关系式计算各样品 CMCase 的活性<sup>[13]</sup>。

#### 1.3.2 $\beta$ -葡聚糖苷酶活性测定

对硝基苯酚标准曲线的绘制: 用对硝基苯酚配制成  $1\text{ mmol/L}$  的对硝基苯酚标准液, 分别吸取  $0$ 、 $0.2$ 、 $0.4$ 、 $0.6$ 、 $0.8$ 、 $1.0$ 、 $1.2$ 、 $1.4$ 、 $1.6$ 、 $1.8\text{ mL}$  于  $10\text{ mL}$  的离心管中, 每管加入醋酸缓冲液( $0.1\text{ mol/L}$ ,  $\text{pH } 5.0$ )至  $2\text{ mL}$ , 每个试管加入  $1\text{ mL}$  无菌水和  $2\text{ mL}$  的碳酸钠溶液( $1\text{ mol/L}$ ), 摇匀后在  $400\text{ nm}$  波长处测定各离心管中溶液的吸光值, 绘制成对硝基苯酚标准曲线<sup>[13]</sup>。

称取  $1\text{ g}$  堆肥样品至  $10\text{ mL}$  离心管中, 加入  $8\text{ mL}$  的无菌水,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r/min}$  充分振荡  $1\text{ h}$  后  $6\text{ 000 r/min}$  离心  $10\text{ min}$ , 吸取上清液即粗酶液  $0.5\text{ mL}$  到新的  $10\text{ mL}$  离心管中, 再吸取  $0.5\text{ mL}$  上清液到另一个新的  $10\text{ mL}$  离心管中作为对照组, 用以消除堆肥样品本身颜色对吸光度结果的影响, 各离心管中加入  $1.5\text{ mL}$  的醋酸缓冲液( $0.1\text{ mol/L}$ ,  $\text{pH } 5.0$ ), 实验组加入  $1\text{ mL}$  已预热的对硝基苯基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside,  $p\text{NPG}$ )底物溶液( $4\text{ mmol/L}$ )。充分混匀后  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴使底物与酶充分反应  $30\text{ min}$  后取出, 立即加入  $2\text{ mL}$  的碳酸钠溶液( $1\text{ mol/L}$ )以终止酶促反应。对照组不加入底物与碳酸钠溶液且不需要酶促反应。在  $400\text{ nm}$  波长处用对照组调零测定实验组

表 2 样品处理液浓度

Table 2 The formulation of sample solution

| 处理液<br>Treatments | 葡萄糖<br>Glucose<br>(mmol/L) | 纤维二糖<br>Cellobiose<br>(mmol/L) | D-葡萄糖酸-1,5-内酯<br>D-gluconate-1,5-lactone<br>(mmol/L) |
|-------------------|----------------------------|--------------------------------|--|
| $G_H C_L$         | 200                        | 0.8                            | 0  |
| $G_H C_H$         | 200                        | 8.0                            | 0  |
| $G_H C_H D$       | 200                        | 8.0                            | 2  |
| $C_L$             | 0                          | 0.8                            | 0  |
| $C_H$             | 0                          | 8.0                            | 0  |
| $C_H D$           | 0                          | 8.0                            | 2  |
| CK                | 0                          | 0.0                            | 0  |

酶液的吸光值。利用标准曲线得到对硝基苯酚浓度和吸光度的关系,根据关系式计算各样品 $\beta$ -葡聚糖苷酶的活性<sup>[13]</sup>。

#### 1.4 来自 GH1 细菌家族 $\beta$ -葡聚糖苷酶基因文库的构建

##### 1.4.1 堆肥中 DNA 的提取和纯化

根据说明书的步骤使用 Soil DNA Kit 提取基因组 DNA,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  储存备用。

##### 1.4.2 目的基因片段的扩增

对添加了生物炭的 7 个堆肥样品进行目的片段扩增。实验采用的引物由 Primer 软件设计,用于扩增 GH1 家族细菌来源的 $\beta$ -葡聚糖苷酶基因。上游引物为 GH1BF300 (5'-KCVTAYCARATIG ARGG-3'),下游引物为 GH1BR1600 (5'-GCCCA YTCRAARTTRTCIA-3')。通过调整退火温度的梯度温度 PCR 探索最适反应条件。PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ):  $2\times\text{Ta}q$  Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(0.8  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , 无菌水 9.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  60 s,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  90 s, 共 30 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min。

