

富集纤维素降解菌群过程中微生物群落多样性分析

王彦伟^{1,2,3}, 祝其丽^{1,2}, 吴波^{1,2}, 谭芙蓉^{1,2}, 胡国全^{1,2}, 何明雄^{1,2}, 高立洪^{3*}

(1. 农业部沼气科学研究所 秸秆资源化利用科技创新团队, 四川 成都 610041; 2. 农业农村部农村可再生能源开发与利用重点实验室, 四川 成都 610041; 3. 农业废弃物资源化利用技术与设备研发重点实验室, 重庆 404100)

摘要: 纤维素降解微生物资源的挖掘, 是实现纤维素高值化利用的重要途径。为构建高效的可培养的纤维素降解体系, 以羧甲基纤维素钠(CMCNa)为底物, 通过长时间富集山羊瘤胃内容物, 经传代培养, 初步构建了1个纤维素降解富集体系。在富集过程中选取前、中、后3个时期10个传代样品, 采用高通量测序技术, 剖析富集物中细菌、真菌群落结构和多样性的响应差异, 揭示不同时期的微生物群落结构变化规律。前期传代样品的细菌丰富度、多样性及均匀度均优于后期传代样品。前期传代样品的真菌群落丰富度较差, 但真菌群落的多样性及均匀性高于后期传代样品。分析10个样品中的细菌属水平, 德沃斯氏菌属(*Devosia* sp.), 纤维单胞菌属(*Cellulomonas* sp.)所占比例较高。真菌属水平曲霉属(*Aspergillus* sp.), 古根霉属(*Archaeorhizomyces* sp.)所占比例较高。细菌、真菌属热图分析表明不同传代样品之间优势种群存在显著差异。以羧甲基纤维素钠为底物对山羊瘤胃内容物连续传代培养可以富集得到纤维素降解复合菌系。

关键词: 羧甲基纤维素钠; 富集; 纤维素降解; 群落结构

中图分类号: S182; S216.4 文献标志码: A 文章编号: 1000-1166(2023)01-0040-07

DOI:10.20022/j.cnki.1000-1166.2023010040

Analysis of Microbial Diversity of Cellulose Degrading Concentration Process / WANG Yanwei^{1,2,3}, ZHU Qili^{1,2}, WU Bo^{1,2}, TAN Furong^{1,2}, HU Guoquan^{1,2}, HE Mingxiong^{1,2}, GAO Lihong^{3*} / (1. Team of Straw Utilization, Biogas Institute of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610041, China; 3. Chongqing Key Laboratory of Agricultural Waste Utilization and R&D of Equipment, Chongqing 404100, China)

Abstract: Results obtained from this study the community changes during the enrichment process of cellulose degrading bacteria, and provide a theoretical basis for constructing an efficient and cultivable cellulose degradation system. Cellulose degradation system was constructed using CMCNa as carbon sources. Illumina Miseq high-throughput sequencing technology was used to analyze the sample from the enrichment process. The response differences of bacterial and fungal community structure and diversity in the enrichment process was shown, and changes of microbial community in different periods was revealed. The abundance, diversity and uniformity of samples in the early stage of bacterial diversity analysis were better than those in later passages. In the analysis of fungal community diversity, the abundance of samples from the early passages was poor, but the diversity and uniformity of the samples were higher than those from the later passages. Analysis of the bacterial genus level in 10 samples, *Devosia* sp., *Cellulomonas* sp. accounted for a higher proportion. The top three proportions of fungi are *Aspergillus* sp., and *Archaeorhizomyces* sp. There are significant differences in the dominant populations of bacteria and fungi community in different samples. A large number of specific cellulose degrading microorganisms can be enriched by using straw as a substrate under the action of selective substrate.

