

高效纤维素降解菌群的构建及其生物多样性分析

潘虎^{1,2,3}, 董俊德^{3,4}, 卢向阳^{1,2*}, 田云^{1,2*}, 张偲³, 龙丽娟³

(1.湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省农业生物工程研究所, 湖南 长沙 410128; 3.中国科学院 海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301; 4.中国科学院 海南热带海洋生物实验站, 海南 三亚 572000)

摘要:以红树林植物根际富含生物质的土壤为材料,经过多代淘汰,筛选构建了1组纤维素降解复合菌群SYF。30℃静置培养10d后,复合菌群对木榄、滤纸、红海榄的分解率分别为83.6%、71.5%和67.3%,纤维素酶活分别为102.2、126.3和110.7 U/mL。利用平板法分离得到了8个属的好氧性细菌和3个属的真菌,利用16S rDNA文库共检测到6个已知属和2个未知种类细菌,同时通过ITS文库共发现5个属真菌。仅有3个属的微生物可通过平板法和克隆文库构建法共同检测。

关键词:纤维素;降解;复合菌;16S rDNA;内源转录间隔区

中图分类号:Q93

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2012)02-0139-07

Construction of a composite microbial system for efficient cellulose degradation and its biodiversity analysis

PAN Hu^{1,2,3}, DONG Jun-de^{3,4}, LU Xiang-yang^{1,2*}, TIAN Yun^{1,2*}, ZHANG Si³, LONG Li-juan³

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Hunan Agricultural Bioengineering Research Institute, Changsha 410128, China; 3.Key Laboratory of Marine Bio-Resources Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 4.National Experiment Station of Tropical Marine Biology, Sanya, Hainan 572000, China)

Abstract: A composite microbial system SYF with efficient cellulose-degrading capacity was constructed from rhizosphere soil of mangrove plant rich in bio-substances by limited generation selections. It was found that 83.6% of *Bruguiera gymnorhiza* leaves, 71.5% of *Rhizophora stylosa* leaves and 67.3% of filter paper were degraded by the composite microbial system at 30℃ within 10 days under static culture conditions with the CMCase activity of 102.2, 126.3 and 110.7 U/mL respectively. The microorganism diversity of SYF was analysis by the plate screening method and clone library establishing method. Eight genera of bacteria and 3 genera of fungi were isolated from the composite microbial system. Six kind of bacteria with known genera and two with unknown genera were detected by the 16S rDNA libraries, while 5 species of fungi were detected by the ITS libraries. Only 3 genera of the microorganisms were detected by both methods.

Key words: cellulose; degradation; composite microbial system; 16S rDNA; internally transcribed spacer(ITS)

在自然条件下,纤维素等物质的分解需要在多种菌株的协同作用下逐步完成。近年来利用复合菌群降解纤维素的研究取得了一些成果,Bell等^[1]构

建了1组含72株可培养细菌的木质纤维素降解复合菌群;崔宗均等^[2]以4种高温堆肥为原料,构建了1组高效稳定的纤维素分解菌复合系MC1,在人工培

收稿日期:2011-12-01

基金项目:国家科技支撑计划项目(2009BAB44B03,2008BADC4B08);科技部国际科技合作项目(2010DFA62510);教育部创新团队项目(IRT0963)

作者简介:潘虎(1986—),男,陕西汉中,人,硕士研究生,主要从事海洋环境资源利用研究,ph2032007@126.com;*通信作者,xiangyangcn@163.com;tianyun79616@163.com

养条件下,重现了自然界中多种微生物协同降解纤维素的过程。

红树林生境具高度盐渍化、土壤缺氧以及周期性的海水浸淹等特点,植物凋落物、有机碎屑含量丰富,具有较高的物质归还率,蕴涵着大量可以降解的纤维素、木质素和几丁质等大分子有机物的微生物类群^[3]。笔者以富含生物质的红树林植物根际土壤为材料,通过多代淘汰,筛选构建了1组高效纤维素降解复合菌群SYF。采用平板分离法与克隆文库构建法研究了复合菌群的微生物区系组成,以期进一步明了复合菌群微生物之间的协同作用及高效分解纤维素的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

