

## 複雑微生物系—ひとつの生態系としての理解と利用—

### Microbial Communities as Complex Systems

春田 伸  
SHIN HARUTA

首都大学東京大学院理工学研究科 〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1  
TEL: 042-677-2580 FAX: 042-677-2559  
E-mail: sharuta@tmu.ac.jp

Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, 1-1, Minami-Osawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan

キーワード: 生態系機能, 種間相互作用ネットワーク, 複雑系

Key words: Microbial ecosystems function, Interspecies relationship, Complex systems

(原稿受付 2015年7月29日/原稿受理 2015年8月5日)

#### 1. はじめに

「生態学」は、生物をその生育環境とのかかわりとの関係で理解しようとする学問分野として長い歴史を持つ。一方、環境中で多様な個体群(集団)が群落(群集)を形成している全体を考える、「生態系」という捉え方は、比較的新しく、20世紀になってからである。それにより、生物同士の思いもよらなかった関係性や性質が明らかになり、自然環境の見方が刷新されていった。微生物については、「微生物生態学」的な視点は古くからあったが、「微生物生態系」という認識が一般化したのは、分子生態学的手法をはじめとする解析技術が進展してきた21世紀になってからではないだろうか。同じくして、「複雑系の科学」といった学問領域が「システム生物学」や「経済学」など、さまざまな分野に導入され、要素還元的な解析では見えてこない「系」としての姿・性質に注目が集まっている。

堆肥化過程は、生物的要素と非生物的要素が密に相互作用し、空間的に不均一に分布するばかりでなく、時間によって変化する複雑極まりない系である。このような微生物生態系の特性を解明していく手がかりとは何だろうか。本稿では、複雑性をもった微生物群集の利用性および微生物生態系にみられる微生物の性質に関する研究例を取り上げるとともに、複雑微生物系の「系」としての特性解明に向けた取り組みについて紹介する。

#### 2. 有用微生物群集の取得と利用

微生物の純粋培養技術が確立されて以来、有用な機能をもった微生物が探索・育種され、医薬、食品、化学工業など、幅広い分野で利用されている。最近では、二種微生物を組み合わせて、複合機能の活用可能性を図ろうとする試みもある<sup>12,30</sup>。Synthetic microbial consortia 等

と称され、セルロースを糖化する真菌と糖から有用物質を生産する遺伝子改変細菌の混合系がその代表例である<sup>21</sup>。

一方、微生物の存在や働きが認識されるはるか以前から、酒や醤油をはじめとして、伝統的な発酵食品の醸造が世界中で発展している。これらは、有害微生物の増殖を抑制しつつ、多種類の微生物を同時に活用しており、まさに複雑微生物系を制御・利用している技術といえる。また、堆肥化や、嫌気消化、活性汚泥法なども、複雑微生物系を巧みに操作してきた微生物利用技術である。これらのプロセスには、純粋培養が容易でない微生物が存在すること、複数微生物の組み合わせによって達成される共代謝機能があること、などが知られるようになり、微生物群集としての活性や利用性が注目される。

そこで、純粋分離することなく集積培養によって、機能性をもった微生物群集を自然界から取得する試みがある(Table 1)。これらは、自然環境中で微生物生態系が進めている反応を抽出・濃縮したものであり、自然の摂理にかなっていると思われる。また、分離株よりも高い活性をもつ微生物群集が、比較的容易に得られている例が多い。Narisawaらの研究のように、取得した微生物群集に既知分離菌を添加して、微生物群集の機能拡張に成功している例もあり、それらはEngineered microbial consortiaと言えるのではないだろうか<sup>29</sup>。このような微生物群集は、バイオオーグメンテーションや微生物利用プロセスにおけるスターターカルチャー(種菌群)として活用される。すべての構成種を特定することは難しく、また、多種微生物の複合作用機序が不明な点もあるが、安定な維持・品質管理、保存ができれば、有用性はより高まるであろう。

