

曹燕篆,王小娟,袁旭峰,等. 利用废纸产纤维素酶复合菌系的筛选及性质研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(1):237-241.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.01.056

利用废纸产纤维素酶复合菌系的筛选及性质研究

曹燕篆^{1,2},王小娟²,袁旭峰²,王小芬²,崔宗均²

(1. 山西农业大学资源与环境学院,山西太谷 030801; 2. 中国农业大学农学院,北京 100193)

摘要:为了获得 1 组能够高效分解废纸并产胞外纤维素酶的复合菌系,采用外淘汰法,在常温条件下以土壤及枯枝落叶为菌源,以废打印纸为唯一碳源,筛选得到 1 组复合菌系 PSD。结果表明,该复合菌系能够在 6 d 内分解纸总质量的 71%,其中纤维素降解率为 72%,半纤维素降解率为 48%。此外,羧甲基纤维素酶活性在分解 3 d 时达到最高值 3.26 U/mL,半纤维素酶活性在分解 4 d 时达到最高值 6.37 U/mL。当培养温度在 25~35℃,培养基 pH 值在 6.0~8.0,培养基为 Hutchinson 时,复合菌系具有较好的纸分解效果和产酶活性。利用 16S 及 26S rRNA 克隆技术分析微生物组成结果表明,该复合菌系由细菌和真菌组成,其中细菌主要包括厚壁菌门、变形菌门及拟杆菌门,真菌主要包括波氏假性霉样菌(*Pseudallescheria boydii*)。由研究结果可知,得到的复合菌系 PSD 能够有效分解废纸并同时分泌纤维素酶,对打印纸废弃物的分解及资源利用具有一定的应用意义。

关键词:复合菌系;废纸分解;纤维素酶;微生物组成

中图分类号:S182;X705 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)01-0237-05

随着现代制造技术的发展,一次性纸张已经成为廉价商品,过去 40 年内,全球纸的消费量增长了 400%,每年产生的废纸量达 4 亿 t 以上。废纸作为最普遍的回收材料之一,理论上可循环使用 6~7 次,但是纸经多次回用后纤维流失率大,且纤维短,利用效率低,因此,全球纸张的平均回收水平只有 2.4 次^[1]。不合理处理无法循环利用的废纸(如填埋或焚烧),会造成温室气体的排放、垃圾渗滤液污染等环境问题^[2]。因此,开发多种资源化利用方式,对废纸进行充分利用,不仅可以节约大量植物木质纤维原料,同时可以减少固体废弃物的排放及对环境的污染。

废纸主要由纤维素(40%~80%)、半纤维素(5%~15%)及少量的木质素组成^[3]。近年来的研究发现,利用多种技术可将废纸转化为乙醇、甲烷、氢等能源物质^[4-6],为了提高转化率,往往需要物理、化学或酶预处理,从而在一定程度上增加了经济成本,或对环境造成了一定的污染。其中利用酶转化废纸材料具有很多优势,如底物特异性高、能源消费低、环境污染水平低等。然而,昂贵的成本成为纤维素酶制剂应用的瓶颈。近年来,利用农业或者工业废弃物通过液体或固体发酵的方式生产纤维素酶成为研究热点,例如以水稻秸秆、玉米穗、象草、甘蔗渣及生活污水等为底物^[7-12]。在纤维素酶的相关研究中,由于真菌能够分泌大量纤维素酶及半纤

维素酶,并且会将其分泌到细胞外至培养基中,易于分离纯化,成为重要的研究对象。但是,用真菌单独分解木质纤维素材料往往需要较长时间^[13]。近年来的研究发现,复合菌系能够有效降解水稻秸秆、玉米秸秆、柳枝稷及滤纸等木质纤维素材料,但是以液体微好氧条件培养的复合菌系胞外酶活性较低^[14-15]。因此,在好氧条件下筛选 1 组由真菌及细菌共同组成,且能够高效分解废纸并分泌纤维素酶的复合菌系,对废纸的资源化利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 复合菌系的筛选

