

# 多功能细菌复合系 NSC-7 的菌种组成多样性

刘长莉<sup>1,2</sup>, 王小芬<sup>2</sup>, 牛俊玲<sup>3</sup>, 吕育财<sup>2</sup>, 郭鹏<sup>2</sup>, 沈海龙<sup>4</sup>, 崔宗均<sup>2\*</sup>

(1. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; 2. 中国农业大学农学与生物技术学院, 生物质工程中心, 北京 100094; 3. 郑州航空工业管理学院资源与环境研究所, 郑州 450015; 4. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040)

**摘要:** NSC-7 是一组具有降解纤维素和林丹双重功能的细菌复合系. 为系统了解复合系的菌种组成, 在有氧条件下, 利用传统的平板划线法分离到 11 株单菌, 将 11 株单菌按体积比 1:1 重新组合并不具备分解纤维素的能力, 利用单层和双层平板滤纸法检测 NSC-7 的分解能力, 发现只有双层平板上的滤纸变黄且降解, 说明复合系内纤维素降解的关键菌是厌氧或微好氧菌. 利用现代分子生物学技术对 NSC-7 构建克隆文库, 获得了 195 个 16S rDNA 片断, 经 DGGE 筛选获得 25 个代表克隆, 其序列数据库比对结果中有 60% 的近缘种为已知菌, 分别归属于 *Clostridium*、*Petrobacter*、*Bacteria*、*Paenibacillus*、*Proteobacterium* 5 个属, 其余 40% 的近缘种为难培养菌株.

**关键词:** 细菌复合系; 木质纤维素; 克隆文库; 菌种组成多样性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)07-2112-06

## Composition Diversity of the Multifunctional Bacterium Community NSC-7

LIU Chang-li<sup>1,2</sup>, WANG Xiao-fen<sup>2</sup>, NIU Jun-ling<sup>3</sup>, LÜ Yu-cai<sup>2</sup>, GUO Peng<sup>2</sup>, SHEN Hai-long<sup>4</sup>, CUI Zong-jun<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Center of Biomass Engineering, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. Institute of Resources and Environment, Zhengzhou Institute of Aeronautical Industry Management, Zhengzhou 450015, China; 4. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** The NSC-7 microbial community could decompose cellulose and lindan with high efficiency. In order to determine the bacterial composition of the community, 11 isolate strains were detected by plate isolation, while a community reset by the 11 isolate strains lost the capacity of degrading cellulose. The capacity of degrading of the filter paper in double deck plate and monolayer plate were determined, only the filter paper in double deck plate were degraded, that means the main or key microbe are anaerobic. The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and construction of 16S rDNA clone library were used to identify the composition diversity of NSC-7 community. 195 clones and 25 strains were detected in clone library, and about 60% closest relative among them was known the detailed information which were belonged to *Clostridium*, *Petrobacter*, *Bacteria*, *Paenibacillus*, *Proteobacterium*. Furthermore, there were 40% closest relative belonged to uncultured bacterium clone.

**Key words:** bacterium community; lignocellulose; clone library; composition diversity

木质纤维素占地球光合产物的 60% 以上, 是地球上取之不尽、用之不竭的重要资源. 利用微生物将其转化为人类紧缺的能源、食物和化工原料<sup>[1,2]</sup>, 对于解决人类环境污染<sup>[3-5]</sup>、食物短缺和能源危机具有重大现实意义. 自崔宗均等<sup>[6]</sup>提出“纤维素降解菌复合系”概念, 并成功构建高效纤维素分解菌复合系以来, 纤维素分解菌复合系的构建和研究引起国内外研究者的高度重视, 但过去的研究主要集中在如何构建高效降解菌系上, 至今还未能能在已有的高效纤维素分解菌系的基础上, 利用种间替换或重组等方法开发出更高效的菌系, 主要是由于对已获得的复合系内菌种组成、分类地位、作用及功能了解甚少, 搞清复合系内关键菌乃至全部菌株的功能和特性对开发和利用复合菌系有着重要作用. 此外, 应用现代技术或特殊技术将高效降解纤维素的关键菌种找到并分离, 对搞清纤维素降解菌系协同机制和构

建高效分解菌组合更有实际意义.

