

常温木质纤维素分解菌群的筛选与特性研究

刘长莉^{1,2}, 朱万斌¹, 郭鹏¹, 王小娟¹, 王小芬¹, 崔宗均^{1*}

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 为获得一组常温条件下加速木质纤维素腐解的菌群, 利用限制性培养法, 筛选到一组在室温(28℃)条件下, 5 d可分解天然稻秆总重 39.6% 的菌群. 仅用质谱仪的一个 CP-Chirasil-Dex CB 毛细管柱就能够检测到丙酸、乙醇、异丙酸、4-氨基-1-丁醇、丁酸、硅烷-二乙基、乳酸、乙二醇、邻苯二甲酸二乙酯、甘油等 10 种以上有机物. 定量分析挥发性产物, 发现其种类和浓度随时间变化很大. 用变性梯度凝胶电泳(DGGE)检测菌群的动态变化, 发现在培养不同时期菌种组成差异很大, 通过对各条带近缘种网上比对结果可见, 该菌群具有丰富的菌种组成多样性, 菌群内微生物分别归属 *Clostridium* sp.、*Brevibacillus* sp.、*Rhizobium* sp.、*Bacterium* sp. 等 4 个属.

关键词: 常温菌群; 木质纤维素分解; 稻秆; 挥发性产物

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)08-2458-06

Screening and Characteristics of Normal Temperature Lignocellulose-Degradation Microbial Community

LIU Chang-li^{1,2}, ZHU Wan-bin¹, GUO Peng¹, WANG Xiao-juan¹, WANG Xiao-fen¹, CUI Zong-jun¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: A normal temperature lignocellulose-degrading microflora has been constructed by our laboratory. We researched the degradation activity and compose of the community in 28℃ fermentation condition. The results showed that the microbial community could degrade 39.6% of rice stew gross weight within five days. The volatile products were detected using CP-Chirasil-Dex CB capillary column by GC-MS; propionic acid, ethanol, isopropyl alcohol, 4-amino-1-butanol, butanoic acid, diethoxydimethyl-silane, lactic acid, ethanol, 2, 2'-oxybis-, diethyl phthalate and glycerin, more than 10 kinds of volatile products were detected. The state volatile products of changed largely along with the process of decompose the productions gradually increase, and the content changes much with the process of decompose. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) detected the dynamic change of bacterium compose, the bacterium changes much in different period, the result of Blast from 16S rDNA sequence was found that the closest relative in community belong to *Clostridium* sp., *Brevibacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Bacterium* sp. four genera.

Key words: normal temperature microbial community; lignocellulose degradation; rice straw; volatile products

秸秆是籽粒收获后耕地上重要的农业废弃物, 也是土壤有机质的主要来源. 由于秸秆中木质纤维素占干重的 40% ~ 60%, 且自然状态下极难分解^[1], 导致我国年均有 5.5 亿 t 的秸秆只能就地丢弃或焚烧不能归还土壤, 需长期堆积才能腐解的秸秆不仅占用耕地还限制营养元素归还土壤, 焚烧秸秆产生的烟尘影响生态环境和人类健康. 此外, 畜禽粪便的处理问题长期困扰着养殖业的发展^[2~4], 畜禽粪便需长期堆积才能腐烂, 造成大量病原菌、病虫害繁殖传播, 尤其是人畜共患病由蚊子、苍蝇等生物的传播严重危害人类健康, 同时还会造成大量碳素营养流失于“土壤-植物”系统之外. 如何将富含木质纤维素类有机废弃物无害化、资源化处理是实现环境保护和资源循环利用的重要课题. 近期研究表明^[5~8], 木质纤维素经过生物处理后, 可转化为各种各样的产品, 其种类之多几乎囊括了所有的石油化工产品. 随

着环境污染和能源危机的日益深重, 越来越让人们意识到将农林废弃物和秸秆等富含木质纤维素类资源变废为宝, 转化为人类可利用的资源的重要性.

