

高效纤维素降解菌系的构建

李平, 王焰新, 刘琨, 王艳红, 童蕾

中国地质大学环境学院, 生物地质与环境地质教育部重点实验室, 湖北武汉 430074

摘要: 筛选出能产生不同纤维素酶的10株纤维素降解菌, 系统地分析了各菌株的EG、CBH和BG酶等3类纤维素酶活。经各菌株优化组合、混合培养, 构建了一组由5株细菌(LCB03、LCB12、LCB52、LCD12和LCD51)组成、能协同作用的复合微生物菌系。经生理生化 and 分子水平鉴定, 这5株细菌分别为 *Pseudomonas citronellolis* (香茅醇假单胞菌)、*Stenotrophomonas maltophilia* (嗜麦芽寡食单胞菌)、*Pseudomonas aeruginosa* (铜绿假单胞菌)、*Pseudomonas aeruginosa* (铜绿假单胞菌) 和 *Flavobacterium mizutaii* (水氏黄杆菌)。复合菌系的各菌株可产生不同类型的纤维素酶, 且各类酶可以协同作用有效分解天然纤维素, 在纤维素类污染的治理与资源化利用中具有很好的应用前景。

关键词: 纤维素降解; 复合菌系; 构建; 鉴定。

中图分类号: X17

文章编号: 1000-2383(2009)03-0533-06

收稿日期: 2009-01-12

Construction of A Microbial System for Efficient Degradation of Cellulose

LI Ping, WANG Yan-xin, LIU Kun, WANG Yan-hong, TONG Lei

School of Environmental Studies, MOE Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China

Abstract: Endoglucanase, exoglucanase and cellobiase activities of ten cellulose degradation isolates from piggery sludge and manure were analyzed. A complex microbial system was constructed by five bacteria named as LCB03, LCB12, LCB52, LCD12 and LCD51 respectively with different cellobiase activities from these isolates. Tested from the perspective of physiology and microchemistry as well as molecular level, these five bacteria were identified as *Pseudomonas citronellolis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Flavobacterium mizutaii*, respectively. So far, there are few papers on cellulose degradation using *S. maltophilia* and *F. mizutaii*. Each of the five bacteria could produce different types of cellobiase that co-catalyze degrading natural cellulose effectively, and the microbial system therefore has great potential in cellulose-related pollution control and waste utilization.

Key words: cellulose biodegradation; complex microbial system; construction; identification.

纤维素是自然界中最丰富的碳水化合物, 是一类可再生的重要资源和能源。纤维素不溶于水, 在环境中结构稳定、难降解, 并广泛存在于农作物秸秆、城市固体废物、畜禽养殖废弃物和造纸废水中, 是难降解污染物之一 (Georgakakis and Krintas, 2000; 陈子爱 and 邓小晨, 2006; Angela *et al.*, 2008)。目前, 从环境中分离和选育纤维素酶高产菌株, 挖掘纤维素酶产生菌的资源, 利用微生物的酶解作用, 解决环境污染问题, 甚至转化为能源已成为国内外研究热点之一。

纤维素是大分子的聚集, 由结晶区和无定形区交错而成 (Petersson *et al.*, 2007)。将天然纤维素分解, 必须依靠内切型葡聚糖酶、外切性葡聚糖酶和纤维二糖酶3种酶协同作用才能完成 (李燕红 and 赵辅昆, 2005)。虽然在前人的研究中, 已有大量关于纤维素降解菌的报道 (卢月霞等, 2007; 顿宝庆等, 2008), 但所筛选的菌株往往产酶类型单一, 很难彻底分解天然纤维素。因此, 在自然状态下彻底降解纤维素, 要充分重视多种微生物之间的协同效应 (Haruta *et al.*, 2002)。而目前在构建复合菌系, 各菌株

协同作用降解天然纤维素方面的研究却鲜有报道。本文目的在于筛选构建能产生多种纤维素酶的高效纤维素降解菌系,分析该菌系的各类纤维素酶活及其降解天然纤维素的能力,并对该菌系进行生理生化以及分子水平的鉴定。

1 实验材料及方法

1.1 主要实验仪器

紫外分光光度计(T61,中国),智能生化培养箱(PHX,中国),PCR仪(Gradient S,德国 Eppendorf),凝胶成像系统(EC3,美国 UVP),电泳槽(DYCP-33A,中国),电泳仪(美国 Bio-rad)。

