

一株发酵纤维素产丁酸菌及其代谢动力学特性

迟雪¹,李建政^{1*},艾斌凌² (1.哈尔滨工业大学,城市水资源与水环境国家重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150090; 2.中国热带农业科学院海口实验站,海南 海口 570102)

摘要: 为开发降解纤维素产丁酸菌的种子资源,从牛粪、猪粪堆肥、玉米地土壤和腐木混合物的富集样品中分离得到一株厌氧降解纤维素产丁酸菌.该菌株细胞呈杆状,长7.1~9.1 μm ,直径1.2 μm 左右,经鉴定为丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*),命名为*C. Butyricum* DCB.在35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,菌株DCB在纤维二糖液体培养基中的最大比生长速率为0.6536 h^{-1} ,世代时间为1.06h,纤维二糖降解速率为0.1g/(L·h),丁酸生成速率为0.06g/(L·h).该菌株利用纤维素发酵产丁酸的转化率高达0.23g/g,具有良好的开发前景.

关键词: 纤维素; 丁酸; 丁酸梭菌; 转化率; 代谢动力学

中图分类号: X172,X382 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2016)01-0232-06

Butyric production and metabolic kinetics of a novel cellulose degrading strain. CHI Xue¹, LI Jian-zheng^{1*}, AI Bin-ling² (1.State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2.Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570102, China). *China Environmental Science*, 2016,36(1): 232~237

Abstract: A novel anaerobic strain, which could digest cellulose during butyric acid production, was isolated from an enrichment culture of cow dung, pig manure, corn soil and rotten wood. The strain was a bacillus with a length of 7.1~9.1 μm and a diameter of about 1.2 μm . It belonged to *Clostridium butyricum* and named *C. Butyricum* DCB. Strain DCB had a specific growth rate of 0.6536 h^{-1} in cellobiose medium at 35 $^{\circ}\text{C}$. In addition to this, the generation time, degradation rate and butyric acid production rate of Strain DCB were 1.06h, 0.1g/(L·h) and 0.06g/(L·h), respectively. In cellulose medium at 35 $^{\circ}\text{C}$, the highest butyric acid conversion ratio was 0.23g/g.

Key words: cellulose; butyric acid; *Clostridium butyricum*; conversion ration; metabolic kinetics

丁酸是一种应用广泛的化工原料^[1-4],其工业生产目前主要采用源于石油化工的正丁醛氧化法^[5].与化学法相比,生物发酵法具有原料广泛、环境友好和可持续等优点^[4].在已有的研究中,用于丁酸发酵的主要原料有淀粉、糖蜜、乳清、马铃薯等,也有利用纤维素酶解物为原料的报道^[6-9].纤维素是地球上储量最丰富的一类可再生资源,占植物干重的1/3到1/2^[10-11].以纤维素为原料发酵生产丁酸,不仅可保证相关产业的良性可持续发展,同时也可大幅降低原料成本.现有的纤维素发酵产丁酸研究,一般是先利用纤维素酶将木质纤维素水解为葡萄糖、木糖等单糖,再利用微生物发酵产丁酸^[12-13],而纤维素酶的高成本极大限制了木质纤维素发酵产丁酸技术^[1,4,14].筛选和利用可以直接降解纤维素的丁酸发酵菌种,则是突破这一瓶颈的有效途径之一.针对发酵纤

维素产丁酸菌种资源还比较缺乏的现状,分离筛选更多的具有工业化应用前景的菌种并对其进行深入研究,具有重要意义^[9,15-17].

本文以降解稻草秸秆产丁酸菌群的富集物为分离源,筛选到一株降解纤维素并以丁酸为主要发酵产物的厌氧菌株,在分子生物学鉴定的基础上,对其进行了纤维二糖发酵动力学特征分析,为其进一步的研究和开发奠定基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌种来源:用于丁酸发酵菌株分离的菌源样

收稿日期: 2015-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51478141);城市水资源与水环境国家重点实验室基金项目(2013DX11)

* 责任作者, 教授, ljz6677@163.com

品,为本实验室保存的厌氧降解纤维素产丁酸混合菌群.该菌群是以稻草秸秆为底物,由牛粪、猪粪堆肥、玉米地土壤和腐木的混合物富集获得^[18].