本研究在 MC1 的基础上, 通过人为驯化构建了一组具有高效降解木质纤维素与林丹双重功能的微生物复合系 NSC-7, 该复合系在 5 d 内能够降解稻秆总重的 73.6%<sup>[7]</sup>, 在 18 d 内降解林丹总量达 38.32%<sup>[8]</sup>. NSC-7 复合系的成功构建, 不仅对人工加速秸秆分解使其快速回还土壤、恢复土壤肥力有重要意义, 而且对有效降低土壤中农药含量、改善生态环境和增加食品安全性有现实作用. 搞清已知复合系的菌种组成及功能, 可为今后构建和开发更高效分解菌复合系奠定研究基础, 因此, 本研究将传统的平板分离技术和现代分子生物学技术变性梯度凝胶电泳

收稿日期: 2008-08-29; 修订日期: 2008-10-28

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAD07A01); 东北林业大学青年基金项目(07035)

作者简介: 刘长莉(1976~), 博士, 讲师, 主要研究方向为生物质资源加工与利用, E-mail: liuchangli08@yahoo.com.cn

\* 通讯联系人, E-mail: acuijz@cau.edu.cn

(DGGE)和克隆文库构建技术相结合,避免了传统技术无法获取难培养菌株的信息、限制了解 NSC-7 内全部微生物的局限,为进一步构建高效人工分解纤维素菌系和分离纤维素降解关键菌奠定前期基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 种

NSC-7 为本实验室从堆肥中筛选和驯化的能够降解纤维素和农药林丹的复合系<sup>[9]</sup>。

#### 1.1.2 培养条件

蛋白胨纤维素培养基(peptone cellulose solution, PCS) (1 L 中含 0.5% 蛋白胨, 0.5% NaCl, 0.2% CaCO<sub>3</sub>, 1% 酵母粉),接种后于 50℃ 静置培养。

### 1.2 NSC-7 复合系单菌的分离

配置含 1.5% 琼脂的 PCS 固体培养基,培养物用生理盐水稀释至 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 分别涂平板。将涂好的平板放入 50℃ 培养箱内培养 3 d,培养好氧菌;将涂好的平板装入厌氧袋(Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo),真空抽气 1 min,再充氮气 1 min,反复操作 6 次,将厌氧袋封口,置于 50℃ 培养箱内 5 d 培养兼性厌氧菌。根据平板培养基上菌落形态差异,分别将菌落移至新鲜的平板培养基,多次划线分离直至纯化为单菌。

### 1.3 分离单菌的性质和组合后分解滤纸的检验

用牙签挑取少量单菌落的菌体,进行革兰氏染色,经油镜(Olympus)观察鉴定各个菌的形态特征;在 30 mL 的试管内装 8 mL 的 PCS 培养基和 1 张 1 cm × 6 cm 的滤纸条,将 11 个单菌株以体积比 1:1 接种到含 PCS 培养基的试管内,同时接种 NSC-7 复合系作为对照,将试管放置在 50℃ 培养 5 d,观察滤纸的分解情况。

### 1.4 滤纸平板法验证菌系降解纤维素情况

配置 502 固体培养基<sup>[10]</sup>,灭菌后待培养基温度降温至 50 ~ 60℃,将 15 ~ 20 mL 的培养基倒入培养皿中,将浸泡在厌氧缓冲液<sup>[10]</sup>(pH = 7.4)中的圆形滤纸取出,平放在未凝固的培养基上,在滤纸上方涂一层 NSC-7 复合系菌液,其中一个平板直接培养,另一平板在滤纸上方再倒一层培养基,为确保两层培养基没有缝隙,倒培养基动作迅速,在第一层培养基未凝固之前倒第二层,使得两层培养基凝固成一体,将 2 种方式接种的培养皿均放在 50℃ 培养箱培养 5 d,观察滤纸分解情况。