复合菌系筛选用 Mandels 固体培养基,配方如下:1.4 g (NH₄)₂SO₄, 2.5 g 蛋白胨, 0.3 g MgSO₄·7H₂O, 2 g CaCO₃, 2 g KH₂PO₄, 5 mg FeSO₄·7H₂O, 1.6 mg MnSO₄, 1.7 mg ZnCl₂, 1.7 mg CoCl₂, 12 g 琼脂, 1 L 去离子水,调节 pH 值至 7.0。将培养基于 121℃ 灭菌 30 min 后倒平板待用。

菌源于 2010 年取自北京植物园的土壤、枯枝落叶,加入 50 mL 灭菌去离子水,于 200 r/min 振荡 20 min,吸取 1 mL 至上述培养基平板上,将(0.5±0.1) g 灭菌的废打印纸盖在培养基表面作为唯一碳源,于 30℃ 静置培养。待废纸分解后,将残余部分刮下并置于 50 mL 灭菌离心管中,加入 30 mL 灭菌去离子水,混匀后吸取 0.5 mL 进行转接。淘汰废纸分解效率低的菌系,将分解能力强的复合菌系每隔 4~6 d 转接 1 次,直至功能稳定。向培养 3 d 的复合菌系与分解剩余的纸中加入 25% 甘油,于 -80℃ 保存。

1.2 降解率

通过测定纸的总质量减少量及木质纤维素成分质量减少量,分析复合菌系对废纸的分解能力。将培养 3 d 的复合菌系通过“1.1”节的方法制备菌液并接种到 21 个新的培养基上,加入灭菌的废纸培养 6 d,从 0 d 开始每天取样,每次 3 个重复,于 60℃ 烘干 48 h 后称质量分析纸的分解情况。将残

收稿日期:2017-09-11

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD14B06);山西省青年科技研究基金(编号:201601D021105);山西省回国留学人员科研资金(编号:2016-072);山西农业大学引进人才科研启动项目(编号:2014YJ17)。

作者简介:曹燕篆(1984—),女,山西太原人,博士,讲师,主要从事废弃物资源利用及微生物生态学研究。Tel: (0354) 6288322; E-mail: caoyanzhuan@126.com。

通信作者:崔宗均,博士,教授,主要从事生物物质资源转化与利用研究。Tel: (010) 62731857; E-mail: acuijzj@cau.edu.cn。

余的纸烘干后剪至 5 mm × 5 mm 大小,装入 F57 专用袋 (Model F57, ANKOM Technology, USA) 中,根据 ANKOM220 型纤维分析仪说明书测定纤维素、半纤维素含量。

1.3 粗酶液的制备及酶活性的测定

在培养期间,收集分解残余的纸制备粗酶液。从平板上刮下分解剩余的纸,加入 30 mL 灭菌去离子水充分混匀,浸提底物表面的胞外酶,于 8 000 r/min 离心 10 min 后所得上清液即为制备好的粗酶液。羧甲基纤维素酶活性及木聚糖酶活性的测定方法参考文献[16]。

1.4 最佳产酶条件

纤维素酶的产生会受培养基 pH 值、发酵温度及养分等的影响^[17],为了确定复合菌系分解废纸过程中的最佳产酶条件,设置不同培养温度 (25 ~ 45 ℃)、培养基 pH 值 (5.0 ~ 8.0) 及培养基种类 (Mandels、Hutchinson、Dubos、PCS 及 PA)。不同培养基养分组成如下。(1) Hutchinson: 1 g/L KH_2PO_4 , 0.3 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L FeCl_3 , 0.1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L NaCl, 2.5 g/L NaNO_3 。(2) Dubos: 1 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L NaNO_3 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L KCl, 0.05 g/L $\text{Fe}_2(\text{SO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。(3) PCS: 5 g/L 蛋白胨, 1 g/L 酵母粉, 2 g/L CaCO_3 , 5 g/L NaCl。(4) PA 培养基: 在 1 L 去离子水中加入 200 g 马铃薯条,煮沸 5 min,用纱布过滤后加入去离子水将总体积补足至 1 L。上述培养基中均加入 12 g/L 琼脂,调节 pH 值至 7.0,于 121 ℃ 灭菌 30 min。在上述不同条件下,复合菌系于接种后 4 d 取样,测定废纸的减质量及粗酶液酶活性。

