

研究报告

病死猪尸体降解复合菌的筛选、鉴定、优化及应用效果评价

翟伟¹, 张喜庆¹, 刘继军², 梁小军³, 高云航^{*1}

1 吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林 长春 130118

2 中国农业大学动物科学技术学院, 北京 100191

3 宁夏农林科学院, 宁夏 银川 750002

翟伟, 张喜庆, 刘继军, 梁小军, 高云航. 病死猪尸体降解复合菌的筛选、鉴定、优化及应用效果评价[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 924-941

Zhai Wei, Zhang Xiqing, Liu Jijun, Liang Xiaojun, Gao Yunhang. Screening, identification, optimization, and application evaluation of compound bacteria for degradation of diseased pig carcasses[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 924-941

摘要:【背景】我国生猪病死率较高, 建立高效的病死猪尸体无害化处理方式尤为重要。【目的】提高病死猪尸体堆肥无害化处理效率。【方法】筛选具有蛋白质和脂肪降解功能的菌株, 并构建复合菌剂, 利用单因素和响应面方法对其菌种配比及降解条件进行优化, 对其接种于病死猪和锯末堆肥进行应用效果评价。【结果】经鉴定, 菌株 DB1 为粘质沙雷氏菌, 所产蛋白酶活力为 36.76 U/mL, 猪肉降解率为 72.17%。菌株 ZF2 为贝莱斯芽孢杆菌, 所产脂肪酶活力为 12.33 U/mL, 猪肉降解率为 70.83%。复合菌剂中 DB1 与 ZF2 最佳菌种配比为 2.55:1, 响应面优化其最佳降解条件为温度 31.65 °C、接种量 3.11%、pH 6.0、盐度 0.75%、Mn²⁺浓度 1 mmol/L。在此条件下进行猪肉降解实验, 7 d 后降解率达 90.61%。堆肥实验显示对照组和低、中、高接种量组堆肥峰值温度分别可达 60、64、69 和 62 °C。其中 3%接种量的处理效果最佳, 高温期可维持 19 d, 病死猪降解率达 98.06%, 各指标均极显著优于对照组($P<0.01$)。【结论】首次根据生猪中肥瘦比设计猪肉降解实验来评价功能菌的作用效果, 较前人方法有所改进。以猪肉降解率作为评价指标, 优化了功能菌的菌种配比, 与前人研究相比具有更好地加速堆肥升温 and 加快病死猪尸体降解的能力。

关键词: 病死猪降解菌; 复合菌剂; 菌种配比; 堆肥

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0501800, 2016YFD0501400); 吉林省科技发展计划(20190201296JC); 宁夏回族自治区重点研发计划(2017BY082); 宁夏农林科学院“十三五”重大专项(NKYZ-16-0202); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-37)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0501800, 2016YFD0501400); Science and Technology Development Project of Jilin Province (20190201296JC); Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2017BY082); Major Special Projects of Ningxia Academy of Agriculture and Forestry in the 13th Five Year Plan (NKYZ-16-0202); National Modern Agricultural Industry Technology System Construction Project (CARS-37)

***Corresponding author:** E-mail: gaoyunhang@163.com

Received: 2021-09-24; **Accepted:** 2021-11-22; **Published online:** 2021-12-20

Screening, identification, optimization, and application evaluation of compound bacteria for degradation of diseased pig carcasses

ZHAI Wei¹, ZHANG Xiqing¹, LIU Jijun², LIANG Xiaojun³, GAO Yunhang^{*1}

1 College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

2 College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100191, China

3 Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, Ningxia, China

Abstract: [Background] In view of the high mortality of live pigs due to diseases in China, it is particularly important to establish an efficient harmless method for treating diseased pig carcasses. [Objective] In order to improve the harmless treatment efficiency of compost on diseased pig carcasses. [Methods] We screened out the strains with protein and fat degradation functions and formulated the compound bacterial agents. Single factor experiments and response surface method were employed to optimize the strain ratio and degradation conditions. The degradation performance of compound bacterial agents on diseased pig carcasses and sawdust compost were evaluated. [Results] Strain DB1 was identified as *Serratia marcescens* with a protease activity of 36.76 U/mL and a degradation rate of 72.17% for pig carcass. Strain ZF2 was *Bacillus velezensis*, with a lipase activity of 12.33 U/mL and a degradation rate of 70.83% for pig carcass. The optimal ratio of DB1 to ZF2 in compound bacterial agent was 2.55:1, and the optimal degradation conditions obtained by response surface optimization were as follows: temperature at 31.65 °C, inoculation amount of 3.11%, pH 6.0, salinity of 0.75%, and Mn²⁺ concentration of 1 mmol/L. A degradation test was carried out under the optimum conditions, which showed a degradation rate of 90.61% after 7 days. The composting test showed that the peak temperature of compost in the control group and the low-, medium-, and high-amount inoculation groups could reach 60, 64, 69, and 62 °C, respectively. The group with an inoculation amount of 3% had the best treatment performance, with the high temperature period lasting for 19 days and the carcass degradation rate of 98.06%. All the indicators of this group were superior to those of the control group ($P<0.01$). [Conclusion] In this study, we designed the degradation test according to the fat/lean ratio of pig carcass for the first time to evaluate the performance of functional bacteria, which was superior to the previous methods. Taking the degradation rate as the evaluation index, we optimized the strain ratio of functional bacteria. Compared with those in previous studies, the compound bacterial agent designed in this study can well accelerate the temperature rise of composting and the degradation of pig carcass.

Keywords: diseased pig carcass-degrading bacteria; compound bacterial agent; strain ratio; compost

近年来,我国养殖业发展迅速,呈现出规模化、集约发展趋势。截至2019年末,我国生猪出栏5.4亿头,肉鸡出栏122亿羽,牛出栏

4 534万头,养殖规模均位于世界前列。然而由于我国动物疫病种类较多,每年由疫病导致的畜禽死亡造成了巨大的经济损失^[1]。其中生猪

病死率较高, 每年高达 8%–12%^[2]。若大量病死猪尸体未能及时处理, 可能会导致疫病的进一步传播。据统计约 75% 的人类新发传染病都源于动物^[3], 并且大部分可通过动物尸体或毛发进行二次传播^[4]。因此, 病死猪尸体的堆积不仅会造成经济损失, 还会造成安全隐患。如何快速高效地处理病死猪尸体, 已成为养殖业亟待解决的问题。传统的病死猪无害化处理方法中深埋法处理速度极慢、焚烧法容易造成二次污染、化制法设备成本偏高且对人员和操作要求较高。然而堆肥法仅需要将动物尸体和木屑、秸秆等基质合理摆放即可进行无害化处理^[5]。相较而言, 堆肥法虽然耗时较长, 但因其具有操作方便、成本低廉的优点而被广泛应用^[6-7]。堆肥处理病原的效果也较好, 堆肥后鸡源病毒于 10–20 d 灭活^[8], 牛源新城疫病毒需 7 d^[9], 猪源口蹄疫病毒于 10 d 失活^[10], 20–25 d 后寄生虫及虫卵均失活^[11]。

堆肥法处理病死猪尸体的原理是微生物发酵产酶对高分子有机物进行酶解^[12], 然而传统的自然堆肥中微生物匮乏且产酶能力较差, 这会导致有机物降解率偏低^[13]。研究证明, 在病死畜禽尸体堆肥中接种外源微生物可以加快堆肥进程并提高有机物降解率^[14-15]。其中, 复合菌的堆肥应用效果一般要优于单菌, 其原因有以下 3 点: (1) 有机物的分解需要依靠生化反应完成, 而绝大多数生化反应的进行需要多种微生物共同作用^[16]; (2) 复合菌耐受性更强, 可以在复杂的生态环境中维持较强的功能; (3) 堆肥中有机物成分较多而单菌产酶种类不全且比例不协调, 而复合菌所产酶系更有利于有机物的完全分解。

研究发现, 大部分芽孢杆菌属、厚壁菌门、变形菌门和放线菌属等具有产酶能力, 是病死猪尸体堆肥过程中的主导菌^[6], 同时也是

进行病死猪无害化处理的常用菌种^[7]。目前相关的研究多集中于功能微生物的筛选和组合。根据有机物组成对复合菌的菌种配比进行优化可显著提高复合菌的作用效果^[17-18]。鉴于此, 本研究从堆肥样品中分别筛选了一株蛋白质降解菌和脂肪降解菌并构建了复合菌剂, 通过单因素和响应面方法根据复合菌降解猪肉的效果优化其菌种配比及降解条件, 接种于病死猪尸体堆肥进行效果评价, 以期病死猪尸体无害化处理提供菌种资源和理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

