

一组小麦秸秆好氧分解菌系的构建及组成多样性

董玉玲^{1,3}, 朱万斌^{1,2}, 郭鹏¹, 王小芬^{1,2}, 张利莉³, 崔宗均^{1,2*}

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; 2. 中国农业大学生物质工程中心, 北京 100193; 3. 塔里木大学新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 阿拉尔 843300)

摘要 采用“外淘汰法”在常温、好氧条件下构建了一组稳定、有效降解小麦秸秆的复合系。复合系分解能力的研究表明, 在 100 mL 改良 CMC 培养基(液面深度 2 cm 和直径 9 cm)中, 分解的前 6 d 复合系保持较高分解能力, 减重率达到 66.1%。6 d 后复合系分解能力逐渐减弱, 到第 10 d 时减重率达到 77.0%。1.86 g 秸秆各成分中, 纤维素分解 0.78 g, 半纤维素分解 0.16 g, 木质素分解 0.24 g。复合系组成多样性的研究表明, 通过克隆文库构建和单菌株分离共确定出 13 个菌属的微生物, 优势菌属有 *Hydrogenophaga*、*Pseudomonas*、*Bacteroides* 和 *Clostridium*, 占 100 个阳性克隆子的 78%。系统发育关系表明, 克隆文库和单菌分离技术分别所确定的微生物种类及亲缘关系存在一定的差异, Isolated 7(FJ439527) 和 Clone 86(EU834839) 与假单胞菌属中的厦门藻(*Pseudomonas xiamenensis*) 亲缘关系较近。

关键词 小麦秸秆; 木质纤维素; 好氧分解; 复合系; 多样性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)01-0249-06

Characteristics and Diversity of a Microbial Community Decomposing Wheat Straw Under Aerobic Conditions

DONG Yu-ling^{1,3}, ZHU Wan-bin^{1,2}, GUO Peng¹, WANG Xiao-fen^{1,2}, ZHANG Li-li³, CUI Zong-jun^{1,2}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Center of Biomass Engineering, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. Key Laboratory of Protect and Utilization of Biology Resources in Tarim Basin of Xinjiang Product and Construct, Tarim University, Alaer 843300, China)

Abstract A microbial community with the stable ability of effectively decomposing wheat stalks was constructed at room temperature under aerobic conditions by the method of restricted cultivation. The degradation ability of the microbial community shows that when performed in 100 mL improved CMC liquid medium, the depth and diameter of the fluid level were 2 cm and 9 cm, it kept higher degradation efficiency with capability of decomposing straws of 66.1% during the initial six days. By the tenth day of decomposition, the degradation ratio was slowly up to 77.0%. Analysis of the components of wheat stalk (1.86 g) showed that the cellulose lost 0.78 g, hemicellulose lost 0.16 g and lignin lost 0.24 g. The composition diversity of the microbial community shows that 13 genera of microorganisms were identified by the technologies of clone library and isolation of pure strain. The results indicated that the dominate genera were *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas*, *Bacteroides* and *Clostridium* taking up 78% in one hundred of positive clones. Phylogenetic dendrogram indicates that the relations among clones and isolated strains and their closest relatives presented certain distances; both Isolated 7(FJ439527) and Clone 86(EU834839) were closely related to *Pseudomonas xiamenensis*.

Key words wheat straw; lignocellulose; aerobic degradation; microbial community; diversity

小麦秸秆为木质纤维素资源, 直接还田可以培肥地力, 但直接还田分解难度大, 分解周期长, 制约秸秆在培肥地力方面的应用^[1,2]。大量的小麦秸秆在田间任意堆砌或就地焚烧, 既浪费了宝贵的资源, 又污染了环境。如何使中国的秸秆变废为宝, 显得极为重要。近年来, 众多国家把木质纤维素资源的能源转化摆在重要战略地位, 期望从种类繁多、分布广泛、总量巨大的木质纤维素资源中产生热效高的生物燃料(如生物乙醇、沼气等)^[3], 缓解油价暴涨及石油能源危机。

