

## 常温秸秆还田菌群的筛选及分解稻秆特性研究

刘长莉<sup>1,2</sup>, 王小芬<sup>1</sup>, 郭鹏<sup>1</sup>, 李培培<sup>1</sup>, 沈海龙<sup>2</sup>, 崔宗均<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; <sup>2</sup> 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

**摘要:** 【目的】对一组人工构建的常温(28℃)菌群的分解能力及分解性质进行研究,以获得常温下能够分解秸秆的微生物群及人工加速秸秆还田的分解技术。【方法】以多年堆积的稻草腐烂物为菌源,用改良的 Mandels 培养基经长期富集培养和定向驯化获得一组稳定的纤维素分解菌群。以标准的纤维素酶活性测定方法对分解过程中酶的活性进行评定,利用气质联机测定分解后的挥发性产物,用变性梯度凝胶电泳(DGGE)监测分解过程中菌种动态变化。【结果】5 d 后稻秆总减重量达到 39.6%,在培养基占总体积 1/5、pH=6、培养第 5 天时纤维素内切酶(CMC)活性表现最高,达到 14 IU·mL<sup>-1</sup>;培养过程中发酵液中有 10 余种挥发性产物,且不同时期产物的种类和浓度变化很大,从 DGGE 图谱发现在培养不同时期菌种组成有很大差异,通过各条带近缘种 16s rDNA 扩增信息构建系统树可见,各条带近缘种分别归属 *Clostridium*、*Brevibacillus*、*Bartonella*、*Bacteroidetes* 4 个属。【结论】常温纤维素分解菌群能够加速稻秆分解。

**关键词:** 常温; 分解菌复合系; 木质纤维素; 酶活性; 微生物组成多样性

## Construction of A Normal Temperature Straw-rotting Microbial Community and Its Character in Degradation of Rice Straw

LIU Chang-li<sup>1,2</sup>, WANG Xiao-fen<sup>1</sup>, GUO Peng<sup>1</sup>, LI Pei-pei<sup>1</sup>, SHEN Hai-long<sup>2</sup>, CUI Zong-jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193; <sup>2</sup>College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

**Abstract:** 【Objective】In order to investigate the degradation activity, optimal condition of secreted cellulase activity and compose, the microbial community with efficient cellulose degrading ability in 28℃ was studied. 【Method】Microbial community came from rotted rice straw was enriched and directional domesticated by improved Mandels medium. The standard cellulase activity assays were used to determine cellulase activity, the fermented juice was analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) method, and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to identify the composition dynamic of the community. 【Result】The results showed that the microbial community could degrade 39.6% of rice straw gross weight within five days. When the culture medium volume was 1/5 of the whole and pH at 6 on the 5 days culture, the CMC reached the highest of 14 IU·mL<sup>-1</sup>. During the rice straw degradation, more than ten kinds of products were detected using GCMS. DGGE detected the dynamic change of microbial community composition, and the microbial composition changed greatly in different periods. The phylogenetic tree derived from 16s rDNA sequence was found that the closest relatives belong to *Clostridium* sp., *Brevibacillus* sp., *Bartonella* sp., *Bacteroidetes* sp. 【Conclusion】This microbial community could accelerate rice straw rotting.

**Key words:** normal temperature; microbial community; lignocellulose degradation; lignocellulase; microorganism diversity

## 0 引言

【研究意义】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%,且木质纤维素分子的连接键在 25℃干燥、避光下半衰期是 4.7×10<sup>6</sup>年,

收稿日期: 2009-04-06; 接受日期: 2009-07-10

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAD07A01, 2006BAD10B05-2)、教育部博士点新教师基金(20070019055)

作者简介: 刘长莉, 博士。E-mail: liuchangli08@yahoo.com.cn。通信作者崔宗均, 教授, 博士。Tel: 010-62731857; E-mail: acuijz@cau.edu.cn