为了加速木质纤维素类资源的分解, 科研工作者做了长期不懈的努力, 在人工条件下, 依靠纯培养的微生物不仅难以直接分解天然木质纤维素, 而且纯菌株存在抵抗力弱、受外界环境影响大等不足限制了其应用于实际生产, 此外, 崔宗均课题组筛选到的高效而稳定的纤维素分解混合菌群^[9], 对天然木质纤维素有很强的分解能力, 但该菌群需要在高温环境(50 ~ 60℃)才表现出较强的分解活力, 在常温

收稿日期: 2008-12-26; 修订日期: 2009-03-13

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAD07A01, 2006BAD10B05-2); 东北林业大学青年基金项目(07035); 教育部博士点新教师基金项目(20070019055)

作者简介: 刘长莉(1976~), 女, 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: acuzij@cau.edu.cn

状态下难以推广和应用, 本研究在前期工作的基础上, 成功获得一组在常温条件下既高效又稳定分解木质纤维素的菌群, 该菌群能够在常温条件下对秸秆进行腐解, 腐解后的秸秆不仅减少农田废弃物对环境的污染, 还可使植物固定的碳素营养回还土壤, 对增加土壤有机质和碳素循环转化成为可能, 因此, 常温木质纤维素分解菌群的成功构建为解决环境污染和农业可持续发展提供了技术支持.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 菌种来源 采自黑龙江省建三江前锋农场堆积 15 a 的柴垛底腐烂的秸秆和土壤样品.

(2) 材料 水稻收获后, 稻秆晾干, 用 1.5% NaOH 浸泡 24 h, 流水冲洗至中性, 80℃ 烘至恒重.

(3) Mandels 培养基 K_2HPO_4 3.0 g, $NaNO_3$ 3.0 g, $CaCl_2$ 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 7.5 mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 2.5 mg, $ZnSO_4$ 2.0 mg, $CoCl_2$ 3.0 mg, 1L 蒸馏水(pH = 6.2). 于 121℃ 灭菌 20 min.

1.2 木质纤维素降解菌的筛选和驯化

取 5 g 菌源样品接种到盛有 150 mL 培养基的 500 mL 三角瓶中, 瓶内含有培养基总量 1% 的稻秆和 1 cm × 6 cm 的滤纸条, 在 28℃ 下静止培养. 当滤纸条颜色由白色变为黄色, 将原菌种以 10% 的接种量转接到新鲜培养基内. 直至滤纸条变黄的时间一致, DGGE 图谱显示菌群达到稳定停止驯化.

1.3 实验设置

300 mL 培养瓶内添加 60 mL 培养基和 0.6 g 处理后的稻秆, 将第 30 代菌种活化后按总体积的 5% 接种, 28℃ 静止培养, 分别在第 0、2、3、4、5 d 取样. 设相同培养基和秸秆量而不接菌的作对照 1, 用于消除培养条件对秸秆重量变化的影响; 设添加 0.2% 蔗糖的培养基中接种而不添加稻秆的作对照 2, 用于消除培养基和菌体对秸秆减重的影响, 每样设 3 个重复.

1.4 秸秆分解过程中总重量及各成分的变化

定期取培养物分别在 8 000 r/min 离心 10 min, 去掉上清液, 将沉淀在 80℃ 烘至恒重, 用乙酸-硝酸混合试剂洗沉淀物, 然后用蒸馏水将非纤维素物质除去, 将剩余的木质纤维素物质磨成碎末, 过 1 mm 筛子后取 0.5 g 干物质于专用袋(Model F57, USA)中, 在 ANKOM220 纤维分析仪(USA)上, 用改良的范氏洗涤法^[10]测量可溶物质、半纤维素、纤维素、木质素及灰分含量.

1.5 培养液中糖分的测定

用超纯水将培养液稀释 10 倍, 在沸水浴中煮沸 20 min, 取出冷却, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 重复提取 3 次, 上清液用蒸馏水适当稀释作为待测样品, 用蒽酮比色法测定糖浓度^[11].

