

复合菌系 BYND-8 的种群组成及其对沼气产量的影响

王伟东¹, 宋亚彬^{1,2}, 王彦杰¹, 高亚梅¹, 荆瑞勇¹, 崔宗均^{3*}

(1. 黑龙江八一农垦大学生命学院, 大庆 163319; 2. 黑龙江省建三江前进农场测试中心, 佳木斯 156331; 3. 中国农业大学物质工程中心, 北京 100193)

摘要:为了明确 1 组在中温下(30℃)高效分解木质纤维素的复合菌系的菌群组成,研究复合菌系预处理秸秆对沼气发酵的影响,利用平板分离法和变性梯度凝胶电泳(DGGE)法研究了中温木质纤维素降解复合菌系 BYND-8 的菌种组成多样性,通过添加该复合系菌液到以牛粪为原料的沼气发酵体系,研究了添加秸秆降解液对沼气产量的影响. 利用平板法分离得到了 6 株细菌,它们与 *Serratia* sp. PSGB 13、*Serratia marcescens* strain UFLA-25LS、*Serratia marcescens* strain DAP33、*Alcaligenes* sp. YcX-20、*Stenotrophomonas maltophilia* strain C6 和 *Bacillus cereus* isolate BRL02-71 的相似率分别达到了 99%、100%、96%、100%、100% 和 99%. 同时利用 DGGE 方法还检测到了 1 株利用平板分离法没有获得到的细菌,它的 16S rDNA V3 区的序列与 Uncultured bacterium clone ATB-KS-1446 具有 100% 的同源性. 稻秆经复合菌系 BYND-8 预处理后应用于沼气发酵中,在发酵的前 15d 内,累积产气量达到 13 167 mL,甲烷产量达到 7 248 mL,比对照分别提高了 44.5% 和 95.3%. 复合菌系具有较高的菌种组成多样性,将复合菌系应用于沼气发酵的原料预处理过程中,可以将产气时间提前,并提高产气量.

关键词:木质纤维素降解; 中温复合菌系; 菌种组成多样性; 变性梯度胶凝胶电泳; 沼气发酵

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3301(2011)01-0253-06

Biodiversity of Mesophilic Microbial Community BYND-8 Capability of Lignocellulose Degradation and Its Effect on Biogas Production

WANG Wei-dong¹, SONG Ya-bin^{1,2}, WANG Yan-jie¹, GAO Ya-mei¹, JING Rui-yong¹, CUI Zong-jun³

(1. College of Biological Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Analysis and Testing Center of Qianjin Farm of Heilongjiang Province, Jiamusi 156331, China; 3. Center of Biomass Engineering, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: The biodiversity of a mesophilic microbial community BYND-8 capable of degrading lignocellulose at 30℃ was detected using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and the isolation of pure cultures, and the effect of the liquid of rice straw degradation by BYND-8 on biogas production was measured. Six bacterial strains were isolated using peptone cellulose solution medium, and the highest similarities of their 16S rDNA gene sequences to *Serratia* sp. PSGB 13, *S. marcescens* strain UFLA-25LS, *S. marcescens* strain DAP33, *Alcaligenes* sp. YcX-20, *Stenotrophomonas maltophilia* strain C6, *Bacillus cereus* isolate BRL02-71 were 99%, 100%, 96%, 100%, 100% and 99%, respectively. In addition, one band was detected besides six bands of cultured isolates on the DGGE gel, and it showed 100% sequence similarity to uncultured bacterium clone ATB-KS-1446. The cumulative biogas and methane productions of biogas fermentation system added with the liquid of rice straw degraded by BYND-8 were 13 167 mL and 7 248 mL, 44.5% and 95.3% higher than those of the control, respectively, in the early 15 days of fermentation. The results showed that the biodiversity of microbial community BYND-8 was very high, and the time of producing biogas was put forward and biogas production was increased with application of microbial community for rice straw pretreatment during the biogas fermentation.

