



研究报告

一株分离自绿化废弃物堆肥枯草芽孢杆菌的常压室温等离子诱变及其发酵条件

邹荣松 李素艳* 孟童瑶 付冰妍 揭阳 宗钰容 余克非 孙向阳

北京林业大学林学院 北京 100083

摘要:【背景】为了提高堆肥降解有机废弃物的效率, 高效堆肥菌剂成为了研究热点, 其中以真菌应用的研究为多, 但真菌也有对氧气和底物敏感等缺点, 细菌对堆肥的作用开始被研究。本实验室以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物, 从绿化废弃物堆肥中筛选得到枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*) BL03, 它具有较好的纤维素分解能力, 能提高绿化废弃物堆肥中纤维素降解和腐殖质合成的速度。【目的】进一步提高 *B. subtilis* BL03 的纤维素酶生产能力。【方法】利用常压室温等离子(Atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变 BL03 菌, 通过 CMC-刚果红固体培养基观察水解透明圈, 以及液体发酵后检测酶活力的方法进行 3 轮筛选; 通过连续多代培养观察突变株的遗传稳定性; 通过梯度温度、pH 培养研究突变株发酵的最适生长温度、培养基初始 pH; 利用正交设计方法研究适合突变株发酵培养的工业级原料配方。【结果】筛选到 2 株正突变株, 酶活力分别提高了 69% 和 72%; 连续 10 代培养稳定, 验证了突变株的遗传稳定性; 其中酶活力最高的突变株 BLA3890 最适培养温度为 37 °C、培养基初始 pH 为 5.0–6.5, 研究得到较经济的发酵培养基配方。【结论】ARTP 诱变 *B. subtilis* BL03 后得到的突变株 BLA1973 和 BLA3890 在绿化废弃物堆肥或其他纤维素降解行业具有进一步研究和应用的价值。

关键词: 绿化废弃物堆肥, 常压室温等离子, 枯草芽孢杆菌, 纤维素酶

Mutagenesis of *Bacillus subtilis* isolated from green waste compost by atmospheric and room temperature plasma treatment and its fermentation conditions

ZOU Rong-Song LI Su-Yan* MENG Tong-Yao FU Bing-Yan JIE Yang
ZONG Yu-Rong YU Ke-Fei SUN Xiang-Yang

College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] High-efficiency composting agents, especially fungi, have become a research hotspot for improving the efficiency of green waste compost. Due to the disadvantaged of fungi application such as its sensitivity to oxygen and substrate, the role of bacteria in composting process has gradually been

Foundation item: National Forestry Public Welfare Industry Research Project of China (201504205)

*Corresponding author: Tel: 86-10-62336096; E-mail: lisuyan@bjfu.edu.cn

Received: 18-12-2018; Accepted: 14-03-2019; Published online: 19-03-2019

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(201504205)

*通信作者: Tel: 010-62336096; E-mail: lisuyan@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2018-12-18; 接受日期: 2019-03-14; 网络首发日期: 2019-03-19

studied. *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) BL03 was screened from the composting process of green waste using CMC-Na as substrate in our laboratory. The BL03 strain with good cellulose decomposition ability could improve the speed of cellulose degradation and humus synthesis in the green waste composting. **[Objective]** To further improve the cellulase activity of BL03. **[Methods]** The atmospheric pressure room temperature plasma (ARTP) was used to mutate the bacteria. Three rounds of screening were carried out via measuring the diameter of the hydrolyzed transparent circle on CMC-Congo red solid medium and detecting the activity of cellulase after liquid fermentation. The genetic stability of the mutant was measured after 10-generations culturing. The optimum growth temperature and initial pH of medium for mutant fermentation were determined by setting gradient temperature and pH culture. Orthogonal design was adopted to determine the industrial raw materials for the fermentation of the mutants. **[Results]** Two mutant strains, of which the enzyme activity increased by 69% and 72% respectively, were obtained. Also, the cellulase activity of the two mutants were stable after 10 generations culturing. The optimum culture temperature for the highest cellulase activity mutant, BLA3890, was 37 °C, and the initial pH of the medium was 5.0–6.5. An economical fermentation medium was obtained from this study. **[Conclusion]** BLA1973 and BLA3890, which obtained from *Bacillus subtilis* BL03 mutated by ARTP, are valuable in composting process of green waste or other cellulose degradation applications and need further research.