在自然界, 天然的木质纤维在土壤当中被众多的微生物群体所降解, 微生物的降解能力不尽相同^[4]。文献^[5~8]注重微生物之间协同互作, 采用

“外淘汰法”定向构建了有效降解水稻、滤纸、脱脂棉等目标材料的微生物群体 MC1, 弥补了单菌株或少数单菌株组合的降解能力不足的优点。MC1 复合系的适宜培养温度为 50℃。文献^[9~13]所构建的复合系亦具有类似性质。目前, 复合系能够高效降解小麦秸秆的报道较少。路鹏等^[14]的研究认为初始溶氧量改变, 纤维素底物的崩解强度、持续时间及开始分

收稿日期: 2009-02-28 修订日期: 2009-05-08
基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAD07A01); 教育部高校博士点新教师基金项目(20070019055); 国家自然科学基金青年基金项目(30800672)
作者简介: 董玉玲(1980~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为生物质资源有效利用与微生物生态, E-mail: dongyuling80@126.com

* 通讯联系人, E-mail: acuijz@cau.edu.cn

解的时间会发生变化.可见,培养温度及初始溶氧量对复合系功能及筛选具有指导意义.

本研究着眼于中国北方碱性土壤,以更具推广潜力和占据重要地位的常温好氧条件开发复合系,以期在实地小麦秸秆类木质纤维素降解过程中发挥重要作用.

1 材料与方法

1.1 好氧分解菌复合系筛选

1.1.1 供试碳源

自然收获的隔年小麦秸秆剪成 10 cm 左右,经 1% NaOH 室温下处理 24 h 后,流水冲洗数次,用清水浸泡 1~2 d,用盐酸调到中性 pH,烘干备用.

1.1.2 CMC 培养基

以改良 CMC 培养基为基础,其中小麦秸秆取代 CMC 作碳源,秸秆添加量为培养液体积的 2%. CMC 培养基组成为 1L 体系中 K_2HPO_4 1 g, Na_2CO_3 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 g, $MnSO_4$ 0.0005 g, 蛋白胨 (Peptone) 5 g, 酵母提取物 (Yeast Extract) 5 g. 经 121℃ 灭菌 20 min 后,培养基 pH 为 9.8.

1.1.3 菌种来源

将小麦秸秆腐熟土(河南开封)和新鲜牛粪(河北省抚宁县)作为菌种来源,二者按 2:1 比例接种到复合系培养体系.

1.1.4 培养条件

在 30~35℃,好氧振荡(130 r/min)条件下,采用“外淘汰法”筛选木质纤维素分解菌复合系.培养体积为 100 mL CMC 液体培养基(300 mL 三角瓶中),当肉眼看到秸秆被部分分解后转接,一般 4~5 d,接菌量为 5%. 初始菌源富集培养为 1 代,以后转接依次为 2、3、4……n 代.

1.2 pH

在复合系的降解过程中测定 pH 变化.在 0~10 d 内适时确定取样时间,应用 HORIBA B-212 型 compact pH 计测定 pH.

1.3 减重及秸秆成分变化

在复合系分解的第 0、1、3、6、10 d 离心法测定秸秆减重.分解菌液首先在 8000 r/min 离心 11 min 弃上清,然后用去离子水水洗 2 次,离心并弃上清,最后在 70℃ 烘箱烘 48 h 后测秸秆残重.以同样培养条件下的 0、5、10 d 的加秸秆不接菌体系的秸秆剩余量为对照.减重测定完毕的样品首先粉碎过 1 mm 筛,然后参照范氏洗涤方法^[15]测定其中的纤

维素、半纤维素、木质素及灰分,并将范氏中性洗涤液洗脱下来的水溶性物质作为菌体和其它代谢产物的扣除量,测定仪器为 ANKOM²²⁰ 型纤维素分析仪.

1.4 克隆构建菌系组成

在复合系分解旺盛的第 4 d 构建克隆文库.氯苯法^[16]提总 DNA,扩增 16S rRNA 基因 V_3 区.引物 27F(5'-AGCGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 907R(5'-CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3').反应程序为 94℃ 5 min;93℃ 变性 1 min,58℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环,72℃ 延伸 10 min 后在 4℃ 下存放.反应体系 50 μ L.1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物.UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(Tiagen)纯化回收目的片段.将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体(Promega)依操作说明进行连接.采用热激法将连接产物转化至感受态细胞 *E. coli* JM109^[17].