1.2 实验材料和主要试剂

1.2.1 样品来源 湖北省鄂州市郊某畜禽养殖场排污口沉积底泥和该养殖场畜禽粪便。

1.2.2 培养基 筛选培养基(g/L): Na_2HPO_4 3.0, NH_4NO_3 0.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, CaCl_2 0.1, CMC-Na 2.0, 微晶纤维素粉 1.0, 滤纸 2.0, 稻草 2.0, pH 值 7.0~7.2。

产酶培养基(g/L): Na_2HPO_4 3.0, NH_4NO_3 0.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCl_2 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, ZnSO_4 0.01, CMC-Na 10.0(或微晶纤维素粉 5.0 或纤维二糖 5.0), 蛋白胨 1.0, 酵母提取物 0.5, pH 值 7.0~7.2。

LB(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15(固), pH 值为 7.0。

天然纤维素降解培养基(g/L): Na_2HPO_4 3.0, NH_4NO_3 0.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCl_2 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01, ZnSO_4 0.01, 蛋白胨 1.0, 酵母提取物 0.5, 稻草 2.0。稻草在加入前经沸水煮 10 min, 以去除稻草中的可溶性物质, 灭菌后烘干备用。

1.2.3 主要试剂 微量生化鉴定管购自杭州微生物试剂厂, DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自美国 Promega 公司, *Taq*、dNTP、DNA Marker、*Rnase* 酶均购自日本 Takara 公司。

1.2.4 实验方法 (1) 纤维素降解菌的筛选。称取 1 g 样品, 用 20 mL 无菌水水洗, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再加 20 mL 水, 重悬土样。重复操作 3 次; 将样品转入装有 100 mL 筛选培养基的 500 mL 锥形瓶中, 30 ℃ 恒温静置培养至培养基浑浊。取 5 mL 菌悬液于装 100 mL 新鲜筛选培养基的

500 mL 锥形瓶中培养一周。重复操作 5~6 次, 将最后得到的菌悬液中取 20 μL 于 LB 平板上涂布。置 30 ℃ 下恒温培养 1~3 d, 挑取长势良好、菌落形态各不相同的菌落, 经多次纯化后保种备用。

(2) 刚果红染色鉴定法。将待鉴定的菌落经前期培养后, 点种到筛选培养基平板上, 30 ℃ 恒温培养 2~4 d, 往培养皿中加入适量 1 mg/mL 的刚果红溶液, 染色 1 h, 弃去染液, 加入适量 1 mol/L 的 NaCl 溶液, 洗涤 1 h。若细菌产生纤维素酶, 则在菌落的周围会出现清晰的透明圈, 依据透明圈的直径大小选择产酶菌株。

(3) 纤维素酶活分析。将筛选的菌种前培养物接种到产酶培养基中, 于 30 ℃、120 r/min 培养 1~2 d, 取样测定各菌株的纤维素酶活力。内切型葡聚糖酶、外切型葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶活力测定以及计算方法按照国际理论应用化学协会(IUPAC)推荐的国际标准方法, 以每 mL 粗酶液每分钟产生 1 μmol 葡萄糖为一个国际单位, 计 IU/mL(Ghose, 1987)。

(4) 细菌鉴定。细菌生理生化特性的鉴定参考《常见细菌系统鉴定手册》(东秀株和蔡妙英, 2001), 细菌基因组 DNA 的提取、PCR 产物的纯化参考 Li *et al.* (2006), 细菌 16S rDNA 片段的扩增、引物参照 Weisburg *et al.* (1991) 合成, 为 P1: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'; P2: 5' GGT-TACCTTGTTACGACTT3'。反应体系为: 在 50 μL 反应体积中, 加入 5 μL 10 $\times$ PCR 缓冲液, 7 μL MgCl_2 (终浓度为 3.5 mM), 1 μL 模板 DNA (<0.1 μg), 0.5 μL P1 和 P2 (终浓度为 0.5 μM), 1 μL dNTP (每种 NTP 2.5 mM), 0.5 μL 和 *Taq* 酶 (1.25 U)。PCR 扩增条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 ℃ 终延伸 10 min。细菌系统进化树的构建采用软件 MEGA 4.0, 进化树的算法采用 Neighbor-joining 法, 进化树评估采用 Bootstrapping 法。

