

张喜庆, 勾长龙, 娄玉杰, 等. 高效纤维素分解菌的分离鉴定及堆肥效果研究[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(2):380-386.

ZHANG Xi-qing, GOU Chang-long, LOU Yu-jie, et al. Isolation and identification of a cellulolytic bacterium and its composting application[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(2):380-386.

高效纤维素分解菌的分离鉴定及堆肥效果研究

张喜庆¹, 勾长龙¹, 娄玉杰^{1,2}, 徐佳萍³, 高云航^{1*}

(1.吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 2.吉林农业大学动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 长春 130118; 3.中国农业科学院特产研究所, 长春 130112)

摘要:采用 CMC-Na 平板法和刚果红染色法从自然发酵的牛粪中分离获得高效纤维素分解菌, 通过形态学观察、生化试验及 16S rDNA 分子生物学对菌株进行鉴定, 采用单因素法确定菌株的最佳培养条件, 最后接种牛粪进行堆肥发酵观测其效果。结果表明: 获得的菌株 Y2 鉴定为枯草芽孢杆菌; 经产酶条件优化后, 菌株 Y2 的滤纸酶活力(FPA)为 15.83 U·mL⁻¹, 羧甲基纤维素酶活力(CMCA)高达 100.81 U·mL⁻¹, 分别是优化前的 1.3、2.76 倍。堆肥试验结果表明: 接种 Y2 组和 EM 菌剂组均在第 3 d 进入高温期(>50℃), 且高温期分别维持了 9 d 和 8 d; 接种 Y2 组纤维素降解率达到 42%, 而 EM 菌剂组为 35%, 接种无菌水组只有 10.5%。菌株 Y2 在堆肥发酵方面具有较大的应用潜力。

关键词:纤维素降解菌; 筛选鉴定; 产酶条件优化; 堆肥发酵

中图分类号: X71 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2016)02-0380-07 doi:10.11654/jaes.2016.02.024

Isolation and identification of a cellulolytic bacterium and its composting application

ZHANG Xi-qing¹, GOU Chang-long¹, LOU Yu-jie^{1,2}, XU Jia-ping³, GAO Yun-hang^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Key Laboratory of Animal Production, Product Quality and Security, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China; 3. Institute of Special Animal and Plant Sciences of CAAS, Changchun 130112, China)

Abstract: Composting is a good approach to utilizing agricultural organic wastes. Supplying microorganisms could shorten composting period and improve compost quality. In this study, a cellulose-decomposing strain was isolated from natural composting manure by using congo red staining and CMC-Na plate method. The strain was identified according to morphological observation, biochemical testing and 16S rDNA gene sequence. The optimal fermentation conditions were also determined by using single factor and orthogonal experiment. Finally, the isolate was inoculated into cattle manure to test its effect. The strain Y2 was identified as *Bacillus subtilis*; Its FPA and CMCA were 15.83 U·mL⁻¹ and 100.81 U·mL⁻¹, 1.3 times and 2.76 times higher than originals, respectively. Compost inoculated with Y2 and EM microbial agents reached high temperature after 3 d, with high temperature maintained for 9 d and 8 d, respectively. The degradation rate of cellulose was 42% for Y2 group, while it was 35% for EM microbial agent and 10.5% for sterile water. Therefore, strain Y2 has a great potential to be applied to composting fermentation.

Keywords: cellulose decomposing bacterium; screening and identification; optimized conditions; composting

收稿日期: 2015-07-18

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项“牛场环境控制与废弃物处理技术”(CARS-38); 2013年公益性行业(农业)科研专项“牛场废弃物处理利用技术模式集成与示范”(201303091); 吉林省青年科研基金项目(20130522092JH)