##### 1.4.3 重组子的连接、转化

PCR 产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳分离,并使用 Gel Extraction Kit 纯化凝胶,然后将纯化后的 DNA 和载体 pMD18-T 进行连接。

将连接产物共计 10  $\mu\text{L}$  加入 100  $\mu\text{L}$  大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,轻弹混匀后放入冰盒中进行冰浴 30 min。冰浴后将离心管转移至  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴锅中热激 60 s,再立即放回冰盒中冷却 2 min,再向离心管内加入 800  $\mu\text{L}$  液体 LB 培养基摇匀。将离心管封好放入  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床中振荡培养 1 h。最后将含有感受态细胞的培养液涂在含有 50  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 固体培养基上。平板倒置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养过夜。

#### 1.5 重组子的鉴定

固体 LB 培养基上生长出大量白色菌落,挑取大小适中的单菌落进行 PCR 检测,通过 PCR 检测转化子是否为阳性。将检出与目的片段大小相同条带的菌落挑至含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下 180 r/min 进行扩大培养过夜。然后将部分菌液送至北京华大基因公司对目的片段进行常规测序。将测序获得的序列在 NCBI 数据库中进行序列比对分析。

#### 1.6 统计分析

采用 SPSS 26.0 计算标准差,采用 GraphPad Prism 进行显著性分析,采用 Excel 2007 和 Origin 2018 软件对数据进行处理分析汇总并绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 堆肥样品的理化性质

#### 2.1.1 CMCase 与 $\beta$ -葡聚糖苷酶酶活

CMCase 活性如图 1 所示,所有添加了葡萄糖的处理组的酶活均低于未添加葡萄糖的处理组,这充分证明了高浓度葡萄糖对 CMCCase 酶活的抑制作用,与刘佳文<sup>[6]</sup>和 Nitta 等<sup>[14]</sup>得到的结果一致。 $\beta$ -葡聚糖苷酶活如图 2 所示,与 CMCCase 不同的是,外源添加葡萄糖并没有明显地抑制 $\beta$ -葡聚糖苷酶的酶活性,而在  $C_L$  处理组中, $\beta$ -葡聚糖苷酶活性显著高于其他处理组,表现出诱导-激活的效应。

#### 2.1.2 葡萄糖抑制下 $\beta$ -葡聚糖苷酶的相对酶活

葡萄糖抑制下的 $\beta$ -葡聚糖苷酶相对酶活如图 3 所示,分别设置 50、100、200 mmol/L 这 3 个不同浓度的葡萄糖作为反应环境,所测得的相对酶活具有相对下降的趋势,即随着外源添加葡萄糖浓度的升高,葡萄糖抑制下的 $\beta$ -葡聚糖苷酶相对活性也随之降低。高浓度葡萄糖处理组、非高浓度葡萄糖处理及对照组在葡萄糖抑制下的 $\beta$ -葡聚糖苷酶相对酶活变化表现出

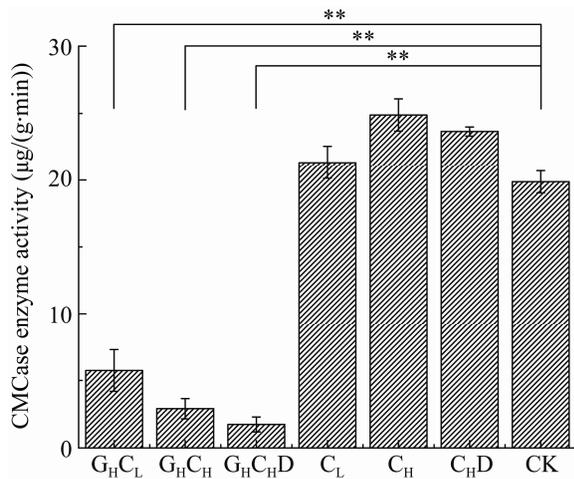


图 1 各处理组样品的羟甲基纤维素酶酶活性  
Figure 1 The CMCase activities. \*\*:  $P < 0.01$ .