Key words: CMCNa; enrichment; cellulose degradation; community structure

收稿日期: 2022-12-21

项目来源: 四川省科技计划项目(2018JY0216; 2022YFS0508); 青海科技厅科技成果转化专项项目(2022-NK-124); 成都农业科技中心地方财政专项资金项目(NASC2020AR02); 重庆市农科院农业废弃物资源化利用技术与设备研发重点实验室开放课题。

作者简介: 王彦伟(1986-), 男, 汉族, 山东临沂人, 副研究员, 研究方向为农业微生物资源的挖掘与应用, E-mail:wangyanwei@caas.cn

通信作者: 高立洪, E-mail: grantsan@163.com

木质纤维素是地球上储量最大的可再生的生物质资源,但木质纤维素结构非常复杂,使其难以快速被微生物降解,这便限制了纤维素资源化的有效利用^[1-3]。获得能高效转化纤维素的微生物是纤维素资源高值化利用的基础。利用微生物共培养(复合菌系)进行纤维素降解与生物转化是实现其高值化利用的有效途径。实现纤维素废弃物的高效利用,已成为缓解能源紧张、提高环境质量、促进经济和社会可持续发展的有效方法^[4-5]。但微生物共培养体系复杂,不同种类的微生物如何在共培养体系发挥作用,仍然是急需解析的问题之一。

微生物在自然界中的纤维素降解中起主要作用,纤维素降解微生物很容易在不同的生境中找到,如土壤、农业废弃物、昆虫内脏、粪便和反刍动物的瘤胃等^[6]。瘤胃是一种具有多种微生物种群的自然纤维素降解系统,通过微生物相互作用降解纤维素材料^[7]。Xing^[8]等报道牛瘤胃微生物促进小麦秸秆生物降解了 96%~97% 的纤维素和半纤维素。Li^[9]等在瘤胃中发现 2 个微生物组可以促进青储秸秆糖的转化。但是利用单一菌株进行木质纤维素降解时,由于底物抑制和反馈抑制作用的存在,使得木质纤维素降解水平低下^[10-12]。近些年来,人们发现混合的菌群对复杂的有机污染物及天然难降解物质如多氯联苯、多环芳烃和合成燃料等有较强的降解能力^[13-15]。大多数情况下,多菌的降解能力都远远高于单菌,因而纤维素降解复合菌系已越来越受到人们的重视。

复合菌系降解木质纤维素时能够避免单一菌株降解时产生的底物抑制和反馈抑制作用,因产酶更加多样,从而能够有效地降解木质纤维素。Kato^[16]等通过研究复合菌系中主要菌株间的关系,从中分离主要菌株,并将厌氧的纤维素降解菌和好氧的非纤维素降解菌株组合在一起,发现非纤维素降解菌对纤维素降解起了非常重要的作用。本研究以连续传代的纤维素降解复合菌系为研究对象,利用 16S rRNA 及 ITS 基因扩增子高通量测序方法,分析不同传代复合菌系降解纤维素过程中各微生物分类单元的群落组成及其相对丰度变化,探究复合菌系群落结构的动态变化规律。

1 材料与方法

1.1 材料

接种物:取自四川省金堂县农村合作社新鲜屠

宰的山羊瘤胃内容物,4℃ 保存于无菌的血清瓶中。配制赫奇逊无机盐培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): KH_2PO_4 1.0, NaCl 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, NaNO_3 2.5, FeCl_3 0.001, CaCl_2 0.1, pH 值 7.2。DNeasy Power Soil Kit。

1.2 样品的传代培养

以羧甲基纤维素钠为唯一碳源,配制赫奇逊无机盐培养基,将培养基分装至三角瓶中,装液量为 40% (体积比), 1×10^5 Pa、121℃ 灭菌 15 min。接种底物为瘤胃内容物,接种量为 10% (体积比), 30℃ 150 $\text{rpm} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养,连续传代培养,每隔 6 d 传一代,共传代 20 次,每一代取样保存至 -80℃ 冰箱。

1.3 微生物组总 DNA 提取

选取 20 次样品中的 10 个样品,包含第一代及最后一代编号 C1-C10,采用 TIANamp 公司的 DNeasy PowerSoilKit 进行抽提,采用荧光分光光度计(Quantifluor-ST fluorometer, Promega, E6090),在 260 nm 和 280 nm 处分别测定 DNA 的吸光值,检测 DNA 的浓度,并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。调整 DNA 溶液浓度, DNA 工作液保存于 4℃,储存液保存于 -20℃。

