

## 4 组常温分解小麦秸秆复合菌系的比较研究

王小娟 李培培 袁旭峰 王小芬 崔宗均\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院/生物质工程中心,北京 100193)

**摘要** 为筛选常温高效产酶复合菌系,分别以枯叶土壤、牛粪、堆肥和自然腐烂的小麦秸秆为微生物源,通过“外淘汰法”筛选了4组常温分解小麦秸秆并产胞外酶的复合菌系 WSD-5、N、M 和 D。培养 15 d 后,WSD-5 分解小麦秸秆 75.6%,而 N、M 和 D 的分解率分别为 65.0%、69.4% 和 67.5%。通过各复合菌系对小麦秸秆纤维素、半纤维素和木质素成分的分解比较,可知 WSD-5 复合菌系具有明显的分解优势:相对于初始秸秆,WSD-5 复合菌系使麦秆中的纤维素、半纤维素和木质素分别减少了 94.2%、81.9% 和 21.3%。4 组复合菌系虽然均检测到纤维素酶、木聚糖酶及滤纸酶的酶活性,但以 WSD-5 复合菌系的酶活性为最高。其中滤纸酶活性最高为 1.30 U/mL,纤维素内切酶活性达 4.35 U/mL,外切酶活性达到 0.60 U/mL, $\beta$  葡萄糖苷酶活性达到 0.43 U/mL,木聚糖酶活性达到 15.16 U/mL。特异引物 PCR 结果显示,WSD-5 复合菌系由真菌和细菌共同组成。

**关键词** 木质纤维素; 微生物; 分解菌复合系; 酶活性

中图分类号 S 216.2

文章编号 1007-4333(2011)01-0024-06

文献标志码 A

## Comparison of four microbial communities with wheat straw-degradation capability at normal temperature

WANG Xiao-juan, LI Pei-pei, YUAN Xu-feng, WANG Xiao-fen, CUI Zun-jun\*

(College of Agronomy and Biotechnology/Center of Biomass Engineering,

China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** Four microbial communities named WSD-5, N, M and D, which with stable wheat straw-degradation capability, were constructed at normal temperature using the restricted cultivation technology. Compared with other three groups, WSD-5 exhibited the potential higher wheat straw-degradation ability during the process of continuous cultivation. On the 15th day, WSD-5 displayed the maximum wheat straw-degradation rate up to 75.6%, compared to N (65.0%), M (69.4%) and D (67.5%). Based on the results, up to 94.2% of cellulose, 81.9% of hemicellulose, and 21.3% of lignin could be decomposed by WSD-5. The activities of cellulase, xylanase, and filter paper were detected for all the four communities and the results demonstrated that WSD-5 showed the highest enzyme activity (filter paper activity, 1.30 U/mL; cellulose endonuclease activity, 4.35 U/mL; exonuclease, 0.60 U/mL;  $\beta$ -glucosidase activity, 0.43 U/mL; xylanase activity, 15.16 U/mL). The result of specific primer PCR showed that WSD-5 was consisted of fungi and bacteria together.

**Key words** lignocellulose; microbe; degrading community; enzyme activity

农业废弃物中的木质纤维素是自然界中最为丰富的可再生资源,也是当前利用率最低的资源,其开发和利用被认为是缓解能源和环境问题最有前景的途径之一。在目前的农业固体废弃物转化工艺研发

中,秸秆纤维素的能源转化受到了广泛关注,其大规模转化工艺的发展,不仅可以有效缓解废弃物堆积带来的环境污染问题,而且有助于解决由于能源短缺而产生的矿物燃料依赖问题<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2010-09-16

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD07A01)

第一作者: 王小娟, 博士研究生, E-mail: wangxiaojuan@cau.edu.cn

通讯作者: 崔宗均, 教授, 主要从事生物质资源利用与微生物生态研究, E-mail: acuijzj@cau.edu.cn

将纤维素转化为能源,首先需要解决的是将纤维素多糖转化为单糖,即纤维素的糖化问题。这个过程主要依赖于纤维素酶,即纤维素外切酶(EC 3.2.1.91)、纤维素内切酶(EC 3.2.1.4)和 $\beta$ -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)的协同作用<sup>[2]</sup>。目前工业化纤维素酶的获取主要来源于微生物,尤其以木霉属(*Trichoderma*)和青霉属(*Penicillium*)等胞外滤纸酶活性比较高的类群为主<sup>[3-4]</sup>,但是所应用和研发的微生物多为单菌株,存在着纤维素分解能力低、酶活性不稳定、产酶成本高和酶作用pH范围狭窄等问题。

