

刘波, 陈倩倩, 王阶平, 等. 糖厂滤泥堆肥发酵过程中可培养芽孢杆菌种群动态变化研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(1): 201-210.

LIU Bo, CHEN Qian-qian, WANG Jie-ping, et al. Dynamic changes in culturable *Bacillus*-like species populations in the process of sugar-refinery filtering mud composting fermentation to produce bio-organic fertilizers[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(1): 201-210.

糖厂滤泥堆肥发酵过程中可培养芽孢杆菌种群动态变化研究

刘波¹, 陈倩倩¹, 王阶平¹, 陈峥¹, 邓文琼¹, 刘欣¹, 肖谦², 唐国梁²

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350002; 2. 豫园生物科技有限公司, 长沙 410001)

摘要:为了揭示糖厂滤泥堆肥发酵生产生物有机肥过程中芽孢杆菌种群变化动态,本研究以糖厂滤泥堆肥发酵加工不同阶段的样品为研究对象,对各样品中的芽孢杆菌进行分离鉴定,研究糖厂滤泥堆肥发酵过程中芽孢杆菌种群数量和结构的变化动态,并分析其与本土芽孢杆菌的关系。结果表明,糖厂滤泥堆肥发酵加工过程中芽孢杆菌种类比较丰富,从糖厂滤泥堆肥发酵加工6个阶段样品中分离到64株芽孢杆菌,分属于7个属27种,其中芽孢杆菌属占绝对优势,有16种;研究发现有6种芽孢杆菌为我国新纪录种,它们是:大豆发酵芽孢杆菌(*Bacillus glycinifermentans* FJAT-47935、FJAT-47944、FJAT-47907)、外村尚芽孢杆菌(*Bacillus hisashii* FJAT-47926)、科研中心哈格瓦氏菌(*Bhargavaea cecembensis* FJAT-47948)、苯乙酰赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus acetophenoni* FJAT-47912、FJAT-47934、FJAT-47919)、巴伐利亚鸟氨酸芽孢杆菌(*Ornithinibacillus bavariensis* FJAT-47915)和拾蛤鸟氨酸芽孢杆菌(*Ornithinibacillus scapharcae* FJAT-47951)。在糖厂滤泥不同发酵加工阶段,芽孢杆菌种类结构不同,堆肥发酵初期(1 d)以大豆发酵芽孢杆菌(*Bacillus glycinifermentans* FJAT-47935)为优势种,总含量为114万 cfu·g⁻¹,发酵中期(30 d)以蓼蓝大洋芽孢杆菌(*Oceanobacillus polygona* FJAT-47932)为优势种,总含量为237万 cfu·g⁻¹,发酵后期(60 d)以淤泥大洋芽孢杆菌(*Oceanobacillus caeni* FJAT-47952)为优势种,总含量为37.6万 cfu·g⁻¹,加工成产品后以耐温芽孢杆菌(*Bacillus thermotolerans* FJAT-47921)为优势种,总量为43万 cfu·g⁻¹;可培养芽孢杆菌种类和数量差异显著,数量变化范围在-80%~+100%;种类的变更率在62%~84%。本土芽孢杆菌对糖厂滤泥堆肥发酵的影响较小,其发酵过程中出现的芽孢杆菌主要来源于自带种类,因此,糖厂滤泥堆肥发酵全过程不外加芽孢杆菌接种剂,自带的芽孢杆菌就能发挥作用。综上所述,糖厂滤泥堆肥发酵加工过程中不仅有种类丰富的芽孢杆菌,而且其种群数量和结构差异显著。

关键词:糖厂滤泥;堆肥发酵;芽孢杆菌;变化动态

中图分类号:X712 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2019)01-0201-10 doi:10.11654/jaes.2018-0094

Dynamic changes in culturable *Bacillus*-like species populations in the process of sugar-refinery filtering mud composting fermentation to produce bio-organic fertilizers

LIU Bo¹, CHEN Qian-qian¹, WANG Jie-ping¹, CHEN Zheng¹, DENG Wen-qiong¹, LIU Xin¹, XIAO Qian², TANG Guo-liang²

(1. Agricultural Bio-resources Institute, Fujian Academy of Agriculture Sciences, Fuzhou 350002, China; 2. Yuyuan Biological Technology Co., Ltd, Changsha 410001, China)

Abstract: The aim of this study is to determine dynamic changes in *Bacillus*-like species population in the process of sugar-refinery filtering mud composting fermentation to produce bio-organic fertilizers. The *Bacillus*-like species in the samples at different composting and

收稿日期:2018-01-16 录用日期:2018-06-07

作者简介:刘波(1957—),男,博士,研究员,从事微生物生物技术与农业生物药物研究。E-mail: fzlubo@163.com

基金项目:国家自然科学基金项目(31370059);福建省重大专项项目农业科技重大专项(2015NZ0003);福建省种业创新与产业化工程项目(FJZZZY-1544);福建省种业创新项目“福建芽孢杆菌资源保藏中心”;福建省自然科学基金项目(2016J01129)

Project supported: National Natural Science Foundation of China(31370059); Special Fund for Key Program of Science and Technology of Fujian Province, China(2015NZ0003); Innovation and Industrialization Project of Seed Industry in Fujian Province(FJZZZY-1544); Innovation Project of Seed Industry in Fujian Province(Bacillus Resource Collections, Fujian Province); Natural Science Foundation of Fujian Province, China(2016J01129)

processing stages were isolated and identified to analyze the dynamic changes in their population size and structure during the process, and to reveal their relationship with the indigenous *Bacillus*-like species. The results indicated that the *Bacillus*-like species were enriched in the process of sugar-refinery filtering mud composting fermentation. A total of 64 strains, belonging to 27 species within 7 genera, were isolated from 6 samples at different composting and processing stages. Among them, the genus *Bacillus*, including 16 species, was the absolutely dominant population. Furthermore, 6 species were *Bacillus*-like new record species in China, including *B. glycinifermentans* (FJAT-47935, FJAT-47944, and FJAT-47907), *B. hisashii* (FJAT-47926), *Bhargavaea cecembensis* (FJAT-47948), *Lysinibacillus acetophenoni* (FJAT-47912, FJAT-47934, and FJAT-47919), *Ornithinibacillus bavariensis* (FJAT-47915), and *Ornithinibacillus scapharcae* (FJAT-47951). There were significant differences in the *Bacillus*-like species population size and structure during different composting and processing stages, with a size variation range from -80% to +100% and a species variety rate from 62% to 84%. The content of the *Bacillus*-like species populations was 1.14×10^6 , 2.37×10^6 cfu·g⁻¹ and 3.76×10^5 cfu·g⁻¹ at the early (1 d), middle (30 d), and later (60 d) stages, respectively, of composting fermentation, and that was 4.3×10^5 cfu·g⁻¹ after the production process. The indigenous *Bacillus*-like species had less influence on composting fermentation of the sugar-refinery filtering muds; the introduced *Bacillus*-like species during composting fermentation were mainly brought by the sugar-refinery filtering muds themselves. Therefore, the self-brought *Bacillus*-like species could fully develop their actions during the sugar-refinery filtering mud composting fermentation, although any additional *Bacillus*-like inoculation agent was not used. In conclusion, the *Bacillus*-like species are rich and their population size and structure are significantly different in the process of sugar-refinery filtering mud composting and processing.

