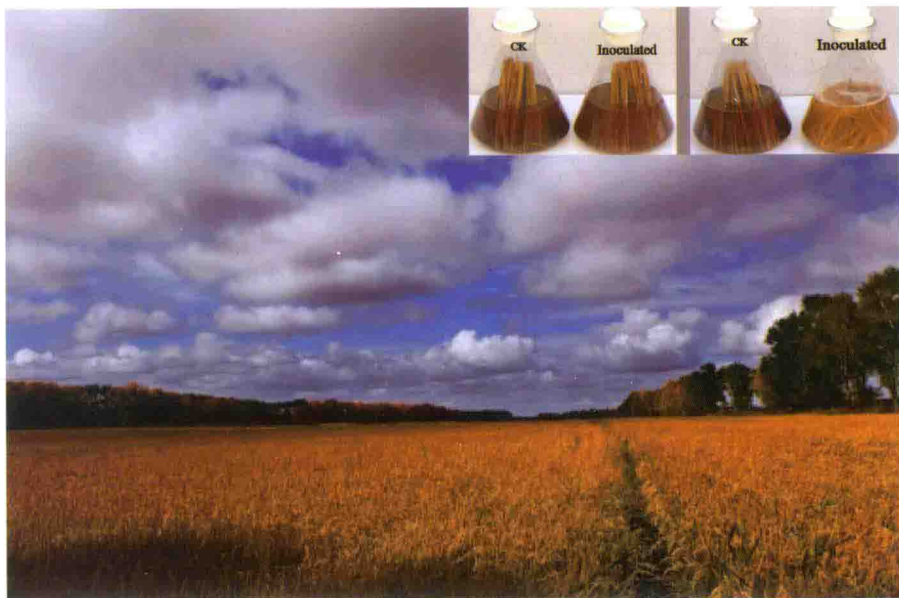




现代生物农业·微生物

# 木质纤维素分解复合菌系及其在农业废弃物资源化中的应用

王伟东 崔宗均 著



科学出版社

# 木质纤维素分解复合菌系及其在 农业废弃物资源化中的应用

王伟东 崔宗均 著

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本书内容分为6章,第1章介绍了本书成果的研究思路和学术思想。第2~5章详细介绍了复合菌系的构建方法、复合菌系的理化性质、复合菌系的培养条件优化、微生物组成多样性,以及初步解析了复合菌系分解纤维素的机理。第6章介绍了复合菌系在农业有机固体废弃物资源化中的应用,主要是在秸秆和畜禽粪便好氧堆肥化中的应用效果和作用机理;同时介绍了乳酸菌复合菌系和沼气复合菌系的构建方法、性质、微生物多样性分析和应用效果;最后对农业废弃物资源化利用的趋势提出了著者浅显的见解。

本书可以作为理、工、农、林等高等院校和科研院所中从事农业废弃物资源化利用、固废处理、环境微生物与微生物生态相关领域的教师、研究生和本科生的参考资料,也可为企业界和社会各界朋友提供参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

木质纤维素分解复合菌系及其在农业废弃物资源化中的应用/王伟东,崔宗均著.—北京:科学出版社,2017.12

ISBN 978-7-03-054706-4

I. ①木… II. ①王… ②崔… III. ①木纤维-纤维素-微生物降解-应用-农业废物-废物综合利用-研究 IV. ①X71

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第244269号

责任编辑:李迪 / 责任校对:郑金红

责任印制:张伟 / 封面设计:刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2017年12月第一版 开本:720×1000 1/16

2017年12月第一次印刷 印张:7 3/4

字数:160 000

定价:98.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)



## 作者简介



王伟东，男，1970年生，山东泰安人，黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院教授，博士研究生导师。1993年毕业于黑龙江八一农垦大学农学系，获农学学士学位，2005年毕业于中国农业大学农学与生物技术学院，获农学博士学位。黑龙江省杰出青年基金获得者，黑龙江省优秀教师，农业部农业技术推广先进个人。中国生态学会微生物生态专业委员会委员、中国微生物学会环境微生物专业委员会委员、中国植物营养与肥料学会生物与有机肥专业委员会委员、黑龙江省微生物学会副理事长、黑龙江省土壤学会理事、大庆市生态学会秘书长，黑龙江省政府科顾委委员。研究方向为微生物分子生态、环境生物技术、寒区农业废弃物资源化利用技术与工程（肥料化、能源化、饲料化）、土壤改良和修复。主持国家自然科学基金项目、国家科技支撑计划课题、国家星火计划等国家级项目（课题）6项，省部级项目（课题）5项；获省部级科技进步奖二等奖和自然科学奖二等奖各1项；发表SCI收录论文20余篇，主编教材1部，授权发明专利6项。



