

禽畜粪便堆肥中优势菌株的分离及对 有机物质降解能力的比较

凌云, 路葵, 徐亚同

(华东师范大学环境科学系, 上海, 200062)

摘要:通过对猪粪堆肥各个阶段的微生物进行分离、纯化, 得到84株纯菌株。经过对比测定, 选出生长相对较快, 降解淀粉、油脂、蛋白质及纤维素能力较强的53株菌株, 包括常温细菌15株、高温细菌4株、常温放线菌17株、高温放线菌6株、常温霉菌11株。其中, 细菌对于淀粉和蛋白质分解能力较好, 但对纤维素和油脂的分解能力差, 由放线菌和霉菌的分解作用进行补充。高温期细菌和放线菌起着至关重要的作用, 霉菌则主要在堆肥末期发挥作用, 在高温期活性很弱。

关键词:禽畜粪便堆肥; 分解能力; 高效菌剂

中图分类号: X713

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2007)01-0036-04

Isolation and Comparing the Degradation Ability of the Microbe in the Manure Composting

LING Yun, LU Kui, XU Ya-tong

(Dept. of Environmental Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Eighty-four strains were isolated and purified from different periods of pig dung's composts. Fifty-three strains (including 15 strains of mesophilic bacteria, 4 strains of thermophilic bacteria, 17 strains of mesophilic actinomycetes, 6 strains of thermophilic actinomycetes and 11 strains of mesophilic moulds) were obtained by the degradation ability of four kinds of macromolecular organic matters (starch, fats, protein and cellulose). Bacteria is good at decomposing amylum and protein, actinomycetes and mould are good at decomposing fibre and lipid. Bacteria and actinomycetes are the most disintegrator in the beginning and metaphase of the composting while mould is active at the end of the composting.

Key words: animal dung; degradation ability; high effective microbe

禽畜养殖业的发展使禽畜粪便造成的环境压力日益增加。好氧堆肥法是现在处理禽畜粪便的一种有效方法。由于微生物在堆肥中起了主要作用, 因此对于好氧堆肥的高效菌种、菌剂研究有不少的报道。沈根祥等^[1]研究了 HSP 菌剂在牛粪堆肥中的应用, 表明菌剂能使堆肥温度迅速上升, 并使其在 20 d 左右腐熟; 刘克锋等^[2]研究了几株自行分离的微生物

对堆肥腐熟度的影响, 找到了 4 种较好的微生物菌剂配比。但大多数的研究报道过于偏重于菌剂对实验室堆肥结果的影响, 或由于菌种数量少造成菌剂适应性不强, 或是因为菌剂来自国外, 价格较高, 导致菌剂的推广受阻, 因此有必要研究具有自主知识产权的价格低廉的禽畜粪便高效降解菌剂。本研究对高效降解菌进行了独立的分离和初步筛选。

收稿日期: 2006-07-04

作者简介: 凌云 (1978—), 男, 博士研究生; 通讯作者: 徐亚同 (1943—), 男, 研究员, E-mail: ytxu@des.ecnu.edu.cn

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20040269012); 上海市科学技术发展基金项目 (013912052)

1 材料与方法

从包括新鲜猪粪、猪粪自然堆肥不同时段堆料、食用菌废料等6种分离源中分离细菌、放线菌和霉菌,培养温度分别为常温(30~37℃)和高温(55℃)。计数分离后,对菌株进行鉴定,鉴定方法见文献[3-5],再分别测试纯菌株对淀粉、脂肪、蛋白质和纤维素的降解能力。淀粉水解试验采用淀粉水解培养基^[6];油脂水解试验采用油脂水解培养基^{[7]206-207},用“+”表示有分解能力,由于该方法只适用于细菌,因此未检测放线菌和霉菌分解油脂的能力。采用Frazier的氯化汞法^{[7]213}检测细菌的蛋白质分解能力,采用明胶液化法^{[7]213}检测

测放线菌分解蛋白质的能力,用“+”表示明胶的液化程度。采用纤维素-刚果红硅胶平板^[8]来进行纤维素水解试验。除油脂降解和明胶液化试验外,均用 D_p 表示降解能力: $D_p = (\text{透明圈直径}/\text{菌落直径})^2$ 。

2 结果与分析

2.1 样品中的微生物数量

由表1可知,无论是常温型还是高温型,细菌的数量占了绝对的优势,升温期各种微生物数量均有增加,进入高温期只有高温细菌和高温放线菌的数量继续上升。在腐熟期细菌数量下降,但放线菌和霉菌数量明显上升。