### 1.5 DNA 提取

培养液经 8 000 r/min 离心 15 min,弃上清收集菌体细胞,用氯仿-苯酚抽提法提取总 DNA。提取参照文献<sup>[11]</sup>,加入 0.1 g 直径为 0.1 mm 的铅珠破碎细胞壁,用酚和氯仿/异戊醇去除蛋白,用异丙醇沉淀,用 RNA 酶去 RNA,用 2 × PEG 精制 DNA。

### 1.6 PCR 反应体系

(1) 16S rDNA 全长 PCR 以分离单菌的 DNA 做模板,PCR 扩增 16S rDNA 全长。引物 27F 和 1492R;反应体系为(50 μL):10 × PCR Tiangen Buffer 5 μL, 10 mmol/L dNTP mix 1 μL, 45 pmol/L 27F 和 1492R 各 0.5 mL, 5 μL Ampli Taq Gold 0.2 μL,模板 DNA 10 ng。

(2) 16S rDNA V<sub>3</sub> 区 PCR 用于 DGGE 分析的 PCR 产物扩增区域是 16S rDNA V<sub>3</sub> 区域。引物 357F-GC 和 517R,反应体系为:10 × PCR Tiangen Buffer 5 μL, 10 mmol/L dNTP mix 1 μL, 45 pmol/L 357F 和 517R 各 0.5 μL, 5 μL Ampli Taq Gold 0.2 μL。

### 1.7 DGGE 分析

采用 DCode 突变检测系统(Bio-Rad, Laboratories, Hercules, Calif)对 16S rDNA V<sub>3</sub> 区域的 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析。对于克隆文库和分离单菌株的 16S rDNA V<sub>3</sub> 区 PCR 产物的筛选,参照文献<sup>[12, 13]</sup>,聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6% ~ 12% (100% 的变性剂组成为尿素 7 mol/L,甲酰胺体积分数为 40%),尿素与甲酰胺变性梯度为 35% ~ 65%,在 61℃ 恒温下,200 V 电泳 5 h, sub-green 染色。

### 1.8 16S rDNA 克隆文库的构建及目的克隆的筛选

将 NSC-7 复合系的总 DNA 作为模板进行 16S rDNA 全长 PCR。将扩增产物进行琼脂糖电泳,在紫外灯下切胶上的扩增片段,用 QIAEX II gel 试剂盒纯化精制;纯化后的 DNA 与 pGEM-T Easy 载体连接,16℃ 过夜,然后通过 42℃ 热激 45 s 转化到 *E. coli* JM109 菌体;通过 X-gal 和 IPTG 的 α2 互补作用筛选出白色菌落。将白色菌落转移到新鲜的含有抗生素的 LB 固体培养基上,同时沾取少量菌落作为模板扩增 V<sub>3</sub> 区,将扩增产物进行 DGGE,按照条带在 DGGE 胶上的位置,筛选出所有不同种类的克隆。

### 1.9 16S rDNA 的测序及分析

对于克隆菌体提取的质粒及纯菌株的 16S rDNA 进行测序。根据 16S rDNA 序列,查询互联网数据库 BLAST(DDBJ nucleotide sequence database)进行检索,分析亲缘关系及相似性。