Keywords: sugar-refinery filtering muds; composting fermentation; *Bacillus*-like species; dynamic changes

广西是我国甘蔗主要产区,机制糖产量超过我国机制糖年总产量的2/3,制糖产业是广西不争的经济大户,也是环境污染大户。据推算,每产1 t糖排出的废糖蜜为0.27 t,滤泥占到压榨总量的2%;全国每年产糖量为800万t,产生废糖蜜216万t,滤泥16万t,排出污水量640万t^[1]。一个年产10万t蔗糖的中等规模的糖厂,其COD总量相当于一个50万人口的中等城市排放的生活污水中的COD总量。就广西而言,排放到江河中的COD总量有70%来自糖厂,对河水的水质及周围的环境造成很严重的污染,水域的生态平衡和水资源的应用也受到很大的影响^[2]。

国内外在处理蔗渣和糖厂滤泥方面提出了许多方法。在国外,Kumar等^[3]利用微生物处理和蚯蚓后处理堆肥发酵甘蔗废弃物形成有机肥;Pérez等^[4]利用分枝杆菌(*Mycobacteria*)处理糖厂滤泥将植物甾醇(Phytosterols)转换为雄烷(Androstanes);Rocky-Salimi等^[5]利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* K46b)发酵糖蜜生产植酸酶;Veana等^[6]利用黑曲霉(*Aspergillus niger* GH1)固体发酵糖蜜和蔗渣生产蔗糖酶;Poo-pathi等^[7]利用蔗渣发酵生产杀蚊生物农药苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*);Techapun等^[8]设计了连续流加培养装置,利用放线菌(*Streptomyces* sp. Ab106)发酵糖厂滤泥等农业废弃物生产木聚糖酶(Xylanase)。在国内,糖厂滤泥处理有过许多研究,谭宏伟^[9]将糖厂滤泥堆肥发酵制成生物有机肥;左见军等^[10]综述了甘蔗糖厂滤泥的资源化利

用,糖厂滤泥综合利用可概括为滤泥生产复合肥、加工成动物饲料、提取蔗糖蜡及植物固醇、制备材料及添加剂、作为生物质燃料等5个方面。蒙世协等^[11]研究了亚硫酸法糖厂滤泥对生土熟化改良试验,施用亚硫酸法滤泥处理和亚硫酸法滤泥+复合微生物菌处理的土壤有机质提高,甘蔗发芽生根快,出苗率高。刘晓举等^[11]利用糖厂滤泥生产根瘤菌菌剂,分析优化了大豆根瘤菌在滤泥中生长的最佳条件:温度29℃,pH 7.5,总糖总氮比7:10,湿度72.97%,接种量51.3 mL·kg⁻¹,脱水滤泥可以作为根瘤菌生长的载体。黄飒等^[12]将碳酸法糖厂滤泥与酸性土壤混合后用于甘蔗种植试验,探索碳酸法糖厂滤泥资源再利用,解决滤泥填埋环境污染问题。虎玉森等^[13]利用等离子体发射光谱(ICP)法、分光光度法和容量分析等方法,测定了糖厂滤泥中的金属元素、全磷、有效磷、全氮和有机质含量,说明了糖厂滤泥进一步开发利用的价值。

糖厂滤泥堆肥发酵生产有机肥被广泛采用。谭宏伟^[9]采用功能菌发酵糖厂滤泥生产生物有机肥的腐熟速度快,受环境因素影响较小,发酵效果稳定,发酵温度最高达77.2℃,且70.0~77.2℃的维持时间长达12 d;发酵后的有机质含量和有机酸转化率优势明显,分别较传统(自然)发酵提高30.2%和12.3%(绝对值)。农业废弃物堆肥发酵过程中,微生物起着重要的作用。Wang等^[14]报道了餐厨垃圾发酵过程添加石灰和磷酸氢镁(鸟粪石),可促进微生物生长和消除臭味。Zhong等^[15]比较了接种剂添加与否对牛粪发酵的

影响,研究表明接种与否影响较小,增加垫料对发酵有利,发酵过程中的优势种群为芽孢杆菌等厚壁菌门的微生物。Zhao等^[16]研究了堆肥过程腐殖质降解菌对腐殖质电子传递基团(alkyl C, O-alkyl C, aryl C, carboxylic C, aromatic C)的响应,影响着堆肥发酵过程,调节电子传递基团,可以调节堆肥发酵过程。许多研究表明,堆肥发酵过程中芽孢杆菌是优势微生物^[17-21]。芽孢杆菌具有较高的抗逆性(耐高温、耐高盐、耐酸碱、抗紫外线等),在各种土壤中的生存能力较强^[22];同时能分解有机质,解磷解钾,提供作物生长养分,分泌许多抗病、生根、促长的次生代谢物^[23],在生物肥料和生物农药中广泛应用。作者选用芽孢杆菌作为糖厂滤泥堆肥发酵过程研究的微生物指标,对于揭示堆肥生产生物有机肥耐热微生物种群变化具有重要意义。关于糖厂滤泥生物有机肥堆肥发酵过程芽孢杆菌种群变化动态的研究未见报道。

作者利用堆肥发酵方法,经过好氧发酵,加速了对糖厂滤泥的除臭、腐熟、脱水、杀虫和灭菌,高温堆肥有效杀灭滤泥中夹带的病原菌、虫卵和杂草籽等,降解有毒有害物质;将糖厂滤泥堆肥发酵加工成生物有机肥,用于果树、瓜类、粮油、蔬菜、花卉等的基肥和追肥。为了解糖厂滤泥堆肥发酵加工生物有机肥生产过程中的芽孢杆菌种群动态,通过采样、分离、计数、纯化、鉴定,对其进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)样本采集:糖厂滤泥生物有机肥生产厂家为龙州南华长丰生物有机肥有限公司。堆肥发酵工艺:利用铲车把滤泥堆成高1.5 m、底宽4 m、长182 m的长条形堆垛,平均每3 d用翻堆机翻抛1次,发酵周期60 d,糖厂滤泥腐熟后,粉碎,混合化学肥料N:P:K=12%:5%:8%,经过圆盘造粒,烘干形成商品。发酵加工过程的采样:于糖厂滤泥堆垛的第1 d(AUG-L,浅发

酵)、第30 d(AUG-M,中发酵)、第60 d(AUG-H,深发酵)、混合化学肥料后(AUG-F1,添化肥)、造粒后(AUG-F2)分别采样,同时,采集堆肥旁边空地土壤;各采样点采用五点取样法,各取500 g,混合后共2500 g样本,放入冰箱保存备用。样品信息见表1。

(2)试剂仪器:芽孢杆菌采用LB培养基:胰蛋白胨10.0 g,酵母提取物5.0 g,氯化钠5.0 g, pH 7.2~7.4,琼脂15.0 g,水1.0 L。PCR扩增引物采用细菌通用16S rRNA引物27F(5'-GAG TTTGAT CCT GGC TCA G-3')和1492R(5'-ACG GCT ACCTTG TTA CGA CTT-3'),由上海生物工程有限公司合成。PCR反应试剂:Mix[含10×Buffer, dNTP(10 mmol·L⁻¹), Taq酶(2.5 U·μL⁻¹)](上海博尚生工生物工程技术服务有限公司),100 bp Marker(上海英骏生物技术有限公司)。DNA提取试剂:100 mmol·L⁻¹ NaCl, 10 mmol·L⁻¹ Tris/HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, Tris-saturated phenol, 氯仿。仪器:UVP GelDoc-It TS Imaging System凝胶成像仪、华粤行仪器有限公司Tpersonal Biometra梯度PCR仪、PowerPac Basic BIO-RAD电泳仪、离心机(Eppendorf Centrifuge 5418R)。