1.4 PCR 扩增

以上述 DNA 为模板,利用引物对各样品基因组 DNA V3~V4 区域及真菌 ITS 序列进行 PCR 扩增,将反应体系置于 ABI Gene Amp[®] 9700 型 PCR 仪进行扩增,PCR 产物参照电泳初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluor[™]-ST 蓝色荧光定量系统(购于 Promega 公司)进行检测定量。利用 TruSeq[™] DNA Sample Prep Kit 回收纯化 PCR 产物,Tris-HCl 洗脱,2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,将扩增产物送至上海派森诺生物科技有限公司,采用 Illumina MiSeq 测序平台进行测序,构建 16S rRNA 文库及 ITS 文库。

1.5 数据分析

首先对高通量测序的原始下机数据进行初步质量筛查;通过质量初筛的序列按照引物和 Barcode 信息,识别分配入对应样品,并去除嵌合体等疑问序列;对获得的序列进行 OTU 归并划分,每个 OTU 的代表序列用于分类地位鉴定以及系统发育学分析;根据 OTU 在不同样品中的丰度分布,评估每个样品的多样性水平,并通过稀疏曲线反映测序深度是否达标;对各样品(组)在不同分类水平的具体组成进行分析(并检验组间是否具有统计学差异);通过多

种多变量统计学分析工具,进一步衡量不同样品(组)间的菌群结构差异及与差异相关的物种;根据物种在各样品中的组成分布,构建互作关网络;根据 16S rRNA 及 ITS 基因测序结果,预测各样品的菌群代谢功能。

2 结果与分析

2.1 样品测序量

对 10 个连续传代样品中细菌 16S rRNA 序列测定,获得序列量在 53885 ~ 67722 之间,经过去除低质量、减噪等方法过滤,每个样品的有效序列在 46442 ~ 59133 条,平均测序覆盖率为 99.2%。碱基长度分布于 400 ~ 450 之间。10 个样品的真菌 ITS 序列测定序列量在 78340 ~ 97643 之间,经过去除低质量、减噪等方法过滤后,每个样品的有效序列在 71456 ~ 89874 条,平均测序覆盖率为 99.6%。碱基长度分布于 100 ~ 300 之间。

2.2 样品 OUT 分布情况

10 个样品中细菌属水平测序比对结果丰富,其中样品 OUT 比对结果在 262 ~ 535 个属,随着传代次数增多,样品中细菌属逐渐减少,其中样品 C1(第 1 代)测序属最多达到 535,样品 C8(第 16 代)测序属最少 209 可比对属,随着传代进行 C8, C9, C10 复合系逐渐稳定,细菌构建完成(见图 1)。10 个样品

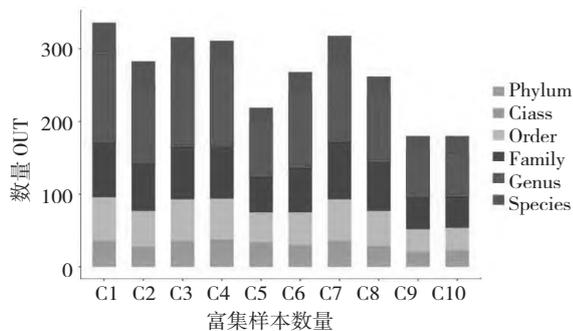


图 1 细菌 OTU 分布

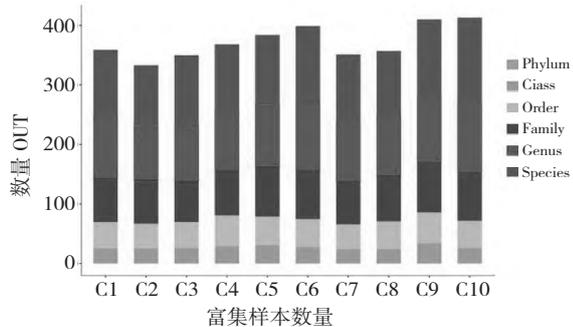


图 2 真菌 OTU 分布

中真菌种水平序列比对结果丰富,其中 OUT 比对结果在 96 ~ 139 个种之间,随着传代次数增多,样品中真菌种逐渐增多, C10 样品测序属种达到 139 个。C2 样品中可比对种最少为 96 个。样品中真菌的可比对序列与细菌变化趋势不同(见图 2)。