1.5 复合菌系微生物组成分析

复合菌系基因组 DNA 的提取采用苯酚-三氯甲烷抽提法,将提取后的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。DGGE (变性梯度凝胶电泳) 及克隆方法参考文献[15]。测序结果使用 Lasergene 软件 (DNASTar, Madison, Wisconsin, USA) 进行分析,序列相似性比对通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>),用 MEGA 5.1 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 复合菌系 PSD 对废打印纸的分解能力

经过连续传代 30 次以上,筛选到 1 组能够有效分解废纸并产纤维素酶的复合菌系 PSD。由图 1 接种复合菌系后废纸的总质量降幅及木质纤维素质量降幅可以看出,培养 3 d 后,纸的总质量减少了 24.9%,其中纤维素、半纤维素分别减少了 38.1%、29.9%。分解 6 d 后,复合菌系 PSD 对废纸的分解率达到 70.6%,其中纤维素减少了 71.7%,半纤维素减少了 48.2%。从图 1 还可以看出,培养 3 ~ 6 d 期间废纸的分解速率高于培养 0 ~ 3 d 的,并且复合菌系对废纸中纤维素成分的分解率高于半纤维素。

2.2 酶活性的变化

从图 2 可以看出,羧甲基纤维素酶、木聚糖酶活性在接种复合菌系 2 d 后快速增加,羧甲基纤维素酶活性在接种复合菌系 3 d 后达到最高值,为 3.26 U/mL,木聚糖酶活在接种复合菌系 4 d 后达到最高值,为 6.37 U/mL。结合图 1 中复合菌系对废纸降解率的影响,可见分解 2 d 后酶活性的快速提高增强了复合菌系对废纸的分解能力,此外复合菌系 PSD 能

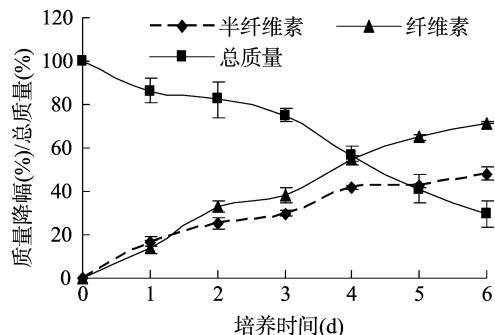


图1 复合菌系 PSD 对废纸的降解率

够有效分解废纸并以废纸为底物分泌活性较高的纤维素酶。崔宗均等以堆肥为菌源,筛选到 1 组能够高效分解天然木质纤维素的复合菌系 MC1,但是其胞外酶活性很低^[18]。另外,复合菌系 XDC-2 虽然能够分泌高活性的胞外木聚糖酶,但胞外羧甲基纤维素酶活性却很低,只有 0.108 U/mL^[19]。Richa 等从土壤中分离出一些能够有效分解纸的真菌,但有关纸的分解情况及产酶情况并没有相关报道^[20]。