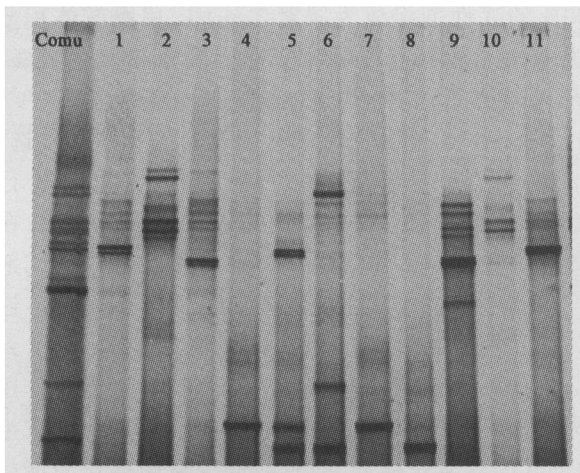
## 2 结果与分析

### 2.1 平板划线培养法分离获得的微生物种类

利用传统的平板稀释法在 PCS 培养基上获得 42 个形态各异的菌落,这些单菌株在接种初期形态有微弱的差别,但培养 2~3 d 后,形态差别不大,将单菌株染色后在光学显微镜下观察其形都为杆状,用传统的分类法很难区分其种类.利用分子生物学的手段,将菌落的 V3 区 PCR 产物利用 DGGE 筛选,在 DGGE 图谱上发现有 11 种不同迁移位置的条带(图 1),分别为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11.将 11 个代表条带菌株,分别提取 DNA,用 27F 和 1492R 引物扩增 16S rDNA 全长,测定其 DNA 序列后,进行 BLAST 检索,与 11 株菌相似率高的近缘种分别为:

1. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* (100%)、
2. *Paenibacillus barengoltzii* (99%)、
3. *Rhizobiaceae* (99%)、
4. *Chelatococcus daeguensis* (99%)、
5. *Bacillus* (99%)、
6. *Tepidiphilus margaritifera* (99%)、
7. *Petrobacter* (100%)、
8. *Geobacillus* (99%)、
9. *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3 (100%)、
10. *Paenibacillus* sp. HanTHS1 (99%)、
11. *Beta proteobacterium* HMD444 (99%).

1~11 号菌株在 GenBank 的登录号依次为: EU250939、EU250945、EU250937、EU250938、EU250946、EU250944、EU250943、EU250941、EU250935、EU250942、EU250940.



Comu 为复合系;1~11 为 11 株单菌的 16S rDNA

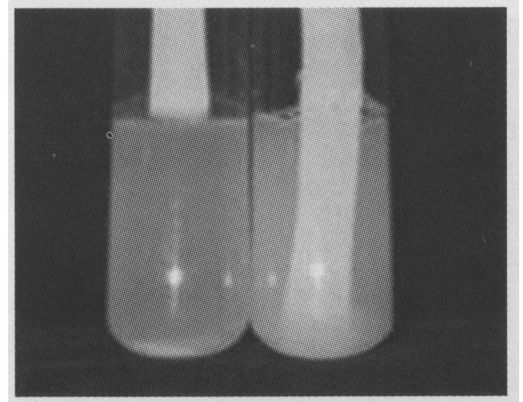
图 1 NSC-7 复合系与分离菌株的 DGGE 图谱

Fig.1 DGGE profiles of the NSC-7 community and isolates

## 2.2 分离单菌的性质和分解纤维素情况

将 11 株纯菌株用革兰氏染色法,观察其形态结构特征.11 株单菌中有 8 株呈阳性,3 株呈阴性,且形态均呈杆状,只是杆的长短、粗细有微弱差别.将分离的 11 株菌以体积比 1:1 重新组合,构成 11 株纯菌株的人工组合复合系,将该复合系在原条件下

培养 5 d,不具备分解滤纸和水稻秸秆的能力(图 2).说明复合系中不仅含有传统方法可分离的菌株,还含有传统的方法不能获得的菌株,而且未分离到的菌株在纤维素降解上起关键性作用.



左侧试管接种复合系;右侧管内接种 11 株单菌株的 1:1 组合

图 2 NSC-7 复合系与分离单菌组合的滤纸分解情况

Fig.2 Filter paper degraded by NSC-7 community and built-up 11 isolates

## 2.3 滤纸平板培养基上 NSC-7 复合系分解情况

滤纸平板培养 5 d 后,从图 3(b)可见,单层平板上的滤纸没有分解的迹象,而双层平板内滤纸上有黄色的斑块[见图 3(a)],并且黄色斑块附近的培养基上还出现多条细小裂纹,说明菌系在厌氧的条件下可分解滤纸,并且分解滤纸过程中产生大量气体可将培养基涨裂.通过平板滤纸的分解情况,说明 NSC-7 复合系暴露在空气中或在典型的好氧条件下都很难分解,只有在厌氧或微好氧条件才能分解,这与该菌系在筛选驯化过程中的培养条件有直接关系,NSC-7 复合系在溶氧量范围为 0.01~0.12 mg/L 的微好氧条件下驯化获得的,在该溶氧量范围内菌系降解纤维素情况良好,这与本实验组同一条件下筛选的另一组高效复合系类似,研究表明<sup>[14]</sup>,该菌系的关键菌是厌氧菌,由此推断,NSC-7 复合系降解纤维素的关键菌也很可能是厌氧菌.

