



研究报告

复合菌系 GF-20 低温降解玉米秸秆过程中群落演替与理化特性

青格尔^{1,2} 于晓芳^{*1,2} 高聚林^{*1,2} 王志刚^{1,2} 胡树平^{2,3} 孙继颖^{1,2} 屈佳伟^{1,2}
韩升才^{2,4}

1 内蒙古农业大学农学院 内蒙古 呼和浩特 010019

2 内蒙古自治区作物栽培与遗传改良重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010019

3 内蒙古农业大学职业技术学院 内蒙古 包头 014109

4 内蒙古农业大学园艺与植保学院 内蒙古 呼和浩特 010019

摘要:【背景】秸秆的生物降解具有高效率 and 环保等特点而备受关注。【目的】明确复合菌系 GF-20 秸秆降解过程中发挥重要作用的功能微生物类群及其与降解特性的关系。【方法】将复合菌系 GF-20 在 10 °C 条件下恒温培养, 定期取样测定其生长特性及秸秆分解特性, 利用 MiSeq 高通量测序技术, 分析不同降解时期复合菌系的群落结构变化规律。【结果】复合菌系 GF-20 在接种后 1 d 内进入对数生长期, pH 值迅速下降至 6.98, 总糖含量迅速降低至 0.22 mg/mL; 3 d 后体系可溶性化学需氧量降低至 4.77 g/L, 氧化还原电位迅速降低至-303 mV, 并高效分泌纤维素酶; 培养 15 d 时玉米秸秆降解率为 31.97%, 木质素、纤维素和半纤维素降解率分别为 32.30%、44.85%和 43.84%。在玉米秸秆降解过程中, 降解初期(2、5 d)的优势菌属为 *Cellvibrio* (29.55%)、*Chryseobacterium* (7.35%)、*Hydrogenophaga* (3.86%)和 *Pseudomonas* (3.42%); 降解中期(7、10 d)的优势菌属为 *Azospirillum* (9.92%)、*Rhizobium* (6.99%)、*Nubsella* (5.06%)和 *Stenotrophomonas* (3.37%); 降解后期(12、15 d)的优势菌属为 *Taibaiella* (13.82%)、*Pleomorphomonas* (13.69%)、*Flavobacterium* (14.89%)、*Cellulomonas* (7.18%)、*Devosia* (7.36%)、*Pedobacter* (4.32%)和 *Sphingomonas* (2.23%)。【结论】明确了复合菌系 GF-20 在不同降解时期微生物群落结构演替规律以及秸秆降解特性动态变化, 为复合菌系的合理化利用提供理论依据。

关键词: 玉米秸秆, 复合菌系, 秸秆降解特性, 微生物多样性

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31760353, 32060434); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2020MS03086, 2018ZD02); National Key Research and Development Program of China (2017YFD0300804); China Agriculture Research System of Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Affairs (CARS-02-63); The Crop Science Observation and Experiment Station in Loess Plateau of North China of Ministry of Agriculture (25204120)

***Corresponding authors:** E-mail: YU Xiaofang: yuxiaofnag75@163.com; GAO Julin: julingao@163.com

Received: 05-01-2021; **Accepted:** 19-03-2021; **Published online:** 18-05-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31760353, 32060434); 内蒙古自治区自然科学基金(2020MS03086, 2018ZD02); 国家重点研发计划(2017YFD0300804); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-02-63); 农业部华北黄土高原地区作物栽培科学观测实验站(25204120)

***通信作者:** E-mail: 于晓芳: yuxiaofnag75@163.com; 高聚林: julingao@163.com

收稿日期: 2021-01-05; **接受日期:** 2021-03-19; **网络首发日期:** 2021-05-18

Microbial community succession and straw degradation characteristics at low temperature in the composite microbial system GF-20

Qinggeer^{1,2} YU Xiaofang^{*1,2} GAO Julin^{*1,2} WANG Zhigang^{1,2} HU Shuping^{2,3}
SUN Jiyang^{1,2} QU Jiawei^{1,2} HAN Shengcai^{2,4}

1 Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019, China

2 Key Laboratory of Crop Cultivation and Genetic Improvement in Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot, Inner Mongolia 010019, China

3 Vocational and Technical College, Inner Mongolia Agricultural University, Baotou, Inner Mongolia 014109, China

4 Horticulture and Plant Protection College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019, China

Abstract: [Background] Straw biodegradation has been the focus of increasing amounts of attention because of its high degradation efficiency and environmental friendliness. [Objective] The key functional microbes in the process of straw degradation of composite microbial system GF-20 and their relationship with the characteristics of degradation were clarified. [Methods] GF-20 was cultured at 10 °C, and the dynamics of growth and straw decomposition characteristics were determined, enabling the estimation of corn stalk decomposition by GF-20. Furthermore, the microbial community succession in different degradation periods was analyzed using MiSeq high-throughput sequencing technique. [Results] The composite microbial system GF-20 grew logarithmically, the pH value rapidly dropped to 6.98, and the total sugar content of the fermentation system quickly decreased to 0.22 mg/mL within 1 d after inoculation. The soluble chemical oxygen demand declined to 4.77 g/L after 3 d, and the oxidation-reduction potential rapidly reduced to -303 mV. The GF-20 efficiently secreted cellulose, and rate of degradation of corn stalk, lignin, cellulose and hemicellulose were 31.97%, 32.30%, 44.85% and 43.84%, respectively, after 15 days of fermentation at 10 °C. The dominant genera included *Cellvibrio* (29.55%), *Chryseobacterium* (7.35%), *Hydrogenophaga* (3.86%) and *Pseudomonas* (3.42%) during the initial stage (2 d, 5 d) and the key functional microbes *Azospirillum* (9.92%), *Rhizobium* (6.99%), *Nubsella* (5.06%) and *Stenotrophomonas* (3.37%) during the mid-term stage (7 d, 10 d). The abundances of *Taibaiella* (13.82%), *Pleomorphomonas* (13.69%), *Flavobacterium* (14.89%), *Cellulomonas* (7.18%), *Devosia* (7.36%), *Pedobacter* (4.32%) and *Sphingomonas* (2.23%) increased significantly during the late stage (12 d, 15 d). [Conclusion] The dynamic changes in bacterial consortium structure and the characteristics of straw degradation during different periods of degradation were clarified and provide a theoretical basis for the rational utilization of composite microbial system GF-20.