2 结果

2.1 刚果红平板初筛

纤维素分解菌能分泌纤维素酶而将平板培养基中的纤维素降解成小分子的低聚糖、纤维二糖和葡萄糖等, 在纤维素刚果红培养基上, 纤维素分解菌的菌落周围均能形成清晰的水解圈, 且水解圈的大小同酶活性的高低有一定的数量关系, 透明圈与菌落直径比

表 1 刚果红鉴别培养基透明圈直径(mm)
Table 1 Degrading capability identification by Congo

菌株	LCB01	LCB03	LCB12	LCB51	LCB52	LCB61	LCD12	LCD41	LCD51	LCD61
透明圈直径	12	8	16	7	18	10	25	15	10	16
菌落直径	3	2	3	3	3	2	4	3	2	3

值大致反映纤维素内切酶活力的高低. 产酶越多,透明圈越大;产酶越快,透明圈出现的越快. 样品经分离纯化共得到 36 株细菌菌株. 菌株培养 2 d 后,经刚果红染色,其中有 10 株菌的透明圈较大,它们在刚果红初筛平板上的菌落直径和透明圈直径见表 1.

刚果红纤维素平板透明圈筛选法虽直接快速,但仅以水解圈大小作为菌株产纤维素酶活力大小的唯一定量指标并不可靠. 因此,需要将这 10 株细菌进一步实验,分析各菌株纤维素酶系特点.

2.2 各菌株纤维素酶系分析

纤维素是一种直链聚合物多糖. 将天然纤维素水解成葡萄糖,必须依靠内切型葡聚糖酶(endo-1,4-β-D-glucanase,EC3. 2. 1. 4,简称 EG,Cx 酶)、外切型葡聚糖酶(exo-1,4-β-D-glucanase,EC3. 2. 1. 91,简称 CBH,C1 酶)和纤维二糖酶 3 种酶(β-glucanase,EC3. 2. 1. 21,简称 BG 酶)协同作用才能完成. EG 酶作用于纤维素分子内部的非结晶区,随机水解 β-1,4 糖苷键,将长链纤维素分子截短,产生大量具有非还原性末端的小分子纤维素,为 CBH 提供新的作用区. CBH 酶作用于纤维素分子末端,水解 β-1,4 糖苷键,每次切下一个纤维二糖分子,生成可溶的纤维糊精和纤维二糖(李燕红和赵辅昆,2005; Zhang *et al.* , 2006). BG 酶作用于纤维二糖生成葡萄糖,虽然它对纤维素无作用,但它可以消除上述两种酶催化反应转化出的中间产物对反应的抑制作用,从而加快反应速度(Bahia and Ali, 2006). 因此,需要全面系统地分析菌株各种纤维素酶活,找出各类纤维素酶活的优化组合,为筛选高效天然纤维素降解菌系提供依据.

各菌株 EG、CBH、BG 酶活见图 1. 10 株细菌的酶活菌在 7.0~16.0 IU/mL 之间,其中菌株 LCB12 和 LCD51 的 EG 酶活最高,分别达到 15.98 IU/mL 和 15.40 IU/mL,高于魏桃员等(2004)、顿宝庆等(2008)报道的酶活. 各菌株的 CBH 酶活介于 EG 酶和 BG 酶之间,为 2~9 IU/mL,其中菌株 LCB03 和 LCD12 酶活最高,分别达到 8.53 IU/mL 和 10.60 IU/mL. 各菌株的 BG 酶活与 EG 酶和 CBH 酶相比较小,在 1~3 IU/mL 之间,其中菌株 LCB12

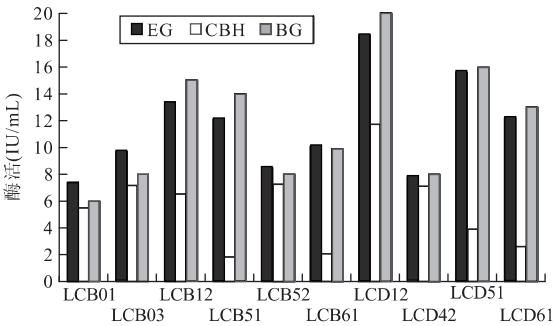


图 1 各菌株的 3 种纤维素酶活

Fig. 1 Endoglucanase, exoglucanase and cellobiase activities of the ten isolates

和 LCD51 酶活最高,分别达到 2.68 IU/mL 和 1.74 IU/mL. 从各菌株的 3 种纤维素酶活比较结果来看,不同菌株的同一种酶活各不相同,而同一菌株的 3 种纤维素酶活也存在较大差异. 如菌株 LCD51,EG 酶活在各菌株最高,但其 CBH 酶活却相对较低. 而彻底降解天然纤维素需要 3 种酶的协同作用. 这也是单一菌株通常降解天然纤维素效率较低的主要原因. 因此,在实际应用中,提高菌株降解天然纤维素的能力,必须充分重视多种微生物之间的协同效应.