于2010年8月从海南省三亚市红沙河口红树林区分别采集木榄、红海榄植株0~30 cm根际土壤沉积物、腐烂木榄和腐烂红海榄植株根际土壤沉积物,装入灭菌的封口聚乙烯袋中,立即保存于4℃冰箱。

复合菌群液体培养基(PCS)、细菌平板分离培养基、真菌平板分离培养基、CMC-刚果红鉴定培养基参照文献^[4]方法配制。

1.2 方法

1.2.1 复合菌群的筛选

取1.5 g沉积物样品接种到150 mL的复合菌群培养液中,以瓶内放入的滤纸条作为分解的外观指标。30℃静止培养10 d后摇匀,取3 mL接种到同样的新鲜培养液中。如此继代培养,淘汰失去分解能力的培养物,筛选分解能力强的复合菌群。经15代以上的继代培养,选择仍保持高分解能力的复合菌群(SYF),进行保存和性质研究。

1.2.2 复合菌群中可培养菌株的分离及纤维素降解活性测定

吸取1 mL继代培养的复合菌群菌液,依次10倍梯度稀释,分别取50 μL 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 倍稀释液涂布于细菌平板分离培养基上和50 μL 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 倍稀释液涂布于真菌平板分离培养基上,每处理设8个重复。细菌于37℃培养2~3 d,真菌于30℃培养5~7 d,挑取形态典型的单一菌落并纯化。将得到的纯培养物接种到CMC-刚果红鉴定培养基上培

养2~5 d,观察是否形成水解透明圈,并测量水解透明圈的大小。用水解透明圈的直径(D)与菌落直径(d)的比值大小表示菌株酶活力高低^[5]。

1.2.3 复合菌群对不同纤维素材料降解能力的测定

分别将2 g滤纸、红海榄叶片、木榄叶片作为唯一碳源制作150 mL的液体培养基,接种3 mL复合菌群液,每个处理3个重复。30℃静止培养,连续10 d每天检测纤维素材料的失重率及复合菌群所产纤维素酶的活性。纤维素材料失重率的测定过程为:除去上清液,105℃烘干至恒重,计算纤维素材料的失重量和失重率。复合菌群的纤维素酶活性测定参照文献^[6]方法进行。

1.2.4 纯培养物基因组DNA提取及16S rDNA基因和ITS基因的扩增与测序

使用上海生物工程服务有限公司基因组抽提试剂盒提取纯培养物菌株DNA,用于目的基因的扩增。细菌16S rDNA部分序列的扩增采用通用引物27F/1492R^[7],真菌ITS部分序列的扩增采用通用引物ITS1/ITS4^[8]。扩增程序参照文献^[7]方法进行。扩增产物送上海美吉测序公司测序。利用MEGA 4.0中的邻接法(Neighbor-Joining)建立系统发育树^[9]。

1.2.5 复合菌群总DNA的提取及16S rDNA基因文库和ITS基因文库的构建

将继代培养的复合菌群菌液离心,收集沉淀物,用BIOMIGA公司的土壤全基因组试剂盒提取总DNA,用于细菌和真菌克隆文库的构建。细菌克隆文库用TaqI和HhaI进行多态性分析,真菌克隆文库用TaqI和HaeIII进行多态性分析,挑取相应克隆子送上海美吉测序公司测序。

2 结果与分析

2.1 复合菌群SYF的构建及其对纤维素材料的降解能力

4种沉积物样品,经过15代的继代培养,得到了1组高效稳定的纤维素降解复合菌群SYF。复合菌群在5 d前对纤维素材料的降解缓慢,第5天开始复合菌群对纤维素材料的降解能力显著增强,其所产纤维素酶的活性也呈快速增高趋势;至第9天时复合菌群对纤维素材料的降解及所产纤维素酶的活性均处于稳定状态。经过10 d的降解,木榄、滤纸、红海榄的失重率分别达83.6%, 71.5%, 67.3%(图1),纤维素