菌株分离样品来源于病死猪尸体和锯末堆肥堆体, 堆肥试验所用病死猪尸体取自长春市周边某养殖场, 锯末为市场。

1.2 培养基

富集培养基: 胰酪蛋白胨 10.0 g/L, 橄榄油 10.0 mL, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L, NaH₂PO₄ 2.0 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, MgSO₄ 1.0 g/L; 酪蛋白培养基^[19]; 三丁酸甘油酯培养基^[20]; LB 液体培养基 (g/L): NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0 (固体培养基需添加 2% 琼脂粉)。

上述培养基均在 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.3 菌株筛选

1.3.1 初筛

使用无菌称量勺称取 10 g 病死猪尸体和锯末堆肥样品加入 100 mL 含玻璃珠的无菌生理盐水中, 37 °C、120 r/min 振荡培养 1 h 后静置 0.5 h。吸取 2 mL 上清液加入富集培养基中, 37 °C、120 r/min 振荡培养 48 h。将菌液稀释涂布于固体培养基上, 挑取不同形态菌落进行划线分离。将纯化的菌株点种于酪蛋白培养基和三丁酸甘油酯培养基中, 选择透明圈与菌落直径比值较大的菌株保存并进行复筛。

1.3.2 复筛

酶活力实验: 将初筛所得菌株接种于LB液体培养基, 37 °C、120 r/min 振荡培养 24 h 作为种子液。吸取种子液 1 mL 加入 100 mL 的 LB 液体培养基, 37 °C、120 r/min 培养 48 h。将菌液于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。根据福林法^[21]和橄榄油浮化法^[22]测定粗酶液的蛋白酶和脂肪酶活力。

猪肉降解实验: 按照生猪中瘦肉与肥肉的比例^[23-24]称取 10.5 g 猪肉, 使用无菌生理盐水反复冲洗数次后置于无菌尼龙袋(80目)中, 放入 100 mL 的 LB 液体培养基中备用。培养菌株至对数生长期 OD_{600} 为 1.0, 并利用稀释涂布法调节菌浓度为 1×10^8 CFU/mL。实验组接种 1 mL 菌液, 对照组接种 1 mL 无菌 LB 液体培养基, 均置于 37 °C、120 r/min 培养 7 d。将尼龙袋中剩余猪肉烘干称重, 计算猪肉降解率。

$$Q_1 = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100\%$$

式中: Q_1 : 猪肉降解率(%); m_0 : 尼龙袋中原始猪肉干重(g); m_1 : 尼龙袋中剩余猪肉干重(g)。

1.4 菌株鉴定

将筛选出的菌株进行菌落形态学观察和革兰氏染色。并使用细菌基因组提取试剂盒进行 DNA 提取, 使用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1429R (5'-GG TTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。产物经纯化后连接至 PMD18-T 载体并转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 阳性克隆子送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 并利用 MEGA 7.0 软件进行多重序列比对分析, 并以 neighbor-joining 法构建系统发育树确定菌株的分类学地位。

1.5 复合菌剂的构建

1.5.1 拮抗实验

将 100 μ L 菌液均匀涂布于固体培养基, 然后将牛津杯放于培养基上并按压紧实。向杯中加入 100 μ L 另一待试菌液, 对照组加入 100 μ L 的 LB 液体培养基, 37 °C 正置培养 24 h 后通过有无抑菌圈产生来确定菌株之间是否存在拮抗作用。

1.5.2 最佳复合菌的确定

按照蛋白质降解菌和脂肪降解菌复配原则, 并结合拮抗作用进行随机组合构建复合菌。将处于对数生长期的各菌浓度调节至 1×10^8 CFU/mL, 根据复配结果等体积比混合构建复合菌, 并按照 1.3.2 的方法对各组复合菌的猪肉降解率进行测定。

1.5.3 粗酶酶活温度稳定性

按照 1.3.2 中方法制备粗酶液, 将酶反应温度分别设为 30、40、50、60、70、80 °C 后测定酶活力。最高酶活定义为 100%, 其余换算为相对酶活。同时, 将粗酶液分别于 30、40、50、60、70 和 80 °C 水浴保温 2 h 后测定酶活性, 测试酶的温度稳定性。

1.6 复合菌降解条件优化

1.6.1 单因素试验

按照 1.3.2 中方法进行猪肉降解实验, 考察菌种配比(7:1、5:1、3:1、1:1、1:3、1:5、1:7)、初始 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)、温度(20、25、30、35、40 °C)、接种量(1%、3%、5%、7%、9%)、盐度(0.50%、0.75%、1.00%、1.25%、1.50%、1.75%)、金属离子(Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^+)、 Mn^{2+} 浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L), 以及培养时间(1、3、5、7、9 d)对降解率的影响。

1.6.2 响应面试验

为了进一步确定菌剂的最佳菌种配比和接种量, 同时排除单因素之间的交互作用。结合单因素试验结果, 利用响应面 Box-Behnken 法

对菌株配比、温度、接种量进行三因素三水平响应面试验方案设计。采用 Design Expert 8.0 软件进行响应面分析, 试验因素水平及编码见表 1。

1.6.3 验证实验

在优化后条件下进行试验, 通过比较预测值和实验值以验证模型的有效性。

1.7 堆肥实验

1.7.1 堆肥原料

以病死猪尸体(粉碎)和锯末进行堆肥, 原料理化性质如表 2 所示。堆肥装置为泡沫箱(内径 390 mm×280 mm×540 mm, 厚度 6 mm), 为保证好氧发酵在侧壁设有通风孔。菌剂为本研究构建的复合菌剂, 按照优化后条件进行培养备用。

1.7.2 堆肥方案

堆肥方案如表 3 所示。堆肥物料总重设置为 10 kg, 包括 5 kg 猪尸体和 5 kg 锯末。此外, 用蒸馏水和尿素将水分调节为 65%, 碳氮比调节为 30:1。本实验设置空白对照组、低、中和高接种量组这 4 个处理, 依据优化结果复合菌的

表 1 Box-Behnken 试验因素水平及编码

Table 1 Box-Behnken test factor level and coding

水平	A 温度	B 菌株配比	C 接种量
Level	A Temperature (°C)	B Strain ratio	C Inoculation amount (%)
-1	25	1:1	1
0	30	3:1	3
1	35	5:1	5

低、中、高接种量分别为物料湿重的 1%、3%、5%, 每组设置 3 个重复(每组需称取 300 g 碎肉装入尼龙袋(80 目)中, 每个堆肥箱中设置 3 个重复)。每天对堆肥中心和环境温度进行监测并记录, 每 5 d 进行 1 次翻堆, 翻堆同时测量尼龙袋中剩余猪肉的重量并适当补充水分。

病死猪尸体降解率计算公式如下:

$$Q_2 = \frac{m_2 - m_3}{m_2} \times 100\%$$

式中: Q_2 : 病死猪尸体降解率(%); m_2 : 尼龙袋中原始猪尸体重量(g); m_3 : 尼龙袋中剩余猪尸体重量(g)。

表 2 堆肥材料的基本理化性质

Table 2 Basic physical and chemical properties of composting materials

原料	全碳	总氮	含水率	碳氮比
Raw material	Total carbon (g/kg)	Total nitrogen (g/kg)	Moisture content (%)	C/N
猪尸体	194.03	15.09	70.00	12.86
Swine corpse				
锯末	486.69	1.54	0.01	316.03
Sawdust				

表 3 堆肥方案

Table 3 Composting scheme

Item	猪尸体	锯末	菌剂	水	尿素
	Swine corpse (kg)	Sawdust (kg)	Bactericide (g)	Water (kg)	Urea (g)
对照组	5.00	5.00	0.00	8.57	65.86
Control group					
低接种量组	5.00	5.00	185.71	8.38	65.86
1% group					
中接种量组	5.00	5.00	557.14	8.01	65.86
3% group					
高接种量组	5.00	5.00	928.57	7.64	65.86
5% group					

1.8 统计分析

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析, 采用 GraphPad Prism 8.0 作图, 并采用 Design Expert 12.0 软件进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的筛选

筛选共获得 6 株具有蛋白质或脂肪降解能力的菌株, 对这 6 株菌进行酶活力测定和猪肉降解实验。其中 DB1、DB2、ZF1、ZF2 这 4 株菌降解猪肉能力较强且具有一定产酶能力, 而 FL1D 和 DQ2 能力较差, 不进行研究(表 4、图 1)。

2.2 菌株鉴定

菌株 DB1 的形态学鉴定结果如图 2A、2B 所示, LB 培养基上呈圆形乳白色, 表面光滑, 湿润不透明。革兰氏染色阴性, 菌体呈短杆状。菌株 ZF2 的形态学鉴定结果如图 2C、2D 所示, LB 培养基上边缘粗糙不规则, 中心白色, 边缘淡黄色有芽孢。革兰氏染色阳性, 菌体呈杆状。