Key words: lignocellulose degradation; mesophilic microbial community; bacterial diversity; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); biogas fermentation

由于能源危机、人口急剧增长、环境污染等问题正日益严重地困扰着整个世界,因而,充分利用生物资源,将其转化为新型的替代能源和各类产品是人们的迫切希望. 中国每年的秸秆产量在 6 亿 t 以上,这些农业废弃物以其可再生性、清洁性及巨大的能源储藏能力受到人类的青睐^[1]. 农作物秸秆主要由纤维素、半纤维素和木质素构成,三者所占的比例分别是 40%、20%~30% 和 20%~30%^[2]. 在天然状态下木质素、纤维素和半纤维素交织在一起,成为

木质纤维素结构,因其难于被生物分解,而被称为

收稿日期:2010-03-16;修订日期:2010-04-29

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2008BAD4B01, 2006BAD07A10, 2006BAD04A09); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA100705); 黑龙江省“十一五”科技重点攻关项目(GB06B502, GA07B501, GB08B502, JC01B509); 黑龙江省普通高等学校新世纪优秀人才培养计划项目(1153-NCET-003); 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1151G030); 博士后研究人员落户黑龙江科研启动项目(LBH-Q08027); 黑龙江省杰出青年科学基金项目(JC201002)

作者简介:王伟东(1970~),男,博士,教授,主要研究方向为生物质资源开发与利用, E-mail: wwdeyy@126.com
* 通讯联系人, E-mail: acuijz@cau.edu.cn

“混凝土结构”^[3]. 在自然界,木质纤维素的降解是由多种微生物的协同作用来完成的. Odom 和 Lewis^[4,5]等报道,将具有纤维素降解能力的菌株和不具有纤维素降解能力的菌株相互混合后两者形成了共生关系,可促进纤维素的降解. Haruta 等^[6]提出了利用复杂的微生物群体则能够更有效的降解天然纤维素材料的观点. 文献[7~10]通过限制性培养和微生物间的优化组合获得了高效分解木质纤维素的微生物复合菌系 MC1,该复合菌系在 50℃ 静止液体培养下 8 d 可把 2 g·(100 mL⁻¹) 稻草分解成糊状,其菌种组成稳定性及降解性能稳定性已得到充分的证实. 王伟东等^[10~13]从发酵的堆肥原料中筛选得到了 1 组复合系 WSC-6,该复合系在 8~10 d 可以完全分解稻草,稻草中纤维素的分解率可达到 99%,且经研究证明该复合系的功能、性质以及菌种组成均已达到稳定. 刘长莉等^[14]也选育出了一组具有稻秆分解能力的复合菌系.

以前报道的复合菌系,基本是在 50~60℃ 的高温条件下才能表现出较强的木质纤维素分解能力,高温培养与中温培养相比,培养条件要求高且能耗也高,但自然环境大部分都是中温甚至更低的温度条件. 因此,构建中温条件下分解木质纤维素能力强的复合菌系更加具有应用可行性. 本实验室已成功构建了 1 组中温木质纤维素降解复合菌系 BYND-8,并对其降解特性进行了研究^[15]. 本研究分析了复合菌系 BYND-8 的菌种组成多样性,并将复合菌系 BYND-8 应用于沼气发酵原料预处理中,以期解决秸秆在沼气发酵中存在着发酵启动慢、发酵周期长、产气量低的问题,为农业有机固体废弃物的资源化利用开辟新的途径.

1 材料与方法

1.1 复合菌系的培养条件

蛋白胨纤维素培养液 (PCS):蛋白胨 5.0 g,纤维素(经碱液浸泡的水稻秸秆) 5.0 g, NaCl 5.0 g, CaCO₃ 2.0 g,酵母浸粉 1.0 g,溶解在 1 L 蒸馏水中. 30℃ 静置培养.

1.2 复合菌系的构建过程

详见文献[15].

1.3 复合菌系中单菌株的分离

在 100 mL 三角瓶内分装 90 mL 的 PCS 培养液,接种复合菌液 10 mL,30℃ 静置培养. 培养 7 d 后,摇动三角瓶使菌液充分混合均匀,吸取 1 mL 菌液转入装有 9 mL 无菌水的试管中,然后从此管中吸

取 1 mL 加入另一盛有 9 mL 无菌水的试管中,混合均匀,以此类推直到稀释至 10⁻⁴、10⁻⁵和 10⁻⁶倍,吸取 0.1 mL 在含有 2% 葡萄糖和 1.8% 琼脂的 PCS 平板上涂布,30℃ 静置培养. 在平板中选择典型的菌落在同样的平板上划线分离纯化直至获得纯菌株. 将单菌株于 -80℃ 冰冻保存.

