



第 18 卷 第 8 期 2024 年 8 月 Vol. 18, No.8 Aug. 2024

(www) http://www.cjee.ac.cn

E-mail: cjee@rcees.ac.cn

(010) 62941074

DOI 10.12030/j.cjee.202311002 中图分类号 X713 文献标识码 A

堆肥过程中耐高温菌群的分离鉴定与群落结构分析

刘克椿^{1,2},崔韵唯^{1,2},韦纯忠³,蒋严波^{3,4},申佩弘²,魏源送^{1,5},张俊亚^{1,5,⊠} 1.中国科学院生态环境研究中心,环境模拟与污染控制国家重点联合实验室,北京100085; 2.广西大学,生命 科学与技术学院,南宁 530005; 3.广西北投环保水务集团有限公司,广西壮族自治区智慧水务工程研究中 心,南宁 530022; 4.清华大学深圳国际研究生院,深圳 518055; 5.中国科学院大学,北京100049

摘要 高温菌剂能够缩短堆肥周期,提高堆肥品质,是一种常见的堆肥技术提升手段。通过结合培养组学研究方法,设置 48 种培养条件,包含 6 种培养基、2 种氧环境(好氧&厌氧)和 4 种高温情境(50、60、70、80℃),从堆肥高温期样品中分离纯化获得 196 株耐高温菌株。基于 16S rRNA 生物学分类方法,共鉴定出 4 个门 14 个属 35 个种,其中厚壁菌门(98%)、芽孢杆菌属(51.5%)、地衣芽孢杆菌(28.6%)分别为在门、属、种水平上的优势菌,也包含一些嗜热菌属如热杆菌属(*Caldibacillus*)、栖热菌属(*Thermus*)等。有 27 株耐高温菌表现出了嗜热特性,在高温条件下对至少一种大分子(淀粉、纤维素、蛋白质、脂肪酸)有更强的降解作用,且有 6 株嗜热菌同时表现出对这 4 种大分子有机物的强降解作用。通过 16s rRNA 扩增子测序对比分析了不同来源高温堆肥样品中耐高温菌群结构。结果表明,厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门为优势菌门,而芽孢杆菌属、*Savagea*、热杆菌属、*Limnochorda*和嗜蛋白菌属为优势耐高温菌属,堆肥过程中仍有很多耐高温/嗜热细菌资源有待筛选和挖掘,需要设置更多样化的培养条件;基于 PICRUSt2 的耐高温菌群功能预测结果表明,高温阶段糖代谢、氨基酸代谢及辅助因子和维生素相关代谢为主要代谢途径。 关键词 堆肥;耐高温菌;分离纯化;耐高温菌群结构;功能预测

堆肥是一种前景广阔的处理生物或有机废物的方法,适用于动物粪便、秸秆、木屑、蘑菇渣、食物废物、花园废物和纸张等任何可进行好氧或厌氧分解的废物^[1]。然而,传统的堆肥法存在着一些问题,如发酵时间长、肥效低、腐殖质转化不完全等。为了解决这些问题,缩短堆肥周期并提高堆肥质量成为国内外学者关注的焦点^[2]。堆肥物料中难降解有机物的存在是导致上述问题的主要原因,而堆肥高温期是有机大分子分解的主要阶段,也是确保堆肥无害化的重要阶段^[3]。然而,当堆肥温度升到高温期时,绝大部分微生物的生长繁殖受到了抑制,其种群数量和多样性普遍降低,酶活性受到影响从而限制了有机质的分解。

目前,针对促进堆肥无害化的研究主要集中在工艺优化和筛选耐高温/嗜热菌方面^[4]。嗜热菌具有代谢 快、活性高、酶的热稳定性高、能够在高温条件下杀死病原菌等特点。在堆肥过程中引入嗜热菌,可以增加 高温期微生物的数量,促进难降解有机物的快速转化,从而有效提高堆肥效率^[5]。与常温菌相比,嗜热菌具 有更高的微生物代谢活性和有机物降解速率,在高温环境下对有机物的生物转化具有重要作用^[6]。

由于真菌生长较慢,耐热性较差,代谢较弱等局限性,目前应用于堆肥的微生物菌剂多为细菌^[7-8]。微生物群落演替受原材料自然和外部环境的影响^[9-11]。目前很多国内学者已从不同来源的有机物料堆肥中,有针对性地分离大量的菌株用于堆肥研究工作,且取得了一定的成果。程旭艳等^[12]采用先富集培养再稀释平板法,通过水解试验初筛以及酶活性复筛的方法,从好氧堆肥样品中分离得到一株可在 70 ℃ 条件下生长同时高效降解纤维素、蛋白质和淀粉的耐高温细菌,经初步鉴定确定为属于 Geobacillus 的菌株,并成功应用于鸡粪堆肥,且有效地促进了堆肥升温,延长了高温期持续时间;阮馨怡等^[13]使用 LB 培养基在 55 ℃ 分离筛选出 4 株污泥堆肥菌株,经鉴定,这 4 株菌均为芽孢杆菌属 (Bacillus),并作为微生物菌剂应用到污泥堆肥中,明显提高了堆肥效果;陈枭嘉等^[14]使用 CYS 培养基筛选分离 7 株可在 70 ℃ 条件下生长的细菌,鉴定确定其分别属于 Geobacillustoebii、Geobacillus sp. 、Methylobacterium sp. 和 Thermus thermophilus 等

收稿日期: 2023-11-01; 录用日期: 2024-01-29

基金项目: 广西重点研发计划资助项目(桂科 AB21196036); 南宁市科技重大专项资助项目(20213121)

第一作者:刘克椿 (1999—),男,硕士研究生,2785004469@qq.com **⊠通信作者:**张俊亚 (1986—),男,博士,副研究员, jyzhang@rcees.ac.cn

4 个类别的属种;江高飞等^[15] 以水稻秸秆粉为唯一碳源,在 75 ℃ 条件下,筛选鉴定出 2 株菌,分别为短小 芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 和嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearohermophilus*),在高温条件下对纤维素 和秸秆有较强的降解能力。

尽管以往研究学者使用不同的培养条件筛选出一些有降解作用的高温菌,但仍缺乏系统性的高温菌株筛选。培养组学是一种采用多种培养条件,结合高通量菌种鉴定技术的培养方法^[16]。培养组学广泛用于人类肠 道微生物组的研究,并通过这种方法分离出大量新的细菌种类和以前未在人类中分离出的其他细菌,极大地 促进了人类肠道微生物组的研究^[17-18]。

