

张 磊,陈雅丽,陈双林,等. 低温型复合腐熟剂的研制及其对牛粪堆肥的处理效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):308-312.

# 低温型复合腐熟剂的研制及其对牛粪堆肥的处理效果

张 磊,陈雅丽,陈双林,闫淑珍

(南京师范大学生命科学院/江苏省微生物与功能基因组学重点实验室,江苏南京 210046)

**摘要:**为了解决冬季(5~10℃)低温下牛粪堆肥发酵难以起温和缩短牛粪堆肥发酵周期,采用低温诱导和纤维素酶活对比方法从牛粪堆肥样品中筛选到 1 株耐低温菌株 D<sub>4</sub>;采用对比试验研究了低温菌株对牛粪堆肥的起温效果,并将低温菌株与筛选到的纤维素酶活高的菌株制备了低温型复合腐熟剂,在有机肥厂测定了低温型复合腐熟剂的堆肥效果。结果表明:筛选到的能够在 5~10℃下迅速繁殖的菌株 D<sub>4</sub>,在冬季堆肥发酵中起温到 25℃只需 24 h。将筛选到的纤维素酶活较高的细菌 X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 和真菌 Z<sub>1</sub> 与低温菌株 D<sub>4</sub> 混合制备成低温型复合腐熟剂,该腐熟剂在低温下使牛粪堆肥起温时间加快 24 h,提前 2 d 进入高温期,使用低温型复合腐熟剂的堆肥生产时间比使用市售产品 RW 促腐剂的堆肥生产时间提前 5 d,缩短了堆肥发酵周期。

**关键词:**低温;腐熟剂;牛粪;堆肥;

**中图分类号:** S141.4      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0308-05

微生物发酵法是一种常用的低投入、高效益畜禽粪便无害化处理方法。传统的自然堆肥发酵由于所含土著微生物的种类和数量有限,以及发酵工艺条件的限制,存在着发酵周期长,发酵产品的肥效低,限制了其大规模应用。目前,通过向物料中接种外源微生物菌剂以提高发酵效率的研究已有大量报道<sup>[1-3]</sup>。但是,在调查江苏省多家有机肥厂的生产情况时,发现了一些急需解决的问题:冬季(温度低于 10℃)有机肥生产严重受阻,生产周期延长,生产能力下降,产品成本增加,有机肥质量下降。分析原因,在冬季低温环境下迅速达到堆肥发酵的起温是关键,有机物堆肥能否快速进入高温期影响着堆肥的无害化进程和发酵周期。在堆肥中酶活和酶效最高的蛋白酶和纤维素酶等是中温菌产生的,在冬季环境下堆肥起始温度难以达到中温菌的生长条件,限制了酶活微生物的作用。现阶段,为解决冬季发酵生产有机肥,多采用在堆肥中输入热蒸汽和热水的方法来达到堆肥发酵的起温过程,或者直接堆肥的堆制部位铺设加温装置来控制增加堆肥的温度<sup>[4-5]</sup>。这些方法都是在有机物堆肥前期通过增加外部的能量来启动发酵,虽然方法先进、适用,但是采用的设备比较昂贵以及增加了生产有机肥的成本。有研究表明,低温环境中堆肥接种低温菌剂可使堆肥温度快速上升,进入高温期<sup>[6]</sup>;谢宇新等<sup>[7]</sup>筛选出的纤维素低温分解菌 D<sub>5</sub> 属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),在低温条件下对堆肥升温具有重要作用。

本研究利用微生物生态学原理,采用低温诱导的方法筛选出 1 株低温(0~10℃)快速繁殖的耐低温细菌,研究了该菌株启动堆肥升温的效果,同时筛选具有高纤维素酶活的微生物菌种,研究这些菌种间的相互关系以及在有机肥厂生产

规模下由这些菌种制备的低温型腐熟剂的堆肥效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 牛粪堆肥样品的采集和处理方法

采集地点是江苏省宿迁市泗洪县谷丰有机肥厂,分别在冬季和夏季采样,取堆肥发酵前期、中期和后期的样品,每一个采样点取样 0.5~1.0 kg。新鲜牛粪加入 1% 豆粕、1% 苕糠、2% 草木灰和冬季采集的发酵前期的样品用塑料袋包好放置在 0~4℃的冰箱中 6 个月以上。