1.4 单菌株的 DNA 提取、16S rDNA 基因 PCR 扩增序列分析

1.4.1 单菌株 DNA 的提取

将得到的纯菌株接种于含有 0.2% 葡萄糖的 PCS 培养液中,30℃ 静置培养 7d. DNA 的提取采用氯苯法^[16].

1.4.2 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

使用引物 27F 和 907R,引物 27F 的序列为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',引物 907R 的序列为:5'-CCCCGTCAATT CCTTTGAGTTT-3'.

PCR 反应体系:反应体系为 50 μL,包括 10 × PCR Gold Buffer 5 μL,2 mmol/L dNTP mix 4 μL, primer(forward 27F 45 pmol/μL) 0.5 μL, primer revers 907R (45 pmol/μL) 0.5 μL, Ampli Tap Gold (5 unit/μL) 0.4 μL, DNA 模板 1 μL, SDW 38.6 μL.

PCR 反应程序为:94℃ 5 min;接下来如下程序 30 个循环,93℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 1.5 min;之后 93℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 5 min.

PCR 产物由上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序,测序引物为 27F 和 907R.

1.5 复合菌系的 DNA 提取、PCR 扩增及其 DGGE 条件

1.5.1 复合菌系 DNA 的提取

将 4℃ 保存的复合菌系活化一代后,采用氯苯法提取总 DNA^[15].

1.5.2 DGGE 所需的 PCR 反应

DGGE 所需的 PCR 引物:引物 357F-GC 序列 GCclampb- 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG- 3' (GC-clamp 序列为 5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGGCG GGGCGGGGACCGGGGG-3'),引物 517R 的序列为 5'-GTGCCAGC(A/C)GCCGCGG-3'.

PCR 体系:反应体系为 50 μL,包括 10 × PCR Gold Buffer 5 μL,2mmol/L dNTP mix 4 μL, primer (forward 357F 45 pmol/μL) 0.5 μL, primer (revers 517R 45 pmol/μL) 0.5 μL, Ampli Tap Gold (5 unit/μL) 0.4 μL, DNA 模板 1 μL, SDW 38.6 μL.

PCR 反应程序:94℃ 5min;接下来如下程序 30 个循环,93℃ 1 min,48℃ 1 min,72℃ 1 min;之后是

72℃ 4 min.

1.5.3 DGGE 条件

20% ~ 55% 的梯度胶,电压为 200 V,功率为 28 W,温度为61℃,时间为 5 h.

1.6 系统发育分析

根据已经分离获得单菌的 16S rDNA 序列以及从 DGGE 胶上获得的 16S V3 区域扩增序列的测序结果,通过 NCBI Blast 数据库进行同源性分析和相关信息检索,采用软件 MEGA 2 用 N J 法构建系统发育树.

1.7 复合菌系 BYND-8 在沼气发酵原料预处理中的应用

1.7.1 沼气发酵原料与接种物

发酵原料为干牛粪和稻秆,稻秆经 1% NaOH 溶液浸泡过夜,用水冲洗到中性,105℃ 条件下烘干至恒重,将稻秆剪成 2 cm 左右的小段.接种物为常温厌氧发酵沼气池发酵液.

1.7.2 实验方案

采用两项发酵工艺,即将沼气发酵过程中的原料水解酸化阶段和沼气生成阶段分开进行.用 1 L 三角瓶模拟一级发酵罐,在三角瓶内添加 PCS 培养液 720 mL,复合菌系 BYND-8 80 mL,烘干至恒重的稻秆 40 g,该组标记为处理组.以不接复合菌系 BYND-8 为对照组 (CK).30℃ 静置发酵 10 d 后,将发酵液和稻秆一同倒入二级发酵罐即沼气发酵罐中,在30℃ 条件下进行沼气发酵.用6 L广口瓶模拟二级发酵罐,二级发酵罐的基础底物为干牛粪 250 g,接种物 500 mL,自来水3 700 mL.

2 结果与分析

2.1 复合菌系的获得

经过 60 代的继代培养,目前已获得 1 组木质纤维素降解能力强且稳定的复合菌系 BYND-8,在 30℃ 条件下,接菌培养 10 ~ 12 d 后全部稻秆被分解成细丝状塌陷入液面 (图 1).