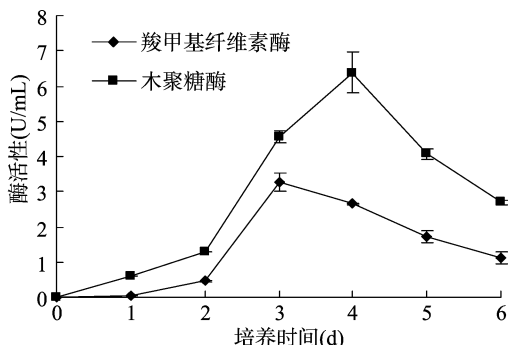


图2 复合菌系 PSD 降解废纸过程中的产酶活性

2.3 产酶条件的优化

在不同培养条件下,接种复合菌系 PSD 4 d 后纸的分解率及产酶活性见图 3。可以看出,当培养温度为 25 ~ 35 ℃ 时,废纸的分解率及粗酶液的酶活性都较高,其中 30 ℃ 时的分解率最高,为 36.1%,在 25 ℃ 条件下,复合菌系产酶的酶活性最高。但是当温度 ≥ 40 ℃ 时,废纸的分解率及酶活性明显下降。由此可见,复合菌系在温度 ≤ 35 ℃ 时能有效降解废纸并产纤维素酶 (图 3-A)。当培养基 pH 值为 6.0 时,羧甲基纤维素酶活性、半纤维素酶活性都达到最高值。将其最高相对酶活性视为 100%,当培养基 pH 值高于 6.0 时,羧甲基纤维素酶、半纤维素酶的相对酶活性分别高于 73%、86%,废纸的总分解率大于 45%,并且当培养基 pH 值为 7.0 时,分解率最高,为 51.1%。但是当 pH 值小于 6.0 时,无论是废纸的降解率,还是复合菌系产纤维素酶的酶活性都明显降低。总体看出,pH 值为 6 ~ 8 时,复合菌系有较好的纸分解效果和产酶活性 (图 3-B)。以 Hutchinson 为培养基废纸为唯一碳源时,复合菌系对废纸的降解率最高,为 50.1%,并且羧甲基纤维素的酶活性最高。当培养基为 Hutchinson、Mandels 及 Dubos 时,废纸的降解率及酶活性明显高于 PCS、PA 培养基的降解率与酶活性 (图 3-C)。由此可见,Hutchinson 为复合菌系分解及产酶的最佳培养基。

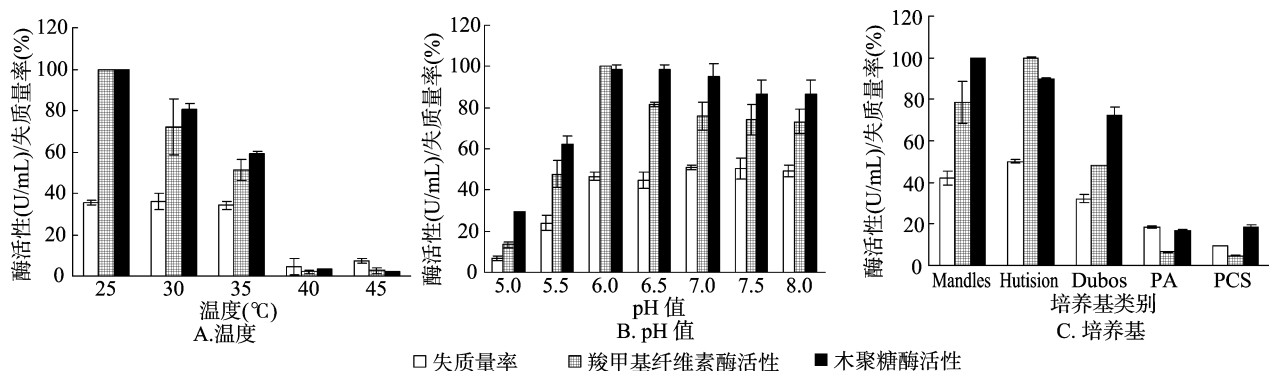


图3 不同培养条件下复合菌系 PSD 对废纸的分解及产酶活性

2.4 复合菌系 PSD 的微生物组成稳定性

为了确定复合菌系 PSD 的微生物组成已经稳定,利用 PCR-DGGE 技术对其总 DNA 进行分析。保存复合菌系继代培养过程中 4 d 后的培养物(第 30、33、36、39 代),提取总 DNA 并利用引物对 357F-GC、517R 及 NLI-GC、LS2 分别进行 PCR 扩增后用于 DGGE 分析。细菌、真菌的 DGGE 图谱见图 4,可见继代培养过程中不同代真菌、细菌的群落结构相同,说明经过长期驯化培养,复合菌系 PSD 的菌群结构稳定,复合菌系在分解木质纤维素过程中群落结构的稳定性能够保证其功能的稳定性。