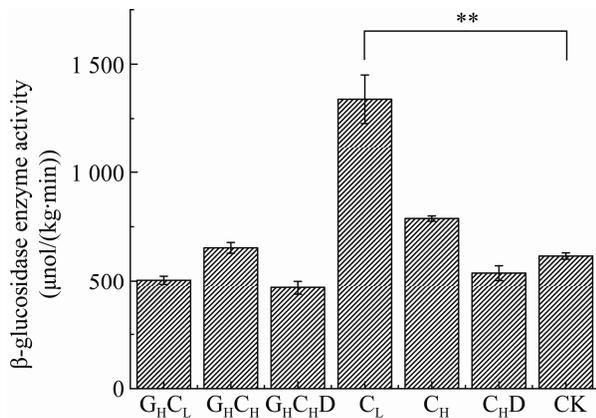


图 2 各处理组样品的  $\beta$ -葡聚糖苷酶酶活性  
Figure 2 The  $\beta$ -glucosidase activities. \*\*:  $P < 0.01$ .

一定的差异性。在 G<sub>H</sub>C<sub>L</sub> 处理组中, 50 mmol/L 和 100 mmol/L 葡萄糖浓度下,  $\beta$ -葡聚糖苷酶相对活性显著高于其他处理组; 而在 G<sub>H</sub>C<sub>H</sub> 处理组中, 200 mmol/L 葡萄糖浓度下  $\beta$ -葡聚糖苷酶相对活性不降反升, 甚至大于 100 mmol/L 葡萄糖浓度下的相对活性。

## 2.2 $\beta$ -葡聚糖苷酶基因文库的构建与分析

### 2.2.1 目的 DNA 片段的扩增及纯化

对 7 个堆肥样品进行 DNA 提取后, 利用通

用引物 F300 和 R1600 进行 PCR 扩增, 获得了长度约为 1 200 bp 的 DNA 分子片段, 反应的特异性良好, 利用纯化试剂盒对 PCR 产物进行回收纯化, 以用于后续连接载体的实验。图 4 为部分 PCR 样品的凝胶电泳图。

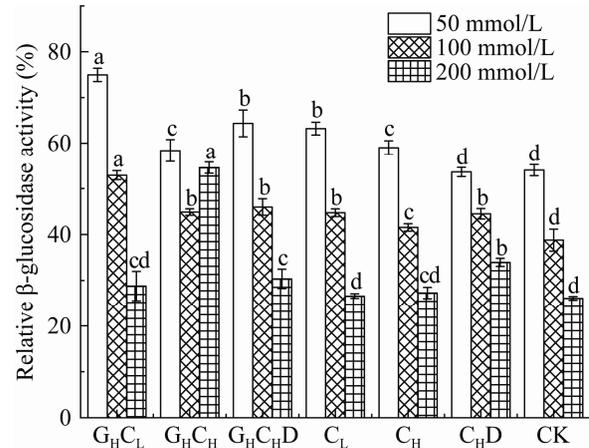


图 3 各处理组在不同葡萄糖浓度抑制下的  $\beta$ -葡聚糖苷酶相对活性 不同小写字母表示各列平均值之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )

Figure 3 Relative  $\beta$ -glucosidase activity of the treatments under different glucose concentrations. Different lowercase letters indicate significant differences among mean values in columns ( $P < 0.05$ ).



图 4 PCR 扩增结果 1: DLT2000 Marker; 2: PCR 检测阳性结果

Figure 4 The results of PCR amplification of  $\beta$ -glucosidase gene. 1: DLT2000 Marker; 2: PCR amplification of positive.

### 2.2.2 目的 DNA 片段的连接、转化与鉴定

将连接目的基因的载体(pMD18-T)转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,在含有 Amp<sup>+</sup> 的 LB 固体培养基中培养 12–16 h,待菌落大小合适时挑取菌落转移至 LB 液体培养基中继续培养过夜。将培养后的菌液作为模板,进行 PCR 扩增以检测重组质粒是否转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,转化成功的转化子 PCR 检测为阳性,扩增出目的基因大小的条带。将阳性菌液送至北京华大基因公司测序。

### 2.2.3 基因克隆文库的测序

对 7 个样本成功测序的转化子共计 249 个。其中显示有 242 条是  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因。根据葡萄糖耐受  $\beta$ -葡聚糖苷酶氨基酸序列中特异性识别位点 W168/L173 的保守性<sup>[15]</sup>,对后续基因测序所得到的  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因进行糖耐受型/非糖耐受型判定,各处理组葡萄糖耐受基因所占比例如表 3 所示。相较于自然堆肥中葡萄糖耐受  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因比例(9.09%–37.5%)<sup>[6]</sup>,生物炭牛粪-稻草堆肥中葡萄糖耐受  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因比例明显升高(36.4%–69.4%)。