1.2 实验方法

1.2.1 芽孢杆菌分离

从各样本中取样10 g至90 mL的无菌水中,摇床30℃,170 r·min⁻¹振荡30 min充分混合,配成10%浓度的样本悬浮液;采用刘国红等^[24]加热筛选法加以改进,将悬浮液放置到80℃的水浴中加热10 min,杀死细菌菌体保存芽孢;采用张艳等^[25]活菌计数法加以改进,将样品梯度稀释后(10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵),涂布LB培养基的平板上,放置于30℃培养箱培养,2 d后观察培养皿上的菌落,根据菌落大小、形态、颜色对相同类型的菌落进行编号和计数,分离纯化不同编号的菌株,用16S rDNA基因对编号菌株进行种类鉴定,获得芽孢杆菌种类,排除非芽孢杆菌进行活菌数的统计。每个样本重复3次,分离纯化菌株采用-80℃甘油冷冻

表1 蔗糖压榨糖厂滤泥堆肥发酵生产生物有机肥过程样品信息

Table 1 Information of the samples in the process of sugar-refinery filtering mud composting fermentation to produce bio-organic fertilizers

处理 Treatments	编号 Number	样品描述 Sample description	样品位置 Sampling position	采集时间 Sampling time
浅发酵	AUG-L	糖厂滤泥堆肥发酵1 d,堆肥过程样品1	长丰生物有机肥有限公司堆肥槽1	2017-07-13
中发酵	AUG-M	糖厂滤泥堆肥发酵30 d,堆肥过程样品2	长丰生物有机肥有限公司堆肥槽2	2017-08-12
深发酵	AUG-H	糖厂滤泥堆肥发酵60 d,进入熟化原料库	长丰生物有机肥有限公司熟化原料库房	2017-09-11
添加化肥	AUG-F1	混合化学肥料后糖厂滤泥,准备造粒	长丰生物有机肥有限公司产品加工生产线边	2017-09-13
造粒产品	AUG-F2	混合化学肥料后糖厂滤泥,造粒后产品	长丰生物有机肥有限公司产品库房	2017-09-14
环境土壤	AUG-E	产品样品	长丰生物有机肥有限公司堆肥场地边环境土壤	2017-09-15

法进行保存,采用 Tris-饱和酚法提取芽孢杆菌基因组 DNA,采用通用细菌 16S rRNA 引物进行扩增、测序、鉴定。

1.2.2 芽孢杆菌种类鉴定

细胞悬浮液制备:于 1.5 mL EP 管中加入 400 μ L STE 缓冲液,用刮菌环从平板中刮取少量已纯化好的菌落,混匀。DNA 提取:1 mL 的细胞悬液在 8000 g 下离心 2 min,弃去上清液后用 400 μ L STE 缓冲液冲洗细胞两次,8000 g 离心 2 min,弃去上清液(若为平板,则 400 μ L STE 悬浮,离心,弃上清液)。用 200 μ L TE 缓冲液悬浮细胞,然后用 100 μ L 的 Tris-饱和酚(取下层)加到离心管中,涡旋混合 60 s(振荡用浮板)。在 4 $^{\circ}$ C 下 13 000 g 离心 5 min 以从有机相中分离出水相,取 160 μ L 上清液转移到干净的 1.5 mL EP 管中。加 40 μ L TE 缓冲液到 EP 管中,用 100 μ L 氯仿混合,4 $^{\circ}$ C 13 000 g 离心 5 min,用氯仿提取的方法纯化裂解,直到没有白色的界面出现,此过程重复 2~3 遍,每次直接往里加 100 μ L 氯仿,离心。取 160 μ L 上清液到干净的 1.5 mL EP 管中,再加 40 μ L TE 缓冲液在 37 $^{\circ}$ C 下放置 10 min,以分解 RNA。将 100 μ L 氯仿加到离心管中混匀后,在 4 $^{\circ}$ C 下 13 000 g 离心 5 min。将 150 μ L 上清液转移到干净的 1.5 mL EP 管中,此时的上清液包含有纯化的 DNA,且可以直接用于序列实验,并可在 -20 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应体系:ddH₂O:9.5 μ L、Mix:12 μ L、正向引物:1 μ L、反向引物:1 μ L、DNA:1.5 μ L;PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,10 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物检测:取 5 μ L PCR 产物,点样于 1% 的琼脂糖凝胶中,以 100 bp Marker 作为标准分子量,110 V 电压,电泳 30 min,用凝胶成像系统观察结果。测序:检测出有条带的菌株 PCR 产物送至铂尚生物技术有限公司进行测序。16S rRNA 序列分析:将所得序列在细菌序列比对网站 EZtaxon-e.ezbiocloud.net 上进行序列比对分析后,参照刘波等^[26]发表的芽孢杆菌属及其近缘属种名目录,标明中文名称。

1.2.3 糖厂滤泥发酵过程芽孢杆菌种群动态分析

(1)统计糖厂滤泥堆肥发酵过程各阶段(AUG-L-第 1 d 浅发酵,AUG-M-第 30 d 中发酵,AUG-H-第 60 d 深发酵,AUG-F1-复合化学肥料后,AUG-F2-添化肥造粒后)芽孢杆菌活菌总数,进行种群数量变化动态分析比较;(2)分析糖厂滤泥堆肥发酵过程各阶段芽孢杆菌不同种类和数量的结构变化,利用种类变

更率(%)(与上一阶段相同种类的个数/该阶段种类总个数),统计各阶段与上一个阶段相同种类芽孢杆菌变更的情况,如果该阶段与上阶段相同种类个数多,变更率就低,反之就高,分析种类结构变化的程度。(3)利用靠近发酵场地的本地土壤分离的芽孢杆菌种类与糖厂滤泥中分离的种类进行比较,分析糖厂滤泥堆肥发酵过程芽孢杆菌与本土芽孢杆菌的关系。

2 结果与分析

2.1 糖厂滤泥堆肥发酵过程芽孢杆菌种类鉴定

从糖厂滤泥堆肥发酵生产生物有机肥过程的 6 个样品中共分离到 64 株芽孢杆菌(表 2),分属于 7 个属,27 种,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)16 种、哈格瓦氏菌属(*Bhargavaea*)1 种、纤细芽孢杆菌属(*Gracilibacillus*)1 种、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)1 种、大洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)3 种、鸟氨酸芽孢杆菌属(*Ornithinibacillus*)2 种、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)2 种、枝芽孢杆菌属(*Virgibacillus*)1 种。芽孢杆菌属占有绝对优势。

2.2 糖厂滤泥堆肥发酵过程的芽孢杆菌种类系统发育及中国新纪录种的发现

在糖厂滤泥堆肥发酵加工过程中分离的芽孢杆菌可聚类为 4 类(见图 1),第 1 类主要类群是以芽孢杆菌属为主的种类,包含了 18 个种;第 2 类主要类群为大洋芽孢杆菌属、鸟氨酸芽孢杆菌属、枝芽孢杆菌属的种类,包含了 6 个种;第 3 类主要类群为赖氨酸芽孢杆菌属的种类,包含 1 个种;第 4 类主要为类芽孢杆菌属的种类,包含 2 个种。其中,有 6 种芽孢杆菌在国内未见报道,为我国新纪录种,它们是:(1)大豆发酵芽孢杆菌 *Bacillus glycinifermentans* (FJAT-47935、FJAT-47944、FJAT-47907),(2)外村尚芽孢杆菌 *Bacillus hisashii* (FJAT-47926),(3)科研中心哈格瓦氏菌 *Bhargavaea cecembensis* (FJAT-47948)(属于芽孢杆菌目、动球菌科、哈格瓦氏菌属),(4)苯乙酰赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus acetophenoni* (FJAT-47912、FJAT-47934、FJAT-47919),(5)巴伐利亚鸟氨酸芽孢杆菌 *Ornithinibacillus bavariensis* (FJAT-47915),(6)拾蛤鸟氨酸芽孢杆菌(*Ornithinibacillus scapharcae* FJAT-47951)。