Keywords: Green waste composting, Atmospheric and room temperature plasmas (ARTP), *Bacillus subtilis*, Cellulase

随着城市的建设, 园林绿化也得到了快速发展。在城市绿化养护中产生的修剪枝条、落叶、草坪修剪物和残花等被称为绿化废弃物^[1], 中国每年有 1 400 万 t 多的绿化废弃物^[2], 目前广泛采用的绿化废弃物处理方法是好氧堆肥, 但由于绿化废弃物含有较高的木质素和纤维素, 在一定程度上制约着堆肥的发酵周期, 可以通过接种微生物菌种提高堆肥效率^[3-5]。降解纤维素和木质素的微生物研究比较多的是真菌, 如具有较好的纤维素和木质素分解酶系的白腐菌^[6-7], 但真菌也有其本身的缺点, 如对氧气和底物敏感等^[8]。近年来, 降解纤维素、木质素的细菌逐渐被深入研究^[9-12]。本实验室以 CMC-Na 为底物, 从绿化废弃物堆肥中筛选分离出优势野生菌 *Bacillus subtilis* BL03, 其具有较好的纤维素分解能力, 发酵后接种到绿化废弃物堆肥中, 能促进纤维素降解和腐殖质的生成速度^[13]。但 BL03 对绿化废弃物堆肥周期改善不明显, 仍然需要 60 d, 尚不能达到现代快速堆肥的要求。为了进一步提高该微生物的堆肥效率, 本研究拟用诱变育种的方法定向提高 BL03 菌的纤维素酶活力。

诱变获得高性能的菌种是研究中常用的一种育种方法^[14], 常用的方法有物理诱变、化学诱变等,

如空间诱变^[15]、紫外线诱变^[16]、亚硝基胍诱变^[17]等, 但这些方法存在费用昂贵或环境保护、职业健康等方面的负面影响。ARTP 诱变技术是近年发展起来的诱变技术, 具有操作方便、突变率高、环境友好等特点^[18]。经 ARTP 诱变后 *Mortierella alpina* 花生四烯酸生产能力提高了 40.61%^[19], *Sinorhizobium meliloti* 维生素 B12 的产能提高了 21.9%^[20]。本研究利用 ARTP 诱变 *B. subtilis* BL03, 并通过 CMC-刚果红平板和液体发酵检测纤维素酶活力的方法定向筛选, 以期提高该菌的纤维素分解能力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

B. subtilis BL03 由本实验室从绿化废弃物堆肥中筛选所得^[13]。

固体培养基参考韩学易等^[21]配制, 种子液培养基选用 LB 培养基, 发酵液培养基: 固体培养基中不加 CMC-Na 和琼脂粉。培养基 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.2 主要试剂和仪器

工业级培养基原料玉米浆干粉、黄豆饼粉、甜菜糖蜜由山东恩沐生物有限公司提供; 其他常规试剂均为国产分析纯。

ARTP 育种仪,无锡源清天木生物科技有限公司;24孔深孔板(每孔尺寸:17 mm×17 mm,孔深40.5 mm),常州英德生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液制备

接种 *B. subtilis* BL03 到装有 50 mL 种子培养液的 250 mL 三角瓶中,37 °C、220 r/min 培养 18 h。吸取 1 mL 种子液转入无菌 EP 管中,4 000 r/min 离心 10 min,去掉上清液,加入适量无菌生理盐水重新将菌体悬浮,控制 OD_{600} 为 0.6–0.8。

1.3.2 ARTP 诱变方法

采用 ARTP 育种仪对 *B. subtilis* BL03 菌种进行诱变。诱变条件:等离子输出功率 120 W;氦气载气流速 10 L/min;等离子激发器与样品距离 2 mm;诱变菌悬液体积 10 μ L;取 10 μ L 菌悬液涂布在无菌不锈钢载片上(ARTP 仪专用配件)。做 6 个不同诱变时间的处理:处理时间从 0 s 开始,每 20 s 做一个递增,最长处理时间为 100 s。将诱变后含菌悬液的载片整体放入装有 1 mL 无菌生理盐水的 1.5 mL 无菌 EP 管内,用漩涡振荡器洗脱 2 min 后,从中取 100 μ L 菌液均匀涂布固体培养基,在生化培养箱中 37 °C 培养 48 h。

1.3.3 筛选方法

(1) 初筛

将诱变后在固体培养基上生长出的单菌落编号,分别复制到另一个固体培养基上,在原固体培养基上加入适量 1 mg/mL 的刚果红溶液,静置 15 min 后倒去刚果红溶液,然后浸泡到 1 mol/L 的氯化钠溶液中显色 15 min。菌落周边出现的透明圈直径越大,表明该菌落纤维素分解能力越强^[22-23],挑选出 5 700 颗透明圈大的单菌落制成甘油管在-80 °C 保藏,以备复筛。