1.6 稻秆分解后挥发性产物的测定

取培养液, 过 0.22 μm 的滤膜, 用气质联机(GC-MS Shimadzu, Japan)分析. 分析柱为 CP-Chirasil-Dex CB (25 m × 0.25 mm) 型毛细管柱; 柱箱升温程序: 60℃ 保持 2 min 后以 5℃/min 速度升至 100℃, 再以 15℃/min 速度升至 190℃, 保持 2 min, 共 15 min; 进样口温度 190℃; 检测器温度 190℃; 载气 He (60 kPa); 流量 34 mL/min; 分流比 1/22; 检测器电压 1.5 kV; 进样量 1 μL, 用 NIST 数据库定性分析各种物质, 将峰图内各个峰所代表的物质以一定比例稀释, 作为标样进行定量分析.

1.7 DGGE 及 DGGE band 测序

DNA 的提取采用 Benzyl Chloride 法^[12], 16S rDNA V3 区域的 RCR 扩增其引物为 357F-GC 和 517R. PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 10 min, 93℃ 1 min, 48℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环, 最后在 72℃ 下延伸 5 min. DGGE 操作系统采用 DCodeTM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 制作规程见文献[13, 14]. 聚丙烯酰胺梯度胶浓度为 6% ~ 12%, 0.5 TAE 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 10 mmol/L 乙酸, 0.5 mmol/L EDTA), 变性剂梯度为 25% ~ 55%, 于恒定电压 200 V 和 61℃ 下电泳 5 h. 采用 SYBR Green I (Eugene, Ore) 染色 30 min, 紫外凝胶成像系统分析结果. 将切胶产物回收, 经 357f 和 517r 引物用上述方法扩增, 扩增后的产物用试剂盒(Tiagen China)纯化^[15], 纯化后送测序公司(上海生工)测序.

2 结果与分析

2.1 筛选与驯化

在筛选初期, 稻秆的分解速度较慢, 约 15 d 才能将秸秆软化, 此后随着传代次数的增加分解速度逐渐加快. 第 5 ~ 6 代菌种分解纤维素的速度较快, 第 6 代在接种的第 2 d 液面下的滤纸变得粗糙培养液呈黄褐色, 第 3 d 滤纸上出现黄色斑点和斑块, 第 4 d 液面两侧的滤纸全部崩解, 由于秸秆的腐解澄清的溶液变得混浊外观呈黑色. 在筛选过程中, 第 10 代纤维素分解能力出现衰退, 培养液的 pH 值也呈不正常的规律性^[16]变化, 将 pH 值变化无规律的菌

种淘汰,pH 值呈规律性变化且分解能力较强的菌群再继续组配,经 5 个月连续 30 多代筛选,获得 1 组分解能力和菌种组成稳定的混合菌群.

2.2 分解能力和分解产物分析

在培养过程中,定期将接菌与未接菌处理内秸秆烘干称重,在培养的第 0、2、3、4、5 d,稻秆分解率分别为 12.0%、18.5%、28.4%、34.6%、39.6% (图 1). 定期检测稻秆内木质纤维素成分(表 1)变化. 接入菌群后,稻秆内各成分迅速降低,在降解的第 5 d,纤维素、半纤维素、木质素和灰分分别减少 0.130、0.116、0.026 和 0.001 g(图 2),减重率分别为 47.8%、69.7%、30.7%和 9.1%. 到第 3d,纤维素降解 26.0%,半纤维素降解 55.8%,灰分降解 14.4%,木质素降解 6.3%. 与高温(50℃)菌群在 5 d 内纤维素、半纤维素和木质素降解率分别为 65.4%、43.9%和 2.6%^[17]相比,该菌群无论是分解能力还是减重成分都有很大差别,常温菌群对半纤维素分解能力较强,而 50℃ 高温菌群对纤维素和灰分分解能力都较强,这是由于高温菌群对纤维素有更强的分解能力,本研究组获得的一组高温纤维素菌 MC1 对纤维素具有很强的分解能力^[9]. 由此也证明了纤维素分子的结构致密,自然状态下极难分解的观点^[1].