自然状态下极难分解<sup>[1]</sup>, 导致中国年均  $5.5 \times 10^8$  t 的秸秆只能就地丢弃或焚烧, 不能归还土壤。大量待分解的秸秆不仅占用耕地还限制营养元素归还土壤, 而且焚烧产生的烟尘影响生态环境和人类健康。因此, 如何将秸秆变废为宝是实现环境保护和农业可持续发展的重要课题。尽管近年来, 秸秆还田作为一种农业可持续发展技术得到重视, 机收和机耕的普及使得秸秆粉碎直接还田面积越来越大, 但黑龙江省由于年均气温较低, 秸秆长时间得不到腐解, 土地质量下降显著, 影响本地区的耕地质量和作物生长。如何加速本地区秸秆腐解, 使其快速培肥土壤已成为亟待解决的重大课题。【前人研究进展】依靠人工纯培养的微生物不仅难以直接分解秸秆, 而且纯菌株存在抵抗力弱、受外界环境影响大等不足, 限制了其在实际生产中的应用。人工构建的秸秆腐熟混合微生物群<sup>[2]</sup>经长期、大量的施用能够加速秸秆的腐解, 并在一定程度上改善土壤团粒结构, 抑制土壤板结, 但秸秆分解后产物组成是什么? 其中是否存在促进土壤有机质增加的化合物? 以及哪些微生物起到关键的分解作用? 一系列问题都尚待明晰。崔宗均等成功构建了高效而稳定的秸秆分解菌菌群 MC1<sup>[3-4]</sup>, 实现了人工培养的微生物群体对木质纤维素的高效分解。牛俊玲等<sup>[5]</sup>构建出具有降解秸秆与林丹双重功能的微生物群 NSC-7, 这些菌群对天然秸秆都具有很强的分解能力, 但需要高温条件 (50℃) 才表现出较强的分解活力, 在常温状态下难以应用。【本研究切入点】本研究突破了纤维素分解菌依赖高温才具备高效分解纤维素的局限, 采用“外淘汰法”长期在室温条件下驯化菌群, 最终获得一组在室温条件下具备高效分解能力的菌群。菌群在室温条件下具备分解秸秆能力, 并且菌群组成和性状稳定为其直接应用于生产实践提供必要条件。【拟解决的关键问题】本研究通过优化纤维素酶反应条件来加强菌群高效分解纤维素的能力, 并对这组常温分解菌的分解能力和分解后的产物组成进行研究, 为今后构建更高效常温秸秆分解菌群奠定基础, 以及为该菌群应用于秸秆还田上提供必要参数与技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种来源 采自黑龙江省建三江前锋农场堆积 15 年的柴垛的垛底腐烂的秸秆和土壤样品。

1.1.2 纤维索材料 秸秆采自中国农业大学科技园, 待水稻秸秆收获后晾干, 用 1.5% NaOH 浸泡 24 h, 流

水冲洗至中性, 80℃烘至恒重, 将烘干后的秸秆切成适当的长度。

1.1.3 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, 1 L 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 5.0 g 菌源样品接种到盛有 150 mL 培养基的 500 mL 三角瓶中, 瓶内含有占培养基总量 1% 的秸秆, 瓶壁上贴 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。在驯化过程中, 发现连续几代滤纸条变黄和崩解的时间一致, 利用 DGGE 检测, 电泳图谱上条带数量和颜色深浅一致, 则停止驯化。

### 1.3 试验设置

300 mL 培养瓶内添加 60 mL 培养基和 0.6 g 处理后的秸秆, 将第 30 代菌种活化后按 5% 体积接种, 分别在第 0、2、3、4 和 5 天取样。设培养基和秸秆量相同而不接菌的作对照 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 (相当于 0.15 g 秸秆所含糖量) 的培养基中接种而不添加秸秆的作对照 2, 用于消除培养基和菌体对秸秆减重的影响。每次取样重复 3 次, 测定后续项目。

### 1.4 秸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 型毛细管柱; 柱箱升温程序: 60℃保持 2 min 后, 以 5℃·min<sup>-1</sup> 速度升至 100℃, 再以 15℃·min<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>; 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。