Keywords: corn stover, composite microbial system, straw degradation characteristics, microbial diversity

玉米秸秆原位还田是培肥改土的一项行之有效的技术措施^[1], 不仅可以提高玉米秸秆的综合利用率, 还可以将作物秸秆中的营养元素归还给土壤, 缓解土壤养分不足, 减少化肥的施用量, 提高耕地土壤质量, 平衡农田生态系统^[2]。然而, 玉米秸秆中含有大量结构稳定的木质纤维素大分子物^[3], 不易降解, 这使得秸秆资源较难被有效充分利用。加快木质纤维素生物腐解是促进还田秸秆有效分解的

措施之一。前人以羧甲基纤维素、碱木质素等为碳源选择性地筛选秸秆降解单菌, 再通过单菌有效复配构建复配菌系进行秸秆生物处理^[4-7]。秸秆类生物自然降解需要多种微生物协同作用^[8-9]。因此, 木质纤维素物质复合微生物的降解备受关注, 以天然纤维素材料滤纸、秸秆粉为碳源通过限制性继代培养筛选获得天然复合菌群, 促进秸秆的降解^[10-12]。

本实验室前期筛选了一组能高效稳定降解木

质纤维素的复合菌系 GF-20, 发现该复合菌系在 10 °C 静置培养 15 d 可降解 30% 的玉米秸秆, 而且具有良好的稳定性^[13-14], 然而该复合菌系在玉米秸秆降解不同时期的秸秆降解特性及菌种组成变化规律尚不清楚。本研究以期明确复合菌系 GF-20 的玉米秸秆降解特性及其主导微生物类型, 为玉米秸秆木质纤维素高值化利用提供理论数据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试复合菌系 GF-20 为本实验室筛选驯化的纤维素低温高效降解复合菌系^[13], 有效活菌数 $\geq 10^8$ CFU/mL。玉米秸秆取自内蒙古农业大学玉米中心(内蒙古包头市土右旗敕勒川现代农业博览园)试验田收获的玉米秸秆, 洗净烘干后剪成 1–2 cm 节段。

1.2 主要试剂和仪器

硫酸铵、磷酸氢二钾、氯化钠、七水硫酸镁、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、葡萄糖等, 国药集团化学试剂(北京)有限公司; 羧甲基纤维素、水杨苷等, Sigma-Aldrich 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司。低温培养箱, 美墨尔特有限公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; Illumina MiSeq PE300 和 HiSeq 测序平台, Illumina 公司。

基础培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, NaCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, 蒸馏水 1 L。玉米秸秆培养基: 40 mL 基础培养基和 1 g 玉米秸秆碳源装入 100 mL 三角瓶中, 1×10^5 Pa 条件下灭菌 30 min。

1.3 复合菌系 GF-20 的培养

将复合菌系 GF-20 以 5% 的接种量接入玉米秸秆培养基中, 在 10 °C 条件下恒温静置培养, 每隔 1 d 取样测定复合菌系的生长特性及秸秆分解特性; 每隔 2、5、7、10、12、15 d 取样测定秸秆降解率和菌种组成多样性。

1.4 主要测定指标与方法

1.4.1 复合菌系生长曲线及培养液 pH 值的动态

于接种后每隔 1 d 取培养液, 测定 pH 值, 之

后 3 000 r/min 离心 1 min, 取上清液在 600 nm 处测定吸光值(OD_{600} 值)。 OD_{600} 值和 pH 值分别使用紫外可见光分光光度计和微量 pH 计测定, 以不接菌为空白对照, 5 次重复。

1.4.2 复合菌系培养液可溶性糖含量和总糖含量的动态

于接种后每隔 1 d 取培养液, 测定可溶性糖(Soluble Sugar, Sc)含量和总糖(Total Sugar, Ts)含量, Sc 采用蒽酮比色法^[15]测定, Ts 采用苯酚硫酸法^[16]测定, 3 次重复。

1.4.3 复合菌系培养液氧化还原电位和可溶性化学需氧量的动态

于接种后每隔 1 d 取培养液, 测定氧化还原电位(Oxidation Reduction Potential, ORP)和可溶性化学需氧量(Soluble Chemical Oxygen Demand, sCOD), ORP 采用微量 pH 计测定, sCOD 根据国标 GB11914-89^[17]测定, 3 次重复。

1.4.4 复合菌系纤维素酶活性的动态

于接种后每隔 1 d 取培养液, 参照国际理论与应用化学联合会(IUPAC)推荐的方法^[18]测定 β -葡萄糖苷酶(β -D-Glucosidase, C_B)活性、内切酶(Endoglucanase, C_x)活性和外切酶(Exoglucanase, C_1)活性。

1.4.5 复合菌系玉米秸秆及木质纤维素降解率的动态

于接种后 2、5、7、10、12、15 d 采用失重法测定玉米秸秆降解率(Corn Straw Degradation Ratio, Sdr), 采用纤维素分析仪测定木质素、纤维素、半纤维的含量, 并计算木质素降解率(Lignin Degeadation Ratio, Ldr)、纤维素降解率(Cellulosic Degradation Ratio, Cdr)和半纤维素降解率(Hemicellulosic Degradation Ratio, Hdr), 3 次重复。

1.4.6 MiSeq 高通量测序

于接种后 2、5、7、10、12、15 d, 在无菌条件下吸取培养液 5 mL, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取不同培养时期复合菌系的基因组 DNA, PCR 扩增 16S rRNA 基因, 引物为 338F (5'-ACTCC

TACGGGAGGCAGCAG-5')和 806R (5'-GGACTAC HVGGGTWTCTAAT-3'), PCR 反应体系和程序参考 Shi 等的方法^[19]。配制 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 完成 MiSeq 高通量测序(北京奥维森基因科技有限公司), 对获得的数据通过序列拼接、过滤和去嵌合体得到优化序列, 进行 OTU 聚类及注释。

1.4.7 数据统计分析

复合菌系理化特性数据采用 SPSS 22.0 软件进行方差分析, 采用 Sigma Plot 12.5 作图。高通量测序利用 QIIME (V1.8.0)软件以 97%相似度水平将序列进行聚类物种分类的操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs), 并通过 Uclust (V1.8)和 Usearch (V8.1.1861)等数据库进行物种比对, 获得物种分类信息及丰度; 采用 SigmaPlot (V12.5)和 R (V3.6.1)软件绘制理化特性图和各分类水平丰度、主坐标分析(Principal Co-Ordinates Analysis, PCoA)及相关分析图, 基于聚类结果, 进行 α 多样性分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养时期复合菌系生长曲线与 pH 值动态

吸光值(OD_{600} 值)可反映微生物细胞密度。由图 1 可知, 在 10 °C 培养条件下复合菌系 GF-20 在 1 d 内进入对数生长期, 5 d 时吸光值增长至 1.87 并维持到 8 d, 之后缓慢降低至 1.46。发酵液 pH 值在培养 1 d 时由初始值 7.90 下降至 6.98, 显著低于 0 d ($P < 0.05$), 表明复合菌系初期发酵产生酸类物质, 使 pH 值快速降低。5 d 后, 发酵液的 pH 值回升到 7.79 左右, 10 d 时达 8.42, 15 d 时下降至 7.64 左右, 表明复合菌系 GF-20 具有良好的调节能力。

2.2 不同培养时期复合菌系发酵液 Sc 与 Ts 含量的动态

如图 2 所示, 复合菌系 GF-20 在 10 °C 培养条件下, 2 d 时可溶性糖(Sc)含量升高至 9.49 $\mu\text{g/mL}$,

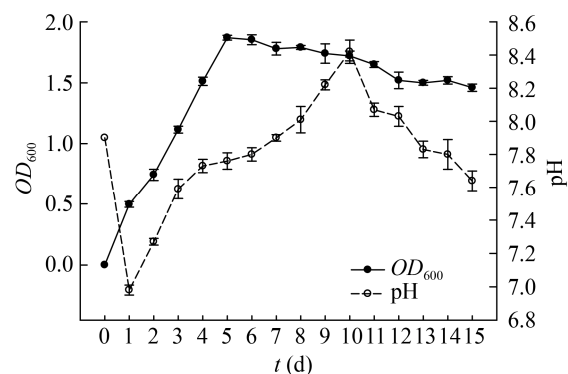


图 1 复合菌系 GF-20 OD_{600} 值与发酵液 pH 值动态
Figure 1 Dynamic of OD_{600} and pH values during the degradation of corn stover by GF-20