1.2 培养基

基础培养基(g/L): KH_2PO_4 ,0.41; Na_2HPO_4 ,1.06; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,0.1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,0.3; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,0.11; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,0.0045;EDTA- Na_2 ,0.00165;半胱氨酸 0.5;酸性微量元素溶液 1mL/L,碱性微量元素 1mL/L,维生素溶液 0.2mL/L^[19].

富集培养基:在基础培养基中加入 5g/L 的滤纸条.

纤维素固体培养基:在基础培养基中加入 10g/L 微晶纤维素、1g/L 酵母粉和 15g/L 琼脂.

纤维二糖液体培养基:在基础培养基中加入 10g/L 的纤维二糖和 0.5g/L 酵母粉.

纤维素液体培养基:在基础培养基中加入 10g/L 微晶纤维素和 0.5g/L 酵母粉.

1.3 实验方法

细菌的进一步富集、分离纯化和发酵动力学特性测试,均在厌氧条件下进行.

1.3.1 细菌的进一步富集 对实验室保存的厌氧降解纤维素产丁酸混合菌群进行复壮培养后,以 5%(V/V)的接种量将菌液接种到富集培养基中进行连续传代培养.培养温度为 35℃,静置,培养时间以滤纸完全崩溃为度.

1.3.2 细菌的分离纯化 将第三代富集培养物接种到纤维素固体培养基中,滚管,35℃下静置培养,待长出肉眼可见的菌落后,用毛细管挑取单菌落接种到纤维二糖液体培养基中,35℃、100r/min 培养 2d;按照 5%(V/V)的比例将纤维二糖发酵液转接到纤维素液体培养基中,35℃、100r/min 培养 5d;以纤维素发酵液为接种物转接到纤维素固体培养基中,滚管,35℃下静置培养.重复以上操作 4 次.

1.3.3 菌株的筛选 将通过操作 1.3.2 节获得的单菌落接种于刚果红纤维素固体培养基中,观察菌落形成及菌落周边是否有透明圈形成,以确定菌株的纤维素降解能力.将确定的具有纤维素降解能力的菌落,接入纤维素液体培养基,35℃厌氧培养 5d,测定培养系统中的挥发酸(VFAs)及其组分浓度,从中筛选出产丁酸能力较强的培养物进

行纯度检验.

1.3.4 培养物纯度检验 将 1.3.3 节筛选出的产丁酸能力较强的培养物,以 5%(V/V)的接种量接种到纤维二糖固体培养基中,滚管,35℃厌氧培养 2d;选取菌落形态一致的厌氧滚管,对其中的培养物进行光学显微镜和扫描电子显微镜(S-3400N, Hitachi)观察,挑选出菌体形态一致的样品.

1.3.5 菌株的分子生物学鉴定 将菌株纯培养物接种到纤维二糖液体培养基中培养至对数生长期,离心收集菌体,使用上海华舜生物工程有限公司小量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA;以通用引物(正向引物 27f:5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3',反向引物 1492r:5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增;扩增产物转入感受态大肠杆菌后,委托上海生工生物有限公司进行 16S rRNA 基因序列测定.利用美国国立生物技术信息中心(NCBI)的 BLAST 程序,对测序结果进行同源性比对.

1.3.6 菌株发酵动力学特性测试 在装有 60mL 纤维二糖液体培养基的 150mL 厌氧瓶中,接入 3mL 纯培养物,35℃、100r/min 培养;分别在 0、2、4、6、10、14、22 和 30h 以注射器排气并采集液体样品 3.0mL,分别测定发酵液样品的细胞浓度、还原糖浓度、pH 值以及 VFAs 等指标.测试采用 3 个平行,结果取平均值.

1.3.7 菌株发酵纤维素产丁酸能力测试 采用纤维素液体培养基,自然 pH 值,35℃、100r/min 培养.每天测定系统的 pH 值和 VFAs,发酵 4d 至系统的 pH 值和 VFAs 不再变化时,测定系统的纤维素残量.测试亦采用 3 个培养系统平行进行.