本研究基于培养组学的研究方法,采用多种培养条件分离、筛选、鉴定堆肥过程中的耐高温菌,并通过高通量测序开展了堆肥耐高温菌群的结构分析,可为甄选高效堆肥微生物菌剂提供一定的参考。主要内容是采用多种培养条件,设置了48种培养条件,涵盖了6种培养基,2种氧还原环境(好氧&厌氧),4种高温条件(50、60、70、80℃),对不同基质堆肥高温期样品筛选耐高温细菌,并进行分离、纯化、鉴定,测定耐高温菌株对淀粉、蛋白质、纤维素和脂肪等大分子有机物的降解能力,考察嗜热菌株的最高生长温度。结合环境样品总 DNA 提取和基于 16S rRNA 的高通量扩增子测序,对4组不同基质堆肥的各个阶段样品进行微生物群落结构分析,探究微生物群落在堆肥不同阶段和不同堆肥方式的变化及相异性,为后期堆肥工作研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究共涉及 5 个批次的样品采集,采集地点分别为:① 2022 年 4 月 30 日于广西泰宝生物科技有限 公司堆肥厂(A1);② 2022 年 10 月 11 日~26 日于广西贵港巨子种养有限公司堆肥厂(A2);③ 2022 年 11 月 2 日~15 日于广西金苗农业有限公司堆肥厂(A3);④ 2022 年 10 月 29 日~11 月 10 日于广西桂沃有机 肥科技有限公司堆肥厂(A4);⑤ 2022 年 8 月 10 日于广西邦禾红鹰生态农业科技公司堆肥厂(仅用于耐高温 菌的筛选)。

采集方法:从堆肥反应堆的 5 个不同区域 (上部位采集 2 个不同点,中部位采集 1 个点,下部位采集 2 个不同点)采集等量的样品,人工彻底混合后作为代表性样品 (采集量约为 200 g)。现场采集后放置冰盒低 温保存,尽快带回实验室,将收集的样品分成 2 部分。一部分保存在 4 ℃,用于耐高温菌的分离与筛选;另一部分保存在-80 ℃,用于物理化学特性分析和 DNA 提取^[19]。采集样品的基本物化特征如表 1 所示。

1.2 筛选培养基

本研究共选择 6 种培养基类型,设置 2 种氧环境条件,开展耐高温菌的筛选。所采用的培养基如下。 纤维素刚果红培养基:硝酸钠 1.0 g、羟基纤维素钠 5.0 g、磷酸氢二钠 1.2 g、磷酸二氢钾 0.9 g、刚果

红 0.2 g、硫酸镁 0.5 g、氯化钾 0.5 g、酵母提取物 0.5 g、酸水解酪蛋白 0.5 g、pH 7.0,蒸馏水 1 000 mL。 R2A 培养基:蛋白胨 0.5 g、无水硫酸镁 0.024 g、酵母提取物 0.5 g、酪蛋白水解物 0.5 g、丙酮酸钠

0.3g、葡萄糖 0.5g、可溶性淀粉 0.5g、磷酸二氢钾 0.3g、pH 7.0, 蒸馏水 1 000 mL。

LAMVAB 培养基:蛋白胨 10g、醋酸钠 5.0g、牛肉膏 10g、酵母粉 5g、硫酸镁 0.1g、葡萄糖 20g、吐温 1.0g、硫酸锰 0.05g、磷酸氢二钾 2.0g、柠檬酸三铵 2.0g、pH 7.0,蒸馏水 1 000 mL。

强化梭菌培养基:蛋白胨 10g、牛肉膏 10g、酵母粉 3.0g、葡萄糖 5.0g、可溶性淀粉 1.0g、氯化钠 5.0g、醋酸钠 3.0g、pH 7.0,蒸馏水 1 000 mL。

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 10g、蛋白胨 3.0g、氯化钠 5.0g、pH 7.0,蒸馏水 1 000 mL。

改良亚硫酸盐培养基:蛋白胨 10g、无水亚硫酸钠 1.0g、pH 7.0,蒸馏水 1 000 mL。

厌氧环境:在6种培养基的基础上,通过添加去氧剂实现厌氧环境。去氧剂在培养基的浓度为L-半胱氨酸 0.5 g·L⁻¹,使用时需配制适量浓度后在无菌环境单独过滤除菌后再添加至培养基。

1.3 耐高温菌株的筛选、分离与纯化

选择 5 个来源于堆肥高温期的样品,开展耐药高温菌的筛选、分离与纯化实验。

样品预处理按照样品: PBS 缓冲液比 1:10 (*w*:*v*) 混合后放置在转速为 200 r·min⁻¹, 温度为常温的摇床 振荡 1 h, 静置 0.5 h 后取上清液放置在 4 ℃ 保存待用。

| Table 1 Characteristics of the samples from the composting | | | | | | | | |
|--|------------|----------|-------|------|-------|---------|-------------|-------------|
| 样品 | 堆肥时间 | 样品 编号 | 堆体温度/ | ℃рН | 含水率/% | 有机质含量/% | C元素 含量/% | N元素 含量/% |
| | 堆肥前 (0 d) | A1-0 | 28.8 | 8.55 | 42.74 | 41.58 | 24.41 | 1.34 |
| 第一批 (CMC1) | 高温期 (30 d) | A1-30 | 63.7 | 7.78 | 59.83 | 47.76 | 27.39 | 1.14 |
| (槽式堆肥,鸡粪:鸭粪:蘑菇渣:滤泥=3:3:3:2) | 腐熟期 (90 d) | A1-90 | 60.0 | 7.88 | 48.09 | 36.29 | 21.33 | 0.88 |
| | 成品 (120 d) | A1-120 | 37.0 | 7.76 | 36.17 | 34.55 | 17.29 | 1.18 |
| 第二批 (CMC2) (条垛堆肥,鸡粪:甘蔗渣=6:4) | 堆肥前 (0 d) | A2-0 | 33.2 | 8.53 | 59.60 | 39.89 | 20.08 | 1.12 |
| | 高温期 (15 d) | A2-15 | 65.2 | 8.48 | 32.85 | 27.92 | 16.62 | 0.78 |
| | 腐熟期 (60 d) | A2-60 | 56.8 | 8.43 | 30.41 | 23.93 | 19.36 | 1.66 |
| | 堆肥前 (0 d) | A3-1 | 40.8 | 7.64 | 42.43 | 35.59 | 19.77 | 0.96 |
| 第三批 (CMC3) | 中高期 (3 d) | A3-3 | 54.3 | 8.06 | 45.52 | 33.56 | 18.46 | 1.10 |
| (槽式堆肥,鸡粪:鸭粪:滤泥:甘蔗渣=1:1:1:7) | 高温期 (7 d) | A3-7 | 60.8 | 7.82 | 40.09 | 38.09 | 20.35 | 1.04 |
| | 腐熟期 (15 d) | A3-15 | 58.6 | 7.72 | 28.15 | 32.12 | 18.26 | 1.08 |
| 第四批 (CMC4) (覆膜堆肥,鸡粪:谷糠=7:3) | 堆肥前 (0 d) | A4-0 | 48.0 | 7.75 | 56.13 | 65.66 | 31.70 | 2.08 |
| | 高温期 (7 d) | A4-7 | 75.0 | 7.56 | 53.01 | 59.34 | 28.74 | 1.33 |
| | 腐熟期 (13 d) | A4-13 | 62.0 | 8.11 | 49.59 | 59.00 | 26.95 | 1.67 |
| 第五批 (条垛堆肥) | 高温期 (60 d) | A5-60 | 56.6 | 8.23 | 50.12 | 48.96 | 28.39 | 0.82 |