已有研究表明,在发酵系统中将微生物共培养可以提高纤维素酶的产量<sup>[5-6]</sup>。但是,简单地将纯培养的微生物进行人工组合,对天然木质纤维素的分解效果并不理想,相应的酶产量也没有明显提高。近年来,筛选构建复合菌系对木质纤维素进行分解成为研究热点,并取得了显著的效果。笔者等突破传统的微生物纯培养技术,在不破坏自然界中微生物之间协同关系的前提下,将酸碱反应不同的菌群优化组合,筛选和驯化了高效而稳定的纤维素分解复合菌系MC1<sup>[7]</sup>。该复合菌系的分解能力远远高于纯培养的单个菌株,可有效的分解不同木质纤维素材料<sup>[8-10]</sup>。然而,MC1是50℃培养的高温细菌复合菌系,虽然明显提高了纤维素降解率,但其细菌的结构组成致使产生的胞外酶活性较低<sup>[11]</sup>。随后,本研究室通过摇床振荡培养筛选出了一组常温小麦秸秆分解复合菌系<sup>[12]</sup>,该复合菌系最高纤维素酶活性为0.17 U/mL,最高木聚糖酶活性为2.82 U/mL,但该复合系的微生物组成仍以细菌为主<sup>[13]</sup>。而自然界中降解天然木质纤维素材料的微生物主要是真菌<sup>[14]</sup>,已报道腐生营养的担子菌类是有效降解枯枝落叶的微生物,能够产生多种氧化还原酶和水解酶<sup>[15-17]</sup>。如何筛选构建含真菌的常温、高效产酶复合菌系,进而大幅度提高微生物酶活性及产酶量,成为进一步研究及成果转化的关键。

本项研究以微生物协同作用为出发点,通过不断的连续筛选,获得了4组常温高效分解木质纤维素复合菌系,进而根据其分解效率和酶活性的高低对这4组复合菌系进行了比较分析,旨在筛选并鉴定出一组高效分解、高效产酶的优势菌群。

## 1 材料与方法

### 1.1 复合菌系筛选过程

#### 1.1.1 培养条件

用于筛选的培养基为Mandels培养基,其成分为:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.4 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L, 蛋白胨 2.5 g/L, CaCO<sub>3</sub> 2.0 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0 mg/L, MnSO<sub>4</sub> 1.6 mg/L, ZnCl<sub>2</sub> 1.7 mg/L, CoCl<sub>2</sub> 1.7 mg/L, 琼脂 12.0 g/L, pH 7.0。小麦秸秆作为唯一的碳源,添加质量分数为1%。在100 mL的三角瓶中,装入40 mL的培养基,灭菌后待用。

#### 1.1.2 复合菌系筛选方法

培养基凝固后,分别接入下列菌源:枯叶土壤、牛粪、堆肥和自然腐烂的小麦秸秆。在30℃下静止培养,1周后小麦秸秆出现明显分解时,将已分解的小麦秸秆转接于新鲜培养基中,转接过程中,淘汰无分解或分解较弱的重复,保留分解能力强的重复,如此转接25~30代后,以至筛选出4组复合菌系,分别命名为WSD-5、N、M和D。

### 1.2 4组复合菌系对小麦秸秆的分解能力

用1.3 g长度为9 cm的小麦秸秆作为唯一碳源制作100 mL Mandels固体培养基,装于250 mL的三角瓶中,另配1组以葡萄糖为唯一碳源的Mandels固体培养基,葡萄糖的质量浓度为120 mg/L,分别接种培养8 d的4组复合菌系的培养物各4 g(湿重),30℃静止培养。分别在0和15 d取样,烘干称重,计算失重量,每组处理设置3次重复。培养的菌种作为对照以消除菌体的影响,不接菌的小麦秸秆培养基作为对照以消除固体培养基内部的未分解小麦秸秆的影响。