(2) 复筛

挑选初筛所得到的菌株接种到种子液培养基,37 °C、220 r/min 培养 18 h。准备无菌 24 孔深孔板,每孔中装入 3 mL 已灭菌的液体发酵培养基。然后给每孔接种 150 μ L 种子液,在孔板摇床 37 °C、

220 r/min 培养 24 h^[24]。在固体培养基上铺上直径 6 mm 的无菌圆形滤纸,每个滤纸上接种 10 μ L 发酵液,培养 48 h 后利用刚果红染色观察透明圈大小,从中筛选出 50 株纤维素酶活力高的菌株进行第二轮复筛。

(3) 二轮复筛

将复筛出的菌株接入种子液培养基,37 °C、220 r/min 培养 18 h,然后取 0.5 mL 种子液接种到装 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,220 r/min 培养 24 h 检测纤维素酶活力。从中筛选出 1–2 株纤维素酶活力最高的菌株进一步研究遗传稳定性、培养基优化等工作。

1.3.4 遗传稳定性分析

为了验证突变株的遗传稳定性,对第二轮复筛获得的菌株分别发酵培养 10 代(固体培养基培养再传固体培养基为 1 代)^[25],并检测每一代菌种同条件下发酵后的纤维素酶活力。

1.3.5 菌体生长曲线测定

将遗传稳定的突变株菌种经固体培养基培养后,接种到装有 50 mL 种子液培养基的 250 mL 三角瓶中,37 °C、220 r/min 振荡培养 18 h。然后取 0.5 mL 种子液接入装有 50 mL 发酵液培养基的 250 mL 三角瓶中,37 °C、220 r/min 培养 24 h,每 2 h 取样测定 OD_{600} 值。用未接种的空白液体发酵培养基为对照,绘制生长曲线^[26]。

1.3.6 酶活性测定

发酵液于 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min,取上清液制成粗酶液,保存于 4 °C 冰箱。取 1 mL CMC 溶液(1%浓度,质量体积比)装入比色管,加入 0.2 mL 粗酶液,50 °C 水浴保温 30 min,加入 2.5 mL DNS 试剂,沸水浴煮 5 min,自来水流水冷却至室温,定容至 5.0 mL,分光光度计 530 nm 下测吸光度,以 1 mL 酶液每分钟产生 1 μ g 葡萄糖为 1 个酶活单位(U)^[21,26-27]。

1.3.7 菌株发酵条件优化^[28-29]

取复筛所得菌种培养成种子液,接种到发酵瓶,置于不同温度、不同发酵起始 pH 培养基、不

同配方培养基, 培养 24 h, 测定发酵液的 OD_{600} , 评价不同培养条件对所选菌株生长的影响。

2 结果与分析

2.1 ARTP 诱变致死率曲线的测定

对 *B. subtilis* BL03 菌悬液处理时间从 0 s 到 100 s, 随着时间的增加, 菌体的致死率不断上升, 详见图 1。处理 20 s 对 BL03 菌的致死率不足 60%, 处理 40 s 后致死率达到了 90%以上, 处理 60 s 致死率达到 95%以上。诱变引发的菌种基因突变具有随机性, 而致死率代表的诱变处理剂量和突变之间的关系尚不明确, 参考 Wang 等的研究^[30], 选择 95%左右的致死率(处理时间 60 s)作为诱变剂量, 对 BL03 进行诱变处理。

2.2 筛选纤维素酶高产突变株

在固体培养基中, 刚果红能与纤维素形成红色复合物, 当纤维素被分解后, 固体培养基上会出现以菌落为中心的透明圈, 可以根据透明圈的大小初步判断纤维素酶活性大小。产酶越多越快, 透明圈直径越大^[22]。研究通过 ARTP 对堆肥中筛选得到的 *B. subtilis* BL03 诱变后, 经过刚果红固体培养基初筛获得 5 700 株菌。经过 2 轮摇瓶复筛, 筛选获得 2 株高产菌株 BLA1973、BLA3890, 具体数据见表 1。两株菌分别比野生菌 BL03 提高了 69%和 72%。

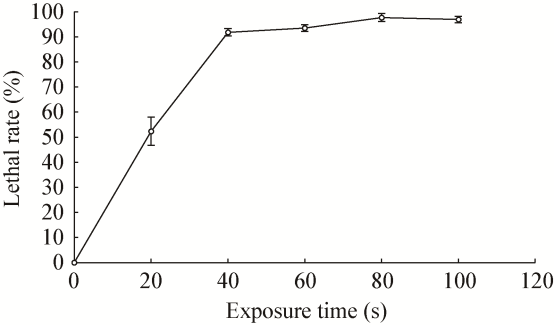


图 1 不同处理时间对 *B. subtilis* BL03 的致死率(n=3)
Figure 1 The lethal rate of *B. subtilis* BL03 at different exposure time (n=3)