将测序结果与 NCBI 上已知菌种的 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 比对, 并使用 MEGA 7.0 进行 neighbor-joining 系统发育树的构建, 结果如图

3 及图 4 所示。DB1 与 *Serratia marcescens* strain AA380 相似性达到 98.00%, 由此确定菌株 DB1 为粘质沙雷氏菌。将菌株 16S rRNA 基因序列上传 GenBank, 获得登录号为 MZ683274。ZF2 与 *Bacillus velezensis* strain LZH-Z23 相似性达到 98.00%, 确定菌株 ZF2 为贝莱斯芽孢杆菌。将菌株 16S rRNA 基因序列上传 GenBank, 获得登录号为 MZ683385。

2.3 复合菌的构建

2.3.1 拮抗实验

对筛选得到的 4 株菌进行牛津杯对峙实验, 观察抑菌圈产生情况以判断菌株间有无拮抗作用。结果如图 5 所示, 各菌株间均不存在拮抗性。结合脂肪与蛋白质降解菌复配的原则, 构建了 5 组复合菌: A 组(DB1、ZF1、ZF2)、B 组(DB1、DB2、ZF1)、C 组(DB1、ZF1)、D 组(DB1、ZF2)和 E 组(DB2、ZF1)。

2.3.2 最佳复合菌的确定

分别测定 5 组复合菌降解猪肉的能力, 结果如图 6 所示。各组复合菌对猪肉的降解率分别为 A 组 57.63%、B 组 63.68%、C 组 69.93%、D 组 75.33%、E 组 65.00%。复合菌 D 与单一菌株相比具有更强的猪肉降解能力, 并且在所构

表 4 菌株筛选结果

Table 4 Screening results of strains

菌株编号 Strain No.	蛋白酶活 Protease activity (U/mL)	脂肪酶活 Lipase activity (U/mL)	猪肉降解率 Pork degradation rate (%)
DB1	36.76±2.20a	3.33±0.42a	72.17±2.50a
DB2	33.77±1.50b	6.32±0.66b	68.88±3.30a
ZF1	7.57±1.10c	11.33±0.33a	54.64±2.60b
ZF2	3.83±0.80d	12.33±0.33a	70.83±3.10a
FL1D	7.56±0.75c	5.62±0.66b	43.36±4.40c
DQ2	6.80±1.23c	6.32±0.42b	42.26±3.20c

注: 不同小写字母代表处理间差异显著($P<0.05$), 以下图表相同

Note: Different lowercase letters represent significant differences between treatments ($P<0.05$), the following figures and charts are the same.

建的 5 组复合菌中效果最强。因此选择 D 组作为优选复合菌进行后续优化实验。

如图 7A 所示, 构成复合菌的蛋白酶产生菌 DB1 和脂肪酶产生菌 ZF2 所产酶的最适反应温度均为 50 °C, 并且可在 40–60 °C 的范围内保持 70% 以上的相对活性。从图 7B 可知, 两菌所产粗酶在温度低于 50 °C 的情况下均保持稳定, 60 °C 时 DB1 和 ZF2 所产粗酶仍可分别保持 $40.58\% \pm 5.92\%$ 和 $50.36\% \pm 4.34\%$ 的相对酶活力。由此可见, 该复合菌具有病死猪尸体堆肥应用的潜力。

2.4 复合菌降解条件优化

2.4.1 单因素试验

研究不同菌株配比、pH、温度、接种量、盐度、金属离子及浓度和发酵时间对复合菌降解猪肉的影响, 结果分别如图 8 所示。

由图 8 可知, 复合菌中 DB1 与 ZF2 的最佳菌

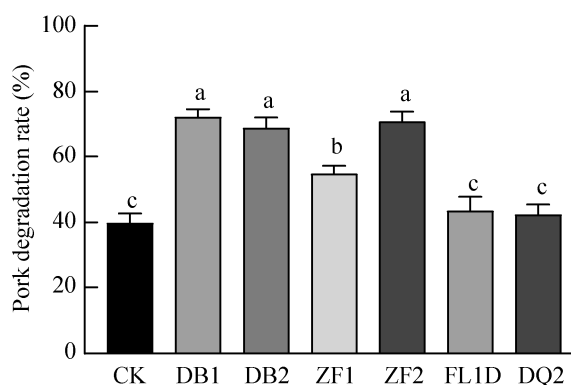


图 1 各菌的猪肉降解率

Figure 1 Pork degradation rate of each bacterium.

种配比为 3:1, 此时猪肉降解率达到 84.42%, 较优化前提高 9.09%。单因素结果显示, 复合菌降解猪肉的最适条件为温度 30 °C, 接种量 3%、pH 6.0、盐度 0.75%、 Mn^{2+} 浓度 1.0 mmol/L, 至 7 d 时猪肉降解率趋于稳定。

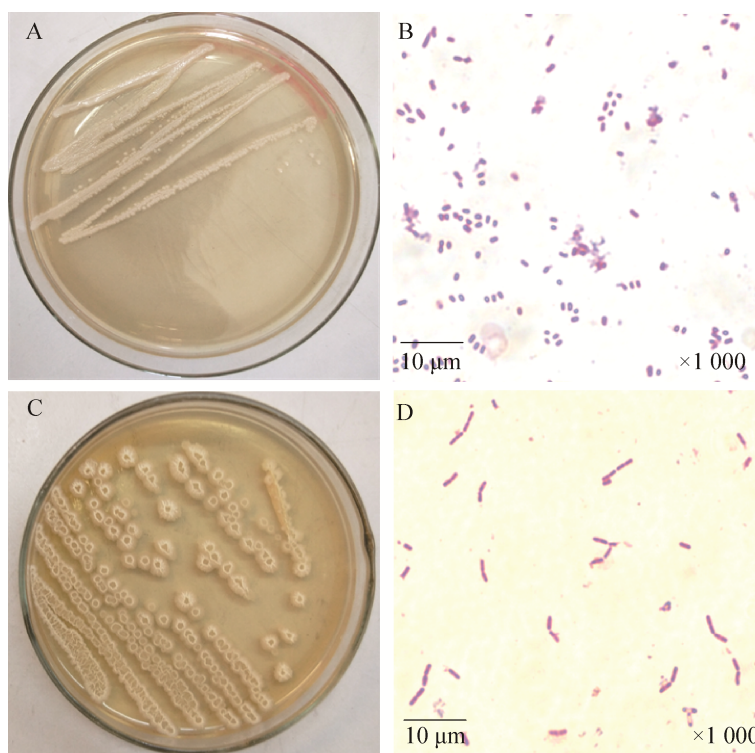


图 2 菌株菌落及菌体形态 A、B: DB1 的菌落及菌体形态; C、D: ZF2 的菌落及菌体形态

Figure 2 Strain morphology and Gram staining phenotype. A, B: Colony and cell morphology of DB1; C, D: Colony and cell morphology of ZF2.

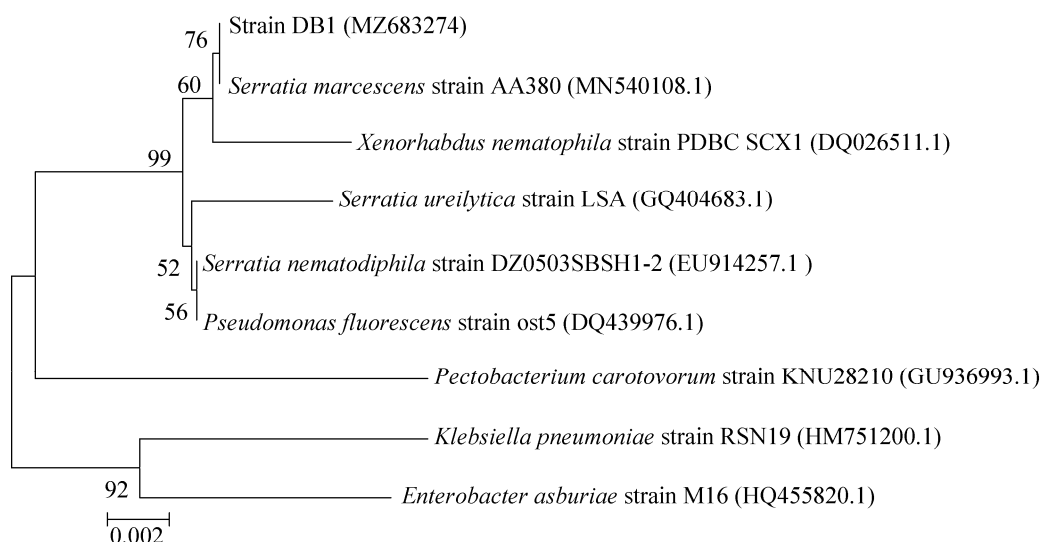


图 3 DB1 的系统发育树 括号中序号表示对应菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示不同支在进化上的亲缘关系; 距离标尺表示序列间差异数值的单位长度

Figure 3 Phylogenetic tree of DB1. The serial number in parentheses represents the GenBank accession number of the corresponding strains; The number on the branch point represents the phylogenetic relationship of different branches; The distance scale represents the unit length of the difference between sequences.

