

高温纤维素降解菌的筛选及内切酶基因的克隆表达

田伟, 王磊, 李刚, 汪贞, 李妍, 张纪兵*

(环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042)

摘要: 以滤纸条作为唯一碳源从以牛粪和麸糠为原料的堆肥样品中分离到了8株具有纤维素降解特性的微生物, 其中菌株T1和T2在刚果红培养基上培养48 h后的水解圈明显大于其他菌株。对菌株T1和T2进行了生理生化和16S rRNA序列分析, 克隆了菌株T2的内切酶基因并对该基因进行了结构域分析, 同时构建了表达载体p28-egB并将其转化至*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中进行表达。研究表明:(1)菌株T1和T2可分别鉴定为*Bacillus cereus*和*Bacillus subtilis*;(2)菌株T2的内切酶基因片段大小为1500 bp, 编码499个氨基酸, 结构域分析显示该酶由两个不连续的结构域组成, 其一为N端催化结构域, 由糖基水解酶家族5组成, 其二为C端底物结合结构域, 由碳水化合物结合结构域家族3组成;(3)在*E. coli* BL21中成功表达了菌株T2的内切酶基因, SDS-PAGE电泳图谱显示该蛋白大小约为50 KD, 浓度约为93.14 mg·L⁻¹。

关键词: 纤维素降解菌; 内切酶基因; 克隆; 表达; 结构域

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)04-0788-06 doi:10.11654/jaes.2014.04.025

Isolation of Thermophilic Cellulose-Decomposing Bacteria and Cloning and Expression of an Endoglucanase Gene

TIAN Wei, WANG Lei, LI Gang, WANG Zhen, LI Yan, ZHANG Ji-bing*

(Nanjing Institute of Environmental Science of the Ministry of Environmental Protection of China, Nanjing 210042, China)

Abstract: Thermophilic cellulose-decomposing bacteria could shorten digesting time of composts. Here we isolated eight strains of thermophilic cellulose-decomposing bacteria from composts produced from dairy manure and rice chaff using filter paper as a sole carbon source. After 48 hour cultivation on CMC-congo red medium, strains T1 and T2 had bigger clear zones than the other strains. Based on the morphological, physiological and biochemical properties as well as 16S rRNA homology analysis, the strains T1 and T2 were identified as *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* respectively. Endoglucanase gene of T2 was cloned and domains analysis showed that the endoglucanase gene contained an open reading frame of 1500 bp, corresponding to 499 amino acids. The endoglucanase was comprised of two discontinuous domains; one was N terminal catalytic domain belonging to glycosyl hydrolase family 5, and the other was C terminal substrate binding domain belonging to carbohydrate binding domain family 3. Using PET28a as the expression plasmid, the endoglucanase gene of strain T2 was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3). SDS-PAGE analysis showed that molecular weight of the expressed protein was about 50 KD and the concentration was about 93.14 mg·L⁻¹.

Keywords: thermophilic bacteria; endoglucanase gene; cloning; expression; domain

在堆肥过程中纤维素由于结构复杂, 不易降解, 直接制约着堆肥的周期以及腐熟程度^[1]。研究表明通

过接种纤维素降解菌菌剂, 特别是高温菌, 可以加快堆肥底物中木质纤维类物质的分解, 从而缩短堆肥腐熟的周期^[2]。具有纤维素降解特性的微生物可以通过产生并分泌纤维素酶的方式有效降解堆肥中的纤维素类物质, 纤维素酶包括内切葡萄糖苷酶、外切葡萄糖苷酶和β-葡萄糖苷酶^[3]。

国内外关于纤维素降解菌的研究已经有一定的报道, 降解能力较强的以真菌居多, 例如 *Aspergillus*, *Trichoderma viride* 等^[4-6]。Tiquia 等研究表明, 真菌在堆

收稿日期: 2013-08-26

基金项目: 环保公益性行业科研专项(201209036); 环保公益性行业科研专项(201309036); 中央级公益性科研院所基本科研业务专项“猪粪有机肥在有机蔬菜生产过程中的安全评价研究”

作者简介: 田伟(1983—), 男, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为固体废物资源利用以及微生物生态学。