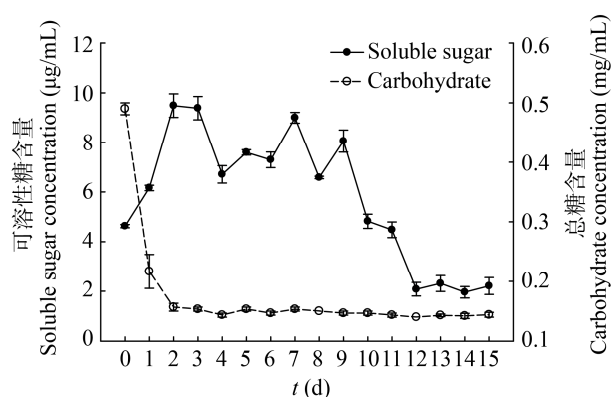


图 2 复合菌系 GF-20 发酵液可溶性糖含量与总糖含量动态
Figure 2 Dynamics of contents of soluble sugar and carbohydrate in fermentative fluid of corn stover by GF-20

9 d 后迅速降低再回升, 培养 12 d 后呈平稳状态, 15 d 时可溶性糖含量为 2.21 $\mu\text{g/mL}$ 。发酵液总糖(Ts)含量在 2 d 时迅速由 0.49 mg/mL 降低至 0.16 mg/mL, 之后趋于稳定。在秸秆降解过程中, 复合菌系 GF-20 中的组成菌株可能发生交替生长, 将玉米秸秆分解过程中产生的糖逐渐消耗。然而随着降解进程的推进, 易分解的物质越来越少, 最终导致总糖浓度趋于稳定。

9 d 后迅速降低再回升, 培养 12 d 后呈平稳状态, 15 d 时可溶性糖含量为 2.21 $\mu\text{g/mL}$ 。发酵液总糖(Ts)含量在 2 d 时迅速由 0.49 mg/mL 降低至 0.16 mg/mL, 之后趋于稳定。在秸秆降解过程中, 复合菌系 GF-20 中的组成菌株可能发生交替生长, 将玉米秸秆分解过程中产生的糖逐渐消耗。然而随着降解进程的推进, 易分解的物质越来越少, 最终导致总糖浓度趋于稳定。

2.3 不同培养时期复合菌系发酵液 sCOD 和 ORP 的动态

由图 3 可知, 复合菌系发酵液的 sCOD 值趋势与 ORP 一样, 随着培养时间的延长呈逐渐降低的

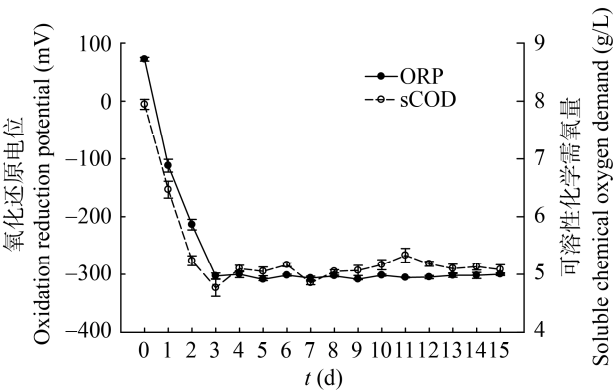


图3 复合菌系 GF-20 发酵液可溶性化学需氧量与氧化还原电位动态
Figure 3 Dynamics of sCOD and OPR in fermentative fluid of corn stover by GF-20

趋势。接种初期, 培养体系中的可溶性有机物含量高, 使得初始 sCOD 值较高, 为 7.95 g/L; 接种后, 微生物快速繁殖, 随着秸秆降解进程培养基中的营养物质迅速消耗, 使得 sCOD 值减小, 培养 4 d 时降低至 5.10 g/L; 培养体系中的 ORP 值在培养 1 d 时, 便由初始值 72 mV 降低至-112 mV, 第 3 天降低至-303 mV, 随后趋于平稳。

2.4 不同培养时期复合菌系纤维素酶活性的动态

如图 4 所示, 复合菌系 GF-20 纤维素酶活性随秸秆降解进程呈单峰曲线变化, β -葡萄糖苷酶(C_B)活性、内切酶(C_x)活性和外切酶(C_1)活性分别在 1.11–1.67、1.00–1.73 和 0.67–1.42 U/mL 之间,

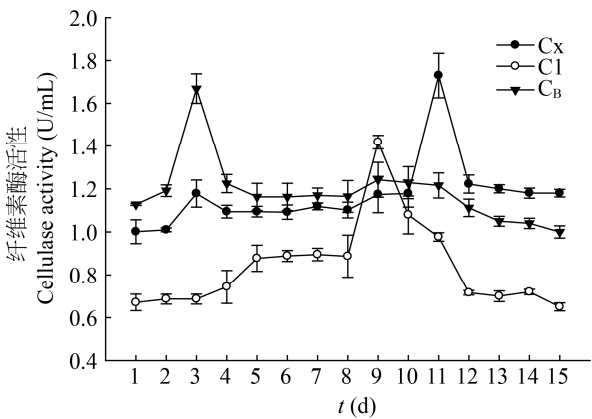


图4 复合菌系 GF-20 纤维素酶活性动态
Figure 4 Dynamics of cellulase enzyme activities in fermentative fluid of corn stover by GF-20

分别在第 3、11 和 9 天达到最高酶活性。复合菌系 GF-20 表现出较高的纤维素酶活性, 3 个酶组分协同分解玉米秸秆。

2.5 不同培养时期复合菌系玉米秸秆及木质纤维素降解率的动态

由表 1 可知, 培养前期(2、5 和 7 d), 复合菌系 GF-20 表现出良好的秸秆降解效率, 玉米秸秆降解率为 20.92%; 培养 15 d 时降解率为 31.97%, 木质素、纤维素和半纤维素降解率分别为 32.30%、44.85%和 43.84%。由此可知, 复合菌系在培养初期降解较强, 而且对纤维素和半纤维素表现出良好的降解能力。

表 1 复合菌系 GF-20 玉米秸秆及木质纤维素降解率的动态
Table 1 Dynamic corn stover and lignocellulose degradation ratio by GF-20

时间 Time (d)	玉米秸秆 Corn stover	木质素 Lignin	纤维素 Cellulose	半纤维素 Hemicellulose
2	11.50±1.73d	10.74±0.03f	11.76±0.21f	13.88±1.01e
5	18.17±0.77c	13.06±0.12e	19.12±1.71e	17.32±0.46d
7	20.92±2.33c	17.13±0.17d	22.79±1.30d	25.12±1.05c
10	27.33±1.35b	21.43±0.30c	26.47±0.37c	33.23±1.07b
12	28.67±2.46b	26.52±0.00b	35.29±0.67b	34.79±0.96b
15	31.97±1.44a	32.30±0.58a	44.85±2.02a	43.84±2.27a
F value	60.46*	3 986.22*	236.48*	205.44*

注: 不同英文字母和*表示在 0.05 水平下差异显著。下同
Note: Different letters and * indicate significant differences at the 0.05 level. The same below