### 2.2.4 DNA 文库中产 $\beta$ -葡聚糖苷酶基因组成

将测序获得的所有  $\beta$ -葡聚糖苷酶编码基因

序列在 NCBI 数据库中进行比对,确定其微生物来源的种属分类,在门水平上进行分类,这些微生物主要分为 5 个门,分别是拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)。详细的门水平分类见图 5。在门水平分类中,放线菌门占主导地位,在 C<sub>L</sub> 处理组其占比最高,达 72%;在 G<sub>H</sub>C<sub>H</sub>D 处理组其占比最低,为 36%。在添加了抑制剂的组中,拟杆菌门的微生物数量相较于未添加抑制剂的组有明显的上升。在目水平进行种属分类,其来源主要可分为 13 个目,分别是鞘脂杆菌目(*Sphingobacteriales*)、根瘤菌目(*Rhizobiales*)、黏球菌目(*Myxococcales*)、小单胞菌目(*Micromonosporales*)、尤泽比氏菌目(*Euzebyales*)、芽孢杆菌目(*Bacillales*)、生丝微菌目(*Hyphomicrobiales*)、酸微菌目(*Acidimicrobiales*)、弯曲杆菌目(*Kallotenuales*)、红螺菌目(*Rhodospirillales*)、肠杆菌目(*Enterobacterales*)、微球菌目(*Micrococcales*)和姜氏菌目(*Jiangellales*)。详细的目的水平分类见图 6,通过目的水平的分析可知,鞘脂杆菌目是拟杆菌门中的主要功能性群落组成;芽孢杆菌目是厚壁菌门中的主要功能性群落组成。

表 3 各处理组葡萄糖耐受  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因比例

Table 3 The ratio of glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase genes of treatments

| 处理组                             | 糖耐受酶基因数目  | $\beta$ -葡聚糖苷酶总数目                          | 糖耐受酶基因所占比例   |
|---------------------------------|---|--|--|
| Treatments                      | Number of glucose-tolerant $\beta$ -glucosidase genes | Number of total $\beta$ -glucosidase genes | The ratio of glucose-tolerant $\beta$ -glucosidase genes to total $\beta$ -glucosidase genes (%) |
| G <sub>H</sub> C <sub>L</sub>   | 8   | 22   | 36.4   |
| G <sub>H</sub> C <sub>H</sub>   | 24  | 40   | 60.0   |
| G <sub>H</sub> C <sub>H</sub> D | 19  | 38   | 50.0   |
| C <sub>L</sub>                  | 20  | 33   | 60.6   |
| C <sub>H</sub>                  | 22  | 35   | 62.9   |
| C <sub>H</sub> D                | 18  | 38   | 47.4   |
| CK                              | 25  | 36   | 69.4   |

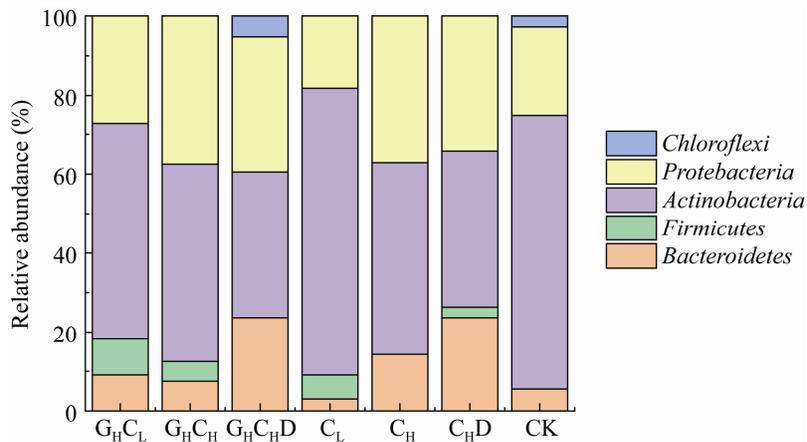


图 5 各处理组产  $\beta$ -葡聚糖苷酶细菌门水平的分类

Figure 5 Taxonomic assignment of  $\beta$ -glucosidase genes of bacterial at the level of phylum.

