

牛粪中纤维素降解菌的分离鉴定及其产酶研究

汪学军^{1,2*}, 闵长莉^{1,2}, 韩彭磊¹, 张丽君¹¹皖西学院生物与制药工程学院; ²皖西学院大别山植物内生菌资源研究中心, 六安 237012

摘要: 采用仅含有羧甲基纤维素钠为碳源培养基从牛粪样品中分离纯化具有较强纤维素降解能力的菌株, 通过生理生化特征研究、形态学和 16S rDNA 生物学手段对其分类鉴定, 并对该菌株的产酶条件进行了初步研究。结果表明, 从牛粪样品中筛选到一株降解纤维素能力较强的菌株 NF38, 分类鉴定结果显示, 菌株 NF38 与浅紫链霉菌 (*Streptomyces violascens*) 最接近, 初步将其鉴定为浅紫链霉菌 (*Streptomyces violascens*); 产酶性质研究表明, 该菌株产纤维素酶活性在温度范围为 30 ~ 40 °C 相对较高 (最适温度 35 °C), pH 范围 7.0 ~ 8.0 (最适 pH 7.0), 接种量范围 5% ~ 10% (最佳接种量 5%), 发酵时间在第 7 d 达到产酶高峰。菌株 NF38 在降解畜禽粪便方面具有一定的开发与应用潜力。

关键词: 牛粪; 纤维素降解菌; 鉴定; 浅紫链霉菌

中图分类号: Q939.96; Q814

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.011

Isolation, Identification of a Cellulolytic Actinomycete from Cow Manure and Study on Its Cellulase-producing Conditions

WANG Xue-jun^{1,2*}, MIN Chang-li^{1,2}, HAN Peng-lei¹, ZHANG Li-jun¹¹College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University; ²Research Center for Endophytic Fungi Resources of Dabie Mountain, West Anhui University, Lu'an 237012, China

Abstract: In this paper, strains with higher cellulose degrading ability were isolated from cow manure by only carboxymethyl cellulose-Na (CMC-Na) medium. The morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA gene were analyzed to identify the taxonomic position of the strains. Moreover, their cellulase producing conditions were also studied. The results showed that a strain (NF38) that can degrade cellulose effectively was obtained. According to taxonomic identification, the strain NF38 was identified as *Streptomyces violascens*. When its fermentation temperature ranged from 30 to 40 °C (optimum at 35 °C) and pH 7.0 to 8.0 (optimum at 7.0), and inoculation amount at 5% - 10% (optimum at 5%), it had the highest enzyme activity. In addition, it took 7d to reach the peak of cellulase production. In conclusion, strain NF38 had potential in degrading animal manure.

Key words: cow manure; cellulose decomposing microorganisms; identification; *Streptomyces violascens*

近年来,随着我国畜牧业规模化和集约化的迅速发展,畜禽粪便的产生量也大大增加,已经成为农业固体有机废弃物的主要生产源。研究发现,畜禽粪便中富含有机质和氮、磷、钾等元素,可以成为再利用的资源^[1],但是由于畜禽粪便中纤维素与木质素含量高且难以分解利用而被丢弃,从而成为污染源造成环境的污染及资源的浪费^[2-4]。因此,如何合理的处理和利用这些畜禽粪便,在不造成环境污染的情况下,又将其转化为可再生性的资源已成为目

前研究的热点,国内外学者对于微生物能分解转化纤维素的有关研究相当重视^[5,6]。从蚯蚓养殖场泥土中分离筛选出一株纤维素酶高产菌株,研究发现氨化预处理可提高该菌株对玉米秸秆的降解率,经鉴定其属于枯草芽孢杆菌^[7]。杨莹等从牛粪自然堆肥中分离筛选出 2 株降解纤维素能力较强的菌株,初步鉴定其均为曲霉属真菌,实验结果表明,这两株真菌可作为降解畜禽粪便发酵剂的优良生产菌株,且棉粕是较为理想的固体发酵氮源^[8]。许玉林等用刚果红染色法从甘蔗地土壤中分离得到一株具有较强纤维素降解能力的真菌,经鉴定该菌株属于草酸青霉,其对天然的滤纸降解率较高,在 3 d 内对滤纸的降解率为 32.95%^[9]。高云航等从新鲜牛粪