表1 样品中各类微生物数量

Tab.1 The amount of microbe in the sample

样品 sample	常温型 mesophilic microbe/(cfu · g ⁻¹)			高温型 thermophilic microbe/(cfu · g ⁻¹)		
	细菌	放线菌	霉菌	细菌	放线菌	霉菌
	bacteria	actinomyces	mould	bacteria	actinomyces	mould
新鲜猪粪 fresh pig dung	6.5×10^9	1.2×10^4	5.0×10^5	1.6×10^6	3.4×10^4	1.2×10^3
升温期 beginning	1.5×10^{10}	3.8×10^7	2.2×10^6	1.0×10^{10}	1.9×10^7	1.1×10^6
高温期 metaphase	2.9×10^9	5.4×10^3	2.4×10^4	2.2×10^{10}	3.6×10^8	1.8×10^3
降温期 cooling phase	3.0×10^{11}	2.0×10^5	6.8×10^4	1.7×10^{10}	2.5×10^7	1.7×10^3
腐熟期 ending	1.9×10^{10}	2.6×10^8	3.1×10^8	9.9×10^8	1.1×10^7	2.5×10^4
蘑菇废料 spent mushroom compost wastes	3.5×10^7	...	4.7×10^5	7.5×10^8	...	2.4×10^5

2.2 微生物分离纯化

根据菌落形态的观察和比较以及显微镜观察,将不同种类的微生物分别划线培养至单菌落。筛除有腐臭或恶臭的菌株、在平板上生长较慢的菌株以及已知的常见致病菌如金黄色葡萄球菌后,得到84株分离物,其中常温细菌26株、高温细菌9株,常温放线菌26株、高温放线菌6株,常温霉菌16株、高温霉菌1株。

2.3 菌株对有机物的分解能力

将84株菌进行了大分子有机物水解能力的测定,将生长相对较快,降解淀粉、油脂、蛋白质及纤维素能力较强的53株菌列于表2~4中,其中常温细菌(用B表示)15株,高温细菌(用HB表示)4株;常温放线菌(用A表示)17株,高温放线菌(用HA表示)6株;常温霉菌(用M表示)11株;由于唯一的一株高温霉菌分解能力一般,未列入其中。

由表2可见:青霉菌属有6株菌,是霉菌中的主要优势类群;7株霉菌对纤维素有降解能力, D_p 均值为

3.84 ± 2.25 ,明显高于细菌和常温放线菌(表3);仅有5株能降解淀粉,且降解能力不强, D_p 为 1.39 ± 0.32 ,低于细菌和放线菌(表3)。

表2 常温霉菌菌株对有机物降解能力的测定结果

Tab.2 The degradation ability of mesophilic moulds

菌株编号 mould number	属名 category	D_p	
		淀粉 starch	纤维素 cellulose
M1-1	青霉属	1.68	0
M1-2	木霉属	1.24	0
M1-3	青霉属	0	1.98
M2-1	青霉属	0	4.22
M2-4	青霉属	1.78	0
M2-5	毛霉属	0	2.91
M2-6	曲霉属	0	1.87
M3-2	毛霉属	1.07	2.27
M4-3	青霉属	1.17	0
M5-1	曲霉属	0	7.75
M6-1	青霉属	0	5.90
平均 average		1.39 ± 0.32	3.84 ± 2.25

在细菌菌株分解能力测定中(表3、4),89%的菌株能分解淀粉,但高温菌株的降解能力比常温菌株高1倍;而所有菌株都能降解蛋白质,特别是微球菌属与芽孢杆菌属的几株常温菌株的降解能力超过其他菌株几倍.常温菌株没有能分解油脂的,也只有3株能分解纤维素.相比之下4株高温细菌对4种有机物都有分解能力.

放线菌菌株分解能力测定结果(表3、4)显示:常温放线菌对淀粉的分解能力较强,比常温细菌高1倍;大多数放线菌菌株能分解蛋白质,但分解能力一般;一半以上常温放线菌菌株能降解纤维素但能力低于高温菌株.高温放线菌侧重于分解蛋白质和纤维素,其分解纤维素的能力比细菌和真菌强.