E-mail: tw79210@163.com

* 通信作者: 张纪兵 E-mail: zhangjb@ofdc.org.cn

肥温度高于 50 ℃时消失,低于 45 ℃才重新出现,而堆肥中纤维素的降解主要发生在高温以及降温腐熟阶段^[7],因此可以认为,真菌对高温堆肥过程中纤维素的降解作用是有限的。堆肥过程中常见的具有纤维素降解活性的微生物主要包括 *Bacillus*、*Clostridium*、*Streptomyces*、*Cellulomonas* 等^[8-12]。本文从以牛粪和砻糠为原料的高温阶段的堆肥样品中进行了高温纤维素降解菌的分离,并对其中一株内切酶活性较高的 *Bacillus subtilis* 菌株的内切酶基因进行了克隆和表达,希望能够有助于堆肥高效菌剂的开发,缩短堆肥周期。

1 材料与方法

1.1 分离样品

用牛粪堆肥高温阶段的样品进行高温纤维素降解菌的分离,样品采自江阴联业生物有限公司堆肥厂。

1.2 培养基

富集培养基:NaNO₃ 0.5 g, KCl 0.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Fe₂(SO₄)₃·7H₂O 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 滤纸条, 蒸馏水 1000 mL。滤纸条先用 1%稀醋酸浸泡 24 h, 用 2%苏打水冲洗至中性, 灭菌后备用。

筛选培养基^[13]:CMC-Na 5 g, KH₂PO₄ 1 g, 尿素 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 7.5 mg, MnSO₄·H₂O 2.5 mg, ZnSO₄·7H₂O 3.6 mg, CoCl₂·6H₂O 3.7 mg, CaCl₂ 0.5 g, 刚果红 0.1%, 琼脂 25 g, 去离子水定容至 1 L。

1.3 高温纤维素降解菌的筛选和鉴定

1.3.1 高温纤维素降解菌的筛选富集

将 10 g 新鲜的肥料样品添加到 90 mL 灭菌的富集培养基内, 170 r·min⁻¹、50 ℃培养, 待滤纸崩解后以 5%的接种量转接到新鲜的富集培养基内, 连续重复 3 次。初筛:吸取连续富集 3 次的富集液 1 mL, 梯度稀释后吸取 0.1 mL 涂布于筛选培养基, 50 ℃培养 48 h, 选择有透明圈的菌株进行多次分离纯化, 直到镜检没有杂菌后, 斜面保存于 4 ℃冰箱内。复筛:将 4 ℃保存的菌体点接到筛选培养基, 50 ℃培养 48 h 后, 测定菌落与透明圈的大小。

1.3.2 高温纤维素降解菌的鉴定

菌株生理生化特征的检测参考文献方法进行^[14]。提取分离菌株基因组 DNA 作为 PCR 反应模板, 采用细菌 16S rRNA 的通用引物进行 PCR 扩增, 其中正向引物序列为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物序列为:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 反应体系 (50 μL): 10 ×Taq 缓冲溶液 5 μL, 模

板 DNA 1 μL, 浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的引物各 1 μL, 10 μmol·L⁻¹ dNTP 1 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U·μL⁻¹) 0.5 μL, 超纯水 35.5 μL。反应条件:94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性 1 min, 52 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 2 min, 进行 30 个循环, 最后 72 ℃延伸 10 min。胶回收目的条带, 然后与 pMD18-T 载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5α, 筛选阳性克隆进行序列测定。16S rRNA 序列测定均由南京金斯瑞生物技术有限公司完成。测序结果在 GenBank 中进行同源性比对, 根据比对结果, 使用 Mega3.0 软件采用邻接法构建系统进化树。

1.4 内切酶基因的克隆和表达

1.4.1 表达载体构建

使用引物 ES1:5'-ATGAAACGG-TCAATCTC-GATTTTATTACGT-3' 和 ES2:5'-ATTGG-TTCT-GTTCCCCAAATCAGTTTTCCT-3' 扩增到 *Bacillus subtilis* 的内切酶基因, 使用信号肽在线分析工具 (Signalp3.0 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对纤维素内切酶进行信号肽预测, 去除信号肽序列后重新设计引物, 并且在上下游引物的 5' 端分别引入 BamHI 和 XhoI 的酶切位点和对应的保护碱基, *Bacillus subtilis* 内切酶聚糖酶基因引物序列分为: BSE1:5'-CGCGGATCCGCAGGGACAAAAACGCCAGTAGC-CAAGAATG-3'; XSE2:5'-CCGCTCGAGAATTTGGT-TCTGTTCCCCAAATCAGTTTTCCT-3'。PCR 反应体系和反应条件与 1.3.2 相同。将扩增到的目的片段回收后, 转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 挑取白斑进行质粒提取, 提取后的质粒使用 BamHI 和 XhoI 进行双酶切, 1%凝胶电泳回收目的片段。将内切酶基因和线性化的 pET-28a(+) 以摩尔比 3:1 的比例混合后 16 ℃酶连过夜, 转化 *E. coli* DH5α, 挑选转化子提取质粒后电泳验证质粒大小, 将重组好的表达质粒命名为 p28-egB。本文使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行蛋白序列的结构域分析。