Table 1. Examples of functional microbial consortia

Function	Source	Reference
Cellulose degradation	Compost	Haruta et al. (2002) <sup>7)</sup>
Lignocellulose degradation	Compost	Wang et al. (2011) <sup>39)</sup>
Silage making (Lactic acid production)	Silage	Wang et al. (2006) <sup>38)</sup>
Fluorobenzen degradation	Contaminated soil	Carvalho et al. (2002) <sup>4)</sup>
Atrazine degradation	Contaminated soil	Smith et al. (2005) <sup>31)</sup>
Aromatic hydrocarbons degradation	Contaminated soil	Ozaki et al. (2006) <sup>29)</sup>
L-Lactic acid production	Compost	Tashiro et al. (2013) <sup>35)</sup>

### 3. 複雑微生物系を特徴づける微生物の生態

よく管理され、長年、効果的に運用・馴養されている堆肥化過程でさえ、その微生物生態系は複雑で、細菌だけでも10万種は存在しているだろう。ヒト腸内細菌が1,000種程度と見積られる数字からしても、その多様性は非常に高い。さらには、アーキア、真菌、ウィルス、時には原生動物も共存する複雑な生態系である。堆肥化過程は、微生物にとっての生存環境も多様で、またそれらは逐次変化している。このような環境において、微生物はどのように多種共存・生残しているのだろうか。エネルギー源、栄養塩が豊富に供給され、均一性の高い液体培地で純粋培養されるときには見られなかった、微生物の様々な新しい生態が、最近、次々に報告されている。

微生物生態系における種間相互作用として、生育場や栄養を巡る競争、棲み分け、食い分け、代謝物の授受、阻害物質や生育促進因子の生産などが幅広く調べられている。代謝物の授受では、エネルギー共役する強固な共生関係も知られる。また、好気呼吸による酸素除去が嫌気的環境を生み出し、好気性菌と嫌気性菌が共存できるようになることで、好気代謝と嫌気代謝の同時進行も可能になる。その一例として、堆肥化過程から抽出した発酵細菌と好気性菌による効率的なセルロース分解が挙げられる<sup>8,16)</sup>。この系では、好気性菌による嫌気環境の提供だけでなく、より密な関係が報告されている。発酵細菌が嫌气的にセルロースを酢酸まで分解するが、その産物である酢酸は発酵細菌の生育を抑制する。ところが、好気性菌によって酢酸が二酸化炭素まで分解されることで、酢酸による阻害効果が消失され、セルロース分解が進むとともに、好気性菌は酢酸の供給を受けやすくなるというWin-Winの関係である。

微生物の生育の足場となる固形分が多い堆肥化過程では、バイオフィームを形成して生育している微生物も多い。バイオフィームでは、細胞同士の相互作用が密で、また、多種細菌が三次元的に局在分布できることから、液体浮遊条件とは異なる種間関係がみられる。典型的な例として、抗菌物質生産菌とその抗菌物質に感受性を示す菌および耐性菌の三者系がある<sup>26)</sup>。抗菌物質生産菌と感受性菌は、耐性菌が存在しても細胞が液体中に分散した条件では共存できないが、バイオフィーム形成状態では、感受性菌は耐性菌によって取り囲まれるように分布することで生産菌から隔離され、三種の共存が達成される。

細菌同士の捕食-被食関係や走性は古くから知られる

が<sup>14)</sup>、微生物生態系での役割は、今まであまり注目されてこなかった。しかし、マイクロな生育場では、捕食-被食およびそれに関連したエネルギー消費を伴う走性は、微生物生態系の多様性や構造に影響を与えると考えられる。最近、Müllerらは、細菌の捕食-被食関係について興味深い現象を報告している<sup>23)</sup>。捕食者である*Myxococcus*属細菌は、被食者である*Bacillus*属細菌に対して正の走性を示し捕食行動をとるのに対し、*Bacillus*属細菌は、捕食者を感じて胞子形成などの防御的な応答をすることを明らかにした。また、Morohoshiらは、捕食細菌の生産する溶菌酵素を感じて、細胞凝集速度を上昇させる被食細菌の細胞運動を報告している<sup>22)</sup>。