表1 堆肥样品的物化参数特征

注: CMC是鸡粪堆肥 (chicken manure compost) 英文缩写; 第五批堆肥原料为烟粉:甘蔗渣:滤泥:草木灰=2:2:1:1。

设置 50、60、70、80 ℃ 四种培养温度,以及好氧和厌氧两种条件。先使用液体培养基,在 50 ℃ 条件下,对预处理样品进行连续 3 次传代培养,获得耐高温菌的富集样品,并筛选掉 50 ℃ 生长缓慢或不生长的微生物^[20]。在 50 ℃ 富集样品的基础上,继续在 60 ℃ 开展连续三代的传代培养,获得 60 ℃ 富集样品,以此类推获得 70 ℃ 和 80 ℃ 的富集样品。初始样品接种量为 10%,第二、三传代培养筛菌接种量为 5%,每次接种培养 2 d。每一种培养基均设置两个平行实验。为避免杂菌污染,整个实验过程需在无菌环境进行。不同高温条件下获得的耐高温菌富集样品,采用稀释涂布平板法,在 50 ℃ 条件下,进行分离与纯化。

1.4 耐高温菌的菌种鉴定与保藏

本研究共获得 196 株耐高温菌,为明确耐高温菌的物种分类信息,采用菌落 PCR 的方法对目标菌种的 16S rDNA 全长进行了扩增。首先,用灭菌的牙签或枪头挑取单一菌落作为 PCR 模板,正反引物各为 1 μ L,快速 PCR 混合液 (2*Rapid Taq Master Mix)为 12.5 μ L,补超纯水至 25 μ L。引物 27F为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1492R为 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'对细菌 16S rDNA 全 长进行扩增。PCR 反应程序为 95 ℃ 预热 15 min,95 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环,最后引物延伸 5 min。取 5 μ L 的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,检测合格后,送上海 生工进行 Sanger 双端测序,序列经拼接后,通过 NCBI 比对,获得耐高温菌的物种分类信息。

将纯化后的耐高温菌,在无菌环境下,与 40% 的甘油按照体积比 1:1 混合于 1.5 mL 的 EP 管中,后放 在-80 ℃ 冰箱长期保藏。

1.5 耐高温菌的有机物降解实验

基于菌种鉴定结果,本研究共筛选到 35 个种水平的耐高温菌。因此,对应这 35 个种水平耐高温菌,本 研究随机挑选了 35 个菌株,开展其在高温条件下对有机大分子的降解实验。正式实验之前随机取 5 个菌种 在 30、37 和 50 ℃ 不同温度下对有机大分子的降解能力测定。研究发现,50 ℃ 条件测定菌种降解能力略大 于 37 ℃,远高于 30 ℃ 培养的菌种。有机物降解实验均在 50 ℃ 培养条件下进行。

1) 淀粉水解实验。淀粉水解培养基:蛋白胨 20g、可溶性淀粉 20g、酵母粉 10g、锥虫蓝 0.1g、琼脂

15 g, pH 7.0~7.2, 蒸馏水 1 000 mL, 121 °C, 20 min。

先配制淀粉水解培养基,用灭菌的牙签挑取单菌落在在平板上点接,每个平板点接3个点,置于50℃ 培养箱中培养3d。此淀粉培养基颜色为蓝色,若菌落周围出现透明,表明淀粉已被菌分泌的淀粉酶水解, 透明圈的大小和菌落的大小反映该菌降解淀粉能力的强弱,按公式(1)来进行计算。

降解强度 =
$$(D/d)^2$$

(1)

式中: d 为菌落直径 (mm), D 为透明圈直径 (mm)。

2) 油脂水解实验。油脂水解培养基:蛋白胨 10g、NaCl 5g、牛肉膏 5g、油脂 10g、琼脂 15g、 1.6% 中性红水溶液 1 mL, pH 7.2, 蒸馏水 1 000 mL。

用灭菌的牙签挑取单菌落在平板上进行稀释划线,置于 50 ℃ 培养箱中培养 3 d。观察培养基底部,若 菌株对脂肪有降解作用就会产生脂肪酸,导致培养基 pH 偏低,菌株附近培养基会出现红色斑点,为阳性反 应,记为"+",否则为阴性,记为"—",根据红色斑点数量以及大小判断其对脂肪的降解能力大小^[21]。

3) 蛋白质水解实验。明胶-琼脂培养基: NaCl 0.3 g、K₂HPO₄ 0.3 g、MgSO₄·7H₂O 0.3 g、明胶 10.0 g、 琼脂 15.0 g, pH 7.0, 蒸馏水 1 000 mL, 115 ℃ 灭菌 20 min。

酸性汞试剂: HgCl₂ 15 g, 36% 的盐酸 20 mL, 蒸馏水 100 mL。

用灭菌的牙签挑取单菌落在在平板上点接,每个平板点接3个点,置于50℃培养3d后取出。在菌落 周围滴加酸性汞试剂,若出现透明圈则说明该菌具有蛋白酶,可水解明胶,同样按公式(1)来进行计算。

4) 纤维素水解实验。纤维素水解培养基: 羧基纤维素钠 10g、蛋白胨 1g、氯化铵 0.1g、磷酸氢二钾 0.7g、磷酸二氢钾 0.3g、氯化钠 0.1g、七水硫酸亚铁 0.01g、七水硫酸镁 0.5g、琼脂 15g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 121 ℃ 灭菌 20 min^[21]。

将待测菌株点接在纤维素水解培养基上,50 °C 培养3d。在平板上滴加1~2 mL 刚果红溶液,10 min 后 用蒸馏水小心冲洗培养皿上的刚果红溶液,若出现透明圈或者淡黄色圈,则为纤维素分解菌。圈的大小可反 映纤维素水解能力的大小。同样按公式(1)来进行计算。

1.6 总 DNA 提取和微生物群落结构分析

本研究共收集 14 个样品,来源于前 4 批不同的堆肥厂(第 5 批堆肥样品未开展群落分析),开展微生物 群落结构分析;参考地球微生物组计划,选择引物 515F/806R^[22]。取 0.5 g 样品,采用 Fast DNA Spin Kit for Soil 试剂盒 (MP Bio, USA),按照说明书,提取堆肥样品总 DNA,并通过 NanoDrop 测定 DNA 的质量 和浓度。DNA 样品经检测合格后,送至基迪奥生物科技有限公司在 Illumina MiSeq PE250 平台上进行扩 增、建库和测序。