1.4.2 内切酶基因的表达

将重组好的表达质粒 p28-egB 转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 30 ℃、170 r·min⁻¹ 摇床培养至 OD₆₀₀ 在 0.4~0.6 之间, 加终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导 4 h 后, 收集菌体, 超声波破碎细胞, 10 000×g、4 ℃离心 5 min, 收集上清液即为粗酶液, 保存于 -20 ℃冰箱。使用 DNS 法检测上清液的酶活, 使用 SDS-PAGE 蛋白电泳进行目的蛋白的检测, 具体操作步骤参照汪家政和范明的方法进行^[15]。

2 结果与分析

2.1 纤维素降解菌的分离与筛选

以滤纸条为唯一碳源,经多次分离、纯化,从牛粪堆肥高温阶段的样品中分离到了8株具有纤维素降解特性的高温细菌(50℃),其中菌株T1和T2具有较强的纤维素降解特性,能够迅速在刚果红培养基上产生透明的水解圈,48 h后菌株T1和T2的透明圈与菌落的比值(H/D)分别达到3.12和2.33(图1),明显高于其他菌株。

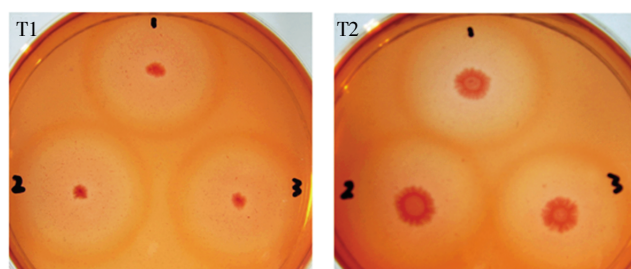


图1 菌株T1和T2在刚果红培养基上的透明圈

Figure 1 Clear zones of strains T1 and T2 on

CMC-congo red medium after 48 hour cultivation

2.2 菌株形态以及生理生化鉴定

高温纤维素降解菌株T1和T2在LB培养基上培养24 h后的菌落形态、革兰氏染色以及显微镜检测特征为:T1为G⁺,菌落较大,为不规则圆形,浅黄色,中间凸起,表面湿润,透明,菌体呈杆状且有鞭毛;T2也为G⁺,菌落较大,不规则圆形并平铺,表面有褶皱且较干燥,乳白色不透明,不产色素,菌体呈杆状且有鞭毛。

表1所示为菌株T1和T2的生理生化特性的鉴定结果,T1和T2的VP试验、淀粉水解试验、明胶液化试验、过氧化氢酶和硝酸还原酶反应均呈阳性,而吲哚试验则均呈阴性;T1可以利用麦芽糖、乳糖和葡萄糖产酸产气,T2则可以利用木糖和葡萄糖产酸但不产气,利用乳糖和甘露糖产气但不产酸;菌株T1酪氨酸反应呈阳性,柠檬酸利用实验呈阴性,而菌株T2则恰恰相反。

表1 菌株T1和T2的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strains T1 and T2

菌株	VP 试验	淀粉水解	明胶液化	麦芽糖	木糖	乳糖	甘露糖	葡萄糖	酪氨酸	柠檬酸	甲基红	吲哚试验	过氧化氢酶	硝酸还原酶
T1	+	+	+	A ⁺ G ⁺	A ⁺ G ⁻	A ⁺ G ⁺	A ⁺ G ⁻	A ⁺ G ⁺	+	-	+	-	+	+
T2	+	+	+	A ⁺ G ⁻	A ⁺ G ⁻	A ⁺ G ⁺	A ⁺ G ⁺	A ⁺ G ⁻	-	+	-	-	+	+

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性;A:产酸;G:产气。

Note: “+” positive; “-” negative; A: acid production; G: gas production.