恒常性を示す安定な多くのシステムが抑制的な制御機構を有しているように、捕食や抗菌物質生産、競争のような負の相互作用は、微生物生態系でも系の安定化に重要であると考えられる。一例として、堆肥化過程から抽出してきた安定な四種細菌混合系の実験がある<sup>17)</sup>。四種細菌間の相互作用はまとめるとFig. 1のように提案されている。この系において、A株はB株に対して強い抑制作用を示すが、B株はD株の生育促進を介して、D株のA株に対する抑制作用を補助し、A株が過剰増殖しないように調整している。一対一の二者関係から発展させた「系」としての捉え方を示した数少ない実例のひとつである。定量的な解析精度の向上、数理モデルによるシミュレーションなどのアプローチによって、「生態系」の性質として一般化できると期待される<sup>19)</sup>。

ここまでは、細菌同士の活発なせめぎあいに注目してきた。しかし、微生物は、環境ストレスに耐えたり、休眠等として知られるように活動を低く抑えたりと、増殖を伴わない生存状態もとらうる<sup>11,15,32)</sup>。このような非増

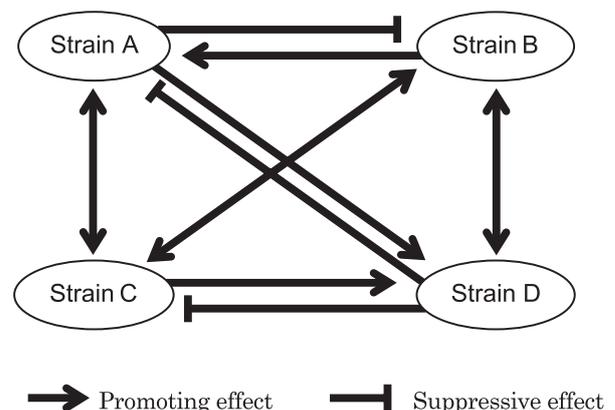


Fig. 1. Interspecies interactions within a defined mixed culture<sup>17)</sup>

殖状態での代謝生理については、その状態を定義づけることすら困難で、まだほとんどわかっていない。ただし、一般的に、活発に分裂を繰り返している細胞よりも、活動量が低い細胞のほうが、環境ストレスに対して抵抗性が高いとも言われ、非増殖・低活動状態は環境細菌の生残戦略のひとつである<sup>6,36)</sup>。非増殖状態の細菌たちは、系の多様性を支え、環境変化に応じて再増殖することで、系の機能的な安定性に貢献すると考えられる。特に、堆肥化のような流入する基質の質・量ともに変動の大きい環境において、その寄与は大きいのではないだろうか。

堆肥化過程は、均質・静的な世界ではなく、高度に不均一で、激しく動的で、複雑な世界であるばかりでなく、上述のように多様な微生物の生態があることを再認識しなければならない。複雑微生物系の理解のためには、このように系を構成する微生物の諸性質を総合して考えることが肝要である。Krauseらは植物生態学の観点から、生物多様性および生態系機能の安定性を考えるにおいて、生物の生存戦略として、種間競争、環境因子による生育制限および死滅の三つの視点を相互に関連付けることを提案しており、微生物生態系の総合的理解のための指針としても有効だと思われる<sup>19)</sup>。

#### 4. ビッグデータの取得と活用

次世代シーケンサーをはじめとして、各種分析機器およびバイオインフォマティクスの発展により、微生物生態系をより包括的に捉えようとする研究が活発に行われている。これらのアプローチは、果たして、堆肥化過程の未解明部分に迫れるのだろうか、それとも、還元的に掘り下げたデータの収集に留まるのだろうか。