表3 常温细菌、放线菌菌株对有机物降解能力的测定结果

Tab. 3 The degradation ability of mesophilic bacteria and mesophilic actinomycetes

细菌菌株						放线菌菌株				
编号 No. of bacteria	属名 category	D_p			油脂 ¹⁾ fat	编号 No. of actinomycetes	属名 category	D_p		明胶 ²⁾ protein
		淀粉 starch	明胶 protein	纤维素 cellulose				淀粉 starch	纤维素 cellulose	
B1-1	芽孢杆菌属	0	10.54	2.30	—	A1-1	链霉菌属	2.41	2.55	++++
B1-2	芽孢杆菌属	1.44	2.35	1.78	—	A1-2	放线菌属	0	0	+++
B1-4	埃希氏属	1.48	3.82	0	—	A1-3	链霉菌属	0	1.71	—
B2-3	假单胞菌属	3.49	2.63	0	—	A1-4	链霉菌属	0	0	+
B2-4	葡萄球菌属	1.97	2.71	0	—	A2-1	小多孢菌属	5.30	1.53	++++
B3-2	微球菌属	1.42	15.71	0	—	A2-2	放线菌属	3.13	0	+
B3-4	芽孢杆菌属	2.07	5.81	0	—	A2-3	小多孢菌属	4.55	0	++++
B3-5	微球菌属	1.30	13.16	0	—	A3-3	放线菌属	4.31	3.03	+
B4-4	黄杆菌属	0	9.35	0	—	A4-1	小单孢菌属	3.17	1.44	+
B5-3	葡萄球菌属	1.72	4.55	0	—	A4-2	链霉菌属	0	1.27	+
B5-4	芽孢杆菌属	1.34	7.20	0	—	A4-3	链霉菌属	3.70	1.89	+
B5-5	假单胞菌属	1.55	3.20	0	—	A5-1	小单孢菌属	3.06	1.27	+
B5-6	假单胞菌属	1.47	4.91	0	—	A5-2	小多孢菌属	2.59	1.30	+
B6-1	芽孢杆菌属	1.61	13.29	1.28	—	A5-5	放线菌属	3.46	0	+
B6-2	微球菌属	1.30	7.08	0	—	A5-6	小多孢菌属	2.83	0	+
						A5-7	小多孢菌属	2.79	0	—
						A5-9	放线菌属	2.46	1.55	+
平均 average		1.70 ± 0.59	7.09 ± 4.36	1.79 ± 0.51		平均 average		3.37 ± 0.88	1.75 ± 0.59	

1) 油脂降解试验中,“+”表示有能力降解油脂,“—”表示无降解能力;2) 明胶液化试验中,每个“+”表示有2 cm的明胶被液化,“—”表示明胶没有液化

表4 高温细菌、放线菌菌株对有机物降解能力的测定结果

Tab. 4 The degradation ability of thermophilic bacteria and thermophilic actinomycetes

细菌菌株						放线菌菌株				
编号 No. of bacteria	属名 category	D_p			油脂 ¹⁾ fat	编号 No. of actinomycetes	属名 category	D_p		明胶 ²⁾ protein
		淀粉 starch	明胶 protein	纤维素 cellulose				淀粉 starch	纤维素 cellulose	
HB1-1	假单胞菌属	2.47	2.79	1.49	+	HA1-1	高温放线菌属	0	1.87	++++
HB3-3	芽孢杆菌属	3.29	4.15	1.12	+	HA1-2	高温放线菌属	5.85	2.51	—
HB4-2	芽孢杆菌属	4.04	3.43	1.43	+	HA3-1	小多孢菌属	0	3.04	++++
HB5-2	芽孢杆菌属	3.54	4.79	1.08	+	HA3-2	链霉菌属	0	7.60	++++
						HA5-1	高温放线菌属	0	0	++++
						HA5-2	放线菌属	2.94	4.96	++++
平均 average		3.34 ± 0.66	3.79 ± 0.87	1.28 ± 0.21		平均 average		4.39 ± 2.06	4.00 ± 2.80	