### 1.5 纤维素酶活性粗酶液制备

培养物经 0.22 μm 滤膜过滤。取 0.5 mL 2% 羧甲基纤维素钠溶液 (用 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸缓冲液配置), 加入 0.5 mL 稀释酶液, 添加 0.5 mL 柠檬酸缓冲液 pH=5.0, 50℃反应 30 min, 加 3.0 mL DNS, 剧烈煮沸 5.0 min, 酶活性空白样和调零样的测定步骤同上。在 540 nm 波长下比色。纤维素酶的活性测定参照国际理论与应用化学联合会 (IUPAC) 推荐的方法<sup>[6]</sup>。1 min 释放 1 μmol 葡萄糖所需酶量为一个单位 (IU)。

## 1.6 产酶条件的优化

①产酶最佳含氧量。300 mL 培养瓶内分别添加 30、60、90、120、150 mL 的培养基，按照培养基体积的 5% 接种，在第 5 天测定纤维素酶活性；②最适产酶时间。分别于第 0、2、3、4、5 和 6 天，取 300 mL 培养瓶内含 60 mL 培养液的样品进行测定；③最适产酶 pH。在初始 pH 分别为 5、6、7、8、9 的培养基内接种，在第 5 天测定纤维素酶活性。

## 1.7 测序及系统发育分析

DNA 的提取采用 Benzyl Chloride 法<sup>[7]</sup>，16s rDNA V3 区域的 RCR 扩增其引物为 357F-GC 和 517R。DGGE 操作系统采用 DCodeTM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)，制作规程参照<sup>[8-9]</sup>。聚丙烯酰胺梯度胶浓度为 6%—12%，0.5 × TAE (20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.3, 10 mmol·L<sup>-1</sup> acetic acid, 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA) 缓冲液，变性剂梯度为 25%—55% (100% 的变性剂组成为尿素 7 mol·L<sup>-1</sup>，甲酰胺 40%)，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 (无 GC-clamp) 和 517R 引物用上述方法扩增，产物用试剂盒 (Tiangen) 纯化<sup>[10]</sup>，纯化后送测序公司 (上海生工) 测序。根据 16s rDNA 序列，查询互联网数据库 BLAST (DDBJ) 进行检索，分析亲缘关系及相似性：将分离单菌株及其在 GenBank 中相近的模式菌的 16s rDNA 基因序列一并调入 Mega (version 2.1) 软件中做进化分析，使用 Clustal\_X (version 1.81) 软件包进行多序列比对，构建 Neighbor-Joining (N-J) 系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 常温秸秆还田菌群筛选

在筛选过程中，随着传代次数的增加分解速度逐渐加快。第 5—6 代复合菌系分解纤维素的速度明显加快，第 6 代在接种的第 1 天贴于瓶壁上的滤纸仅液面以上部分变得粗糙，培养液由黄色透明逐渐呈现黄褐色；到第 3 天，液面上部的滤纸全部变黄，液面下部贴近液面的滤纸变得松软多孔；第 5 天液面上、下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。在筛选的第 10 代，部分菌群的分解能力出现衰退，培养液的 pH 也不再呈正常的规律性变化<sup>[11-12]</sup>，将 pH 变化无规律的菌种淘汰，pH 呈规律性变化且分解能力强的复合菌系再继续组配，在继续

筛选过程中还发现随着转接次数的增多，菌群对滤纸崩解的时间延长，分解能力出现衰退，推断可能是由于接种过程中丢失一些菌种，或菌群分泌的某种代谢的产物积累过多所致。经半年连续的筛选和组配，获得 1 组在分解能力上保持稳定，菌种组成也基本稳定的混合菌群。

### 2.2 菌群分解能力检测

在第 38 代培养过程中，定期将接菌与未接菌处理中的秸秆烘干称重，在第 0、2、3、4、5 天接种的稻秆剩余重量分别为 0.600、0.489、0.422、0.390、0.363 g，5 d 内稻秆总减重量达到 39.6%。从图 1 曲线变化可见，稻秆旺盛分解主要集中在前 3 d，此期间秸秆总重量减少 29.6%，前 3 天减重量占 5 d 总减重量的 74.7%，说明秸秆内易利用的成分迅速被微生物分解利用，导致旺盛分解主要集中于接种前期。