1.4 分析方法

发酵液的 pH 值、吸光度(OD)、菌体干重、微晶纤维素含量均依照国家标准方法进行测定^[20].其中,pH 值用 DELTA32 型 pH 计(Mettler Toledo)测定,OD 值采用紫外可见分光光度计(上海天美,UV2300)测量,菌体干重和微晶纤维素含量采用恒重法确定.发酵系统中的菌体干重采用 OD_{600} -菌体干重拟合曲线的回归方程进行计算,回归方程为 $y=0.6386x(R^2=0.9568)$.

发酵液中的 VFAs 采用 SP-6890 气相色谱仪

(FID 检测器)(山东鲁南瑞虹)测定,还原糖浓度采用 DNS 法测量^[21].

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与筛选

对分离得到的培养物进行发酵纤维素产丁酸能力测试,从中筛选出丁酸产量较高的菌株 12 个.如表 1 所示,这 12 株细菌发酵纤维素的液相产物均为丁酸和乙酸,其中编号为 22-3 的培养物具有最强的产丁酸能力,经 3d 发酵,其 VFAs 产量达到 0.35g/L,丁酸产量为 0.23g/L,占到 VFAs 总量的 66%.将该菌株选定为目标菌种,进行进一步的测试.

表 1 筛选菌株发酵纤维素产酸特性

Table 1 Fermentative organic acid production from cellulose by candidate bacteria

菌株 编号	乙酸 (g/L)	丁酸 (g/L)	总挥发酸 (g/L)	丁酸比例 (%)
3-1	0.21	0.11	0.32	34
6-1	0.09	0.17	0.26	65
12-3	0.11	0.16	0.27	59
13-1	0.15	0.18	0.33	54
15-3	0.12	0.18	0.30	60
18-2	0.14	0.16	0.30	53
20-1	0.12	0.19	0.31	61
22-3	0.12	0.23	0.35	66
27-2	0.08	0.14	0.22	63
32-2	0.12	0.21	0.33	63
34-3	0.11	0.18	0.29	62
35-3	0.12	0.22	0.34	65

2.2 菌种的分子生物学鉴定

电子扫描显微镜观察表明,编号为 22-3 菌株的菌体呈杆状,成对存在,单细胞直径为 1.2μm 左右,长 7.1~9.1μm(图 1).在微晶纤维素固体培养基上形成的菌落,白色,不透明,圆形,边缘不规整.在加入刚果红的纤维素固体培养基中,培养形成的菌落周边均出现了透明圈,证明该菌株具有降解纤维素的能力^[22].

将 16S rRNA 基因序列(长度为 1476bp)与 GenBank 中的序列进行同源性比对,结果表明,该菌株与丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)相似度最高(99%),而与 *C. beijerinckii* 和 *C.*

saccharoperbutylacetonicum 的相似度均为 98%.结果证明该菌株在分类上属于 *C. butyricum*,将其命名为 *C. Butyricum* DCB.

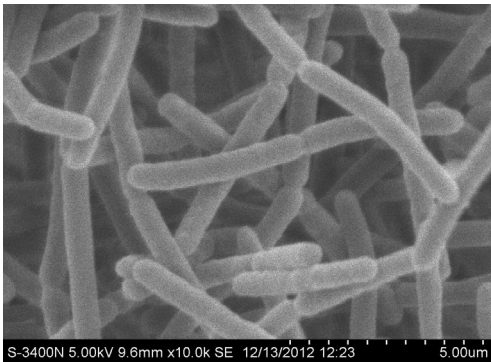


图 1 菌株 DCB 的菌体形态

Fig.1 Morphological characteristics of strain DCB

2.3 菌株 DCB 的生长动力学特征

为研究菌株 DCB 的生长动力学特性,借助于纤维二糖液体培养基,对其进行了发酵培养测试.结果表明(图 2),菌株 DCB 在纤维二糖液体培养基中,经过 6h 的迟缓期后进入对数生长期,并在第 14h 后进入稳定期,直到第 30h 培养结束.