## 2.4 16S rDNA 克隆文库的构建及目的克隆的筛选

为了全面了解 NSC-7 复合系的菌种组成多样性,对 NSC-7 的 16S rDNA 全长的 PCR 产物建立克隆文库,通过蓝白斑菌落筛选,获得 195 个白色菌落.随机将每 10 个菌落分成一组,对 20 组菌进行菌落 PCR-DGGE 筛选,从 DGGE 图谱的 20 个泳道中选择条带最多、差异性最大的 8 组,对选定的 80 个克隆子的 16S rDNA V3 区做菌落 PCR,再次利用 DGGE 图谱中每种菌的迁移位置差异性进行细致筛选,获得 25 种不同迁移位置的条带.

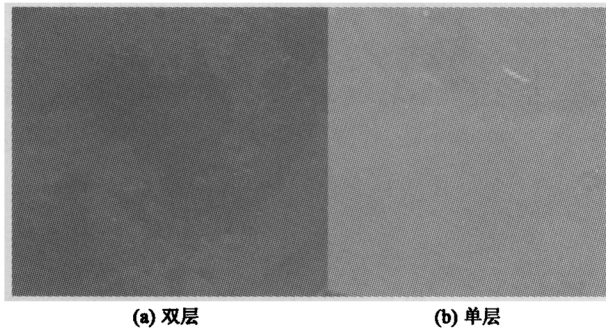


图3 NSC-7复合系在双层平板与单层平板上滤纸的降解情况

Fig.3 Filter paper degraded in solid medium of double deck plate and monolayer plate by NSC-7 community

## 2.5 系统发育分析

将25个代表性克隆进行测序,将所得序列输入NCBI网站,用Blast程序与数据库中已有序列相比对结果见表1,从中可见NSC-7复合系具有丰富而

独特的多样性,25株菌有15株属于已知菌,其中*Clostridium*占36%(9株)、*Proteobacterium*占8%(2株)、*Petrobacter*占8%(2株)、*Bacteria*占4%(1株)、*Paenibacillus*占4%(1株),其余10株属于难培养菌.NSC-7复合系共有25株菌,其中10株菌的近缘种属于难培养菌,难培养菌占复合系菌种总数的40%,说明NSC-7复合系既是一个菌种组成多样性丰富的群体,又是一个发现新型菌种的良好素材.此外,在25株菌的近缘种中有20株属于严格厌氧或微好氧菌,5株属于好氧菌,厌氧菌占微生物总数的80%,这意味着要细致研究该复合系的菌种组成,需要在厌氧条件下分离、纯化每个厌氧菌,因此,要彻底了解每株菌获得相应信息还存在很大的难度,但搞清其内部每个菌株的分类地位和作用,为今后研究纤维素分解菌系的功能和协作机制有十分重要的意义.