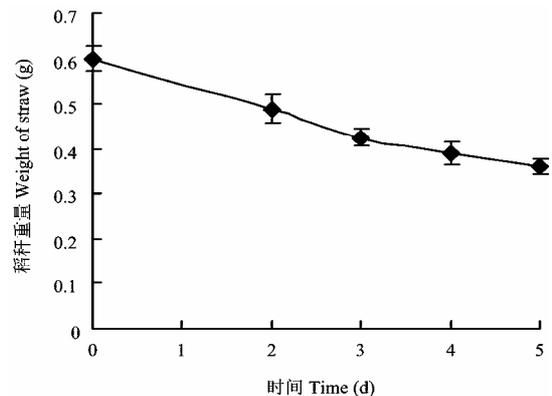
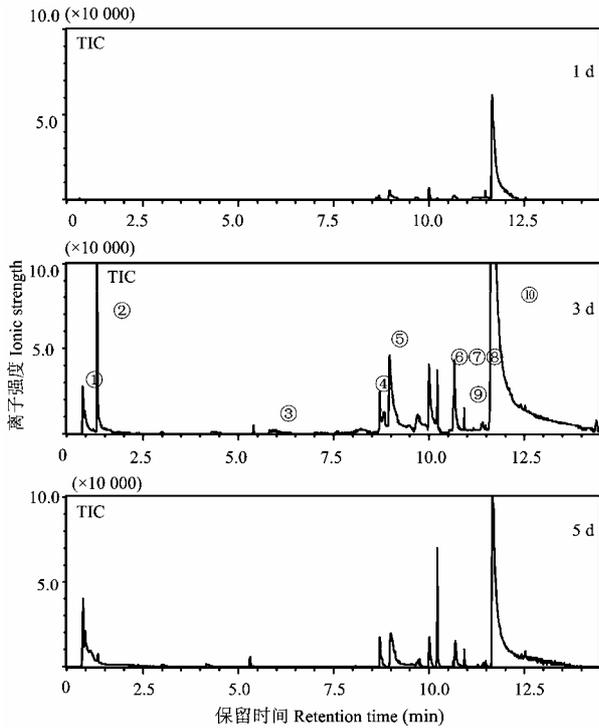


图 1 培养过程中秸秆减重和分解率动态变化

Fig. 1 Changes of rice straw gross weight and decreasing rate during degradation process

### 2.3 发酵液中挥发性产物定性分析

分别在第 1、3、5 天取发酵液的成分，用 GC-MS 测定成分，经 NIST 数据库检索结果如图 2。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 天峰的数量少、面积小，第 3 天峰的数量明显增多且同一物质的峰面积增大，而第 5 天峰数量和面积都相对减少。由此可见，秸秆由初期的致密、难溶于水状态，经菌群分解后，产物中仅挥发性的物质就有 10 种，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。将致密、难溶



①丙酸; ②乙醇; ③异丙酸; ④4-氨基-1-丁醇; ⑤丁酸; ⑥硅烷-二乙基; ⑦乳酸; ⑧乙二醇; ⑨邻苯二甲酸二乙酯; ⑩甘油  
 ①Propionic acid; ②Ethanol; ③Propionic acid 2-methyl; ④4-amino-1-butano; ⑤Butanoic acid; ⑥Silicane-diethyl; ⑦Lactic acid; ⑧Glycol; ⑨Diethyl phthalate; ⑩Glycerin

图 2 质谱定性分析挥发性产物图

Fig. 2 Qualitative analysis of volatile products by GCMS

无法利用的物质转化为可溶的、易利用的物质，并且很多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

进秸秆内各种元素的循环。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<sup>[13-15]</sup>。

2.4 菌群产酶条件的优化

文献[16-17]表明，木质纤维素分解过程中纤维素酶起到重要作用，并且在已知的各种纤维素酶中内切纤维素酶（CMC）糖化活力是最广泛采用的衡量分解能力一个重要指标。为了探寻这组常温菌群在分解木质纤维素过程中最适条件，本研究利用普遍采用评价纤维素酶活性（CMC）的内切酶检测法测定了各种条件下 CMC 的活性，为优化培养条件和今后更好的应用该常温菌群分解木质纤维素奠定理论基础。