作者简介: 张喜庆(1992—), 男, 吉林集安人, 硕士研究生, 从事动物疫病防治研究。E-mail: zhangxiqing1020@163.com

* 通信作者: 高云航 E-mail: gaoyunhang@163.com

在中国,畜禽粪便是农业废弃物的主要来源之一,每年产生的粪便量超过3亿t^[1]。大量的畜禽粪便如不经有效处理,会造成严重的环境污染。目前,堆肥发酵被认为是实现有机废弃物资源化利用的理想途径之一^[2],该方法既可以有效杀灭粪便中的病原菌、消除恶臭,使粪便达到无害化,又可以将粪便中的有机物生物转化为可被植物吸收的小分子物质,使粪便达到肥料化^[3]。然而传统的自然堆肥发酵周期长、腐熟程度低,已远远不能满足粪便资源化处理的需要。近年来,一些研究证明在堆肥过程中接种外源微生物既可以缩短堆肥周期,又可以提高堆肥质量。沈根祥等^[4]在牛粪和秸秆的堆肥中接种外源微生物,结果显示比自然堆肥提前10d达到腐熟;李玉红等^[5]在牛粪和玉米秸秆的堆肥中接种外源微生物菌剂,结果表明添加菌剂可以使堆肥的高温期延长3~4d;Jiang等^[6]在牛粪和麦秆的堆肥中接种氮转化菌剂,结果显示氮损失达到最低,总氮含量增加了36.1%。然而堆料中木质纤维素难降解的问题仍是限制堆肥腐熟的关键问题。因此,本研究从自然发酵的牛粪中筛选出高效纤维素分解菌,优化其产酶条件,并接种于牛粪进行堆肥发酵,研究其对堆肥温度及堆肥质量的影响,以便开发出具有应用价值的微生物接种剂,为促进堆肥腐熟提供优良的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用牛粪来源于吉林农业大学牛场自然腐熟的牛粪。

1.2 培养基

NA培养基、羧甲基纤维素钠培养基、产酶发酵培养基均参照勾长龙^[7]方法配制。

1.3 菌株的筛选与鉴定

采用羧甲基纤维素钠平板法和刚果红染色法^[8]筛选出具有纤维素分解能力的菌株,并测量菌落直径(D)和水解圈直径(d)。

1.4 酶活力测定

参照江国忠^[8]介绍的方法对菌株的滤纸酶活力(FPA)和羧甲基纤维素酶活力(CMCA)进行测定。

1.5 形态学鉴定

筛选出纤维素分解能力较强的菌株(Y2),为确定菌株菌属,对其进行菌落形态和培养特征观察,并进行革兰氏染色、芽孢染色鉴定,同时进行生化试验鉴定。

1.6 16S rDNA 鉴定

细菌DNA提取按参考文献[9]进行。以提取菌株的基因组为模板,用细菌16S rDNA通用引物进行PCR扩增,PCR产物经纯化后连接至pMD-18T转化到DH5 α 大肠杆菌中,将提取重组质粒送至生工生物公司进行序列测定。所得序列与GenBank数据库中序列进行Blast比对分析,利用MEGA6.0构建系统进化树,根据菌株间的亲缘关系确定菌株的种属。

1.7 产酶条件优化

1.7.1 种子液制备

将Y2的菌种接种到发酵培养基中,置于振荡培养箱中28℃、160 r·min⁻¹振荡培养2d,制成种子液备用。

1.7.2 不同因素对菌株Y2酶活的影响

保持培养基中其他成分不变,设定以下条件:碳源,羧甲基纤维素钠、微晶纤维素、淀粉、秸秆、麸皮;氮源,牛肉膏、酵母粉、蛋白胨、硫酸铵、酵母粉和蛋白胨混合物、尿素。分别在初始pH值5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,温度25、28、33、37、40℃,将种子液以2%的接种量接入发酵培养基中,28℃、160 r·min⁻¹振荡培养2d,测定酶活力;按不同接种量(2%、4%、6%、8%、10%)接入培养基中28℃、160 r·min⁻¹振荡培养2d,测定酶活力;将种子液以2%的接种量接入发酵培养基中,28℃、160 r·min⁻¹分别振荡培养24、48、72、96、120h,测定酶活力。

1.8 堆肥试验

1.8.1 堆肥物料

堆肥物料为牛粪和稻壳(表1)。牛粪取自吉林农业大学牛场,稻壳取自吉林农业大学养殖基地。菌株Y2,有效活菌数调制为 $\geq 10^8$ 个·mL⁻¹;EM菌剂购于河南省鹤壁市人元生物技术发展有限公司。

表1 堆肥材料基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of composting materials