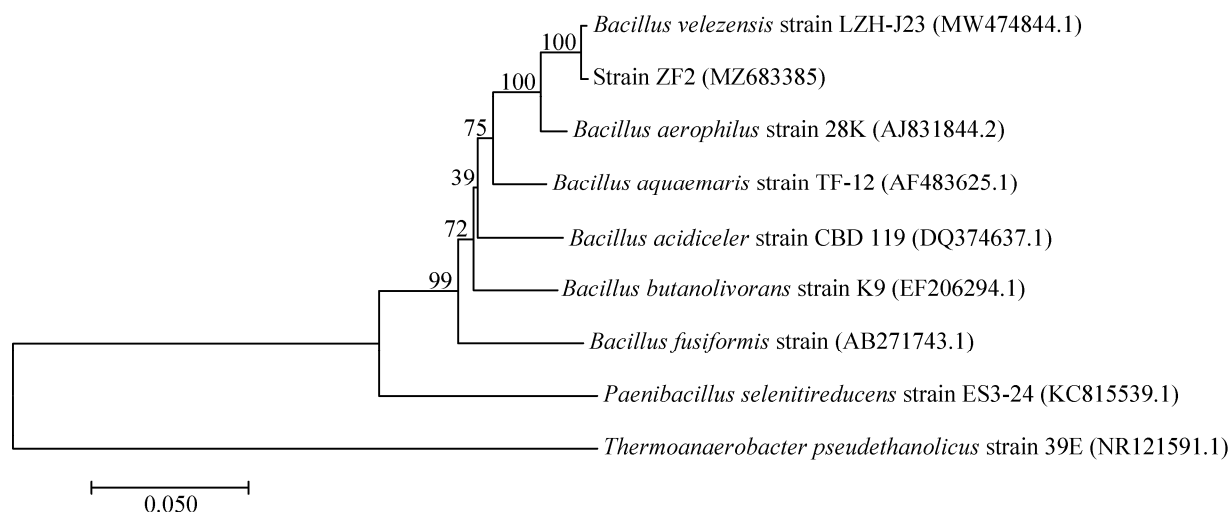


图 4 ZF2 的系统发育树 括号中序号表示对应菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示不同支在进化上的亲缘关系; 距离标尺表示序列间差异数值的单位长度

Figure 4 Phylogenetic tree of ZF2. The serial number in parentheses represents the GenBank accession number of the corresponding strains; The number on the branch point represents the phylogenetic relationship of different branches; The distance scale represents the unit length of the difference between sequences.

此外,复合菌接种量高于3%时,猪肉降解率呈现降低趋势,原因可能是菌液浓度过高而培养基中营养物质不足^[25]。然而 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 对猪肉降解率均有促进作用, Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 和 K^{+} 则存在不同程度的抑制作用。这是因为金属离子可以改变酶的空间结构影响酶活性,从而促进或者抑制复合菌降解猪肉^[26-27]。

2.4.2 响应面试验

为了进一步确定菌剂的最佳菌株配比和接种量,同时分析各因素间是否存在交互作用。在单因素试验基础上(图8、表5),根据 Box-Behnken 中心复合设计原理,以温度(A)、菌种配比(B)和接种量(C)为3个自变量,以猪肉降解率为因变量设计了三因素三水平的响应面分析试验,具体结果如表6所示。

对表6中的数据进行多元回归拟合,获得猪肉降解率对温度、菌种配比、接种量的二元多次回归方程为:猪肉降解率 $=90.77+7.17A-1.88B+1.70C+1.45AB-3.56AC+0.59BC-10.10A^2-3.07B^2-3.61C^2$ 。

试验模型的回归分析结果如表7所示,所选模型 $P<0.01$,说明建立的模型有意义。失拟值检测为 4.96 ($P>0.05$),差异不显著,说明方程拟合情况较好。模型校正决定系数 R^2 为 0.938 9,

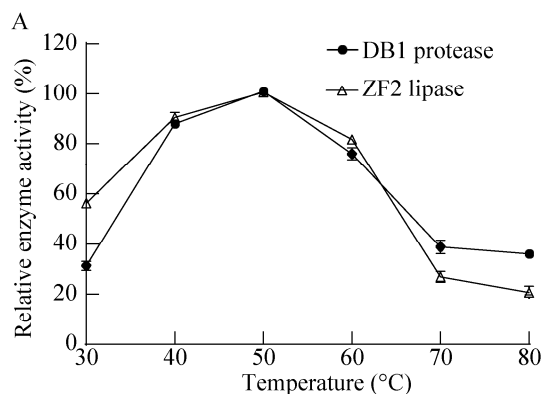


图7 温度对酶活性(A)及酶活稳定性(B)的影响

Figure 7 Effect of temperature on enzyme activity (A) and stability (B).

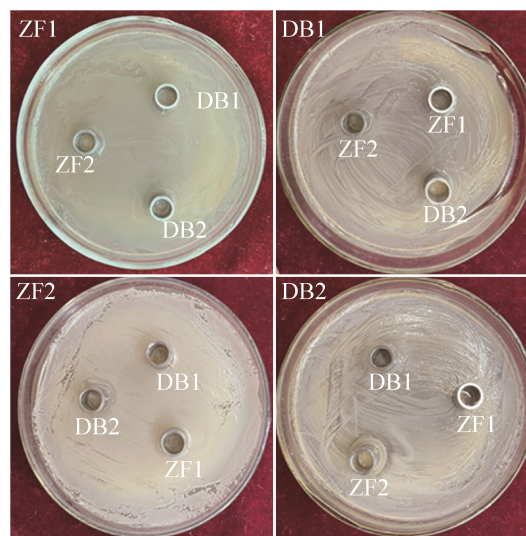


图5 菌株拮抗实验

Figure 5 Strain antagonism test.

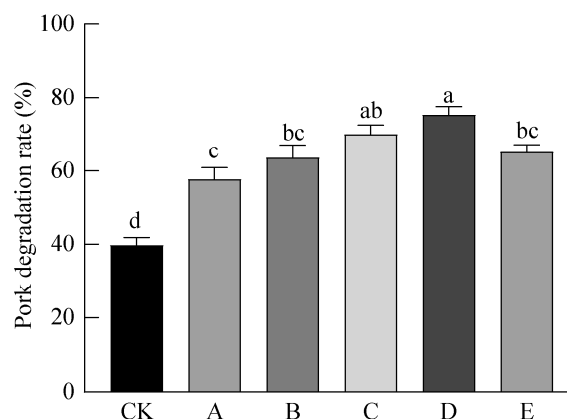
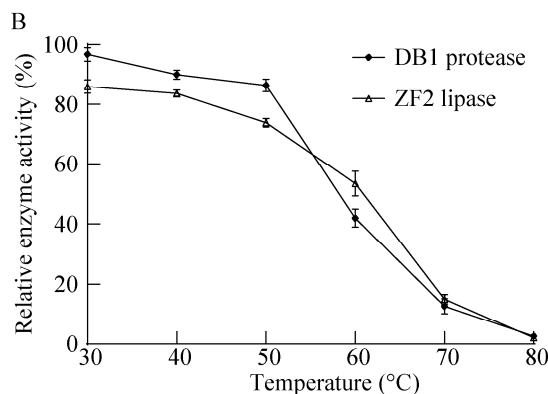


图6 复合菌的猪肉降解率

Figure 6 Pork degradation rate of compound bacteria.