酶活分别达102.2、126.3和110.7 U/mL(图2)。

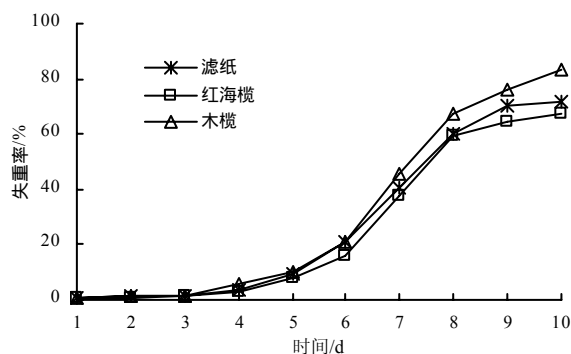


图 1 复合菌群 SYF 对纤维素的降解能力

Fig. 1 The degradation ability of different cellulose materials by composite microbial system SYF

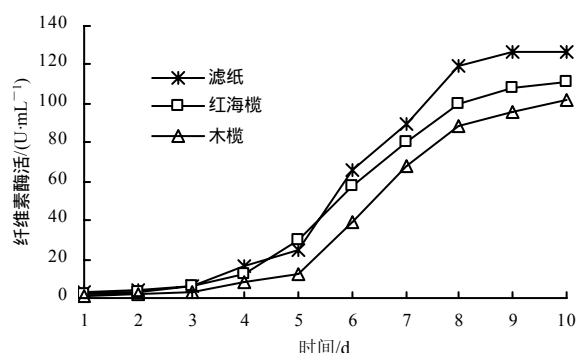


图 2 复合菌群 SYF 所产纤维素酶的活力

Fig. 2 The CMCase activity of the composite microbial system SYF

表 1 复合菌群中可培养细菌分离株的初步鉴定

Table 1 Preliminary classification of culturable bacterium isolate from composite microbial system SYF

| 菌株编号 | 近缘细菌 | 同源性比率/% |
|--|--|---------|
| SYF-1 | <i>Microbacterium</i> sp.QDHT-09(FJ210805.1) | 99 |
| SYF-2、SYF-2-2 | <i>Brevundimonas</i> sp.201(EU841501.1) | 99 |
| SYF-4、SYF-14 | <i>Rhizobium borbori</i> DN365(EU356639.1) | 99 |
| SYF-5 | <i>Rhizobium</i> sp.3(HM151908.1) | 99 |
| SYF-6、SYF-6-2、SYF-7、SYF-10、SYF-10-2、SYF-13 | <i>Pseudomonas putida</i> BJ10(HQ848377.1) | 99 |
| SYF-8、SYF-9、SYF-12、SYF-15、SYF-16 | <i>Escherichia coli</i> NA114(CP0002797.2) | 99 |
| SYF-11 | <i>Arcobacter butzleri</i> ED-1(FJ968634.1) | 99 |
| SYF-17 | <i>Acinetobacter</i> sp.SeaH-As2w(FJ607248.1) | 100 |
| SYF-18 | <i>Ochrobactrum intermedium</i> DSQ5(HM217123.1) | 99 |

2.3 复合菌群可培养真菌的筛选及纤维素降解能力

从真菌分离平板中共分离得到12株真菌单菌落,通过形态学鉴定分为4种不同菌株,对其进行ITS测序分析(表2)。结果表明,4种真菌均属于子囊菌,其中SYFz-1和SYFz-2属于青霉菌属,SYFz-3

