

多重荧光标记结合拉曼光谱原位研究多粘芽胞杆菌降解秸秆的生物膜特征

肖 健, 王丽萍, 沈其荣, 余光辉*

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京农业大学农业部长江中下游植物营养与施肥重点实验室, 江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室, 南京 210095)

摘要:利用多粘芽胞杆菌(*Paenibacillus polymyxa* SYX-1)快速降解稻草秸秆,用多重荧光标记技术进行标记,共聚焦激光显微镜观察(CLSM)并结合激光拉曼光谱(Raman),原位研究纤维素降解过程中形成的生物膜特征,进一步探究植物纤维的酶解机制。共聚焦激光扫描跟踪结果表明:在0~13 d的降解过程中,SYX-1菌株定殖的稻草秸秆表面物质成分呈复杂化趋势,表明在秸秆表面有良好的生物膜形成;拉曼光谱结果显示SYX-1菌株对稻草秸秆的降解主要发生在拉曼强度1580~1590 cm^{-1} 处,证实了相关秸秆纤维素降解酶主要以 β -折叠构象和无规卷曲构象共存。多重荧光标记技术和拉曼光谱手段相结合,可以作为深入研究纤维素降解过程中生物膜的形成特征及探究植物纤维酶解机制的有效手段。

关键词:稻草秸秆;多重荧光标记;拉曼光谱;生物膜

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2013)04-0854-06 **doi:**10.11654/jaes.2013.04.028

Characterization of Biofilm Formed by *Paenibacillus polymyxa* SYX-1 During the Degradation of Rice Straw Using Multiple Fluorescence Labeling Combined with Raman Spectroscopy

XIAO Jian, WANG Li-ping, SHEN Qi-rong, YU Guang-hui*

(Agricultural Ministry Key Lab of Plant Nutrition and Fertilization in Low-Middle Reaches of the Yangtze River, Jiangsu Key Lab for Organic Solid Waste Utilization, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, *Paenibacillus polymyxa* SYX-1 was used to rapidly degrade rice straw. The formed biofilm was characterized by the combination of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and laser Raman spectroscopy. The distribution patterns of proteins, α -polysaccharides, cellulose, total cells, and dead cells in rice straw were simultaneously visualized using CLSM after labeling by fluorescein isothiocyanate (FITC), concanavalin A (Con A), calcofluor white (CW), SYTO 63, and SYTOX blue, respectively. The results demonstrated that SYX-1 was colonized on the surface of straw and formed a good biofilm during the degradation process from 0 to 13 days. A lignocellulose structure was observed obviously in rice straw at 0 day but obscured after cultivation of 13 days, supporting the degradation of rice straw by SYX-1. The laser Raman spectra demonstrated that the degradation of rice straw mainly occurred at the bands of 1580 cm^{-1} and 1590 cm^{-1} , which is belonged to the stretch vibration modes of amide groups. Therefore, the combination of multiple fluorescence labeling-CLSM observation and laser Raman spectroscopy could be used as a suitable tool to characterize the architecture and function of biofilm. Knowledge on the architecture and function of biofilm contributes to our understanding of the degradation and utilization of lignocellulose biomass and provides novel information for engineering applications and scientific research.

Keywords: rice straw; multiple fluorescence labeling; Raman spectroscopy; biofilm

全球每年产生的纤维素高达1000亿t^[1]。中国农作物秸秆量每年达到6亿t,林木枝桠和林业废弃物年可获得量约9亿t,但这些资源多以焚烧等简单方

式处理,利用率低且污染环境^[2]。因此,有效利用纤维素资源仍是目前乃至未来的一个研究热点。

相关研究表明,纤维素的结晶区和非结晶结构对其降解具有重要影响。纤维素结晶区内链分子的全部羟基和非结晶区内链分子的部分羟基会形成很多氢键,从而使得纤维素极难溶解,反应性能差。在纤维素结晶区,葡萄糖分子的羟基全部与分子内部或分子外部的氧结合,这种结晶构造使得酶与纤维素