采用 ARDRA 酶切技术筛选克隆子^[18,19].随机挑选 100 个阳性克隆子进行菌落扩增,引物 Sp6(5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3')和 T7(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').反应程序为 94℃ 5 min;94℃ 变性 1 min,58℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环,72℃ 延伸 10 min 后在 4℃ 下存放.反应体系 25 μ L.1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物.UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(Tiagen)纯化回收目的片段.应用 *Hinf* I 内切酶对目的 PCR 产物酶切 3 h,反应温度为 37℃.反应体系为 buffer 2 μ L,内切酶 1 μ L,PCR 产物 3 μ L,最后用去离子水补足至 20 μ L.对酶切产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,电泳 45 min.点 5 μ L 100 bp plus DNA Ladder 作 Marker.用 Alpha Imager 2200 Imaging System(Alpha Innotech,USA)凝胶成像仪照相.

1.5 单菌株的分离

选定较优的反映生物多样性的 CMC 固体平板培养基进行单菌株的分离,同时,鉴于微生物对底物降解的专一性、适应性和多样性,为了更多地筛选到复合系的组成微生物,碳源基质选定小麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆和滤纸 4 种,除滤纸外,3 种秸秆均经碱处理.

依据菌落形态、颜色、大小、干湿度等指标,采用涂布平板法对分解旺盛的第 3d 复合系进行单菌株分离.

对选定单菌落扩大富集培养,氯苯法提总 DNA.扩增 16S rRNA 基因 V_3 区,引物 27F 和 907R.反应程序为 94℃ 5 min;93℃ 变性 1 min,58℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环,72℃ 延伸 10 min 后

在 4℃ 下存放, 反应体系 50 μ L.

1.6 测序及序列分析

测序工作由上海生工生物工程技术服务有限公司完成. 将测定序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 进行结果比对. 将测序结果及近缘模式菌的 16S rRNA 基因序列调入 Clustal 1.81 软件中进行排序, 使用 MEGA 2.1 软件构建 Neighbor-Joining 系统发育树^[20]. 将克隆文库构建得到的 11 个克隆子和单菌株分离得到的 8 株单菌株的 16S rRNA 基因序列存于 GenBank, 其登录号分别为 EU834832 ~ EU834842 和 FJ439521 ~ FJ439528.

2 结果与分析

2.1 复合系构建及分解能力

通过“外淘汰法”连续继代富集培养 40 代得到 1 组分解功能稳定地有效降解小麦秸秆的复合系. 文献 5 6 第 1 次成功筛选到功能、组成稳定的高效降解纤维素物质的高温分解菌复合系, 本研究第 1 次在常温好氧振荡条件下筛选出有效降解小麦秸秆的复合系, 且对碱性环境具有良好的缓冲能力. 在连续降解 10 d 中, 复合系的 pH 变化见图 1, 在 0 ~ 14 h, pH 迅速减低, 由初始 pH 9.9 降至 pH 7.8, 之后 pH 会有所回升且略有波动的维持在 pH 8.5.

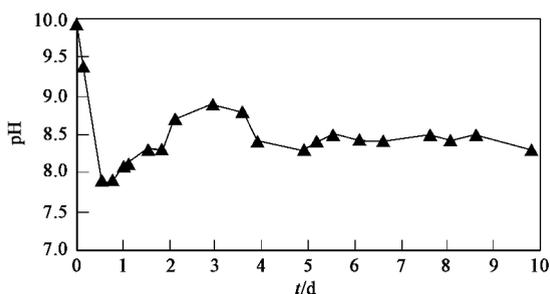


图 1 复合系降解过程中的 pH 变化

Fig. 1 Changes of pH of microbial community during decomposition process

该复合系在不改变培养基和秸秆添加量的 100 mL 培养体系(液面深度 2 cm 和直径 9 cm)中, 连续降解 10 d 的情况见图 2, 在第 1、3、6、10d 的减重率依次为 15.4%、38.3%、66.1%、77.0%. 在分解的前 6 d 复合系保持较高分解能力, 分解速度很快, 减重率第 6 d 已达到 66.1%, 6 d 后逐渐减慢, 复合系进入微弱降解阶段, 最后在第 10 d 将小麦秸秆从 1.86 g 降解到 0.43 g, 减重率达到 77.0%. 第 0、1、3、6、10 d 的剩余秸秆中各成分的变化见图 3, 其中

半纤维素分解 0.16 g, 纤维素分解 0.78 g, 木质素分解 0.24 g. 就秸秆降解效果而言, 在绝对量上, 被降解最多的成分是纤维素; 在相对量上, 纤维素、木质素大部分被降解, 接近 80%, 降解效果较好, 半纤维素仅一半被分解.