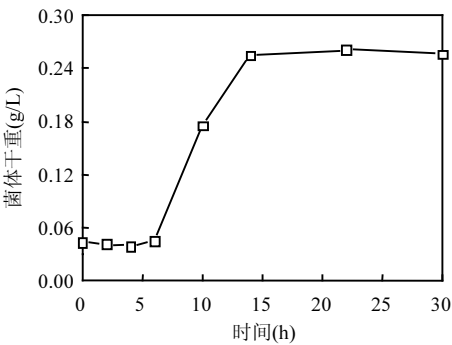


图 2 菌株 DCB 的群体生长规律

Fig.2 Growth of strain DCB in batch culture

借助描述有限空间内种群增长基本规律的 Logistic 方程对菌株群体在对数生长期和稳定期的生长状态进行分析^[23],方程表达如式(1)所示.

$$X = X_0 e^{\mu_m t} \left[1 - \frac{X_0 (1 - e^{\mu_m t})}{X_m} \right] \tag{1}$$

式中: X_0 为发酵系统的初始生物量,g/L; X_m 为发酵过程获得的最大生物量,g/L; μ_m 表示菌群的最大

比生长速率, h^{-1} ; t 为发酵时间, h .

对方程(1)两边同时取对数得:

$$\ln \frac{X}{X_m - X} = \mu_m t - \ln \left(\frac{X_m}{X_0} - 1 \right) \quad (2)$$

其中, X_m 可由实验测得.

以 $\ln \frac{X}{X_m - X}$ 对时间 t 作图得一直线, 其斜率

为 μ_m , 而其截距即为 $-\ln \left(\frac{X_m}{X_0} - 1 \right)$, 由此可计算得

到发酵系统初始菌体浓度 X_0 .

由图 3 所示的实验数据计算得到: $\mu_m = 0.6536 h^{-1}$, $X_0 = 0.0028 g/L$.

将参数 μ_m 、 X_0 、 X_m 代入式(1), 得到菌株 DCB 发酵纤维二糖过程的群体生长动力学方程:

$$X = \frac{0.0028 e^{0.6536t}}{1 - 0.0028(1 - e^{0.6536t})} \quad (3)$$

在对数期生长期, 菌株 DCB 的代时为 $T_d = \ln 2 / \mu_m = 1.06(h)$.

2.4 菌株 DCB 的丁酸生成动力学特征

以纤维二糖液体培养基对菌株 DCB 丁酸生成动力学特性的测试结果表明(图 3), 菌株 DCB 发酵纤维二糖产丁酸的生成速率与菌体的群体增长规律(图 2)在进程上呈现出高度一致性. 经过 6h 的迟缓期, 发酵系统中的丁酸和乙酸浓度开始迅速增加, 到第 14h 后趋于平稳. 由于 VFAs 的不断产生和累积, 导致发酵系统 pH 值迅速下降, 在第 14h 对数期结束时降低到了 4.1 以下(图 3a). 尽管此时系统中仍有大量纤维二糖残留, 但发酵产物(图 3b)及生物量(图 2)均不再有明显变化, 说明菌体活性受到严重抑制.

基于菌株 DCB 产物形成与菌体生长的高度偶联性, 采用 Leudeking-piret 模型对其丁酸生成动力学特性进行分析^[24]. 设, 丁酸生成速率与生物量增长速率的相关系数为 β , 则有:

$$\frac{dP}{dt} = \beta \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

式中: P 为丁酸的累积量, g/L ; X 为发酵过程中的生物量, g/L ; t 为发酵时间, h .

对式(4)两边同时积分得:

$$P = \beta X + C \quad (5)$$

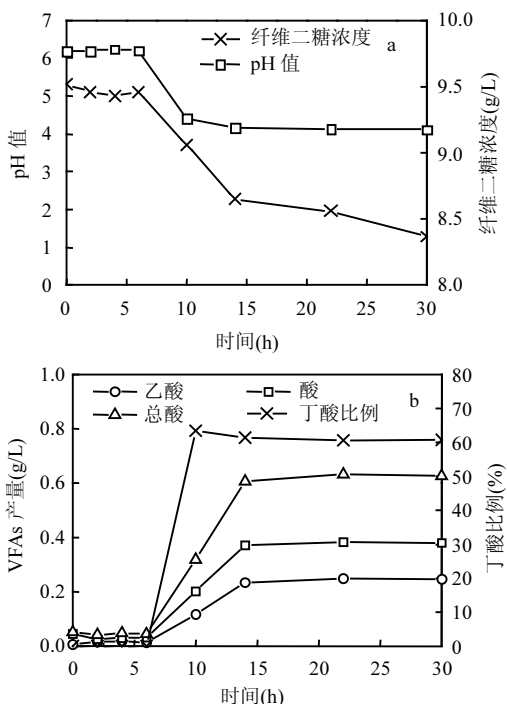


图 3 菌株 DCB 发酵纤维二糖产酸过程

Fig.3 Organic acid producing process from cellobiose by fermentation of strain DCB