リボソームRNA遺伝子を対象にしたディープシーケンシングによって、系統的多様性に関する知見は蓄積されてくる。最近では、各微生物の経時的な消長、増減に関するデータから、微生物同士の種間関係を抽出する方法も提案・開発されている<sup>9)</sup>。これによって、実験的に検証することは困難であるが、二種間だけでなく、三種以上の関係を予測できる。

メタゲノム解析の適用例も広がっており、遺伝子塩基配列から微生物生態系の機能的特徴づけが進んでいる<sup>34)</sup>。堆肥化過程にメタゲノム解析を適用した例では、多種類の加水分解酵素遺伝子、脱水素酵素遺伝子、および炭水化物の輸送・代謝に関わる遺伝子が豊富であることを示している<sup>20)</sup>。これらは有機物分解が盛んな微生物生態系の特徴であると考えられる。Tafisらが提案するように、微生物生態系内の種多様性や種間の相互作用といった視点ではなく、系全体をひとつの遺伝子プールとして捉える視点が有効である<sup>35)</sup>。同時に、系の遺伝子転写プロファイル、タンパク質発現プロファイル、代謝物プロファイル、生理活性プロファイル、を総合的に解析することで理解が深まるであろう。このようなマルチオミックスデータの統合解析プラットフォームの開発も進められている<sup>27)</sup>。

Martinsらは堆肥化過程のメタゲノム解析で、有機物分解の遺伝子以外に、ストレス応答や細胞内恒常性維持に関わる遺伝子を高頻度に検出している<sup>20)</sup>。これらは、

非増殖状態の生理として上述したように、堆肥化過程の機能的多様性・安定性を支える重要な微生物の性質だと考えられる。また、実験室条件で高活性を示す微生物を現場に投入しても生残性が低い事例が広く知られているが、実環境で受ける様々なストレス（高温/低温、酸化還元状態、pH、浸透圧、乾燥、飢餓等）に対する抵抗性を加味した微生物（群集）の選抜が必要ではないだろうか。

#### 5. 「系」としての理解に向けて

複雑微生物系の「系」として本質的な理解には、その複雑さ、不均一さゆえに、オミックス解析もまだまだ追いついていないのが現状であろう。Rölingらが提案するように、データは得られるものの、データの質をどう解釈し、どう活用するのか、を見極めることが重要である<sup>30)</sup>。例えば、次世代シーケンサーを活用したメタゲノム等の解析は他のオミックス解析に比べ、より網羅的なデータ取得ができるが、機能未知遺伝子が大量に含まれ、non-coding RNAの領域が隠れているなど、すべての配列情報を解釈できているわけではない。近年注目される、読み枠およびアノテーション非依存的な配列情報解析は、複雑な微生物生態系の特徴付けや診断にも有効ではないだろうか<sup>24)</sup>。

光合成にはじまる地球規模の生態系の形成・維持を包括的に捉えるにおいては、供給されるエネルギーの生態系内での分配を理解するアプローチがある。微生物生態系についても、Fig. 2に概説されるような、エネルギーの分配・流れを描くことで、包括的な特徴づけができるのではないだろうか<sup>28)</sup>。そのためには、代謝フラックス解析、特に熱力学に基づいた電子・エネルギーの流れをつかむことが必要であると思われる<sup>2,3,10,13,18)</sup>。代謝フラックスの動的な変化から、潜在的機能を含めた機能的多様性や安定性の本質に迫ることができると期待される。さらに、メタゲノムなどの他のオミックス解析等とも相互補完的に進めることが有効である。

複雑微生物系を効果的に活用していくにおいて、機能的に安定な微生物生態系に共通する性質を見出せないだろうか。主にマクロな生態系を対象に発展してきた群集生態学分野では、知見の一般化を目指した生態理論や仮説を提案している。例えば、「競争排除則」「Seed bank仮説」「生態系管理理論」など、微生物生態系にあてはめて考えることで、今まで見落としていた複雑微生物系の性質が浮き彫りになってくると期待されるものも多い。