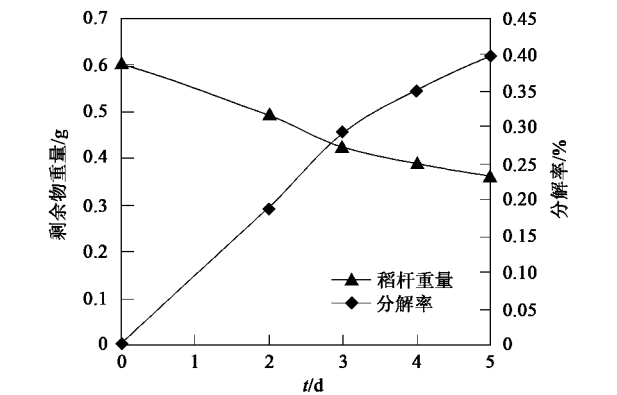


图 1 培养过程中秸秆重量和分解率动态变化
Fig.1 Changes of rice straw gross weight and decomposing rate during degradation process

表 1 稻秆中木质纤维素的含量/%
Table 1 Components of lignocellulose in rice straw/%

组成	纤维素	半纤维素	木质素	灰分
百分比	42.7	26.4	6.7	0.5

2.3 培养液中糖浓度变化

在培养过程中,溶液中可溶性糖呈先下降后上

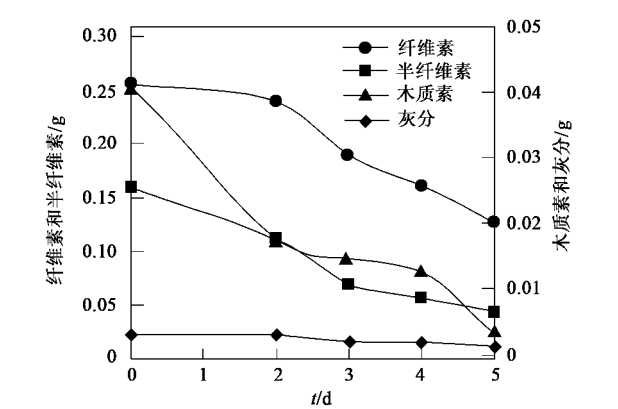


图 2 不同时期秸秆中各成分的变化
Fig.2 Changes of rice straw composition during degradation

升再下降趋势,可溶性糖初始值是 0.500 $\mu\text{g/mL}$ (图 3),接种 1d 后迅猛下降到 0.077 $\mu\text{g/mL}$,而在第 3 d 浓度又回升到 0.110 $\mu\text{g/mL}$,3 d 后浓度又有所下降,到第 5 d 减少到 0.072 $\mu\text{g/mL}$. 可溶性糖的变化是秸秆被分解产生的各种可溶性糖积累和产生后被微生物分解利用而消失的外部表现. 前期迅猛下降是由于培养初期迅速增殖的微生物需要消耗大量糖来满足自身生长代谢所致;在 2~3 d,糖浓度又有所增加,结合分解过程中 2~3 d 也是秸秆迅猛减重时期可知,秸秆中纤维素和半纤维素被微生物转化为可溶性糖,产生的糖大于自身消耗导致糖浓度上升;3 d 后,随着分解能力的下降,分解产生的糖不足自身消耗,导致糖浓度有所下降. Atif 等^[18]研究表明,木质纤维素分解后产生的糖,对后续分解有阻遏作用. 从图 3 可见,该常温分解体系中产生的糖能够被迅速消耗,这对于解除产物的阻遏作用促进木质纤维素的进一步分解是有利的^[18],这也是常温菌群具备高效分解木质纤维素的原因之一.