测序得到 raw reads 之后,首先用 FASTP 软件^[23] 对低质量 reads 进行过滤,然后采用 FLASH 软件^[24] 将双端 reads 拼接为 tag,再对 tag 进行过滤,得到的数据称为 Clean tag。接下来用 USEARCH 软件^[25] 的 UPARSE 算法基于 Clean tag 进行聚类,用 USEARCH 软件的 UCHIME 算法去除聚类比对过程中检测到的嵌合体 tag,最终得到的数据为 Effective tag。获得 OTU 后,基于 Effective tag 进行 OTU 丰度统计。根据分析流程,在 RDP 数据库对比序列进行物种注释,使用扩增子分析软件 Qiime 进行 α 多样性分析 和 β 多样性分析,使用 PICRUSt2 软件^[26] 在 KEGG 数据库进行群落功能预测等。

2 结果与讨论

2.1 堆肥过程中可培养耐高温菌群组成特征

本研究共筛选并鉴定了 196 株耐高温细菌,覆盖 4 个门,14 个属 (图 1(c)),35 个种 (图 1(d))。在门水平上,主要为厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、栖热菌门 (Deinococcus-Thermus)和放线菌门 (Actinobacteria),其中厚壁菌门占比 98.0%,放线菌门 2 株,栖热菌门和放线菌门各 1 株 (图 1(a))。这表明,堆肥中可培养的耐高温菌多为厚壁菌门;在属水平上,共有芽孢杆菌属 101 株,占总菌株数的51.5% (图 1(b))。据报道,芽孢杆菌属对有机物质分解能力强,能产生丰富的代谢物质,还有抑菌、除臭等作用^[27];其次是硫胺素芽孢杆菌属 (*Aneurinibacillus*),菌株数量为 34 株,占比 17.3%。硫胺素芽孢杆菌属 能还原硝酸盐,分解硫胺素、酪朊、明胶和吐温 80 等^[28];魏茨曼氏菌属 (*Weizmannia*)和土芽孢杆菌属

(Geobacillus), 菌株数量分别为 23 和 14 株, 占比 17.3% 和 11.7%。魏茨曼氏菌属^[29]可作为一种益生菌, 调节脂质代谢、抗氧化应激和保护内皮细胞损伤来改善动脉粥样硬化; 土芽孢杆菌属^[30]在分解代谢方面具有 多功能性, 是许多耐热酶的来源, 还可以用作生物转化和生物修复等过程中的全细胞催化剂。



Fig. 1 The distribution of high-temperature resistant strains isolated and identified

在 196 株嗜热细菌中,地衣芽孢杆菌 (Bacillus licheniformis) 的菌株数量为 56 株,占比 28.6%,为所有 菌种中占比最大 (图 1(d))。地衣芽孢杆菌具有较强的蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性,能使有机物质快速分 解,促进堆肥腐殖化^[31];其次是嗜热嗜气解硫胺杆菌 (Aneurinibacillus thermoaerophilus),菌株数量为 30 株,占比 15.3%,其能分解硫胺素,还原硝酸盐^[28];凝结芽孢杆菌 (Weizmannia coagulans) 和枯草芽孢杆 菌 (Bacillus subtilis) 也占有一定比例,菌株数量分别为 23 和 15 株。凝结芽孢杆菌能分解糖类物质,在厌氧 条件下能产生蛋白酶;而枯草芽孢杆菌自身合成淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶等酶类,其中纤维素酶 活性较强^[32]。

2.2 堆肥中可培养耐高温菌对有机大分子的降解作用

使用 SPSS 统计学显著性检验分析, p<0.05, 不同菌株之间的降解能力有显著性差异。根据透明圈 D^2/d^2 的大小划分降解强度为 4 个等级, 分别为: 强 ($D^2/d^2>9$)、中 ($9>D^2/d^2>4$)、弱 ($4>D^2/d^2>1$)和无 ($D^2/d^2=0$)降解脂肪强度根据红色斑点数量以及大小判断其对脂肪的降解能力大小, 同样划分为 4 个等级。本 研 究 中 筛 选 了 35 株 耐 热 细 菌 , Aeribacillus pallidus、Agrobacterium tumefaciens、Ammoniibacillus agariperforans、Bacillus pervagus、Bacillus tequilensis、Geobacillus thermoglucosidasius、Geobacillus pallidus、Geobacillus thermodenitrificans 等 8 株未表现出对任一大分子有机物的强降解作用,表 2 展示了

第8期

27 株耐高温菌在高温条件下 (50 ℃) 对大分子有机物的降解能力,6 株对3 种以上有机大分子具有强降解作用,分别为嗜热嗜气解硫胺杆菌 (Aneurinibacillus thermoaerophilus)、解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens)、宫本寿芽孢杆菌 (Bacillus hisashii)、地衣芽孢杆菌 (Bacillus licheniformis)、枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis) 和巨孢链霉菌 (Streptomyces megasporus)。