2.3 糖厂滤泥堆肥发酵过程中芽孢杆菌数量与种群结构动态变化

糖厂滤泥堆肥发酵过程芽孢杆菌数量的动态变化,见图 2。在糖厂滤泥不同发酵加工阶段,可培养

表2 糖厂滤泥微生物肥料生物有机肥堆肥发酵过程芽孢杆菌分离鉴定

Table 2 Isolation and identification of the *Bacillus*-like species from the samples in the process of sugar-refinery filtering mud composting fermentation to produce bio-organic fertilizers

菌株编号 Strain	标准菌株 Standard strain	中文名称 Chinese name	相似性 Similarity/%
FJAT-47963, FJAT-47970	<i>Bacillus alitudinis</i> 41KF2b ^T	高地芽孢杆菌	100
FJAT-47965	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T	蜡样芽孢杆菌	100
FJAT-47924	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513 ^T	环状芽孢杆菌	100
FJAT-47917	<i>Bacillus farraginis</i>	混料芽孢杆菌	97.96
FJAT-47923	<i>Bacillus fortis</i> R-6514 ^T	强壮芽孢杆菌	99.72
FJAT-47937, FJAT-47962, FJAT-47969	<i>Bacillus galactosidilyticus</i> LMG 17892 ^T	解半乳糖苷芽孢杆菌	99.93
FJAT-47935, FJAT-47944, FJAT-47907	<i>Bacillus glycinifermentans</i> GO-13 ^T	大豆发酵芽孢杆菌	100
FJAT-47926	<i>Bacillus hisashii</i> N-11 ^T	外村尚芽孢杆菌	99.93
FJAT-47916, FJAT-47967	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 ^T	巨大芽孢杆菌	100
FJAT-47966, FJAT-47968	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 ^T	短小芽孢杆菌	99.86
FJAT-47930	<i>Bacillus selenatarsenatis</i> SF-1 ^T	硒砷芽孢杆菌	99.64
FJAT-47927, FJAT-47940, FJAT-47950	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 ^T	暹罗芽孢杆菌	99.93
FJAT-47910, FJAT-47938, FJAT-47971	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i> NCIB 3610 ^T	枯草芽孢杆菌	99.93
FJAT-47908, FJAT-47913, FJAT-47925, FJAT-47942, FJAT-47943, FJAT-47946, FJAT-47956, FJAT-47960	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 ^T	特基拉芽孢杆菌	99.93
FJAT-47914, FJAT-47921, FJAT-47922, FJAT-47936, FJAT-47945, FJAT-47958, FJAT-47961	<i>Bacillus thermotolerans</i> SGZ-8 ^T	耐温芽孢杆菌	99.86
FJAT-47964	<i>Bacillus thioparans</i> BMP-1 ^T	产硫芽孢杆菌	99.79
FJAT-47948	<i>Bhargavaea cecembensis</i> DSE10 ^T	科研中心哈格瓦氏菌	99.72
FJAT-47949	<i>Gracilibacillus dipsosauri</i> DD1 ^T	蜥蜴纤细芽孢杆菌	99.37
FJAT-47912, FJAT-47934, FJAT-47919	<i>Lysinibacillus acetophenoni</i> JC23 ^T	苯乙酮赖氨酸芽孢杆菌	99.72
FJAT-47909, FJAT-47911, FJAT-47928, FJAT-47929, FJAT-47941, FJAT-47952, FJAT-47954, FJAT-47955, FJAT-47957	<i>Oceanobacillus caeni</i> S-11 ^T	淤泥大洋芽孢杆菌	98.47
FJAT-47931	<i>Oceanobacillus halophilum</i> GD01 ^T	嗜盐大洋芽孢杆菌	99.39
FJAT-47932, FJAT-47947	<i>Oceanobacillus polygoni</i> SA9 ^T	蓼蓝大洋芽孢杆菌	99.58
FJAT-47915	<i>Ornithinibacillus bavariensis</i> WSBC 24001 ^T	巴伐利亚鸟氨酸芽孢杆菌	99.79
FJAT-47951	<i>Ornithinibacillus scapharcae</i> TW25 ^T	拾蛤鸟氨酸芽孢杆菌	99.58
FJAT-47953	<i>Paenibacillus harenae</i> B519 ^T	沙漠沙类芽孢杆菌	95.28
FJAT-47918	<i>Paenibacillus residui</i> MC-246 ^T	残渣类芽孢杆菌	99.93
FJAT-47939	<i>Virgibacillus oceani</i> MY11 ^T	海洋枝芽孢杆菌	99.79

芽孢杆菌数量差异显著($P < 0.01^{**}$),糖厂滤泥堆肥发酵初始阶段(AUG-L,浅发酵,1 d)芽孢杆菌总含量114万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$;随着发酵进程进入发酵中期(AUG-M,中发酵,30 d),总含量上升了107.89%,为237万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$;随着糖厂滤泥堆肥发酵腐熟进入深发酵阶段,总含量下降了84.13%,为37.6万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$;腐熟糖厂滤泥添加化肥混合后,芽孢杆菌数量有所回升,总含量为152万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$;经过圆盘造粒干燥后,产品中的芽孢杆菌数量大幅度下降到43万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

糖厂滤泥堆肥发酵过程中芽孢杆菌种群结构动态变化见图3。糖厂滤泥堆肥发酵初始阶段(AUG-

L,浅发酵,1 d)分离到8种芽孢杆菌,总含量为114万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$,优势种为*Bacillus glycinifermentans* FJAT-47935(大豆发酵芽孢杆菌)(36万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)和*Bacillus tequilensis* FJAT-47943(特基拉芽孢杆菌)(25万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$);其中,*Bacillus glycinifermentans* FJAT-47935为我国新纪录种。

糖厂滤泥堆肥发酵中期阶段(AUG-M,中发酵,30 d),堆堆发酵30 d,分离到10种芽孢杆菌,总含量为 $237 \times 10^4 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$,优势种为*Oceanobacillus polygoni* FJAT-47932(蓼蓝大洋芽孢杆菌)(128万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)和*Oceanobacillus halophilum* FJAT-47931(嗜盐大洋芽