崔宗均，男，1957年生，吉林图们人，中国农业大学生物质工程中心教授，博士研究生导师，副主任。1994年在中国农业大学获博士学位。1994~1996年在中国农科院原子能研究所博士后流动站从事氮循环与微生物生态研究；1996~1998年获日本JSPS博士后奖学金赴东京大学从事木质纤维素分解及微生物生态研究，1999年至今任中国农业大学副教授、教授。从事生物质资源利用、生物质能源转化及微生物生态研究，先后承担国家级课题30余项。2003~2007年兼任东京大大学院农学生命科学研究科客座教授、博士生导师，主持东京大学校企合作项目“Biomass Refinery”工作。创立了功能微生物复合系的理论和稳定复合菌系的构建技术，在微生物群体功能的利用、木质纤维素的微生物快速分解与能源转化、有机废弃物快速堆肥化、秸秆发酵饲料、生物质水稻育秧基质等技术开发方面取得了重要成果。发表国内外学术论文160余篇。授权国家专利7项，获省部级二等奖以上奖励3项。

## 前 言

环境问题一般是与社会和经济发展伴生的，随着我国经济的快速发展，我国正在面临着严重的环境安全问题。其中，畜禽粪便、农作物秸秆、农产品加工废弃物等农业有机固体废弃物的污染问题是近年来影响我国环境安全和生态安全的重要因素之一。我国每年产生的作物秸秆量约 7.5 亿~9.0 亿 t，畜禽粪便量约 35 亿~40 亿 t，但是总的资源化率不超过 70%，有 30%左右的农业废弃物没有被处理和资源化利用，造成严重的环境污染。另外，我国耕地面临着严重的污染和退化问题。如果把这些农业有机废弃物资源化为有机肥，进而开发相应的土壤改良剂等产品；或者能源化为沼气（或生物天然气），沼渣沼液再还田，或者过腹还田，把农业有机废弃物资源化，不但可以治理环境污染，而且可以改善生态环境，提升耕地质量，一举多得。农业有机废弃物的好氧或厌氧生物处理是这些废弃物资源化的根本途径之一。

微生物是自然界给人类的宝贵资源，也是自然界物质循环的核心驱动力。但是，我们人类对于微生物的认识还不够，目前人类获得的微生物纯培养物只有自然界微生物总量的 0.1%~1.0%左右。因此，开发新的微生物资源，并把对人类有益的微生物资源应用到生产实际中，是人类尤其是科研工作者长期而艰巨的任务。在微生物研究和应用领域，以往大多注重纯培养菌株的研究和应用。进入 21 世纪以来，在环境微生物与微生物生态研究、废水处理以及废弃物的资源化领域，微生物复合菌系受到更多人的重视。复合菌系更符合自然状态下微生物的本来状态，多种微生物协同作用，发挥生态功能，或者发挥人类赋予的特殊功能，比微生物纯培养具有优势。把复合菌系作为一个整体看待，首先发挥它的功能，然后通过传统微生物学研究方法，或者通过高通量测序技术、组学方法、单细胞测序技术等现代分子生物学技术，获得其中的关键菌株，解析复合菌系微生物组成多样性，阐明复合菌系微生物协同作用机制，最终人工调控复合群体微生物的作用，可能会是新时期环境微生物、微生物生态学及废弃物资源化利用的研究方向。

农业废弃物好氧堆肥和厌氧沼气发酵是这类废弃物资源化利用的有效途径。王伟东从攻读博士学位期间开始，在崔宗均教授的指导下，就从事木质纤维素的微生物分解与转化、畜禽粪便和秸秆好氧高温堆肥技术与工程方面的研究。之所

以把研究重点集中于木质纤维素的分解，主要是因为农业废弃物中最主要的成分是木质纤维素，木质纤维素分解与转化是农业有机废弃物生物分解与转化利用的根本指标。经过多年的研究，著者把研究成果集中进行总结，期望能够为同行、科研工作者、大专院校的师生或者企业界的朋友提供一些参考。本书内容分为 6 章，第 1 章介绍了著者的研究思路和学术思想。第 2~5 章，详细介绍了复合菌系的构建方法、复合菌系理化性质、复合菌系的培养条件优化、微生物多样性，以及初步解析了复合菌系分解纤维素的机理。第 6 章介绍了复合菌系在农业有机废弃物资源化中的应用，主要是在秸秆和畜禽粪便好氧堆肥化中的应用效果和作用机理；之后在第 6 章又介绍了其他两种复合菌系（乳酸菌复合系和沼气复合菌系）的构建方法、性质、微生物多样性分析和应用效果；第 6 章的最后部分对农业有机废弃物的资源化利用提出了著者浅显的见解。