複雑微生物系を理論的に開発・制御するのに足る十分な理解には、まだまだ歳月がかかる。しかし、「系内での個々の微生物の生理」と「系全体が示す性質」の両視点で、観察・解析していくことが地道ながらも着実な戦略であるように思われる。そして、群集生態学だけでなく、数学、社会学といった異分野との幅広い融合が飛躍的・突発的な前進を駆動するのではないだろうか。これらの研究は、堆肥化をはじめとした微生物群集の利用技術や環境保全に対して、診断基準の提案、新たな利用法の開発、制御法の確立につながるものと期待したい。

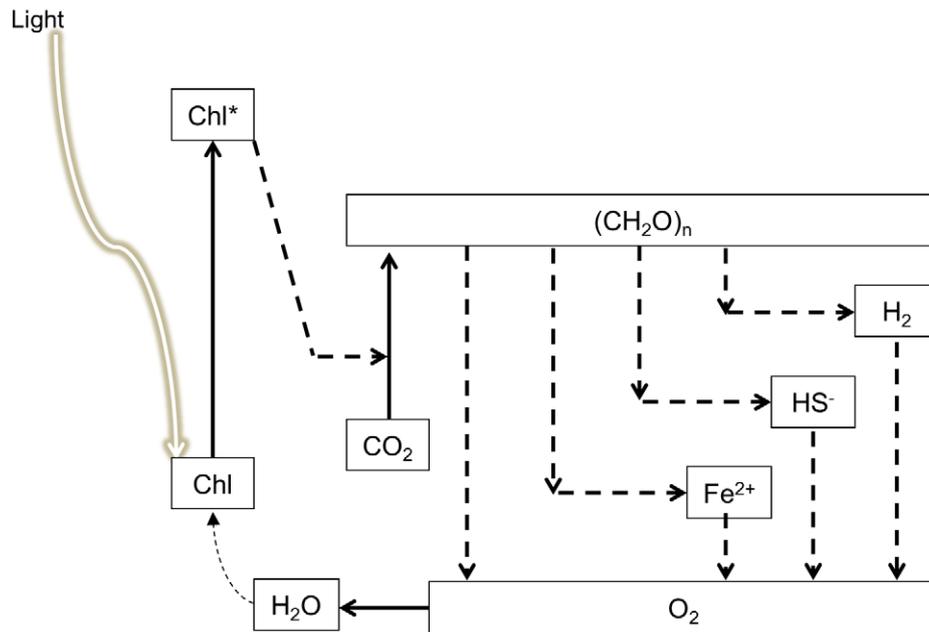


Fig. 2. Overview of energy flow in ecosystems  
Chl, chlorophyll; Chl\*, excited chlorophyll

## 謝 辞

本稿は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻応用微生物学研究室（五十嵐泰夫教授 現・中国西南大学）において、多くの皆様と取り組んだ研究内容から得た知見を基盤として執筆しました。多様で幅広く発展性のある研究活動の機会を与えていただき、ここに心から感謝いたします。また、複雑微生物系における微生物の新たな姿の発見に導いてくれている首都大学東京大学院理工学研究科生命科学専攻環境微生物学研究室の皆さんに感謝します。