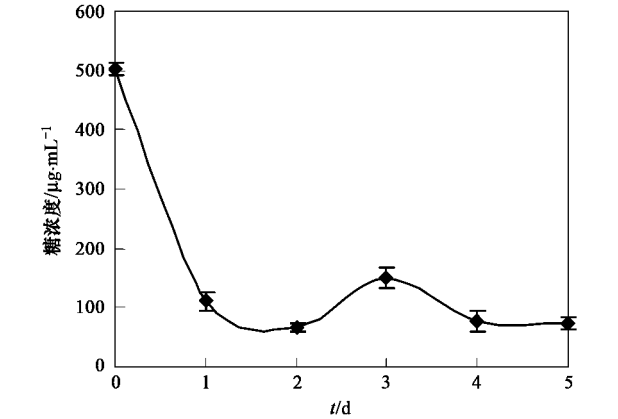


图 3 发酵过程中可溶性糖浓度的变化
Fig.3 Changes of saccharide concentration during fermentation

2.4 发酵液中挥发性产物的变化

2.4.1 定性分析

用 GC-MS 分别在 1、3、5 d 检测发酵液的成分, 经 NIST 数据库检索结果如图 4. 产物中可检测到丙酸、乙醇、异丙酸、4-氨基-1-丁醇、丁酸、硅烷-二乙基、乳酸、乙二醇、邻苯二甲酸二乙酯、甘油等 10 种化合物. 从峰图分布可见, 第 1 d 峰的数量少、峰的面积也小, 第 3 d 峰的数量明显增多且同一物质的峰面积增大, 而第 5 d 峰的数量和面积都相对减少. 由此可见, 稻秆分解后产物并不是简单的几种, 仅由 GC-MS 一个 CP-Chirasil-Dex CB 型毛细管柱就可测得 10 种挥发性产物, 并且很多已知成分都对土壤养分恢复和调节有利, 其中有机酸的产生对土壤酸碱度调节有重要作用, 醇类和盐类对土壤有机质的增加有益, 可见这组常温菌群可有效促进秸秆内的大量元素和微量元素的循环, 尤其对加速地球碳循环起到极大的促进作用.

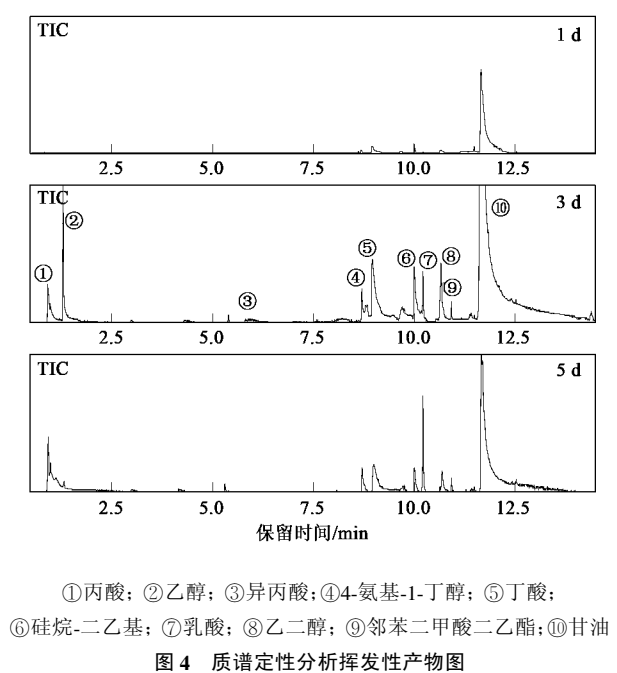


图 4 质谱定性分析挥发性产物图

2.4.2 挥发性产物定量分析

对含量较大的 5 种挥发性产物进行定量分析 (如图 5), 第 1 d 只能检测到 2 种产物其中丁酸 0.029 g/L、甘油 0.624 g/L; 第 3 d 产物的种类和含量都达到最大值, 其中丙酸 1.711 g/L、乙醇 0.205 g/L、丁酸 0.234 g/L、甘油 3.366 g/L; 在第 5 d 检测到丙酸 1.241 g/L、乳酸 0.325 g/L、甘油 0.509 g/L. 在不同时期产物的含量差异较大, 乙酸仅在前 3 d 出现, 丙酸