表1 克隆文库的16S rDNA序列分析

Table 1 Analysis of 16S rDNA of clone library

菌株编号	登录号	近缘菌株名称(相似率/%)	近缘菌株登录号	文库中数量	比例
96k	EU250948	Uncultured bacterium (99)	DQ125580	2	2.53
99	EU250956	Uncultured bacterium(99)	EF559181	1	1.26
112	EU250965	Uncultured bacterium(97)	DQ887961	1	1.26
126	EU250947	Uncultured bacterium(97)	DQ129397	5	6.32
113	EU250932	Uncultured bacterium(99)	EF558994	3	3.79
28	EU250957	Uncultured bacterium tbr1-10(96%)	AF280825	2	2.53
26	EU250960	Uncultured bacterium(93)	DQ129397	1	1.26
76	EU250952	Uncultured bacterium(92)	EF559169	5	6.32
93	EU250958	Uncultured bacterium(99)	AB234005	5	6.32
54	EU250961	Uncultured bacterium(89)	EF559160	4	5.06
96	EU250949	<i>Clostridium</i> sp. 75064(97)	AF227826	1	1.26
53	EU250954	<i>Clostridiales desulfotomaculum</i> (99)	DRU95951	1	1.26
117	EU250953	<i>Clostridium</i> sp. strain XB90(90)	AJ229234	3	3.79
114	EU250934	<i>Clostridium thermosuccinogenes</i> sp. Nov. (99)	AB207248	5	6.32
92	EU250963	<i>Clostridium</i> sp. PML14(99)	EF522948	2	2.53
57	EU250962	<i>Clostridium stercorarium</i> sub sp. (94)	AF266461	2	2.53
25	EU250950	<i>Clostridium</i> sp. PML3-1(92)	EF165015	5	6.32
118	EU250933	<i>Clostridium</i> sp. PML14(95)	EF522948	7	8.86
B19	EU250930	<i>Clostridium</i> sp. (95)	AF227826	3	3.79
116	EU250955	<i>Anaerobaculum mobile</i> (98)	AJ243189	2	2.53
78	EU250931	<i>Petrobacter succinimandens</i> BON4(98)	AY219713	5	6.32
77	EU250964	<i>Petrobacter</i> sp. DM-3(96)	DQ539621	3	3.79
B14	EU250935	<i>Paenibacillus</i> sp. HanTHS1(95)	AM283040	4	5.06
124	EU250959	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> (99)	AJ864723	2	2.53
52	EU250951	Beta proteobacterium HMD444(96)	AB015328	2	2.53

为了进一步了解NSC-7复合系的系统发育地位,将克隆子中同源性较高的序列下载,通过Clustal X1.83、Mega Soft等软件构建系统发育树,结果如图4.从系统树的序列分布可见,有很多难培养菌株的

序列与梭菌的序列相间分布,也有很多与梭菌的序列聚列在一起,说明很多难培养菌属于梭菌,只是还没有获得纯菌株.在所有的梭菌属近缘种信息中仅有clone114的近缘种*C. thermosuccinogenes* sp.