### 1.2 菌种和培养基

1.2.1 菌种 大肠杆菌(*Escherichia coli*)实验室保藏;RW 促腐剂购买于鹤壁市人元生物技术有限公司。

1.2.2 培养基 牛粪浸汁培养基:取牛粪发酵中期的物料 100 g,加入适量水,加热煮沸 20 min,8 层纱布过滤,取滤液定容至 1 L,分装灭菌为牛粪浸汁液体培养基,加入 20 g 琼脂制成牛粪浸汁固体培养基。牛粪固体培养基(1 kg):鲜牛粪 65%、苕糠 30%、草木灰 5%,水 300 g,装袋高温灭菌。固体发酵培养基和菌体吸附料:麸皮和黄豆粉各称取 4 kg 和 1 kg,加入 1.5 kg 的水,搅拌均匀,装入发酵袋中,每个发酵袋装料 200 g,121℃ 30 min 灭菌 2 次,间隔 24 h,作为真菌发酵料和细菌菌体吸附料。牛肉膏蛋白胨培养基(肉汤培养基),马丁氏琼脂培养基(PDA 培养基),纤维素刚果红培养基;羧甲基纤维素培养基的配制参照文献[8-9]。

### 1.3 堆肥原料

牛粪、苕糠和草木灰取自江苏省谷丰有机肥厂,采用中华人民共和国农业行业标准 NY 525—2011<sup>[10]</sup>测定其性质,堆肥原料的主要性质见表 1。

表 1 堆肥原料的主要性质

原料	总有机碳 (g/kg)	全氮含量 (g/kg)	C/N	水分 (%)
牛粪	386.3±11.22	21.1±0.42	18.30	65.00±2.10
苕糠	311.0±10.37	4.1±0.50	75.85	1.00±0.12

收稿日期:2013-09-09

基金项目:江苏省产学研前瞻性研究计划(编号:BY2012002)。

作者简介:张 磊,硕士研究生,研究方向为固体废弃物的资源化利用。

通信作者:闫淑珍,副研究员。E-mail:yanshuzhen@njnu.edu.cn。

#### 1.4 耐低温微生物菌株的筛选

1.4.1 耐低温菌株的分离和驯化 取 0~4℃ 冰箱中存放 6 个月的样品,采用稀释分离法在牛粪浸汁固体培养基中分离微生物,置于 1~4℃ 培养,挑取 48 h 内生长最快的微生物单菌落的菌株,再用肉汤培养基在 1~4℃ 培养条件下划线纯化后,接种到 10 mL 肉汤试管中,置于 10℃ 培养。在培养 6、12、24 h 时测定  $D_{600\text{nm}}$  的数值比较各个单菌株的生长速度,保留生长最快的生长菌株,再划线纯化接种到灭菌的牛粪固体培养基中,置于 1~4℃ 培养 24 h。

1.4.2 耐低温菌剂的制作和适应性测定 将筛选到的在低温条件下生长最快的菌株接种到肉汤液体培养基中,15℃ 120 r/min 培养 48 h,倒入装在瓷盘的灭菌菌体吸附料中,搅拌均匀,在 30℃ 烘箱中烘干。设计堆肥总量 1 t(牛粪 60%, 麸糠 35%, 5% 草木灰),翻抛均匀,加入 0.2% 的低温菌。将温度计插于发酵堆中间 30 cm 处,经 10 min 稳定后读数。观察 72 h 内堆肥的升温效果。

#### 1.5 产纤维素酶活微生物的筛选

取有机肥发酵中期样品 10 g,分别用 100 mL 的牛肉膏蛋白胨培养基和马丁氏液体培养基富集培养,28℃,120 r/min,培养 3 d;按照文献[9~11]的方法,测量菌落直径( $d$ )和水解圈的直径( $D$ )。按照文献[12]的方法,用 DNS 法测定滤纸酶活力(FPA)、外切葡聚糖酶活力( $C_1$  酶)和内切葡聚糖酶活力( $C_x$  酶),将筛选到的产纤维素酶活力高的菌株接种到羧甲基纤维素培养基斜面上保藏。

#### 1.6 功能菌株间相互关系的测定

1.6.1 细菌与细菌之间的关系 将筛选的各功能细菌在肉汤培养基平板上交叉划线,倒置放于 15℃ 或 28℃ 的培养箱中培养 3 d,观察交叉点菌株的生长情况。

1.6.2 细菌与真菌菌株之间的关系 在马丁琼脂平板上接种各个真菌后再接种各个细菌,放于 15℃ 或 28℃ 的培养箱中培养 3 d,观察是否有抑菌圈出现。

#### 1.7 功能菌株的鉴定

1.7.1 细菌 鉴定方法参照文献[13]。16S rDNA 采用菌落 PCR 方法<sup>[14]</sup>提取 DNA 和 PCR 扩增,正向引物:5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和反向引物 5'-CTACG-GCTACCTGTTCAG-3'。扩增产物回收纯化后送上海生工生物工程有限公司测序,将测序结果与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST,确定菌株的种类。