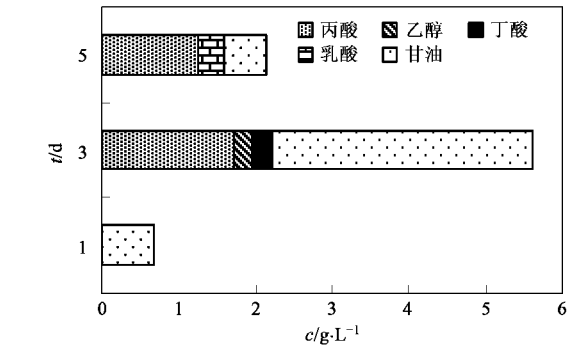


图 5 定量分析挥发性产物动态

Fig.5 Quantitative analysis of major volatile products

在 3 d 后才出现, 乙醇仅在第 3 d 可检测到, 而甘油从始至终都存在且含量较高, 结合图 4 和图 5 中定性和定量分析可见, 秸秆由初期的难溶于水状态, 经菌群分解后, 产物的种类逐渐增多, 且各种物质的含量也随着菌群的作用而变化, 进一步说明菌群可有效的促进秸秆内各种元素的循环流动, 将致密、难溶的无法利用的物质转化为可溶的、易利用的物质. 另外, 从不同时期峰图变化可见, 产物的种类如此之多、变化也很复杂, 若从中直接提取某种特定的物质有较大的难度, 但这些物质都可以作为甲烷发酵的底物^[19-21], 因此, 利用该菌群作为农业废弃物甲烷发酵的前发酵也是一个具有潜力的发展方向.

2.5 利用 DGGE 分析筛选过程中的菌群动态

在筛选过程中, 分别在第 5、10、15、20、30 代收集菌体细胞, 菌群组成和变化通过 DGGE 图谱中

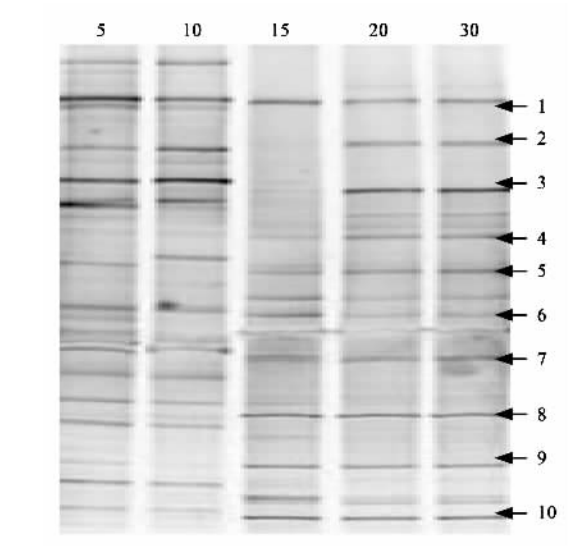


图 6 利用 DGGE 检测第 5、10、15、20 和 30 代菌种组成

Fig.6 DGGE profiles of bacteria dynamic shifts during constructing of 5, 10, 15, 20 and 30 generation

条带分布进行分析(图 6).从 DGGE 筛选图谱中各代泳道上条带的颜色深浅和位置变化可见,菌群组成变化分为三阶段:前 10 代属原初期,这一时期的菌种主要受出发菌种的影响,种类多、功能性强,但菌群组成尚未稳定;10~15 代属不稳定期:从条带位置和颜色变化可见菌群的组成与前期(第 1~10 代)和后期(第 20~30 代)都存在一定的差异,但经

过这一阶段驯化,菌群逐渐适应人为提供的环境,组成和功能逐渐趋于稳定;第 20~30 代属稳定期,经过长期的驯化和淘汰,适应环境的微生物稳定下来,形成了一组功能和结构稳定的菌群.对第 30 代菌群 DGGE 图谱上的条带进行切胶测序,主要条带的近缘种见表 2,10 个条带近缘种分别归属 *Clostridium* sp.、*Brevibacillus* sp.、*Rhizobium* sp.、*Bacterium* sp.