收稿日期: 2015-02-13 接受日期: 2015-05-07

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目 (KJ2013A266); 国家自然科学基金研究项目 (31100019); 六安市定向委托皖西学院市级研究项目 (2012LWA019)

* 通讯作者 Tel: 86-564-3305073; E-mail: xjwang0917@163.com

样品中筛选得到 1 株产酶活较高的纤维素分解菌,经鉴定其为短小芽孢杆菌,产酶条件优化结果表明,该菌株以 0.5% 玉米粉为碳源、1% 酵母粉为氮源,初始 pH 3.0、42 °C 摇瓶培养 54 h 产酶活最高^[10]。由此可见,若将这些纤维素分解菌应用于畜禽废弃物进行无害化处理,可为解决环境污染与资源浪费等问题提供一条可行的途径。

目前,对于纤维素分解菌选育应用研究较多的是真菌与细菌,尤以曲霉、木霉和青霉为典型,而对放线菌的研究报道较少。本实验从新鲜牛粪样品中分离筛选出一株具有较强纤维素分解能力的菌株 NF38,通过生理生化特征研究、形态学和 16S rDNA 生物学手段对其分类鉴定,并对菌株 NF38 产酶条件进行了初步研究,以为纤维素分解菌株的研究奠定一定的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 牛粪样品

六安市亿牛乳业荷斯坦奶牛的新鲜粪便。

1.1.2 培养基

液体富集培养基(g/L):选择羧甲基纤维素钠为唯一碳源的培养基配方,即 CMC-Na 10、FeSO₄·7H₂O 0.001、K₂HPO₄ 1.0、MgSO₄·7H₂O 0.5、KCl 0.5、NaNO₃ 0.5、硫酸链霉素 0.02;pH 7.2^[11]。分离培养基(g/L):CMC-Na 10.0、FeSO₄·7H₂O 0.001、K₂HPO₄ 1.0、MgSO₄·7H₂O 0.5、KCl 0.5、NaNO₃ 0.5、琼脂粉 15.0;pH 7.2。纯化培养基:高氏 I 号固体培养基。种子培养基:高氏 I 号液体培养基。发酵培养基(g/L):CMC-Na 10、酵母浸出粉 3.5、MgSO₄·7H₂O 0.5、轻质 CaCO₃ 6.0、KH₂PO₄ 0.1,pH 自然。

1.2 纤维素降解菌株的筛选

新鲜牛粪样品 10 g 加入到装有 90 mL 液体富集培养基的锥形瓶中进行富集培养,30 °C 震荡培养 7 d。取富集后的培养液 10 mL 接种至 90 mL 液体富集培养基中,再次在同样的条件下进行富集培养。取后一次的富集培养液 1 mL 按 10 倍浓度梯度依次稀释至 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵;分别取稀释 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵富集液 0.1 mL 至分离培养基平板上涂布均匀后,静置 30 min 后,倒置于 30 °C 恒温恒湿培养箱中培养 10 d。采用划线法对分离平板上的放线菌菌株在纯化培养基平板上进行纯化至菌落纯的放线

菌,对纯化得到菌株编号和保藏。

取上述纯化得到的放线菌菌株分别接种于分离培养基平板中央,30 °C 培养 7 d 后,在每个培养平板中倒入 0.1% 的刚果红显色液 15 mL,静置 10 min 倒去显色液,并用去离子水漂洗平板表面 2~3 次,观察有无水解圈,并对菌落直径 *d* 和水解圈直径 *D* 进行测量和记录。

1.3 菌株 NF38 酶活力的测定

菌株 NF38 接种到种子培养液中于 30 °C、150 rpm 震荡培养 48 h 后,按 5% 的接种量转接于发酵培养基中继续培养 7 d。收获的发酵液经 10000 rpm 离心 5 min,所得到取上清即为粗酶液,保存备用。