收稿日期:2012-07-30

基金项目:国家自然科学基金(21007027);博士后科学基金(20100481156, 201104535和1002017B)

作者简介:肖 健(1989—),女,硕士研究生,主要研究方向为固体有机废弃物资源化利用。

*通信作者:余光辉 E-mail: yuguanghui@njau.edu.cn

难以进行有效接触,从而阻碍了降解的快速进行^[3]。纤维素降解菌是通过在目标基质表面形成生物膜以实现有效降解。因此,研究降解菌在纤维素表面形成的生物膜特征非常重要。

共聚焦激光扫描显微技术(Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM)是一种无损深层形态结构分析的重要方法,它的最大优点在于能对材料进行深层($\sim 100\ \mu\text{m}$)形貌观察,具有快速、无损、样品制备简单等优点,已被广泛应用于原位表征微生物的生物膜特征^[4],但该技术不能提供生物膜的表面结构信息。拉曼光谱技术则能提供生物膜的表面结构信息,同时具备无需染色和样品预处理等优点,保证了拉曼光谱可以定性地得到物质结构的指纹光谱^[5]。

实验室现有一株多粘芽胞杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)SYX-1,其具有较强的纤维素降解功能。本试验通过摇瓶培养研究水稻秸秆的纤维素降解过程,利用多重荧光标记结合 CLSM 技术和拉曼光谱技术进行跟踪观察,深入研究了菌株 SYX-1 在纤维素降解过程中形成的生物膜特征,并初步阐明了菌株 SYX-1 的纤维素酶解机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

纤维素降解菌 SYX-1 来自宜兴新天地实验工程中心;稻草来自宜兴新天地实验工程中心。

LB 培养基:蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 酵母浸膏 5.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0。

刚果红鉴定培养基: K_2HPO_4 2.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, MgSO_4 0.3 g, CaCl_2 0.3 g, FeSO_4 5.0 mg, MnSO_4 1.6 g, ZnCl_2 1.7 mg, CoCl_2 2.0 mg, CMC-Na 2.0 g, 琼脂粉 18 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。

蛋白胨纤维素培养液(PCS):蛋白胨 5.0 g, NaCl 5.0 g, 酵母粉 1.0 g, CaCO_3 3.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0。

1.2 仪器设备

UV-2550 紫外分光光度计;Leica CM 1900 型低温冷冻切片仪;共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)ZEISS LSM700, 南京农业大学动科院提供;激光拉曼谱仪 LABRAM 800(法国 JY 公司), 南京师范大学分析测试中心提供;离心机 BIO-RAD。

1.3 试验方法

1.3.1 纤维素降解菌 SYX-1 纤维素降解能力测定

将 SYX-1 菌落点接到筛选培养基上, 30 ℃培养

2 d, 加入适量 $0.1\% 1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 刚果红溶液, 染色 1 h, 弃染液, 加适量 $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液洗涤 1 h, 测量透明圈直径(D)和菌落直径(d)。

1.3.2 菌株 SYX-1 水稻秸秆降解实验

秸秆预处理:将水稻秸秆剪成 3~4 cm 的小段, 洗净表面不洁物质后于 105 ℃烘箱中烘至恒重备用。

实验设计:实验利用蛋白胨纤维素培养液(PCS)^[6]进行摇瓶培养降解稻草秸秆, 设两组处理, 每处理 3 个平行, 分别为:加降解菌 SYX-1 处理(命名为 JJ 组)和不加菌的空白对照(命名为 CK 组)。以每 500 mL 三角瓶 100 mL PCS 培养液的量分装, 然后向每瓶内加入 1 g 处理好的水稻秸秆(纤维素碳源), 加秸秆时尽量保证瓶与瓶之间秸秆的均匀性。将分装好的培养液经 121 ℃、20 min 高压灭菌, 冷却后按 5%(体积分数)的量接种, 置于 35 ℃、170 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床振荡培养。分别于培养的第 0、13 d 取样检测。