2.2 复合菌系中单菌株的分离

经平板分离纯化,获得了 6 株可以在 PCS 营养平板上生长的菌株,分别命名为 BYND-8-1 ~ 6.把平板上分离的各个菌株的 16S rDNA V3 区域 PCR 扩增产物与复合系 DNA 的 16S rDNA V3 区域 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析 (图 2).结果表明复合菌系 DNA 条带多于获得的单菌 DNA 条带,说明复合菌系中存在着利用平板分离法未能分离获得的菌株,因此将复合菌系 DNA 在 DGGE 胶中与单个菌株不同的条带从胶上切下来,经纯化和 PCR 扩增后进

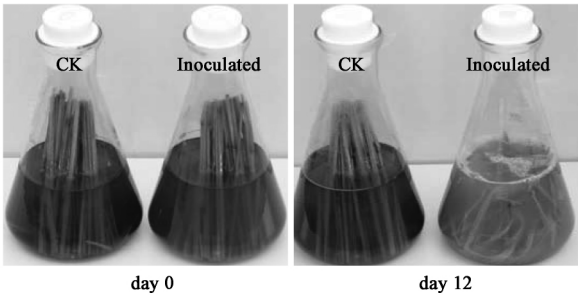
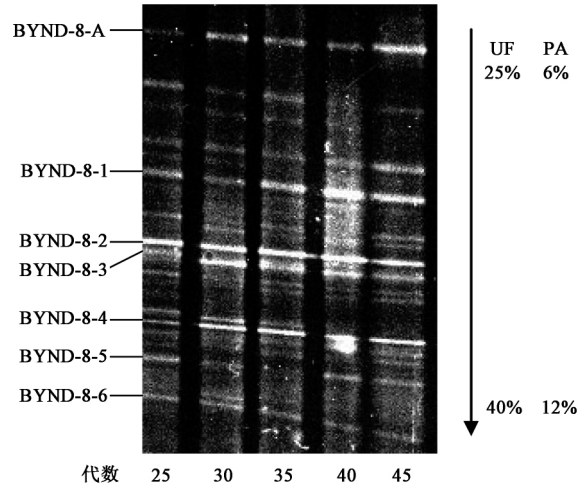


图 1 复合菌系对稻秆的分解

Fig. 1 Degradation of rice straw inoculated with BYND-8



图中 25、30、35、40、45 为复合菌系的培养代数,PCS 培养基以稻秆为碳源,添加量为 0.5%;DGGE 胶 UF 的浓度梯度为 25% ~ 40%,PA 的浓度梯度为 6% ~ 12%,图左侧标记为菌株的名称

图 2 不同代复合菌系的 16S rDNA 基因 PCR-DGGE 图谱

Fig. 2 Profile of 16S rDNA gene PCR-DGGE of five different subcultures

行测序,测序结果与 NCBI Blast 数据库进行同源性比较,检测出了一株利用平板分离法没有获得的菌株命名为 BYND-8-A.对每个菌株 16S rDNA 基因测序后与 NCBI Blast 数据库进行同源性比较,初步确定了每个菌株的分类地位,同源性比较结果见表 1,系统发育树见图 3.

2.3 复合菌系的种群组成

各菌株的 16S rDNA 基因序列相似性分析结果表明,复合菌系的组成如下.

(1)沙雷氏菌属 包括 BYND-8-1、BYND-8-3 和 BYND-8-5,3 株菌株的菌体形态、菌落特征较为相似,它们与 *Serratia* sp. PSGB 13、*S. marcescens* strain UFLA-25LS、*S. marcescens* strain DAP33 的相似性分别为 99%、100% 和 96%.三者之间相似性在 96% 左右,具体是否为同一个种,还需要进一步