| Table 2 Degradation characteristics of Cultivable thermotolerant bacteria in compost towards typical macromolecular organic compounds* | | | | | |
|--|-------------------------------------|--|---|---|------------------|
| 序号 | 菌种 | 淀粉降解 强度/ (D ² /d ²) | 蛋白质降解 强度/(D ² /d ²) | 纤维素降解 强度/(D ² /d ²) | 脂肪降解 强度/(+/-) |
| 1 | Aneurinibacillus aneurinilyticus | 弱(3.14) | 无(0) | 无(0) | 无 (-) |
| 2 | Aneurinibacillus thermoaerophilus | 中(5.64) | 强(39.49) | 无(0) | 强(+++) |
| 3 | Bacillus aerius | 无(0) | 强(10.89) | 弱(1.85) | 无 (-) |
| 4 | Bacillus amyloliquefaciens | 弱(2.02) | 强(14.44) | 强(18.25) | 无 (-) |
| 5 | Bacillus cereus | 无(0) | 强(32.08) | 无(0) | 中 (++) |
| 6 | Bacillus hisashii | 中(4.72) | 中 (7.09) | 无(0) | 中 (++) |
| 7 | Bacillus licheniformis | 中(4.17) | 强(23.01) | 强(11.54) | 无 (-) |
| 8 | Bacillus paralicheniformis | 弱(2.29) | 无(0) | 无(0) | 无 (-) |
| 9 | Bacillus smithii | 弱(1.8) | 无(0) | 强(9.56) | 无 (-) |
| 10 | Bacillus subtilis | 弱(5.41) | 强(36.12) | 强(38.16) | 无 (-) |
| 11 | Bacillus thermoamylovorans | 强(26.26) | 无(0) | 强(29.91) | 无 (-) |
| 12 | Bacillus velezensis | 弱(2.09) | 无(0) | 无(0) | 无 (-) |
| 13 | Brevibacillus borstelensis | 弱(2.42) | 强(112.2) | 无(0) | 无 (-) |
| 14 | Brevibacillus parabrevis | 弱(1.89) | 无(0) | 无(0) | 无 (-) |
| 15 | Caldibacillus thermoamylovorans | 弱(2.95) | 中(8.94) | 无(0) | 中 (++) |
| 16 | Geobacillus kaustophilus | 弱(2.35) | 强(31.26) | 无(0) | 无 (-) |
| 17 | Geobacillus proteiniphilus | 弱(2.75) | 无(0) | 无(0) | 无 (-) |
| 18 | Geobacillus stearothermophilus | 弱(2.92) | 无(0) | 无(0) | 无 (-) |
| 19 | Geobacillus thermocatenulatus | 弱(2.97) | 无(0) | 无(0) | 强(+++) |
| 20 | Geobacillus thermoleovorans | 中(19.38) | 无(0) | 无(0) | 中 (++) |
| 21 | Paenibacillus cineris | 弱(3.45) | 无(0) | 强(34.71) | 无 (-) |
| 22 | Paenibacillus cisolokensis | 弱(1.81) | 无(0) | 无(0) | 弱 (+) |
| 23 | Parageobacillus thermoglucosidasius | 中(5.27) | 无(0) | 无(0) | 无(-) |
| 24 | Streptomyces megasporus | 弱(1.42) | 强(24.12) | 弱(3.35) | 无 (-) |
| 25 | Streptomyces thermovulgaris | 无(0) | 强(60.21) | 无(0) | 无 (-) |
| 26 | Thermus scotoductus | 弱(2.67) | 强(42.49) | 无(0) | 无 (-) |
| 27 | Weizmannia coagulans | 中(5.82) | 无(0) | 无(0) | 无 (-) |

表 2 堆肥中可培养耐高温菌对典型大分子有机物的降解特征*

针对单一有机大分子,对淀粉降解能力最强的耐高温菌为 Bacillus thermoamylovorans (D²/d²=26.26, 图 2(a)) >Aneurinibacillus thermoaerophilus (D²/d²=8.15) >Bacillus licheniformis (D²/d²=6.76) >Weizmannia coagulans (D²/d²=5.14) 。蛋白质: Brevibacillus borstelensis (图 2(b)) >Bacillus subtilis>Streptomyces thermovulgaris >Aneurinibacillus thermoaerophilus, 它们的 D²/d² 为 112.3>76.78>60.21>42.63。纤维素: Bacillus subtilis (图 2(c)) >Paenibacillus cineris>Bacillus thermoamylovorans> Bacillus amyloliquefaciens, 它

们的 D²/d² =为 38.16>34.16>29.91>18.25。脂肪酸: Geobacillus thermocatenulatus、Bacillus subtilis、 Aneurinibacillus thermoaerophilus 和 Bacillus hisashii (图 2(d)) 对脂肪的降解能力最强。同以往研究相比, 韩波波等^[21] 筛选的耐高温菌中降解淀粉、蛋白质、纤维素最大 D²/d² 分别为 18.78、3.21、3.62, 而本研究中 的最大值分别为 26.26、112.3、38.16, 远高于其结果,有可能是由于其降解实验在 37 ℃ 进行,未体现耐高 温菌的嗜热特性。WANG 等^[33] 在猪粪堆肥中筛选筛选降解淀粉菌中最大 D²/d² 为 4.08,降解蛋白质菌中最 大 D²/d² 为 12.17,降解纤维素菌中最大 D²/d² 为 3.66,鉴定它们分别为地衣芽孢杆菌、短芽孢杆菌和 *Kitasatospora phosalacine*,它们降解大分子有机物能力与本研究筛选菌株相比弱了很多、这同其在常温下筛 选降解菌株有关,嗜热耐高温菌在高温条件下表现出了更强的大分子有机物降解特征。刘国防^[34] 根据透明圈 法,测晕圈大小和晕圈透明程度判断降解脂肪酸能力大小,筛选得到 2 株高效降解脂肪酸菌株,鉴定其为地 衣芽孢杆菌 (Bacillus licheniformis)和解淀粉芽孢杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens)。但本实验筛选得到的地 衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌并未表现对脂肪酸有降解效果,这也有可能是本实验筛到的菌株对其他有机物 降解较强,降解脂肪能力反而变弱了,这也可能是没有经过脂肪酸富集培养驯化有关。



2.3 堆肥过程中耐高温微生物群落结构分析

本研究中微生物群落多样性和丰富度表现出高温期降低,腐熟期增加的特征,且覆膜堆肥进一步增加了 多样性和丰富度指数,而堆肥物料、堆肥方式、周期的不同亦会导致微生物群落多样性在不同阶段有不同的 变化规律(表3)。如在 A1 组中 α 多样性指数在高温期减少,在腐熟期增加,其丰富度指数表现出相同特 征;在 A2 组中, α 多样性在高温期下降,在腐熟期增加,且腐熟期的 α 多样性比堆肥初期还要高,与此同 时,其丰富度指数随堆肥过程不断增加;在 A3 组中,细菌的 α 多样性在高温期下降后又上升,在腐熟期下 降、其丰富度指数随堆肥的进程在不断下降;在第 A4 组,覆膜堆肥中,在高温期 α 多样性增加,在腐熟期 降低,其丰富度指数变化规律同 α 多样性一致。对比表 1,堆肥从初期很快达到高温期的最高温度。此时细 菌的 α 多样性指数在高温阶段是最高,在高温持续过程中,细菌的 α 多样性指数在不断下降。

厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门是堆肥过程中的主要微生物(图 3(b)),与堆肥中细菌微生物群落结构得到的结果相同^[35]。对堆肥过程中微生物群落结构在门水平的组成进行分析(图 3(a)),A1-30、A2-15、A3-7和A4-7均为堆肥过程中的高温期样品,温度分别达到了 63.7、65.2。A1-30 中厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门分别占比 82%、2.8%、