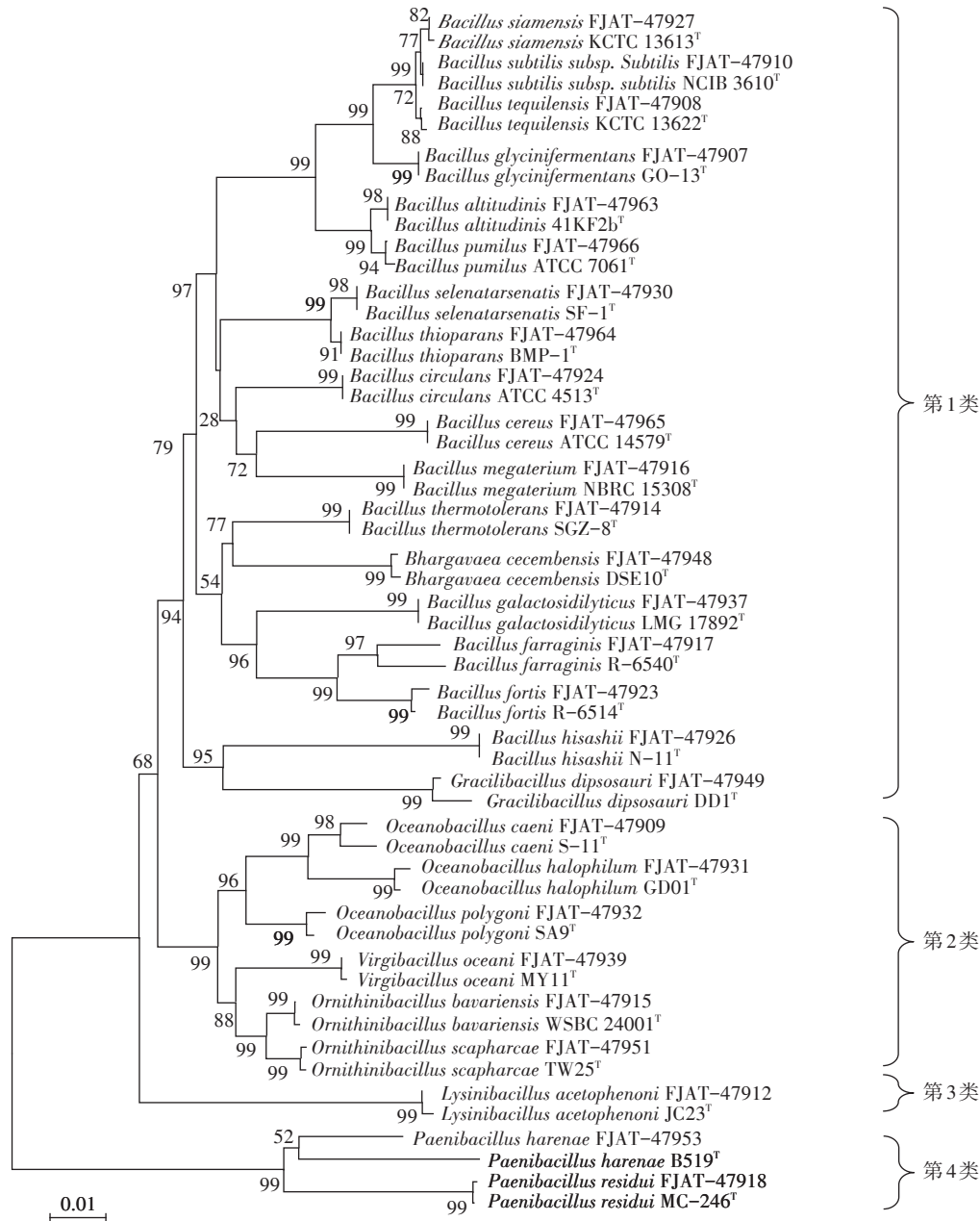


图1 基于16S rRNA基因序列的糖泥生物有机肥发酵过程芽孢杆菌系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of the *Bacillus*-like species from the samples in the process of sugar-refinery filtering mud composting fermentation to produce bio-organic fertilizers based on the 16S rRNA gene sequences

孢杆菌)(72万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$);其中, *Lysinibacillus acetophenoni* FJAT-47934(苯乙酮赖氨酸芽孢杆菌)为我国新纪录种。

糖厂滤泥堆肥发酵腐熟阶段(AUG-H,深发酵,60 d),堆垛发酵60 d,分离到6种芽孢杆菌,总含量为37.6万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$,优势种为 *Oceanobacillus caeni* FJAT-47952(淤泥大洋芽孢杆菌)(10.7万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)和 *Paenibacillus harenae* FJAT-47953(沙漠沙类芽孢杆菌)(10.2万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$);其中,3个种即 *Ornithinibacillus*

scapharcae FJAT-47951(拾蛤鸟氨酸芽孢杆菌)、*Bhargavaea cecembensis* FJAT-47948(科研中心哈格瓦氏菌)、*Bacillus glycinifermentans* FJAT-47944(大豆发酵芽孢杆菌)为我国新纪录种。

糖厂滤泥腐熟料混合化肥加工阶段(AUG-F1,添加化肥),堆垛发酵腐熟后,添加化肥成分(N:P:K=15%:5%:8%),造粒前分离到8种芽孢杆菌,总含量为152万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$,优势种为 *Oceanobacillus caeni* FJAT-47911(淤泥大洋芽孢杆菌)(43万 $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)和 *Bacillus*

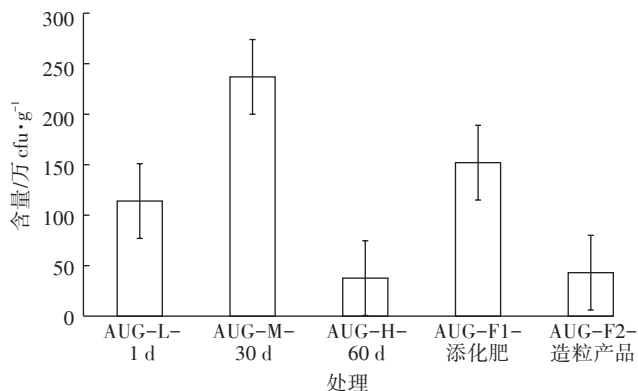


图2 糖厂滤泥堆肥发酵过程芽孢杆菌种群数量变化动态

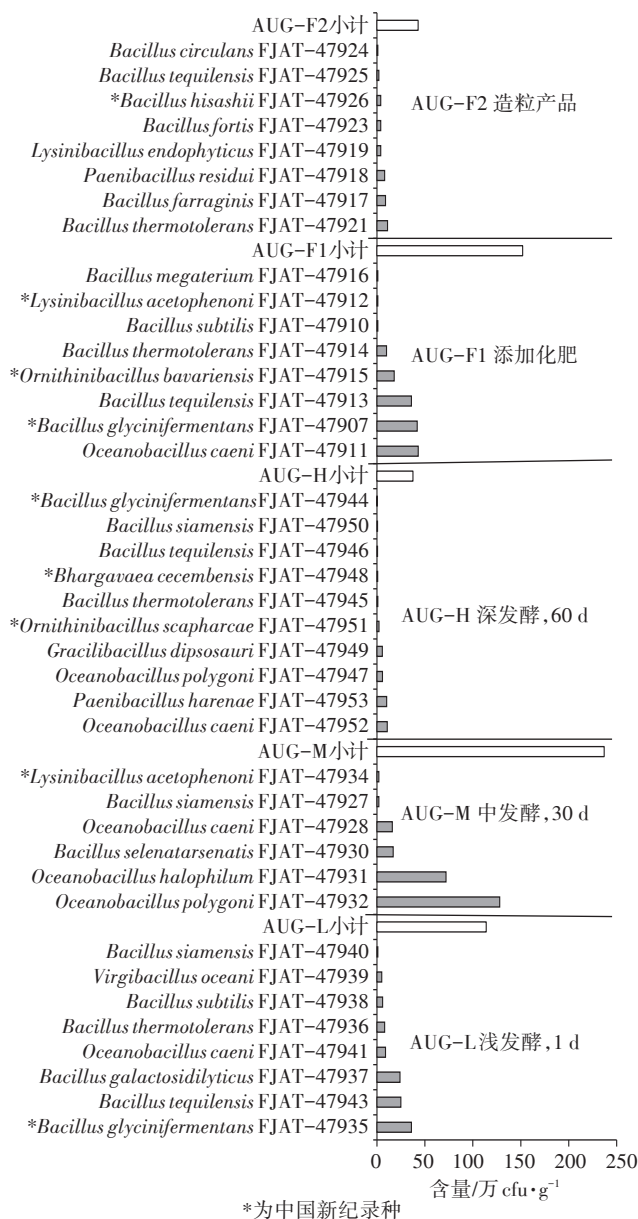
Figure 2 Dynamic changes in population quantity of the *Bacillus*-like species in the samples in the process of sugar-refinery filtering mud composting fermentation