2.3 遗传稳定性分析

为了验证筛选所得到突变菌株的遗传稳定性, 对 BLA1973 和 BLA3890 进行了固体培养基传代, 每代均在 250 mL 三角瓶中进行液体发酵培养, 并检测发酵液的纤维素酶活力, 数据如表 2 所示。ARTP 诱变后的突变体 BLA1973 和 BLA3890 产纤维素酶活力有较好的遗传稳定性。通过比较, 确定 BLA3890 作为目标菌株进一步测试其相关指标, 其在 CMC-刚果红培养基上产生的透明圈见图 2。

2.4 生长曲线的测定

将出发菌株 *B. subtilis* BL03 和突变株 BLA3890 在同样条件下培养 24 h, 每隔 2 h 取样检测 OD_{600} 值, 结果如图 3 所示, 突变株 BLA3890 的生长速率没有受到诱变的影响, 与出发菌株几乎一致。两株

表 1 两轮复筛获得的突变株在刚果红培养基上的透明圈直径和 CMC 酶活力

Table 1 The transparent circle diameter and CMCase activity of mutant strains obtained from two rounds of screening

菌株 Strain	菌落编号 Code	透明圈直径 Diameter of the transparent circle (mm)	CMC 酶活力 CMCase activity (U/mL)
Wild strain	BL03	6.5	106
Mutant strain 1	BLA1973	7.2	179
Mutant strain 2	BLA3890	7.8	182

表 2 野生株和突变株连续 10 代培养时的纤维素酶活力(U/mL, n=3, 平均值±标准差)

Table 2 The CMCase activity of the wild and mutant strains during generations (U/mL, n=3, mean±SD)

Strain	Generation									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BL03	104±4.3	106±4.0	112±10.1	102±3.6	108±4.4	113±5.7	114±8.7	104±3.5	105±3.3	107±4.3
BLA1973	178±4.6	184±3.1	179±3.6	176±5.3	182±3.5	182±4.0	176±3.2	174±2.5	182±2.1	176±1.5
BLA3890	182±2.1	182±3.2	184±3.2	183±2.1	184±3.2	188±1.5	184±2.1	185±5.3	180±1.5	186±3.8

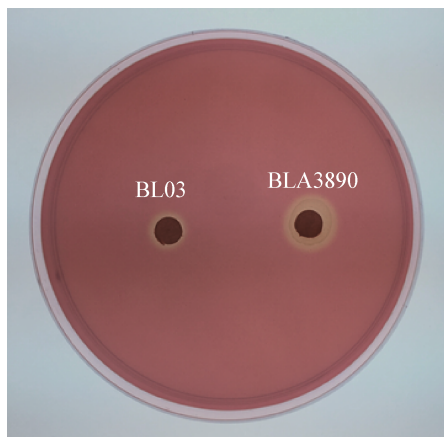


图2 菌株在 CMC-刚果红培养基上的透明圈
Figure 2 The transparent circle of strain on CMC-Congo red medium

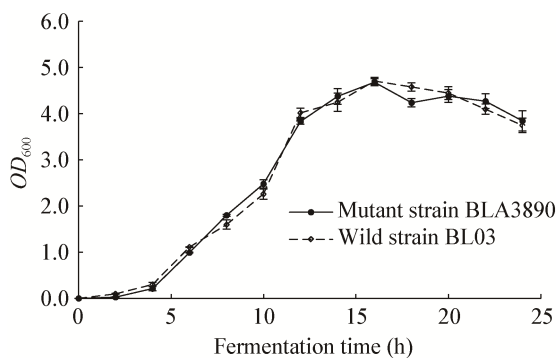


图3 野生株 BL03 和和突变株 BLA3890 生长曲线(n=3)
Figure 3 The growth curves of wild strain BL03 and mutant BLA3890 (n=3)

菌都在 5 h 后快速进入对数期生长, 在 15–20 h 进入稳定期生长。

2.5 BLA3890 发酵条件优化

2.5.1 BLA3890 最适温度

在发酵培养基中接种种子液, 摇床上设定不同温度培养 24 h, 检测 OD_{600} 吸光值的结果见图 4。从图 4 中可见 BLA3890 的最适培养温度还是 37 °C, 与 BL03 一致, 诱变没有改变该菌的最适培养温度。