2.3 细菌、真菌群落丰富度和多样性的影响

为了能较为全面的评估 10 个传代样品中微生物群落的 Alpha 多样性,表 1 反映了 10 个样品的多样性差异,在细菌群落多样性分析中,传代后期样品 C8, C9, C10 的 Chao1 及 Observed species 数值较小,表明丰富度较前 7 代样品差异显著,后期传代样品 C8 的 Shannon 和 Simpson 数值较小,多样性较其他样品差异显著, C8 样品的 Pielou's e 指数小,样品的均匀度较其他样品差异显著。前期样品的细菌丰富度、多样性及均匀度均好于后期传代样品。真菌多样性分析中,前期传代样品 C1, C2 及 C3 的 Chao1 及 Observed species 数值较小,表明丰富度较后 7 代样品差异显著。样品 C10 的 Shannon 和 Simpson 数值较小,多样性较其他样品差异显著。C10 样品的 Pielou's e 指数小,样品的均匀度较其他样品差异显著,真菌群落多样性分析中,前期传代样品中的丰富度较差,但是样品的多样性及均匀性高于后期传代样品。富集样品的前期丰度较高,后期变少,可能是部分菌群在富集筛选过程中退化,作用降低,优势菌群增加,丰度降低。

2.4 传代样品的微生物群落组成分析

对各个物种的组内样品丰度值进行归一化后,再求样品平均值,分析 10 个细菌属水平,所展示样品前 20 的细菌属如图 3, 10 个样品中各种属展示如下。德沃斯氏菌属(*Devosia* sp.) 占 13%, 纤维单胞菌属(*Cellulomonas* sp.) 占 12%, 异根瘤菌属(*Allo-rhizobium*)-新根瘤菌属(*Neorhizobium*)-副根瘤菌属(*Pararhizobium*)-根瘤菌属(*Rhizobium*) 占 4%。在前期样品(C1)中链霉菌属(*Streptomyces* sp.) 大量存在,这可能与瘤胃液的微生物类群相关,随着传代的进行,德沃斯氏菌属(*Devosia* sp.)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas* sp.) 逐渐成为优势菌群。其中在后期传代样品(C7)中纤维弧菌属(*Cellvibrio* sp.)、砂单胞菌属(*Arenimonas* sp.) 占据了优势地位,有别于其他后期样品。C8、C9 和 C10 样品中群落结构趋于稳定。结果表明:厚壁菌门中的种属占优势地位,这和报道中的瘤胃微生物相似,牛瘤胃中厚壁菌门也是秸秆降解的优势种群^[17-18],同时在测序分析中仍然有大量的微生物未被鉴定到属。已有的研究也

表 1 样品 Alpha 多样性指数表

	细菌群落					真菌群落				
	Chao1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数	Pielou_e 指数	Observed Species 指数	Chao1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数	Pielou_e 指数	Observed Species 指数
C1	906.34	0.895322	5.72714	0.586884	866.2	415.202	0.988918	7.57863	0.87148	414.8
C2	911.178	0.968055	6.55891	0.670227	882.9	412.383	0.980322	7.19741	0.828742	411.5
C3	781.865	0.947529	6.00819	0.631636	730.2	409.1	0.903074	6.02	0.693872	409
C4	721.555	0.936384	5.58153	0.596545	655.5	438.057	0.989623	7.59376	0.865407	438
C5	559.169	0.932299	5.6301	0.621599	532.8	485.372	0.988737	7.73965	0.867582	484.7
C6	752.923	0.962034	6.27736	0.6604	726.8	512.738	0.902622	6.14042	0.682375	511.5
C7	1038.49	0.947952	6.16563	0.617183	1016.9	433.97	0.875114	4.36993	0.498876	433.4
C8	461.198	0.738685	3.86519	0.448238	394.3	491.253	0.990091	7.7309	0.864795	491
C9	431.741	0.932731	5.15782	0.597431	397.1	495.939	0.852483	5.36365	0.599048	495.8
C10	482.711	0.94069	5.31146	0.600985	457.6	541.331	0.7636	4.5175	0.497623	540.5