本书集成了国家自然科学基金面上项目（31270536）、国家科技支撑计划课题（2015BAD21B04、2012BAD12B05-3、2008BAD4B01、2006BAD04A09、2006BAD07A10）、黑龙江省杰出青年科学基金（JC201002）、黑龙江省重大科技攻关项目（GA07B501）、黑龙江省教育厅科技项目（2012TD006、1251xnc108、1253CGZH15）、黑龙江省农垦总局科技项目（HNK135-04-08、HNK125B-11-11A、HNK125B-11-06A、HNK10TG-08）的研究成果。所有研究内容除了著者外，其他均来自著者研究团队的研究生的研究论文，他们分别是宋亚彬硕士、戚桂娜硕士、孙志远硕士、温雪硕士、王翠硕士、孙宇硕士、张杨硕士、李振国硕士、王国兴硕士、李莹硕士等。另外，黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院的王彦杰教授、晏磊副教授、高亚梅副教授，以及学院的相关老师等在研究中给予了大力支持，在出版过程中给予了帮助。王伟东在攻读博士学位期间，得到了导师崔宗均教授的悉心指导，研究还得到了王晓芬博士、高丽娟博士、杨洪岩博士、吕育才博士、刘建斌博士及研究室众多同学的帮助。出版过程中，得到了科学出版社的大力帮助和支持。本书的出版还得到了黑龙江八一农垦大学出版基金的资助。在本书出版之际，对他们表示诚挚的感谢。

由于著者水平有限，本书可能仍然存在一些疏漏甚至错误，诚恳希望同行专家和读者予以批评指正，以便我们修正。

著者

2016年12月

# 目 录

第 1 章 微生物复合菌系的研究进展	1
1.1 微生物纯培养	1
1.2 微生物复合菌系的提出及其生态学意义	2
1.2.1 复合菌系的概况	2
1.2.2 复合菌系构建遵循的原则	3
1.2.3 木质纤维素分解复合菌系的构建思路及其科学意义	4
第 2 章 木质纤维素分解复合菌系的构建和性质	8
2.1 木质纤维素分解复合菌系的构建	8
2.1.1 木质纤维素分解复合菌系构建的培养条件	8
2.1.2 复合菌系的构建过程	8
2.2 木质纤维素分解复合菌系的分解能力	9
2.2.1 复合菌系的滤纸分解活性	9
2.2.2 复合菌系对纤维素材料的分解能力	10
2.3 复合菌系的性质	12
2.3.1 复合菌系在纤维素分解过程中的 pH 调节能力	12
2.3.2 木质纤维素分解复合菌系的稳定性	15
2.4 复合菌系的发酵产物	20
第 3 章 复合菌系的培养条件优化	23
3.1 培养液碳源种类和添加量对复合菌系纤维素分解活性的影响	23
3.1.1 不同碳源种类的影响	23
3.1.2 不同碳源添加量的影响	24
3.2 培养基氮源的种类和添加量对复合菌系纤维素分解活性的影响	25
3.2.1 不同氮源种类的影响	25
3.2.2 不同氮源添加量的影响	25
3.3 培养温度对复合菌系纤维素分解活性的影响	26
3.4 不同的初始 pH 对复合菌系纤维素分解活性的影响	27