在洁净的试管中加入 1 mL 粗酶液和 1.5 mL 的 1% CMC-Na 磷酸缓冲液或者滤纸作为底物,在 50 °C 水浴锅中保温 30 min,然后迅速加入 2.5 mL DNS 并摇匀,使反应终止,沸水浴 5 min,快速冷却后在波长为 540 nm 下测定 OD 值,分别测得测定纤维素酶酶活(CMCA)和滤纸酶酶活(FPA)^[12]。酶活单位(IU)按国际单位定义为:1 mL 酶液 1 min 产生 1 mol 还原糖的酶量作为 1 个酶活单位^[12]。

1.4 菌株 NF38 鉴定

1.4.1 菌株 NF38 形态学特征和生理生化特征研究

在直径为 90 mm 的培养平板上以划线法接种菌株 NF38,培养后观察菌落大小、质地、颜色、色素有无等培养特征^[13];而菌丝和孢子丝通过插片法加以培养后在显微镜下进行观察^[14,15]。生理生化特征的研究方法参照文献进行研究并记录结果^[16]。

1.4.2 菌株 NF38 的 16S rDNA 基因序列测定和系统发育分析

菌株 NF38 的 DNA 的提取和扩增参照文献方法进行^[17,18]。16S rDNA 序列 PCR 扩增采用保守引物 27F (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')^[19]。对扩增产物进行测序,测序工作委托上海生工生物工程有限公司完成。测定后的序列进行基因登录号的申请、模式菌株的选取、相似性比较和系统发育树的构建^[20]。

1.5 菌株 NF38 产酶条件的研究

1.5.1 发酵温度对产酶的影响

接种有菌株 NF38 的发酵培养基分别于 10、20、25、30、35、40、50 °C 条件下进行震荡培养,摇床转速为 150 rpm,培养 7 d,测定 CMCA 和 FPA 酶活。

1.5.2 发酵初始 pH 对产酶的影响

发酵培养基中加入数滴 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH,使其初始的 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0,接种菌株 NF38 种子液后置于 30 ℃,150 rpm 摇床震荡培养 7 d,测定 CMCA 和 FPA 酶活。

1.5.3 发酵时间对产酶的影响

接种菌株 NF38 的发酵培养基于 30 ℃,150 rpm 摇床震荡培养,分别取 3、4、5、6、7、8 d 和 9 d 发酵液,测定 CMCA 和 FPA 酶活。

1.5.4 接种量对产酶的影响

发酵培养基中分别接种 1%、5%、10%、15%、20% 和 30% 菌株 NF38 种子液后置于 30 ℃,150 rpm 摇床震荡培养 7 d,测定 CMCA 和 FPA 酶活。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

经过两次富集培养基的富集培养,淘汰了大部分不能利用 CMC-Na 为唯一碳源的微生物,同时,在富集培养基中加入硫酸链霉素,又使得大部分细菌不能在其中生长筛选,使得筛选出具有纤维素降解放线菌的概率得到有效的提高。筛选得到放线菌 NF38,显示出良好的纤维素降解能力,其水解圈直径 D 和菌落直径 d 分别为 23.6 mm、1.3 mm, D/d 值为 18.1,测定酶活为 32.4 U/mL,放线菌 NF38 水解圈如图(图 1)所示。根据以上的实验结果,选择 NF38 为研究对象做进一步研究。

2.2 菌株 NF38 鉴定

2.2.1 放线菌的形态特征

菌株 NF38 在高氏 I 号平板上培养 7 d 后,菌落直径 2~3 mm、白色隆起、边缘整齐光滑(图 2)。气生菌丝白色、基内菌丝淡黄色;孢子丝为稍微的弯曲状,螺旋不明显,球形孢子链状排列在一起,孢子表面光滑、黄色。

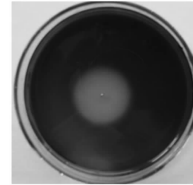


图 1 菌株 NF38 刚果红水解圈

Fig. 1 Hydrolyzed circle of NF38 by Congo-red



图 2 菌株 NF38 菌落形态

Fig. 2 Colony morphology of strain NF38

2.2.2 菌株 NF38 培养特征

菌株 NF38 除了在营养琼脂上生长较差外,在其余培养平板上均生长良好,气生菌丝以乳白色为主,而基内菌丝的颜色多变,不同培养基表现出较大的差异性,在 8 种不同培养基上具体培养特征见表 1。