2.4.1 最适含氧量 在 300 mL 培养瓶内分别添加 30、60、90、120、150 mL 培养基，在第 5 天测得的内切酶活性分别为 3.0、12.3、3.9、0.8、0.16 IU·mL<sup>-1</sup>，从图 3-a 不同体积培养基内对纤维素酶活性的影响差异可见，当培养基体积为 60 mL 时，纤维素酶活性最高，培养瓶内培养液体积过多或过少，即当含氧量过高或过低纤维素酶活性都显著降低，在培养基占总体积 1/5 时酶活性最高，说明这组常温纤维素菌群属于好氧菌，在氧气相对充足的条件下纤维素酶活性更高。

2.4.2 最适产酶 pH 在初始 pH 分别为 4、5、6、7、8、9 的培养基内培养 5 d，各处理的纤维素酶活性如图 3-b 所示，其活性值分别为 10.9、12.3、13.3、11.2、7.9、7.1 IU·mL<sup>-1</sup>，由纤维素酶活性水平变化可知，在酸性条件下活性较高，其中以 pH=6 活性最高，为 13.3 IU·mL<sup>-1</sup>，在碱性条件下活性明显下降。由此可见，该菌系在微酸性条件时酶的活性更强。

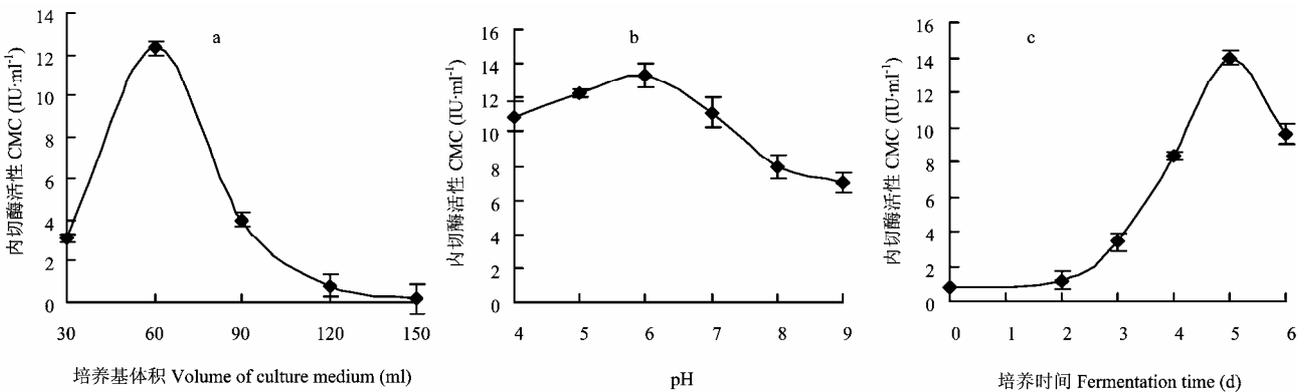


图 3 环境条件对纤维素内切酶活性的影响

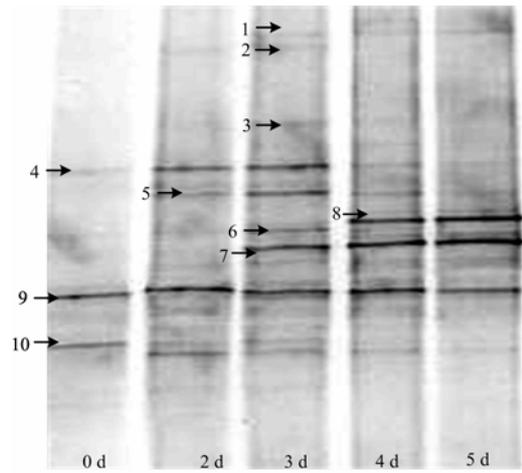
Fig. 3 Effects of different conditions of fermentation on cellulase activity