2.3 分子生物学鉴定

为了更确切地鉴定菌株T1和T2的分类学地位,以各自纯培养的基因组DNA为模板,使用16S rRNA的通用引物成功扩增到了1.5 kb的目的片段。图2所示为菌株T1和T2的系统发育树,T1和T2分别位于*Bacillus cereus*和*Bacillus subtilis*的分支上,且与它们的相似性均达到了99%,结合其菌落形态和生理生化特性,可以初步将菌株T1和T2分别鉴定为*Bacillus cereus*和*Bacillus subtilis*。

2.4 *Bacillus subtilis* 内切酶基因的克隆以及表达载体构建

以*Bacillus subtilis* T2的基因组DNA为模板,通过PCR成功扩增到了一段1500 bp左右的DNA片段egB(图3A)。该基因与已经报道的*Bacillus subtilis* AH18(EF070194)的内切酶基因相似性达到了99%,与*Paenibacillus campinasensis* (GU206788)的内切酶基因相似性达到了98%,而与*Bacillus amyloliquefaciens* FZB42(CP000560)的内切酶基因相似性为93%。可以初步认为扩增到了*Bacillus subtilis* T2的内切酶基因。测序后,通过blastx在NCBI数据库中在线比对及开放阅读框(ORF)分析,表明从*Bacillus subtilis* T2扩增到的基因序列含有一个完整的ORF,该阅读框编码499个氨基酸序列,等电点预测为8.55,蛋白分子量为55.3 KD。

通过对*Bacillus subtilis* T2内切酶的结构域分析发现,内切酶是由两个不连续结构域组成的标准蛋白:其一为N-端催化结构域(48~301号氨基酸),由糖基水解酶家族5组成,该结构域主要起催化底物水解的作用;其二为C-端底物结合结构域,由碳水化合物结合结构域家族3组成,从356号氨基酸残基开始到437号氨基酸残基共182个氨基酸残基,可以与纤维素表面结合,从而使催化易于进行。另外,在第472~485号氨基酸之间有一段14个氨基酸序列的低复杂性的区域,同时,第1~29号氨基酸残基为信号肽序列。去掉该信号肽序列基因后,重新设计引物BSE1和XSE2,成功构建了与理想片段大小相符的表达载体

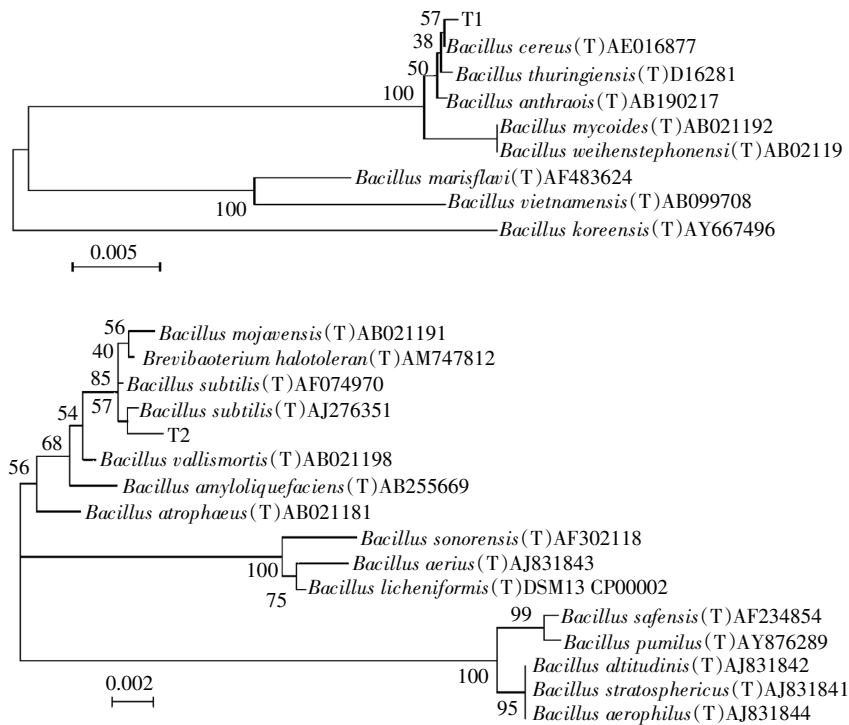
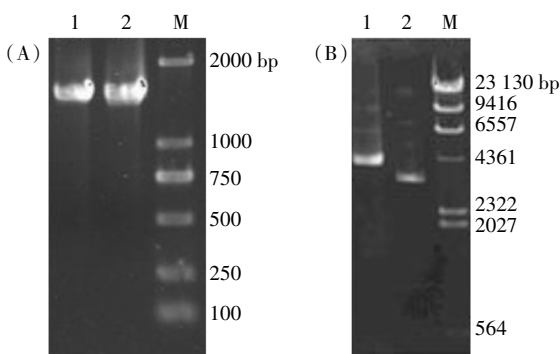