1.4 分析方法

1.4.1 多重荧光标记-共聚焦激光显微镜(CLSM)技术

在秸秆摇瓶实验中, 秸秆样品分为两组, 分别为 JJ 组和 CK 组。

按照相关荧光染剂及染色条件配置荧光染剂, 各荧光染剂装入棕色瓶于 -20 ℃冰箱保存备用。在 0、13 d 的时候, 分别从两组样品取 0.05 g 样品置入 2 mL 离心管中, 注意所取样品统一处理成长方形(1 cm×0.5 cm), 尽量保证颜色等外部条件均匀一致, 依次进行染色。所用染剂及染色条件见表 1。

冷冻切片采用直接冷冻法。

利用共聚焦激光显微镜(CLSM)观察样品时, 因仪器限制以及为避免染剂荧光干扰, 各染剂皆分别单独收光, 观测物镜为油镜 X63。光原及设计条件见表 2。

1.4.2 拉曼光谱测定

分别取保存 0、13 d 的稻草鲜样少许于载玻片上压平, 置于显微镜的载物台上, 调好样品测试点, 使激光通过物镜聚焦到样品测试点上, 进行测定。拉曼光谱测定条件:激发波长 325 nm, 狭缝 400 μm , 分光计 2400, NUV 为×15, 获得时间 60 s, 扫描范围 200~2000 cm^{-1} , 分辨率 1 cm^{-1} 。

2 结果与分析

2.1 SYX-1 降解纤维素的能力

CMC 平板检测菌株产纤维素酶的能力是一种快速简便的方法, 透明圈直径和菌落直径比值(D/d)能够直接反映纤维素降解菌产纤维素酶的能力(本实验

表 1 荧光染料及染色条件
Table 1 Fluorescence tincture and stain condition

染料名称	染色目标物	荧光颜色	溶剂	染色时间/min
FITC	蛋白质	绿色	1 mol·L ⁻¹ NaHCO ₃	60
Nile Red	脂肪	黄色	PBS buffer	30
Con A	α-多糖	浅蓝色	PBS buffer	30
CW	纤维素	蓝色	PBS buffer	30
SYTO 63	总细胞	红色	DI water	30
SYTOX Blue	死细胞	紫色	PBS buffer	10

注:PBS buffer,磷酸盐缓冲溶液。

表 2 荧光染剂的激光光源及设定条件
Table 2 Laser source and conditions of fluorescence staining

荧光染料	激发光源	激发波长/nm	收光波长/nm
FITC	Ar	488	500~550
Nile Red	Ar	514	625~700
Con A	He-Ne	543	550~590
CW	UV	364	410~480
SYTO 63	He-Ne	633	650~700
SYTOX Blue	Ar	458	460~500

中培养 2 d)^[7]。已知缺陷短波单胞菌 XW-1 (*Brevundimonas* sp.) 为高产纤维素酶菌^[8], 其 $D/d=13.12$, 在本实验中作为参比菌株使用。从图 1 和表 3 可知, 纤维素降解菌 SYX-1 的比值 $D/d=10.64$, 接近于高产纤维素酶菌株 XW-1, 可以看出其纤维素降解能力较为理想, 可用于进一步的研究。

2.2 多重荧光标记原位观察菌株 SYX-1 降解稻草的生物膜特征

图 2 为 CK₀、CK₁₃ 和 JJ₀、JJ₁₃ 样品的 CLSM 照片 (结合 3 组平行数据综合分析)。从图 2 可以看出, 实验所用的秸秆中存在蛋白质、脂肪、α-多糖和纤维素等物质, 还有一定数量的死细胞。通过 0、13 d 的两次取样观察, 秸秆表面的大分子聚合物 (蛋白质、脂肪、α-多糖和纤维素) 发生了显著的变化。

比较图 2-A 和图 2-B, 即以 CK₀ 和 CK₁₃ 样品进行分析: 在 0~13 d 内, 未加菌摇瓶中样品的绿色荧光减弱, 说明蛋白质类物质有所减少; 红色荧光明显增强, 说明有生物膜生成; 黄色和浅蓝色荧光强度减弱, 说明脂肪和 α-多糖有所减少, 有可能是因为选取的样品这两种物质成分比较少所造成的; 紫色和蓝色荧光强度没有明显变化。