2.2%; A3-7 中厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门分别占比 14%、74%、0.7%; A4-7 中厚壁菌门、放线菌门和 拟杆菌门分别占比 77.8%、5.2%、0.9%。从高温期到腐熟期还是处于高温持续阶段,发现高温持续阶段,除 了 A4 组之外, 放线菌门的相对丰度是增加的; 在 A4 组中放线菌门从高温期到腐熟期的相对丰度在下降, 这可能是 A4 组的高温阶段处于较高平均温度为 75 ℃; 而拟杆菌门在高温持续阶段的相对丰度在下降、可能 高温环境对拟杆菌门的生长繁殖有较大影响。在筛选高温菌实验得到的菌株多为厚壁菌门。在 A1-30 样品 中,优势菌门为厚壁菌门和拟杆菌门,但在筛菌实验中,并未筛选到拟杆菌门。这可能是在 50 °C 筛菌中拟 杆菌门与其他菌门相比,生长繁殖速度并不占优势,在更高温度下的耐受性较差;在 A3-7 样品中,优势菌 门为厚壁菌门和放线菌门,在筛菌实验仅仅筛选到厚壁菌门。

| 10 | | a diversity of microbial co | minumity during composition | ng |
|--------|---------|-----------------------------|-----------------------------|----------|
| 样品编号 | Shannon | Simpson | Chao | Coverage |
| A1-0 | 7.01 | 0.970 | 2 020.1 | 0.997 |
| A1-30 | 6.38 | 0.953 | 1 773.5 | 0.997 |
| A1-90 | 5.73 | 0.905 | 1-599.9 | 0.996 |
| A1-120 | 6.72 | 0.965 | 1 664.6 | 0.996 |
| A2-0 | 6.86 | 0.942 | 1 286.3 | 0.991 |
| A2-15 | 5.80 | 0.866 | 1 402.0 | 0.993 |
| A2-60 | 7.46 | 0.974 | 2 130.2 | 0.994 |
| A3-0 | 7.49 | 0.958 | 1 897.0 | 0.992 |
| A3-3 | 6.62 | 0.947 | 1 735.1 | 0.996 |
| A3-7 | 7.10 | 0.966 | 1 449.8 | 0.992 |
| A3-15 | 5.90 | 0.928 | 1 215.6 | 0.995 |
| A4-0 | 6.20 | 0.888 | 1 889.7 | 0.996 |
| A4-7 | 7.52 | 0.976 | 2 234.3 | 0.995 |
| A4-13 | 5.58 | 0.886 | 1 370.8 | 0.996 |

| 表3 | 堆肥过程中微生物群落的 | α 多样性指数表 |
|----|-------------|-----------------|
|----|-------------|-----------------|





Fig. 3 Composition of microbial community structure

在不同原料堆肥不同阶段 (图 4(a)), A1 组中, 堆肥初期 A1-0 和高温期 A1-30 的最优势菌属为嗜蛋白 菌属 (Proteiniphilum),可能是蛋白质含量较高,嗜蛋白菌属细菌有较强蛋白质酶活性,易分解利用蛋白质 类物质^[36]。在腐熟期 A1-90 的最优势菌属转变为芽孢杆菌属,芽孢杆菌属细菌对有机物质具有分解作用,产生更多的代谢产物^[37];在 A2 组中,堆肥初期 A2-0 优势菌属为热杆菌属(*Caldicoprobacter*),具有分解木质素和纤维素作用^[38]。在高温期 A2-15 和腐熟期 A2-60 转变为 *Limnochorda*,其被认为是潜在的抗生素降解菌^[39]。可能对类似抗生素结构物质有分解作用;在 A3 组中,堆肥初期 A3-0 和高温期 A3-7 优势菌属为芽孢杆菌属,具有对有机质进行快速分解并升温作用。在腐熟期 A3-15 转变为热多孢菌属(*Themopolyspora*),能合成木聚糖酶,在高温对木聚糖有较强的降解效果^[40];在 A4 组中,堆肥初期 A4-0 的优势菌属为 *Savagea*,其能利用几十种碳水化合物为自身提供能量且产生其他代谢产物,对菊粉酶、果胶酶和木聚糖酶也有较弱的分解效果^[41]。在高温期 A4-7 优势菌属为热杆菌属,在腐熟期 A4-13 转变为芽孢杆菌属和 *Savagea*。



图 4 堆肥过程中耐高温细菌群落相关性热图

Fig. 4 Heatmap of the correlation of high-temperature tolerant bacterial communities during composting

在堆肥过程中的优势耐高温菌中芽孢杆菌属、Savagea、热杆菌属(Caldibacillus)、Limnochorda 和嗜蛋 白菌属(Proteiniphilum)的占比较大,对堆肥的温度上升、有机物降解以及腐殖质的形成起着很大作用。同 时4个堆肥组之间的高温期和腐熟期的优势菌株不完全一样,可能是由于堆肥基质、堆肥周期和方式不同。 A1组高温期 A1-30样品中的优势菌属主要有芽孢杆菌属、嗜蛋白菌属、盐胞菌属(Halocella)、 Defluviitoga、Lactobacillus和热杆菌属,在分离得到的高温菌中仅有芽孢杆菌属、热杆菌属和其他劣势菌 属; A2组高温期 A2-15样品中的优势菌属主要有芽孢杆菌属、嗜蛋白菌属、盐胞菌属、Limnochorda、 Lactobacillus、Defluviitoga和热杆菌属,比1组多了Limnochorda,仅有分离得到芽孢杆菌属和其他劣势菌 属; A3 组高温期 A3-7样品中的优势菌属主要有芽孢杆菌属、Savagea、Limnochorda、栖热菌属,同样仅有 分离得到芽孢杆菌属和其他劣势菌属; A4 组高温期 A4-7样品中的优势菌属主要有芽孢杆菌属、热杆菌属、热杆菌属、 Defluviitoga 和热杆菌属,同样仅有分离得到芽孢杆菌属和其他劣势菌属。本研究即便结合培养组学的方法, 以目前传统的分离高温手段,对于优势菌属仅能分离得到芽孢杆菌属和热杆菌属。本研究筛选得到的4个 门,14个属均在群落中检测到。对于 Savagea 属、Limnochorda 属、嗜蛋白菌属、盐胞菌属、 Defluviitoga 属和 Lactobacillus 属等 6个优势菌属尚未分离得到。这说明堆肥过程中仍有很多耐高温/嗜热细 菌资源有待筛选和挖掘,需要设置更多样化的培养条件。

堆肥环境因素对耐高温菌群的变化具有显著影响。相关性分析表明(图 4(b)), Savagea、Bacteroides、 Anaerosalibacter bizertensis、Atopostipes 等与 TN(总氮)、TOC(有机碳)、OM(有机质)、MC(含水率)呈显著正相关(p<0.05); Erysipelothrix与 OM 呈正相关; Limnochorda、Longispora 与 MC 呈强负相关 (p<0.01), Sphaerobacter 与 MC 呈负相关(p<0.05); 温度与微生物并未呈现出显著相关性(p>0.05),这可能是由于不同堆肥原料和堆肥方式所致,而非单个堆肥的连续化实验变化。