3.5	不同溶氧量对复合菌系纤维素分解活性的影响	29
<b>第4章</b>	<b>复合菌系的微生物组成多样性</b>	<b>31</b>
4.1	用于分析微生物多样性的微生物分子生态学方法	31
4.1.1	变性梯度凝胶电泳	31
4.1.2	末端限制性片段长度多态性	32
4.1.3	荧光原位杂交技术	33
4.1.4	高通量测序技术	33
4.1.5	稳定性同位素核酸探针技术 DNA-SIP	34
4.2	木质纤维素分解复合菌系的微生物多样性	34
4.2.1	复合菌系中可培养的菌株分离	34
4.2.2	利用分子生物学方法分析复合菌系的微生物多样性	37
4.2.3	复合菌系的细菌组成多样性	39
<b>第5章</b>	<b>复合菌系分解纤维素的机理初探</b>	<b>43</b>
5.1	复合菌系中关键菌株的确定	43
5.1.1	复合菌系中的好氧菌株纤维素降解能力的测试	43
5.1.2	复合菌系中的厌氧菌株纤维素降解能力的测试	43
5.2	利用简化的复合菌系模型研究复合菌系分解纤维素的机理	45
5.2.1	菌株的组配分解纤维素试验	45
5.2.2	简化的复合菌系在分解纤维素过程中微生物变化动态	51
5.2.3	复合菌系分解纤维素的机理假设	52
<b>第6章</b>	<b>利用复合菌系处理农业有机固体废弃物</b>	<b>60</b>
6.1	复合菌系作为接菌剂在畜禽粪便堆肥化过程中的应用	60
6.1.1	接菌和不接菌对堆肥化过程中理化参数的影响	61
6.1.2	接菌剂对木质纤维素含量的影响	62
6.1.3	接菌剂对腐熟度的影响	65
6.1.4	堆肥化过程中细菌变化规律	67
6.2	利用木质纤维素分解复合菌系作为沼气发酵预处理剂	71
6.2.1	材料与方法	71
6.2.2	结果与分析	71
6.3	其他两种复合菌系	74



6.3.1 沼气发酵复合菌系 .....	74
6.3.2 低温乳酸发酵复合菌系 .....	91
6.4 展望 .....	99
6.4.1 关于木质纤维素的微生物分解 .....	99
6.4.2 关于微生物生态学研究的方法 .....	100
6.4.3 关于我国农业废弃物资源化利用的思考 .....	101
参考文献 .....	103

# 第 1 章 微生物复合菌系的研究进展

## 1.1 微生物纯培养

在自然界中，多种不同的微生物种类混合生活在一起，微生物之间通过协同作用完成一种或者某一类生态功能。例如，人类肠道微生物与人类健康、微生物分解作物秸秆等农业有机固体废弃物、微生物分解难降解化合物、利用生物法处理污水、自然界中的甲烷发酵过程等，地球中各种元素的生物化学循环过程都是在各种微生物的驱动下完成的。因此，微生物个体功能、微生物群体的群体功能对于人类具有重要的意义。由于在自然界中微生物是混杂存在的，所以我们要识别某一种特定的微生物时，必须先得到纯的单个菌株或细胞，然后才能对其进行鉴定，了解其生物学特性，最后才能调控它为人民服务。因此，如何获得一种微生物的纯的单个个体是微生物学最主要的课题之一。

微生物学中把一个细胞或一群相同的细胞经过培养繁殖而得到的后代的过程称为纯培养（pure culture）。如果在一个菌落中所有细胞均来自于一个亲代细胞，即为纯培养。纯培养需要通过各种不同的微生物分离方法才能够获得，是由微生物的奠基人法国微生物学家巴斯德（Louis Pasteur）和德国微生物学家科赫（Robert Koch）（图 1-1）等建立起来的。传统的获得微生物纯培养的方法主要有涂布平板法（spread plate method）、稀释倒平板法（pour plate method）、平板划线法（streak plate method）、稀释滚管法（dilution shake culture method）等，前 3 种方法主要用于好氧微生物的纯培养分离，稀释滚管法用于厌氧微生物的分离培养。

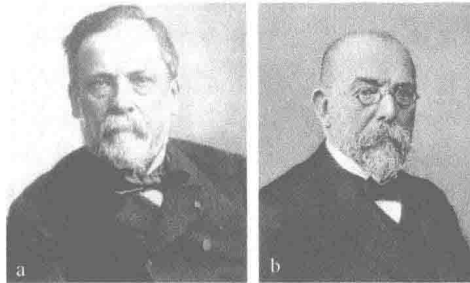


图 1-1 巴斯德（Louis Pasteur, 1822—1895 年）(a) 和科赫（Robert Koch, 1843—1910 年）(b)

科学试验的研究结果证明，以人类现有的知识储备、试验方法和技术手段，还不能把自然界中所有的微生物都分离纯化并得到纯培养物。自然界中大部分微生物是不可分离培养的，目前能够培养的微生物约占自然界中微生物总数的 1% (Alain and Querellou, 2009)。1987 年，人类发现的微生物有 26 个类群 (phyla) 均可培养，而目前发现的微生物类群超过 50 个，近半数不可培养。这些未培养微生物之所以还没有获得纯培养物，主要是受到研究手段、研究方法和人类对于微生物认识不足的限制，从而偏离了微生物的实际生长环境。例如，采用过高浓度的、营养丰富的培养基，忽略了微生物之间的相互关系，实验室中无法完全模拟微生物自然生长所需要的环境，生长缓慢的微生物被忽视，等等。其本质上是对微生物不了解。