2.2 复合菌群中可培养细菌的分离及纤维素降解能力

从细菌分离平板中共分离得到84株细菌单菌落,通过初步形态学分析,挑选20株形态差异显著的菌株,对其16S rDNA进行测序分析。16S rDNA基因BLAST分析结果(表1)表明,分离得到的菌株除SYF-1属于放线菌门的微杆菌属(*Microbacterium*)外,其余菌株均分布在变形菌门,涵盖了 α -变形菌、 γ -变形菌和 ϵ -变形菌的7个属。其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)最多,有6株;其次为大肠杆菌属(*Escherichia*);其余菌属各有1~2株,分别为:短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、弓形菌属(*Arcobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)。序列分析表明,SYF-4和SYF-14与*Rhizobium borbori* DN365(EU356639.1)有99%的相似性,菌株DN365是2010年从活性污泥中分离的1株苯胺降解新种^[10],它分离的活性污泥环境与笔者的复合系传代培养具有较相似的生境,但SYF-4、SYF-14与*Rhizobium borbori*是否为同一种类还需进一步生理生化鉴定。

属于节菱孢属,SYFz-4属于曲霉属。同时将得到的纯培养物接种到CMC-刚果红培养基上培养5 d,4株真菌都能形成较大的水解透明圈(图3),表明它们具有较强纤维素降解能力,其中SYFz-2的纤维素酶活最强。

表 2 复合菌群中可培养真菌的初步鉴定及其纤维素酶活

Table 2 Preliminary classification of culturable fungi isolate from composite microbial system SYF and the CMCase activity analysis

| 菌株编号 | 近缘真菌 | 同源性比率/% | 纤维素酶活/(U·mL ⁻¹) |
|--------|--|---------|-----------------------------|
| SYFz-1 | <i>Penicillium</i> sp. 12-20(GQ422445.1) | 99 | 1.28 |
| SYFz-2 | <i>Penicillium chrysogenum</i> HGQ6(JF834167.1) | 100 | 3.14 |
| SYFz-3 | <i>Arthrrium phaeospermum</i> T57(FJ462766.1) | 100 | 1.73 |
| SYFz-4 | <i>Aspergillus versicolor</i> UOA/HCPF8640(FJ878625.1) | 99 | 2.64 |

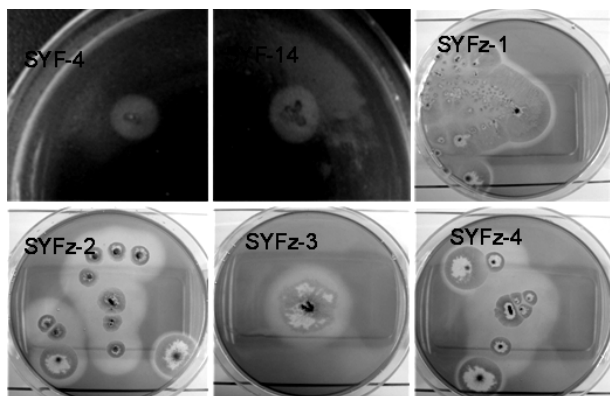


图 3 复合菌群中可培养微生物在纤维素刚果红平板上形成的透明圈

Fig. 3 The clear zone of the microorganisms on the cellulose-congo-red mediurn

2.4 复合菌群 16S rDNA 文库

从16S rDNA克隆文库中挑取白色菌落100个,通过菌落PCR法进行插入片段检测,得到77个阳性克隆子,阳性率为77%。将阳性克隆子进行*TaqI*、*HhaI*酶切和ARDRA分析,共得到9个OTU(操作分类单元),每种OTU挑选1个克隆子进行DNA测序分析,BLAST程序与GenBank基因库中相关序列比对的结果(表3)表明,复合系菌群具有丰富的物种多样