当 $t=0$ 时, $P=0$, 常数 $C = -\beta X_0$. 将 C 代入式(5)并整理得:

$$P = \beta(X - X_0) \quad (6)$$

式(6)表达的是菌体在对数生长期产物丁酸的累积特征. 以 P 对 $(X - X_0)$ 作图, 得一直线, 其回归方程为 $P = 1.3664(X - X_0)$ ($R^2 = 0.9555$), 其中, 斜率 1.3664 即为 β . 将式(3)和 β 与式(6)联立, 得丁酸生成动力学方程:

$$P = \frac{1.3664 \times 0.0028 e^{0.6536t}}{1 - 0.0028(1 - e^{0.6536t})} - 0.0109 \quad (7)$$

由式(7)计算得到菌株 DCB 在对数生长期的丁酸累积生成量为 0.48g/L, 其生成速率为 0.06g/(L·h).

2.5 菌株 DCB 的纤维二糖降解动力学特征

底物降解速率与发酵系统的生物量有如下关系^[25]:

$$\frac{dS}{dt} = -k \frac{dX}{dt} \quad (8)$$

式中: S 为发酵液中纤维二糖浓度, g/L ; X 为发酵过程中的生物量, g/L ; t 表示时间, h .

对式(8)两边同时积分得:

$$S = -kX + B \quad (9)$$

将式(9)转换为:

$$S = -(1-X_0)kX + S_0 \quad (10)$$

式(10)表达的是菌体在对数生长期的底物降解特征.以 S_0-S (设为 Y) 对 X 作图,得一直线,斜率为 $(1-X_0)k$,得到的方程为: $Y=0.9405X$ ($R^2=0.943$).由此可得, $k=0.9462$.

将式(3)和系数 k 与式(10)联立,得纤维二糖降解动力学模型:

$$S = \frac{0.9405 \times 0.0028 e^{0.6536t}}{1 - 0.0028(1 - e^{0.6536t})} + 10 \quad (11)$$

由式(11)计算得到菌株 DCB 在对数生长期的纤维二糖降解量为 0.8g/L ,降解速率为 $0.1\text{g/(L}\cdot\text{h)}$.

2.6 菌株 DCB 发酵纤维素产丁酸能力

如图 4a 所示,菌株 DCB 利用纤维素发酵产丁酸主要发生在第 1d,其后发酵基本停止.对发酵过程系统的 pH 值检测发现,随着系统中 VFAs 的积累,其 pH 值在 1d 之内迅速由初始的 6.7 降低到了 5.0 左右(图 4b).pH 值快速大幅下降,严重抑制细菌代谢活性,这可能是导致发酵停止的主要原因^[1].经检测,经过 1d 的发酵,系统中有 1.02g/L 的纤维素被降解,乙酸、丁酸和总 VFAs 的累积量分别为 0.11 、 0.22 和 0.33g/L ,其中丁酸占总 VFAs 的 66.5%.计算结果表明,菌株 DCB 利用纤维素发酵产丁酸转化率为 0.23g/g ,但丁酸产生速率较低,仅为 $0.009\text{g/(L}\cdot\text{h)}$.

根据终产物的不同,一般把丁酸菌分为两类:一类以丁酸作为终产物,另一类以丁醇作为终产物^[1].目前已有超过 10 种丁酸菌被认为具有工业生产前景,它们分布在以下 7 个属中^[15]:梭菌属(*Clostridium*),丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*),丁酸杆菌属(*Butyribacterium*),真杆菌属(*Eubacterium*),梭杆菌属(*Fusobacterium*),巨型球菌属(*Megasphaera*)和八叠球菌属(*Sarcina*)^[16-17].其中,梭菌属的丁酸产量相对较高、稳定性较好,最具商业化潜力^[9].而菌株 DCB 所属的丁酸梭菌(*C.butyricum*)是梭菌属中产丁酸的代表菌种之一,具有良好的开发前景.