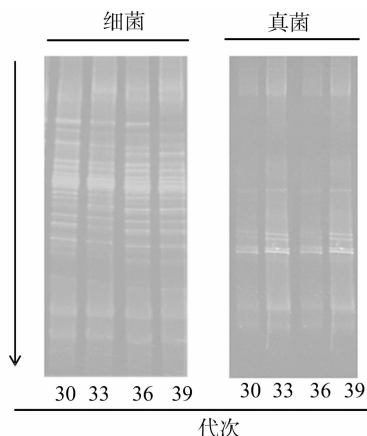


图4 继代培养过程中复合菌系 PSD 的 DGGE 图谱

2.5 复合菌系 PSD 的微生物组成

利用克隆技术,分析复合菌系 PSD 的微生物组成,其 16S rDNA、26S rDNA 系统发育树分别见图 5、图 6。本研究共获得 200 个细菌克隆子,测序分析结果表明,主要为厚壁菌门(31.1%)、变形菌门(24.1%)及拟杆菌门(44.6%),其中厚壁菌门主要包括 *Sedimentibacter*、柯恩氏菌(*Cohnella*)及泰氏菌属(*Tissierella*)。克隆子 B74 与 *Sedimentibacter* sp. enrichment culture clone MB2_218 有 96% 的相似性,有报道称,该菌对 1,2,4-三氯二苯并-对-二噁英具有还原脱氯的作用^[21]。克隆子 B102、B160 与 *Cohnella* sp. FCN3-3 (HQ704069)具有 98% 的相似性,该菌是 1 株从牛粪中分离并具有纤维素分解能力的细菌^[22]。变形菌门主要包括假单胞菌(*Pseudomonas*)、不粘柄菌属(*Asticcacaulis*)及红杆菌属(*Rhodobacter*),其中克隆子 B35 与 *Pseudomonas stutzeri*(施氏假单胞菌) train S1 (AY485995)具有 99% 的相似性,该菌是

从土壤中分离得到的,具有降解氟氯氰菊酯的能力^[23]。拟杆菌门主要包括哈氏噬纤维菌(*Cytophaga hutchinsonii*)、*Cf. Cytophaga*、*Dysgonomonas* 及 *Chitinophaga*。其中克隆子 B31 与 *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 (CP000383)具有 91% 的相似性,对该菌的基因组测序发现能够编码很多参与纤维素利用的基因^[24]。另外,在复合菌系 XDC-2 的微生物组成中也检测到 *Pseudomonas stutzeri*、*Dysgonomonas* 的存在^[19]。Wang 等筛选到的 1 组能够高效降解木质素、芳香族化合物的复合菌系 LDC 中有 *Pseudomonas* sp.、*Cohnella* 的存在^[25]。

对获得的 180 个真菌克隆子进行测序的结果表明,共有波氏假性霉样菌(*Pseudallescheria boydii*)、*Filobasidium floriformes* 及轮枝菌(*Verticillium* sp.) 3 种真菌,其中 80.7% 的序列与 *Pseudallescheria boydii* (AB363764)具有 99% 的相似性。据报道,该菌广泛存在于堆肥中,可有效降解有机物,同时还可利用碳氢化合物及挥发性烷烃类物质,如乙烷、丙烷、丁烷等^[26-27]。另外,研究发现 *Pseudallescheria boydii* 可有效降解有毒物质 2,3,7,8-四氯二苯并二噁英及多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons,简称 PAHs)^[28-29]。12.5% 的序列与 *Verticillium* sp. (AY312607)具有 99% 的相似性,有研究发现,黑白轮枝菌(*Verticillium albo-atrum*)、黄萎病病菌(*Verticillium dahliae*)都能够分泌多种纤维素酶并能有效分解纤维素。Klosterman 等对这 2 株真菌进行宏基因组测序,结果发现基因组中有很多编码果胶降解酶及碳水化合物活性酶的基因^[30-31]。据笔者所知,本研究是第 1 次在复合菌系中检测到有 *Verticillium* sp. 的组成。因此可见,PSD 是一组由细菌和真菌共同组成的复合菌系。