## 引用文献

- Bernstein, H.C. and R.P. Carlson. 2012. Microbial consortia engineering for cellular factories: *in vitro* to *in silico* systems. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 3: e201210017.
- Cannon, W.R. 2014a. Simulating metabolism with statistical thermodynamics. *PLoS One.* 9: e103582.
- Cannon, W.R. 2014b. Concepts, challenges, and successes in modeling thermodynamics of metabolism. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2: 53.
- Carvalho, M.F., C.C.T. Alves, M.I.M. Ferreira, P. De Marco, and P.M.L. Castro. 2002. Isolation and initial characterization of a bacterial consortium able to mineralize fluorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 102–105.
- Faust, K. and J. Raes. 2012. Microbial interactions: from networks to models. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 538–550.
- Fridman, O., A. Goldberg, I. Ronin, N. Shoshitaishvili, and N.Q. Balaban. 2014. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature.* 513: 418–421.
- Haruta, S., Z. Cui, Z. Huang, M. Li, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2002. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 529–534.
- 春田 伸, 加藤創一郎, 崔 宗均, 石井正治, 五十嵐泰夫. 2006. 嫌気, 好気微生物の混合培養による効率的有機物分解. *J. Environ. Biotechnol.* 5: 91–95.
- Haruta, S., S. Kato, K. Yamamoto, and Y. Igarashi. 2009. Intertwined inter-species relationships: approaches to untangle the microbial network. *Environ. Microbiol.* 11: 2963–2969.
- Henry, C.S., L.J. Broadbelt, and V. Hatzimanikatis. 2007. Thermodynamics-based metabolic flux analysis. *Biophys. J.* 92: 1792–1805.
- Hoehler, T.M. and B.B. Jørgensen. 2013. Microbial life under extreme energy limitation. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 83–94.
- Jagmann, N. and B. Philipp. 2014. Design of synthetic microbial communities for biotechnological production processes. *J. Biotechnol.* 184: 209–218.
- Jankowski, M.D., C.S. Henry, L.J. Broadbelt, and V. Hatzimanikatis. 2008. Group contribution method for thermodynamic analysis of complex metabolic networks. *Biophys. J.* 95: 1487–1499.
- Jurkevitch, E. (ed.). 2007. *Predatory prokaryotes: biology, ecology and evolution.* Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Kanno, N., K. Matsuura, and S. Haruta. 2014. Differences in survivability under starvation conditions among four species of purple nonsulfur phototrophic bacteria. *Microbes Environ.* 29: 326–328.
- Kato, S., S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2005. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7099–7106.
- Kato, S., S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2008. Network relationships of bacteria in a stable mixed culture. *Microb. Ecol.* 56: 403–411.
- Khandelwal, R.A., B.G. Olivier, W.F.M. Röling, B. Teusink, and F.J. Bruggeman. 2013. Community flux balance analysis for microbial consortia at balanced growth. *PLoS One.* 8: e64567.
- Krause, S., X. Le Roux, P.A. Niklaus, P.M. Van Bodegom, J.T. Lennon, S. Bertilsson, H.P. Grossart, L. Philippot, and P.L. Bodelier. 2014. Trait-based approaches for understanding microbial biodiversity and ecosystem functioning. *Front. Microbiol.* 5: 251.
- Martins, L.F., L.P. Antunes, R.C. Pascon, J.C. de Oliveira, L.A. Digiampietri, D. Barbosa, B.M. Peixoto, M.A. Vallim, C. Viana-Niero, E.H. Ostroski, G.P. Telles, Z. Dias, J.B. da Cruz,