表 1 复合菌系的各个菌株 16S rDNA 序列与数据库比较近缘种结果

Table 1 Seven strains from BYND-8 of DNA sequences compared with BLAST sequences

菌株	登录号	近缘种	16S rDNA 相似率/%
BYND-8-1	FJ 390136	<i>Serratia</i> sp. PSGB 13 (EF195352)	99
BYND-8-2	FJ 390137	<i>Alcaligenes</i> sp. YcX-20 (AF155147)	100
BYND-8-3	FJ 390139	<i>Serratia marcescens</i> strain UFLA-25LS (EU407551)	100
BYND-8-4	FJ 390138	<i>Bacillus cereus</i> isolate BRL02-71 (DQ339693)	99
BYND-8-5	FJ 390140	<i>Serratia marcescens</i> strain DAP33 (EU302858)	96
BYND-8-6	FJ 390141	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain C6 (AJ293468)	100
BYND-8-A	FJ 390142	Uncultured bacterium clone ATB-KS-1446 (EF686966)	100

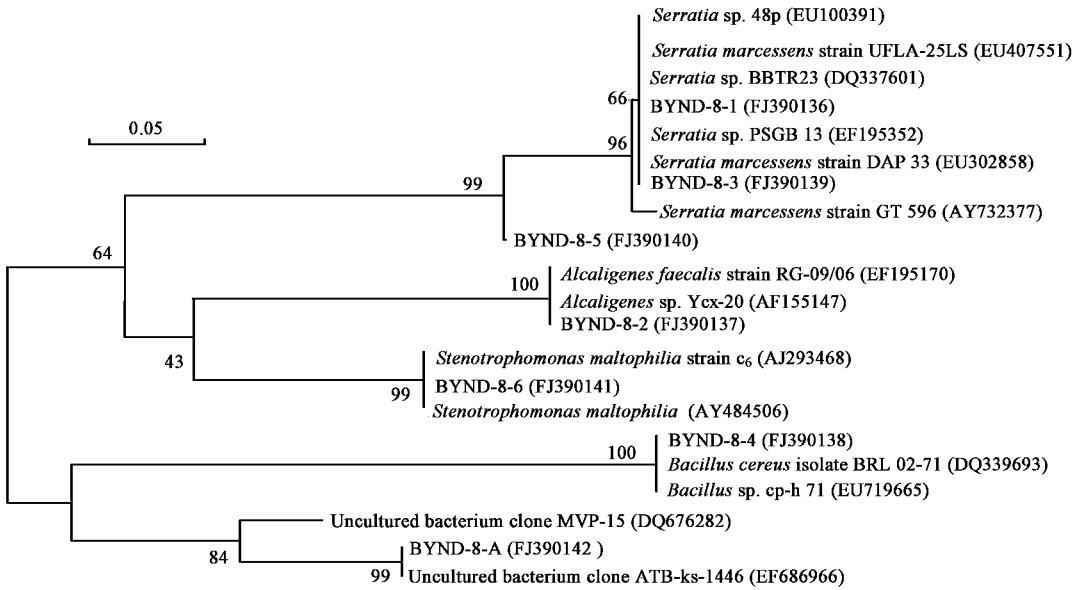


图 3 以 16S rDNA 序列为基础的复合菌系各个菌株的系统发育树状图

Fig. 3 Phylogenetics tree based on the 16S rDNA sequences of BYND-8

的信息验证。

(2)产碱杆菌属 BYND-8-2. BYND-8-2 与 *Alcaligenes* sp. YcX-20 具有 100% 的相似性。

(3)窄食单胞菌属 BYND-8-6. BYND-8-6 与 *Stenotrophomonas maltophilia* strain C6 具有 100% 的相似性。

(4)芽孢杆菌属 BYND-8-4. BYND-8-4 与 *Bacillus cereus* isolate BRL02-71 具有 99% 的相似性。

(5)未知菌属 BYND-8-A. BYND-8-A 与 Uncultured bacterium clone ATB-KS-1446 具有 100% 的相似性. 该菌株利用平板分离法没有分离获得, 目前在 NCBI 数据库内还没有关于该菌株的详细信息记载。