性,涵盖了变形细菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、螺旋体门(Spirochaetes)共4个门类。变形菌和拟杆菌为优势群落。变形细菌序列共3条,占克隆文库的76.6%,其中包含了 ϵ (1条)、 γ (1条)、 δ (1条)3个亚门;拟杆菌序列1条,占14.3%;厚壁菌序列2条,占2.5%;螺旋体菌序列1条,占1.2%;另外还有2条分类地位不明确的序列,占5.2%。序列比对结果表明:clone 4除了与*Bacteroides graminisolvens* (AB547643.1)具有100%的相似性外,大部分是与未培养微生物具有较高的相似性,*Bacteroides graminisolvens*是2009年从以牛粪便为原料的产甲烷反应器中分离的1株厌氧的具有木聚糖降解活性的新种^[11]。clone 25占克隆文库的一半以上,与布氏弯曲菌(*Arcobacter butzleri*)具有99%的相似性,布氏弯曲菌是一类较常见的、但不分解糖类的细菌,其基因组序列已公布。clone 34与具有葡萄糖分解能力的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)具有较高的同源性。其他克隆子则与一些难培养的或厌氧微生物的亲缘关系最为相近。另外,2个分类地位不明确的克隆子中的clone 72被归入了Firmicutes类群(图4),BLAST分析

表 3 复合菌群 16S rDNA 克隆文库分析

Table 3 16S rDNA library analysis of the composite microbial system SYF

| 克隆子编号 | 克隆子数量/个 | 近缘细菌 | 同源性比率/% | 分类地位(门) |
|----------|---------|--|---------|----------------|
| clone 4 | 11 | <i>Bacteroides graminisolvens</i> (AB547643.1) | 100 | Bacteroidetes |
| clone25 | 53 | <i>Arcobacter butzleri</i> ED-1(FJ968634.1) | 99 | Proteobacteria |
| clone 34 | 5 | <i>Pseudomonas putida</i> CDd-9(GU248219.1) | 99 | Proteobacteria |
| clone 51 | 3 | Bacterium enrichment culture clone DPF09(GQ377126.1) | 99 | 未知 |
| clone 58 | 1 | Uncultured clostridiacease IRB8(DQ069192.1) | 99 | Firmicutes |
| clone 63 | 1 | <i>Clostridium</i> sp.SK082(AB298754.2) | 99 | Firmicutes |
| clone 72 | 1 | Uncultured bacterium clone G-8(DQ443934.1) | 99 | 未知 |
| clone 89 | 1 | <i>Desulfovibrio vulgaris</i> RCH1(CP002297.1) | 99 | Proteobacteria |
| clone 93 | 1 | <i>Spirochaeta zuelzeriae</i> (FR749929.1) | 100 | Spirochaetes |