2.5.2 培养基初始 pH 对 BLA3890 产纤维素酶的影响

将发酵培养基配制成不同 pH, 接种 BLA3890 和 BL03 种子液后培养 24 h, 发酵过程中 pH 自然,

发酵结束后检测 OD_{600} , 观察 BLA3890 最适生长的初始 pH 值, 结果如图 5 所示, BLA3890 在初始 pH 5.0–6.5 的环境长势相近, 说明其最适 pH 范围较宽, 方便发酵培养。从图 5 也可以看到, 野生菌在 pH 为 7.0 的培养液中也显示出了较好的生长能力, 而 BLA3890 在此条件下的生长能力已经开始下降, 可能是受到了诱变的影响, 具体原因尚不明确。

2.5.3 BLA3890 发酵培养基条件优化

为了低成本扩繁 BLA3890 生产堆肥菌剂, 取葡萄糖、甜菜糖蜜作为碳源, 玉米浆干粉、黄豆饼粉作为氮源进行培养基优化。进行梯度试验的基本组成(g/L): 葡萄糖 6.0, 甜菜糖蜜 10.0, 玉米浆干粉 20.0, 黄豆饼粉 20.0, 再根据最佳梯度试验结果, 进一步利用正交设计对上述培养基进行优化。

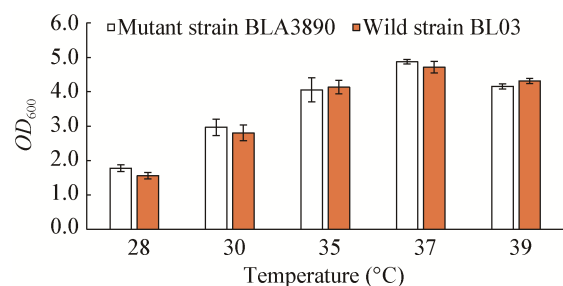


图4 突变株 BLA3890 和野生株 BL03 在不同温度下培养 24 h 的 OD_{600} 吸光值(n=3)
Figure 4 The OD_{600} of mutant strain BLA3890 and wild strain BL03 cultured at different temperatures for 24 h (n=3)

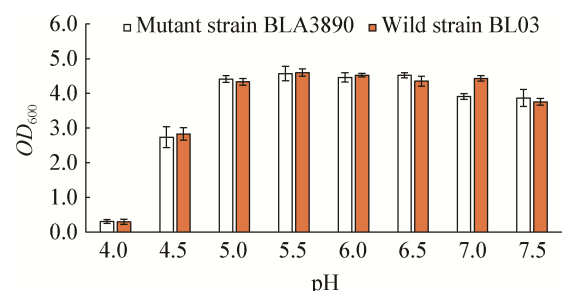


图5 突变株 BLA3890 和野生株 BL03 在不同初始 pH 液体培养基中培养 24 h 的 OD_{600} 吸光值(n=3)
Figure 5 The OD_{600} of mutant strain BLA3890 and wild strain BL03 were cultured at different initial pH liquid medium for 24 h (n=3)

根据图 6 所示，分别选择葡萄糖、甜菜糖蜜、玉米浆干粉、黄豆饼粉含量 9.0、15.0、20.0、20.0 g/L 为中心数值，设计正交试验，详见表 3，各处理试验结果详见表 4。

通过正交试验，可见玉米浆干粉对 *B. subtilis* BLA3890 的发酵生物量影响最大，可能与玉米浆粉除了提供氮源之外，还提供了烟酸和生物素等其他有机养分有关系^[31]，具体原因有待深入研究。该菌经济的发酵培养基组成(g/L)：葡萄糖 9.0，甜菜糖蜜 15.0，玉米浆干粉 20.0，黄豆饼粉 20.0。

3 讨论与结论

为了提高堆肥的有机废弃物降解效率，高效堆

肥菌剂成为研究热点，其中应用真菌的研究较多，但真菌有对氧气和底物敏感等缺点，因此，细菌对堆肥的作用开始被深入研究。本实验室以 CMC-Na 为底物，从绿化废弃物堆肥中筛选得到枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* BL03，其具有较好的纤维素酶活力。BL03 经发酵后接种到绿化废弃物堆肥中能提高纤维素的降解和腐殖质的合成速度，但对绿化废弃物堆肥周期的改善不明显。为了进一步提高 BL03 的纤维素降解能力，本研究利用常压室温等离子(ARTP)诱变 BL03 菌，再通过 CMC-刚果红平板和 CMC 纤维素酶活力检测，筛选纤维素酶活力高的突变株。ARTP 诱变方法与传统诱变方法相比操作