表明:自然资源中仍然有许多未被发现的微生物,可能具有重要的生物学功能。

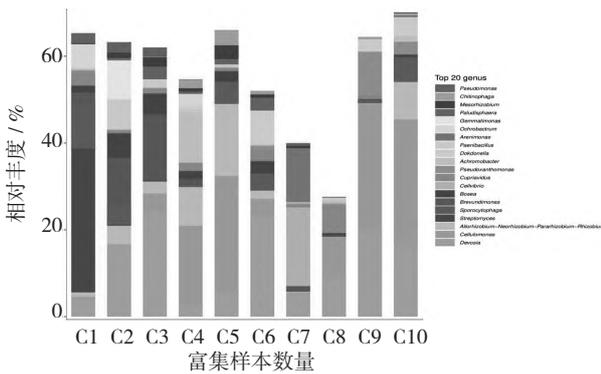


图 3 样品细菌属分类水平物种组成

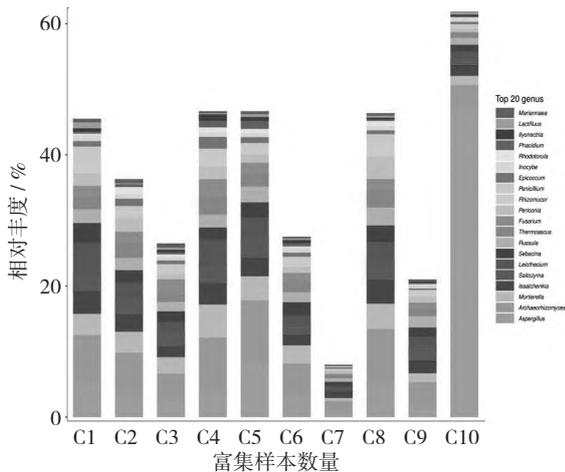


图 4 样品真菌属分类水平物种组成

对各个物种的组内样品丰度值进行归一化后,再求样品平均值,分析 10 个样品真菌属水平,所展

示样品前 20 的真菌属如图 4 所示,其中曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 占 8%, 古根霉属 (*Archaeorhizomyces* sp.) 占 6%, 被孢霉属 (*Mortierella* sp.) 占 3% 等。未鉴定到属分类的真菌菌属占比最高,大量的未培养的真菌仍然需要进一步挖掘。

2.5 组间差异

为了比较样品间的物种组成差异,实现对各样品的物种丰度分布趋势的展示,研究中,使用属水平的分类单元组成作为分析对象,使用平均丰度前 50 位的属的丰度数据绘制热图。细菌属热图分析不同样品的差异较为显著,不同传代样品之间优势种群存在显著差异,纤维弧菌属 (*Cellvibrio* sp.) 和 砂单胞菌属 (*Arenimonas* sp.) 仅在 C7 样品中较为丰富,纤维单胞菌属 (*Cellulomonas* sp.) 和假黄色单胞菌属 (*Pseudoxanthomonas* sp.) 在 C4、C9、C10 样品中较为丰富,在 C1、C2、C3 样品中 *Pseudomonas* sp 属占有优势,但随着传代的进行,在后面的传代样品中,逐渐被其他优势菌群替代。类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* sp.) 和 戈马单胞菌属 (*Gommatimonas* sp.) 仅在 C2 中占有优势。德沃斯氏菌属 (*Devosia* sp.) 和独岛杆菌属 (*Dokdonella* sp.) 分别在 C6、C9、C10 样品中显示为优势菌属。热图分析显示随着传代的进行,样品中的细菌微生物群落逐渐改变,优势菌群发生变化,样品中的群落结构不稳定。

为了比较样品间的物种组成差异,实现对各样品的物种丰度分布趋势的展示,研究中,使用属水平的分类单元组成作为分析对象,使用平均丰度前 50 位的属的丰度数据绘制热图。真菌属热图分析表明