采用主成分聚类分析 (Principal component analysis, PCoA) 对堆肥中耐高温微生物群落进行了样本件的 相似性或差异性解析 (图 5(a)), A1 组耐高温微生物群落显著区别于其它组。A1 组的堆肥基质复杂,且堆肥 周期更长,已进入后腐熟期,而其它组在采样阶段一直处于高温期。在 A1 组中,第 0 d 和第 30 d 样品组成 差异性较小,这可能是在第 30 d 的时候才刚刚到达高温期,微生物群落结构还尚未发生较大改变,到第 90 d 的时候,30 d 和 90 d 样品之间的差异很大,到了 120 d 样品属于成品了、可是含水率变得更低,微生物群 落发生明显变化。其它组的堆肥周期较短,但每个堆肥阶段的样品差异仍然存在尤其是在堆肥初期和高温期 之间。这说明不同的堆肥原料和堆肥周期是导致样品距离的主要因素,其次是堆肥的各个阶段进一步促进样 品之间的差异性。冗余分析结果表明 (图 5(b)),MC、TOC、OM 对耐高温菌群结构影响较大,pH 和温度的 影响相对较小,这与相关性分析结果一致。





2.4 堆肥过程中耐高温微生物群落功能预测

使用 PICRUSt 群落功能预方法对堆肥耐高温菌群进行代谢通路分析 (图 6)。高温期谢功能丰度约为 14.0%,氨基酸代谢丰度约为 14.2%,辅助因子和维生素的代谢丰度约为 13.1%,萜类和多酮类的代谢丰度 约为 9.2%,其他氨基酸的代谢丰度约为 8.2%,脂肪代谢丰度约为 7.5%,DNA 复制和修复约为 5.1%,能量 代谢约为 5.4%,异种生物降解和代谢丰度约为 3.2%,其他功能途径如聚糖的生物合成和代谢、次生代谢物 的生物合成、核苷酸代谢、转录翻译、跨膜分泌等等功能丰度相对较小。在糖代谢中 C5 支链二元酸代谢、戊糖磷酸途径、丙酮酸代谢途径、柠檬酸循环、糖酵解/糖异生、丁酸甲酯代谢、氨基糖和核苷酸糖的代谢等 占比较大。在堆肥高温期的微生物功能中,抗霉素的生物合成功能丰度是其他功能的 3 倍以上。抗霉素具有 杀虫和抗真菌作用^[42],在堆肥过程中真菌的丰度和多样性远不如细菌^[8],可能是受到抗霉素这类物质的影响。在有机大分子的降解实验中,筛选的菌株对淀粉、纤维素、蛋白质的降解在菌株数量上比降解脂肪的菌 株多一些。



Fig. 6 The relative abundance distribution of microbial functions during composting

3 结论

本研究通过培养组学和高通量测序的方法对堆肥过程中耐高温微生物群落结构进行了较为系统的分析, 主要结论如下。

1) 从堆肥高温期样品中共筛选了 196 株耐高温细菌,包含 4 门、14 属、35 种,并以地衣芽孢杆菌 (56 株)、嗜热嗜气解硫胺杆菌(30 株)、凝结芽孢杆菌(23 株)和枯草芽孢杆菌(15 株)为主。

2) 在高温条件下的大分子有机物降解实验表明, Bacillus thermoamylovorans、Brevibacillus borstelensis、Bacillus subtilis和 Geobacillus thermocatenulatus 分别对淀粉、蛋白质、纤维素、脂肪降解作用最强。

3) 细菌群落结构分析表明,堆肥过程中的主要耐高温菌为芽孢杆菌属、Savagea、热杆菌属、 Limnochorda 和嗜蛋白菌属等。这表明堆肥中仍然存在大量本研究未培养得到的耐高温/嗜热细菌。

4) 基于 PICRUSt2 的功能预测结果表明, 堆肥过程高温阶段以糖代谢、氨基酸代谢及辅助因子和维生素 相关代谢为主, 相对丰度分别为 14.0%、14.2% 和 13.1%。

参 考 文 献

- [1] CHIA W Y, CHEW K W, LE C F, et al. Sustainable utilization of biowaste compost for renewable energy and soil amendments[J]. Environmental Pollution, 2020, 267: 115662.
- [2] 程艳, 刘永德, 赵继红, 等. 污泥堆肥中高温菌的研究进展[J]. 中国资源综合利用, 2014(2): 31-32.
- [3] PATRA R K, BEHERA D, MOHAPATRA K K, et al. Juxtaposing the quality of compost and vermicompost produced from organic wastes amended with cow dung[J]. Environmental Research, 2022, 214: 114119.
- [4] SANCHEZ Q J, OSPINA DA M S. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process [J]. Waste Management, 2017, 69: 136-153.
- [5] MENG X, LIU B, ZHANG H, et al. Co-composting of the biogas residues and spent mushroom substrate: Physicochemical properties and maturity assessment [J]. Bioresource Technology, 2019, 276: 281-287.
- [6] XIAO Y, ZENG G M, YANG Z H, et al. Continuous thermophilic composting (CTC) for rapid biodegradation and maturation of organic municipal solid waste[J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 4807-4813.
- [7] LIM S L, WU T Y. Characterization of matured vermicompost derived from valorization of palm oil mill byproduct[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(8): 1761-1769.

[8] XIE G, KONG X, KANG J, et al. Fungal community succession contributes to product maturity during the co-composting of chicken manure and crop residues [J]. Bioresource Technology, 2020, 27(9): 9658-9668.

- BAKER G C, SMITH J J, COWAN D A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 55(3): 541-555.
- [10] YANG W, ZHANG L. Addition of mature compost improves the composting of green waste [J]. Bioresource Technology, 2020, 105: 190-197.
- [11] WU X, SUN Y, DENG L, et al. Insight to key diazotrophic community during composting of dairy manure with biochar and its role in nitrogen transformation[J]. Waste Management, 2022, 350: 126927.
- [12] 程旭艳, 霍培书, 尚晓瑛, 等. 堆肥中高温降解菌的筛选、鉴定及堆肥效果[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(5): 105-111.
- [13] 阮馨怡, 刘曦, 关玥, 等. 高效污泥降解菌种的筛选及在污泥堆肥中的效果[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(9): 1569-1575.
- [14] 陈枭嘉,李立,马新新,等.豆渣降解高温菌的筛选及应用[J].河南农业科学, 2021, 50(1): 172-179.