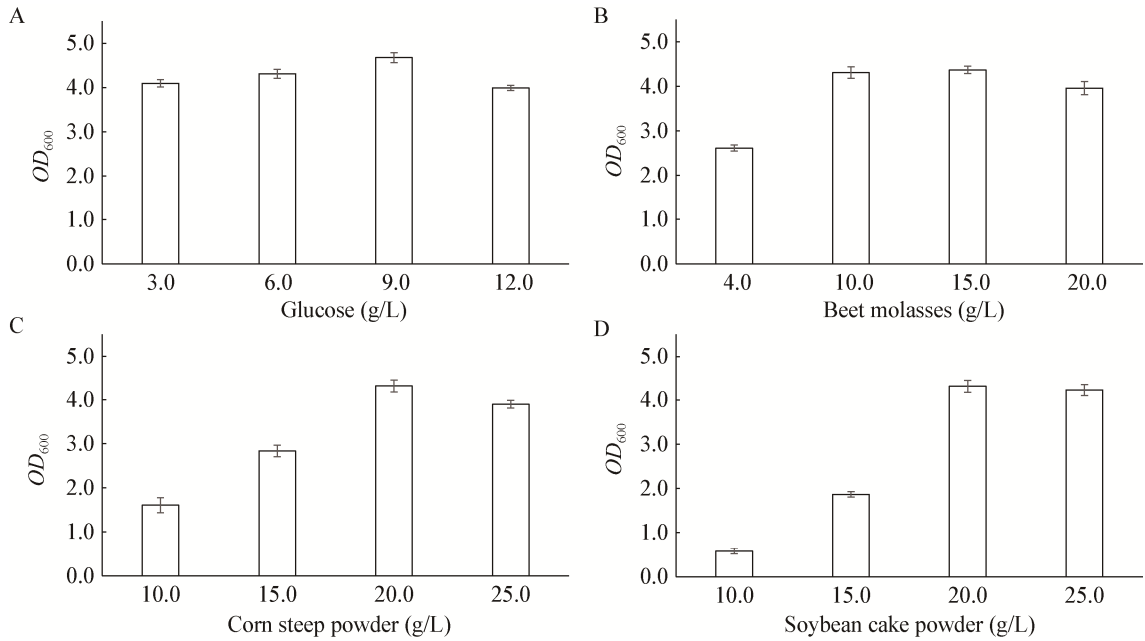


图 6 不同培养基单因素水平试验(n=3)

Figure 6 The single factor level test of different media (n=3)

注： *B. subtilis* BLA3890 在不同浓度培养物中的生长情况：葡萄糖(A)；甜菜糖蜜(B)；玉米浆干粉(C)；黄豆饼粉(D).

Note: The growth of *B. subtilis* BLA3890 in different concentrations of glucose (A); beet molasses (B); corn steep powder (C); soybean cake powder (D).

表 3 正交试验因素水平表

Table 3 The factors level table of orthogonal test

水平 Level	葡萄糖 Glucose (g/L)	甜菜糖蜜 Beet molasses (g/L)	玉米浆干粉 Corn steep powder (g/L)	黄豆饼粉 Soybean cake powder (g/L)
1	7.0	12.0	17.0	17.0
2	9.0	15.0	20.0	20.0
3	11.0	18.0	23.0	23.0

表 4 各处理生长 24 h 后 OD_{600} 值和极差分析(n=3)Table 4 The values and range analysis of OD_{600} in the different treatment after fermentation for 24 h (n=3)

水平 Level	葡萄糖 Glucose (g/L)	甜菜糖蜜 Beet molasses (g/L)	玉米浆干粉 Corn steep powder (g/L)	黄豆饼粉 Soybean cake powder (g/L)	OD_{600}
1	7.0	12.0	17.0	17.0	3.257±0.13
2	7.0	15.0	20.0	20.0	4.996±0.17
3	7.0	18.0	23.0	23.0	3.097±0.08
4	9.0	12.0	20.0	23.0	5.184±0.16
5	9.0	15.0	23.0	17.0	3.953±0.09
6	9.0	18.0	17.0	20.0	3.938±0.11
7	11.0	12.0	23.0	20.0	4.120±0.15
8	11.0	15.0	17.0	23.0	3.927±0.13
9	11.0	18.0	20.0	17.0	4.945±0.16
K_1	3.783	4.187	3.707	4.052	
K_2	4.358	4.292	5.042	4.351	
K_3	4.331	3.993	3.723	4.069	
R	0.575	0.299	1.335	0.299	