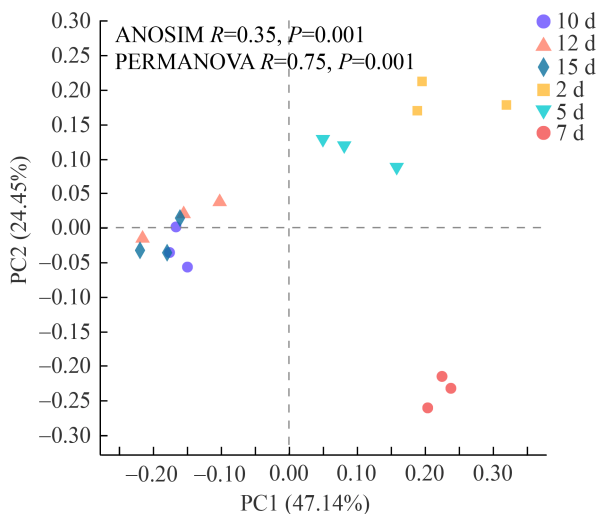


图 6 不同培养时期复合菌系的 PCoA 图

Figure 6 The PCoA map of GF-20 at different stages of cultivation

($P < 0.05$; $N = 999$ Permutations), 说明不同培养时期菌系物种组成及丰度存在差异。

2.8 不同培养时期复合菌系物种组成及相对丰度变化

在门分类水平(图 7), 不同时期样品主要由变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)等组成, 但其丰度存在显著差异。*Proteobacteria* 在 5 d 和 7 d 时期丰度显著高于 10、12 和 15 d ($P < 0.05$), 为 68.41% 和 65.23%, 培养后期 10、12 和 15 d 间差异不显著($P > 0.05$); *Bacteroidetes* 在培养中后期 10、12 和 15 d 丰度较高, 均 40% 以上且差异不显著($P > 0.05$); *Actinobacteria* 在培养中后期 (10、12 和 15 d) 的丰度高于 5 d 和 7 d 时期, 但差异不显著($P > 0.05$); *Cyanobacteria* 丰度在培养初期 (2、5 d) 显著高于 ($P < 0.05$) 后期 (12、15 d)。

在属分类水平(图 8), 不同培养时期鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)、根瘤菌(*Rhizobium*)、柄杆菌(*Caulobacter*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、*Nubsella*、产吡啶金杆菌(*Chryseobacterium*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)、纤维弧菌(*Cellvibrio*)、

Pleomorphomonas、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)、*Fluviicola*、*Taibaiella* 等菌属丰度存在显著差异 ($P < 0.05$), 氢噬菌(*Hydrogenophaga*) 丰度存在极显著差异 ($P < 0.01$)。 *Cellvibrio* 在 5 d 时期丰度显著高于其他时期, 为 29.55%, 其次为 2 d, 丰度为 16.33%, 7、10、12 和 15 d 时期丰度无显著差异, 为 10.13%–12.58%; *Taibaiella* 在培养 10、12 和 15 d 时期丰度显著高于 2、5 和 7 d, *Flavobacterium* 在培养 15 d 时期的丰度显著高于其他时期, 而 *Rhizobium*、*Chryseobacterium*、*Hydrogenophaga*、*Pseudomonas* 在 2、5 和 7 d 丰度显著高于 10、12 和 15 d 时期; *Azospirillum* 在 7 d 时期丰度显著高于其他时期, 为 9.92%, 其次为 5 d 和 10 d, 分别为 6.06% 和 5.59%; 纤维单胞菌 (*Cellulomonas*) 在 12、15 d 时丰度显著高于其他时期, 为 7.18% 和 6.39%; 复合菌系组成菌种丰度随培养时期呈波动变化, 培养初期 (2、5 d) *Cellvibrio*、*Chryseobacterium*、*Hydrogenophaga*、*Pseudomonas*、*Caulobacter*、贪噬菌(*Variovorax*)等菌属含量显著高于中后期 (12、15 d), *Taibaiella*、*Pleomorphomonas*、*Flavobacterium*、*Cellulomonas*、德沃斯氏菌(*Devosia*)、*Fluviicola*、*Stenotrophomonas*、*Dysgonomonas*、*Pedobacter* 等菌属含量随培养时间的延长丰度显

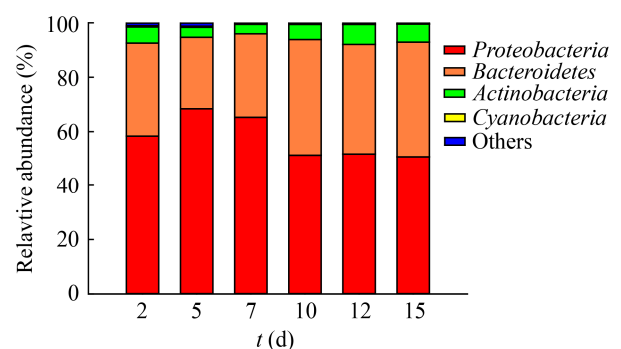


图 7 不同培养时期复合菌系 GF-20 门分类水平优势细菌群落组成

Figure 7 Bacterial composition of GF-20 in different stages of cultivation at the phylum taxon level

Note: Others represented bacteria which relative abundance were less than 1.00% in each sample