比较图 2-C 和图 2-D, 即以 JJ₀ 和 JJ₁₃ 样品进行分析: 在 0~13 d 内, 加菌摇瓶中样品的绿色荧光增强, 说明蛋白质类物质增多; 红色荧光增强, 说明有生



图 1 菌株 XW-1 和 SYX-1 在 CMC 平板上形成的水解圈对比
Figure 1 The comparison of hydrolysis circle of the degradation bacterium XW-1 and SYX-1 (2 d)

表 3 刚果红染色法实验结果对比
Table 3 Results of Congo red dyeing method

菌株编号	菌落直径 d/mm	透明圈直径 D/mm	D/d
XW-1	3.40	44.6	13.1
SYX-1	3.10	33.0	10.6

物膜生成; 紫色, 黄色和浅蓝色荧光无明显变化, 说明死细胞数量、脂肪和 α-多糖类物质没有明显变化; 蓝色荧光有所增强, 说明降解的并不充分。

比较图 2-D 和图 2-B, 即以 JJ₁₃ 和 CK₁₃ 样品进行分析: 前者绿色、红色与后者相比有所增强, 表明前者蛋白质类物质明显较多, 形成的生物膜更厚, 成分更加复杂。

CLSM 原位观察表明: 0 d 时, 秸秆有明显的木质纤维素结构, 而 13 d 后, 秸秆的木质纤维素结构模糊; 在 0~13 d 内, 加菌组秸秆表面红色荧光增强, 说明 SYX-1 菌株在液培过程中于秸秆表面形成了明显生物膜, 而且其物质成分随降解过程的进行变得更加复杂; 秸秆表面附着的蛋白质类物质明显增加, 分析应该