2.3 菌株混合培养结果分析

从上述 10 株细菌中选出各酶活较高的 5 株细菌,分别是 LCB03、LCB12、LCB52、LCD12 和 LCD51. 将这 5 株混合培养,两两混合点种于 LB 平板上,定期观察菌种的生长情况. 实验中未发现菌落因生长缓慢而被其他菌落覆盖的现象,或菌落间互相接触时即被限制的现象. 具体生长情况见表 2. 结果表明,各菌种混合后可以共存,不相互拮抗. 根据生态位的理论,不同菌株能够在一起共存,是因为它们之间通过协同作用出现了生态位的分离,不存在生态位的重叠,从而避免了种群间激烈的竞争(任南琪和马放,2002),各菌株之间的相容性为各菌株组合协同作用降解天然纤维素提供了基础.

2.4 复合菌系降解天然纤维能力测定

将上述 5 株菌株经过夜培养后的菌悬液,以体积比 1:1 混合,将混合菌液接种到天然纤维素培养

表 2 平板混合培养情况

Table 2 Growth of bacteria on mixed culture plates

混合接种	生长情况	混合接种	生长情况
LCB03+ LCB12	++	LCB12+ LCD12	+
LCB03+ LCB52	++	LCB12+ LCD51	+
LCB03+ LCD12	++	LCB52+ LCD51	++
LCB03+ LCD51	+	LCB52+ LCD12	++
LCB12+ LCB52	+	LCD12+ LCD51	+

注：“+”指各菌落延展性不强，但可以保持自身形态，生长良好，相邻菌落也正常生长；“++”指 2 种菌均有很好扩展性，各自菌落生长迅速，且菌落边界比较模糊。

基中连续培养一周，定期检测各酶活(图 2)。从图 2 可以看出，复合菌系降解稻草过程中，各酶活均呈现先增高、后降低的趋势。其中 EG、CBH、BG 酶活分别在第 4、2、3 天达到最高，分别为 3.15、1.12 和 0.55 IU/mL。复合菌系降解天然稻草的 EG 酶活优于曾青兰(2008)报道的菌株 g76 降解天然稻草的 EG 酶活(1.72 IU/mL)。

稻草失重检测结果显示，接种复合菌系的稻草失重为空白对照的 1.6 倍，为 0.36 g。

2.5 细菌鉴定

5 株细菌的形态和主要生理生化特征分别见表 3。5 株细菌的生理特征大部分相似，如均为直杆菌，均无芽孢，革兰氏染色均为阴性，最适生长温度以及 pH 值相似。不同的是细菌 LCB52 和 LCD12 均为单极生鞭毛，而细菌 LCB03、LCB12 和 LCD51 为周生鞭毛；LCD51 不运动，其余 4 株细菌运动。5 株细菌的生化特征存在一定差别。它们均能利用葡萄糖、果糖和纤维二糖，不能利用碳酸盐、氧化乙醇产酸。而在利用麦芽糖、淀粉水解、硝酸盐还原、产色素、氧化

表 3 五株细菌主要的生理生化特征

Table 3 Main physiological and biochemical characteristics of five isolates

特征	LCB03	LCB12	LCB52	LCD12	LCD51
葡萄糖	+	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+	+
淀粉	+	+	—	—	—
纤维二糖	+	+	+	+	+
麦芽糖	—	+	—	—	+
明胶水解	+	+	+	+	—
Na ₂ CO ₃	—	—	—	—	—
NO ₃ ⁻ 还原	+	+	+	+	—
色素	—	—	脓青素	脓青素	黄色素
氧化酶	+	—	+	+	—
接触酶	+	—	+	+	—
氧化乙醇产酸	—	—	—	—	—
脂酶	+	+	+	+	—
鞭毛	>1	>1	1	1	>1
革兰氏染色	—	—	—	—	—
细胞形状	直杆	直杆	直杆	直杆	直杆
运动性	运动	运动	运动	运动	不运动
4℃生长	+	+	—	—	+
41℃生长	+	—	+	+	—
60℃生长	—	—	—	—	—