### 1.3 4组复合菌系分解小麦秸秆过程中麦秆的主要成分分析

将烘干后的秸秆残渣粉碎并过1 mm筛,称取0.5 g样品装入滤袋,每处理设3次重复,按照纤维分析仪(Model ANKOM<sup>200</sup>, ANKOM Technology, USA)操作规程测定秸秆的可溶性物质、纤维素、半纤维素、木质素以及灰分。

### 1.4 粗酶液提取

配制400 mL的固体培养基,秸秆添加量为4 g,装于1 000 mL的烧杯中。向各个烧杯中分别接种培养8 d的4组复合菌系的新鲜培养物,30℃下静止培养12 d,每天取样1次。每次取样时,定量称

取新鲜的培养物,置于研钵中,加入 15 mL 的去离子水,研碎之后转入离心管中,振荡 1 min, 8 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,得到相应复合菌系的粗酶液。

### 1.5 pH 和温度对酶活性的影响

配置 1/15 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液(pH 4.92~8.67),溶解质量分数( $\omega$ )2%的羧甲基纤维素(CMC),测定粗酶液的 CMC 酶活性,用以测试酶作用最适 pH;以最适 pH 的缓冲液溶解底物,用以测试酶作用最适温度,设定温度范围为 40~70 °C。本研究中所有的酶活性均在最适 pH 和最适温度下测定。

### 1.6 酶活性测定

本研究所测定的酶活性包括滤纸酶(总酶活)、纤维素内切酶(CMC 酶)、纤维素外切酶(微晶纤维素酶)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶(纤维二糖酶)和木聚糖酶。所使用的底物分别为滤纸条 50 mg(Whatman No. 1 滤纸,约 1 cm  $\times$  6 cm)、2%( $\omega$ )的羧甲基纤维素、2%( $\omega$ )的微晶纤维素粉、0.5%( $\omega$ )的水杨苷和 1%( $\omega$ )的燕麦木聚糖,缓冲液均为磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液(1/15 mol/L)。比较测定得知 D、WSD-5、N 和 M 4 组复合菌系缓冲液的最适 pH 分别为: 6.47、6.24、5.91 和 5.20,最适温度为 55 °C。

酶活测定采用 IUPAC 推荐的测定方法<sup>[18]</sup>,反应结束后,530 nm 处测定吸光值。分别用葡萄糖和木糖绘制标准曲线。外切酶的测定需要每 10 min 摇晃 1 次,且水浴结束后,将样品于 12 000 r/min 离心 1 min 后,再向上清液中添加 3 mL DNS 溶液<sup>[19]</sup>。在测定过程中,应将所有的样品、酶的空白对照、糖标液以及光谱调零点样品同时沸水浴。根据标线计算酶活力。1 个酶活性单位定义为 1 min 形成 1  $\mu$ mol 还原糖所需要的酶量。

### 1.7 复合菌系微生物组成初步鉴定

将复合菌系培养物移至离心管,加入 500  $\mu$ L 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0; 40 mmol/L EDTA, pH 8.0),充分振荡后, -20 °C 保存<sup>[20]</sup>。采用氯苯法<sup>[21]</sup>提取复合系总 DNA。

鉴定细菌所用的特异引物为扩增 16S rRNA 基因 V3 区的 357F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 517R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 93 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 30 个循环后, 72 °C 延伸 3 min 50 s 后,产物于 4 °C 下存

放。鉴定真菌所用的特异引物为扩增 26S rRNA 基因的 D1 区的引物 NL1 (5'-GCATATCAATAA-GCGGAGGAAAAG-3') 和 LS2 (5'-ATTCCC-AAACAACCTCGAC TC-3')<sup>[22]</sup>。反应程序为 95 °C 5 min; 95 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 共 30 个循环后, 72 °C 延伸 3 min 50 s 后,产物于 4 °C 下存放。PCR 扩增产物采用 2% ( $\omega$ )TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 秸秆残重和各复合菌系的分解率