表明, 与其亲缘关系较近的大部分是未培养细菌, 应该是一类未获得纯培养物的新分类单元。clone 51 单独形成 1 个分支, 它和来源于富含动物排泄物的

池塘缺氧底泥富集培养物 clone DPF09^[12]具有较高亲缘关系, 推测其可能是一类存在于富集培养物中独特的细菌类群。

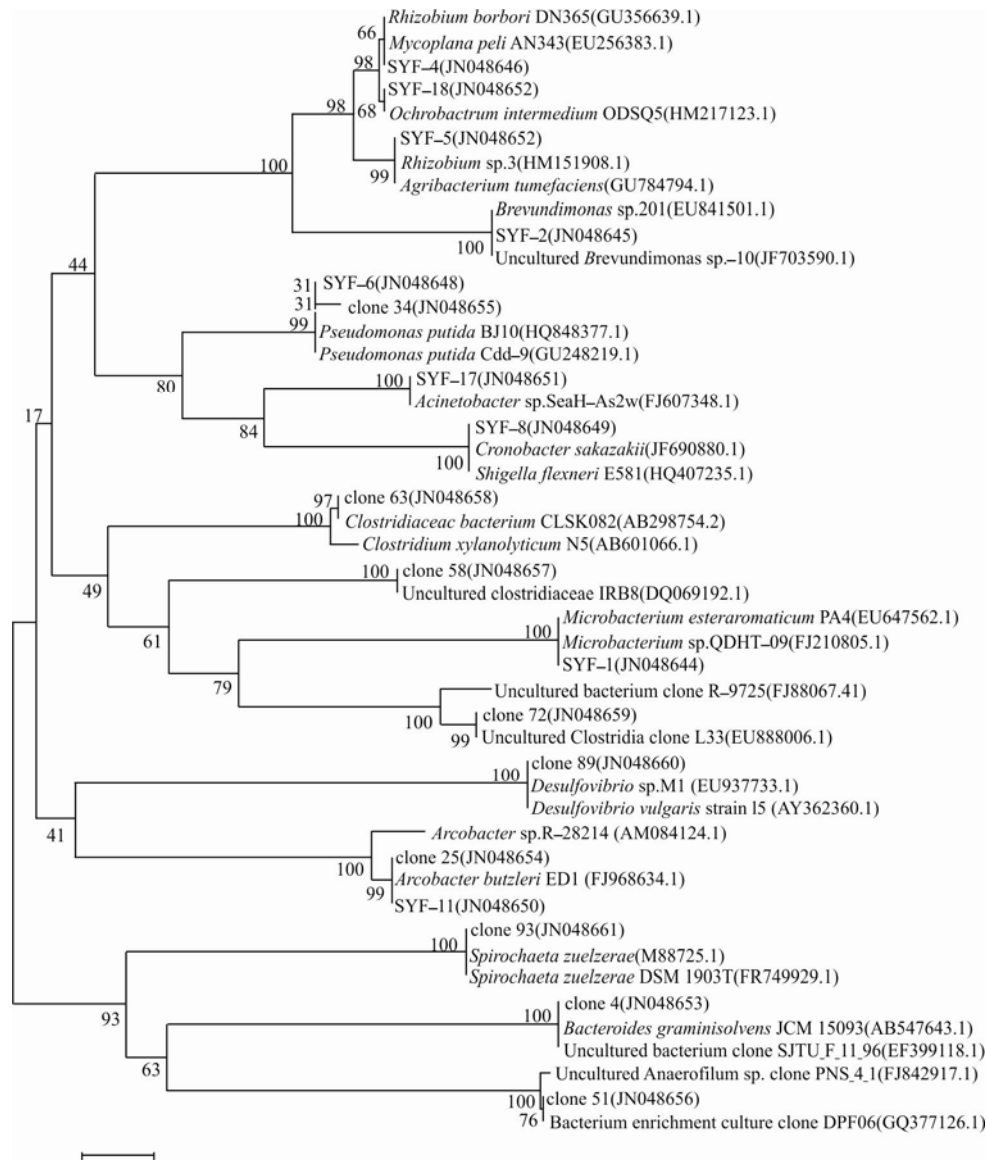


图 4 复合菌群中可培养细菌和不可培养细菌系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic analysis of the culture-dependent and culture-independent bacterium of the composite microbial system SYF

2.5 复合菌群 ITS 克隆文库

从复合菌群真菌的ITS克隆文库中挑取白色菌落100个, 通过菌落PCR法进行插入片段检测, 得到89个阳性克隆子, 阳性率为89%。将阳性克隆子进行TaqI、HaeIII酶切和ARDRA分析, 共得到5个OTU, 每种OTU挑选1个克隆子进行DNA测序分析, 利用BLAST程序与GenBank基因库中相关序列进行比对, 结果(表4)表明, 复合菌群中主要为子囊类真菌, 而在子囊菌中又以发菌科真菌为优势种。序列比对

结果表明: clone z-10与*Hamigera fusca* NRRL 35721具有92%的相似性, *Hamigera fusca*是2010年发现的一属新的真菌^[13]。clone z-26占克隆文库的57.3%, 与青霉菌属(*Penicillium*)具有98%的相似性。clone z-38与踝节菌属(*Talaromyces*)具有较高的同源性, 但有关踝节菌属的研究报道较少。clone z-56与*Penidiella* sp. HEY-1具有95%的同源性, 何友文等^[14]发现*Penidiella* sp. HEY-1可产生 β -葡萄糖苷酶, 可参与纤维素的降解。clone z-67与现有真菌具有较大差