图 2 基于菌株 T1 和 T2 亲缘关系相近菌株的 16S rRNA 基因序列的邻接系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree showing the positions of strains T1 and T2 constructed by neighbour-joining method based on 16S rRNA gene sequence



(A)泳道 M:DL2000; 1, 2: 内切酶基因 *egB*;
(B)泳道 M:λ-HindIII marker; 1: PET28a; 2: p28-*egB*。

图 3 重组质粒 p28-*egB* 电泳图Figure 3 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids p28-*egB*p28-*egB*(图 3B),可用于后续的内切酶基因的表达。

2.5 目的蛋白的表达

经 IPTG 诱导 4 h 后转入表达载体 p28-*egB* 的大肠杆菌发酵液经超生波破碎后获得的粗酶液成功检测到了内切酶活性,酶活达到了 $2.32 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,而转入载体 pET28a 的粗酶液则未能检测到内切酶活性,说明内切酶基因已经在 *E.coli* BL21 细胞中成功表达。粗酶液 5 倍稀释后,经 SDS-PAGE 分析,发现转入表达载体 p28-*egB* 的粗酶液在大约 50 KD 处可见 *Bacil-*

lus subtilis T2 的内切葡聚糖酶目的条带,与理论值 55.3 KD 基本相符(图 4),用软件 BandScan 4.50 分析 SDS-PAGE 电泳图谱后,发现内切酶的浓度约为 $93.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

从堆肥高温阶段的新鲜样品中经过富集、初筛和复筛分离到两株纤维素内切酶活性较高的高温菌株,结合生理生化和分子生物学分析,初步鉴定为 *Bacil-*

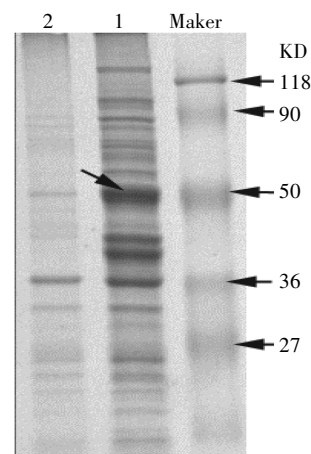
Maker: protein markers; 1: induced BL21/p28-*egB*; 2: induced BL21/pET28a

图 4 IPTG 诱导后的融合蛋白的表达分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of fusion proteins induced by IPTG

lus cereus 和 *Bacillus subtilis*。芽孢杆菌属的微生物是堆肥有机物质的重要分解者。黄翠等^[1]从堆肥样品中筛选到了 15 株具有纤维素降解特性的高温菌株,其中有 13 株属于芽孢杆菌属;Tian 等^[16]使用 16S rRNA 基因文库的方法对牛粪高温堆肥的第 0、12、42、112 d 的样品进行了微生物类群分析,发现在高温阶段(42 d)芽孢杆菌属的微生物的克隆数明显增加。本文分离的菌株 T1 和 T2 在 50 ℃条件下生长良好,推测与牛粪堆肥过程中高温阶段纤维素、木质素等复杂化合物的降解和堆肥的最终腐熟具有密切的相关性。同时,芽孢杆菌属的微生物具有较高抗逆性和环境适应性,更有利于堆肥高温菌剂的开发以及保存、运输。