1.7.2 真菌 取产孢的真菌纯菌落,用无菌镊子挑取真菌少许菌丝放于乳酚油中。观察显微镜下的真菌产孢结构特征和孢子的形态特征参考<sup>[15]</sup>。

#### 1.8 低温型复合腐熟剂的制备

在真菌斜面挑取菌块,接种到固体发酵培养基中,28℃ 发酵 4~5 d,观察袋中发酵料已经全部长满真菌菌丝为最适,将发酵好的真菌,放到干净的瓷盘上铺平,在 30℃ 烘箱中烘干;细菌参照方法“1.4.2”制备。把每个烘干的菌剂按比例混合即为混合菌剂。加入低温细菌的复合菌剂为低温型复合菌剂。取混合菌剂 10 g,采用稀释法分别统计真菌和细菌的数量。

#### 1.9 低温型复合腐熟剂堆肥试验的设计和腐熟指标测定

1.9.1 堆肥设计 设计堆体的物料总质量为 10 t,其中配料

是鲜牛粪为总质量的 60%~65%、麸糠为 30%~35% 和草木灰 5%~10%。试验设 4 个处理:处理 1:加入总质量 0.2% 的复合腐熟剂(菌剂中活菌数量为  $0.8 \times 10^9$  CFU/g);处理 2:加入总质量 0.2% 的低温型复合腐熟剂(菌剂中活菌数量为  $1.1 \times 10^9$  CFU/g);对照 1:加入总质量 0.2% 的市售 RW 促腐剂(菌剂中活菌数量为  $0.5 \times 10^9$  CFU/g);对照 2(空白对照):不加任何菌剂。将配料和腐熟剂混合,每处理堆的长×宽×高为 12.0 m×1.5 m×1.2 m,分别用翻抛机翻抛,条垛式发酵。每个堆体温度达到 55℃ 后再堆制 7 d 进行二次翻抛,翻抛后再次加入菌剂,加入量同第 1 次。试验时间:2012 年 11 月 10 日至 2012 年 12 月 8 日。

#### 1.9.2 腐熟指标测定

1.9.2.1 理化指标 从堆肥开始每天上午 9 时和下午 5 时,测定发酵场气温和堆体温度,重复测量 4~5 次。当发酵温度达到 55℃ 时再堆制 7 d 进行翻抛,翻抛后再次测定温度的变化。在堆肥发酵的起始和结束进行取样。取样时把每处理均分割成 3 部分,每部分取 5 个点,取得的样品分为两部分,一部分立即用密封袋冷冻保存,另一部分精确称取 10.00 g,放在干燥箱中 110℃ 干燥直至恒重,测量样品质量,计算水分含量。将烘干的样品,进行全氮和有机碳测定,采用有机肥新标准 NY 525—2011<sup>[10]</sup>测定堆肥发酵前后肥堆的有机碳、全氮。同时堆肥过程中观察堆料的物理性状(颜色、颗粒、臭味)变化。

1.9.2.2 生物指标 种子发芽指数( $GI$  值)测定:样品为堆肥完成后取的混合样。取样品 10 g,以样品:蒸馏水=1:2 摇动 5 min。纱布过滤,滤液 3 000 r/min 离心 10 min,上清液稀释 5 倍。再取直径 9 cm 培养皿,内放二层滤纸,在滤纸上滴加 10 mL 堆肥浸提稀释液,均匀摆放 20 粒种子,放置在 25℃ 恒温箱中培养 6 d,统计发芽率和发芽幼苗的根长,以清水处理为对照(CK),每个处理 3 次重复。相对发芽指数计算公式为: $GI = (\text{堆肥浸提液处理种子发芽率} \times \text{堆肥浸提液处理平均根长}) / (\text{清水对照种子发芽率} \times \text{清水对照平均根长})$ 。

#### 1.10 数据分析

试验结果以算术平均数±标准差表示,采用 SPSS 16.0 软件进行数据方差分析(one-way ANOVA)检验处理间差异显著性。Duncan's 多重比较。

## 2 结果与分析

#### 2.1 耐低温微生物菌株的筛选

筛选到 7 株( $D_1 \sim D_7$ )在 10℃ 条件下均能生长的菌株。菌株  $D_1$ 、 $D_2$ 、 $D_3$  和  $D_4$  在 5℃ 条件下生长速度相对较快。均比大肠杆菌的生长速度快,其中菌株  $D_4$  的生长速度最快(图 1)。  $D_1$  至  $D_4$  4 个菌株接种到灭菌的牛粪固体培养基中,5℃ 培养 48 h,菌体量分别为: $1.2 \times 10^8$ 、 $2.1 \times 10^8$ 、 $0.9 \times 10^8$ 、 $1.5 \times 10^8$  CFU/g。表明 4 个菌株在牛粪中的适应性均比较好。