2.4 复合菌系对沼气产气量和产气质量的影响

2.4.1 对沼气日产气量的影响

在沼气厌氧发酵过程中, 每日定时记录沼气的日产气量, 结果如图 4 所示. 在发酵的第 6 d 处理组

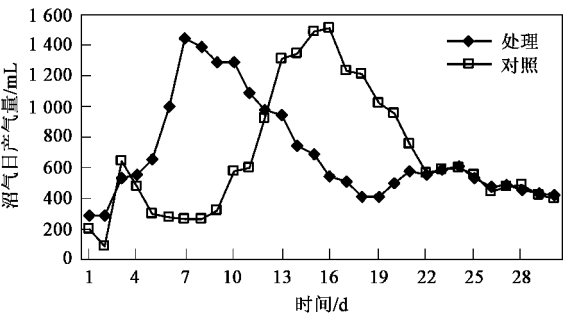


图 4 日产气量示意

Fig. 4 Daily biogas production

进入产气高峰期, 在第 7 d 出现产气量的最高峰, 日产气量可高达 1 400 mL 左右, 然后从第 7 d 开始到第 13 d 都保持很高的日产气量, 日产气量均在 1 000 mL 以上, 从发酵的第 14 d 开始日产气量显著下降. 对照组在第 13 d 进入产气高峰期, 在第 16 d 出现产气量的最高峰, 日产气量为 1 500 mL 左右, 从第 19 d

开始,日产气量则显著下降. 总体来看,在沼气发酵过程中,处理组比对照组启动快,处理组比对照组可提前 8 d 进入产气高峰期.

2.4.2 对沼气累积产气量和甲烷产量的影响

图 5 给出了沼气发酵过程中处理组和对照组累积产气量和甲烷产量. 经过 30 d 的厌氧发酵,处理组累积产气量为 20 702 mL,对照组累积产气量为 20 355 mL,二者差异不显著. 但在厌氧发酵的前 15 d 内处理组累积产气量显著高于对照组的累积产气量,在厌氧发酵进行到第 15 d 时,处理组累积产气量为 13 167 mL,对照组累积产气量为 9 110 mL,处理组比对照组累积产气量提高了 44.5%,而在发酵的后 15 d 内,对照组的沼气累积产气量比处理组提高了 49.2%.

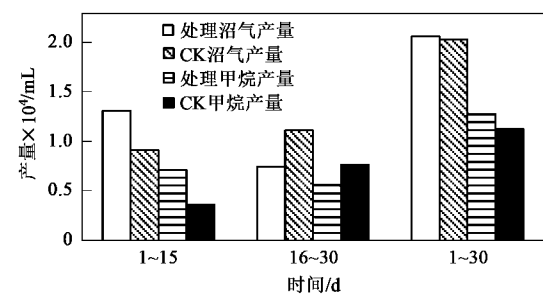


图 5 接种复合菌系对沼气产量和甲烷含量的影响
Fig.5 Total production of biogas and methane under inoculation compared with control

在发酵的前 15 d 内,处理组的甲烷产量为 7 248 mL,对照组的甲烷产量为 3 711 mL,处理组的甲烷产量比对照组提高了 95.3%,而在发酵的后 15 d 内,处理组的甲烷产量为 5 592 mL,对照组的甲烷产量为 7 697 mL,对照组的甲烷产量比处理组提高了 37.6%,但从整个发酵过程来看,即在 30 d 内,处理组的甲烷产量比对照组的甲烷产量提高了 12.6%.

3 讨论

有报道在 50℃ 高温下能够快速、高效降解秸秆的复合菌系,菌系中含有可分离培养和不可分离培养的细菌^[6, 8, 17, 18]. 本研究通过平板分离和 DGGE 分析证实,BYND-8 中包含有 6 株可平板分离培养的菌株和 1 株难于平板分离培养的菌株,既含有好氧菌如产碱杆菌属的 BYND-8-2、芽孢杆菌属的 BYND-8-4 和窄食单胞菌属的 BYND-8-6,又含有兼性厌氧菌如沙雷氏菌属的 BYND-8-1、BYND-8-3、BYND-8-5,说明该复合菌系的菌种组成具有很高的多样性,并且与高温复合菌系在菌种组成上差异较

大. 正是由于复合菌系是由多种不同类型的微生物组成的,才使得复合菌系能够协同高效分解木质纤维素,复合菌系的菌种组成多样性是与其功能相对应的. 但是在 50℃ 下高效分解木质纤维素,培养时需要投入很大的能量来维持分解所需要的温度,而中温(30 ~ 35℃)复合菌系分解却需要较少的能量投入. 因此,中温复合菌系分解木质纤维素更具有低能耗优势.