表 2 图 6 的 DGGE 图谱中主要条带说明
Table 2 Identities of main band of DGGE in Fig.6

序号	近缘种(登录号)	相似率/%	登陆号
1	Uncultured bacterium (EU593800)	87	FJ040791
2	Uncultured soil bacterium (EF526237)	100	FJ040792
3	<i>Brevibacillus borstelensis</i> isolate NS 1846 (EU251074)	100	FJ040793
4	<i>Soil bacterium</i> Siso-S3F-MILLSSL-3 (EU515530)	98	FJ040794
5	<i>Bartonella rattiaustraliensis</i> AUST/NH4 (EU111749)	98	FJ040795
6	<i>Brevibacillus</i> sp. JAM-FM0201 (EU554438)	100	FJ040796
7	<i>Clostridium algidicarnis</i> (AF127023)	91	FJ040797
8	Uncultured bacterium (AF407689)	91	FJ040798
9	<i>Brevibacillus borstelensis</i> strain S3 (EF439668)	98	FJ040799
10	<i>Marine bacterium</i> H6 (EU183317)	88	FJ040800

4 个属.

3 讨论

在自然条件下,很多木质纤维素都能够被缓慢分解,但彻底分解需要较长时间.自然状态下,农林废弃物长期得不到腐解,尤其是长期耕作的土壤上的秸秆不能及时回还土壤,极大地限制营养元素的循环,导致土壤有机质下降.本实验筛选的常温降解秸秆菌群能够在 5 d 内分解秸秆总量的 39.6%,该菌群的成功构建实现了人工加速秸秆内元素快速回还土壤的构想,为实现农业可循环发展提供必要技术.常温纤维素分解菌群具有实际应用的优势,首先,该菌群在长期的筛选和驯化过程中已逐渐形成功能性强、组成稳定的菌群,抗外界干扰能力与纯培养微生物具有无法比拟的优势.其次,菌群在常温条件下可高效分解木质素,对其广泛应用于实际生产实践奠定重要基础.

常温菌群在 5 d 内,降解天然水稻秸秆总重的 39.6%,尽管与同一研究组筛选的 MC1 在 50℃ 条件下 12 d 内分解稻草重量的 81%^[4,15] 相比分解能力并不强,但能够在室温条件下 5 d 使得秸秆减重率达 39.6%,在国内外还未见人工构建的菌群在常温下具有如此高效分解能力的报道.利用 DGGE 检测到含有 *Clostridium* sp. 和 *Bacterium* sp. 的菌种存在,众

所周知, *Clostridium* sp. 对木质纤维素有超强的分解能力, Kato 等^[22] 分离的单菌株 *Clostridium thermosuccinogenes* sp. Nov. 具有分解天然稻秆的能力, Hatsumi 等^[23] 分离的单菌株 *Clostridium* sp. NBRC101661 具有分解办公室废纸的能力,此外, *Bacterium* 属微生物是最常见的分解自然垃圾、有机染料和纤维素的微生物^[24], Johnvesly 等^[25] 利用 *Bacillus* sp. JB-99 分解稻壳粉, Tachaapaikoon 等^[26] 从 *Bacillus halodurans* C-1 菌株中分离和纯化到纤维素酶,由此可见,菌群内含 *Clostridium* 和 *Bacterium* 属的微生物是该常温菌群具备高效分解木质纤维素的主要原因.