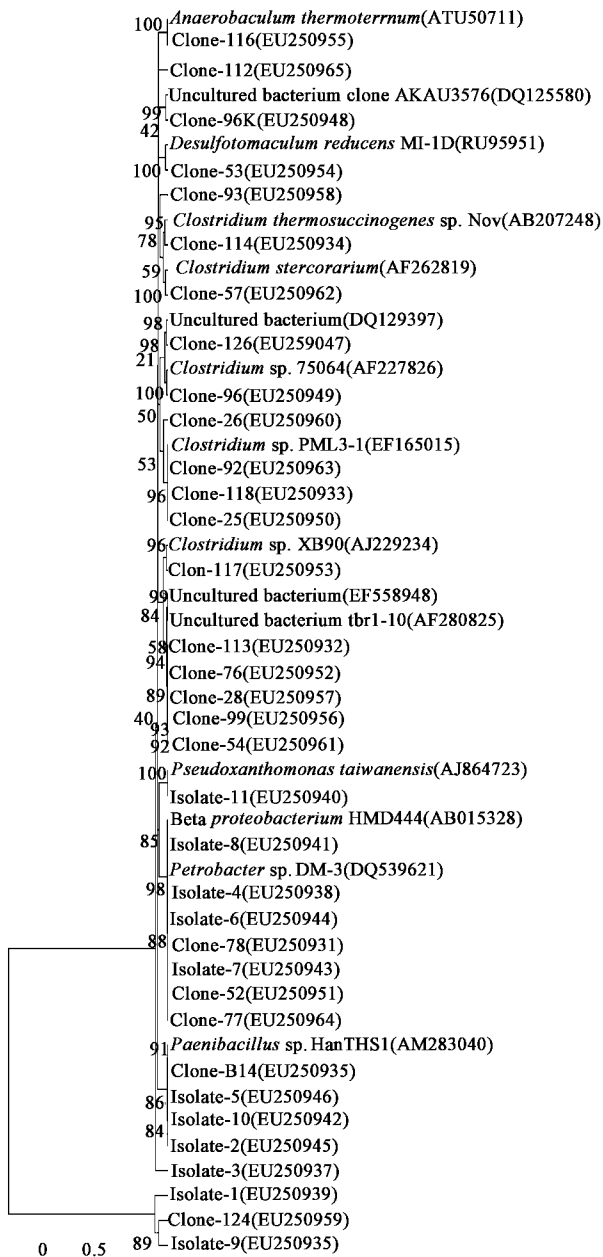


图4 NSC-7复合系克隆文库和单菌株构建的系统树

Fig.4 Phylogenetic tree analysis of isolates and clone in the NSC-7 community

Nov.<sup>[15,16]</sup>是通过厌氧分离纯化获得的纯菌株,该菌是从50℃条件下纤维素降解菌复合系中分离纯化出来的1株具有高效降解纤维素能力的梭菌,NSC-7复合系与该复合系都来源于堆肥样品,并且培养条件、环境和降解纤维素能力都很相似,说明clone114和近缘种*C. thermosuccinogenes* sp. Nov.很可能是同一种菌.此外,clone25、54、57、92、117、118、126的近缘种均是梭菌属菌株,梭菌占NSC-7复合系菌种总数的40%,该属微生物具有超强的分解天然水稻

秸秆<sup>[15]</sup>、废纸浆<sup>[17]</sup>的能力,近期的很多研究都表明梭菌中很多微生物可以同时分泌纤维素酶和半纤维素酶,并且这些酶对木质纤维素的水解有超强的能力<sup>[18-20]</sup>.由此可见,梭菌的存在是复合系具备高效分解木质纤维素的重要原因.

### 3 讨论

NSC-7是一组具有高效降解纤维素和林丹双重功能的复合系,该菌系在14d内分解天然稻秆总重量的73.6%,在国内外报道的文献中除了MC1在12d内能够分解稻草总重量的81%<sup>[21]</sup>以外,目前鲜见培养的微生物比NSC-7更强分解能力的报道.通过克隆文库构建检测到该复合系中有25个不同迁移位置的条带,分别归属于*Bacteria*、*Paenibacillus*、*Petrobacter*、*Proteobacterium*、*Clostridium* 5个属.很多研究都表明*Bacillus*属微生物具有高效分解木质纤维素、分泌纤维素酶和半纤维素酶的能力,Johnvesly等<sup>[22]</sup>以稻壳粉为底物测得的碱性*Bacillus* sp. JB-99分泌半纤维素酶活性最高可达4826 IU·mL<sup>-1</sup>,Tachaapaikoon等<sup>[23]</sup>从*Bacillus halodurans* C-1菌株中分离和纯化到2种内切纤维素酶;*Paenibacillus*也具备分泌半纤维素酶和分解纤维素的能力<sup>[24,25]</sup>,但本研究在有氧条件下获得的11株菌中含有2株*Paenibacillus*属菌株和1株*Bacteria*属菌株,但这些菌株混合后并不具有分解纤维素的能力,说明NSC-7复合系内*Bacteria*和*Paenibacillus*属微生物并不具备分解纤维素的能力,此外,目前还未见关于*Petrobacter*和*Proteobacterium*属微生物具有分解纤维素能力的报道,由此可推断,NSC-7复合系内分解纤维素的关键菌是未分离获得的梭菌属菌株.很多资料都表明<sup>[15, 17-20, 26]</sup>,梭菌属的微生物属于严格厌氧或微好氧菌,对自然界木质纤维素的降解上起到重要作用,本研究经双层平板滤纸法也证实分解纤维素的关键菌是厌氧或微好氧菌,在NSC-7复合系内梭菌占已知菌总数的40%,复合系含有大量的梭菌是其具有高效分解纤维素能力的一个主要原因.