测定复合菌系分解过程中的秸秆失重是检测微生物秸秆分解能力的重要指标。本研究中所用的小麦秸秆 0 d 的总干重为 0.88 g, 经过 15 d 的培养, WSD-5 复合菌系分解体系中小麦秸秆残重为 0.20 g, 分解率达到了 75.6%, N、M 和 D 复合菌系分解残重分别为 0.28、0.25 和 0.26 g, 失重率分别为 65.0%、69.4% 和 67.5%。且整个分解过程中, WSD-5 菌对小麦秸秆的分解率始终高于其他 3 组复合菌系(图 1), 表现出了较强的小麦秸秆分解能力。

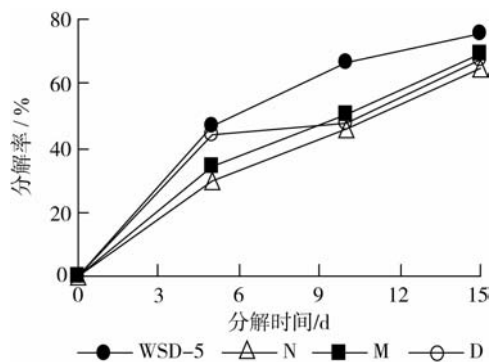


图 1 分解过程中复合菌系对小麦秸秆的分解率

Fig. 1 Degradation rates of wheat straw during decomposition process

### 2.2 秸秆残重中的主要成分

为检测各复合菌系对秸秆中各主要成分的分解能力,测定了培养的第 0 和 15 天剩余小麦秸秆中可溶性物质、纤维素、半纤维素、木质素和灰分的含量。图 2 为复合菌系分解后小麦秸秆的主要成分比较,标注 0 的柱状图为初始秸秆的主要成分,之后依次为 WSD-5、N、M 和 D 复合菌系分解麦秆第 15 天的样品成分。通过比较发现 WSD-5 复合菌系表现出

明显的优势,其分解后残留的秸秆各成分均显著少于其余 3 组复合菌系的处理;相对于初始秸秆, WSD-5 复合菌系使麦秆中的纤维素成分减少了 94.2%,而 N、M 和 D 复合菌系对麦秆的纤维素降解率分别为 87.5%、87.9% 和 86.6%;WSD-5 对半纤维素的降解率达到了 81.9%,而 N、M 和 D 仅达到了 71.7%、78.2% 和 78.6%;由此可见 WSD-5 对纤维素和半纤维素的降解能力均高于其余 3 组复合菌系。WSD-5 对木质素的降解率为 21.3%,而 N、M 和 D 分别达到了 0.1%、27.8% 和 33.3%,显然 WSD-5 对木质素的降解能力低于

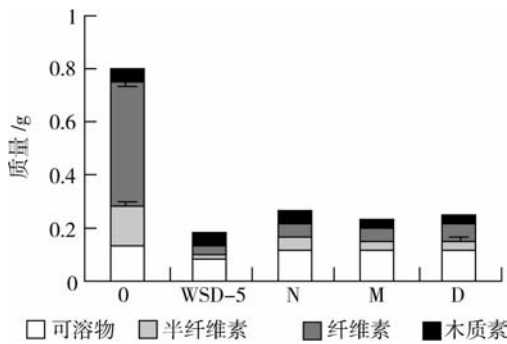


图 2 分解前后小麦秸秆主要成分分析

Fig. 2 Analyses of major components of wheat straw during decomposition process

### 2.4 纤维素酶活性动态

复合菌系分解过程中纤维素酶活性动态变化见图 4。总体上看,复合菌系分解过程中表达的纤维素内切酶活性最高(图 4(a)),纤维素外切酶次之

M 和 D 复合菌系。

### 2.3 滤纸酶活性动态

4 组复合菌系分解过程中产生的滤纸酶活性动态见图 3。各复合菌系滤纸酶活性表达的最高峰分别出现在分解的不同阶段。其中以复合菌系 WSD-5 和 N 的酶活性较高,最高峰出现在分解的第 5 天和第 4 天,达到了 1.30 和 0.97 U/mL。随后缓慢下降,到第 12 天复合菌系 WSD-5 的酶活性下降到最高值的 43.6%,而复合菌系 N 已下降到最高值的 18.2%。复合菌系 M 和 D 的滤纸酶活性相对较低,且最高峰出现在分解后期。