方便、成本低、对人体和环境影响小,在环境保护和职业健康等方面具有明显优点,是诱变微生物菌种的有效方法。本研究通过 ARTP 对 BL03 菌进行了 60 s 诱变处理,对其致死率约 95%,通过固体培养基分离得到 5 700 株菌,以 CMC-刚果红培养基的透明圈直径为指标,初筛了 50 株酶活力高的菌株并进行了 2 轮复筛,挑选的突变株 BLA1973 和 BLA3890 其液体发酵 CMC 纤维素酶活力比野生株 BL03 提高了 69%和 72%,通过 10 代传代培养,认为该 2 株突变株的纤维素酶活力遗传稳定。

对 BLA3890 突变株的发酵条件进一步进行了研究,发现该突变株与野生株 BL03 的生长曲线接近;BLA3890 最适培养温度为 37 °C、初始培养基 pH 为 5.0–6.5,最适温度和野生株 BL03 一致,但最适初始 pH 比 BL03 窄,而 BL03 在 pH 7.0 仍然生长很好。为了选择较经济的培养基,我们通过单因素和正交设计研究了葡萄糖、甜菜糖蜜、玉米浆干粉、黄豆饼粉对 BLA3890 生长的影响,认为玉米浆干粉对该菌的生长影响最大,可能与玉米浆粉除了提供氮源之外,还提供了烟酸和生物素等其他有机养分有关系。目前初步获得了经济的培养基配方(g/L): 葡萄糖 9.0,甜菜糖蜜 15.0,玉米浆干粉 20.0,黄豆饼粉 20.0。

本研究中 ARTP 诱变对菌的生长曲线没有影响,但对最适初始 pH 有影响,可见 BLA3890 的突变不是提高生物量来提高纤维素酶活力,该菌纤维素酶活力的提高可能与菌体对培养基中某种酸碱物质代谢水平有关联,这有待进一步深入研究。

在堆肥过程中底物条件复杂,堆肥菌剂添加以生物量为主^[32],因此本试验未研究培养条件对酶活力的影响。后续可以进一步研究 BLA3890 与 BL03 发酵过程中酶活力的变化,及其在绿化废弃物堆肥中的应用。

REFERENCES

- [1] Zhang L, Sun XY, Tian Y. Application of green waste compost for *Calathca rotundifolia* cv. Fasciata cultivation[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2011, 33(5): 109-114 (in Chinese)
张璐,孙向阳,田赞. 园林废弃物堆肥用于青苹果竹芋栽培研究[J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(5): 109-114
- [2] Shi Y, Ge Y, Chang J, et al. Garden waste biomass for renewable and sustainable energy production in China: Potential, challenges and development[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2013, 22(8): 432-437
- [3] Zhang L, Sun XY. Effects of rhamnolipid and initial compost particle size on the two-stage composting of green waste[J]. Bioresource Technology, 2014, 163: 112-122
- [4] Frederickson J, Butt KR, Morris RM, et al. Combining vermiculture with traditional green waste composting systems[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1997, 29(3/4): 725-730
- [5] Gou CL, Wang YQ, Zhang XQ, et al. Inoculation with a psychrotrophic-thermophilic complex microbial agent accelerates onset and promotes maturity of dairy manure-rice straw