原料	含水率/%	有机碳/%	全氮/%	C/N	pH
牛粪	80.12	30.81	1.43	21.54	7.68
稻壳	11.56	41.25	0.78	52.88	—

1.8.2 试验设计

试验共设A、B、C3组(每组3个重复)。每组均用新鲜牛粪与稻壳按体积比6:4进行配比,C/N调节至25~30之间,水分控制在55%左右,其中A组按体积比接种0.5%的Y2,B组接种0.5%的EM菌剂,空白

组接种 0.5% 的无菌水。充分混匀后装入容积 10 L 的泡沫箱中, 每 3 d 翻堆一次。每天上午 9:00 和下午 16:00 进行温度测定, 以测定的平均值作为当天的温度值。

1.9 纤维素降解率的测定

纤维素降解率的测定参照刘旭^[10]的测定方法。

1.10 数据处理

试验数据采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件进行整理和统计, 用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析, 用邓肯氏新复极差测验法 (Duncan's Multiple Range Test, DMRT 法) 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

经过 CMC-Na 平板法和刚果红染色法初步筛选, 挑取 6 株菌落直径与水解圈直径比值 (D/d) 较大的菌株 (图 1) 进行复筛。

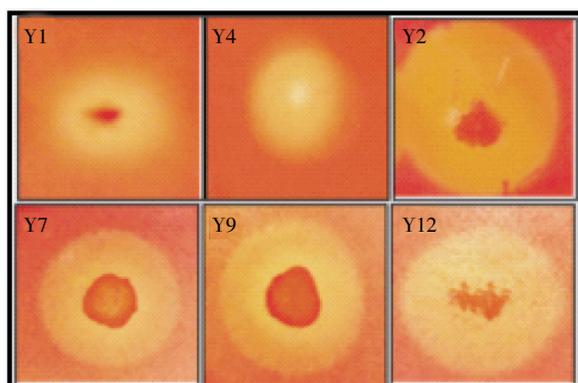


图 1 菌株在筛选平板上的水解圈

Figure 1 Clear hydrolytic zone on screening plate

将初筛获得的 6 株菌进行酶活力测定 (表 2)。结果显示菌株 Y2 的 FPA ($12.15 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 CMCA ($36.57 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 均显著高于其他菌株的酶活力, 且差异显著 ($P < 0.05$), 结合初筛 D/d 值, 选取菌株 Y2 进行后续试验。

2.2 菌株 Y2 的鉴定

菌株 Y2 的形态学鉴定结果如图 2 所示。在 NA 培养基上的呈灰白色, 表面多褶皱, 干燥不透明, 边缘不整齐。革兰氏染色阳性, 显微镜下观察菌体呈长杆状; 孔雀石绿染色芽孢呈绿色, 芽孢在菌体的中央位置, 属于中间芽孢体, 营养体呈红色。

生化试验结果如表 3。结合菌体形态和培养特征的观察, 初步判断菌株 Y2 为芽孢杆菌属。

表 2 菌株酶活力测定结果

Table 2 Results of enzyme activities of strains

菌株编号	FPA/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	CMCA/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
Y1	4.32±0.98C	20.68±1.55d
Y2	12.15±1.23A	36.57±1.33a
Y4	5.77±3.12C	31.22±2.89b
Y7	7.29±1.08BC	13.55±3.45e
Y9	10.01±1.25B	31.09±3.68b
Y12	9.58±2.07B	26.53±2.42c

注: 同列不同大写字母代表 FPA 差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母代表 CMCA 差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: Different capital letters within a column mean significant difference for FPA ($P < 0.05$), different small letters represent significant difference for CMCA ($P < 0.05$). The same below.