3 结论

本研究成功筛选到 1 组能够高效降解废纸,同时分泌胞外纤维素酶的复合菌系 PSD。该复合菌系能够在 6 d 内分解废纸总质量的 71%,其中纤维素、半纤维素的降解率分别为 72%、48%。在复合菌系分解废纸期间,胞外羧甲基纤维素酶活性在 3 d 时达到最高值,为 3.26 U/mL,半纤维素酶活性在 4 d 时达到最高值,为 6.37 U/mL。

16S rDNA、26S rDNA 克隆文库结果表明,复合菌系由真菌、细菌组成,其中细菌 *Cohnella*、*Pseudomonas* 及 *Cytophaga hutchinsonii* 可能是功能菌,*Pseudallescheria boydii* 是主要的真菌组成。

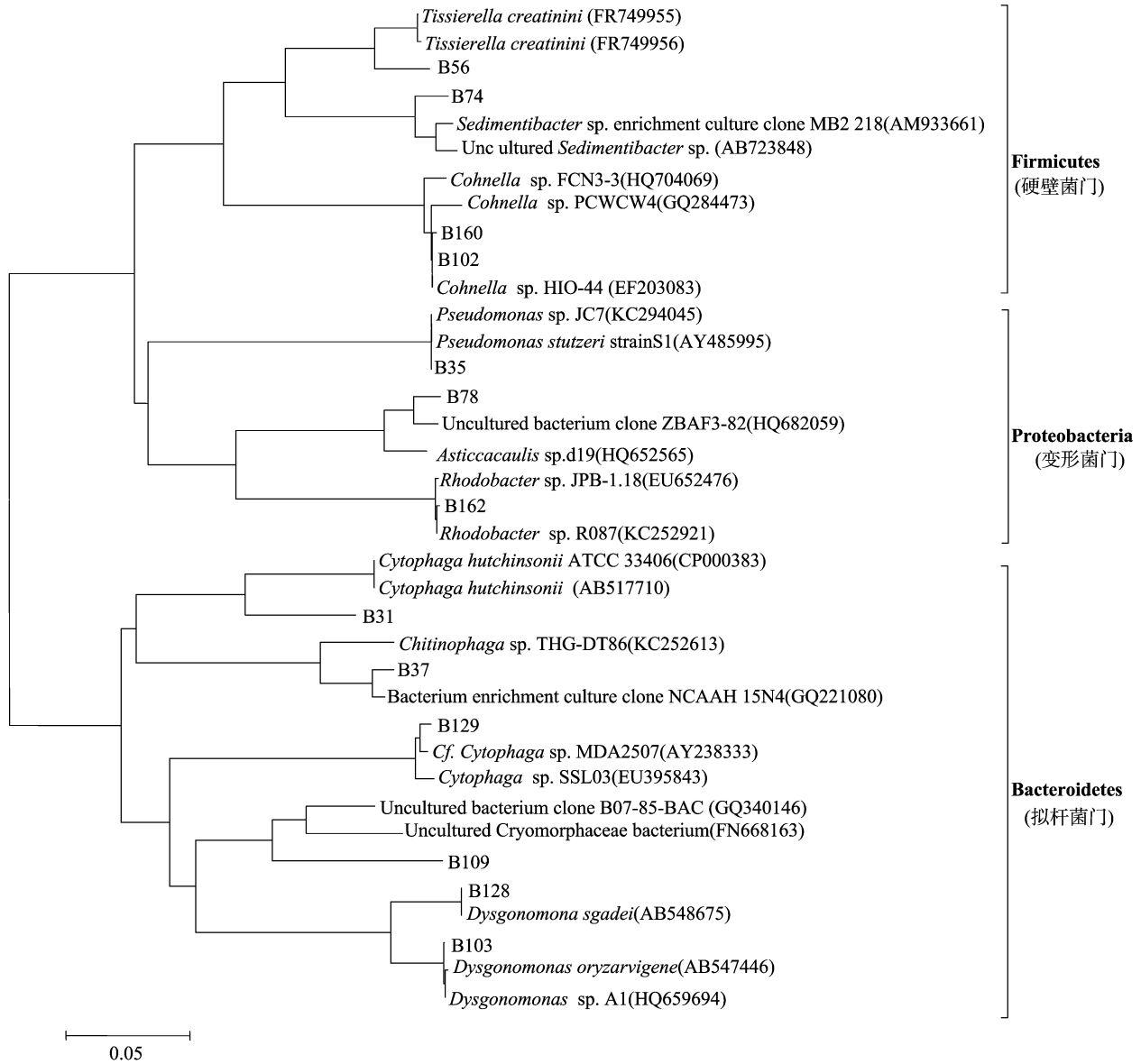