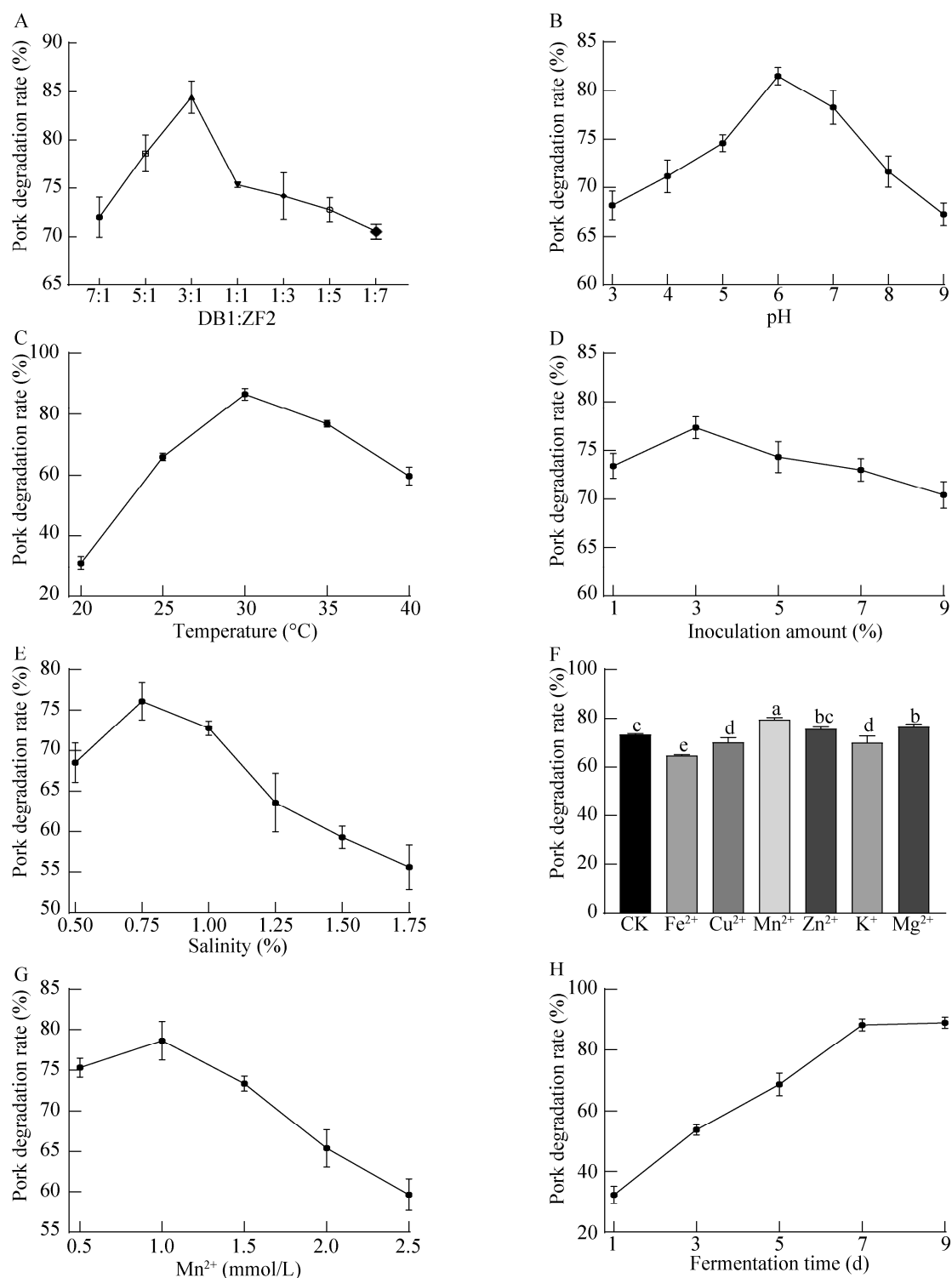


图8 单因素对复合菌降解猪肉效果的影响 A: 菌株配比; B: 初始 pH; C: 温度; D: 接种量; E: 盐度; F: 金属离子; G: 金属离子浓度; H: 发酵时间

Figure 8 Effect of single factor on the degradation of pork by composite bacteria. A: Strain ratio; B: Initial pH; C: Temperature; D: Inoculation amount; E: Salinity; F: Metal ions; G: Metal ion concentration; H: Fermentation time.

说明此模型能解释 93.89% 的响应值变化, 即模型与数据拟合度良好。因此, 该模型对复合菌降解猪肉条件的优化合理而有效。

根据回归方程绘制响应面和等高线图, 结果如图 9 所示。由图 9 和表 7 可知温度对降解效果有极显著影响, 3 种因素对猪肉降解率影响表现为温度>菌种配比>接种量。响应面优化最佳条

表 5 三因素的三水平数据

Table 5 Three level data of three factors

水平	A 温度	B 菌种配比	C 接种量
Level	A Temperature (°C)	B Strain ratio	C Inoculation amount (%)
-1	65.89±1.21	78.58±1.91	73.41±1.28
0	86.50±1.89	84.42±1.66	77.33±1.13
1	76.75±1.09	75.33±0.29	74.31±1.60

表 6 响应面法设计的 17 组试验方案及结果

Table 6 The response surface method was used to design 17 experimental schemes and results

编号	A 温度	B 菌种配比	C 接种量	降解率
No.	A Temperature (°C)	B Strain ratio	C Inoculation amount (%)	Degradation rate (%)
1	0	-1	1	85.55
2	-1	0	-1	61.65
3	0	0	0	91.85
4	1	0	-1	87.90
5	-1	-1	0	77.10
6	0	-1	-1	84.50
7	0	1	1	84.85
8	1	0	1	85.35
9	0	0	0	89.45
10	0	0	0	91.45
11	0	0	0	92.95
12	1	1	0	81.00
13	1	-1	0	83.75
14	0	1	-1	81.45
15	-1	1	0	68.55
16	-1	0	1	73.35
17	0	0	0	88.15

表 7 模型回归分析

Table 7 Model regression analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
Model	1 087.10	9	120.79	11.96	0.001 8
A	411.13	1	411.13	40.70	0.000 4
B	28.31	1	28.31	2.80	0.138 0
C	23.12	1	23.12	2.29	0.174 1
AB	8.41	1	8.41	0.83	0.391 9
AC	50.77	1	50.77	5.03	0.059 9
BC	1.38	1	1.38	0.14	0.722 5
A ²	429.30	1	429.30	42.50	0.000 3
B ²	39.75	1	39.75	3.93	0.087 7
C ²	54.87	1	54.87	5.43	0.052 6
残差 Residual	70.71	7	10.10		
失拟 Lack of fit	55.73	3	18.58	4.96	0.078 0
纯误差 Pure error	14.99	4	3.75		
总和 Cor total	1 157.81	16			

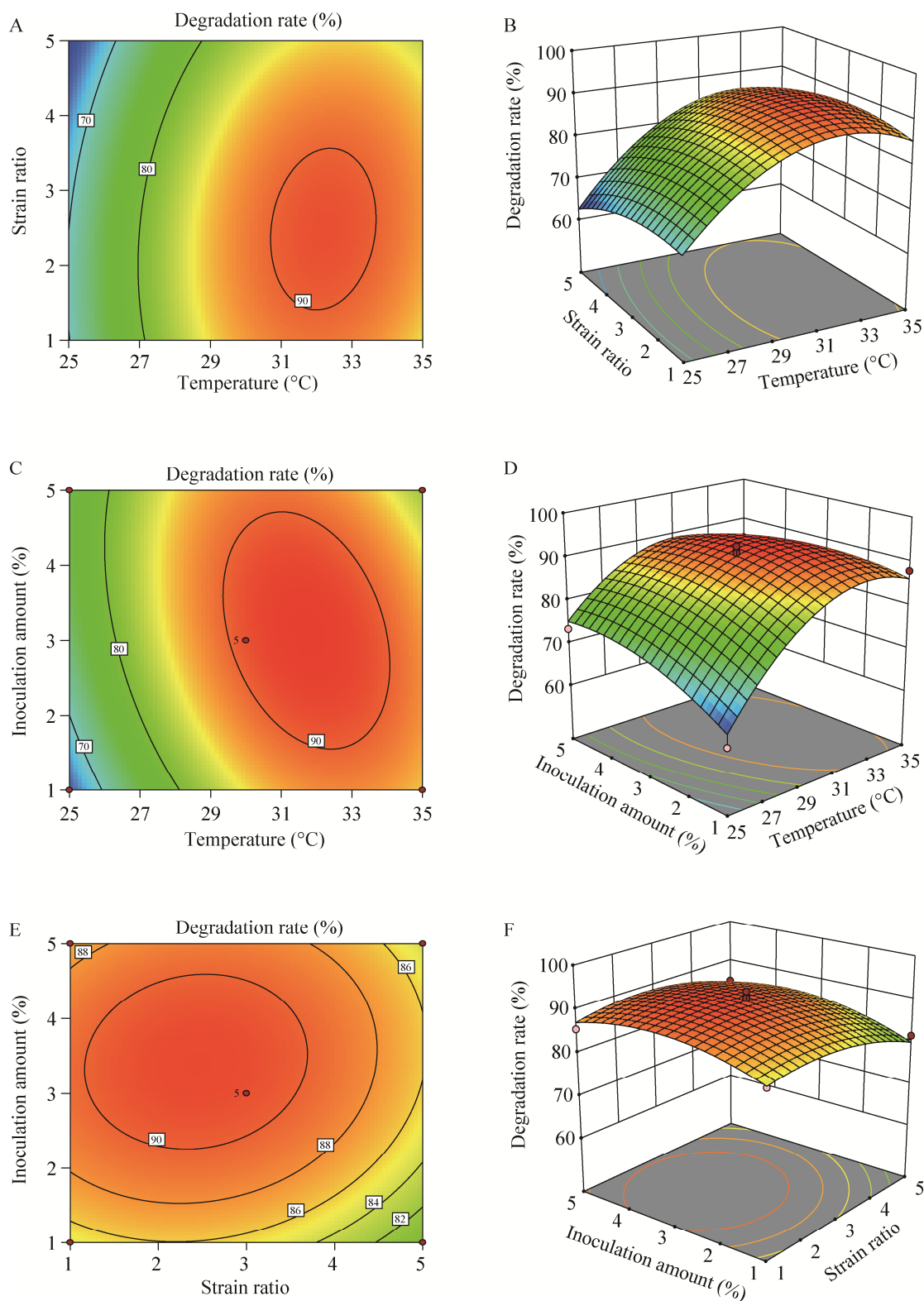


图9 响应面图和等高线图

Figure 9 Response surface plot and the corresponding contour plot.