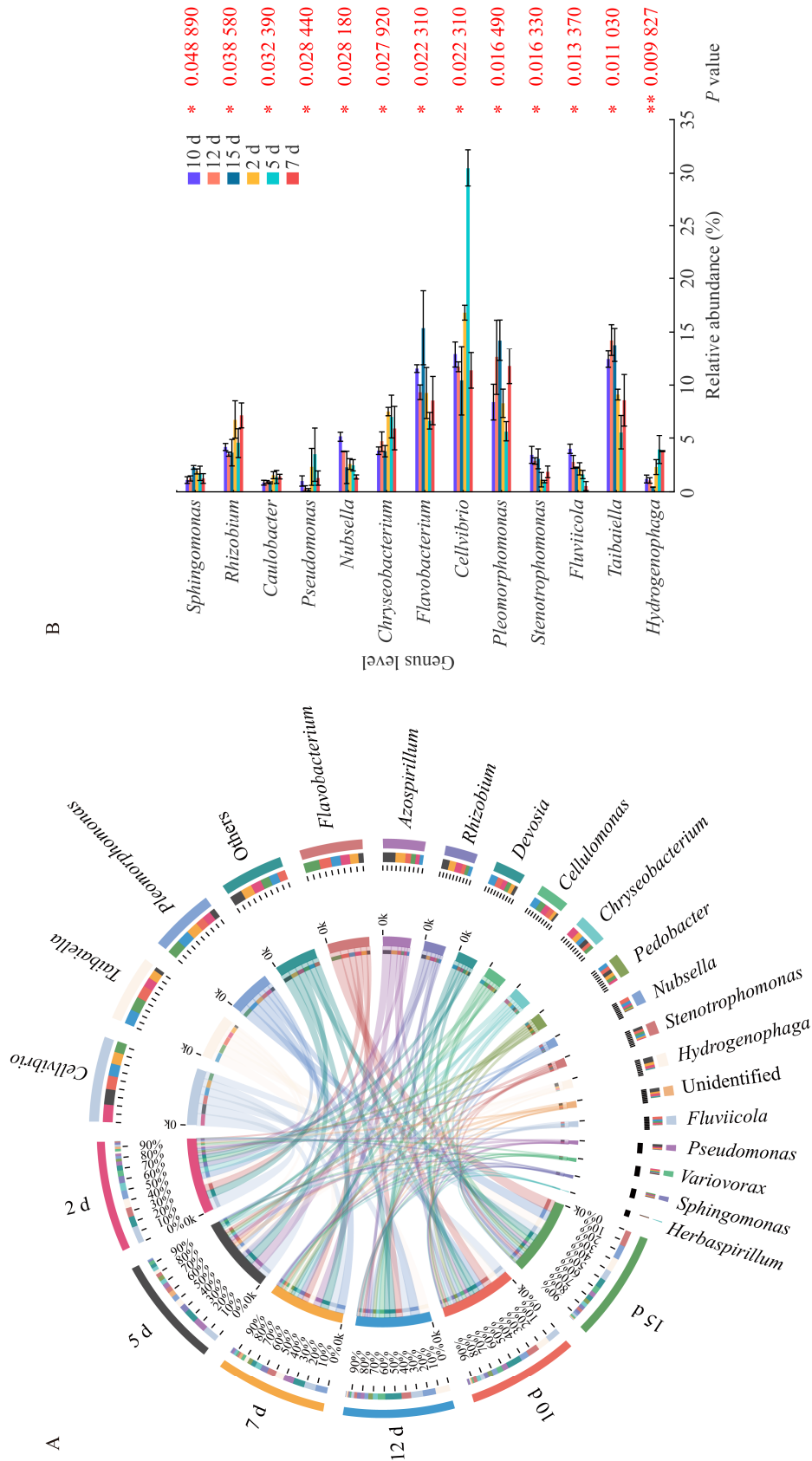


图 8 不同培养时期复合菌系 GF-20 属分类水平细菌群落的 Circos 聚类分析图(A)和差异分析图(B)
Figure 8 Circos cluster analysis of dominant genera (A) and difference analysis (B) at the genus taxon level at different cultivation stages of GF-20

著提高; 固氮螺菌(*Azospirillum*)、*Rhizobium*、*Nubsella* 等菌属在培养中期(7、10 d)其丰度显著高于初期(2、5 d)和后期(12、15 d)。

2.9 复合菌系理化特性与物种相关分析

将复合菌系 GF-20 降解玉米秸秆过程理化特性与群落演替中 Top 20 物种进行相关分析, 结果如图 9 所示, 菌落中的 *Cellvibrio*、*Taibaiella*、

Chryseobacterium、*Devosia*、*Stenotrophomonas*、*Nubsella*、*Fluviicola* 等降解纤维素或中间产物及烷烃类物质的主要关键菌群与 Cx 酶活性存在显著正相关关系, *Azospirillum* 和 *Pseudomonas* 与 C1 酶呈显著正相关, *Pleomorphomonas* 和 *Pseudomonas* 与 C_B 酶呈极显著正相关, *Pedobacter*、*Nubsella*、*Stenotrophomonas* 与 pH 值呈显著或极显著正相

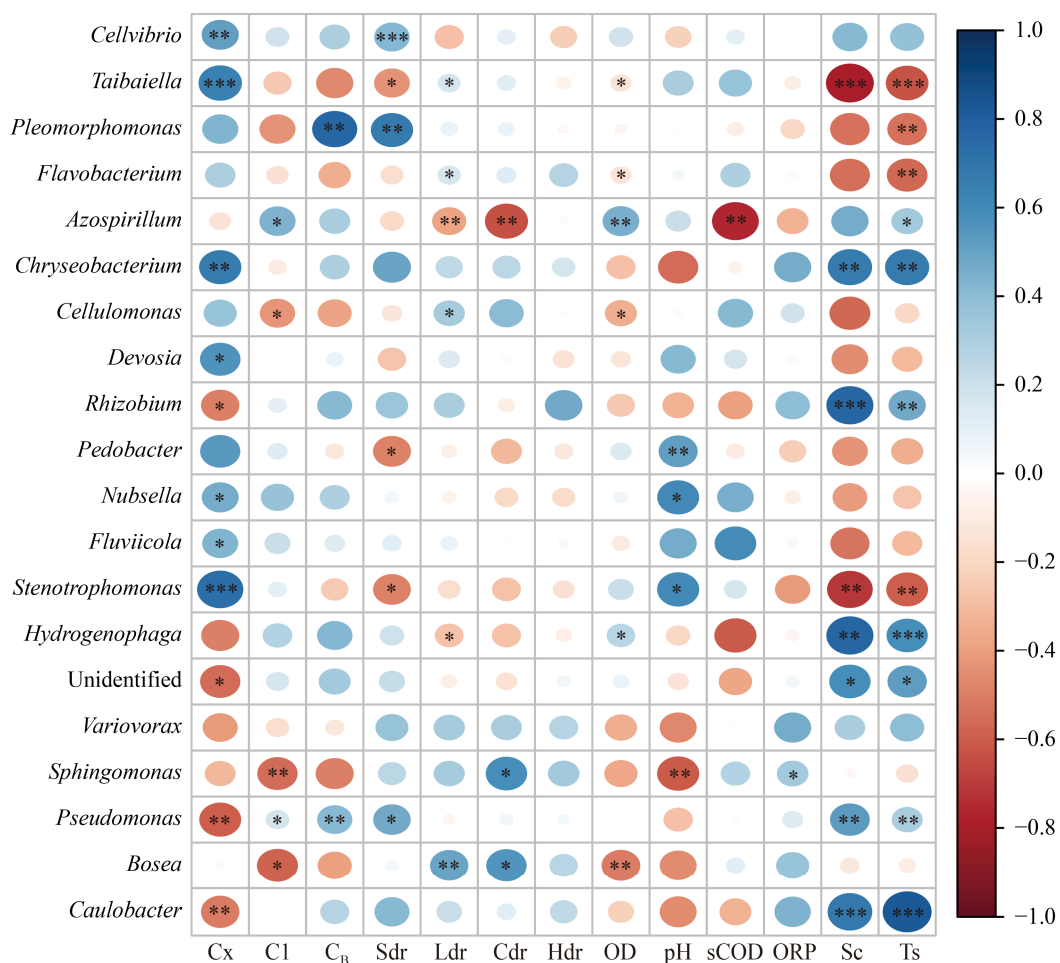


图 9 不同培养时期优势菌属与秸秆降解特性指标相关分析

Figure 9 Correlation analysis of dominant genera and straw degradation characteristics at different stages of cultivation of GF-20

注: Cx: 内切酶; C1: 外切酶; C_B: β-葡萄糖苷酶; Sdr: 玉米秸秆降解率; Ldr: 木质素降解率; Cdr: 纤维素降解率; Hdr: 半纤维素降解率; OD: OD₆₀₀; pH: pH 值; sCOD: 可溶性化学需氧量; ORP: 氧化还原电位; Sc: 可溶性糖含量; Ts: 总糖含量。*、**和***表示在 0.05、0.01 和 0.001 水平下显著相关