本研究在好氧培养条件、适当提高秸秆添加量情况下, 对复合系的降解能力进行了探究. 该复合系的高效降解, 其原因可能是长期定向转接, 使得能够良好适应该环境的微生物迅速大量增殖, 或者群体间发生了某种增益作用(synergistic collaboration)或抑制作用.

文献 [21, 22] 认为半纤维素是最有前景的降解对象, 因为它不参与水晶状结构的形成, 它的结构也不像木质素那样复杂. 但本研究中, 从降解情况来看, 纤维素和木质素的降解率均偏高, 纤维素降解总量最高, 而半纤维素的降解率及降解总量均偏低, 这可能由于碱处理去除了秸秆中的半纤维素成分^[23], 破坏了秸秆的结构.

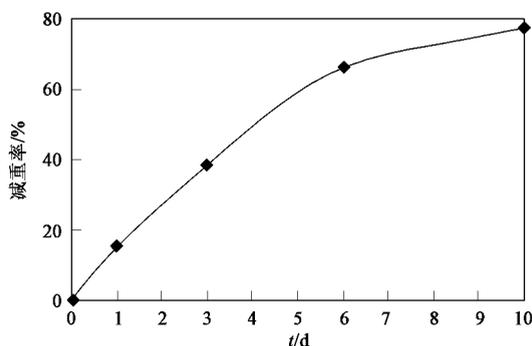


图 2 小麦秸秆减重率

Fig. 2 Degradation ratio of wheat stalk

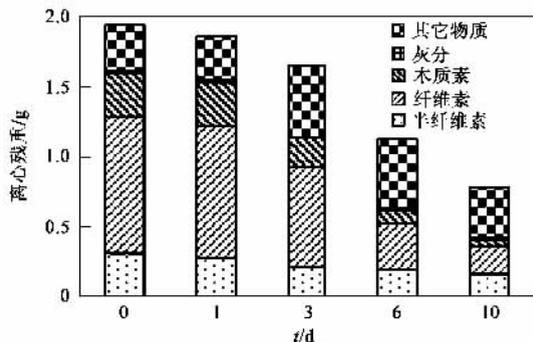


图 3 分解过程中的小麦秸秆成分变化

Fig. 3 Component reduction of wheat stalk during decomposition process

2.2 复合系组成多样性

在复合系克隆文库构建中, 通过 ARDRA 酶切

技术及测序结果确定出复合系的组成微生物 11 种, 具体见图 4. 其微生物构成当中优势菌属有 *Hydrogenophaga*(噬氢菌属) *Pseudomonas*(假单胞菌属) *Bacteroides*(拟杆菌属) 以及 *Clostridium*(梭菌属), 占到 100 个随机挑选的阳性克隆子的 78%^[24], 此外, 其它菌属有 *Tissierella*(组织菌属) *Alcaligenes*(产碱杆菌属) *Myxococcales*(粘球菌目) *Acholeplasma*(无胆淄原体科) 等, 见图 5. 总之, 该复合系的微生物组成呈现多样性, 这些多样的微生物, 在好氧振荡条件下, 发挥着协同互作, 为小麦秸秆高效而稳定的降解起到一定作用, 其降解机制有待于进一步研究.