表 1 菌株 NF38 培养特征

Table 1 The cultural characteristics of strain NF38

培养基 Medium	气生菌丝 Aerial mycelium	基内菌丝 Substrate mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
酵母麦芽提取物琼脂(ISP2) Yeast extract-malt extract agar	乳白色 Milk white	褐色 Brown	褐色 Brown
燕麦琼脂(ISP3) Oat power agar	乳白色 Milk white	褐色 Brown	褐色 Brown
无机盐淀粉琼脂(ISP4) Inorganic salt starch agar	乳白色 Milk white	浅褐色 Brown	无 No
葡萄糖天门冬酰胺琼脂(ISP5) Glucose asparagine agar	气丝少,灰白色 Few aerial mycelia, offwhite	无色 Colorless	无 No
蛋白胨酵母膏铁盐琼脂(ISP6) Peptone yeast ext-Fe agar	乳白色 Milk white	褐色 Brown	褐色 Brown
营养琼脂 Nutrient agar	气丝少,灰白色 Few aerial mycelia, offwhite	无色 Colorless	无 No
马铃薯浸汁琼脂 Potato extract agar	浅灰色 Light grey	浅灰色 Light grey	淡黄色 Light yellow
Glycerol asparagine agar 高氏 I 号	白色 white	淡黄色 Light yellow	无 No

2.2.3 菌株 NF38 生理生化特性

菌株 NF38 特征中最为典型的是可以很好利用纤维素,革兰氏染色呈阳性;在 10 ~ 45 °C 温度范围内生长正常,但最适生长温度为 30 ~ 40 °C 之间,培养期间没有黑色素和 H₂S 的产生;菌株适宜生长 pH

为 4.0 ~ 10.0 之间,最适生长 pH 为 7.4。

菌株 NF38 对碳源利用实验结果表明可以有效利用实验项目中多数碳源,显示出对碳源的利用谱较为广泛,但是,对肌醇和 L-阿拉伯糖不能利用。菌株 NF38 生理生化和碳源利用实验结果(表 2)。

表 2 菌株 NF38 生理生化特征和碳源的利用情况

Table 2 The physiological characteristics and carbon utilization of strain NF38

实验项目 Test items	生理生化 Physiological and biochemical	实验项目 Test items	碳源利用 Carbon utilization
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	D-木糖 D-Xylose	+
牛奶凝固 Coagulation of milk	+	D-果糖 D-Fructose	++
牛奶胨化 Peptonize of milk	-	D-葡萄糖 D-Glucose	++
黑色素 Melanin pigment	-	麦芽糖 Maltose	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	蔗糖 Sucrose	+
纤维素利用 Growth on cellulose	++	甘露醇 Mannitol	+
H ₂ S 产生 Production of H ₂ S	-	鼠李糖 Rhamnose	+
最适生长 pH Optimal pH	7.4	肌醇 Inositol	-
最适生长温度 Optimal temperature	35 °C	L-山梨醇 L-Sorbitol	+
革兰氏染色 Gram staining	++	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-

注: ++:阳性; +:弱阳性; -:阴性。

Note: ++:Positive; +:Weakly positive; -:Negative.

2.2.4 菌株 NF38 16S rDNA 序列测定和系统发育树的构建

菌株 NF38 的 16S rDNA 扩增产物的长度为 1443 bp,通过在 Bankit 上在线提交菌株序列扩增方法、菌株来源等相关信息,获得的基因登录号为 KF790691。菌株 NF38 的 16S rDNA 序列经 Blastn 比对结果表明,该菌株与 GenBank 中浅紫链霉菌 (*Streptomyces violascens*) (EU273550) 序列同源性最高。核酸序列比对软件 Clustal X(1.81) 进行 alignment,利用 MEGA 6.02 软件包中的 Kimura-2-Parameter Distance 模型计算进化距离,以 Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 3),1000 次随机抽样计算自举支持率(Bootstrap),以评估系统发生树的置信度^[21]。由图 3 可以看出菌株 NF38 在进化树中与 *S. violascens* (EU273550) 亲缘关系最近,且处于同一分支上,同源性达到 99%。