## 1.2 微生物复合菌系的提出及其生态学意义

目前已经知道，自然界中绝大部分的微生物是无法分离得到纯培养的，但是，没有得到这些微生物纯培养并不代表它们不存在，更不能忽视它们的生态功能。例如，在污水处理中的厌氧氨氧化菌 (anaerobic ammonium oxidation, Anammox)，自然界中的氨氧化细菌 (ammonia oxidizing bacteria)、氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea) 和甲烷氧化菌 (methane oxidizing bacteria) 等，它们在自然界的碳氮循环中发挥重要作用，但是大部分是目前不能分离培养的。这些未培养微生物和一些可以分离培养的微生物混合生活在一起，发挥生态功能。因此，与微生物纯培养相比，如何获得、研究、分析、调控具有一定功能的由多种微生物组成的混合群体同样具有重要的意义。尤其是在环境生物技术领域，很多学者已经发现微生物复合群体在环境治理方面比纯培养菌株更具有优势。

### 1.2.1 复合菌系的概况

根据多年的研究结果，著者提出如下复合菌系的概念。

复合菌系是天然组成的而不是人工组合在一起的群体，组成微生物之间具有协同关系，而且是遗传稳定、特定功能强大的微生物复合系统。复合菌系中的各种组成微生物是自然条件下就生活在一起，是以一定的功能分离筛选指标、通过限制性培养获得的。

从复合菌系和纯培养的比较 (表 1-1) 可以看出，微生物的纯培养是在微生物学基础研究层面不能绕开的环节，如果进行某一种微生物的系统发育和分类鉴定等研究工作，必须得到纯培养物，并且纯培养在一些实际应用领域具有非常明显的优势。而复合菌系在某些应用领域已经显示出了它独特的优势，尤其

是环境治理方面，已经有大量的试验证明复合菌系比纯培养物在环境污染治理方面效果显著。因此，复合菌系和纯培养是微生物学研究的两个方面，具有同等重要的意义。

表 1-1 复合菌系与纯培养相比的优缺点比较

类型	优点	缺点	应用领域
复合菌系	(1) 组成稳定，不易发生变异 (2) 性质稳定 (3) 功能稳定 (4) 抗逆性强，在复杂的环境条件下能够充分发挥其功能	(1) 组成复杂，遗传背景复杂，不容易研究 (2) 在以某一特定产物为目标的发酵中不易应用，调控困难	环境治理、生物防治等
纯培养	(1) 成分单一，易于操作 (2) 容易进行分析和研究，遗传背景明确 (3) 在发酵过程中容易获得特定的产物，便于发酵条件标准化	(1) 某些特定功能和一些优良性状容易退化、丧失 (2) 在复杂的环境条件下很难发挥其功能	生物制药、酶制剂生产、食品酿造、分子生物学研究等

### 1.2.2 复合菌系构建遵循的原则

复合菌系不是简单的几种微生物纯培养物的随机的或者设计的组合，而是天然条件下原本就生活在一起的、相互之间具有协同作用关系的一群微生物集合体。因此，要获得具有某种功能的微生物复合菌系，在筛选、构建复合菌系时要遵循一定的原则。这里提到的“构建”的概念与分子生物学意义上的构建是不同的，分子生物学概念的构建强调从微生物基因角度进行研究，而这里提出的“构建”则是通过一定的限制性培养方法，如温度、碳源或氮源、pH 等限定，把天然样品中具有协同作用的微生物富集在一起，并且这些微生物能够稳定共存，功能和组成也稳定遗传。

(1) 确定一个具体明确的功能目标。例如，构建的复合菌系是用于分解纤维素、木质素或某一种特定的有机化合物等，在限制性培养时就要在底物中加入相应的物质，同时尽量减少与目标物质相类似的组分。

(2) 确定直观容易考量的指标。例如，在构建纤维素分解复合菌系时，用滤纸条作为衡量复合菌系是否具有纤维素分解能力的标准，既直观又简单，同时可以观察复合菌系的分解速度和能力。如果没有直观方便的考量指标，就需要一定的方法进行检测，不仅复杂烦琐，效率低，而且成本高。

(3) 筛选条件要最大限度接近原始条件。构建复合菌系时首先要从环境中取样，然后以此样品进行富集筛选。因为人为选择的培养条件与原来微生物的培养条件的差异，会使一些微生物的生长受到不同程度的限制，如那些难培养的微生物。所以，进行复合菌系的构建时，限制性条件一定要最大限度地模仿原始样品的原始条件，以便最大限度地使具有功能的微生物种类保存下来。