注：“+”为阳性；“—”为阴性。

酶、接触酶和脂酶等方面不同。

采用对 16S rRNA 序列测定和分析的方法对细菌进行分子水平的鉴定。PCR 扩增得到长度为 1 432、1 445、1 446、1 429 和 1 428 bp 的扩增带(图 3)。将菌株 LCB03、LCB12、LCB52、LCD12 和 LCD51 的 16S rDNA 序列提交国际 GenBank 登记，序列号分别是：FJ194516、FJ194517、FJ194518、FJ194519 和 FJ194520。5 株细菌的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 数据库中的序列分别进行同源性比较发现，细菌 LCB03 与 *Pseudomonas citronello-*

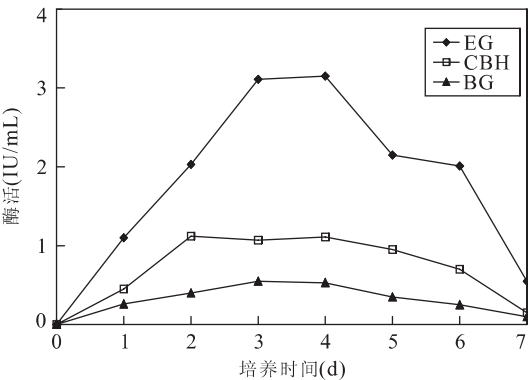


图 2 复合菌系降解天然纤维素稻草的各种酶活

Fig. 2 Endoglucanase, exoglucanase and cellobiase activities of degrading natural cellulose by composite microbial system

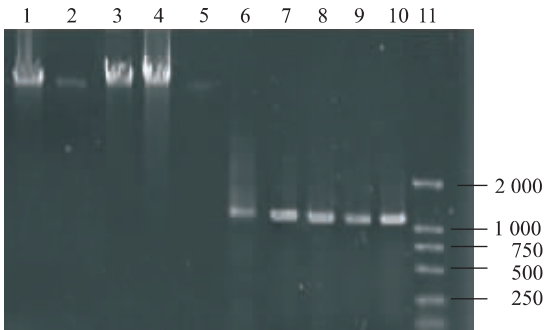


图 3 5 株细菌 16S rDNA 的 PCR 产物琼脂糖电泳

Fig. 3 Amplification of 16S rDNA from five isolates by PCR

1、2、3、4、5 分别为菌株 LCB03、LCB12、LCB52、LCD12 和 LCD51 的基因组 DNA；6、7、8、9、10 分别为菌株 LCB03、LCB12、LCB52、LCD12 和 LCD51 的 16S rDNA PCR 产物；11 为 DNA Marker