研究表明^[26-27],丁酸梭菌可利用的底物比较广泛,甘油、乳清、淀粉、蔗糖、纤维素和麦秸

等都可用于发酵产丁酸.经测试,*C. Butyricum* DCB 发酵纤维素的丁酸转化率达到 0.23g/g 的较高水平,而且,该菌株利用纤维素发酵产丁酸时的液相末端产物组成相对简单,除了丁酸外只有乙酸生成,这为降低后续的产物分离与纯化成本奠定了良好基础.然而,从目前测试结果来看,*C. Butyricum* DCB 在发酵纤维素的丁酸累积量只有 0.22g/L ,生成速率也较慢,如何进一步提高菌株 DCB 对纤维素的丁酸转化率和发酵系统的丁酸累积量是决定其应用前景的关键.在后续研究中,需要对其生理生化和生理生态特征进行更加全面的研究,并通过底物浓度、氮源、C/N 值、pH 值、温度、促进剂等条件的优化,进一步提高丁酸得率和丁酸积累量,为其应用奠定基础.

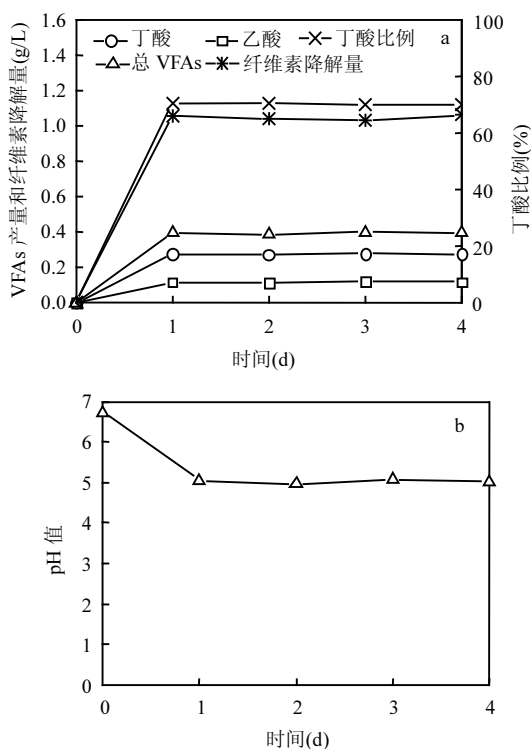


图4 菌株 DCB 降解纤维素发酵产酸特性及 pH 值变化
Fig.4 Organic acid producing process and pH fluctuation from cellulose by fermentation of strain DCB

3 结论

3.1 从牛粪、猪粪堆肥、玉米地土壤和腐木的混合物的富集物中分离得到一株厌氧降解纤维

素产丁酸菌株DCB,隶属于丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*),命名为 *C. Butyricum* DCB.该菌株细胞呈杆状,长7.1~9.1 μm ,直径为1.2 μm 左右.在微晶纤维素固体培养基上形成圆形菌落,白色,不透明,边缘不规整.

3.2 以纤维二糖为底物,在35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,*C. Butyricum* DCB 菌群的最大比生长速率为0.6536 h^{-1} ,世代时间为1.06h,纤维二糖降解速率为0.1g/(L·h),丁酸生成速率为0.06g/(L·h).

3.3 在35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,*C. Butyricum* DCB利用纤维素发酵产丁酸的转化率高达0.23g/g,但系统的丁酸累积量仅为0.22g/L,有待进一步提高.