glycinifermentans FJAT-47907(大豆发酵芽孢杆菌)(42万 cfu·g⁻¹);其中3个种,即 *Bacillus glycinifermentans* FJAT-47907(大豆发酵芽孢杆菌)、*Ornithinibacillus bavariensis* FJAT-47915(巴伐利亚鸟氨酸芽孢杆菌)、*Lysinibacillus acetophenoni* FJAT-47912(苯乙酰赖氨酸芽孢杆菌)为我国新纪录种。

糖厂滤泥腐熟料造粒加工阶段(AUG-F2,造粒产品),堆垛发酵腐熟后,添加化肥,进行圆盘造粒,从造粒产品中分离到8种芽孢杆菌,总含量为43万 cfu·g⁻¹,优势种为 *Bacillus thermotolerans* FJAT-47921(耐高温芽孢杆菌)(11万 cfu·g⁻¹)和 *Bacillus farraginis* FJAT-47917(混料芽孢杆菌)(9万 cfu·g⁻¹);其中, *Bacillus hisashii* FJAT-47926(外村尚芽孢杆菌)为我国新纪录种。

2.4 糖厂滤泥堆肥发酵过程芽孢杆菌与本土芽孢杆菌关系

实验结果见表3。从糖厂滤泥堆肥发酵堆场周围土壤中分离到芽孢杆菌7种,总含量为215万 cfu·g⁻¹,优势种为 *Bacillus pumilus* FJAT-47966(短小芽孢杆菌)(65万 cfu·g⁻¹)和 *Bacillus galactosidilyticus* FJAT-47969(解半乳糖苷芽孢杆菌)(41万 cfu·g⁻¹),未发现我国新纪录种。本地土壤样品中的短小芽孢杆菌、高地芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、产硫芽孢杆菌在糖厂滤泥堆肥发酵过程未发现,而解半乳糖苷芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌,可以在糖厂滤泥堆肥发酵加工过程中看到;糖厂滤泥中的许多芽孢杆菌,在本地土壤中未分离到,本土芽孢杆菌对糖厂滤泥堆肥发酵的影响较小,其发酵过程中出现的芽孢杆菌主要来源于自带种类。



*为中国新纪录种

*means a *Bacillus*-like species is the new record species in China

图3 糖厂滤泥堆肥发酵过程芽孢杆菌种类结构变化动态

Figure 3 Dynamic changes in population structure of the *Bacillus*-like species in the samples in the process of sugar-refinery filtering mud composting fermentation

3 讨论

近年来,糖厂滤泥用于生产生物有机肥成为资源化趋势。刘忠等^[27]进行蔗田土壤有机质平衡预测,为甘蔗生产中合理使用甘蔗残体、糖厂滤泥和酒精废液,提高土壤肥力及甘蔗产量提供依据。蒙炎成等^[28]研究了糖厂滤泥对蔗田土壤微生物数量的影响,结果表明处理后1个月,滤泥和酒精发酵液处理土壤细菌总数均达到最大值;处理后2个月,滤泥处理土壤放

表3 糖厂滤泥堆肥发酵堆场周围土壤土芽孢杆菌种类分离鉴定
Table 3 Isolation and identification of the *Bacillus*-like species in the soil samples around the sugar-refinery filtering mud composting fermentation yard

土样编号 Soil number	拉丁文学名 Latin name of the <i>Bacillus</i> -like species	菌株编号 Strain number	中文名称 Latin name of the <i>Bacillus</i> -like species	含量/ $\times 10^4$ cfu·g ⁻¹ Population quantity
AUG-E 环境土壤	<i>Bacillus altitudinis</i>	FJAT-47963	高地芽孢杆菌	36
	<i>Bacillus thioparans</i>	FJAT-47964	产硫芽孢杆菌	22
	<i>Bacillus cereus</i>	FJAT-47965	蜡样芽孢杆菌	12
	<i>Bacillus pumilus</i>	FJAT-47966	短小芽孢杆菌	65
	<i>Bacillus megaterium</i>	FJAT-47967	巨大芽孢杆菌	36
	<i>Bacillus galactosidilyticus</i>	FJAT-47969	解半乳糖苷芽孢杆菌	41
	<i>Bacillus subtilis</i>	FJAT-47971	枯草芽孢杆菌	3
	总计			215

线菌总数达到最大值;处理后3个月,土壤丝状真菌总数达到最大值;说明糖厂滤泥对提高蔗田土壤微生物数量有显著的促进作用。谢少兰^[29]报道了利用糖厂滤泥挤压造粒生产有机无机复混肥的工艺技术,产品的农田试验获得较好效果,利用滤泥和蔗灰作为有机质,掺合适量的氮、磷、钾,制成滤泥(蔗灰)复混肥料,农田试验证明,对农作物有增产效果,已被当地的蔗农所认识。然而,糖厂滤泥料堆肥发酵生产微生物肥过程芽孢杆菌种群变化动态的研究未见报道。

糖厂滤泥堆肥发酵生产生物有机肥过程中芽孢杆菌种类比较丰富。本研究分离到7属27种芽孢杆菌,在这些芽孢杆菌中,发现6种国内未见报道的芽孢杆菌,它们是:(1)*Bacillus glycinifermentans* FJAT-47935、FJAT-47944、FJAT-47907(大豆发酵芽孢杆菌),由韩国学者Kim等^[30]从大豆发酵物中分离的芽孢杆菌新种;(2)*Bacillus hisashii* FJAT-47926(外村尚芽孢杆菌),由日本学者Nishida等^[31]从取食高温堆肥发酵物的无菌老鼠的盲肠中分离的芽孢杆菌新种;(3)*Bhargavaea cecembensis* FJAT-47948(科研中心哈格瓦氏菌),由印度学者Manorama等^[32]从印度洋查戈斯-拉克代夫海岭深5904 m沉积物中分离的哈格瓦氏菌属新种,属于芽孢杆菌目、动球菌科;(4)*Lysinibacillus acetophenoni* FJAT-47912、FJAT-47934、FJAT-47919(苯乙酰赖氨酸芽孢杆菌),由Azmatunnisa等^[33]从有机溶剂乙酰苯中分离的赖氨酸芽孢杆菌新种;(5)*Ornithinibacillus bavariensis* FJAT-47915(巴伐利亚鸟氨酸芽孢杆菌),由德国学者Mayr等^[34]从德国巴伐利亚州巴氏消毒牛奶中分离,建立鸟氨酸芽孢杆菌新属的模式种;(6)*Ornithinibacillus scapharcae* FJAT-47951(拾蛤鸟氨酸芽孢杆菌新),由韩国学者