件:温度 31.65 °C,菌种配比 2.55,接种量 3.11%,猪肉降解率为 92.21%。在此条件下进行 3 次平行降解实验,所得猪肉实际降解率为 90.61%,与理论值拟合度达到 98.26%。表明通过响应面法对复合菌降解猪肉条件的优化合理有效,并具有实际意义。

2.5 堆肥实验结果

2.5.1 温度

本实验静态耗氧堆肥持续了 25 d,环境及各组堆体温度随时间变化如图 10 所示,各组堆肥温度均经历升温、维持然后下降的过程。与对照组相比,1%、3%和 5%接种量组进入高温期(大于 55 °C)的时间分别提前了 1、2、2 d,并且高温期分别显著延长了 8、13、8 d ($P<0.05$)。微生物矿化和代谢有机物时积累的热量是堆肥升温的原因^[28],结果表明接种复合菌可以显著促进堆肥升温。此外,堆肥过程中 1%、3%和 5%接种量组峰值温度分别为 64.0、69.0 和 62.0 °C,均显著高于对照组的峰值温度 60 °C ($P<0.05$)。在所有处理中 3%接种量组的高温期持续时间最长且峰值温度也最高,因此在本研究中 3%的接种量更有利于堆肥升温。随

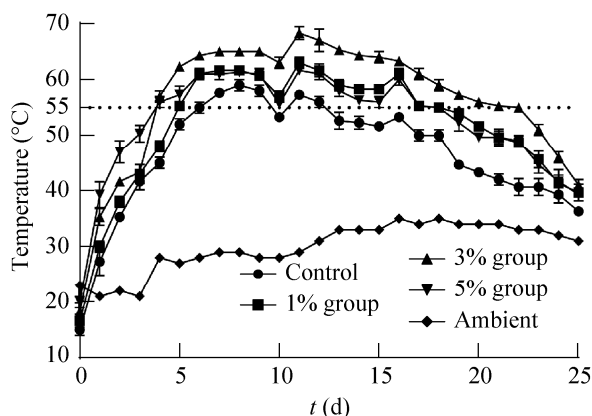


图 10 堆肥过程中外环境及堆体的温度变化

Figure 10 Temperature changes of external environment and pile during composting.

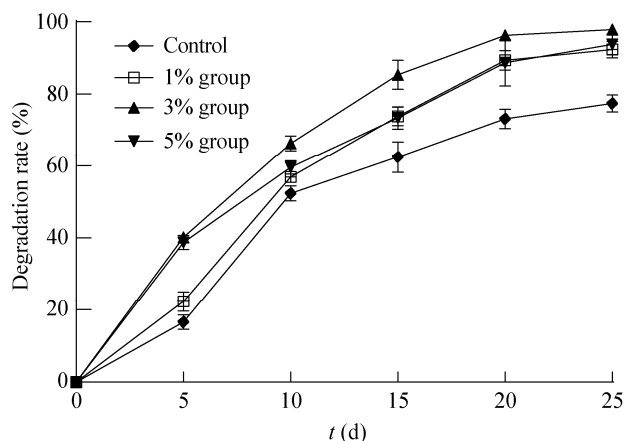


图 11 堆肥过程中降解率的变化

Figure 11 Change of degradation rate during composting.

着有机物不断分解,微生物活性变低,堆肥后期各组温度逐渐降低,此时堆肥已经完全腐熟。

2.5.2 降解率

堆肥过程中各组病死猪尸体降解率变化如图 11 所示,均随时间延长逐渐增加。与对照组相比,接菌各组在堆肥初期降解速率均较高,这是因为复合菌快速繁殖产生大量脂肪酶和蛋白酶促进了尸体分解^[29]。堆肥结束时,对照组和 1%、3%、5%接种量组的降解率分别为 78.44%和 92.89%、98.06%、94.22%,接菌各组降解率均显著高于对照组($P<0.05$)。经计算,1%、3%和 5%接种量组降解率分别比对照组提高了 13.86%、19.06%和 15.22%。与实验室规模的降解实验相比堆肥中猪肉降解速率较低,这是因为堆肥环境的发酵条件较差。结果表明,接种复合菌可以提高病死猪降解率,加快堆肥进程。所有处理中 3%接种量组病死猪降解率最高,更适合于短期小规模病死猪尸体堆肥处理。可见接种量过大会影响菌剂发挥作用,这与 Duan 等的研究结果相同^[30]。

3 讨论

病死猪尸体堆肥是微生物以猪尸体为主要

氮源,以堆体基质(秸秆、锯末、稻壳等)为主要碳源进行发酵,从而对有机物进行分解。同时,微生物发酵过程中积累的高温还可以杀灭病原,从而达到病原无害化的目的^[31]。堆肥用外源微生物菌株根据其作用条件,可以分为低温、中温和高温降解菌三类。其中,低温菌主要负责在低温环境中快速启动堆肥^[32]。中温菌一般都具有较高的产酶能力,其适宜生长条件在堆肥前期^[33],接种后可提高堆肥中降解酶的活性,在快速酶解有机物时产热延长高温期^[34-36]。高温菌的作用一般是促进难分解有机物进一步分解^[37],并提高堆肥的峰值温度。此外,不同类型菌剂的接种方式也不同。低温和中温菌剂多于堆肥初期添加以促进升温,加快堆肥进程。分段多次接种的方式适用于高温或腐熟菌剂,可以提高菌剂的存活能力^[36]。然而病死猪尸体中存在病原,分段多次接种会反复暴露尸体易造成病原泄露。综合考虑,本研究构建了具有高效猪肉分解能力的中温菌剂,于堆肥初期进行接种加速堆肥进程。

堆肥中有机物种类复杂,单一菌产酶种类较少导致应用堆肥后有机物降解率仍偏低^[38]。相较而言,复合菌产酶种类丰富,是进行堆肥研究的重点^[39]。本研究构建的复合菌最适发酵条件为 31.65 °C,说明其可在堆肥前期高效产酶。复合菌所产的降解酶为耐热酶类,均在 50 °C 时具有最大活性,这与分离菌株的样品环境有关^[40]。在≤50 °C 范围内酶活性随着温度升高而提高,且在 30–50 °C 的范围内酶活性均保持稳定。堆肥实验中,在高温期前所有实验组堆肥升温速度及病死猪降解速率均高于对照组。由此可见,复合菌具有加快堆肥进程,提高病死猪降解率的能力。

目前在研究病死猪降解复合菌时,多以多种降解酶的活力作为评价指标,将高产酶菌种

进行组合以追求复合菌的高酶活性^[41-43]。该方法中测定酶活力所用底物并非猪肉,酶与底物亲和性可能不同,易导致结果偏差。本研究首次根据生猪的肥瘦比进行模拟降解实验,并以猪肉降解率评价复合菌的作用效果。相较而言,该方法所得结果直观可靠,具有一定借鉴意义。研究表明,优化菌种配比可显著提高复合菌的作用效果^[44-45]。前人工作中,需要以多个酶活力来进行效果评价,考虑指标较多导致不便展开优化工作^[41-43]。鉴于此,本研究以猪肉降解率作为单一评价指标,对蛋白质和脂肪降解菌的配比进行了优化。与优化前相比,猪肉降解率显著提高 9.09%,可见对菌种配比的优化合理且有效。

病死畜禽无害化处理的效果,最直观体现在两个方面:(1)堆肥能否持续维持高温以杀灭病原^[46];(2)病死动物是否充分降解^[41]。李海龙使用多株耐热芽孢杆菌构建了复合菌剂,接种堆肥后高温期维持 9 d,堆肥结束时病死猪降解率为 97.10%^[41]。嵇少泽等使用脂肪酶和蛋白酶产生菌构建复合菌系,高温期持续了 7 d,40 d 后病死猪降解率达 98.00%^[42]。本研究中接种 3%的复合菌可使堆肥高温期达 19 d,仅 25 d 病死猪即可降解 98.06%。相较而言,本研究构建的复合菌更有利于堆肥升温,高温期持续时间更长且相同时间内病死猪降解率更高,可见其更适合用于病死猪的无害化处理。