(4) 复合菌系将来所处的环境要与构建的复合菌系的样品的原始条件尽量相同。因为构建复合菌系都是有目的性的,而且复合菌系的功能都有具体的衡量指标,应符合复合菌系将来要处于的目标环境。因此,在构建取样时,样品的环境条件应该与筛选条件、将来使用复合菌系的环境条件尽量相同,并且三者尽量协调统一,这样才能保证复合菌系适宜的生长条件,进而微生物在目标环境中占据繁殖优势,发挥应有的作用。例如,如果想获得具有分解畜禽粪便能力的微生物复合菌系,并且能在畜禽粪便堆肥化过程中使用复合菌系促进有机物分解,那么就应该在以畜禽粪便为原料的堆肥环境中取样,复合菌系的筛选条件也应模拟堆肥环境。

上述提到的4个原则是复合菌系构建时的主要原则,但是并不是只考虑上述原则就高枕无忧了。相反,与微生物生长密切相关的因素也需要考虑,如pH、温度、溶氧量、静置还是振荡、缓冲液,等等。只有充分考虑各种影响因素,才能确保获得的复合菌系具有组成稳定性、性质稳定性、功能稳定性和遗传稳定性,在连续若干年的继代培养后,仍可以保持性能稳定、不退化。

### 1.2.3 木质纤维素分解复合菌系的构建思路及其科学意义

#### 1.2.3.1 木质纤维素物质资源化利用的必要性

木质纤维素是植物光合作用的主产品,占植物总干物质重的1/2左右,其每年的生成量达850亿t之多,而且农田农作物光合产物的一半以上又由秸秆占据,因此秸秆蕴藏着大量的养分和能量,是重要的未充分利用资源。据统计,我国每年产生农作物秸秆6.5亿~8.0亿t,其中约45%用于直接还田和饲料,30%用于生活燃料,20%多被就地燃烧。秸秆的就地燃烧不仅浪费了大量的资源,而且造成了严重的环境污染和火灾隐患。同时,人类社会进入21世纪后,在全世界范围内出现了前所未有的能源危机与环境问题,尤其我国目前存在着严重的能源安全隐患。在我国,粮食安全问题是我国最重要的问题之一,为了生产足够的粮食,耕地在不断透支,每年大量使用化肥,但是有机质的投入微乎其微,致使耕地质量不断下降。因此,将这些木质纤维素资源转化为有机肥、生物能源或者其他类生物基产品,对于治理环境污染、改善生态环境、保护和提升耕地质量、保障国家粮食和能源安全、促进社会发展具有重要意义。木质纤维素物质资源化最有效的技术途径之一就是生物法利用。

#### 1.2.3.2 木质纤维素分解复合菌系的构建思路

微生物降解是木质纤维素最主要的降解方式。植物材料中,纤维素、半纤维素和木质素交互在一起,木质素包围着纤维素,而木质素又是非水溶性的、具有

芳香环的、分子质量非常巨大的三维聚合物，它保护纤维素和半纤维素不受酶的攻击，因此，木质纤维素很难被降解，被称为“混凝土结构”。但是，自然界中还是存在大量可以降解木质纤维素的细菌、真菌和放线菌，而且它们常与其他一些不具备纤维素分解能力的微生物生活在一起，组成一个互利互惠的小生境，从而更好地分解木质纤维素等有机物。

木质纤维素的微生物降解研究中，以往的研究多集中在单个微生物的分离和纯培养方面，但自然界中约 99% 以上的微生物是目前无法纯培养的 (Amann et al., 1995)。这就决定了研究只能局限在实验室中进行，因为纯培养不符合自然状态下木质纤维素的降解条件和规律。自然条件下，木质纤维素的分解是在众多微生物的协同作用下完成的。因此，模拟自然条件下木质纤维素的降解过程，人工构建具有高效纤维素分解能力的微生物复合群体更具有实际价值和应用价值。

鉴于此，著者提出了新的构建复合菌系的思路 (图 1-2)。以往的传统微生物分离筛选，首先是从环境中分离得到具有需要性状的纯培养菌株，然后把背景和性状清楚的菌株进行扩繁，之后应用到各种目标环境中。或者把不同的菌株再进行重新组配，组建混合菌群，再把混合菌群扩繁应用。但是实践证明，纯培养菌株在环境治理方面的效果不理想。对于混合菌株，由于它们不是天然就生长在一起，人为组合后协同作用效果也不理想。我们构建木质纤维素复合菌系的思路与