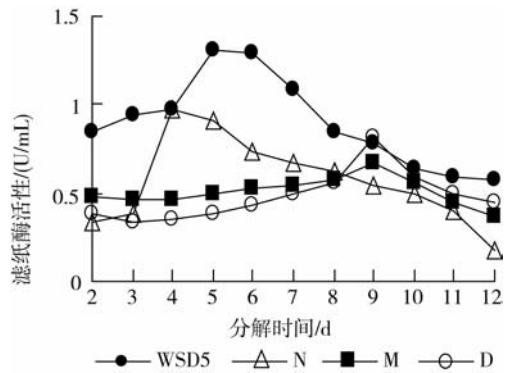


图 3 分解过程中滤纸酶活性动态

Fig. 3 Dynamics of filter paper activity during decomposition process

(图 4(b)), $\beta$ -葡萄糖苷酶活性最低(图 4(c))。

复合菌系 WSD-5 的酶活性动态变化与其他 3 组复合菌系有显著的区别,纤维素内切酶活性在第 6 d 达到最高值 4.35 U /mL,随后缓慢下降,到第

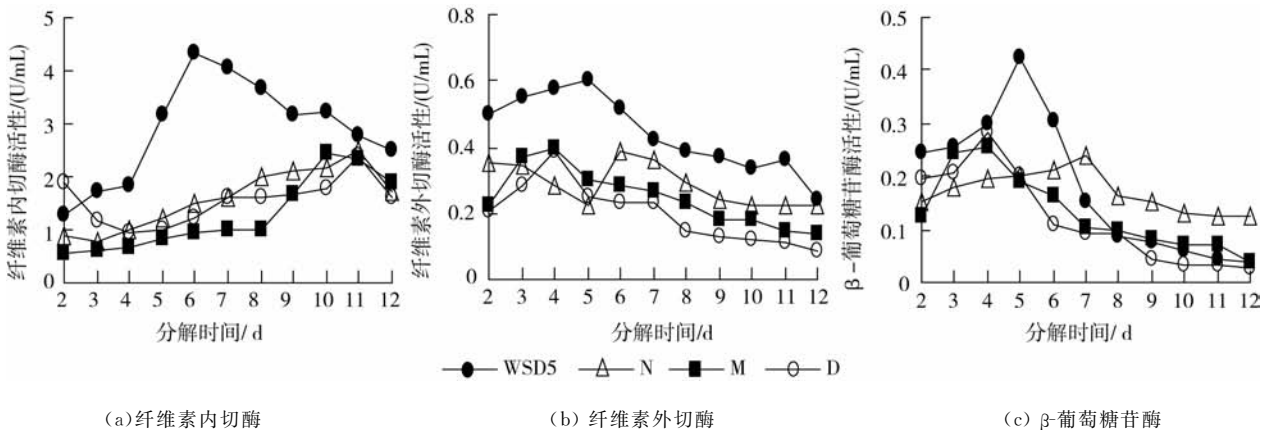


图 4 分解过程中纤维素酶活性动态

Fig. 4 Dynamics of cellulase activity during decomposition process

12天下降到最高值的57.3%，纤维素外切酶活性和β-葡萄糖苷酶活性最高峰均出现在第5天，分别达到了0.60和0.43 U/mL，到第12天下降到最高值的39.9%和8.7%。

其余3组复合菌系的动态趋势基本一致，且酶活性也波动于同一水平，纤维素内切酶活性最高峰均出现在分解后期，活性处于2.30~2.50 U/mL之间；纤维素外切酶活性最高也仅接近于0.40 U/mL；而β-葡萄糖苷酶活性最高峰则出现在分解的前期，酶活性最高值接近0.30 U/mL。