结果表明,添加适量本研究构建的复合菌可在提高堆肥温度的同时促进尸体的降解。在实际应用中,固态菌剂的环境耐受性更强,方便保存和运输^[43],而将化学、物理处理与微生物菌剂结合也可以提高菌剂的作用效果^[47]。因此在后续实验中可尝试将复合菌进行固定化,并将其与物理或化学处理联用以建立安全快速的病死猪尸体无害化处理方案。

4 结论

本研究筛选获得了高效猪肉降解菌 DB1 和 ZF2。经鉴定, DB1 为粘质沙雷氏菌, 所产蛋白酶活力为 36.76 U/mL, ZF2 为贝莱斯芽孢杆菌, 所产脂肪酶活力为 12.33 U/mL, 猪肉降解率分别为 72.17% 和 70.83%。

复合菌中 DB1 与 ZF2 最佳菌数比为 2.55:1, 最适降解条件为温度 31.65 °C, 接种量 3.11%、pH 6.0、盐度 0.75%, 发酵时间 7 d, 猪肉降解率可达 90.61%, 较 DB1 及 ZF2 的单菌株作用分别提高 18.44% 和 19.78%。

堆肥实验表明, 在病死猪尸体堆肥中接种复合菌可以加速堆肥升温、延长高温期并提高病死猪尸体的降解率。就本实验而言, 3% 的接种量更适合于短期小规模病死猪尸体堆肥处理。

REFERENCES

- [1] 陈腾飞, 吴志明, 刘阳利, 闫若潜, 谢彩华, 王淑娟, 李勤楠. 热辅快速生物发酵分解工艺无害化处理病死猪尸体效果评估[J]. 动物医学进展, 2015, 36(5): 81-85
Chen TF, Wu ZM, Liu YL, Yan RQ, Xie CH, Wang SJ, Li QN. Evaluation of effect on harmless treatment of dead pig carcass by process of rapid biological fermentation decomposition[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(5): 81-85 (in Chinese)
- [2] 王兴平. 病死动物尸体处理的技术与政策探讨[J]. 甘肃畜牧兽医, 2011, 41(6): 26-29
Wang XP. Discussion on technology and policy of dead animal carcass treatment[J]. Gansu Animal and Veterinary Sciences, 2011, 41(6): 26-29 (in Chinese)
- [3] 张振玲, 孙朋, 薛忠, 徐海飞. 堆肥无害化处理死猪概述[J]. 猪业科学, 2017, 34(4): 98-99
Zhang ZL, Sun P, Xue Z, Xu HF. Summary of harmless treatment of dead pigs by composting[J]. Swine Industry Science, 2017, 34(4): 98-99 (in Chinese)
- [4] Di Teodoro G, Valleriani F, Puglia I, Monaco F, Di Pancrazio C, Luciani M, Krasteva I, Petrini A, Marcacci M, D'Alterio N, et al. SARS-CoV-2 replicates in respiratory *ex vivo* organ cultures of domestic ruminant species[J]. Veterinary Microbiology, 2021, 252: 108933
- [5] 张振玲, 董淑红, 孙朋, 薛忠. 死亡动物无害化处理技术
- 术及当前我国死猪处理对策[J]. 家畜生态学报, 2018, 39(9): 83-86
- Zhang ZL, Dong SH, Sun P, Xue Z. Review of harmless disposal technology of animal carcasses and current strategies on disposing dead swine in China[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2018, 39(9): 83-86 (in Chinese)
- [6] Yang XC, Hu QQ, Han ZZ, Ruan XY, Jiang SW, Chai J, Zheng R. Effects of exogenous microbial inoculum on the structure and dynamics of bacterial communities in swine carcass composting[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2018, 64(12): 1042-1053
- [7] 李海龙, 李吕木, 钱坤, 许发芝. 病死猪堆肥高温降解菌的筛选、鉴定及堆肥效果[J]. 微生物学报, 2015, 55(9): 1117-1125
Li HL, Li LM, Qian K, Xu FZ. Isolation and identification of thermophilic bacteria for efficient dead-pig composting[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(9): 1117-1125 (in Chinese)
- [8] Senne DA, Panigrahy B, Morgan RL. Effect of composting poultry carcasses on survival of exotic avian viruses: highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus and adenovirus of egg drop syndrome-76[J]. Avian Diseases, 1994, 38(4): 733-737
- [9] 续彦龙, 王丽丽, 龚改林, 万磊兵, 李敬波, 李淑英, 尤建嵩, 徐永平. 堆肥法无害化处理染疫动物尸体的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(4): 138-141
Xu YL, Wang LL, Gong GL, Wan LB, Li JB, Li SY, You JS, Xu YP. Research progress on harmless treatment of infected animal carcasses by composting[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 47(4): 138-141 (in Chinese)
- [10] Guan J, Chan M, Grenier C, Brooks BW, Spencer JL, Kranendonk C, Copps J, Clavijo A. Degradation of foot-and-mouth disease virus during composting of infected pig carcasses[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2010, 74(1): 40-44
- [11] 王洪志, 杨克美, 陈世中, 种洪栋, 王永, 王爱华, 文勇立, 刘鲁术, 蔡子建. 堆肥发酵处理畜禽粪便杀灭寄生虫及虫卵的研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2013, 39(3): 307-310
Wang HZ, Yang KM, Chen SZ, Zhong HD, Wang Y, Wang AH, Wen YL, Liu LS, Cai ZJ. Investigation of livestock and poultry manure composting treatment to eliminate parasites and eggs[J]. Journal of Southwest University for Nationalities: Natural Science Edition, 2013, 39(3): 307-310 (in Chinese)
- [12] Zeng GM, Yu M, Chen YN, Huang DL, Zhang JC, Huang

- HL, Jiang RO, Yu Z. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(1): 222-227
- [13] Xi BD, He XS, Wei ZM, Jiang YH, Li MX, Li D, Li Y, Dang QL. Effect of inoculation methods on the composting efficiency of municipal solid wastes[J]. *Chemosphere*, 2012, 88(6): 744-750
- [14] 张德. SQ 复合微生物菌剂处理病死猪尸体效果研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2017
- Zhang D. Study on the effect of SQ compound microbial agent on the treatment of dead pig carcass[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [15] 田鹤. 低温缺氧环境下屠宰废弃物快速堆肥复合菌剂的制备与应用基础研究[D]. 绵阳: 西南科技大学硕士学位论文, 2018
- Tian H. Research on the preparation and application of rapid composting compound bacteria for slaughtered waste under low temperature and hypoxia conditions[D]. Mianyang: Master's Thesis of Southwest University of Science and Technology, 2018 (in Chinese)
- [16] 宋文哲. 复合菌群降解木质素的研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2014
- Song WZ. Biodegradation of lignin by composite flora[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2014 (in Chinese)
- [17] 王玉, 张晶, 曹云, 吴华山, 黄红英, 刘爱民. 极端嗜热功能菌筛选及其促进堆肥腐熟效果研究[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(7): 1633-1642
- Wang Y, Zhang J, Cao Y, Wu HS, Huang HY, Liu AM. Screening of functional extreme thermophiles and their effects on improving the maturation of composting[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(7): 1633-1642 (in Chinese)
- [18] 卞立红, 任国领, 何雯, 李颖, 王毅强, 杨爽. 基于两株菌的复合菌处理油田采出水效果评价[J]. *大庆石油地质与开发*, 2019, 38(4): 105-109
- Bian LH, Ren GL, He W, Li Y, Wang YQ, Yang S. Evaluation of the treated effect of oilfield produced water by the compound bacterium based on two bacteria[J]. *Petroleum Geology & Oilfield Development in Daqing*, 2019, 38(4): 105-109 (in Chinese)
- [19] 曹红, 王秀娟, 翁佩芳, 周小敏, 高志中, 吴祖芳, 张鑫. 海洋源蛋白酶产生菌筛选及酶学特性的初步研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(2): 93-100
- Cao H, Wang XJ, Weng PF, Zhou XM, Gao ZZ, Wu ZF, Zhang X. Preliminary study on screening of high protease production strain from marine and its enzymology characteristics[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(2): 93-100 (in Chinese)
- [20] 胡珺. 脂肪酶产生菌的筛选鉴定、产酶条件优化及酶学性质研究[D]. 武汉: 湖北工业大学硕士学位论文, 2017
- Hu J. Screening and identification of lipase producing bacteria, optimization of lipase producing conditions and enzymatic properties[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University of Technology, 2017 (in Chinese)
- [21] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 蛋白酶制剂 GB/T 23527—2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Proteinase preparations: GB/T 23527—2009[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese)
- [22] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 脂肪酶制剂 GB/T 23535—2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Lipase preparations: GB/T 23535—2009[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese)
- [23] 李贞明, 余苗, 马现永, 容庭, 孟繁明, 李宝红, 张洁, 李剑豪. 两种杂交组合猪肉品质比较[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(5): 80-86
- Li ZM, Yu M, Ma XY, Rong T, Meng FM, Li BH, Zhang J, Li JH. Comparison of pork quality between two hybrid combinations[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020, 47(5): 80-86 (in Chinese)
- [24] 李瑞, 鄢理洋, 侯改凤, 刘明, 贺长青, 田开胜, 姚亚玲, 李年富, 黄兴国. 湘西黑猪(大合坪黑猪)胴体性状及肉品质测定[J]. *养猪*, 2016(6): 65-68
- Li R, Wu LY, Hou GF, Liu M, He CQ, Tian KS, Yao YL, Li NF, Huang XG. Carcass and meat quality assay of Xiangxi black pig[J]. *Swine Production*, 2016(6): 65-68 (in Chinese)
- [25] 王亚军, 蔡文娟, 耿冲冲, 王惠, 张蓉, 陈甜靖, 李金守. 一株油脂降解菌的筛选及其降解条件优化[J]. *生态环境学报*, 2020, 29(5): 1031-1038
- Wang YJ, Cai WJ, Geng CC, Wang H, Zhang R, Chen TJ, Li JS. Screening of a oil-degrading strain and optimization of its degradation conditions[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2020, 29(5): 1031-1038 (in Chinese)