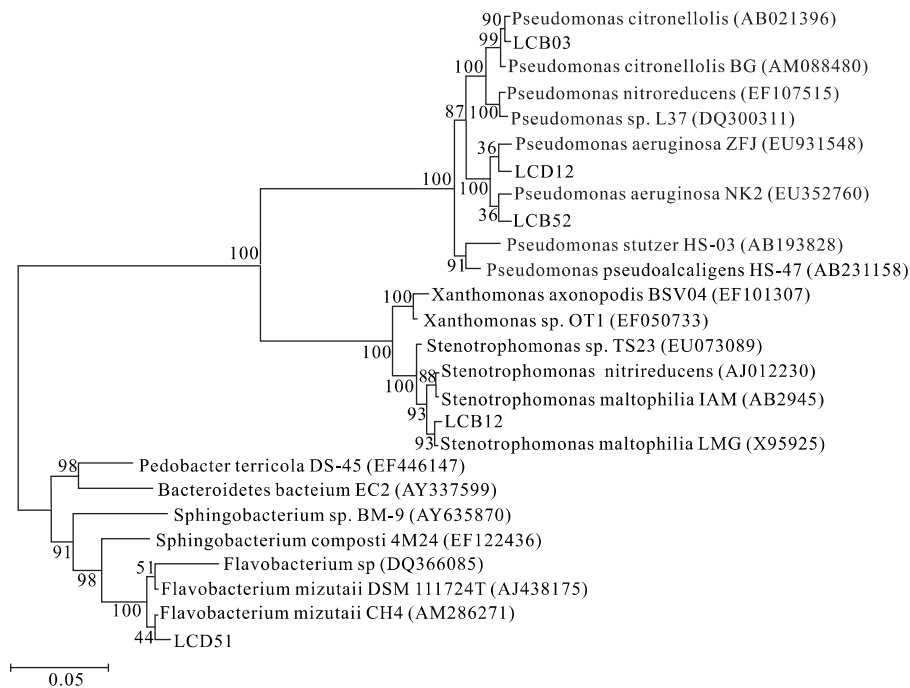


图 4 菌株 LCB03、LCB12、LCB52、LCD12 和 LCD51 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree generated from an alignment of the 16S rDNA of strain LCB03, LCB12, LCB52, LCD12 and LCD51

lis (香茅醇假单胞菌)、LCB12 与 *Stenotrophomonas maltophilia* (嗜麦芽窄食单胞菌)、LCB52 与 *Pseudomonas aeruginosa* (铜绿假单胞菌)、LCD12 与 *Pseudomonas aeruginosa* (铜绿假单胞菌)、LCD51 与 *Flavobacterium mizutaii* (水氏黄杆菌) 的多个菌株同源性达到 98%~99%。将 5 株细菌的序列 16S rDNA 在网上 BLAST 比较分析后, 选取与该细菌同属和不同属的一些代表菌株的 16S rDNA 序列, 并用 Clustal W 和 MEGA4.0 软件构建系统发育树 (图 4)。从图中可以看出, LCD12、LCB52 和 LCB03 三株细菌之间有较近的亲缘关系, LCB12 与这 3 株细菌的亲缘关系相对于 LCD51 与这 3 株细菌更近。这与它们在形态特征、生理生化特征上的差异以及同源性比较的结果相一致。

综合上述生理生化鉴定以及分子鉴定结果, 对照《细菌鉴定手册》, 菌株 LCB03、LCB12、LCB52、LCD12 和 LCD51 被分别鉴定为 *P. citronellolis* (香茅醇假单胞菌)、*S. maltophilia* (嗜麦芽窄食单胞菌)、*P. aeruginosa* (铜绿假单胞菌)、*P. aeruginosa* (铜绿假单胞菌) 和 *F. mizutaii* (水氏黄杆菌)。

3 讨论

地球上每年光合作用产生大于 100 亿吨的植物

干物质, 其中一半以上是纤维素和半纤维素。纤维素是数量最大的一类环境污染物。自然界中有机固体废弃物一半以上的成分是纤维素和半纤维素。纤维素也是畜禽养殖废水、造纸废水 SS 和 COD 的主要来源之一 (Van Wyk and Mohulatsi, 2003; 陈子爱 and 邓小晨, 2006; Angela *et al.*, 2008)。生物法是目前处理废弃物和废水中纤维素的最为有效的方法。在能源日益紧缺的今天, 将固体废弃物和废水中的纤维素分解成葡萄糖、乙醇等小分子化合物, 转化为动物饲料、肥料或燃料等, 具有非常重要的意义 (Hilden and Johansson, 2004)。

本文从畜禽养殖场排污口沉积底泥和畜禽粪便中筛选得到 5 株高效纤维素降解菌, 经生理生化以及分子水平的鉴定, 复合菌系中细菌 LCB03、LCB52 和 LCD12 分别属于假单胞菌属的不同种, 细菌 LCB12 属于嗜麦芽窄食单胞菌, 细菌 LCD51 属于水氏黄杆菌。目前在国内外已有的研究报道中, 纤维素降解菌主要集中在纤维单胞菌 (*Cellulomonas*)、嗜纤维菌 (*Cytophaga*)、生孢嗜纤维菌 (*Sporocytophaga*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、梭菌 (*Clostridium*) 和芽孢杆菌 (*Bacillus*) (Bahia and Ali, 2006; Keikhosro *et al.*, 2006), 而关于嗜麦芽窄食单胞菌和水氏黄杆菌降解纤维素的研究, 还几乎未见报道。复合菌系的各菌株可产生不同类型的

纤维素酶,且产生的各类酶活各有高低,具有较强互补性.各菌株间可以共存,协同作用有效分解天然纤维素,具有很强的实际应用价值.