## 2.5 木聚糖酶活性动态

复合菌系分解过程中木聚糖酶活性动态如图5所示。复合菌系WSD-5酶活性显著高于其余3组复合菌系，第6天达到了15.16 U/mL，随后缓慢下降，分解末期降到了最高值的29.5%。其余3组复合菌系的木聚糖酶活性变化趋势基本一致，最高峰出现在分解的后期，酶活最高值为D复合菌系产生的10.4 U/mL。

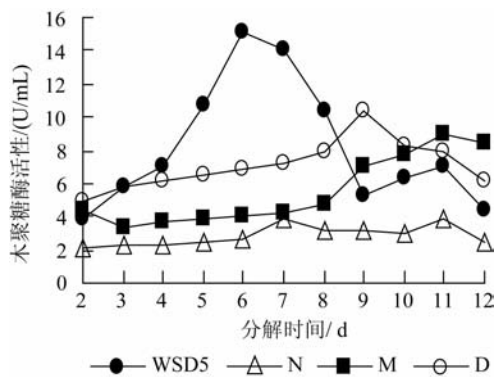


图5 分解过程中木聚糖酶活性动态

Fig. 5 Dynamics of xylanase activity during decomposition process

## 2.6 复合菌系微生物组成初步鉴定

本研究的4组复合菌系，在筛选过程中，外观上均可看出有丝状真菌菌丝体存在。综合各复合菌系的分解及酶活特性，可以明显看出，复合菌系WSD-5具有着较其他复合菌系分解及产酶上无可比拟的优势。为了进一步确定筛选的WSD-5的微生物组成，笔者对复合菌系筛选过程中的总DNA进行提取，采用特异引物PCR扩增的方式检测复合菌系微生物的组成。

复合菌系WSD-5的总DNA细菌和真菌PCR扩增图谱见图6，从琼脂糖凝胶电泳结果可以看出，

WSD-5的总DNA可以分别扩增出细菌和真菌条带，从而证明了所筛选的复合菌系WSD-5是含有真菌的复合菌系。经后序的克隆文库构建可知，WSD-5复合菌系中真菌组成中*Coprinus cinereus*占到总丰度的76.6%，*Pseudallescheria boydii*占到17.5%。

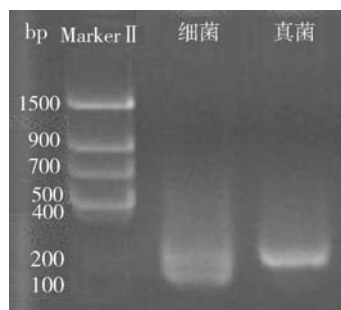


图6 复合菌系WSD-5的总DNA细菌、真菌PCR扩增图谱

Fig. 6 PCR amplified patterns of bacteria and fungi with the total DNA of WSD-5

## 3 讨论

1)外淘汰法即是在不破坏自然界中微生物之间协同关系的前提下，在一定的条件下限制培养、观察分解现象、淘汰无分解或分解较弱的重复、保留分解能力强的重复，如此经过长期连续限制性定向继代培养，直至分解能力和微生物组成保持稳定。本研究中，分别以枯叶土壤、牛粪、堆肥和自然腐烂的小麦秸秆作为不同的微生物源，通过外淘汰法最终筛选到了4组常温分解小麦秸秆的复合菌系WSD-5、N、M和D，4组复合菌系均能高效的分解木质纤维素，并同时分泌胞外酶。说明这种方法在筛选具有自然协同作用的功能群体时是非常有效的。

2)通过对分解过程中的小麦秸秆成分变化和酶活性的测定，WSD-5都表现出了较强的优势，其对秸秆中的纤维素和半纤维素成分有大幅度的分解，并于分解过程中表达出较高的滤纸酶活性、纤维素酶活性以及半纤维酶活性。WSD-5的各酶活性的最高峰均出现于分解前期，即其培养周期及产酶周期均比其余复合菌系短，从而也证明了该复合菌系具有更大的应用潜力。