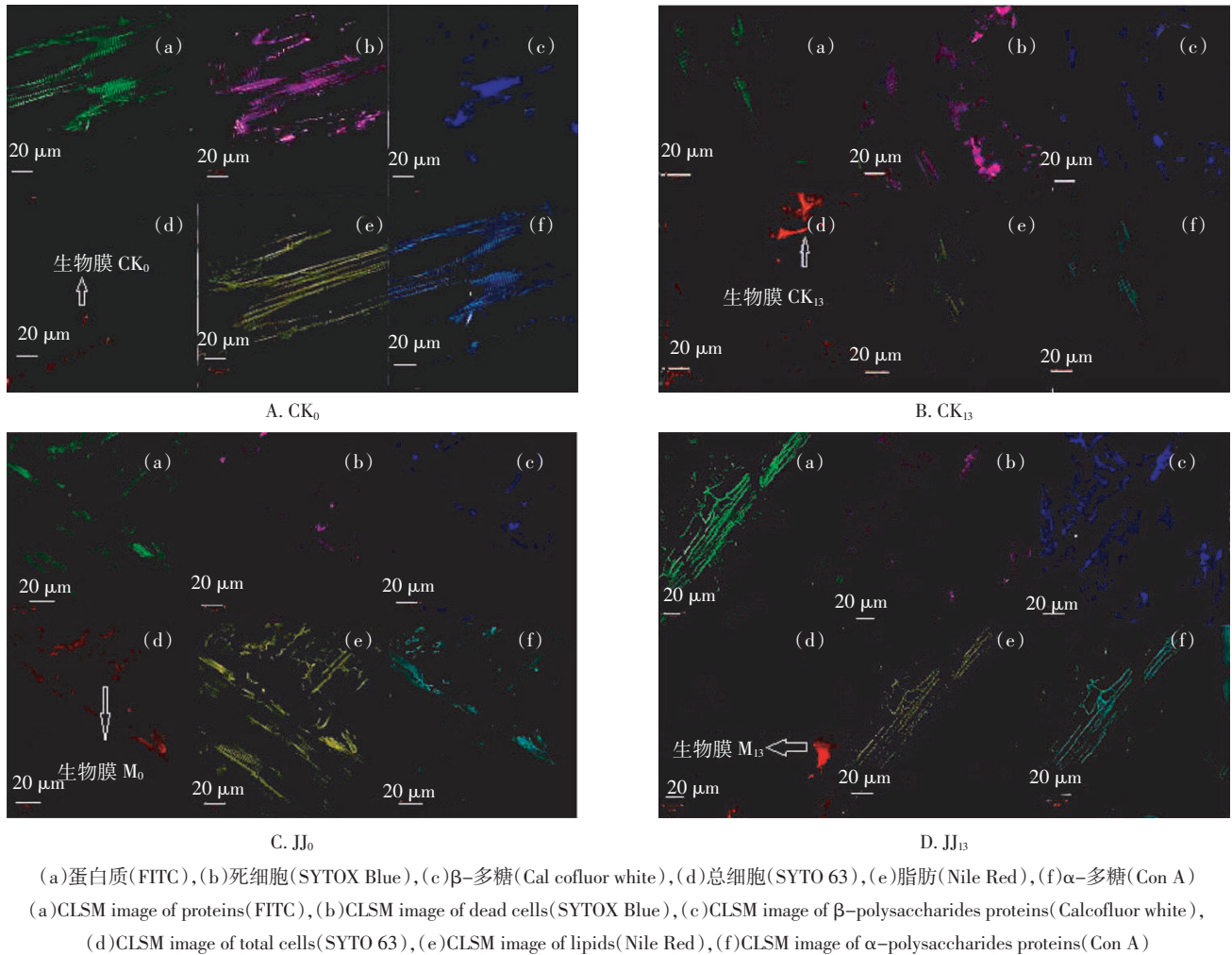


图 2 共聚焦显微镜下秸秆样品(油镜 X 63)

Figure 2 The sample of rice straw in CLSM(oil immersion X 63)

是菌株 SYX-1 对纤维素进行了一定程度的不完全降解;而在相应的 CK 对照样品中,随着时间的增加,也有生物膜的形成,但看不出有纤维素降解活动发生。

2.3 拉曼光谱表征菌株 SYX-1 降解稻草形成生物膜的化学结构

图 3 为秸秆拉曼光谱分析曲线。拉曼光谱分析曲线是以拉曼位移为横坐标,拉曼散射光强度为纵坐标的曲线。从中可以看出拉曼光谱测定的相关物质峰的总体变化。

一般认为拉曼光谱中两个峰比较典型^[9]:一个峰约在 1580 cm^{-1} 处,称为 G 峰,被认为是对应石墨结构的峰;另一个峰约在 1360 cm^{-1} 处,称为 D 峰,被认为是对应缺陷的峰。D 峰相对强度表征非石墨化边界的多少,即无序化度。这种无序化度属于六元环中所有碳原子同时进行的振动,这种模式的振动只存在于六边芳香环状碳结构中,只在无序态时产生^[10]。

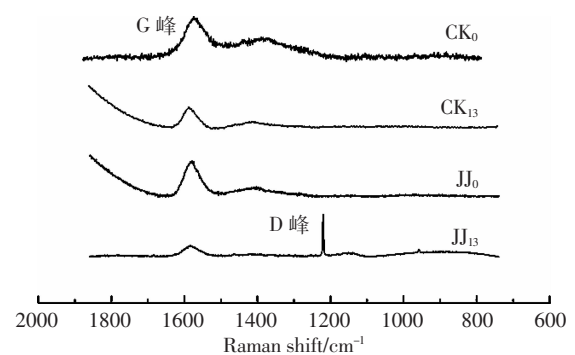


图 3 秸秆拉曼光谱

Figure 3 Raman spectra of rice straw

在 4 条拉曼曲线中,G 峰至 D 峰的变化都是由隆起到平稳,但从横向和纵向的角度看都有所变化。横向观察,CK₀、CK₁₃、JJ₀ 曲线中, $1360\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ 处存在微微隆起的 D 峰,而 JJ₁₃ 则不存在此峰;纵向观察,CK₀-JJ₁₃ 4 条曲线的 G 峰明显减弱,直至 JJ₁₃ 曲线中