本文成功地对 *Bacillus subtilis* 的内切酶基因进行了克隆和表达,且粗酶液的内切酶活性为 $2.32 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,相对于已经报道的细菌葡聚糖内切酶活性具有一定的优势。张楠等分离到的一株枯草芽孢杆菌的内切酶活为 $1.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右^[17],但明显低于 Liu 等报道的耐热真菌 *Aspergillus fumigatus* Z5 的内切酶活性^[6]。化学和物理诱变技术是常用的选育高效纤维素降解菌的手段,但带有一定的盲目性,而本文对 *Bacillus subtilis* 的内切酶基因的克隆为使用分子生物学技术,例如更换强启动子或者定点突变等筛选高效纤维素降解菌株提供了可能。另外,本文 *Bacillus subtilis* 的内切酶呈弱碱性,可以应用于洗涤剂 and 脱墨等行业^[18],具有广泛的应用价值。

纤维素的降解是内切葡萄糖苷酶、外切葡萄糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶协同作用的结果,而本文只关注了 *Bacillus subtilis* 的内切酶活性,且在实际生产中菌株的生长环境无法达到实验水平,因此对纤维素的实际降解效果缺乏一定的说服力,有待进一步的深入研究。另外,由于单一菌株通常无法产生所有的纤维素酶^[19-20],日后的工作将着重于其他菌株尤其是耐热真菌的筛选,开发混合菌剂,应用于堆肥产业。但是,本实验依然为提高生物固体废弃物的资源化利用效率提供了优良菌株。

4 结论

(1)从堆肥高温阶段的新鲜样品中经过富集、初筛和复筛分离到两株纤维素内切酶活性较高的高温菌株,结合生理生化和分子生物学分析,分别鉴定为 *Bacillus cereus* 和 *Bacillus subtilis*。

(2)成功克隆了 *Bacillus subtilis* 1500 bp 的纤维素内切酶基因,该基因编码的葡聚糖内切酶由 N 端催

化结构域和 C 端底物结合结构域两个不连续的结构域组成,SDS-PAGE 电泳图谱显示该蛋白大小约为 50 KD,浓度约为 $93.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

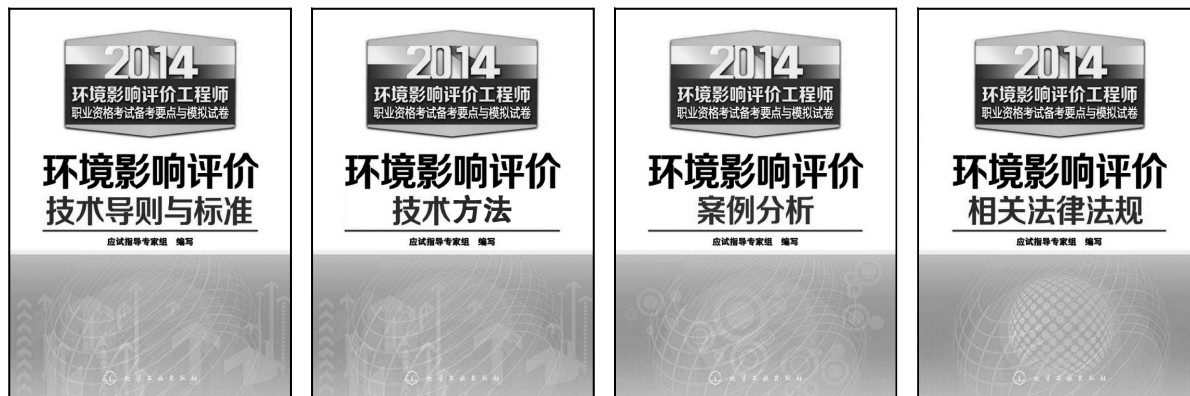
- [1] 黄 翠,杨朝晖,肖 勇,等.堆肥嗜热纤维素分解菌的筛选鉴定及其强化堆肥研究[J].环境科学学报,2010,30(12):2457-2463.
HUANG Cui, YANG Zhao-hui, XIAO Yong, et al. Isolation and identification of cellulolytic thermophiles for composting and their enhancement of composting[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(12): 2457-2463.
- [2] Tengerdy R P, Szakacs G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 13:169-179.
- [3] 顾方媛,陈朝银,石家骥,等.纤维素酶的研究进展与发展趋势[J].微生物学杂志,2008,28(1):83-87.
GU Fang-yuan, CHEN Chao-yin, SHI Jia-ji, et al. Advances in cellulase and its development tendency[J]. *Journal of Microbiology*, 2008, 28(1):83-87.
- [4] 赵方圆,范宁杰,朱建春,等.纤维素高效降解菌 YN1 的筛选及其降解特性[J].微生物学通报,2010,37(4):496-502.
ZHAO Fang-yuan, FAN Ning-jie, ZHU Jian-chun, et al. Isolation and characterization of an efficient cellulose-decomposing strain YN1[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(4):496-502.
- [5] 顾 挺,申卫收,钟文辉.稻秆纤维素降解菌的分离筛选和降解性能研究[J].南京师范大学学报,2011,11(1):73-79.
GU Ting, SHEN Wei-shou, ZHONG Wen-hui. Isolation, Screening and capability of cellulose-degrading strains for rice straw[J]. *Journal of Nanjing Normal University*, 2011, 11(1):73-79.
- [6] Liu D Y, Zhang R F, Yang X M, et al. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi *Aspergillus fumigatus* Z5 isolated from compost[J]. *Protein Expression & Purification*, 2011, 79(2):176-186.
- [7] Tiquia S M, Tam N F Y. Composting of spent pig litter in turned and forced-aerated piles[J]. *Environmental Pollution*, 1998, 99(3):329-337.
- [8] Danon M, Franke-Whittle I H, Insam H, et al. Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(1):133-144.
- [9] Franke-Whittle I H, Knapp B A, Fuchs J, et al. Application of COM-POCHIP microarray to investigate the bacterial communities of different composts[J]. *Microbiology Ecology*, 2009, 57(3):510-521.
- [10] Partanen P, Hultman J, Paulin L, et al. Bacterial diversity at different stages of the composting process[J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10:94-105.
- [11] Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, et al. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2001, 66(3):930-936.