图5 复合菌系 PSD 中微生物的 16S rDNA 系统发育树

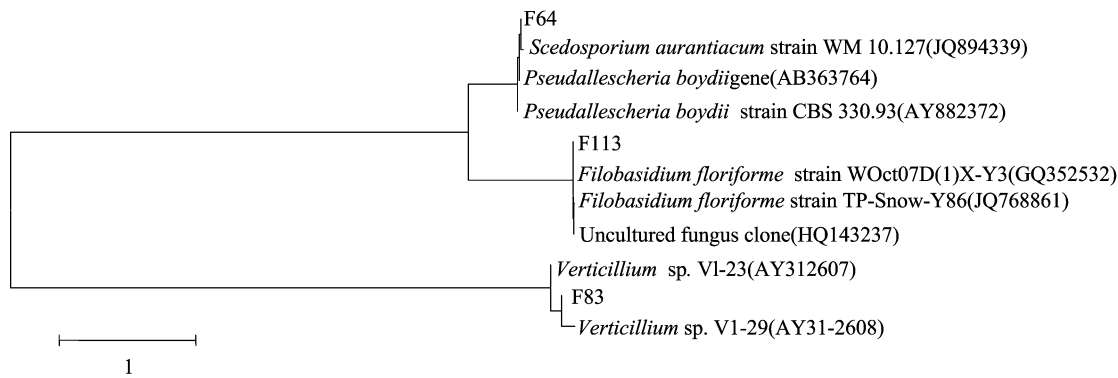


图6 复合菌系 PSD 中微生物的 26S rDNA 系统发育树

参考文献:

[1] Zhang Z, Macquarrie D J, de Bruyn M, et al. Low - temperature microwave - assisted pyrolysis of waste office paper and the application of bio - oil as an AI adhesive [J]. Green Chemistry, 2015, 17 (1) : 260 - 270.