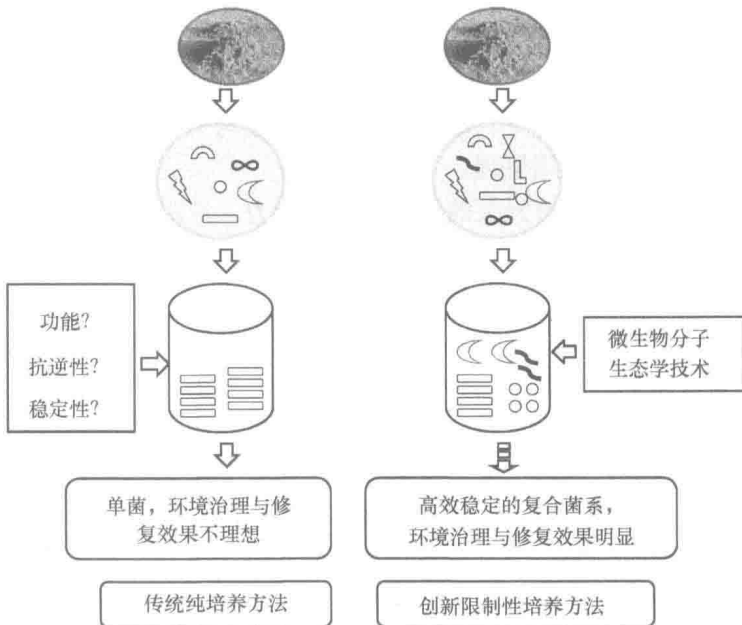


图 1-2 木质纤维素分解复合菌系的构建思路（彩图可扫封底二维码获取）

传统思路正好相反, 首先, 以分解木质纤维素能力为唯一考核指标, 把自然样品中所有的微生物富集在一起, 把这些微生物当作一个整体来看待, 在尽可能模拟样品原位条件的情况下把所有木质纤维素分解过程中起协同作用的微生物都保留下来; 其次, 在得到功能稳定的群体后, 再反过来分析复合菌系的微生物组成多样性。这样确保了木质纤维素分解复合菌系中的微生物是原始条件下的自然组合, 而不是人为的强制组合, 达到了高效稳定的木质纤维素分解效果。

### 1.2.3.3 木质纤维素分解复合菌系的科学意义

在人工条件下, 依靠纯培养微生物、酶等难以直接分解天然木质纤维素, 因此常常需要物理或化学的前处理。但事实上, 在自然界多种微生物的共同作用下(虽然速度较慢), 木质纤维素被彻底分解。对此, 著者认为自然界中由多种微生物组成的特殊群体, 只有群体内各成员协同作用才能顺利分解木质纤维素。在这个意义上, 20 世纪以灭菌培养基和纯培养为特色的应用微生物学技术对于天然木质纤维素的分解显得无能为力。构建具有高效分解能力的稳定复合菌系, 人工控制条件下再现微生物的群体功能, 这对深入研究微生物群体组成的多样性和丰度、群体功能的奥秘, 以及进一步开发木质纤维素资源的生物法资源化利用技术具有重大意义。

(1) 复合菌系的构建思路与传统思路不同, 不是把纯培养菌株进行简单的组合, 而是通过限制性培养的方法, 先从原料中获得自然存在的、具有协同功能的微生物群体, 把复合菌系作为一个功能整体进行研究, 把自然界微生物的协同作用再现于人工可控培养条件下。然后采用传统方法与分子生态学技术结合, 研究群体的菌种组成及协同作用机理。

(2) 高温复合菌系具有强大的纤维素分解能力, 且功能稳定。在 50℃ 静置培养条件下, 8d 可以完全分解水稻秸秆, 分解能力连续保持 10 年以上。抗逆性强, 在室内环境接种后, 分解能力与稳定性保持不变。其木质纤维素分解能力在国际上处于领先水平, 解决了科学界木质纤维素微生物难以高效分解的难题。复合菌系在分解木质纤维素的过程中, 产生乙醇、乙酸、甘油、甲酸等有机物质, 为将来利用木质纤维素类生物质资源作为原料, 开发生物质能源和生物质基产品提供了技术基础和新途径。因此, 复合菌系在以秸秆等农业生物质资源为材料生产乙醇、乙酸、甘油等方面具有实际应用价值, 具有广泛的应用前景。利用复合菌系生产纤维素复合酶系也是今后发展的一个新的方向。