4 结论

- (1) 常温纤维素分解菌群在 25~30℃ 条件下,5 d 能够分解稻秆总重的 39.6%,其中纤维素分解了 47.8%,半纤维素分解了 69.7%.
- (2) 由 GC-MS 一个 CP-Chirasil-Dex CB 型毛细管柱定性分析挥发性产物,检测到丙酸、乙醇、异丙酸、4-氨基-1-丁醇、丁酸、硅烷-二乙基、乳酸、乙二醇、邻苯二甲酸二乙酯、甘油等 10 种化合物.定量分析表明,挥发性产物的种类和数量在发酵期间呈动态变化.
- (3) 利用 DGGE 监测常温菌群的筛选过程,在第 20 代菌群的组成逐渐趋于稳定.第 30 代获取的

菌群信息表明, 菌群含有 *Clostridium* sp.、*Brevibacillus* sp.、*Rhizobium* sp.、*Bacterium* sp. 4 个属。
参考文献:

- [1] Wolfenden R, Snider M J. The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts [J]. *Acc Chem Res*, 2001, **34**(12): 938-945.
- [2] 张绪美, 董元华, 王辉, 等. 中国畜禽养殖结构及其粪便 N 污染负荷特征分析[J]. *环境科学*, 2007, **28**(6): 1311-1318.
- [3] Manuel A, Jorge D. Optimizing vermicomposting of animal wastes: Effects of rate of manure application on carbon loss and microbial stabilization [J]. *J Environ Manage*, 2008, **88**(4): 1525-1529.
- [4] Naramabuye F X, Haynes R J, Modi A T. Cattle manure and grass residues as liming materials in a semi-subsistence farming system [J]. *Agr Ecosyst Environ*, 2008, **124**(1-2): 136-141.
- [5] Chi F, Chen H Z. Absorption of ethanol by steam-exploded corn stalk [J]. *Bioresource Technol*, 2009, **100**(3): 1315-1318.
- [6] Jian S, Ratna R, Sharma S, *et al*. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production [J]. *Biomass Bioenergy*, 2009, **33**(1): 88-96.
- [7] Frederick W J, Lien S J, Courchene C E, *et al*. Co-production of ethanol and cellulose fiber from Southern Pine: A technical and economic assessment [J]. *Biomass Bioenergy*, 2008, **32**(12): 1293-1302.
- [8] Enno M, Helina M, Anne M, *et al*. Electrophysiological responses from neurons of antennal taste sensilla in the polyphagous predatory ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus* to plant sugars and amino acids [J]. *J Insect Physiology*, 2008, **54**(8): 1213-1219.
- [9] 王伟东, 崔宗均, 王小芬, 等. 快速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.
- [10] Guo P, Wang X F, Zhu W B, *et al*. Degradation of corn stalk by the composite microbial system of MC1[J]. *J Environ Sci*, 2008, **20**(1): 1-6.
- [11] Tomas M T A. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage [J]. *J Sci Food Agr*, 1977, **28**: 639-644.
- [12] 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**: 5278-5280.
- [13] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, *et al*. Succession of bacterial community structure along the changjiang river determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and clone library analysis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 5142-5150.
- [14] 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.
- [15] Haruta S, Cui Z, Huang Z, *et al*. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**: 529-534.
- [16] 王伟东, 王小芬, 刘长莉, 等. 木质纤维素分解菌复合系 WSC-6 分解稻秆过程中的产物及 pH 动态[J]. *环境科学*, 2008, **29**(1): 219-224.
- [17] 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.
- [18] Atif H A, Yasmeen M I. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger* [J]. *Bioresource Technol*, 2004, **94**(3): 311-319.
- [19] Tomoyuki H, Shin H, Yoshiyuki U, *et al*. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(2): 1623-1630.
- [20] Burrell P C, Sullivan C O, Song H, *et al*. Identification, detection, and spatial resolution of *Clostridium* populations responsible for cellulose degradation in a methanogenic landfill leachate bioreactor [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(4): 2414-2419.
- [21] Yutaka N, Karthikeyan S, Makoto Murakami, *et al*. Direct conversion of cellulose to methane by anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* and defined methanogens [J]. *Biotechnol Lett*, 2000, **22**(3): 223-227.
- [22] Kato S, Haruta S, Cui Z J, *et al*. *Clostridium straminisolvans* 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.
- [23] 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.
- [24] Sushama S, Gomare J P, Jadhav S P, *et al*. Degradation of sulfonated azo dyes by the purified lignin peroxidase from *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298 [J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2008, **13**: 136-143.
- [25] 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.
- [26] 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.