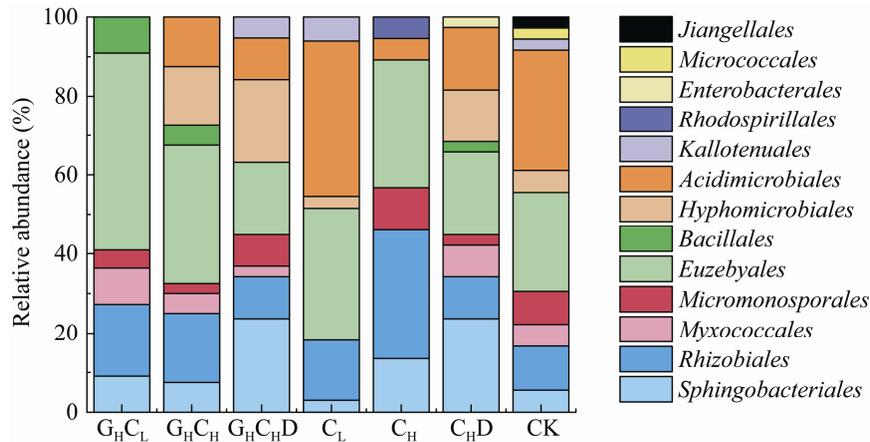


图 6 各处理组产  $\beta$ -葡聚糖苷酶细菌目水平的分类

Figure 6 Taxonomic assignment of  $\beta$ -glucosidase genes of bacterial at the level of order.

### 3 讨论

相关的研究表明, 在自然堆肥的条件下, 功能性微生物群体通过差异化上调葡萄糖耐受型  $\beta$ -葡聚糖苷酶表达, 同时下调非葡萄糖耐受型  $\beta$ -葡聚糖苷酶的表达以应对高浓度葡萄糖引起的碳代谢抑制环境下纤维素水解受限, 并通过提高  $\beta$ -葡聚糖苷酶转糖基活性这一途径来补偿因水解活性下降而受影响的碳代谢速率<sup>[6]</sup>。在差异化表达的过程中, 上调/下调  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因的来源微生物, 在系统发育的分类水平上表

现出一定的种属特征<sup>[7]</sup>。添加生物炭对堆肥中功能微生物群落结构的影响, 以及对功能基因差异化表达的影响尚未可知。

依据酶活变化可知, 与自然堆肥相似<sup>[6]</sup>, 生物炭牛粪-稻草堆肥中添加高浓度葡萄糖的处理组中 CMC<sub>ase</sub> 酶活均明显受到了抑制,  $\beta$ -葡聚糖苷酶酶活受到 CCR 效应的影响不大。相较于自然堆肥<sup>[6]</sup>, 生物炭牛粪-稻草堆肥中  $\beta$ -葡聚糖苷酶的酶活普遍较低, 这一结果与文献[16-18]一致。当前对产生这一现象的原因有不同的见

解。Lehmann 等<sup>[19]</sup>认为这是由于微生物和碳在生物炭表面共存, 在提高效率的同时减少了酶的产出; 而 Liao 等<sup>[20]</sup>认为, 由于生物炭改变了微环境, 从而影响了微生物群落结构。也有可能由于生物炭对于  $\beta$ -葡聚糖苷酶的吸附作用导致了测定酶活结果低于正常值<sup>[21]</sup>。在后续的实验, 通过对  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因转录表达水平的研究分析, 或许可以提供更好的解释。本研究中, 在生物炭牛粪-稻草堆肥的高温后期, 通过分析糖耐受和非糖耐受功能基因的比例可以得出, 生物炭牛粪-稻草堆肥中糖耐受功能基因占比明显高于自然堆肥。考虑到一般条件下非糖耐受  $\beta$ -葡聚糖苷酶转录水平代表了  $\beta$ -葡聚糖苷酶水解活性<sup>[7]</sup>, 这在一定程度上也解释了在添加生物炭后  $\beta$ -葡聚糖苷酶的水解活性普遍降低的原因。糖耐受  $\beta$ -葡聚糖苷酶基因的比例增加, 说明功能微生物群落会差异化表达  $\beta$ -葡聚糖苷酶。在水解活性受到抑制时,  $\beta$ -葡聚糖苷酶通过提高转糖基活性来弥补水解活性的降低以维持碳代谢过程的继续。同时, 在生物炭牛粪-稻草堆肥中 CK 组检出了微球菌目, 在自然堆肥的碳代谢抑制效应下, 微球菌目来源的微生物在功能群落差异化表达  $\beta$ -葡聚糖苷酶的调控中扮演着重要的角色<sup>[7]</sup>。这些证据表明, 不同于自然堆肥, 在堆肥的高温后期, 生物炭牛粪-稻草堆肥处在碳代谢抑制效应下。生物炭的碱性和多孔性为微生物生长提供了合适的微环境, 在这种微环境中, 微生物接触物质将会更容易, 从而使得外源物质对微生物局部的抑制效应和诱导效应均变得更强, 这在本研究中得到了进一步的证实。自然堆肥中, 在  $\beta$ -葡聚糖苷酶的酶活水平变化上, 抑制剂的添加并未表现出明显的抑制效应, 而在生物炭牛粪-稻草堆肥中表现出明显的抑制效应。 $\beta$ -葡聚糖苷酶的酶活在  $C_L$  处理组达到最高点, 说明在该处理组