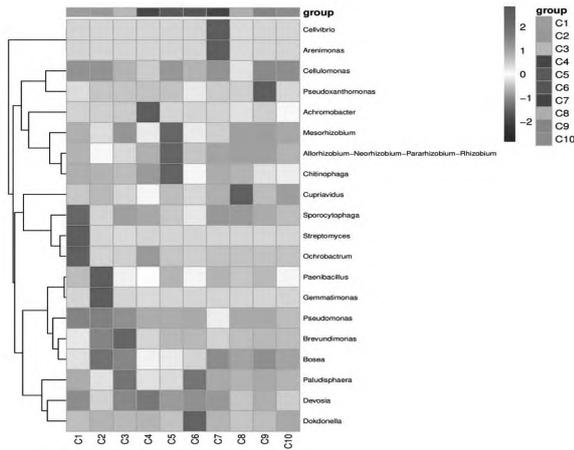


图5 细菌属水平 heatmap 分析

不同样品的差异较为显著, C10 样品中仅存在曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 优势种群。C1、C2、C3、C4、C5 样品中优势菌种较多, 分别是 *Lactifluc* sp.、*peniollum* sp.、红酵母菌属 (*Rhodotorula* sp.)、*Llyonectria* sp.、附球菌属 (*Epicoccum* sp.)、星裂盘菌属 (*phacidium* sp.)。C7、C9 样品中优势菌群未被发掘, 在 C8 样品中黑团胞属 (*Periconia* sp.) 占有优势。

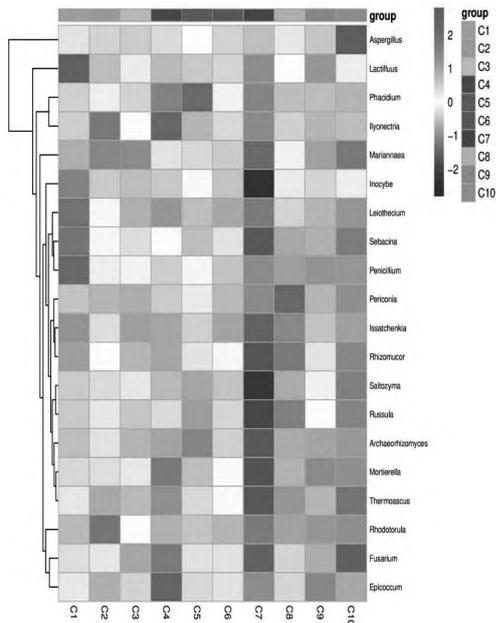


图6 真菌属水平 heatmap 分析

3 讨论

本研究采用 Illumina MiSeq 技术对连续传代的复合系样品的群落进行高通量测序, 组间差异性分析显示不同传代样品微生物群落结构存在明显的差异, 细菌、真菌热图分析表明不同传代样品中的细

菌、真菌的优势菌群不同, 前期传代样品 (C1, C2, C3, C4 和 C5) 中的假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、生孢噬纤维菌属 (*Sporocytophaga* sp.)、链霉菌属 (*Streptomyces* sp.)、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum* sp.)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* sp.)、*gemmatimonas* sp.、短波单胞菌属 (*Brevundimonas* sp.)、无色杆菌属 (*Achromobacter* sp.)、中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium* sp.)、鞘氨醇菌属 (*Chitinophaga* sp.) 等优势种属逐渐消失, 前期传代样品中的优势细菌属逐渐被后期传代样品中的独岛杆菌属 (*Dokdonella* sp.)、纤维弧菌属 (*Cellvibrio* sp.)、假黄色单胞菌属 (*Pseudoxanthomonas* sp.) 等取代, 前期传代样品 (C1, C2, C3, C4, C5) 中优势真菌 *Lactifluc* sp.、青霉属 (*Peniollum* sp.)、*llyonectria* sp. 等被黑团胞属 (*Periconia* sp.)、曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 取代。以 CMCNa 为唯一碳源连续富集、限制性培养过程中, 菌群结构一直处于变化的状态, 使随机性过程增加。后期传代样品优势细菌纤维弧菌属 (*Cellvibrio* sp.) 和假黄色单胞菌属 (*Pseudoxanthomonas* sp.) 都被报道过具有纤维素降解能力的菌属^[19-22], 这类菌属的保留, 可能与其具有木质纤维素分解功能的或者辅助降解纤维素功能有关。测序结果分析表明复合菌系中存在与纤维素降解有直接关系的菌, 也存在可能有未知的功能, 或者因适应培养基选择并保留, 也可能在接下来的传代培养中被“淘汰”。