1) 油脂降解试验中,“+”表示有能力降解油脂,“—”表示无降解能力;2) 明胶液化试验中,每个“+”表示有2 cm的明胶被液化,“—”表示明胶没有液化

3 讨论与结论

从微生物生态学角度分析,新鲜猪粪中细菌数量虽然最多,但不排除有大量的致病菌存在,所以并不说明此时细菌降解能力处于绝对优势的地位。在升温期,由于有机质含量充足,各种微生物数量均明显上升,处于竞争状态。在高温期,高温细菌和高温放线菌占主导地位,常温放线菌和常温霉菌都受到明显抑制;常温细菌数量下降却不明显,可能形成芽孢等耐受高温环境的休眠体。高温霉菌仅分离得到1株,且降解能力很弱,几乎不起什么作用。这与刘婷等^[9]的报道相符。当堆肥进入腐熟期,高温微生物数量都在下降,常温细菌数量依然变化不大,常温放线菌和常温霉菌数量上升,微生物群落结构又一次发生变化。此外,蘑菇养殖废料在自然堆肥时拌入猪粪后,能有效提升发酵温度,因此也进行了菌株分离。但结果表明微生物数量反而没有猪粪中多,可能是因为其较高的C/N比和较低的含水率影响了堆肥的环境条件所至。

堆肥中,淀粉、蛋白质等物质在堆肥初期就被分解,而纤维素类物质分解较慢^[10]。结合微生物的降解能力分析,堆肥的起始阶段细菌、放线菌和真菌主要分解淀粉和蛋白质并产热,使得堆温上升。进入高温期后,除淀粉和蛋白质继续分解外,油脂和纤维素类物质也逐渐被高温细菌和高温放线菌分解。放线菌在降解纤维素方面的作用尤其重要。当易分解的有机质被细菌和放线菌逐步分解后,堆温下降,此时霉菌数量的迅速上升及其分解能力都表明堆肥末期它在分解剩余纤维素和木质素的过程中起了重要作用。此时若未及时翻堆,堆肥将出现“发霉”现象。

相比于污泥堆肥^[11],粪便堆肥的放线菌菌株降解淀粉的能力弱于污泥放线菌,但纤维素和蛋白质类物质的降解能力较强,可能是由于堆肥原料不同所造成的差异。

实际应用中,可根据不同需要将各类微生物进行组合,达到最佳分解效果。细菌分解有机物能力一般,但数量巨大,是高效菌剂的主要菌株来源;放线菌尤其是高温放线菌对蛋白质和纤维素分解能力较强,不可或缺;很多现有菌剂因过于注重细菌菌株,

忽视放线菌,因此堆肥升温快,但后续分解能力一般。霉菌由于耐高温性差,应在堆肥末期投加。

本研究通过对淀粉、蛋白质、纤维素、油脂4种有机物的降解试验,筛选出了53株相对生长较快且分解能力较强的菌株。

研究表明细菌对于淀粉和蛋白质分解能力较好,主要作用在于堆肥初期和高温期;放线菌在高温期分解纤维素和蛋白质的作用不可忽视;霉菌则在堆肥末期纤维素、木质素等物质的降解中起了主要作用。

高效菌剂的开发应主要注重于细菌菌株,并适当地加入放线菌菌株进行分解能力调节。霉菌即使使用也应在堆肥后期接种。

参考文献:

- [1] 沈根祥,袁大伟,凌霞芬,等. Hsp 菌剂在牛粪堆肥中的试验应用[J]. 农业环境保护, 1999, 18(2): 62-64.
- [2] 刘克锋,刘悦秋,雷增普,等. 几种微生物应用于猪粪堆肥中的研究[J]. 北京农学院学报, 2001, 16(2): 36-41.
- [3] 王大粗. 细菌分类基础[M]. 北京:科学出版社, 1977.
- [4] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册:中文版[M]. 8版. 北京:科学出版社, 1984.
- [5] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组. 常见与常用真菌[M]. 北京:科学出版社, 1978.
- [6] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海:科学技术出版社, 1986:144-145.
- [7] 俞宇馨,吴国庆,孟宪庭. 环境工程微生物检验手册[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1990.
- [8] HENDRICK C W, DOYLE J D, HUGLEY B. A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in solid [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(5): 2016-2019.
- [9] 刘婷,陈朱蕾,周敬宣. 外源接种粪便好氧堆肥的微生物相变化研究[J]. 华中科技大学学报, 2002, 19(2): 57-59.
- [10] 朴哲,崔宗均,苏宝林. 高温堆肥的物质转化与腐熟进度关系[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(3): 74-78.
- [11] 龚维红,陈玮. 城市污泥好氧发酵菌种放线菌的初步筛选[J]. 生物技术, 2005, 15(2): 41-43.

【责任编辑 李晓卉】