Shin等^[35]从死蛤上分离出的鸟氨酸芽孢杆菌属新种;这些芽孢杆菌为我国芽孢杆菌新纪录种。

糖厂滤泥堆肥发酵过程芽孢杆菌种群动态的研究表明,糖厂滤泥堆肥发酵初期,自带丰富的芽孢杆菌种群,包括了8种芽孢杆菌,总含量达114万cfu·g⁻¹,达到常规接菌的水平。经过30 d发酵,芽孢杆菌数量上升达到高峰,种类下降为6种,除了*Bacillus siamensis* FJAT-47940与前一期发酵相同外,其余种类不同,种类变更率83%;含量与堆肥发酵初期比上升了107.89%,达237万cfu·g⁻¹;经过60 d堆肥腐熟,芽孢杆菌数量大幅度下降,与前一期发酵相比,数量下降了84.13%,为37.6万cfu·g⁻¹,虽然数量下降,但种类上升为10种,除了*Oceanobacillus caeni* FJAT-47952、*Oceanobacillus polygona* FJAT-47947、*Bacillus siamensis* FJAT-47950相同外,其余种类不同,种类变更率70%,物料腐熟过程另外一批芽孢杆菌种群占优势;到了添加化肥阶段,添加化肥成分N:P:K=15%:5%:8%,添加化肥后,产品造粒加工过程工序在混合槽内存放1~2 d,此时,芽孢杆菌数量有所回升,总含量为152万cfu·g⁻¹,种类有所下降,为8种,其中除了*Oceanobacillus caeni* FJAT-47911、*Bacillus tequilensis* FJAT-47913、*Bacillus thermotolerans* FJAT-47914以外,其余种类不同,种类变更率达62%;进入圆盘造粒阶段,混合物料经过圆盘造粒,烘干、包装等工序生产出产品,此时,芽孢杆菌数量大幅度下降,总含量为43万cfu·g⁻¹,种类为8种,除了*Bacillus thermotolerans* FJAT-47921、*Lysinibacillus endophyticus* FJAT-47919、*Bacillus tequilensis* FJAT-47925外,其余种类不同,种类变更率为62%。

作者首次揭示了糖厂滤泥堆肥发酵、生物有机肥

加工过程芽孢杆菌种群结构发生较大变化;糖厂滤泥堆肥发酵全过程不外加芽孢杆菌接种剂,自带的芽孢杆菌能发挥作用,数量变化范围在-80%~+100%;种类的变更率在62%~84%,即不同堆肥加工阶段芽孢杆菌种类大部分不相同,尽管堆肥发酵过程有些阶段芽孢杆菌含量较高(如堆肥发酵中期芽孢杆菌数量达237万 cfu·g⁻¹),但在最终复合生物肥料产品中芽孢杆菌总含量仅为43万 cfu·g⁻¹。同时,这些芽孢杆菌与本地土壤芽孢杆菌关系不大,主要是由自身原料携带的种类;堆肥加工过程,那些适应堆肥物料变化的种类生长起来,不适应的被淘汰,不同芽孢杆菌通过对堆肥物料适应,其选择了相应的优势生态位。因而,在糖厂滤泥堆肥发酵时,自身的营养成分和生长条件(湿度、通气、pH、温度等)选择了自带的足够丰富的芽孢杆菌种群,外加芽孢杆菌菌种的必要性值得讨论。在生产复合生物肥料时,添加芽孢杆菌菌种进入产品,是否能提升产品的芽孢杆菌含量值得讨论,要看芽孢杆菌对物料适应性和加工过程的适应性,才能形成有效芽孢杆菌种群。

4 结论

糖厂滤泥堆肥发酵、添加加工过程芽孢杆菌种群结构发生较大变化,数量变化范围在-80%~+100%;种类的变更率在62%~84%。

糖厂滤泥堆肥发酵的芽孢杆菌主要来至自身携带的种类,本地土壤芽孢杆菌关系不大。尽管堆肥发酵过程有些阶段芽孢杆菌含量较高(如堆肥发酵中期芽孢杆菌数量达237万 cfu·g⁻¹),但在最终复合生物肥料产品中芽孢杆菌总含量仅为43万 cfu·g⁻¹。

糖厂滤泥堆肥发酵,分离到7属27种芽孢杆菌,在这些芽孢杆菌中,发现6种国内新纪种,它们是:(1)*Bacillus glycinifermentans*(大豆发酵芽孢杆菌),(2)*Bacillus hisashii* FJAT-47926(外村尚芽孢杆菌),(3)*Bhargavaea cecembensis* FJAT-47948(科研中心哈格瓦氏菌),(4)*Lysinibacillus acetophenoni*(苯乙酮赖氨酸芽孢杆菌),(5)*Ornithinibacillus bavariensis*(巴伐利亚鸟氨酸芽孢杆菌),(6)*Ornithinibacillus scapharcae*(拾蛤鸟氨酸芽孢杆菌新)。

参考文献:

[1] 蒙世协, 杨 锋, 王 城, 等. 亚硫酸法糖厂滤泥生土熟化改良试验研究[J]. 广西糖业, 2017(4): 17-21.
MENG Shi-xie, YANG Feng, WANG Cheng, et al. Study on calcareous soil amelioration with filtered sludge of sugar refinery[J]. *Guangxi Sug-*

ar Industry, 2017(4): 17-21.
[2] 谭宏伟, 周柳强, 谢如林, 等. 蔗糖生产中的有机废弃物资源化利用研究[J]. 大众科技, 2016, 18(5): 110-112.
TAN Hong-wei, ZHOU Liu-qiang, XIE Ru-lin, et al. Application of organic discarded goods in cane sugar production[J]. *Popular Science and Technology*, 2016, 18(5): 110-112.
[3] Kumar R, Verma D, Singh B L, et al. Composting of sugar-cane waste by-products through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(17): 6707-6711.
[4] Pérez C, Falero A, Hung B R, et al. Bioconversion of phytosterols to androstanes by mycobacteria growing on sugar cane mud[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2005, 32(3): 83-86.
[5] Rocky-Salimi K, Hashemi M, Safari M, et al. Valorisation of untreated cane molasses for enhanced phytase production by *Bacillus subtilis* K46b and its potential role in dephytinisation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(1): 222-229.
[6] Veana F, Martínez-Hernández J L, Aguilar C N, et al. Utilization of molasses and sugar cane bagasse for production of fungal invertase in solid state fermentation using *Aspergillus niger* GH1[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014, 45(2): 373-377.
[7] Poopathi S, Mani C, Rajeswari G. Potential of sugarcane bagasse (agro-industrial waste) for the production of *Bacillus thuringiensis israelensis* [J]. *Tropical Biomedicine*, 2013, 30(3): 504-515.
[8] Techapun C, Poosaran N, Watanabe M, et al. Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulase-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(3): 298-301.
[9] 谭宏伟. 糖厂滤泥发酵制成生物有机肥[J]. 南方农业学报, 2017, 48(3): 428-432.
TAN Hong-wei. Bio-organic fertilizer made through fermentation of filter mud from sugar refinery[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2017, 48(3): 428-432.
[10] 左见军, 印华亮, 王威威, 等. 甘蔗糖厂滤泥的资源化利用分析[J]. 企业科技与发展, 2014(14): 19-21.
ZUO Jian-jun, YIN Hua-liang, WANG Wei-wei, et al. The comprehensive utilization of byproducts and wastes in cane sugar industry[J]. *Enterprise Science and Technology & Development*, 2014(14): 19-21.
[11] 刘晓举, 陈宝娣, 郭继强. 利用糖厂滤泥生产根瘤菌菌剂[J]. 大连工业大学学报, 2013, 32(3): 187-190.
LIU Xiao-ju, CHEN Bao-di, GUO Ji-qiang. Production of rhizobia inoculant using sugar mill filter mud[J]. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2013, 32(3): 187-190.
[12] 黄 飒, 欧宗喜. 碳酸法糖厂滤泥在甘蔗种植应用上的探索[J]. 广西蔗糖, 2012(2): 20-25.
HUANG Sa, OU Zong-xi. Application of carbonate sugar mill filter on sugar cane planting[J]. *Guangxi Sugarcane & Canesugar*, 2012(2): 20-25.
[13] 虎玉森, 王兴民. 糖厂滤泥中肥效成分的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 1998(1): 87-89.
HU Yu-sen, WANG Xing-min. Study on fertilizer effective components in filter mud of sugar mill[J]. *Journal of Gansu Agricultural Uni-*