综合菌株 NF38 形态学特征、碳源利用特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列的鉴定结果,将牛粪中获得将具有纤维素降解能力的菌株 NF38 鉴定为浅紫链霉菌 (*S. violascens*)。

2.3 菌株 NF38 产酶条件的研究

2.3.1 发酵温度对产酶的影响

在不同温度发酵后收获的粗酶样品经测活后实

验结果见图 4A,纤维素酶酶活和滤纸酶酶活在 30 ~ 40 °C 区间内酶的活性相对较高,其中,在 35 °C 所产生 CMCA 酶的活力最强 32.4 U/mL, FPA 酶活为 28.7 U/mL;但在 40 °C 后急剧下降。这样的实验结果可能说明了该菌株长期生活在牛的肠道内,适应了肠道温度环境,属于体温微生物。

2.3.2 发酵初始 pH 对产酶的影响

在不同初始 pH 值培养条件下收获的粗酶样品经测活后实验结果见图 4B,纤维素酶酶活和滤纸酶酶活在 pH 为 7.0 ~ 8.0 范围内维持在一个较高水

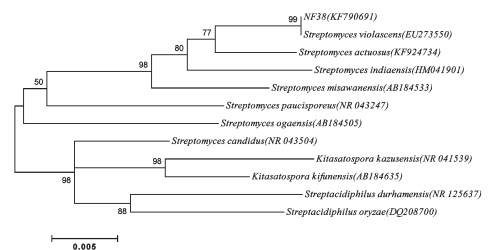


图 3 菌株 NF38 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain NF38

注:分支上的树值为自举 1000 次的结果,线段 0.01 代表 1/100 进化距离单位

Note: Nuerals on branches were the supporting percentage by 1000 replicates (Scale bar, 0.01 nucleotide substitution per 100 nucleotides of 16S rDNA sequence)

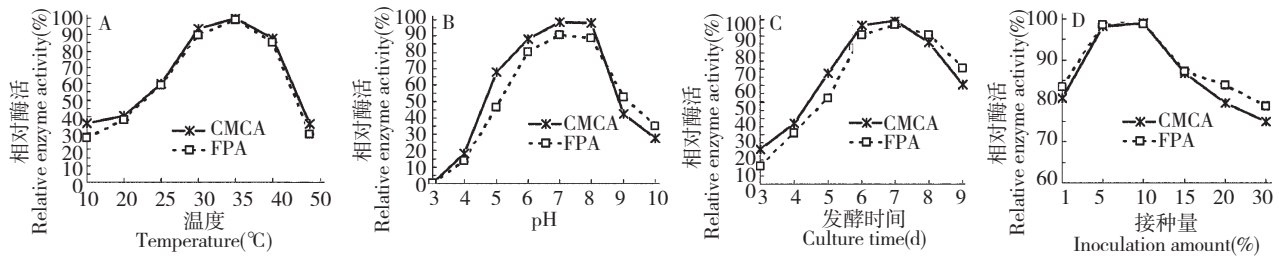


图4 温度(A)、pH(B)、发酵时间(C)及接种量(D)对菌株NF38产酶活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature (A), pH value (B), culture time (C) and inoculation amount (D) on cellulase production of strain NF38

平上,酶活分别达到顶峰,但是 $\text{pH} > 8.0$ 以后会出现酶的活性迅速下降的现象,这说明了菌株NF38在中性或者是偏碱性的条件下,最有利于酶的产生和保持较高的活性。

2.3.3 发酵时间对产酶的影响

在不同培养时间下收获的粗酶样品经测活后实验结果见图4C,菌株NF38培养3d后,纤维素酶酶活和滤纸酶酶活分别仅为6.95、3.46 U/mL,酶的活性在第7d时,活性最高,随后逐渐降低。可能是因为放线菌生长较为缓慢,代谢产物积累是在菌体生长的基础之上,因此,需要较长的时间来才能达到最高;而之后会出现下降,是因为菌体生长进入衰亡期,一方面菌体衰老死亡,细胞裂解的副产物导致酶的活力下降,另一方面所产生的酶随着时间延长自身也会发生酶活下降现象。