- [12] Takaku H, Kodaira S, Kimoto A, et al. Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(1):42-50.
- [13] Hart T D, De FAAM, Kinsey G, et al. Strategies for the isolation of cellulolytic fungi for composting of wheat straw[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, 18(5):471-480.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001:97-100.
- [15] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 210-215.
- [16] Tian W, Sun Q, Xu D B, et al. Succession of bacterial communities during composting process as detected by 16S rRNA clone libraries analysis[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 78: 58-68.
- [17] 张 楠, 杨兴明, 徐阳春, 等. 高温纤维素降解菌的筛选和酶活性测定及鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(3):82-87.
- ZHANG Nan, YANG Xing-ming, XU Yang-chun, et al. Screening, cellulose activity measurement and identification of cellulose-decomposing bacteria[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2010, 33(3):82-87.
- [18] Bhat M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2000, 18:355-383.
- [19] 黄得扬, 陆文静, 王洪涛, 等. 高效纤维素分解菌在蔬菜-花卉秸秆联合好氧堆肥中的应用[J]. 环境科学, 2004, 25(2):145-149.
- HUANG De-yang, LU Wen-jing, WANG Hong-tao, et al. Application of High-efficient cellulose utilization microorganisms in Co-composting of vegetable wastes and flower stalk[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(2): 145-149.
- [20] 吴文韬, 鞠美庭, 刘金鹏, 等. 一株纤维素降解菌的分离、鉴定及对玉米秸秆的降解特性[J]. 微生物学通报, 2013, 40(4):712-719.
- WU Wen-tao, JU Mei-ting, LIU Jin-peng, et al. Isolation, identification and corn stalk degradation characteristics of cellulose-degrading bacterial strain NH11[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(4):712-719.



新书推荐

2014 版《环评工程师考试丛书》最新出版



《环境影响评价工程师职业资格考备考要点与模拟试卷》2014 版

ISBN	书名	定价	出版日期	开本
9787122191618	环境影响评价技术导则与标准	65.0	2014 年 2 月	16K
9787122192738	环境影响评价相关法律法规	50.0	2014 年 2 月	16K
9787122191625	环境影响评价案例分析	65.0	2014 年 1 月	16K
9787122191601	环境影响评价技术方法	45.0	2014 年 2 月	16K

如需更多图书信息,请登录 www.cip.com.cn

服务电话:010-64518888,64518800(销售中心)

网上购书可登录化学工业出版社天猫旗舰店:<http://hxgycbs.tmall.com>

邮购地址:(100011)北京市东城区青年湖南街 13 号 化学工业出版社

如要出版新著,请与编辑联系,联系电话:010-64519525。