- [26] Zhang J, Qin XJ, Guo YP, Zhang QQ, Ma QG, Ji C, Zhao LH. Enzymatic degradation of deoxynivalenol by a novel bacterium, *Pelagibacterium halotolerans* ANSP101[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 140: 111276
- [27] Rossmann MG, Blow DM. The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit[J]. Acta Crystallographica, 1962, 15(1): 24-31
- [28] Bernal MP, Albuquerque JA, Moral R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment: a review[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(22): 5444-5453
- [29] Haselroth KJ, Wilke P, Dalla Costa IM, Lustoza Rotta VM, Rosado AF, Hermes E. Effectiveness of *Aeromonas hydrophila* for the removal of oil and grease from cattle slaughterhouse effluent[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 287: 125533
- [30] Duan ML, Zhang YH, Zhou BB, Qin ZL, Wu JH, Wang QJ, Yiu YN. Effects of *Bacillus subtilis* on carbon components and microbial functional metabolism during cow manure-straw composting[J]. Bioresource Technology, 2020, 303: 122868
- [31] Chung WJ, Chang SW, Chaudhary DK, Shin J, Kim H, Karmegam N, Govarthanam M, Chandrasekaran M, Ravindran B. Effect of biochar amendment on compost quality, gaseous emissions and pathogen reduction during in-vessel composting of chicken manure[J]. Chemosphere, 2021, 283: 131129
- [32] 单德鑫, 王岩, 张颖. 低温菌群筛选及对温度的影响[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(6): 40-46
Shan DX, Wang Y, Zhang Y. Screening of low temperature fermentation bacteria and effect of temperature[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2015, 46(6): 40-46 (in Chinese)
- [33] 张丹, 岳华, 杨惠兰, 兰书焕, 李旭东, 王臣, 谢翼飞. 基于环境微生物资源库快速构建易腐垃圾高效堆肥复合菌剂[J]. 微生物学报, 2021, 61(10): 3199-3210
Zhang D, Yue H, Yang HL, Lan SH, Li XD, Wang C, Xie YF. Fast-preparation of compost effective microorganisms (EM) for perishable garbage based environmental microbial repository[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(10): 3199-3210 (in Chinese)
- [34] Wan LB, Wang XT, Cong C, Li JB, Xu YP, Li XY, Hou FQ, Wu YY, Wang LL. Effect of inoculating microorganisms in chicken manure composting with maize straw[J]. Bioresource Technology, 2020, 301: 122730
- [35] 张祥永, 任静, 马彦霞, 郁继华. 微生物菌剂对牛粪堆肥中酶活性的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2016, 51(3): 65-71
Zhang XY, Ren J, Ma YX, Yu JH. Effects of microbial agents on enzymes activities during cow manure composting[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2016, 51(3): 65-71 (in Chinese)
- [36] 赵彬涵, 孙宪昀, 黄俊, 李少杰. 微生物在有机固废堆肥中的作用与应用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 223-240
Zhao BH, Sun XY, Huang J, Li SJ. Application and effects of microbial additives in aerobic composting of organic solid wastes: a review[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 223-240 (in Chinese)
- [37] Hemati A, Aliasgharzad N, Khakvar R, Khoshmanzar E, Asgari Lajayer B, Van Hullebusch ED. Role of lignin and thermophilic lignocellulolytic bacteria in the evolution of humification indices and enzymatic activities during compost production[J]. Waste Management, 2021, 119: 122-134
- [38] 何宙阳, 徐谓, 刘超, 刘红军, 李荣, 沈标, 沈其荣. 木质纤维降解复合菌剂促进堆肥腐熟研究[J]. 土壤, 2020, 52(4): 728-735
He ZY, Xu X, Liu C, Liu HJ, Li R, Shen B, Shen QR. Using wood fiber degrading compound microbial agents to promote maturity of composting[J]. Soils, 2020, 52(4): 728-735 (in Chinese)
- [39] 卢青青. 猪尸体好氧堆肥生物强化技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2017
Hu QQ. Study on biodegradating technology for aerobic composting of pig carcass[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [40] Sun FD, Sun QX, Zhang H, Kong BH, Xia XF. Purification and biochemical characteristics of the microbial extracellular protease from *Lactobacillus curvatus* isolated from Harbin dry sausages[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133: 987-997
- [41] 李海龙. 病死猪堆肥高温降解菌的筛菌、鉴定及其应用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2015
Li HL. Isolation and identification of thermophilic bacterium strains with high degradation and the effects on dead pig composting[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [42] 嵇少泽, 勾长龙, 张喜庆, 王羽, 田佳琪, 李晨, 刘继军, 高云航. 病死猪堆肥高效降解复合菌系的构建及应用效果[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(3): 528-533
Ji SZ, Gou CL, Zhang XQ, Wang Y, Tian JQ, Li C, Liu JJ, Gao YH. Construction and application of a highly efficient complex microbial system to degrade dead-pig carcass in

- compost and assessment of its efficiency[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(3): 528-533 (in Chinese)
- [43] 李晓宇, 王思佳, 王丽丽, 李纪彬, 李淑英, 徐建波, 魏炳栋, 徐永平. 牛屠宰废弃物的高效降解菌株分离鉴定及堆肥效果评价[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(5): 58-63, 158
- Li XY, Wang SJ, Wang LL, Li JB, Li SY, Xu JB, Wei BD, Xu YP. Isolation and identification of highly efficient strains in cattle slaughter waste and assessment of its composting effect[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021(5): 58-63, 158 (in Chinese)
- [44] 徐杰, 许修宏, 门梦琪, 行国瑞, 谷猛, 杨阳, 杨荣艺, 边鑫雨. 畜禽粪便堆肥快速升温除臭多功能复合菌剂及其应用[J]. 中国土壤与肥料, 2019(5): 200-206
- Xu J, Xu XH, Men MQ, Xing GR, Gu M, Yang Y, Yang RY, Bian XY. Research and application of multifunctional agent for warming and deodorizing in livestock manure composting[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2019(5): 200-206 (in Chinese)
- [45] 段小雨, 段松岐, 张蕙兰, 李诚, 刘爱平, 杨文久, 董毓平, 刘韞滔. 芒果废弃物降解菌的筛选及香菇混菌发酵条件优化[J]. 四川农业大学学报, 2020, 38(3): 311-318
- Duan XY, Duan SQ, Zhang HL, Li C, Liu AP, Yang WJ, Dong YP, Liu YT. Screening of mango waste degrading bacteria and optimization of fermentation conditions of *Lentinus edodes* mixed bacteria[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2020, 38(3): 311-318 (in Chinese)
- [46] 习佳林, 董红敏, 贺爱国, 陶秀萍, 尚斌. 不同通风条件下堆肥处理死鸡效果研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(5): 1314-1320
- Xi JL, Dong HM, He AG, Tao XP, Shang B. The effect of different ventilation rates on composting of dead hens[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(5): 1314-1320 (in Chinese)
- [47] Liu Y, Ma RN, Li DY, Qi CR, Han LN, Chen M, Fu F, Yuan J, Li GX. Effects of calcium magnesium phosphate fertilizer, biochar and spent mushroom substrate on compost maturity and gaseous emissions during pig manure composting[J]. Journal of Environmental Management, 2020, 267: 110649