- L. Juliano, S. Verjovski-Almeida, A.M. da Silva, and J.C. Setubal. 2013. Metagenomic analysis of a tropical composting operation at the São Paulo zoo park reveals diversity of biomass degradation functions and organisms. *PLoS One*. 8: e61928.
- 21) Minty, J.J., M.E. Singer, S.A. Scholz, C.-H. Bae, J.-H. Ahn, C.E. Foster, J.C. Liao, and X.N. Lin. 2013. Design and characterization of synthetic fungal-bacterial consortia for direct production of isobutanol from cellulosic biomass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110: 14592–14597.
- 22) Morohoshi, S., K. Matsuura, and S. Haruta. 2015. Secreted protease mediates interspecies interaction and promotes cell aggregation of the photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 362: 1–5.
- 23) Müller, S., S.N. Strack, S.E. Ryan, D.B. Kearns, and J.R. Kirby. 2015. Predation by *Myxococcus xanthus* induces *Bacillus subtilis* to form spore-filled megastructures. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 203–210.
- 24) Nakao, R., T. Abe, A.M. Nijhof, S. Yamamoto, F. Jongejan, T. Ikemura, and C. Sugimoto. 2013. A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps), to the microbiome analysis of ticks. *ISME J.* 7: 1003–1015.
- 25) Narisawa, N., S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2007. Effect adding cellulolytic bacterium on stable cellulose-degrading microbial community. *J. Biosci. Bioeng.* 104: 432–434.
- 26) Narisawa, N., S. Haruta, H. Arai, M. Ishii, and Y. Igarashi. 2008. Coexistence of antibiotic-producing and antibiotic-sensitive bacteria in biofilms is mediated by resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3887–3894.
- 27) Ogata, Y., E. Chikayama, Y. Morioka, R.C. Everroad, A. Shino, A. Matsushima, H. Haruna, S. Moriya, T. Toyoda, and J. Kikuchi. 2012. ECOMICS: a web-based toolkit for investigating the biomolecular web in ecosystems using a trans-omics approach. *PLoS One*. 7: e30263.
- 28) Otaki, H., C.R. Everroad, K. Matsuura, and S. Haruta. 2012. Production and consumption of hydrogen in hot spring microbial mats dominated by a filamentous anoxygenic photosynthetic bacterium. *Microbes Environ.* 27: 293–299.
- 29) Ozaki, S., N. Kishimoto, and T. Fujita. 2006. Isolation and phylogenetic characterization of microbial consortia able to degrade aromatic hydrocarbons at high rates. *Microbes Environ.* 21: 44–52.
- 30) Rölling, W.F., M. Ferrer, and P.N. Golyshin. 2010. Systems approaches to microbial communities and their functioning. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21: 532–538.
- 31) Smith, D., S. Alvey, and D.E. Crowley. 2005. Cooperative catabolic pathways within an antrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 265–273.
- 32) Storz, G. and R. Hengge. 2010. Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, DC, USA.
- 33) Taffs, R., J.E. Aston, K. Brileya, Z. Jay, C.G. Klatt, S. McGlynn, N. Mallette, S. Montross, R. Gerlach, W.P. Inskeep, D.M. Ward, and R.P. Carlson. 2009. *In silico* approaches to study mass and energy flows in microbial consortia: a syntrophic case study. *BMC Systems Biol.* 3: 114.
- 34) Takami, H., T. Taniguchi, Y. Moriya, T. Kuwahara, M. Kanehisa, and S. Goto. 2012. Evaluation method for the potential functionome harbored in the genome and metagenome. *BMC Genomics.* 13: 699.
- 35) Tashiro, Y., H. Matsumoto, H. Miyamoto, Y. Okugawa, P. Pramod, H. Miyamoto, and K. Sakai. 2013. A novel production process for optically pure L-lactic acid from kitchen refuse using a bacterial consortium at high temperatures. *Biores. Technol.* 146: 672–681.
- 36) Thorne, S.H. and H.D. Williams. 1997. Adaptation to nutrient starvation in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli: analysis of survival stress resistance, and changes in macromolecular synthesis during entry to and exit from stationary phase. *J. Bacteriol.* 179: 6894–6901.
- 37) Großkopf, T. and O.S. Soyer. 2014. Synthetic microbial communities. *Curr. Opin. Microbiol.* 18: 72–77.
- 38) Wang, X., S. Haruta, P. Wang, M. Ishii, Y. Igarashi, and Z.J. Cui. 2006. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57: 106–115.
- 39) Wang, W., L. Yan, Z. Cui, Y. Gao, Y. Wang, and R. Jing. 2011. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Biores. Technol.* 102: 9321–9324.