3)在本研究中，WSD-5复合菌系的分解和产酶能力与其余3组复合菌系有着显著的区别，说明微生物源起了关键作用。WSD-5筛选的微生物源为

枯叶土壤,另外 3 组分别为牛粪、堆肥和自然腐烂的小麦秸秆。已有报道显示<sup>[14,23]</sup>,这些生境中存在大量的降解天然纤维素的微生物。WSD-5 的分解能力及产酶能力明显优于其他 3 组复合菌系,这可能是由于枯叶上所附带的微生物正处于分解木质纤维素材料的旺盛阶段,具有较强的分解活性的原因。而其余 3 组微生物源采样时,微生物分解木质纤维素的过程已经完成,纤维素菌的分解活性也随之下降,导致使用同样的筛选方法所得的复合菌系降解能力及产酶活性有明显的区别。

4)与现有已报道的常温小麦秸秆分解复合菌系<sup>[12-13]</sup>相比,WSD-5 分泌的胞外酶活性更高,纤维素内切酶活性高出 4.18 U/mL,木聚糖酶活性高出 12.34 U/mL。且 WSD-5 同时分泌有滤纸酶、纤维素外切酶及  $\beta$ -葡萄糖苷酶,说明 WSD-5 具有完整的酶系统,这与 WSD-5 由细菌和真菌共同组成密切相关。对于 WSD-5 具体的细菌及真菌菌种组成以及它们之间的代谢关系如何,还需要做进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Adsul M G, Bastawde K B, Varma A J, et al. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production[J]. *Bioresour Technol*,2007,98: 1467-1473
- [2] Bayer E A, Lamed R, Himmel M E. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management[J]. *Environ Biotechnol*,2007,18:237-245
- [3] Mandel M, Sternberg U. Recent advances in cellulose technology[J]. *J Ferment Technol*,1976,54(4):267-286
- [4] Takao S, Kamagata Y, Sasaki H. Cellulase production by *Penicillium purpurogenum* [J]. *J Ferment Technol*,1985,63(2):127-134
- [5] Brijwani K, Oberoi H S, Vadlani P V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran [J]. *Process Biochem*,2010,45(1):120-128
- [6] Kumar R, Singh S, Singh O V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*,2008,35:377-391
- [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] Haruta S, Cui Z J, Huang Z Y, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*,2002,59:529-534
- [9] 郭鹏,王小芬,朱万斌,等. 纤维素分解菌复合系 MC1 分解木薯淀粉厂残渣[J]. *环境科学*,2008,29(3):795-798
- [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*,2008,20:109-114
- [11] 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):59-66
- [12] 董玉玲,朱万斌,郭鹏,等. 一组小麦秸秆好氧分解菌复合系的酶学特性研究[J]. *中国农业大学学报*,2010,15(1):1-6
- [13] 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
- [14] Hättenschwiler S, Tiunov A V, Scheu S. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems[J]. *Annual Reviews of Ecology*,2005,36:191-218
- [15] Colpaert J V, van Laere A. A comparison of the extracellular enzyme activities of two ectomycorrhizal and a leaf-saprotrophic basidiomycete colonizing beech leaf litter[J]. *New Phytologist*,1996,134:133-141
- [16] Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) [J]. *Enzyme and Microbial Technology*,2002,30:454-466
- [17] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties [J]. *FEMS Microbiology Reviews*,2006,30:215-242
- [18] Ghose T K. Measurement of cellulase activities [J]. *Pure Appl Chem*,1987,59(2):257-268
- [19] Beukes N, Pletschke B I. Effect of sulfur-containing compounds on *Bacillus cellulosome*-associated 'CMCase' and 'Avicelase' activities [J]. *FEMS Microbiol Lett*,2006,264:226-231
- [20] Wang X F, Shin H, Wang P, et al. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage [J]. *FEMS Microbiology Ecology*,2006,57:106-115
- [21] 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
- [22] Flórez A B, Mayo B. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE [J]. *Int J Food Microbiol*,2006,110:165-171
- [23] 王伟东,刘建斌,牛俊玲,等. 堆肥化过程中微生物群落的动态及接菌剂的应用效果 [J]. *农业工程学报*,2006,22(4):148-152

(生物质研究专栏论文 4, 责任编辑: 袁文业)