**2.4.3 最适产酶时间** 分别在第 0、2、3、4、5 和 6 天，取含 60 mL 培养基的培养瓶内的培养液进行测定，如图 3-c 所示，纤维素酶的活性呈单峰曲线，培养过程中活性分别为 0.8、1.2、3.4、8.3、14.2、9.6 IU·mL<sup>-1</sup>。在第 5 天，酶活性水平达到高峰，而从图 1 可见，复合菌系旺盛分解秸秆时间主要集中在前 3 天，可见该常温复合菌系的分解能力和酶的活性值变化趋势并不完全一致。

### 2.5 菌群的动态变化和系统发育分析

将第 38 代培养物在培养的第 0、2、3、4、5 天分别取样，并对其进行 PCR-DGGE 分析，结果如图 4 中 DGGE 图谱所示，从条带颜色深浅和动态变化可见，在不同的培养时期，菌群内菌种组成变化很大，共有 10 个较为清晰的条带，其中条带 9 一直存在，且条带自始至终颜色都浓厚如初，可见条带 9 代表的菌株是复合系的优势菌株；而条带 4、5 和 10 这 3 个条带只在前 3 天出现，而后随着培养时间的延长条带的颜色变浅且逐渐消失，说明这些菌只在培养初期占优势；而条带 1、2 和 3 仅在第 3 天隐约出现后随即消失；条带 6、7、8 在第 3 天后才出现，并且随着培养时间的延长颜色逐渐加深，在培养后期逐渐演替为优势菌。

为了进一步了解这组常温纤维素分解菌菌群的系统发育地位，将 DGGE 图谱中出现的 10 个条带进行测序，将所得序列输入 NCBI 网站将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 5。从系统树可见该常温菌系有



条带近缘种依次为 Closest relatives in turn: 1. Uncultured bacterium clone VC92(EU593800, 87%); 2. Uncultured soil bacterium (EF526237, 100%); 3. *Brevibacillus borstelensis* isolate NS 1846(EU251074, 100%); 4. Soil bacterium Siso-S3F-M1LLSSL-3 (EU515530, 98%); 5. *Bartonella rattiaustraliensis* strain AUST/NH4 (EU111749, 98%); 6. *Brevibacillus* sp. JAM-FM0201 (EU554438, 100%); 7. *Clostridium algidicarnis* (AF127023, 91%); 8. Uncultured bacterium (AF407689, 91%); 9. *Brevibacillus borstelensis* strain S3 (EF439668, 98%); 10. Marine bacterium H6 (EU183317, 88%)

图 4 复合系在培养过程中动态变化的变性梯度凝胶电泳图谱

Fig. 4 DGGE dynamic changes of microorganism of community during degradation process

丰富的菌种组成多样性，10 个条带的近缘种中除了 2 株为未可培养菌外，其余已知菌分别归属 *Clostridium* sp.、*Brevibacillus* sp.、*Bartonella* sp.、*Bacteroidetes* sp. 4 个属。

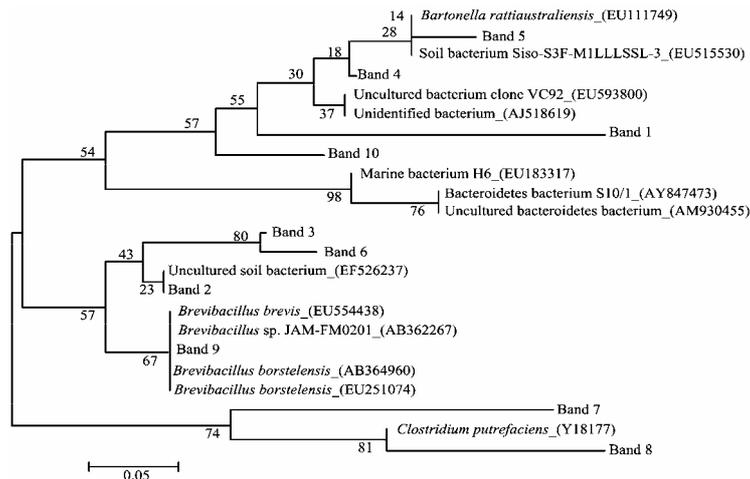


图 5 常温菌的系统发育分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of normal temperature microbial community of complete 16S rRNA gene sequences