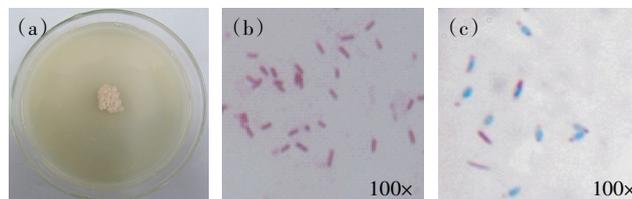


图 2 菌株 Y2 的菌落形态(a)、革兰氏染色(b)、芽孢染色(c)

Figure 2 Colony morphology(a), Gram staining(b), spore staining(c) of strain Y2

表 3 Y2 菌株的生理生化试验结果

Table 3 Physical and biochemical properties of strain Y2

测试项目 Test item	Y2	测试项目 Test item	Y2
D-葡萄糖 D-Glucose	+	淀粉水解 Starch hydrolysis	+
蔗糖 Sucrose	+	明胶液化 Hydrolysis of gelatin	+
甘露糖 Mannose	+	接触酶 Catalase	+
D-甘露醇 D-mannitol	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	-
甲基红 Methyl red	+	脂酶 Lipase	+
V-P 试验 V-P text	+	硫化氢 H_2S production	-
吲哚实验 IPA text	-	柠檬酸盐 Citrate solution	+
反硝化反应 Denitrification reaction	+	尿酶反应 Urinary enzyme reaction	+

注: “+”表示阳性反应; “-”表示阴性反应。

Note: “+”Positive; “-”Negative.

以 Y2 菌株基因组 DNA 为模板, 获得的核苷酸片段大小约为 23 000 bp。利用 16S rDNA 细菌通用引物进行 PCR 扩增, 测得菌株 Y2 的 16S rDNA 核苷酸序列长度为 1450 bp。该结果与预期相符。将序列通过 GenBank 比对后, 选取相似序列构建基因系统进化树 (图 3), 结果显示拮抗菌 Y2 与 *Bacillus subtilis* strain M15J 同源性达到 98%, 综合菌体形态、生化试验结果和 16S rDNA 序列分析, 鉴定菌株 Y2 为枯草芽孢杆菌。

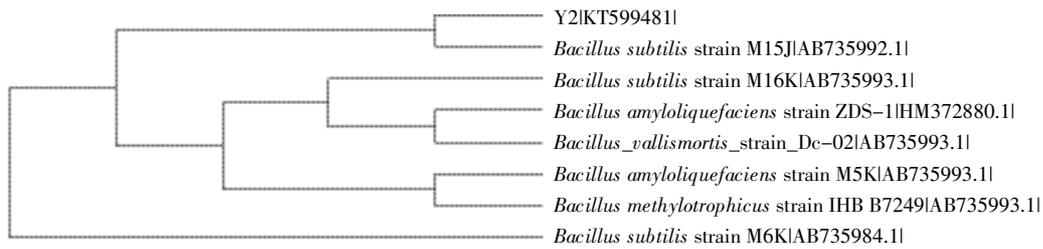


图3 Y2系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of stain Y2

2.3 单因素对菌株 Y2 产酶活力的影响

不同培养条件下,菌株 Y2 的酶活力如图 4 所示。当以麸皮为碳源时,菌株 Y2 的 FPA 和 CMCA 均最高,分别为 $(13.78 \pm 2.23) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(66.35 \pm 2.05) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,与其他各物质差异显著 ($P < 0.05$)。因此可以认为麸皮为菌株 Y2 产酶的最优碳源(图 4a)。

以蛋白胨、酵母粉、硫酸铵、牛肉膏、蛋白胨+酵母粉和尿素为氮源的结果如图 4b)。当以酵母粉和硫酸铵为氮源时,FPA 较高分别为 $(15.51 \pm 2.18) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(18.49 \pm 1.82) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,与其他物质差异显著 ($P < 0.05$);当以酵母粉为氮源时,Y2 的 CMCA 最高为 $(86.75 \pm 2.84) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,其余各物质的 CMCA 差异均显著 ($P < 0.05$)。综合上述结果,酵母粉为最适氮源。

当初始 pH 为 5 时,菌株 Y2 的 FPA 和 CMCA 最高,分别为 $(14.33 \pm 1.15) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(68.61 \pm 1.12) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,随着 pH 的增加,菌株 Y2 的 CMCA 逐渐降低,可以初步判定菌株 Y2 为嗜酸性纤维素分解菌(图 4c)。