趋于平稳;CK₀-CK₁₃ 的 G 峰拉曼强度差值要比 JJ₀-JJ₁₃ 的小。这些现象说明在摇瓶实验中,加入纤维素降解菌的样品中存在纤维素降解活动,属于六边形环状碳结构中所有碳原子在同时进行振动,并且这种无序状态趋于平稳,意味着降解由强到弱。

拉曼光谱能够显示蛋白分子中肽键、主链骨架以及侧链的特征性振动谱带,根据肽键的特征,拉曼峰可以分析蛋白质分子的构象特征。JJ₁₃ 样品在 1230~1250 cm⁻¹ 处出现一特征峰,该峰为酰胺Ⅲ中 N-H 变角和 C-N 键伸缩振动峰^[9],说明在降解过程中有蛋白类物质的生成并参与降解。

在拉曼光谱中,多肽及蛋白质分子链有多个酰胺谱带,尤其在 1700 cm⁻¹ 以下各个酰胺特征峰与蛋白质的分子构象有密切关系,表 4 为特定蛋白质构象的酰胺Ⅰ与酰胺Ⅲ的拉曼谱带,可见降解秸秆纤维素的相关酶主要以 β-折叠构象和无规卷曲构象共存^[12]。

表 4 特定蛋白质构象的酰胺Ⅰ与酰胺Ⅲ的拉曼谱带(cm⁻¹)
Table 4 The Raman spectrum belt of specific protein conformation of amide I and amide III (cm⁻¹)

构象	酰胺Ⅰ	酰胺Ⅲ	其他灵敏峰
β-折叠	1665~1680	1230~1245	1020~1060
α-螺旋	1645~1658	1264~1310	890~945
无规卷曲	1660~1666	1242~1250	—

3 讨论

生物膜在各学科中具有不同的含义,本文研究的是在水稻秸秆表面聚集的微生物细胞及其活动分泌产生的胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)^[13]。相关研究表明,微生物 EPS 主要由多糖、蛋白质、核酸和脂类组成^[14]。本研究分别用荧光探针标记微生物和胞外聚合物:蛋白质(FITC,绿色)、脂类物质(Nile Red,黄色)、α-多糖(Con A,浅蓝色)、纤维素(CW,蓝色)、总细胞(SYTO 63,红色)和死细胞(Sytox Blue,紫色)。虽然通过仔细挑选的激发波长和发射波长的组合已经将峰值的干扰减少到最低,但胞外聚合物之间的相互影响以及硬件和软件的各种限制^[13],会造成一些物质荧光强度不明显的现象,需要其他技术的辅助,才能更好地开展研究。

纤维素降解酶是一种复合酶,包括 C₁ 酶、C_x 酶和 β-葡萄糖苷酶^[15]。探讨植物纤维酶解机制的难度主要受天然纤维素的物理结构、细胞壁的微细结构、纤维的化学成分分布、纤维素酶系组成以及纤维素酶对

天然纤维素水解模式的影响^[16-17]。相关研究表明,天然植物纤维结构因子主要受纤维比表面积和纤维结晶度的影响^[18]。在植物细胞壁中,纤维素大分子是以结晶区域和无定形区域二相体系聚集的。结晶区内纤维素链分子规则排列,无定形区内链分子排列规则性较差^[19]。在含纤维素材料中,纤维素结晶区所占的比例可用结晶度来表示^[20]。对于天然纤维素来说,结晶度 CrI(Crystallinity Index)为:CrI%=[I₁₄₈₁/(I₁₄₈₁+I₁₄₆₂)]×10²,其中 I₁₄₈₁ 表示结晶区拉曼光谱强度,I₁₄₆₂ 表示非结晶区拉曼光谱强度^[21]。