- versity, 1998(1):87-89.
- [14] Wang X, Selvam A, Lau S S S, et al. Influence of lime and struvite on microbial community succession and odour emission during food waste composting[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 18 (247): 652-659.
- [15] Zhong X Z, Ma S C, Wang S P, et al. A comparative study of composting the solid fraction of dairy manure with or without bulking material: Performance and microbial community dynamics[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 21(247):443-452.
- [16] Zhao X, He X, Xi B, et al. Response of humic-reducing microorganisms to the redox properties of humic substance during composting[J]. *Waste Manag*, 2017, 16(9):56-68.
- [17] 王守红, 朱凌云, 徐 荣, 等. 菌剂添加对牛粪堆肥氮素变化及腐熟度影响[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(4):1-5.
WANG Shou-hong, ZHU Ling-yu, XU Rong, et al. Nitrogen changes and maturity of cow manure composting influenced by microbial inoculum[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*. 2017, 44(4):1-5.
- [18] 赵利超, 余从田, 黄晓风, 等. 奶牛粪酸臭成分分解过程中微生物群落变化的研究[J]. 微生物学报, 2017, 57(6):1-9.
ZHAO Li-chao, YU Cong-tian, HUANG Xiao-feng, et al. Study on microbial community changes during the degradation of dairy manure acid components[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6):1-9.
- [19] 徐大兵, 佘国涵, 徐祥玉, 等. 辅以多黏类芽孢杆菌堆肥提取液工艺及其对土壤微生物群落结构的影响[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(4):634-639.
XU Da-bing, LÜ Guo-han, XU Xiang-yu, et al. The technology research of pig manure compost extracts combined paenibacillus polymyxa and its influence on soil microbial community structure[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2017, 56(4):634-639.
- [20] 李敬波. 牛粪堆肥过程中优势菌群变化及复合菌剂制备[D]. 大连:大连理工大学, 2014.
LI Jing-bo. Changes of dominant microbiota during cattle manure composting and preparation of a microbial inoculant for composting [D]. Dalian:Dalian University of Technology, 2014.
- [21] 肖 勇. 基于分子生物学技术的堆肥微生物群落、功能与应用研究[D]. 长沙:湖南大学, 2011.
XIAO Yong. Researches on the communities, functions and applications of microorganisms in compost based on molecular biological techniques[D]. Changsha:Hunan University, 2011.
- [22] Logan N A, Berge O, Bishop A H, et al. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 2114-2121.
- [23] 刘国红, 刘 波, 王阶平, 等. 芽孢杆菌分类与应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(4):949-958.
LIU Guo-hong, LIU Bo, WANG Jie-ping, et al. Advances in taxonomy and Application of *Bacillus*[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(4): 949-958.
- [24] 刘国红, 刘 波, 车建美, 等. 新疆伊犁马铃薯根际芽孢杆菌纯培养多样性[J]. 生物多样性, 2017, 25(8):856-863.
LIU Guo-hong, LIU Bo, CHE Jian-mei, et al. Diversity of *Bacillus*-like species isolated from potato rhizosphere soils in Yili, Xinjiang[J]. *Biodiversity Science*, 2017, 25(8):856-863.
- [25] 张 艳, 刘均娥, 张 晶, 等. 平板活菌计数法检测粪便中的肠道菌群[J]. 首都医科大学学报, 2008(1):85-86.
ZHANG Yan, LIU Jun-e, ZHANG Jing, et al. Viable counting method for detecting intestinal flora in feces[J]. *Journal of Capital Medical University*, 2008(1):85-86.
- [26] 刘 波, 王阶平, 陶天申, 等. 芽孢杆菌属及其近缘属种名目录[J]. 福建农业学报, 2015, 30(1):38-59.
LIU Bo, WANG Jie-ping, TAO Tian-shen, et al. List of species name for the *Aacillus*-like bacteria[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30(1):38-59.
- [27] 刘 忠, 唐其展, 陈桂芬, 等. 蔗田土壤有机质平衡预测[J]. 南方农业学报, 2013, 44(1):87-91.
LIU Zhong, TANG Qi-zhan, CHEN Gui-fen, et al. Forecast of soil organic matter balance in sugarcane field[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2013, 44(1):87-91.
- [28] 蒙炎成, 唐其展, 刘 忠, 等. 糖厂滤泥、酒精发酵液对蔗田土壤微生物数量的影响研究[J]. 广西农业科学, 2009, 40(10):1323-1330.
MENG Yan-cheng, TANG Qi-zhan, LIU Zhong, et al. Effects of filter mud and vinasse from sugar factory on quantity of soil microorganism in sugarcane field[J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2009, 40(10): 1323-1330.
- [29] 谢少兰. 挤压造粒生产有机无机复混肥的工艺技术[J]. 磷肥与复肥, 2010, 25(4):52-54.
XIE Shao-lan. Technology of organic-inorganic compound fertilizer production by extruding granulation[J]. *Phosphate & Compound Fertilizer*, 2010, 25(4):52-54.
- [30] Kim S J, Dunlap C A, Kwon S W, et al. *Bacillus glycinifermentans* sp. nov., isolated from fermented soybean paste[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(10):3586-3590.
- [31] Nishida A, Miyamoto H, Horiuchi S, et al. *Bacillus hisashii* sp. nov., isolated from the caeca of gnotobiotic mice fed with thermophile-fermented compost[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(11):3944-3949.
- [32] Manorama R, Pindi P K, Reddy G S, et al. *Bhargavaea cecembensis* gen. nov., sp. nov., isolated from the Chagos-Laccadive ridge system in the Indian Ocean[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(10):2618-2623.
- [33] Azmatunnisa M, Rahul K, Lakshmi K V, et al. *Lysinibacillus acetophenoni* sp. nov. a solvent-tolerant bacterium isolated from acetophenone [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt 6):1741-1750.
- [34] Mayr R, Busse H J, Worliczek H L, et al. *Ornithinibacillus* gen. nov., with the species *Ornithinibacillus bavariensis* sp. nov. and *Ornithinibacillus californiensis* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006, 56(6):1383-1389.
- [35] Shin N R, Whon T W, Kim M S, et al. *Ornithinibacillus scapharcae* sp. nov., isolated from a dead ark clam[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2012, 101(1):147-154.