异,它应该是一类未获得纯培养物的新分类单元。 培养真菌的系统发育树如图5所示。
通过ITS序列构建的复合菌系中可培养真菌和不可

表 4 复合菌群真菌 ITS 克隆文库分析

Table 4 ITS library analysis of the composite microbial system SYF

| 克隆子编号 | 克隆子数量/个 | 近缘真菌 | 同源性比率/% | 分类地位(科) |
|------------|---------|--|---------|----------------|
| clone z-10 | 31 | <i>Hamigera fusca</i> NRRL 35721(GU092939.1) | 92 | Trichocomaceae |
| clone z-26 | 51 | <i>Penicillium</i> sp. 196F (AB468053.1) | 98 | Trichocomaceae |
| clone z-38 | 4 | <i>Talaromyces helicus</i> NRRL 2106(AF033396.1) | 99 | Trichocomaceae |
| clone z-56 | 2 | <i>Penidiella</i> sp. HEY-1 (HM051159.1) | 95 | Capnodiales |
| clone z-67 | 1 | Uncultured fungus clone B4F01(GU073009.1) | 86 | 未知 |

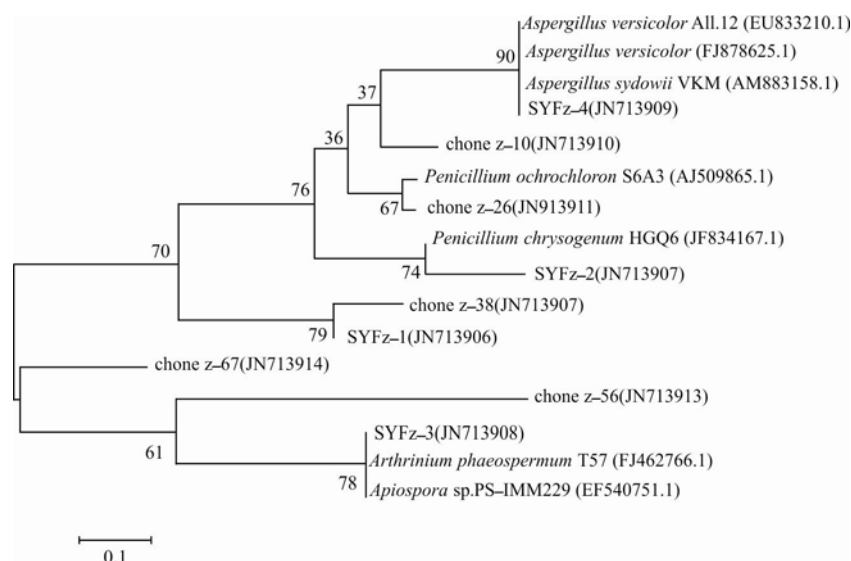


图 5 复合菌群中可培养真菌和不可培养真菌系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic analysis of the culture-dependent and culture-independent fungi of the composite microbial system SYF

3 结论与讨论

迄今,已报道的产纤维素酶的微生物大多是以纯培养手段获得的,其对自然结构的纤维素分解能力有限,应用于复杂环境时效果较差^[15]。在自然条件下,纤维素等物质的降解是在不同微生物分泌的多种酶系的协同作用下完成的^[16-17],故模拟多菌协同作用的复合菌群在纤维素等物质的利用方面具有广阔的应用前景。部分研究表明,复合菌群较单一菌株具有酶系互补^[18]、多种酶系可降低中间产物的反馈抑制作用^[19]以及复合菌群中不同菌株间可形成互利共生现象^[20]等优点,从而有利于促进纤维素的生物降解。但由于复合菌群的构建较复杂,耗时较长,菌种组成的多样性以及不同菌种之间协同作用的复杂性,使复合菌群的纤维素降解机理研究