当种子液接种量为 4% 时,菌株 Y2 的 FPA 和 CMCA 分别为 $(15.58 \pm 1.22) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(40.67 \pm 1.91) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,相比接种量为 2% 时菌株 Y2 的 FPA 和 CMCA 均有所升高,其中 CMCA 差异显著 ($P < 0.05$);当接种量大于 4% 时,菌株的 FPA 和 CMCA 随着接种量的增加而呈下降趋势。由该结果可知,4% 为最佳接种量(图 4d)。

由图 4e 可知,温度在 25~28 °C 之间时,菌株 Y2 的 FPA 和 CMCA 均呈上升趋势。28 °C 时菌株 Y2 的 FPA 和 CMCA 均达到最高,分别为 $(14.26 \pm 1.17) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(44.76 \pm 1.52) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$;当培养温度高于 28 °C 时,FPA 和 CMCA 均随温度的增加而降低。由此推断,28 °C 为最佳培养温度。

由图 4f 可知菌株 Y2 的 FPA 在 72 h 增到最高,可达 $(29.86 \pm 1.52) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,与其他时间段差异显著 ($P < 0.05$);72 h 后,随着时间的增长,FPA 逐渐下降。而菌株 Y2 的 CMCA 变化则相对平缓,在 48 h 达到最高

$(41.14 \pm 1.76) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,与其他时间段差异显著 ($P < 0.05$),之后缓慢下降。

2.4 堆肥试验结果

由图 5 可知,接种 Y2 组和 EM 菌剂组均在第 3 d 达到高温期,接种无菌水组未进入高温期。接种 Y2 组最高温度为 61 °C,EM 菌剂组最高温度达 64 °C;接种 Y2 组在高温期 (>50 °C) 维持了 9 d,EM 菌剂组高温期维持了 8 d;两组均在第 30 d 降至 20 °C 左右;接种无菌水组在第 5 d 有过升温迹象,但随后温度下降,一直未进入高温期。

2.5 纤维素降解率

由图 6 可知,接种 Y2 组和 EM 菌剂组纤维素降解率从堆肥开始至第 12 d 呈平缓上升趋势,此后直至堆肥结束时,接种 Y2 组纤维素降解率达到 42%,而 EM 菌剂组只达到 35%,Y2 组的纤维素降解率比 EM 菌剂组高了 7 个百分点;自然发酵组的纤维素降解率至堆肥结束时只有 10.5%。

3 讨论

本研究采用刚果红染色法和摇瓶复筛从自然发酵的牛粪中获得一株高效纤维素分解菌 Y2,经鉴定菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。目前国内外选育出的优良纤维素分解菌主要包括里氏木霉(*Trichoderma reesei*)^[11]、斜卧青霉(*Penicillium decumbens*)、草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)等真菌和放线菌(*Streptomyces* sp.),关于纤维素酶高产细菌的报道较少。与真菌和放线菌相比,细菌增殖速度更快,可以在短期内产生大量的生物热,有利于堆体的升温。而在细菌中枯草芽孢杆菌具有良好的耐高温、耐酸能力,适应环境能力很强。另外一些研究表明^[12],枯草芽孢杆菌还有很强的生物同化作用,能有效降低粪便中的吲哚、氨气等有害气体的浓度,有利于粪便的资源化利用。纤维素酶活力的高低决定了菌株对纤维素物质的分解能力。刘清锋等^[13]对产纤维素酶菌株青霉 T24-2 进