中, 低浓度的纤维二糖对于  $\beta$ -葡聚糖苷酶的诱导作用十分显著。

相较于自然堆肥各处理在葡萄糖抑制下  $\beta$ -葡聚糖苷酶相对酶活的变化趋势<sup>[6]</sup>, 生物炭牛粪-稻草堆肥的实验结果表明, 在高浓度葡萄糖处理下, 功能微生物群落同样会差异化上调表达葡萄糖耐受型  $\beta$ -葡聚糖苷酶, 其中在  $G_H C_L$  50 mmol/L 和 100 mmol/L 及  $G_H C_H$  200 mmol/L 处理组中,  $\beta$ -葡聚糖苷酶相对酶活显著高于未添加高浓度葡萄糖的处理组。值得注意的是, 在生物炭牛粪-稻草堆肥的  $G_H C_H$  处理组中, 200 mmol/L 葡萄糖抑制下的  $\beta$ -葡聚糖苷酶相对活性显著高于相同处理组在 100 mmol/L 葡萄糖抑制下的  $\beta$ -葡聚糖苷酶相对活性。这一结果显示, 在高浓度葡萄糖的处理下, 功能微生物群落差异化表达  $\beta$ -葡聚糖苷酶不仅体现在糖耐受型  $\beta$ -葡聚糖苷酶和非糖耐受型  $\beta$ -葡聚糖苷酶, 在一定的条件下也可以差异化表达糖激活型  $\beta$ -葡聚糖苷酶。糖激活型  $\beta$ -葡聚糖苷酶是指在葡萄糖存在时催化活性大于无葡萄糖存在时催化活性的一类  $\beta$ -葡聚糖苷酶<sup>[22-25]</sup>。在高浓度葡萄糖抑制下, 功能微生物上调葡萄糖耐受型  $\beta$ -葡聚糖苷酶和葡萄糖激活型  $\beta$ -葡聚糖苷酶。这种功能基因的差异化表达是功能微生物为了响应外界环境变化而具备的一种普遍的调控机制<sup>[26-28]</sup>。这种机制对微生物/功能微生物在复杂环境中的生存与竞争起到了积极的作用。

为了揭示生物炭对堆肥中产  $\beta$ -葡聚糖苷酶微生物的群落组成是否产生影响, 利用 DNA 克隆文库技术对功能基因的多样性组成进行分析。不同于自然堆肥的高温后期的优势菌群为 *Bacteroidetes*<sup>[6]</sup>, 生物炭牛粪-稻草堆肥中的优势菌群为 *Actinobacteria*。可能是由于生物炭对微生物群落的选择作用引起了这种优势菌群的差异。有研究表明, 在土壤中添加生物炭能促进

土壤中 *Actinobacteria* 的生长<sup>[29-30]</sup>, 而同时期的 *Proteobacteria* 成为所有处理组的次优势菌群<sup>[30]</sup>。结合测序结果可知, 绝大多数 *Proteobacteria* 来源的功能基因序列中含有糖耐受特征性保守位点 W168 和 L173。值得注意的是, 在  $C_L$  处理组中, *Proteobacteria* 来源的功能基因相对占比明显偏低。这进一步说明功能微生物在诱导表达  $\beta$ -葡聚糖苷酶的情况下, 具有糖耐受特征的功能基因明显受到抑制。对比添加抑制剂的处理组( $C_HD$  和  $G_HC_HD$ )和未添加抑制剂的处理组( $C_H$  和  $G_HC_H$ ), 拟杆菌的数量有了明显的增加。这可能由于抑制剂 D-葡萄糖酸-1.5-内酯在堆肥过程中对拟杆菌起到了选择作用。