Note: Cx: Endoglucanases; C1: Exonuclease; C_B: β-D-glucosidase; Sdr: Corn stalk degradation ratio; Ldr: Lignin degradation ratio; Cdr: Cellulosic degradation ratio; Hdr: Hemicellulosic degradation ratio; OD: OD₆₀₀; pH: pH value; sCOD: Soluble chemical oxygen demand; ORP: Oxidation-reduction potential; Sc: Soluble sugar content; Ts: Total sugar content. *, ** and *** indicate significant correlation at the 0.05, 0.01 and 0.001 level

关, *Sphingomonas* 与 pH 值呈极显著负相关, *Azospirillum* 与 sCOD 呈极显著负相关, *Sphingomonas* 与 ORP 呈显著正相关, *Chryseobacterium*、*Rhizobium*、*Hydrogenophaga*、*Pseudomonas*、*Caulobacter* 与可溶性糖和总糖呈显著正相关, *Taibaiella*、*Stenotrophomonas* 与可溶性糖和总糖呈显著负相关。

3 讨论

目前,有关中高温(15–60 °C)条件下秸秆降解菌的筛选和特性研究较多,但应用于低温地区秋季原位还田玉米秸秆分解效果不佳。本研究中的复合菌系 GF-20 在 10 °C 低温条件下迅速进入对数生长期,分泌纤维素酶,协同分解玉米秸秆,在 10 °C 条件下培养 15 d 时玉米秸秆、纤维素、半纤维素和木质素降解率均达到 30% 以上。

3.1 复合菌系 GF-20 的玉米秸秆降解特性

复合菌系 GF-20 在接种玉米秸秆的初期,总糖含量、发酵体系 pH 值、可溶性化学需氧量、氧化还原电位等迅速降低,经菌种组成检测发现 *Cellvibrio*、*Chryseobacterium*、*Hydrogenophaga*、*Pseudomonas*、*Caulobacter* 等菌群丰度呈培养初期显著高于后期,说明其主要参与培养初期的秸秆降解进程。 α 多样性指数和 PCoA 分析表明,培养初期(2、5 d)多样性指数高且聚集在一起,说明培养初期物种组成丰度和结构较为相似。秸秆分解后各种可溶性糖的积累和被微生物分解利用引起可溶性糖含量变化,在玉米秸秆分解过程中可溶性糖含量呈波浪动态变化。sCOD 可间接反映碳源的多少,培养初期(0–3 d)由于培养基中残留有可溶性的有机物,使得初始的 sCOD 值比较高,秸秆被微生物降解而产生的可溶性糖含量大于微生物自身消耗,导致可溶性糖含量升高,随后 *Cellvibrio*、*Chryseobacterium* 等微生物迅速增殖,OD 值升高, pH 值下降,培养基中的营养物质被消耗掉, sCOD 值减小(图 3)。微生物消耗糖原满足自身生长代谢,分解底物玉米秸秆产生的糖被消耗,使得糖浓度难

以积累,2 d 时迅速降低至 0.16 mg/mL (图 2),以便于有足够的微生物数量来启动其难分解利用物质的降解机制;然而随着培养时间的延长,易分解的纤维素物质越来越少,12 d 后分解产生的糖不能满足自身消耗,最终导致总糖浓度趋于稳定。研究表明,秸秆降解过程中产生的糖会对后续分解产生阻碍作用,因此降解体系中产生的糖被迅速消耗,有利于后续秸秆降解^[20–21]。另外,底物降解过程中产生的酸,成为微生物呼吸底物被转化为 CO₂ 从体系中排除,也会引起 sCOD 的下降。ORP 值可间接反映厌氧条件的好坏。如图 3 所示,秸秆降解过程中 ORP 在培养第 1 天时迅速降低,随后趋于平稳,因为培养初期培养基中氧气充分,好氧微生物 *Cellvibrio*、*Hydrogenophaga*、*Pseudomonas* 迅速增殖生长,氧气被迅速消耗掉,ORP 呈现下降趋势,这便为兼性厌氧和厌氧菌 *Taibaiella*、*Pleomorphomonas*、*Flavobacterium*、*Cellulomonas*、*Rhizobium*、*Sphingomonas* 等创造了良好的生长环境,它们的丰度增加,消耗有机酸, pH 值升高。复合菌系 GF-20 保持较高的酶活性,较其他复合菌有明显的提升^[22]。以往秸秆分解菌的筛选和评价主要集中在中高温条件^[23–24],而 GF-20 培养 7 d 时降解率为 20.92%,15 d 时为 31.97%,可在较低的温度条件下促进秸秆降解。

3.2 复合菌系 GF-20 在玉米秸秆降解中的关键微生物

在门水平上, *Proteobacteria*、*Bacteroidetes* 和 *Actinobacteria* 是复合菌系 GF-20 的优势菌门,与其他降解体系优势门组成有些不同,从堆肥环境中筛选富集得到的降解菌群 EMSD5 和瘤胃细菌降解玉米秸秆体系中变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门是最丰富的 3 个门类^[25–26]。经相关分析发现, *Cellvibrio*、*Taibaiella*、*Chryseobacterium*、*Devosia* 等菌属与 C_x 酶活性存在显著正相关关系, *Azospirillum* 和 *Pseudomonas* 与 C₁ 酶呈显著正相关, *Pleomorphomonas* 和 *Pseudomonas* 与 C_B 酶呈极显著正相关(图 9), *Bosea*、*Sphingomonas*、

Cellulomonas 等与纤维素降解率呈正相关, *Bosea*、*Cellulomonas*、*Flavobacterium*、*Taibaiella* 等菌属与木质素降解率呈显著正相关(图 9), 推测 *Cellvibrio*、*Taibaiella*、*Pleomorphomonas*、*Flavobacterium*、*Azospirillum*、*Cellulomonas*、*Rhizobium*、*Chryseobacterium*、*Devosia*、*Pedobacter* 等丰度较高的菌种可能是复合菌系 GF-20 能够在较短的时间内高效降解玉米秸秆的关键物种。

复合菌系中 *Cellvibrio* 和 *Chryseobacterium* 在培养初期(2、5 d)其丰度显著高于培养中后期, *Cellvibrio* 属于产典型低温纤维素酶类的兼性厌氧微生物^[27-28], 可在低温条件下高效降解纤维素类物质; *Chryseobacterium* 可分泌降解细胞壁的纤维素酶和蛋白酶, 可与 *Pseudomonas* 协同降解纤维素^[29-30]。 *Taibaiella*、*Cellulomonas*、*Devosia*、*Pedobacter* 等菌群丰度表现为培养后期显著高于培养前期, 据报道 *Taibaiella* 的多个菌种可分泌纤维素分解酶系葡萄糖苷酶等, 可利用纤维素碳源^[31]; *Cellulomonas* 属的许多细菌应用于秸秆生物降解和生物修复领域, 分泌的纤维素酶活性高^[32]; *Devosia* 属细菌能分泌过氧化氢酶, 利用木糖、戊醛糖、纤维素等^[33]; *Pedobacter* 属细菌常富集于富含纤维素的土壤中, 具有纤维素降解能力^[34]。因此推测 *Cellvibrio*、*Chryseobacterium*、*Taibaiella*、*Cellulomonas*、*Devosia*、*Pedobacter* 是复合菌系降解纤维素的主要菌群。