表 5 为 CK 组和 JJ 组样品在降解过程中纤维素结晶度 CrI 的变化。CK 样品由于摇瓶混合液中细小组分的比表面积比秸秆长纤维组分的大,细小组分的结晶度较长纤维组分的低,浆中的细小组分对酶的吸附、酶解作用比长纤维组分要强些^[22],所以经过 13 d 的摇瓶实验过程,导致拉曼光谱能测得的 CrI 逐渐降低;JJ 样品中加入降解菌,其分泌一定量的纤维素降解酶,随着酶解时间的延长,纤维素结晶度逐渐升高并趋于稳定。这证明了纤维素酶对纤维素的降解主要发生在无定形区和结晶区表面。

表 5 纤维素结晶度 CrI 的变化
Table 5 Evolution of cellulose CrI

样品	CrI%(0 d)	CrI%(13 d)	变化
CK	50.4	49.0	降低
JJ	48.9	49.5	升高

拉曼图谱中物质的变化与 CLSM 的结果一致:其中 JJ₁₃ 组绿色荧光明显增强,与 JJ₁₃ 拉曼图谱中 1230~1250 cm⁻¹ 处出现酰胺Ⅲ物质的事实一致,且主要为 β-折叠构象和无规卷曲构象共存。

用 CLSM 显微镜和拉曼光谱的方法相结合研究天然纤维素降解机理尚属首次。实验结果充分说明这两种技术的结合可以成为深入研究纤维素降解过程中形成的生物膜特征以及进一步探究植物纤维酶解机制的有效方法。

4 结论

(1)共聚焦激光显微镜(CLSM)的扫描结果显示,对于 JJ 样品(加降解菌 SYX-1 处理),0 d 时秸秆表面观察到有明显木质纤维素结构,13 d 后,秸秆的木质纤维素结构模糊,表面附着的蛋白质类物质明显增加,这说明菌株 SYX-1 在秸秆表面形成了生物膜,秸秆表面物质成分变得复杂,且菌株 SYX-1 分泌了相

应的纤维素降解酶,对秸秆进行了一定程度的不完全降解。

(2)拉曼光谱结果显示 SYX-1 菌降解秸秆主要发生在拉曼位移 $1580\sim 1590\text{ cm}^{-1}$ 处,该菌分泌的降解纤维素的酶主要以 β -折叠构象和无规卷曲构象共存,而且证明了纤维素酶对纤维素降解主要发生在纤维素的无定形区和结晶区表面。

(3)共聚焦激光显微镜(CLSM)和拉曼(Raman)光谱手段相结合,从生物膜的物质荧光分布和秸秆降解的拉曼光谱强度结果表征了秸秆降解的生物膜变化过程,并且可以充分证明两种手段的结合可以作为深入研究纤维素降解菌生物膜的形成以及探究植物纤维酶解机制的有效手段。

参考文献:

- [1] Zhang Y H P, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement; Screening and selection strategies[J]. *Biotech Adv*, 2006, 24:452-481.
- [2] Yuan J S, Tiller K H, Ahmad H A, et al. Plants to power: Bioenergy to fuel the future[J]. *Trends Plant Sci*, 2008, 13(8):421-429.
- [3] Eriksson T, Borjesson J, Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose [J]. *Enzyme and Microbiology technology*, 2002, 31:353-364.
- [4] Jiří Hašek, Eva Streiblová. Fluorescence microscopy methods[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1996, 53(Yeast Protocols):391-405.
- [5] Harz M, Rösch P, Peschke K D, et al. Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions[J]. *Analyst*, 2005, 130(11):1543-1550.
- [6] 王伟东, 崔宗均, 牛俊玲, 等. 一组木质纤维素分解菌复合系的筛选及培养条件对分解活性的影响[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(5):7-11.
Wang W D, Cui Z J, Niu J L, et al. Construction of a composite microbial system of lignocellulose degrading and effect of cultural condition on the system capability[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2004, 9(5):7-11.
- [7] 刘海波, 王义强, 陈介南, 等. 一株高产纤维素酶菌的筛选与鉴定[J]. 生物学杂志, 2005, 25(3):16-20.
Liu H B, Wang Y Q, Chen J N, et al. Isolation and identification of cellulose decomposing strain with high cellulase activity[J]. *Journal of Biology*, 2005, 25(3):16-20.
- [8] 黄玉兰, 李征, 张杰, 等. 一株耐低温纤维素酶高产菌株的筛选, 鉴定和产酶的初步试验[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5):637-644.
Huang Y L, Li Z, Zhang J, et al. Screening and identification of a cold-adapted cellulase-producing bacteria[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(5):637-644.
- [9] 黄彪. 杉木间伐材的炭化理论及其在环境保护中应用的研究[D]. 南京林业大学, 2004:40-60.
Huang B. Study on mechanism of carbonization for thinning wood of Chinese fir and application of its carbonized materials in environmental protection[D]. Nanjing Forest University, 2004:40-60.
- [10] 林冠峰. 炭化工艺对高活性木炭性能的影响[J]. 林业科学, 2009, 45(4):112-116.
Lin G F. Property of highly activated wood charcoal prepared by different carbonization method[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2009, 45(4):112-116.
- [11] 黄建华, 杨璐, 余珊珊. 中国文物彩绘常用胶料的显微共聚焦拉曼光谱特征研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(3):687-690.
Huang J H, Yang L, Yu S S. Confocal micro Raman spectroscopy for the identification of the binder used in Chinese painted cultural relics[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2011, 31(3):687-690.
- [12] 邵正中, 吴冬, 李光宪, 等. 用激光拉曼光谱研究蚕丝的结构与功能的关系[J]. 光散射学报, 1995(1):2-6.
Shao Z Z, Wu D, Li G X, et al. Raman spectroscopic investigation the relation between structure and function of silk fibroin[J]. *Chinese Journal of Light Scattering*, 1995(1):2-6.
- [13] Chen M Y, Lee D J, Tay J H, et al. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(2):467-474.
- [14] Steven L P, Sladjana M, Helena C, et al. Introduction to biofilms[J]. *Biofilms and Veterinary Medicine*, 2011, 6:41-68.
- [15] 李振红, 陆贻通. 高效纤维素降解菌的筛选[J]. 环境污染与防治, 2003(3):133-135, 153.
Li Z H, Lu Y T. Screening on the cellulose-decomposing microorganisms[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2003(3):133-135, 153.
- [16] Lee S L. Structural properties of cellulose and cellulose reaction mechanism[J]. *Biotech Bioeng*, 1983, 25(1):33-51.
- [17] Fan L T, Lee Y H, Davied H. Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis[J]. *Biotech Bioeng*, 1980, 22:177-199.
- [18] Lee Y H. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose [J]. *Biotech Bioeng*, 1983, 25:939-966.
- [19] 卢煊初, 胡文利, 孙丽深. 红外光谱法研究纤维素结晶度: II. 苇浆打浆过程中脆性和结晶度的关系[J]. 造纸技术通讯, 1981, 3:11-20.
Lu X C, Hu W L, Sun L S. Infrared spectroscopic studies on the degree of cellulose crystallinity Part II: The relationship between brittleness and degree of Crystallinity during the beating process of teed pulp[J]. *China Pulp & Paper*, 1981, 3:11-20.
- [20] Howell J A, Mangate M. Enzyme deactivation during cellulose hydrolysis[J]. *Biotech Bioeng*, 1989, 33:631-637.
- [21] Schenzel K, Fischer S, Brendler E. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy[J]. *Cellulose*, 2005, 12:223-231.
- [22] 管斌, 孙艳玲, 隆言泉, 等. 复合纤维素酶对杨木 SGW 浆纤维素结晶度和微晶体尺寸的影响[J]. 中国造纸学报, 2000(15):7-11.
Guan B, Sun Y L, Long Y Q, et al. Effects of enzymatic modification on the crystallinity of cellulose and the average dimensions of the cellulose crystallite of Aspen SGW pulp[J]. *Transactions of China Pulp and Paper*, 2000, 15:7-11.