### 4 结论

在有氧条件下,从NSC-7复合系内分离到11株单菌,将分离的11株单菌重新组合后不具备分解纤维素的能力.经单层和双层滤纸平板法检验,仅双层平板内滤纸分解,说明NSC-7复合系内分解纤维素的关键菌属于厌氧菌.对复合系构建克隆文库,经DGGE筛选获得25个不同迁移位置的条带,经测序

表明其中 15 株分别归属于 *Clostridium*、*Petrobacter*、*Bacteria*、*Paenibacillus*、*Proteobacterium* 5 个属, 剩余 10 株属于难培养菌株。

#### 参考文献:

- [1] Orozco A, Ahmad M, Rooney D, et al. Dilute acid hydrolysis of cellulose and cellulosic bio-waste using a microwave reactor system [J]. *Process Saf Environ*, 2007, **85**(B5): 446-449.
- [2] Joana M D, Maria C M, Alvim F, et al. Waste materials for activated carbon preparation and its use in aqueous-phase treatment: A review [J]. *J Environ Manage*, 2007, **85**: 833-846.
- [3] Pasquini M W. The use of town refuse ash in urban agriculture around Jos, Nigeria: health and environmental risks [J]. *Sci Total Environ*, 2006, **354**(1): 43-59.
- [4] McKay H. Environmental, economic, social and political drivers for increasing use of wood fuel as a renewable resource in Britain [J]. *Biomass Bioenerg*, 2006, **30**(4): 308-315.
- [5] Alvarenga P, Palma P, Gonçalves A P, et al. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land [J]. *Environ Int*, 2007, **33**(4): 505-513.
- [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] 刘长莉, 王小芬, 牛俊玲, 等. 一组多功能细菌复合系 NSC-7 的培养特性及稳定性[J]. *微生物学通报*, 2008, **35**(5): 720-724.
- [8] 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.
- [9] 牛俊玲, 崔宗均, 李国学, 等. 高温堆肥中复合菌系对木质纤维素和林丹降解效果的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2005, **24**(2): 375-379.
- [10] Drent W J, Lahpor G A, Wiegant W M, et al. Fermentation of inulin by *Clostridium thermosuccinogenes* sp. Nov., a thermophilic anaerobic bacterium isolated from various habitats[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 455-462.
- [11] Guo P, Wang X F, Zhu W B, et al. Degradation of corn stalk by composite microbial system of MC1 [J]. *Environ Sci Technol*, 2008, **20**(1): 1-6.
- [12] Wang X F, Haruta S, Cui Z J, 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**: 106-115.
- [13] Mitali D, Todd V R, Laura G L. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(3): 756-767.
- [14] Kato S, Haruta S, Cui Z J, et al. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(11): 7099-7106.
- [15] Kato S, Haruta S, Cui Z J, et al. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, **51**: 133-142.
- [16] 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 Microbiol*, 2004, **54**: 2043-2047.
- [17] Hatsumi S, Hironori I, Shohei A, et al. Isolation and characterization of a new *Clostridium* sp. that performs effective cellulosic waste digestion in a thermophilic methanogenic bioreactor [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(5): 3702-3709.
- [18] Murashima K A, Kosugi D R H. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation [J]. *J Bacteriol*, 2003, **185**: 1518-1524.
- [19] Koukikielo R, Cho H Y, Kosugi A, et al. Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 3504-3511.
- [20] Cha J, Satoshi M, Helen C, et al. Effect of multiple copies of cohesins on cellulase and hemicellulase activities of *Clostridium cellulovorans* mini-cellulosomes [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, **17**(11): 1782-1788.
- [21] 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.
- [22] Johnvesly B S, Virupakshi G N, Patil R, et al. Cellulase-free thermostable alkaline xylanase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2002, **12**(1): 1553-1556.
- [23] Tachaapaikoon C, Lee Y S, Rantanakhanokchai K, et al. Purification and characterization of two endoxylanases from an alkaliphilic *Bacillus halodurans* C-1 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2006, **16**: 613-618.
- [24] Lee Y E, Lim P O. Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Paenibacillus* sp. DG-22 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2004, **14**: 1014-1021.
- [25] Zhang Y H P, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies [J]. *Biotechnol Adv*, 2006, **24**(5): 452-481.
- [26] Kosugi A Y, Amano K M, Doi R H. Hydrophilic domains of scaffolding protein CbpA promote glycosyl hydrolase activity and localization of cellulosomes to the cell surface of *Clostridium cellulovorans* [J]. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 6351-6359.