### 3 讨论

该常温秸秆分解菌群能够在 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归还土壤的构想，为实现农业可循环发展提供物质条件。

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，抗外界的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。该菌群具有高效的分解能力很可能与菌群所含的 *Clostridium* sp. 微生物有关，*Clostridium* sp. 对木质纤维素有超强的分解能力。Kato 等<sup>[18]</sup>分离的单菌株 *Clostridium thermosuccinogenes* sp. Nov. 具有分解天然秸秆的能力。Hatsumi 等<sup>[19]</sup>分离的单菌株 *Clostridium* sp. strain NBRC101661 具有分解办公室废纸的能力。很多研究<sup>[20-21]</sup>都表明，*Clostridium* sp. 具有同时分泌多种的纤维素酶和半纤维素酶的能力。从图 4 的 DGGE 图谱可见，条带 7 与 *Clostridium* sp. 菌对应，而 *Clostridium* 通常为厌氧菌，这也说明了在这个微好氧体系中，只有在培养后期氧气供应不足的条件下条带 7 才大量生长繁殖的原因。并且该菌的存在是菌群具备高效分解木质纤维素能力的一个主要原因。另外，条带 9 的近缘种是 *Brevibacillus borstelensis* strain S3，该菌在培养过程中始终占优势。*Brevibacillus* sp. 菌株是堆肥中最常出现的一种微生物，它不仅分解自然垃圾，而且对有机染料和难分解的木质素有很好的分解作用<sup>[22]</sup>，该菌自始至终的存在，对该菌群高效分解木质纤维素也起到一定作用。

这组常温纤维素复合菌系能够在 5 d 内分解秸秆总重的 39.6%，常温复合菌系具备如此高的分解能力在国内外尚属罕见，主要是因为在该复合菌系 4 个已知属的微生物中就有 3 个对纤维素分解有重要作用，这也是复合菌系具备高效分解木质纤维素的一个主要原因。

### 4 结论

4.1 常温秸秆还田复合菌系 5 d 内分解秸秆总重量的 39.6%，且旺盛分解主要集中在分解初期。

4.2 常温秸秆还田复合菌系在培养基溶氧量 1.5—2.8 mg·L<sup>-1</sup> 的微好氧条件下纤维素内切酶活性 (CMC) 达到最高，为 13.3 IU·mL<sup>-1</sup>；pH=6 的微酸

环境 CMC 可达 14.2 IU·mL<sup>-1</sup>；在培养第 5 d 的 CMC 活性最高，可达 14.2 IU·mL<sup>-1</sup>。

4.3 利用 DGGE 监测菌种动态变化，发现不同时期菌种组成差异很大。从系统发育分析可见该常温菌系有着丰富的菌种组成多样性，已知条带近缘种分别归属 *Clostridium* sp.、*Brevibacillus* sp.、*Bartonella* sp.、*Bacteroidetes* sp. 4 个属。