2.3.4 接种量对产酶的影响

不同接种量经发酵后,所收获的粗酶样品经测活后实验结果见图4D,接种量在5%~10%范围内酶活基本保持在同一个较高水平。当接种量 $> 10\%$ 时随接种量增加酶活相反呈下降趋势,可能是由于微生物的数量快速增加,发酵培养基中的营养成分被消耗并且已经不能满足酶的生物合成要求,导致酶还没有来得及合成或不是其合成最佳条件,因此出现酶活下降的现象。

3 讨论

随着我国集约化养殖业的扩大与人们环保意识的增强,将畜禽粪便进行堆肥化处理,是把这些废弃物变废为宝的有效途径^[22]。传统的堆肥法是利用原料中的土著微生物来降解有机物质,但由于其耗时较长,易产生臭味,且堆肥成品具有肥效较低与养料价值不高等缺点^[23]。故人们在发酵过程中往往

接种一些功能微生物,以便解决上述问题。将纤维素降解菌添加到畜禽粪便中进行堆肥,使其有机物在功能微生物的作用下矿化与腐殖化,生产出生物有机肥^[24,25]。这些生物有机肥施用农田后能起到改良土壤和增加肥效的作用^[8],且能增加农作物的产量,对于自然生态环境的保护,推动生态农业的可持续发展具有非常重要的意义^[26,27]。

本研究通过仅含有CMC-Na为唯一碳源培养基进行筛选,根据透明圈的大小,从新鲜牛粪样品中筛选到1株具有较强纤维素降解能力的放线菌菌株NF38,酶活测定结果表明其值为32.4 U/mL,酶活较高,可作为畜禽粪便无害化处理中的潜力菌株。此外,本研究还对菌株NF38的产酶条件进行了研究,结果表明该菌株在温度范围为30~40℃区间内酶的活力相对较高(最适温度35℃);pH范围为7.0~8.0时其酶活维持在较高水平上(最适pH为7.0);接种量在5%~10%区间时其酶活基本保持较高水平(最佳接种量为5%);发酵时间在第7d时达到产酶高峰。

本研究结合生理生化特征研究、形态学和16S rDNA序列分析结果,鉴定菌株NF38为浅紫链霉菌(*Streptomyces violascens*)。而已有的研究表明从放线菌中筛选到能产生纤维素酶的活性菌株还很少见有文献报道,目前仅有为数不多文献报道了放线菌能够产生纤维素酶的生物活性方面的研究,Waldron等从土壤中分离得到一株产纤维素酶的放线菌*Microbispora bispora*,酶活为5.9 U/mL^[28];冯海玮等等从水稻秸秆堆下土壤分离出一株能降解纤维素JSD-1放线菌,产酶活性为59.19 U/mL^[29]。这与本研究中发现的浅紫链霉菌可产纤维素酶的报道有所不同,从而为纤维素降解菌的来源提供了一个新的优良菌种。同时也有报道表明目前浅紫链霉菌