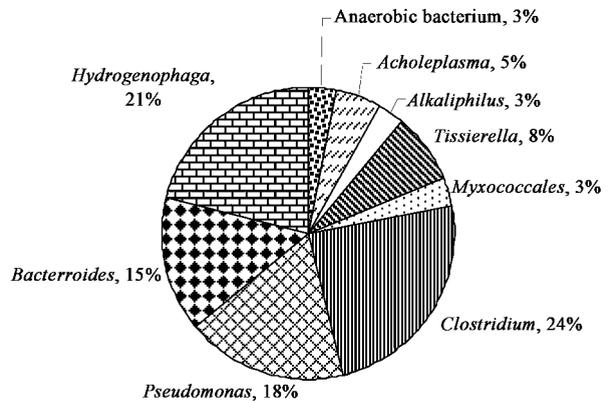


图 5 克隆子的微生物构成
Fig.5 Microbial composition of clones

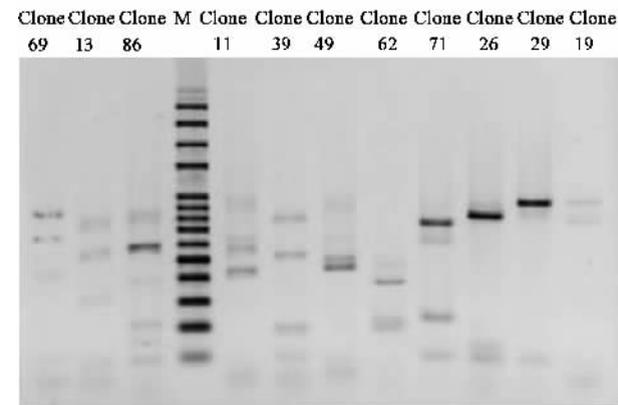


图 4 11 个克隆子的琼脂糖胶电泳酶切图谱
Fig.4 Zymogram of agar gel electrophoresis of 11 clones

在 CMC 固体培养基上依据菌落特征分离好氧菌 8 种, 结合测序结果, 它们皆为可培养菌株, 近缘菌属有 *Enterococcus*(肠球菌属) *Pseudomonas*(假单胞菌属) *Jonesia*(琼斯氏菌属) *Alcaligenes*(产碱杆菌属) *Brevundimonas*(缺陷短波假单胞菌) *Bordetella*(博德特氏菌属) *Thauera*(索氏菌属), 见表 1.

系统发育关系见图 6, 通过克隆文库构建与单菌株分离技术所确定的微生物之间亲缘关系存在一定距离, 种群的丰富度较强, 且单菌株 Isolated 7 (FJ439527) 与 Clone 86 (EU834839) 的近源种

表 1 克隆子及分离菌的 16S rRNA 基因序列比对结果

Table 1 Blast consequence for clones and isolates according to 16S rRNA gene sequences

克隆子/分离菌(登录号)	近源种(登录号)	相似率/ %
Clone 11(EU834832)	<i>Clostridium</i> sp. 9B4(AY554416)	100
Clone 2(EU834834)	Uncultured anaerobic bacterium(AY953246)	98
Clone 29(EU834836)	<i>Acholeplasma</i> sp. (EU517562)	88
Clone 39(EU834837)	<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILA(CP000853)	98
Clone 49(EU834838)	<i>Clostridium</i> sp. strain P6 (AY949857)	89
Clone 62(EU834840)	Myxococcales bacterium Gsoil 47(AB245340)	87
Clone 71(EU834842)	<i>Clostridium</i> sp. pandaIX(AY957603)	91
Clone 19(EU834835)	Uncultured <i>Tissierella</i> sp.(AB331483)	98
Clone 86(EU834839)	<i>Pseudomonas</i> sp. C10-2(DQ088664)	95
Clone 13(EU834833)	<i>Bacteroides</i> sp. 22(AY554420)	95
Clone 69(EU834841)	<i>Hydrogenophaga</i> sp. TR7-01(AB166886)	98
Isolated 1(FJ439521)	<i>Enterococcus</i> sp. R-25205(AM084029)	100
Isolated 2(FJ439522)	<i>Jonesia</i> sp. TUT101(AB098584)	99
Isolated 3(FJ439523)	<i>Alcaligenes</i> sp. PGBS00K(EU622578)	100
Isolated 4(FJ439524)	<i>Brevundimonas diminuta</i> strain HPC 101(AY948228)	98
Isolated 5(FJ439525)	<i>Alcaligenes</i> sp. b16(EU434562)	95
Isolated 6(FJ439526)	<i>Bordetella</i> sp. D9-5(AM403215)	98
Isolated 7(FJ439527)	<i>Pseudomonas</i> sp. C10-2(DQ088664)	100
Isolated 8(FJ439528)	<i>Thauera</i> sp. PIV-1(AJ505850)	96