### References

- [1] Wolfenden R, Snider M J. The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts. *Accounts of Chemical Research*, 2001, 34(12): 938-945.
- [2] 何永梅. 介绍几种秸秆腐熟菌剂. 农家顾问, 2007, (9): 34-35.  
He Y M. Introduce several kinds of rotting straw-rotting microbial community. *Farmhouse Counselor*, 2007(9): 34-35. (in Chinese)
- [3] 崔宗均, 李美丹, 朴哲, 黄志勇, Masaharu Ishii, Yasuo Igarash. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能. 环境科学, 2002, 23(3): 36-39.  
Cui Z J, Li M D, Piao Z, Hang Z Y, Ishii M, Igarash Y. Selection of a composite microbial system MC1 with efficient and stability cellulose degradation bacteria and its function. *Environmental Science*, 2002, 23: 36-39. (in Chinese)
- [4] 王伟东, 崔宗均, 王小芬, 牛俊玲, 刘建斌, Igarashi Yasuo. 快速纤维素分解菌复合系 MC1 对秸秆的分解能力及稳定性. 环境科学, 2005, 26(5): 156-160.  
Wang W D, Cui Z J, Wang X F, Niu J L, Liu J B, Yasuo I. Capability and stability of degrading rice straw of composite microbial system MC1. *Environmental Science*, 2005, 26(5): 156-160. (in Chinese)
- [5] 牛俊玲, 李国学, 崔宗均, 王伟东, 刘建斌. 堆肥中高效降解纤维素林丹复合菌系的构建及功能. 环境科学, 2005, 26(4): 186-190.  
Niu J L, Li G X, Cui Z J, Wang W D, Liu J B. Construction and function of a high efficient complex microbial system to degrade cellulose and lindane in compost. *Environmental Science*, 2005, 26(4): 186-190. (in Chinese)
- [6] Ghose T K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemical*, 1987, 59(2): 257-268.
- [7] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21: 5278-5280.
- [8] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu B, Uchiyama H. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and clone library analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002,

- 68: 5142-5150.
- [9] Wang X F, Haruta S, Wang P, Ishii M, Igarashi Y, Cui Z J. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 57: 106-115.
- [10] Haruta S, Cui Z, Huang Z, Li M, Ishii M, Igarashi Y. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59: 529-534.
- [11] 王伟东, 王小芬, 刘长莉, 李玉花, 吕育财, 崔宗均. 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. *环境科学*, 2008, 29(1): 219-224.
- Wang W D, Wang X F, Liu C L, Li Y H, Lü Y C, Cui Z J. Productions analyses and pH dynamics during rice straw degradation by the lignocellulose degradation bacteria system WSC-6. *Environmental Science*, 2008, 29(1): 219-224. (in Chinese)
- [12] Liu J B, Wang W D, Yang H Y, Wang X F, Gao L J, Cui Z J. The process of rice-straw degradation and dynamic trend of pH by the microbial community of MC1. *Journal of Environmental Sciences*, 2006, 18(6): 1142-1146.
- [13] Tomoyuki H, Shin H, Yoshiyuki U, Masaharu I, Yasuo I. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1623-1630.
- [14] Burrell P C, Sullivan C O, Song H, Clarke W P, Blackall L L. Identification, detection, and spatial resolution of *Clostridium* populations responsible for cellulose degradation in a methanogenic landfill leachate bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(4): 2414-2419.
- [15] Yutaka N, Karthikeyan S, Makoto M, Naomichi N. Direct conversion of cellulose to methane by anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* and defined methanogens. *Biotechnology Letters*, 2000, 22(3): 1573-6776.
- [16] Cha J H, Matsuoka S, Chan H, Yukawa H, Inui M, Doi R H. Effect of multiple copies of cohesins on cellulase and hemicellulase activities of *Clostridium cellulovorans* mini-cellulosomes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17 (11): 1782-1788.
- [17] Jonathan C, Diana I, Raphael L, Yongchao L, Henri-P F, David B W, Edward A B. Conversion of *Thermobifida fusca* free exoglucanases into cellulosomal components: comparative impact on cellulose-degrading activity. *Journal of Biotechnology*, 2008, 135: 351-357.
- [18] Kato S, Haruta S, Cui Z J, Ishii M, Yokota A, Igarashi Y. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 51: 133-142.
- [19] Hatsumi S, Hironori I, Shohei A, Naoaki K, Akiko M, Kuniaki, Teruhiko B, Kenji U. Isolation and characterization of a new *Clostridium* sp. that performs effective cellulosic waste digestion in a thermophilic methanogenic bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3702-3709.
- [20] Murashima K A, Kosugi D R H. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185: 1518-1524.
- [21] Koukiekolo R, Cho H Y, Kosugi A, Inui M, Yukawa H, Doi R H. Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 3504-3511.
- [22] Sushama S G, Jyoti P J, Sanjay P G. Degradation of sulfonated azo dyes by the purified lignin peroxidase from *Brevibacillus laterosporus* MTCC 2298. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, 13: 136-143.

(责任编辑 李云霞)