主要用来提取 L-谷氨酸氧化酶,而有关浅紫链霉菌产纤维素酶的报道还很鲜见,这也证明了微生物代谢产物的确具有多样性。

参考文献

- Ma HL(马怀良), Xu XH(许修宏). The technologies of aerobic compost of animal dung. *J Northwest Agric Univ* (东北农业大学学报), 2006, 36: 536-540.
- Deswal D, Khasa YP, Kukad RC. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Biores Technol*, 2011, 102: 6065-6072.
- Chang J, Cheng W, Yin Q, et al. Effect of steam explosion and microbial fermentation on cellulose and lignin degradation of corn stover. *Biores Technol*, 2012, 104: 587-592.
- Yu L, Chen ZX, Tong X, et al. Anaerobic degradation of microcrystalline cellulose: kinetics and micro-scale structure evolution. *Chemosphere*, 2012, 86: 348-353.
- Feng KK(冯克宽), Wang MY(王明谊). Studies on cellulase from *Aspergillus niger* Sta-122 strain. *J Northwest Norm Univ, Nat Sci* (西北师范大学学报, 自科版), 1991, 27: 61-65.
- Gijzen HJ. Continuous cultivation of rumen microorganisms, a system with possible application to the anaerobic degradation of lignocellulosic waste. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 8: 246-250.
- Wu WT(吴文韬), Ju MT(鞠美庭), Liu JP(刘金鹏), et al. Isolation, identification and corn stalk degradation characteristics of cellulose-degrading bacterial strain NHI1. *Microbiol China* (微生物学通报), 2013, 40: 712-719.
- Yang Y(杨莹), Lai HX(来航线), Chen X(陈雄), et al. Selection of high efficient strains for decomposing cow manure and the optimization of fermentation formula. *J Northwest Agric Forest Univ, Nat Sci* (西北农林科技大学学报), 2007, 35: 125-128.
- Xu YL(许玉林), Zheng YX(郑月霞), Ye BY(叶冰莹), et al. Isolation and identification of a cellulose degrading fungi. *Microbiol China* (微生物学通报), 2013, 40: 220-227.
- Gao YH(高云航), Zhang XH(张喜宏), Wang W(王巍), et al. Study on isolation, identification and enzyme-producing conditions optimized of cellulolytic bacteria in Ox dung. *China Anim Husband Veterin Med* (中国畜牧兽医), 2014, 41: 151-156.
- Saratale GD, Saratale RG, Oh SE. Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolated *Streptomyces* sp. MDS. *Biomass Bioener*, 2012, 47: 302-315.
- Fan C(樊程), Li SJ(李双江), Li CL(李成磊), et al. Isolation, identification and cellulase production of a cellulolytic bacterium from intestines of giant panda. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2012, 52: 1113-1121.
- Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J System Bacteriol*, 1966, 16: 313-340.
- Wang XJ(汪学军), Min CL(闵长莉), Yin ZC(殷智超), et al. Isolation and identification of an antimicrobial endophytic actinomycete from *Macleaya cordata*. *J Chin Med Mater* (中药材), 2014, 37: 1947-1950.
- Group of Actinomycetes Taxonomy, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (中国科学院微生物研究所放线菌分类组). Identifying Manual of Streptomyces. Beijing: Science Press, 1975. 13-15.
- Jiang Y(姜云), Huang LL(黄丽丽), Chen CQ(陈长卿), et al. Screen, identification and optimized fermentation conditions of an actinomycetes strain against pathogenic fungus *Fulyia fulva*. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2007, 47: 622-627.
- Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *Int J System Bacteriol*, 1995, 45: 240-245.
- Jiang SM(姜淑梅), Zhang L(张龙), Dai SK(戴世鲲), et al. A quick and efficient method for genomic DNA extraction from actionbacteria. *Biotechnology* (生物技术), 2007, 17: 39-41.
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*, 2003, 55: 541-555.
- Kumar S, Zhang QB(张庆波), Li SM(李苏梅), et al. Isolation and characterisation of enterocins from marine *Streptomyces* sp. SCSIO 11863 isolated from South China sea. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1216-1220.
- Liu ZY(刘占英), Hou XZ(侯先志), Liu YC(刘玉承), et al. Isolation, identification and characterization of a cellulose-degrading bacterial strain from the rumen of sheep. *Microbiol China* (微生物学通报), 2009, 36: 459-464.
- Lu BL(卢秉林), Wang WL(王文丽), Li J(李娟), et al. Maturing process of cattle manure high temperature composting with mixing different ratio of wheat straw. *Environ Pollution Control* (环境污染与防治), 2010, 32: 30-34.
- Xie KZ(解开治), Xu PZ(徐培智), Zhang RZ(张仁陟), et al. Effects of one chemical composting promoter and microorganism composting preparations on fresh cow dung compost. *J Agro-Environ Sci* (农业环境科学学报), 2007, 26: 1142-1146.