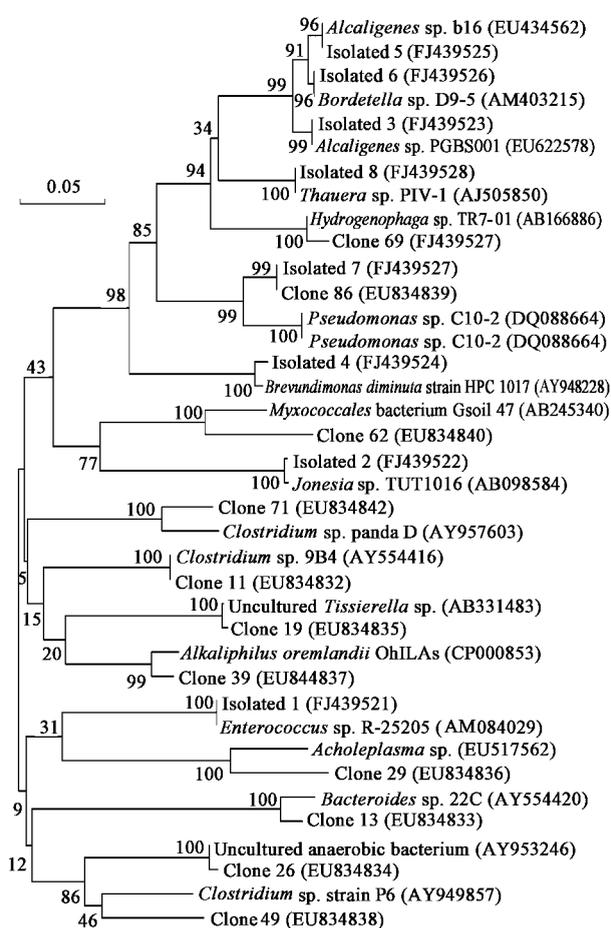


图6 根据16S rRNA基因序列构建的克隆子及分离菌的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of clones and isolated strains based on 16S rRNA gene sequences

Pseudomonas xiamenensis sp. (DQ088664) 亲缘关系较近。*Pseudomonas xiamenensis* sp. 为假单胞菌属中的1个最近已分离的新种,它的纤维素降解能力,产酶性质等尚未见报道。

克隆文库构建和平板分离技术相结合确定出复合系构成中13个菌属的细菌微生物,相对于已报道的木质纤维素分解菌复合系的微生物构成^[5,8,11],好氧条件下的木质纤维素分解菌复合系的微生物组成更丰富,嗜氢菌属、产碱杆菌属等为第1次报道。通过克隆文库构建与通过单菌株分离所确定的微生物在结构组成上差距甚远,其原因为微生物数量、微生物本身分离难度、培养基局限性等。

3 结论

(1) 在好氧振荡条件下,连续继代富集培养40代得到一组分解功能稳定的木质纤维素分解菌复合系。

(2) 复合系在分解的前6d保持较高分解能力,

6d后进入微弱降解阶段。秸秆的各成分中,纤维素的降解效果最好,半纤维素和木质素的降解效果次之,纤维素的分解量多于半纤维的分解量。

(3) 通过克隆文库的构建和单菌株的分离共确定出13个菌属的微生物,如嗜氢菌属、拟杆菌属、假单胞菌属、组织菌属、梭菌属、产碱杆菌属、肠球菌属、琼斯氏菌属、缺陷短波假单胞菌属、博德特氏菌属、索氏菌属、粘球菌目、无胆淄原体科,其中,嗜氢菌属、产碱杆菌属等为第1次报道。

参考文献:

- [1] McKendry P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass [J]. *Bioresour Technol*, 2002, **83**(1): 37-46.
- [2] 孙颜, 胡敏, 谢笔钧. 秸秆还田的效果与方法 [J]. *精细化工*, 2000, **17**(7): 431-434.
- [3] Silverstein R A, Chen Y, Sharma-Shivappa R R, et al. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalk [J]. *Bioresour Technol*, 2007, **98**(16): 3000-3011.
- [4] Vargas-Garcia M C, Suarez-Estrella F, Lopez M J, et al. *In vitro* studies on lignocellulose degradation by microbial strains isolated from composting processes [J]. *Int Biodeter Biodegr*, 2007, **59**(4): 322-328.
- [5] Haruta S, Cui Z J, Huang Z, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose degradation ability [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2002, **59**(4/5): 529-534.
- [6] 崔宗均, 李美丹, 朴哲, 等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能 [J]. *环境科学*, 2002, **23**(3): 36-39.
- [7] 王伟东, 崔宗均, 王小芬, 等. 快速木质纤维素分解菌复合系 MC1 对秸秆的分解能力及稳定性 [J]. *环境科学*, 2005, **26**(5): 156-160.
- [8] Kato S, Haruta S, Cui Z J, et al. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community [J]. *Appl Environ Microb*, 2005, **71**(11): 7099-7106.
- [9] 王伟东, 崔宗均, 牛俊玲, 等. 一组木质纤维素分解菌复合系的筛选及培养条件对分解活性的影响 [J]. *中国农业大学学报*, 2004, **9**(5): 7-11.
- [10] 牛俊玲, 李国学, 崔宗均, 等. 堆肥中高效降解纤维素林丹复合菌系的构建及功能 [J]. *环境科学*, 2005, **26**(4): 186-190.
- [11] 王伟东, 王小芬, 李玉花, 等. 复合系 WSC-6 的菌种组成特性及其木质纤维素分解能力 [J]. *农业工程学报*, 2007, **23**(10): 210-215.
- [12] 王伟东, 崔宗均, 杨洪岩, 等. 高效稳定纤维素分解菌复合系 WSC-6 的稳定性 [J]. *中国环境科学*, 2005, **29**(5): 567-571.
- [13] 牛俊玲, 崔宗均, 秦莉, 等. 不同培养条件对堆肥中降解纤维素林丹复合菌系分解能力的影响 [J]. *农业工程学报*, 2008, **24**(1): 235-240.
- [14] 路鹏, 李国学, 陈丽君, 等. 氧浓度对复合菌系 MC1 纤维素降解能力的影响 [J]. *农业工程学报*, 2008, **24**(2): 209-213.
- [15] Van Soest P J, Wine R H. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate [J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1968, **51**: 780-785.

- [16] Zhu H ,Qu F ,Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants ,fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucleic Acids Res ,1993 ,**21** : 5279-5280.
- [17] Wang X F ,Haruta S ,Wang P ,*et al.* Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage[J]. FEMS Microbiol Ecol ,2006 **57** (1) :106-115.
- [18] 宋志刚 ,许强芝 ,鲁心安 ,等. 中国东海海洋微生物种群多样性初步研究[J]. 微生物学通报 ,2006 **33** (1) :63-67.
- [19] Bockelmann W ,Heller M ,Heller K J. Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) [J]. Int Dairy J ,2008 **18** (10/11) :1066-1071.
- [20] Kato S ,Haruta S ,Cui Z J ,*et al.* *Clostridium straminisolvens* sp. nov. , a moderately thermophilic , aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community [J]. Int J Syst Evol Micr ,2004 **54** :2043-2047.
- [21] Eiland F ,Leth M ,Klamer M ,*et al.* C and N turnover and lignocellulose degradation during composting of *Miscanthus* straw and liquid pig manure[J]. Compos Sci Util ,2001 **9** (3) :186-196.
- [22] Howard R L ,Abotsi E ,Jansen van Rensburg E L ,*et al.* Lignocellulose biotechnology :issues of bioconversion and enzyme production[J]. African J Biotechnol ,2003 **2** :602-619.
- [23] 孙君社 ,苏东海 ,刘莉. 秸秆生产乙醇预处理关键技术[J]. 化学进展 ,2007 **19** (7/8) :1122-1128.
- [24] 徐宏翔 ,吴敏 ,王小谷 ,等. 东北太平洋深海沉积物细菌多样性 [J]. 生态学报 ,2008 **28** (2) :479-485.
- [25] Lai Q L ,Shao Z Z. *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov. , a denitrifying bacterium isolated from activated sludge[J]. Int J Syst Evol Micr , 2008 **58** :1911-1915.