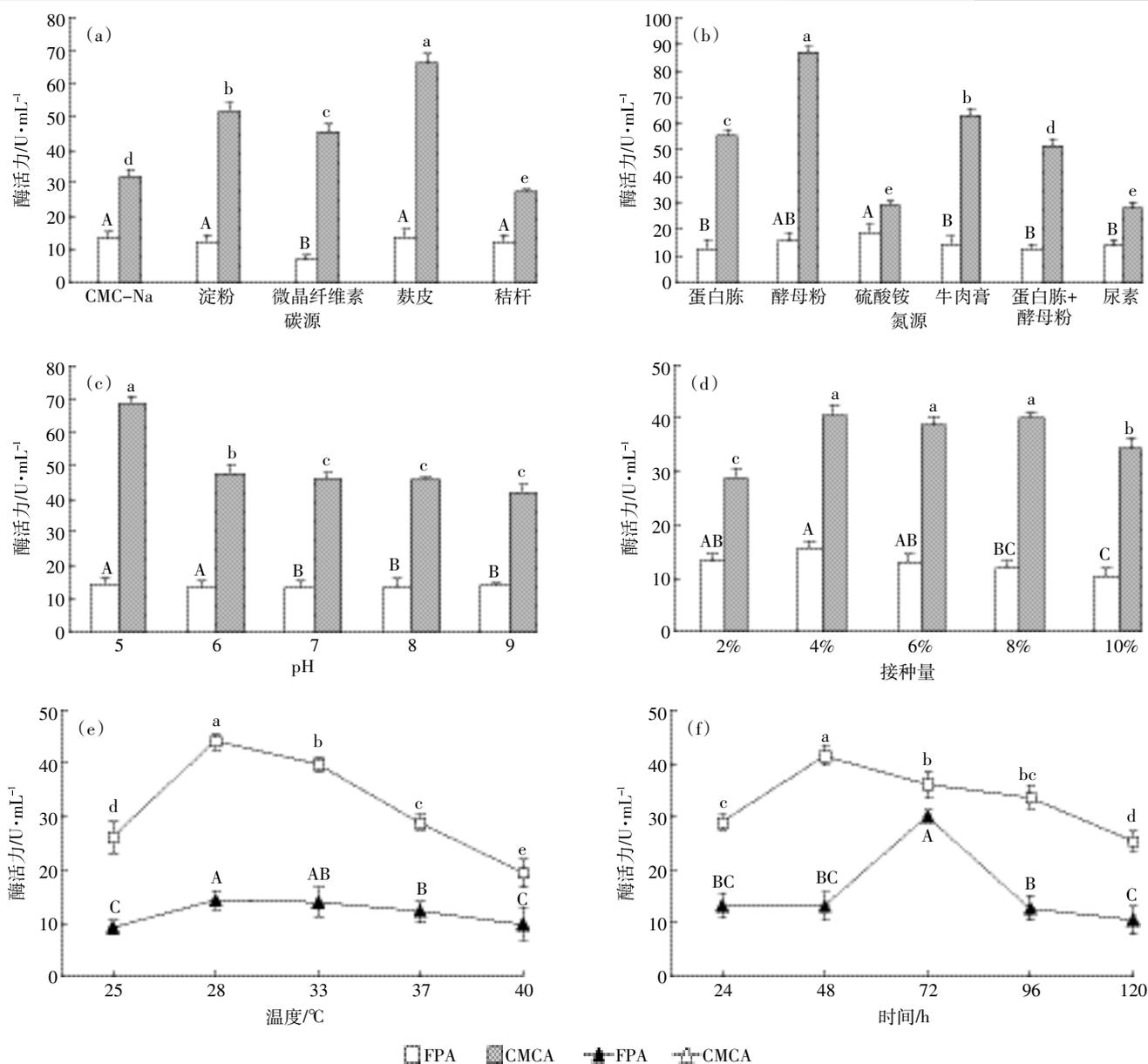


图4 不同因素对菌株 Y2 酶活力的影响

Figure 4 Enzymatic activities of strain Y2

行优化后,获得的最大滤纸酶活力和内切酶活力分别为 6.89 、 $45.01 U \cdot mL^{-1}$;李保深等^[14]研究对秸秆降解效果较好的斜卧青霉的产酶条件, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $120\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 4 d , 滤纸酶活力和内切酶活力分别达到 7.085 、 $3.856\text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本试验筛选出的菌株 Y2 在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}5.0$ 培养 48 h , FPA 和 CMCA 分别可达 15.83 、 $100.81\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 远远高于以上报道的真菌和放线菌的酶活力。这说明细菌 Y2 属于高产优良纤维素分解菌, 有利于堆体中纤维素物质的降解。