上述研究结果表明, 生物炭对功能微生物群落结构组成及功能产生了一定的影响。这为生物炭作为堆肥过程中的添加剂, 以及纤维素的高效降解和堆肥工艺的优化提供了可借鉴的资料。

## 4 结论

(1) 相较于自然堆肥, 添加生物炭堆肥中的微生物群落结构组成产生了明显的变化, 放线菌是所有处理组的优势菌群,  $C_L$  处理组的变形菌数量有所下降, 在添加了抑制剂的处理组中拟杆菌明显增多。

(2) 相较于自然堆肥, 在添加了生物炭的堆肥中, 产  $\beta$ -葡聚糖苷酶微生物群落对添加了高浓度葡萄糖的碳代谢抑制效应或添加低浓度纤维二糖的诱导效应更敏感。

## REFERENCES

- [1] 刘佳, 许修宏, 李洪涛. 利用 PCR-DGGE 技术对自然堆肥微生物群落多样性的分析[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(9): 35-38  
Liu J, Xu XH, Li HT. Diversity analysis of microbial community of natural compost by PCR-DGGE technique[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2009, 40(9): 35-38 (in Chinese)
- [2] 李洪涛, 许修宏, 卢新颖, 徐莹, 吕盈, 李欣. 好氧堆肥高温期纤维素酶活及  $\beta$ -glucosidase GH1 家族阳性微生物群落的相关研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(9): 119-124  
Li HT, Xu XH, Lu XY, Xu Y, Lv Y, Li X. Monitoring of microbial populations by PCR-DGGE targeting family1  $\beta$ -glucosidase genes and cellulase activity during thermophilic phase of composting[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 42(9): 119-124 (in Chinese)
- [3] Yeh YF, Chang SCY, Kuo HW, Tong CG, Yu SM, Ho THD. A metagenomic approach for the identification and cloning of an endoglucanase from rice straw compost[J]. Gene, 2013, 519(2): 360-366
- [4] Singhanian RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, Pandey A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production[J]. Bioresource Technology, 2013, 127: 500-507
- [5] Zhang XY, Ma B, Liu JW, Chen XH, Li SS, Su EL, Gao LY, Li HT.  $\beta$ -glucosidase genes differentially expressed during composting[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 174
- [6] 刘佳文. CCR 影响堆肥功能性微生物群落差异化表达  $\beta$ -glucosidase[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2020  
Liu JW. Differential  $\beta$ -glucosidase expression in functional microorganism of compost under CCR[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [7] 张欣悦. 堆肥过程中功能微生物群落对碳代谢抑制 (CCR) 的应答机制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2021  
Zhang XY. Functional microbial communities response to carbon catabolite repression (CCR) during cattle manure-maize composting[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2021 (in Chinese)
- [8] 季雅岚, 索龙, 解钰, 王小淇, 方雅各, 杨霖, 赵伶俐, 孟磊. 不同生物质炭对海南砖红壤性质及  $N_2O$  排放的影响[J]. 土壤, 2017, 49(6): 1172-1178  
Ji YL, Suo L, Xie Y, Wang XQ, Fang YG, Yang L, Zhao LR, Meng L. Effects of different biochars on Hainan latosol properties and  $N_2O$  emission[J]. Soils, 2017, 49(6): 1172-1178 (in Chinese)
- [9] Godlewska P, Schmidt HP, Ok YS, Oleszczuk P. Biochar for composting improvement and contaminants reduction: a review[J]. Bioresource Technology, 2017, 246: 193-202
- [10] Sun ZY, Zhang J, Zhong XZ, Tan L, Tang YQ, Kida K. Production of nitrate-rich compost from the solid