参考文献:

- [1] ZHANG C, YANG H, YANG F, et al. Current progress on butyric acid production by fermentation [J]. *Current Microbiology*, 2009, 59(6):656-663.
- [2] 邓照西,冷一欣,蒋彩云.醋酸丁酸纤维素合成研究 [J]. *化学研究与应用*, 2008,20(4):418-421.
- [3] ZIGOV J, ŠTURDIK E, VAND K D, et al. Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction [J]. *Process Biochemistry*, 1999,34(8):835-843.
- [4] 高飞,刘继军.正丁酸的生产技术及应用状况 [J]. *天津化工*, 2007,20(6):42-44.
- [5] 杨贵清,刘刚,杨长得.酪丁酸梭菌代谢工程菌的构建及其发酵特性 [J]. *生物工程学报*, 2010,26(2):170-176.
- [6] VANDAK D, TELGARSK M, ŠTURDIK E. Influence of growth factor supplements on butyric acid production from sucrose by *Clostridium butyricum* [J]. *Folia Microbiologica*, 1995,40(6):669-672.
- [7] VANDAK D, TOM ŠKA M, ZIGOVA J, et al. Effect of growth supplements and whey pretreatment on butyric acid production by *Clostridium butyricum* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1995,11(3):363-363.
- [8] GROBBEN N G, EGGINK G, CUPERUS F P, et al. Production of acetone, butanol and ethanol (ABE) from potato wastes: fermentation with integrated membrane extraction [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993,39(4/5):494-498.
- [9] 邓名荣,郭俊,朱红惠.微生物催化生产丁酸研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2009,29(3):117-122.
- [10] 刘占英,侯先志,刘玉承,等.一株瘤胃纤维素降解菌的分离鉴定及其纤维素降解特性 [J]. *微生物学通报*, 2009,36(3):459-464.
- [11] LYND L R, WEIMER P J, VAN ZYL W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002,66(3):506-577.
- [12] 谢占玲,吴润.纤维素酶的研究进展 [J]. *草业科学*, 2004, 21(4):72-76.
- [13] 苏东海,孙君社.提高纤维素酶水解效率和降低水解成本 [J]. *化学进展*, 2007,19(7):1147-1152.
- [14] WEI D, LIU X, YANG S-T. Butyric acid production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium tyrobutyricum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor [J]. *Bioresource Technology*, 2013,129:553-560.
- [15] ZHU Y, WU Z, YANG S-T. Butyric acid production from acid hydrolysate of corn fibre by *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor [J]. *Process Biochemistry*, 2002,38(5):657-666.
- [16] ZIGOVA J, ŠTURDIK E. Advances in biotechnological production of butyric acid [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2000,24(3):153-160.
- [17] STARR M P, STOLP H, TRÜPER H G, et al. The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Vols I and II [M]. Berlin, Germany:Springer Verlag GmbH & Co., 1981.
- [18] AI B, LI J, SONG J, et al. Butyric acid fermentation from rice straw with undefined mixed culture: Enrichment and selection of cellulolytic butyrate-producing microbial community [J]. *Int-J-Agric-Biol*, 2013,15:1075-1082.
- [19] ANGELIDAKI I, SANDERS W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants [J]. *Reviews in Environmental Science & Bio/Technology*, 2004,3(2):117-129.
- [20] 魏复盛.国家环境保护总局,水和废水监测分析方法编委会.水和废水监测分析方法 [M]. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [21] GHOSE T. Measurement of cellulase activities [J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1987,59(2):257-268.
- [22] 曹月青,殷幼平,董亚敏,等.桑粒肩天牛肠道纤维素分解细菌的分离和鉴定 [J]. *微生物学通报*, 2001,1:9-11.
- [23] 梁峙,韩宝平.白腐真菌生长条件及其代谢动力学模型(英文) [J]. *农业科学与技术:英文版*, 2008,(6):1-9.
- [24] BERNAL M, TINOCO L K, TORRES L, et al. Evaluating Colombian *Clostridium* spp. Strains hydrogen production using glycerol as substrate [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2013,16(2):5-5.
- [25] 后立琼.苗族酸汤中乳酸菌的分离鉴定及发酵动力学模型研究 [D]. 四川:四川农业大学,2012.
- [26] MICHEL-SAVIN D, MARCHAL R, VANDECASTEELE J. Butyrate production in continuous culture of *Clostridium tyrobutyricum*: effect of end-product inhibition [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990,33(2):127-131.
- [27] CHEN W-M, TSENG Z-J, LEE K-S, et al. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2005,30(10):1063-1070.

作者简介:迟雪(1989-),女,黑龙江哈尔滨人,博士研究生,研究方向为厌氧微生物生理生态学.