References

- Angela, C. R., Marcela, B., Natalia, S. S., et al., 2008. Treatment of paper pulp and paper mill wastewater by coagulation-flocculation followed by heterogeneous photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 194 (1): 1—10.
- Bahia, A., Ali, G., 2006. Characterization of a novel β -glucosidase from a *Stachybotrys* stain. *Biochemical Engineering Journal*, 32(1): 191—197.
- Chen, Z. A., Deng, X. C., 2006. Progress in microbiologic utilization technology of crop straw. *China Biogas*, 24 (3): 31—35 (in Chinese with English abstract).
- Dong, X. Z., Cai, M. Y., 2001. Manual of identification for general bacteriology. Science Press, Beijing, 66—191 (in Chinese).
- Dun, B. Q., Wu, W., Wang, X. J., et al., 2008. Isolation and identification of a cellulose decomposing bacteria. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 10(1): 113—117 (in Chinese with English abstract).
- Georgakakis, D., Krintas, T., 2000. Optimal use of the Hosoya system in composting poultry manure. *Biore-source Technology*, 72(1): 227—233.
- Ghose, T. K., 1987. Measurement of cellulase activities international union of pure and applied chemistry. *Chemphere*, 59(2): 257—268.
- Haruta, S., Cui, Z., Huang, Z., et al., 2002. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4—5): 529—534.
- Hilden, L., Johansson, G., 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology Letters*, 26(22): 1683—1694.
- Keikhosro, K., Giti, E., Mohammad, J., 2006. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1): 138—144.
- Li, P., Liu, D. L., Nahimana, L., et al., 2006. High nitrogen removal from wastewater with several new aerobic bacteria isolated from diverse ecosystems. *Journal of Environmental Sciences*, 18(3): 525—529.
- Li, Y. H., Zhao, F. K., 2005. Advances in cellulase research. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 17(5): 392—397 (in Chinese with English abstract).
- Lu, Y. X., Chen, K., Li, H. H., 2007. Screening of cellulose-degrading bacteria and study on its cellulose-producing condition. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 35 (12): 3631—3644 (in Chinese with English abstract).
- Petersson, L., Kvien, I., Oksman, K., 2007. Structure and thermal properties of poly (lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials. *Composites Science and Technology*, 67(11—12): 2535—2544.
- Ren, N. Q., Ma, F., 2002. Microbiology of pollution control. Harbin Institute of Technology Press, Harbin, 256—328 (in Chinese).
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697—703.
- Wei, T. Y., Zhang, S. Q., Shao, L. G., et al., 2004. Isolation and study of a new strain of cellulose degrading bacterium. *Environmental Science and Technology*, 27(5): 1—3, 39 (in Chinese with English abstract).
- Van Wyk, J. P. H., Mohulatsi, M., 2003. Biodegradation of wastepaper by cellulase from *Trichoderma Viride*. *Bioresource Technology*, 86(1): 21—23.
- Zeng, Q. L., 2008. Isolation and identification of straw cellulose-biodegrading filamentous fungi. *Hubei Agricultural Sciences*, 47(6): 652—655 (in Chinese with English abstract).
- Zhang, Y., Himmel, M., Mielenz, J., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24(5): 452—481.

附中文参考文献

- 陈子爱, 邓小晨, 2006. 微生物处理利用秸秆的研究进展. *中国沼气*, 24(3): 31—35.
- 顿宝庆, 吴薇, 王旭静, 等, 2008. 一株高纤维素酶活力纤维素分解菌的分离与鉴定. *中国农业科技导报*, 10(1): 113—117.
- 东秀株, 蔡妙英, 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 66—191.
- 李燕红, 赵辅昆, 2005. 纤维素的研究进展. *生命科学*, 17(5): 392—397.
- 卢月霞, 陈凯, 李海江, 2007. 一株纤维素降解细菌的筛选及产酶条件研究. *安徽农业科学*, 35(12): 3631—3644.
- 任南琪, 马放, 2002. 污染控制微生物学. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 256—328.
- 魏桃员, 张素琴, 邵林广, 等, 2004. 一株纤维素降解细菌的分离及特性研究. *环境科学与技术*, 27(5): 1—3, 39.
- 曾青兰, 2008. 降解秸秆纤维素丝状真菌的分离鉴定. *湖北农业科学*, 47(6): 652—655.