崔宗均等(2002)以高温堆肥为原料, 从中分离、构建了一个具有高效分解天然纤维素能力的复合菌系 MC1, 具有强大的纤维素分解能力, 把天然纤维素降解的过程在实验室条件下人工再现(图 1-3)。

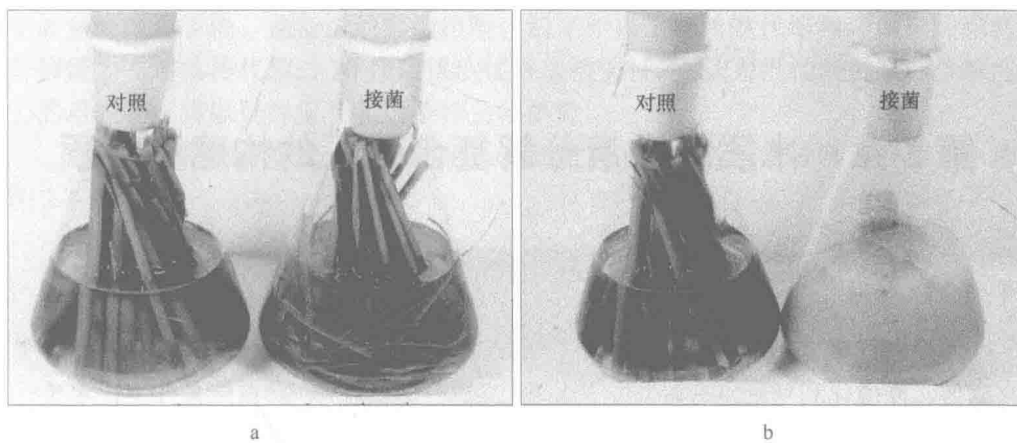


图 1-3 纤维素分解复合菌系 MC1 对于水稻秸秆的分解 (崔宗均等, 2002)

a. 接种当天; b. 接种 10d 后



## 第 2 章 木质纤维素分解复合菌系的构建和性质

### 2.1 木质纤维素分解复合菌系的构建

木质纤维素资源是自然界最廉价、最丰富的可再生有机物资源，但是人类对于它高效、高值化利用程度有限，尤其是生物法资源化利用。在自然条件下，木质纤维素经过多种微生物的协同作用可以被有效分解。但是，在有目的的人为控制下进行定向生物分解及转化一直是木质纤维素生物利用研究中的难题。人们在真菌分解利用木质纤维素方面研究较早，取得的成果也多，很多基础研究结果都来自于真菌对于木质纤维素的分解。20 世纪末，细菌在纤维素分解方面的强大功能逐渐受到人们的重视，相应的纤维素分解机理研究也逐渐深入。同时，自然界中以一定生态功能为基础的多种微生物之间的协同作用更加为人们所重视。

#### 2.1.1 木质纤维素分解复合菌系构建的培养条件

采用的培养基为蛋白胨纤维素培养液 (PCS)，其组成如下：蛋白胨 5.0g，纤维素 (新华滤纸) 5.0g，NaCl 5.0g，CaCO<sub>3</sub> 2.0g，酵母粉 1.0g，溶解在 1L 水中。接种量 5% (体积比)，50℃ 静置培养，使其处于溶氧量 (DO) 微好氧条件中。

#### 2.1.2 复合菌系的构建过程

从以玉米秸秆、水稻秸秆和牛粪为原料的堆肥的高温期中取样。在 200mL 三角瓶内装 100mL 蛋白胨纤维素培养液 (PCS)，以 1g 的水稻秸秆作为碳源，瓶内放入滤纸条作为分解的外观指标，加入样品 5g，50℃ 静置培养。试验使用的稻秆的处理方法：配制 1.5% 的氢氧化钠溶液，把成熟收割后的干稻秆剪成 10cm 左右，用皮筋捆住，放入容器中，使溶液覆盖过稻秆，浸泡 24h 后，用流水冲洗，数次后，用清水浸泡 1~2d，测 pH，用酸调至中性，80℃ 烘干备用。以下不作特殊说明，试验所使用稻秆均为碱处理后的稻秆。当瓶内滤纸条完全分解，水稻秸秆软化时取 5mL 培养液作为菌种接种到同样的新鲜培养基中。

如此一直继代培养，淘汰失去分解能力的培养物，留下分解能力强的培养物。等留下的培养物到 10 代以上仍然具有分解能力时，将培养物相互混合进行组配，继续继代培养；选择分解能力强，pH 接近中性的培养物继续继代培养。培养过程