- [2] Rahman M O, Hussain A, Basri H. A critical review on waste paper sorting techniques [J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2014, 11(2): 551–564.
- [3] Ioeilovich M. Waste paper as promising feedstock for production of biofuel[J]. Journal of Scientific Research and Reports, 2014, 3(7): 905–916.
- [4] Nishimura H, Tan L, Sun Z Y, et al. Efficient production of ethanol from waste paper and the biochemical methane potential of stillage eluted from ethanol fermentation[J]. Waste Management, 2016, 48: 644–651.
- [5] Baba Y S, Tada C, Fukuda Y, et al. Improvement of methane production from waste paper by pretreatment with rumen fluid[J]. Bioresource Technology, 2013, 128: 94–99.
- [6] Pendyala B, Chaganti S R, Lalman J A, et al. Using a food and paper–cardboard waste blend as a novel feedstock for hydrogen production: influence of key process parameters on microbial diversity [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2013, 38(15): 6357–6367.
- [7] Zheng W, Zheng Q, Xue Y, et al. Influence of rice straw polyphenols on cellulase production by *Trichoderma reesei* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123(6): 731–738.
- [8] Xia L M, Shen X L. High–yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU–02 on corn cob residue [J]. Bioresource Technology, 2004, 91(3): 259–262.
- [9] Visser E M, Falkoski D L, de Almeida M N, et al. Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse[J]. Bioresource Technology, 2013, 144(6): 587–594.
- [10] Lan T Q, Wei D, Yang S T, et al. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor [J]. Bioresource Technology, 2013, 133(4): 175–182.
- [11] Libardi N, Soccol C R, Góes–Neto A, et al. Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum* [J]. Process Biochemistry, 2017, 57: 190–199.
- [12] Azadian F, Badoei–Dalfard A, Namaki–Shoushtari A, et al. Production and characterization of an acido–thermophilic, organic solvent stable cellulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2017, 15(1): 187–196.
- [13] Dong X Q, Yang J S, Zhu N, et al. Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white–rot fungi [J]. Bioresource Technology, 2013, 131(2): 443–451.
- [14] 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.
- [15] Yang H, Wu H, Wang X, et al. Selection and characteristics of a switchgrass–colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3546–3550.
- [16] 温博婷, 袁旭峰, 华彬彬, 等. 纤维素分解菌系 WSD–5 常温产酶高温糖化小麦秸秆研究[J]. 中国农业大学学报, 2014, 19(2): 36–42.
- [17] Kuhad R C, Deswal D, Sharma S A, et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2016, 55: 249–272.
- [18] 崔宗均, 朴哲, 王伟东, 等. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的产酶条件[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(2): 296–299.
- [19] Guo P, Zhu W B, Wang H, et al. Functional characteristics and diversity of a novel lignocelluloses degrading composite microbial system with high xylanase activity[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(2): 254–264.
- [20] Richa S, Subhash C, Amrita S. Isolation of microorganism from soil contaminated with degraded paper in Jharna village[J]. Journal of Soil Science, 2013, 4(2): 23–27.
- [21] Bunge M, Wagner A, Fischer M, et al. Enrichment of a dioxin–dehalogenating *Dehalococcoides* species in two–liquid phase cultures [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(10): 2670–2683.
- [22] Khianngam S, Tanasupawat S, Akaracharanya A, et al. *Cohnella cellulositytica* sp. nov., isolated from buffalo faeces [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(8): 1921–1925.
- [23] Saikia N, Das S K, Patel B K, et al. Biodegradation of beta–cyfluthrin by *Pseudomonas stutzeri* strain S1 [J]. Biodegradation, 2005, 16(6): 581–589.
- [24] Xie G, Bruce D C, Challacombe J F, et al. Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(11): 3536–3546.
- [25] Wang Y X, Liu Q, Yan L, et al. A novel lignin degradation bacterial consortium for efficient pulping[J]. Bioresource Technology, 2013, 139(7): 113–119.
- [26] April T M, Abbott S P, Foght J M, et al. Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microasaceae) [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(3): 270–278.
- [27] Anastasi A, Varese G C, Marchisio V F. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost[J]. Mycologia, 2005, 97(1): 33–44.
- [28] Ishii K, Furuichi T, Tanikawa N, et al. Estimation of the biodegradation rate of 2,3,7,8–tetrachlorodibenzo–p–dioxin by using dioxin–degrading fungus, *Pseudallescheria boydii* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 162(1): 328–332.
- [29] Aranda E, Godoy P, Reina R A, et al. Isolation of of ascomycota fungi with capability to transform PAHs: insights into the biodegradation mechanisms of penicillium oxalicum [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017, 122: 141–150.
- [30] Klosterman S J, Subbarao K V, Kang S, et al. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens [J]. PLoS Pathogens, 2011, 7: e1002137.
- [31] Talboys P W. Degradation of cellulose by *Verticillium albo–atrum* [J]. Transactions of the British Mycological Society, 1958, 41(2): 242–248.