温度是反映堆肥是否顺利进行的重要标志, 温度变化可以作为堆肥过程评价的指标^[7]。本试验中接种

Y2 组和 EM 菌剂组均在第 3 d 进入高温期, 而且接种 Y2 组高温期维持了 9 d , 比 EM 菌剂组多维持了 1 d 。分析认为可能是枯草芽孢杆菌能够产生芽孢, 抗热性较强, 经过高温阶段的休眠, 温度下降后仍可大量繁殖产生热量, 因此高温期维持时间更长。根据国家卫生合格标准, 堆体温度在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上保持 $5\sim 7\text{ d}$, 是杀灭粪便中致病菌和寄生虫卵的重要条件 (GB 7959—2012)^[15]。结果显示接种 Y2 组和 EM 菌剂均达到无害化腐熟标准。纤维素降解率是反映堆肥腐熟程度的重要指标, Zhou 等^[16]在牛粪和秸秆的堆肥中通过三阶段接种不同的微生物, 结果显示堆肥结束后接种微生物

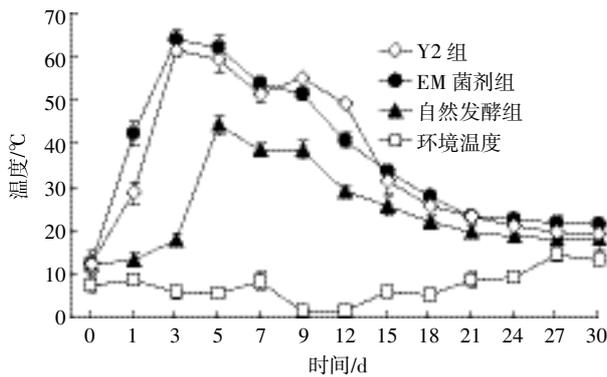


图5 不同菌剂对堆肥温度的影响

Figure 5 Effects of different microbial agents on composting temperature

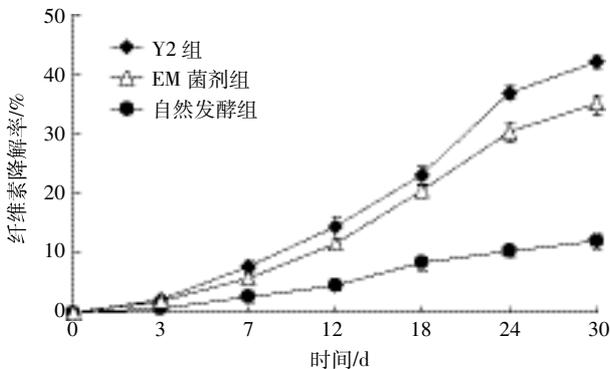


图6 不同菌剂对堆肥中纤维素分解率的影响

Figure 6 Effects of different microbial agents on cellulose decomposition

组纤维素的降解率达到43%，而空白组只有15%；Wang等^[17]研究结果显示，接种青霉菌的鸡粪和牛粪堆肥纤维素降解率均显著高于对照组，达到41%左右。本研究的纤维素降解率达到42%，高于接种EM组7个百分点，与Zhou和Wang等的研究结果相近，说明本实验所用的纤维素降解菌Y2对堆肥发酵的腐熟具有较好的促进作用。

4 结论

(1)从自然发酵的牛粪中获得一株高效纤维素分解菌Y2,经形态特征、生化特性及16S rDNA分子序列分析鉴定菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

(2)通过单因素试验和正交试验优化菌株Y2的产酶条件,经产酶条件优化后,菌株Y2的滤纸酶活(FPA)为 $15.83 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,羧甲基纤维素酶活力(CMCA)高达 $100.81 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别是优化前的1.3、2.76倍。

(3)采用Y2接种牛粪进行堆肥试验,不仅延长了堆肥的高温期,也提高了堆肥质量。

参考文献:

- [1] Qian X Y, Shen G X, Wang Z Q, et al. Co-composting of livestock manure with rice straw: Characterization and establishment of maturity evaluation system[J]. *Waste Management*, 2014, 34(2):530-535.
- [2] 艾海舰,刘翠英.生物活性水对堆肥腐熟过程的效应研究[J].西北农业学报,2006,15(5):258-260.
AI Hai-jian, LIU Cui-ying. Effect of added the bacteria mineral water in the process of compost fermentation[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2006, 15(5):258-260.
- [3] 张传富.禽粪好氧堆肥效应细菌的筛选与鉴定[D].哈尔滨:东北农业大学,2007.
ZHANG Chuan-fu. Isolation and identification of effective bacteria in aerobic composting of poultry manure[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2007
- [4] 沈根祥,尉良,钱晓雍,等.微生物菌剂对农牧业废弃物堆肥快速腐熟的效果及其经济性评价[J].农业环境科学学报,2009,28(5):1048-1052.
SHEN Gen-xiang, WEI Liang, QIAN Xiao-yong, et al. Effect of microbial inoculation on quick composting of animal manure with crop straws and economic analysis[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(5):1048-1052.
- [5] 李玉红,王岩,李清飞.外源微生物对牛粪高温堆肥的影响[J].农业环境科学学报,2006,25(增刊2):609-612.
LI Yu-hong, WANG Yan, LI Qing-fei. Effect of inoculating microbes on composting process of cattle manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(Suppl2):609-612.
- [6] Jiang J S, Liu X L, Huang Y M, et al. Inoculation with nitrogen turnover bacterial agent appropriately increasing nitrogen and promoting maturity in pig manure composting[J]. *Waste Management*, 2015, 39:78-85.
- [7] 勾长龙.低温纤维素降解菌的筛选及其复合菌系在牛粪堆肥中的应用研究[D].长春:吉林农业大学,2014.
GOU Chang-long. Identification of cold-adapted cellulose bacterium and effects of complex microbial agents on cattle manure composting[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.
- [8] 江国忠.高产纤维素酶枯草芽孢杆菌的筛选、应用及其产酶条件研究[D].南昌:南昌大学,2010.
JIANG Guo-zhong. Screening, application and conditions of enzyme production research of bacillus subtilis strains with high-cellulase yielded[D]. Nanchang: Nanchang University, 2010.
- [9] Mapula Kgomo A M, Jean-Baptiste R, Marla T, et al. Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor*(L. Moench)[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 112(5):104-117
- [10] 刘旭.奶牛粪便高效降解菌的筛选及混合菌发酵研究[D].成都:四川农业大学,2005.
LIU Xu. Screening of high-efficiency degrading microbes of the cow excrement and fermentation by mixed microorganism[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2005.
- [11] 马怀良,郭文学,柴军红.常温高效纤维素分解菌的筛选[J].东北农业大学学报,2010,41(1):52-55.

- MA Huai-liang, GUO Wen-xue, CHAI Jun-hong. Screening high-performance cellulose-degrading microbes at normal temperature[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41(1):52-55.
- [12] 李春风, 林显华, 谷巍. 枯草芽孢杆菌在饲料生产及环境防治中的应用[J]. *中国饲料*, 2013(1):10-13.
- LI Chun-feng, LIN Xian-hua, GU Wei. *Bacillus subtilis* in feed production and environmental prevention and treatment[J]. *China Feed*, 2013(1):10-13.
- [13] 刘清锋, 支晓鹏, 徐惠娟, 等. 纤维素降解菌青霉 T24-2 的分离及产酶特性[J]. *工业微生物*, 2007, 37(3):15-19.
- LIU Qing-feng, ZHI Xiao-peng, XU Hui-juan, et al. Screening and characterization of cellulase-producing *Penicillium* sp. T24-2[J]. *Industrial Microbiology*, 2007, 37(3):15-19.
- [14] 李保深, 高大文, 张博. 一株产纤维素酶真菌的筛选鉴定及降解[J]. *东北林业大学学报*, 2011, 39(7):135-137.
- LI Bao-shen, GAO Da-wen, ZHANG Bo. Screening and identification of a prolific fungus strain producing cellulase and its degradation effect[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2011, 39(7):135-137.
- [15] GB 7959—2012, 粪便无害化卫生要求[S]. 2012.
- GB 7959—2012, Hygienic requirements for harmless disposal of night soil[S]. 2012.
- [16] Zhou C, Liu Z, Huang Z L, et al. A new strategy for co-composting dairy manure with rice straw: Addition of different inocula at three stages of composting[J]. *Waste Management*, 2015(40):38-43.
- [17] Wang H Y, Fan B Q, Hu Q X, et al. Effect of inoculation with *Penicillium expansum* on the microbial community and maturity of compost[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(24):11189-11193.