复合菌中的 *Stenotrophomonas*、*Pleomorphomonas* 和 *Pedobacter* 表现为培养后期其丰度显著高于前期, 而 *Caulobacter* 则在培养初期丰度显著高于后期, *Stenotrophomonas* 属于纤溶微生物, 具有降解烷烃类物质的作用^[35]; *Caulobacter* 属于嗜冷微生物, 可在 4 °C 低温条件下生长, 以纤维二糖、木糖为碳源产酸, 分泌葡萄糖苷酶等水解酶类^[36]; *Pleomorphomonas* 和 *Pedobacter* 多报道于堆肥微生物菌群中或源自土壤, 分泌葡萄糖苷酶、糖苷水解酶, 可直接利用木质纤维素或间接利用秸秆降解中

间代谢产物醇类或糖苷类等, 促进秸秆分解^[29,37-38]; *Azospirillum* 属为固氮菌, 与 *Niveispirillum* 具有协同降解作用^[39]。以上菌群协同降解培养前期和后期的中间产物及烷烃类物质。

复合菌系中的 *Flavobacterium* 通过分泌过氧化氢酶、氧化酶、葡萄糖苷酶、半乳糖苷酶等酶系分解秸秆降解过程的中间产物丙酸、乳酸等, 消除底物反馈抑制作用^[40], 降解木质纤维素; *Rhizobium* 既可合成纤维素也降解木质素, 能够降解各种木质素单体、二聚体及柳枝草和紫花苜蓿的天然木质素, 并且分泌木质素过氧化物酶^[41]。 *Pseudomonas* 是高效降解木质纤维素细菌, 能分泌染料脱色过氧化物酶(DyPs)^[42-43]; *Hydrogenophaga* 通常分泌水解酶和氧化酶^[44]; *Sphingomonas* 菌属多报道于石油降解微生物中, 是降解多环芳烃(PAHs)的重要功能微生物^[45]。因此推测以上菌群可降解玉米秸秆中的木质素组分。

4 结论

复合菌系 GF-20 在降解玉米秸秆过程中迅速进入对数生长期, 发酵液的 sCOD、ORP、总糖含量呈降低后趋于稳定的变化, pH 值在 7.0-8.5 间浮动, 培养 15 d 时玉米秸秆、木质素、半纤维素和纤维素降解率分别为 31.97%、32.30%、44.85% 和 43.84%。不同培养时期, 复合菌系 GF-20 的组成菌种类和丰度不断变化, 培养初期(2、5 d)的 α 多样性指数较高且物种结构相似。复合菌系 GF-20 的优势菌属为 *Cellvibrio*、*Chryseobacterium*、*Azospirillum*、*Rhizobium*、*Taibaiella*、*Pleomorphomonas*、*Flavobacterium*、*Cellulomonas*、*Devosia*、*Pedobacter*, 与其他组成微生物协同作用, 从而高效降解玉米秸秆。本研究结果为秸秆生物质的转化与利用提供了一定的理论指导。

REFERENCES

- [1] Yang JH, Luo YL, Chen J, Jin M, Wang ZL, Li Y. Effects of main food yield under straw return in China: a

- meta-analysis[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(21): 4415-4429 (in Chinese)
杨竣皓, 骆永丽, 陈金, 金敏, 王振林, 李勇. 秸秆还田对我国主要粮食作物产量效应的整合(Meta)分析[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(21): 4415-4429
- [2] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(3): 453-461
- [3] Petersson L, Kvien I, Oksman K. Structure and thermal properties of poly(lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials[J]. *Composites Science and Technology*, 2007, 67(11/12): 2535-2544
- [4] Jing RX, Zhang ZY, Jia P, Li Y. Isolation and identification of cellulose degrading strain *Bacillus* sp. D2 and its influencing factors on enzyme production[J]. *Journal of Henan University: Natural Science*, 2020, 50(6): 675-683 (in Chinese)
景如贤, 张志宇, 贾培, 李伟. 纤维素降解菌株 D2 的分离鉴定及其产酶影响因素的研究[J]. *河南大学学报: 自然科学版*, 2020, 50(6): 675-683
- [5] Jiang GF, Bao YZ, Yang TJ, Zheng HP, Mei XL, Wei Z, Xu YC, Shen QR. Screening of thermophilic cellulolytic bacteria and investigation of cellulase thermostability[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(10): 2465-2472 (in Chinese)
江高飞, 暴彦灼, 杨天杰, 郑海平, 梅新兰, 韦中, 徐阳春, 沈其荣. 高温秸秆降解菌的筛选及其纤维素酶活性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(10): 2465-2472
- [6] Yin J, Liu YQ, Yu F, Cai JC, Liu TY. Screening and identification of a lignin-degrading bacterium and its application in composting[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2019(3): 179-185 (in Chinese)
尹静, 刘悦秋, 于峰, 蔡建超, 刘天月. 一株木质素降解菌的筛选鉴定及其在堆肥中的应用[J]. *中国土壤与肥料*, 2019(3): 179-185
- [7] Su X, Wang JH, Zhang FZ, Liu JL, Gong GL, Ouyang XL, Wei D, Zhao HY, Song FQ, Yan L, et al. Microbial community succession associated with corn straw degradation in a bacterium consortium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(12): 2675-2689 (in Chinese)
苏鑫, 王敬红, 张方政, 刘嘉乐, 巩光禄, 欧阳晓伦, 魏丹, 赵洪颜, 宋福强, 晏磊, 等. 复合菌系降解玉米秸秆过程中群落演替与秸秆降解的关系[J]. *微生物学报*, 2020, 60(12): 2675-2689
- [8] Haruta S, Cui Z, Huang Z, Li M, Ishii M, Igarashi Y. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(4/5): 529-534
- [9] Yang HY, Wu H, Wang XF, Cui ZJ, Li YH. Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3546-3550
- [10] Cui ZJ, Li MD, Piao Z, Huang ZY, Ishii M, Igarashi Y. Selection of a composite microbial system MC1 with efficient and stability cellulose degradation bacteria and its function[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2002, 23(3): 36-39 (in Chinese)
崔宗均, 李美丹, 朴哲, 黄志勇, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi. 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
- [11] Li J, Zhang HN, Zhao C, Zhang JY, Zhang Q, Zhang JY, Liu MK, Chen Q, Zhao K. Isolation and screening of cellulose decomposing microbe and the straw decomposing effect of complex microbial system[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, 22(4): 689-696 (in Chinese)
李静, 张瀚能, 赵翀, 张金羽, 张琪, 张靖莹, 刘茂柯, 陈强, 赵珂. 高效纤维素降解菌分离筛选、复合菌系构建及秸秆降解效果分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 22(4): 689-696
- [12] Wei W, Song SL, Wu H, Zhang L, Guan YX, Li YS, Dai CC. Effects of compound microbial agent on corn straw degradation and soil ecological properties[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2019, 50(2): 323-332 (in Chinese)
魏蔚, 宋时丽, 吴昊, 张丽, 管永祥, 李运生, 戴传超. 复合菌剂对玉米秸秆的降解及土壤生态特性的影响[J]. *土壤通报*, 2019, 50(2): 323-332
- [13] Qinggeer, Gao JL, Yu XF, Zhang BL, Wang ZG, Borjigin N, Hu SP, Sun JY, Xie M, Wang Z. Screening of a microbial consortium with efficient corn stover degradation ability at low temperature[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(10): 2369-2379
- [14] Yu XF, Borjigin Q, Gao JL, Wang ZG, Hu SP, Borjigin N, Wang Z, Sun JY, Han SC. Exploration of the key microbes and composition stability of microbial consortium GF-20 with efficiently decomposes corn stover at low temperatures[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(8): 1893-1904
- [15] Arthur Thomas T. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1977, 28(7): 639-642
- [16] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related

- substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356
- [17] State Bureau of Environmental Protection of the People's Republic of China. National Standard (Mandatory) of the People's Republic of China: Water quality-Determination of the chemical oxygen demand-Dichromate method. GB 11914-1989[S]. Beijing: Standards Press of China (in Chinese)
国家环境保护局. 中华人民共和国国家标准: 水质 化学需氧量的测定 重铬酸盐法 GB 11914-1989[S]. 北京: 中国标准出版社
- [18] Ghose TK. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268
- [19] Shi WH, Qin M, Chen F, Xia B. Supragingival microbial profiles of permanent and deciduous teeth in children with mixed dentition[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146938
- [20] Hanif A, Yasmeen A, Rajoka MI. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*[J]. Bioresource Technology, 2004, 94(3): 311-319
- [21] McCarthy JK, Uzelac A, Davis DF, Eveleigh DE. Improved catalytic efficiency and active site modification of 1,4- β -D-glucan glucohydrolase A from *Thermotoga neapolitana* by directed evolution[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(12): 11495-11502
- [22] Li PP, Wang XJ, Yuan XF, Wang XF, Cao YZ, Cui ZJ. Screening of a composite microbial system and its characteristics of wheat straw degradation[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(10): 1586-1594
- [23] Feng YJ, Yu YL, Wang X, Qu YP, Li DM, He WH, Kim BH. Degradation of raw corn stover powder (RCSP) by an enriched microbial consortium and its community structure[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 742-747
- [24] Qiao JT, Guo RB, Yuan XZ, Shi XS, Xu XH, Fan XL, Qiu YL. Phylogenetic analysis of methanogenic corn stalk degrading microbial communities[J]. Environmental Science, 2013, 34(4): 1531-1539 (in Chinese)
乔江涛, 郭荣波, 袁宪正, 师晓爽, 许晓晖, 范晓蕾, 邱艳玲. 玉米秸秆厌氧降解复合菌系的微生物群落结构[J]. 环境科学, 2013, 34(4): 1531-1539
- [25] Zhu N, Yang JS, Ji L, Liu JW, Yang Y, Yuan HL. Metagenomic and metaproteomic analyses of a corn stover-adapted microbial consortium EMSD5 reveal its taxonomic and enzymatic basis for degrading lignocellulose[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 243
- [26] Guo W, Li Y, Wang LZ, Wang JW, Xu Q, Yan TH, Xue B. Evaluation of composition and individual variability of rumen microbiota in yaks by 16S rRNA high-throughput sequencing technology[J]. Anaerobe, 2015, 34: 74-79
- [27] Wu YR, He JZ. Characterization of a xylanase-producing *Cellvibrio mixtus* strain J3-8 and its genome analysis[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10521
- [28] Nelson CE, Gardner JG. In-frame deletions allow functional characterization of complex cellulose degradation phenotypes in *Cellvibrio japonicus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(17): 5968-5975
- [29] Bhise KK, Bhagwat PK, Dandge PB. Synergistic effect of *Chryseobacterium gleum* sp. SUK with ACC deaminase activity in alleviation of salt stress and plant growth promotion in *Triticum aestivum* L.[J]. 3 Biotech, 2017, 7(2): 105
- [30] Maki M, Iskhakova S, Zhang TZ, Qin WS. Bacterial consortia constructed for the decomposition of *Agave* biomass[J]. Bioengineered, 2014, 5(3): 165-172
- [31] Kim MK, Pulla RK, Kim SY, Yi TH, Soung NK, Yang DC. *Sanguibacter soli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(Pt 3): 538-541
- [32] Yin LJ, Huang PS, Lin HH. Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp. YJ5[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(17): 9833-9837
- [33] Hassan YI, Lepp D, Zhou T. Genome assemblies of three soil-associated *Devosia* species: *D. insulae*, *D. limi*, and *D. soli*[J]. Genome Announcements, 2015, 3(3): e00514-e00515
- [34] Evdokimova EV, Gladkov GV, Kuzina NI, Ivanova EA, Kimeklis AK, Zverev AO, Kichko AA, Aksenova TS, Pinaev AG, Andronov EE. The difference between cellulolytic 'culturomes' and microbiomes inhabiting two contrasting soil types[J]. PLoS One, 2020, 15(11): e0242060
- [35] Xiao JJ, Li YL, Yang Q. Degradation of toluene in petroleum contaminated soil by *Stenotrophomonas* sp. MJ-1[J]. Environmental Engineering, 2018, 36(4): 186-189 (in Chinese)
肖建军, 李亚龙, 杨琦. 寡养单胞菌降解石油污染土壤中的甲苯[J]. 环境工程, 2018, 36(4): 186-189
- [36] Sun LN, Yang ED, Wei JC, Tang XY, Cao YY, Han GM. *Caulobacter flavus* sp. nov., a stalked bacterium isolated from rhizosphere soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt12): 4374-4380
- [37] Das S, Jeong ST, Das S, Kim PJ. Composted cattle manure increases microbial activity and soil fertility more than composted swine manure in a submerged rice paddy[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1702
- [38] Da XY, Jiang F, Chang XL, Ren L, Qiu X, Kan WJ, Zhang YM, Deng SS, Fang CX, Peng F. *Pedobacter ardeleyensis* sp. nov., isolated from soil in Antarctica[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt11): 3841-3846

- [39] Kupryashina MA, Petrov SV, Ponomareva EG, Nikitina VE. Ligninolytic activity of bacteria of the genera *Azospirillum* and *Niveispirillum*[J]. Microbiology, 2015, 84(6): 791-795
- [40] Kang JY, Chun J, Jahng KY. *Flavobacterium aciduliphilum* sp. nov., isolated from freshwater, and emended description of the genus *Flavobacterium*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt 5): 1633-1638
- [41] Laus MC, Van Brussel AA, Kijne JW. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2005, 18(6): 533-538
- [42] Kumar P, Maharjan A, Jun HB, Kim BS. Bioconversion of lignin and its derivatives into polyhydroxyalkanoates: challenges and opportunities[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2019, 66(2): 153-162
- [43] Rahmanpour R, Bugg TDH. Characterisation of Dyp-type peroxidases from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: oxidation of Mn(II) and polymeric lignin by Dyp1B[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2015, 574: 93-98
- [44] Xing W, Li JL, Li P, Wang C, Cao YN, Li DS, Yang YF, Zhou JZ, Zuo JE. Effects of residual organics in municipal wastewater on hydrogenotrophic denitrifying microbial communities[J]. Journal of Environmental Sciences, 2018, 65: 262-270
- [45] Zhou LS, Li H, Zhang Y, Wang YF, Xu H. Analysis of *Sphingomonas* genetic diversity in petroleum-contaminated soils by using PCR-DGGE technique[J]. Acta Pedologica Sinica, 2011, 48(4): 804-812 (in Chinese)
周丽沙, 李慧, 张颖, 王亚菲, 徐慧. 石油污染土壤鞘氨醇单胞菌遗传多样性 16S rDNA-PCR-DGGE 分析[J]. 土壤学报, 2011, 48(4): 804-812