通过分析 10 个样品中的 OUT 分类, 在细菌分类中 unclassified_Microbacteriaceae, 德沃斯氏菌属 (*Devosia* sp.) 和纤维单胞菌属 (*Cellulomonas* sp.) 3 种类型的种属占比较高, 其中德沃斯氏菌属 (*Devosia* sp.) 被报道过存在于污泥秸秆堆肥体系、棉花秸秆堆肥体系和秸秆还田的土壤等不同的秸秆降解体系中^[23-24], 其在秸秆降解复合菌系中发挥着重要的作用。纤维单胞菌属 (*Cellulomonas* sp.)^[25-26] 是细菌属中纤维素酶活力较强的菌株, 该菌属可通过分泌几种胞外纤维素酶对秸秆进行水解, 在细菌纤维素降解过程中有重要的研究意义。在真菌 OUT 分类中 unclassified_fungi (49%), 未鉴定到属的真菌占大部分, 其作用有待于进一步解析。 *Aspergillus* sp. (8%)^[27-28] 及古根霉属 (*Archaeorhizomyces* sp.) 占 6%^[29-30] 都具备降解纤维素的能力, 在秸秆堆肥富集物中都被监测到是优势菌群, 被孢霉属 (*Mortierella* sp.) 占 3% 在复合系中的作用不明。在自然环境中, 木质纤维素的降解是多种微生物共同作用的结

晶,纤维素的彻底降解是通过多种微生物长时间相互作用的结果。对于纯培养的单菌,不论是细菌还是真菌,很少有明确报道表明单菌具有较强的天然木质纤维素分解能力。

以 CMCNa 为底物富集纤维素降解菌系,测序分析表明复合系中存在大量的纤维素降解菌,在选择性底物的作用下,特定的微生物得到了富集,但是连续传代的样品并没有获得稳定的复合系,这可能和培养时间、培养基组成等有关。要想获得稳定的复合系,还需要进一步优化培养条件等。

参考文献:

- [1] 孙付保,王亮,谭玲,等. 木质纤维素糖平台基质组成结构的分析表征技术研究进展[J]. 化工进展,2014,33(4): 883 – 890.
- [2] 亓伟,王闻,王琼,等. 木质纤维素预处理技术及其机理研究进展[J]. 新能源进展,2013,1(2): 150 – 158.
- [3] Somerville C. Toward a systems approach to understanding plant cell walls[J]. *Science*,2004,306(5705): 2206 – 2211.
- [4] Wongwilaiwalin S, Laathanachareon T, Mhuantong W, et al. Comparative metagenomic analysis of microcosm structures and lignocellulolytic enzyme systems of symbiotic biomass-degrading consortia[J]. *Applied microbiology and biotechnology*,2013,97(20): 8941 – 8954.
- [5] Miao C, Hamad W Y. Cellulose reinforced polymer composites and nanocomposites: a critical review[J]. *Cellulose*,2013,20(5): 2221 – 2262.
- [6] Poszytek K, Ciekowska M, Sklodowska A, et al. Microbial consortium with high cellulolytic activity (MCHCA) for enhanced biogas production[J]. *Front Microbiol*,2016,7: 324.
- [7] Zheng Bo Yue, Wen Wei Li, Han Qing Yu. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*,2013,128,738 – 744.
- [8] Xing B S, Han Y, Wang X C, et al. Persistent action of cow rumen microorganisms in enhancing biodegradation of wheat straw by rumen fermentation[J]. *Sci Total Environ*,2020,715:136529.
- [9] Li J, Tang X, Chen S, et al. Ensiling pretreatment with two novel microbial consortia enhances bioethanol production in sterile rice straw[J]. *Bioresource Technology*,2021,339:125507.
- [10] Fernandez Fueyo E, Ruiz Duenas F J, Ferreira P, et al. Comparative genomics of ceriporiopsis subvermispora and phanerochaete chrysosporium provide insight into selective ligninolysis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,2012,109(14): 5458 – 5463.
- [11] Datta R, Kelkar A, Baraniya D, et al. Enzymatic degradation of lignin in soil: a review[J]. *Sustainability*,2017,9(7):1163 – 1169.
- [12] Chauhan P S. Role of various bacterial enzymes in complete deployment of lignin: a review[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*,2020,23:101498.
- [13] Kamimura N, Sakamoto S, Mitsuda N, et al. Advances in microbial lignin degradation and its applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*,2019,56:179 – 186.
- [14] Chen Y, Li C, Zhou Z, et al. Enhanced biodegradation of alkane hydrocarbons and crude oil by mixed strains and bacterial community analysis[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*,2014,172(7): 3433 – 3447.
- [15] Santisi S, Cappello S, Catalfamo M, et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*,2015,46(2): 377 – 387.
- [16] Wang W, Yan L, Cui Z, et al. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose[J]. *Bioresource Technology*,2011,102(19): 9321 – 9324.
- [17] R Seshadri, S C Leahy, G T Attwood, et al. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection[J]. *Nat Biotechnol*,2018,36: 359 – 367.
- [18] Bao Shan Xing, Yule Han, Xiaochang C, et al. Persistent action of cow rumen microorganisms in enhancing biodegradation of wheat straw by rumen fermentation[J]. *Science of The Total Environment*,2020,715:0048 – 9697.
- [19] 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(03):36 – 39.
- [20] Maki M L, Broere M, Leung K T, et al. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers[J]. *International Journal of Biochemistry Molecular Biology*,2011,2(2): 146 – 154.
- [21] Kwon G H, Kwon M J, Park J E, et al. Whole genome sequence of a freshwater agar-degrading bacterium *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 [J]. *Biotechnology Reports*,2019,23:e00346.
- [22] Glaeser S P, Iulian G, Hossein H, et al. Endophytic bacterial communities of oilseed rape associate with genotype-specific resistance against *Verticillium longisporum*[J].

- FEMS Microbiology Ecology, 2019, 96(1):183 – 188.
- [23] Du R, Yan J, Li S, et al. Cellulosic ethanol production by natural bacterial consortia is enhanced by *Pseudoxanthomonas taiwanensis* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1):10.
- [24] Ting Ting S, Xiao G E, Mai Jun L I, et al. Screening of Strains of Cellulase-Producing Bacteria in Compost of Sewage Sludge and Straw and Optimization of Cellulase-Producing Conditions [J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2013, 29(6):768 – 772.
- [25] Li Ping X U, Zhe J, Ying Liang G E, et al. Bacterial Community on the Corn Straw in Suihua Area of Heilongjiang Province by Illumina Miseq Sequencing [J]. *science and technology of food industry*, 2018 (23):105 – 110.
- [26] Yin L J, Huang P S, Lin H H. Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp. YJ5. [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2010, 58(17):9833 – 9837.
- [27] Pierre BÉGUIN, Eisen H. Purification and partial characterization of three extracellular cellulases from *Cellulomonas* sp. [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2010, 87(3):525 – 531.
- [28] Contesini F J, Lopes D B, Macedo G A, et al. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use [J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2010, 67(3 – 4):163 – 171.
- [29] Nianlei Z, Guangyi F U, Youze X U, et al. Study on the Water-soluble Lignin Degradation by *Aspergillus* sp. F – 1 [J]. *Environmental Engineering Technology*, 2019, 42(2):38 – 44.
- [30] Fengge Z, Yunqian H, Cobb A B, et al. *Trichoderma* Biofertilizer Links to Altered Soil Chemistry, Altered Microbial Communities, and Improved Grassland Biomass [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:848 – 852.