在以木质纤维素类原料的厌氧发酵的过程中,人们希望通过微生物预处理原料来提高目标产物的产量. 黄如一^[19]通过秸秆预处理产沼气对比实验证明,用复合菌剂预处理过的秸秆产气量比不加菌剂预处理的纯秸秆对照组提高 33.6% 以上,产沼气启动时间比不加菌剂预处理的纯秸秆快 4 d. Xing 等^[20]也证明在以玉米芯为原料厌氧发酵制氢时,通过微生物预处理玉米芯可以提高氢的产量. 本研究表明,稻秆经复合菌系 BYND-8 预处理后应用于沼气发酵中,在沼气发酵的前 15 d 内,处理组的累积产气量和甲烷产量均显著高于对照组,而在发酵的后 15 d 内,处理组少于对照组. 其主要原因是由于 BYND-8 在降解稻秆的过程中产生的代谢物如乙酸等是沼气发酵所需的重要前体物质,甲烷菌在发酵的初期就可得到足够的营养和沼气前体物质来生长繁殖和生产沼气,所以可加速沼气发酵的启动,使沼气产生时间提前,处理组比对照组提前 8 d 进入了产气高峰期. 因此,在实际生产应用中,使用复合菌系预处理秸秆后进行沼气发酵,可以提高产气量和产气率,提高处理效率.

4 结论

(1) 复合菌系 BYND-8 包含有 6 株可平板分离培养的菌株和 1 株难于平板分离培养的菌株,实验结果证明该复合菌系的菌种组成具有很高的多样性.

(2) 将复合菌系 BYND-8 应用于沼气发酵的秸秆原料预处理过程中,可以促进提早产气,提高产气量.

参考文献:

- [1] 杨世关,李继红,孟卓,等. 木质纤维素原料厌氧生物降解研究进展[J]. 农业工程学报,2006,22(增刊1):120-124.
- [2] Tengerdy R P, Szakacs G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation [J]. Biochemical Engineering, 2003, 13(2-3): 167-179.
- [3] Tomme P, Warren R A, Gilks N R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi [J]. Advances in Microbial Physiology,

1995, **37**(1): 1-81.

[4] Odom J M, Wall J D. Photoproduction of H₂ from cellulose by an anaerobic bacterial coculture [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, **45**: 1300-1305.

[5] Lewis S M, Montgomery L, Garleb K A, *et al.* Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment on invitro degradation of cellulosic substrates by mixed ruminal microorganisms and *Bacteroides succinogenes* S85 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, **54**: 1163-1169.

[6] Haruta S, Cui Z, Huang Z, *et al.* Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, **59**: 529-534.

[7] 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.

[8] 董玉玲,朱万斌,郭鹏,等. 一组小麦秸秆好氧分解菌系的构建及组成多样性 [J]. 环境科学, 2010,**31**(1):249-254.

[9] 朴哲,崔宗均,苏宝琳,等. 高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的酶活特性 [J]. 中国农业大学学报,2003,**8**(1):59-61.

[10] 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.

[11] 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,**25**(5):567-571.

[12] 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.

[13] 王伟东,王小芬,刘长莉,等. 木质纤维素分解菌复合系 WSC-6 分解秸秆过程中的产物及 pH 动态 [J]. 环境科学,2008,**29**(1):219-224.

[14] 刘长莉,朱万斌,郭鹏,等. 常温木质纤维素分解菌群的筛选与特性研究 [J]. 环境科学,2009,**30**(8):2458-2463.

[15] 宋亚彬,戚桂娜,邓伟,等. 中温木质纤维素降解复合菌系 BYND-8 的筛选及培养条件优化 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2008,**20**(6):62-67.

[16] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride [J]. Nucleic Acids Research, 1993, **21**: 5278-5280.

[17] 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]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, **54**: 2043-2047.

[18] Kato S, Haruta S, Cui Z J, *et al.* Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(11): 7099-7106.

[19] 黄如一,何万宁,唐和建,等. 秸秆预处理产沼气对比试验 [J]. 中国沼气,2008,**26**(4):24-26.

[20] Xing Y, Ma H C, Fan Y T, *et al.* Cellulose-hydrogen production from corn stalk biomass by anaerobic fermentation [J]. Chinese Science Bulletin, 2009, **54**(8): 1434-1444.