- composting under cold climate conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 339-346
- [6] Gong XQ, Li SY, Sun XY, et al. Maturation of green waste compost as affected by inoculation with the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Environmental Technology*, 2017, 38(7): 872-879
- [7] Zeng GM, Huang DL, Huang GH, et al. Composting of lead-contaminated solid waste with inocula of white-rot fungus[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(2): 320-326
- [8] Chandra R, Raj A, Purohit HJ, et al. Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste[J]. *Chemosphere*, 2007, 67(4): 839-846
- [9] Su XM, Zhang S, Mei RW, et al. Resuscitation of viable but non-culturable bacteria to enhance the cellulose-degrading capability of bacterial community in composting[J]. *Microbial Biotechnology*, 2018, 11(3): 527-536
- [10] Bandounas L, Wierckx NJP, de Winde JH, et al. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential[J]. *BMC Biotechnology*, 2011, 11(1): 94
- [11] Vicuña R. Bacterial degradation of lignin[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1988, 10(11): 646-655
- [12] Zimmermann W. Degradation of lignin by bacteria[J]. *Journal of Biotechnology*, 1990, 13(2/3): 119-130
- [13] Yu KF, Sun XY, Li SY, et al. Application of quadratic regression orthogonal design to develop a composite inoculum for promoting lignocellulose degradation during green waste composting[J]. *Waste Management*, 2018, 79: 443-453
- [14] Ahmad I, Day JP, Macdonald MV, et al. Haploid culture and UV mutagenesis in rapid-cycling *Brassica napus* for the generation of resistance to chlorsulfuron and *Alternaria brassicicola*[J]. *Annals of Botany*, 1991, 67(6): 521-525
- [15] He XH, Liu M, Lu JY, et al. Space mutation breeding: a brief introduction of screening new floricultural, vegetable and medicinal varieties from earth-grown plants returned from China's satellites and spaceships[A]/Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology[M]. London: Global Science Books, Ltd., 2006: 266-271
- [16] Krishna S, Maslov S, Sneppen K. UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli* SOS response: A quantitative model[J]. *PLoS Computational Biology*, 2007, 3(3): e41
- [17] Yoon SH, Lee EG, Das A, et al. Enhanced vanillin production from recombinant *E. coli* using NTG mutagenesis and adsorbent resin[J]. *Biotechnology Progress*, 2007, 23(5): 1143-1148
- [18] Zhang X, Zhang C, Zhou QQ, et al. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(13): 5639-5646
- [19] Li XY, Liu RJ, Li J, et al. Enhanced arachidonic acid production from *Mortierella alpina* combining atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and diethyl sulfate treatments[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 177: 134-140
- [20] Cai YY, Xia MM, Dong HN, et al. Engineering a vitamin B₁₂ high-throughput screening system by riboswitch sensor in *Sinorhizobium meliloti*[J]. *BMC Biotechnology*, 2018, 18(1): 27
- [21] Han XY, Chen H, Wu Q, et al. Optimization of conditions for submerged fermentation of cellulase from *Bacillus subtilis* C-36[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2006, 24(2): 178-181 (in Chinese)
- 韩学易, 陈惠, 吴琦, 等. 产纤维素酶枯草芽孢杆菌 C-36 的产酶条件研究[J]. *四川农业大学学报*, 2006, 24(2): 178-181
- [22] Ye JY. A new differential medium for cellulose decomposing microorganisms[J]. *Microbiology China*, 1997, 24(4): 251-252 (in Chinese)
- 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基[J]. *微生物学通报*, 1997, 24(4): 251-252
- [23] Zhang YH, Wang J, Zhang W, et al. An improved differential medium for cellulose decomposing microorganisms[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology*, 2004, 12(1): 33-36 (in Chinese)
- 张宇昊, 王颀, 张伟, 等. 一种改进的纤维素分解菌鉴别培养基[J]. *纤维素科学与技术*, 2004, 12(1): 33-36
- [24] Shi F, Tan J, Chu J, et al. A qualitative and quantitative high-throughput assay for screening of gluconate high-yield strains by *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 109: 134-139
- [25] Ma JF, Wu MK, Zhang CQ, et al. Coupled ARTP and ALE strategy to improve anaerobic cell growth and succinic acid production by *Escherichia coli*[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2016, 91(3): 711-717
- [26] Wang W, Fu JH, Cui WD, et al. Preliminary study on liquid fermentation conditions of a cellulase producing bacterium[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2002, 39(1): 20-22 (in Chinese)
- 王炜, 付建红, 崔卫东, 等. 一株产纤维素酶细菌液体发酵条件的初步研究[J]. *新疆农业科学*, 2002, 39(1): 20-22
- [27] Liu GS, Wang L, Li XM, et al. An improved method of determination of saccharifying power of CMC-cellulase[J]. *Feed Research*, 1999(1): 20-22 (in Chinese)
- 刘国生, 王琳, 李学梅, 等. 纤维素酶 CMC 糖化力测定方法的改进[J]. *饲料研究*, 1999(1): 20-22
- [28] Liu D, Wang HY, Wu X, et al. Screening of cellulase-producing strain and optimization of fermentation conditions[J]. *Industrial Microbiology*, 2015, 45(4): 19-25 (in Chinese)
- 刘丹, 王红英, 吴星, 等. 纤维素酶产生菌及其发酵条件优化[J]. *工业微生物*, 2015, 45(4): 19-25
- [29] Sun JS, Li X, Dong XQ. Induced breeding and conditions of producing cellulase by *Trichoderma koningii*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2002, 24(2): 83-85 (in Chinese)
- 孙君社, 李雪, 董秀芹. 纤维素酶高产菌株的选育及产酶条件的研究[J]. *北京林业大学学报*, 2002, 24(2): 83-85
- [30] Wang LY, Huang ZL, Li G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(3): 851-858
- [31] Zhang L, Liu L, Li JH, et al. Effects of corn steep liquor on succinic acid fermentation[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(3): 301-307 (in Chinese)
- 张乐, 刘龙, 李江华, 等. 玉米浆对丁二酸发酵的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(3): 301-307
- [32] Li J, Peng SP. *Practical Handbook for Composting Engineering*[M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2011: 92-93 (in Chinese)
- 李季, 彭生平. 堆肥工程实用手册[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2011: 92-93