- fraction of dairy manure by a lab-scale composting system[J]. *Waste Management*, 2016, 51: 55-64
- [11] Tiquia SM, Wan HC, Tam NFY. Microbial population dynamics and enzyme activities during composting[J]. *Compost Science & Utilization*, 2002, 10(2): 150-161
- [12] 顾文杰, 张发宝, 徐培智, 解开治, 唐拴虎, 陈建生, 黄旭. 接种菌剂对堆肥微生物数量和酶活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(8): 1718-1722
- Gu WJ, Zhang FB, Xu PZ, Xie KZ, Tang SH, Chen JS, Huang X. Inoculum additions during composting: impacts on microbial populations and enzyme activity[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(8): 1718-1722 (in Chinese)
- [13] Zang XY, Liu MT, Fan YH, Xu J, Xu XH, Li HT. The structural and functional contributions of  $\beta$ -glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 51
- [14] Nitta M, Furukawa T, Shida Y, Mori K, Kuhara S, Morikawa Y, Ogasawara W. A new Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>-type transcription factor BgLR regulates  $\beta$ -glucosidase expression in *Trichoderma reesei*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2012, 49(5): 388-397
- [15] De Giuseppe PO, Souza T, Souza FHM, Zanphorlin LM, Machado CB, Ward RJ, Jorge JA, Furriel R, Murakami MT. Structural basis for glucose tolerance in GH1  $\beta$ -glucosidases[J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2014, 70(Pt 6): 1631-1639
- [16] Du ZL, Wang YD, Huang J, Lu N, Liu XR, Lou YL, Zhang QZ. Consecutive biochar application alters soil enzyme activities in the winter wheat-growing season[J]. *Soil Science*, 2014, 179(2): 75-83
- [17] Paz-Ferreiro J, Gascó G, Gutiérrez B, Méndez A. Soil biochemical activities and the geometric mean of enzyme activities after application of sewage sludge and sewage sludge biochar to soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(5): 511-517
- [18] Frene JP, Frazier M, Liu S, Clark B, Parker M, Gardner T. Early effect of pine biochar on peach-tree planting on microbial community composition and enzymatic activity[J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(4): 1473
- [19] Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D. Biochar effects on soil biota-a review[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(9): 1812-1836
- [20] Liao N, Li Q, Zhang W, Zhou GW, Ma LJ, Min W, Ye J, Hou ZN. Effects of biochar on soil microbial community composition and activity in drip-irrigated desert soil[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2016, 72: 27-34
- [21] Günal E, Erdem H, Demirbaş A. Effects of three biochar types on activity of  $\beta$ -glucosidase enzyme in two agricultural soils of different textures[J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2018, 64(14): 1963-1974.
- [22] Salgado JCS, Meleiro LP, Carli S, Ward RJ. Glucose tolerant and glucose stimulated  $\beta$ -glucosidases-a review[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 267: 704-713
- [23] Xu H, Xiong AS, Zhao W, Tian YS, Peng RH, Chen JM, Yao QH. Characterization of a glucose-, xylose-, sucrose-, and D-galactose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the alkalophilic bacterium *Bacillus halodurans* C-125[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(3): 833-839
- [24] Uchiyama T, Miyazaki K, Yaoi K. Characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(25): 18325-18334
- [25] Chan CS, Sin LL, Chan KG, Shamsir MS, Manan FA, Sani RK, Goh KM. Characterization of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Anoxybacillus* sp. DT3-1[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 174
- [26] Alafari HA, Abd-Elgawad ME. Differential expression gene/protein contribute to heat stress-responsive in *Tetraena propinqua* in Saudi Arabia[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28(9): 5017-5027
- [27] Chen Z, Shi SH, Huang Y, Huang CQ, Liu RC, Cheng LF, Fu GH, Chen HM, Wan CH, Fu QL. Differential metabolism-associated gene expression of duck pancreatic cells in response to two strains of duck hepatitis A virus type 1[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(11): 3105-3116
- [28] Liu FS, Pang XJ, Yu ZQ, Wang K. Differential gene expression analysis for osteosarcoma lung metastases[J]. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 2022, 33(3): 379-387
- [29] Prayogo C, Jones JE, Baeyens J, Bending GD. Impact of biochar on mineralisation of C and N from soil and willow litter and its relationship with microbial community biomass and structure[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(4): 695-702
- [30] Watzinger A, Feichtmair S, Kitzler B, Zehetner F, Kloss S, Wimmer B, Zechmeister-Boltenstern S, Soja G. Soil microbial communities responded to biochar application in temperate soils and slowly metabolized <sup>13</sup>C-labelled biochar as revealed by <sup>13</sup>C PLFA analyses: results from a short-term incubation and pot experiment[J]. *European Journal of Soil Science*, 2014, 65(1): 40-51