较为困难。目前,对混合菌群的研究主要集中于2~3种纯菌的人工组配阶段^[21]。笔者经过连续培养构建了1组高效的纤维素降解复合菌群SYF,该复合菌群表现出较强的纤维素分解能力和较高的微生物组成多样性,说明该复合菌群中可能存在产不同纤维素酶或其他酶的多种微生物,这些微生物及其所产的纤维素酶或其他酶通过协同作用,从而加速纤维素的降解。下一步将集中探讨复合菌群SYF所产酶及其酶学性质,以便揭示该复合菌群降解纤维素的作用机制。

参考文献:

- [1] Bell T, Newman J A, Silverman B W, et al. The contribution of species richness and composition to bacterial services[J]. Nature, 2005, 436: 1157-1160.

- [2] 崔宗均, 李美丹, 朴哲, 等. 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.
- [3] Gina H, Patricia V, Yoav B. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview [J]. Biology and Fertility of Soils, 2001, 33 (4): 265–278.
- [4] Haruta S, Cui Z, Huang Z, et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose degradation ability[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59: 529–534.
- [5] Ruijsenaars H J, Hartmans S. Plate screening methods for the detection of polysaccharase producing microorganism[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 55: 143–149.
- [6] Hardin M T, Mitchell D A, Howes T. Approach to designing rotating drum bioreactors for solid state fermentation on the basis of dimensionless design factors[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 67(3): 274–282.
- [7] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697–703.
- [8] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[C]// Innis M A, Gelfand D H, Shinsky J J, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315–322.
- [9] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150–163.
- [10] Guo X Z, Sui Z R, Mei Y X, et al. *Rhizobium borbori* sp. nov., aniline degrading bacteria isolated from activated sludge[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61: 816–822.
- [11] Nishiyama T, Ueki A, Kaku N, et al. *Bacteroides graminisolvens* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59: 1901–1907.
- [12] Dong Y, Butler E C, Philp R P, et al. Impacts of microbial community composition on isotope fractionation during reductive dechlorination of tetrachloroethylene[J]. Biodegradation, 2011, 22 (2): 431–444.
- [13] Peterson S W, Jurjevic Z, Bills G F, et al. Genus *Hamigera*, six new species and multilocus DNA sequence based phylogeny[J]. Mycologia, 2010, 102(4): 847–864.
- [14] 何友文, 李江, 王剑锋, 等. *Penidiella* sp. HEY-1 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及其酶学性质[J]. 林产化学与工业, 2011, 31(3): 1101–1114.
- [15] Christopher H V. The molecular composition of lignin in spruce decayed by white-rot fungi (*Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*) using pyrolysis–GC–MS and thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2003, 51: 67–75.
- [16] 陈耀宁. 堆肥化中协同降解木质纤维素的混合菌筛选及其培养[D]. 长沙: 湖南大学环境科学与工程学院, 2007.
- [17] Ikram-ul-Haq, Muhammad M J, Tehmina S K, et al. Cotton saccharifying activity of cellulases produced by co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*[J]. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2005, 1(3): 241–245.
- [18] 涂璇, 薛泉宏, 司美茹, 等. 多元混菌发酵对纤维素酶活性的影响[J]. 工业微生物, 2004, 34(1): 30–34.
- [19] Song Rui-qing, Deng Xun. Study on biodegradating ability of thirteen edible fungi to straw[J]. Journal of Forestry Research, 2004, 15(3): 223–226.
- [20] 蒲涛, 钟毅沪, 郑宗坤. 混合培养对固氮菌和纤维素分解菌生长及固氮的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(1): 1–4.
- [21] Gutierrez-Correa M, Portal L, Moreno P, et al. Mixed culture solid substrate fermentation of *Tichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse[J]. Bioresource Technology, 1999, 68(2): 173–178.

责任编辑: 罗慧敏