- [15] 江高飞,暴彦灼,杨天杰,等.高温秸秆降解菌的筛选及其纤维素酶活性研究[J].农业环境科学学报,2020,39(10):2465-2472.
- [16] 邱非, 韩依辛, 魏琦麟, 等. 培养组学在动物肠道微生物应用的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(2): 598-605.
- [17] MATAR G, BILEN M. Culturomics, a potential approach paving the way toward bacteriotherapy [J]. Current Opinion in Microbiology, 2022, 69: 102194.
- [18] LAGIER J C, DUBOURG G, MILLION M, et al. Culturing the human microbiota and culturomics [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16: 540-550.
- [19] WANG S P, SUN Z Y, WANG S T, et al. Bacterial community structure and metabolic function succession during the composting of distilled grain waste [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(4): 1479-1495.
- [20] 林燕, 阮馨怡, 张伟, 等. 一种利用普通生化设备分离纯化高温菌株的方法: CN109517754A[P]. 2019-03-26.
- [21] 韩波波. 高温菌的分离纯化及性质研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2008.
- [22] THOMPSON L R, SANDERS J G, MCDONALD D, et al. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity [J]. Nature, 2017, 551: 457-463.
- [23] BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59.
- [24] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [25] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [26] LÖYTYNOJA A, VILELLA A J, GOLDMAN N. Accurate extension of multiple sequence alignments using a phylogeny-aware graph algorithm[J]. Bioinformatics, 2012, 28(13): 1684-1691.
- [27] MPOFU E, VEJARANO F, SUZUKI-MINAKUCHI C, et al. Complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* TAB7, a compost-deodorizing strain with potential for plant growth promotion [J]. Microbiology Resource Announcements, 2019, 8(4): 11-18.
- [28] MUSILOVA J, KOURILOVA X, PERNICOVA I, et al. Novel thermophilic polyhydroxyalkanoates producing strain *Aneurinibacillus thermoaerophilus* CCM 8960[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(12): 4669-4681.
- [29] MA L, ZHAO Z, ZHAO Y, et al. Weizmannia coagulans JA845 improves atherosclerosis induced by vitamin D3 and high-fat diet in rats through modulating lipid metabolism, oxidative stress, and endothelial vascular injury [J]. Journal of Applied Microbiology, 2023, 134(8): 159-165.
- [30] KANANAVIČIUTE R, ČITAVIČIUS D. Genetic engineering of Geobacillus spp. [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 111: 31-39.
- [31] CHANG Y, ZHOU K, YANG T, et al. Bacillus licheniformis inoculation promoted humification process for kitchen waste composting: Organic components transformation and bacterial metabolic mechanism[J]. Environmental Research, 2023, 237(Pt 2): 117016.
- [32] KARPOV D S, DOMASHIN A I, KOTLOV M I, et al. Biotechnological potential of the Bacillus subtilis 20 Strain[J]. Molecular Biology, 2020, 54(1): 137-145.
- [33] WANG W K, LIANG C M. Enhancing the compost maturation of swine manure and rice straw by applying bioaugmentation[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 6103.
- [34] 刘国防. 高效油脂降解菌剂构建与效果研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [35] ZHAO Y, LIU Y, NIU H, et al. The structure and function analysis of bacterial community during aerobic composting of chicken manure[J]. Shengwu Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1175-1187.
- [36] CHEN S, DONG X. Proteiniphilum acetatigenes gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(Pt 6): 2257-2261.
- [37] LIU L, LIU Y, SHIN H D, et al. Developing Bacillus spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(14): 6113-6127.
- [38] BOUANANE-DARENFED A, HANIA W Ben, HACENE H, et al. Caldicoprobacter guelmensis sp. nov., a thermophilic, anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from a hot spring [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt 6): 2049-2053.
- [39] ZHANG J, YUE Z, DING C, et al. Metagenomic binning analyses of pig manure composting reveal potential antibiotic-degrading bacteria and their risk of antibiotic resistance genes [J]. Bioresource Technology, 2023, 371: 128540.
- [40] ANBARASAN S, WAHLSTRÖM R, HUMMEL M, et al. High stability and low competitive inhibition of thermophilic *Thermopolyspora flexuosa* GH10 xylanase in biomass-dissolving ionic liquids[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(4): 1487-1498.
- [41] PATIL V S, LUGANI Y, CHAUDHARI R D, et al. Description and genomic insights into a multidrug resistant novel bacterium Savagea serpentis sp. nov., isolated from the scats of a vine snake (Ahaetulla nasuta) [J]. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 2021, 114(6): 687-696.
- [42] SKRZYPCZAK N, PRZYBYLSKI P. Modifications, biological origin and antibacterial activity of naphthalenoid ansamycins[J]. Natural Product Reports, 2022, 39(9): 1653-1677.

(责任编辑:金曙光)

Isolation, identification, and community structure analysis of thermophilic bacteria during composting

LIU Kechun^{1,2}, CUI Yunwei^{1,2}, WEI Chunzhong³, JIANG Yanbo^{3,4}, SHEN Peihong², WEI Yuansong^{1,5} ZHANG Junya^{1,5,*}

1. State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China; 3. Guangxi Beitou Environmental Protection & Water Group Co., LTD., Nanning 530025, China; 4. International Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China; 5. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

*Corresponding author, E-mail: jyzhang@rcees.ac.cn.

Abstract The addition of thermotolerant bacterial agents is a common technique to accelerate the composting process and improve compost quality. Combined with the culture omics research method with 48 culture conditions, including 6 culture media, 2 oxygen environmental conditions (aerobic & anaerobic) and 4 high temperature scenarios (50, 60, 70, and 80 °C), 196 thermotolerant strains were isolated and purified from the thermophilic stage of composting. A total of 35 species belonging to 14 genera from 4 phyla of thermotolerant bacteria were identified. Among them, the phylum Firmicutes (98%), the genus Bacillus (51.5%) and Bacillus licheniformis (28.6%) were predominant at the phylum, genus, and species levels, respectively. Additionally, some thermotolerant genera such as *Caldibacillus* and *Thermus* were also identified. Among the isolated strains, 27 exhibited thermophilic characteristics and showed enhanced degradation capabilities for at least one of the macromolecules (starch, cellulose, protein, and fatty acids) under high-temperature conditions, with 6 thermophilic strains simultaneously demonstrating strong degradation capabilities for all four macromolecular organic compounds. Furthermore, a comparative analysis of the thermotolerant bacterial community structures in high-temperature compost samples from different sources was conducted through 16S rRNA amplicon sequencing. The results revealed that the phyla Firmicutes, Actinobacteria, and Bacteroidetes were dominant, while the genera Bacillus, Savagea, Caldibacillus, Limnochorda, and Proteocatella were the predominant thermotolerant genera. The study highlighted the need for further screening and exploration of thermotolerant/thermophilic bacterial resources in composting, with a requirement for the establishment of more diversified cultivation conditions. Moreover, functional predictions of the thermotolerant bacterial community using PICRUSt2 indicated that sugar metabolism, amino acid metabolism, and cofactor and vitamin-related metabolism were the predominant metabolic pathways during the high-temperature composting phase.

Keywords composting; thermotolerant bacteria; isolation and purification; thermotolerant bacterial community; function prediction