#### 2.2 低温菌单菌剂对堆肥的起温效果

图 2 显示,各低温单菌剂在自然堆肥中都具有增温效果。其中  $D_4$  菌株增温效果明显好于其他 3 个菌株,在 24 h 内能使堆肥的温度上升到 25℃;在 40 h 内能使堆肥的温度上升

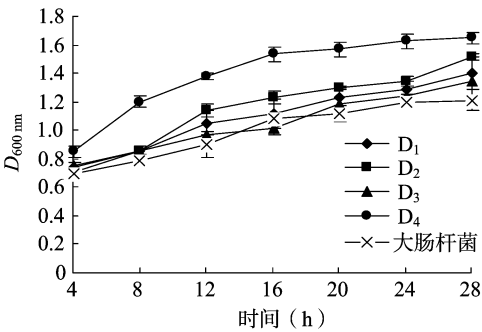


图1 在10 °C条件下低温菌生长速度

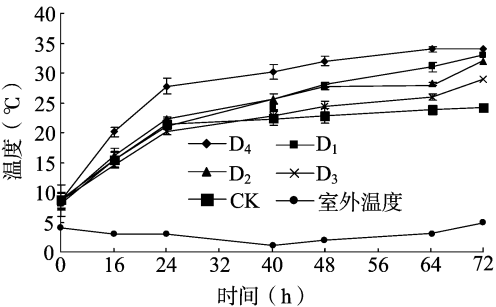


图2 低温菌株单菌剂的起温效果

到 30 °C;在 64 h 内能使堆肥温度上升到 35 °C。因此,选择 D<sub>4</sub> 菌株作为低温型腐熟剂的起温菌株。

2.3 产纤维素酶菌株的筛选

筛选到具有纤维素酶活的细菌 20 株,真菌 3 株,挑选其中 *T* 值较大的菌株进行酶活测定。表 2 显示,菌株 X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 的 C<sub>1</sub> 酶活高于菌株 X<sub>5</sub>、X<sub>11</sub>、X<sub>12</sub>,而真菌 Z<sub>1</sub> 的酶活均较高,其中 FPA (滤纸酶活) 的活力高于细菌的 FPA 活力。

2.4 功能菌株间相互关系的研究

试验结果(表 3)表明,耐低温菌株 D<sub>4</sub> 和细菌菌株 X<sub>5</sub>、X<sub>11</sub> 发生拮抗作用,同时真菌 Z<sub>1</sub> 和细菌菌株 X<sub>5</sub> 发生拮抗;菌株 D<sub>4</sub> 与产纤维素酶细菌 X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub> 和真菌 Z<sub>1</sub> 之间不产生拮抗作用。说明它们可以作为复合腐熟剂的基础菌株。

表 2 牛粪堆肥中分离菌株的纤维素酶活性

菌株	<i>T</i> 值	FPA (U/g)	C <sub>1</sub> (U/g)	C <sub>s</sub> (U/g)
X <sub>2</sub>	7.28	372.3 ± 4.80d	72.3 ± 1.47f	305.7 ± 2.94d
X <sub>3</sub>	7.00	415.9 ± 4.64e	68.6 ± 1.15de	329.7 ± 3.07f
X <sub>5</sub>	5.42	312.5 ± 3.90c	67.2 ± 1.05de	301.2 ± 2.76c
X <sub>11</sub>	2.42	219.8 ± 2.74b	32.3 ± 0.86b	201.3 ± 2.30b
X <sub>12</sub>	2.34	181.2 ± 2.10a	21.4 ± 1.86a	197.2 ± 2.87a
真菌 Z <sub>1</sub>	2.51	916.3 ± 3.86f	62.9 ± 1.27c	327.1 ± 4.80e

注:*T* 值 = 水解圈直径 (cm)/菌落直径 (cm);同列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

表 3 牛粪堆肥中分离菌株之间的相互关系

菌株	D <sub>4</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	真菌 Z <sub>1</sub>
D <sub>4</sub>		-	-	+	+	-	-
X <sub>2</sub>	-		-	-	+	-	-
X <sub>3</sub>	-	-		-	-	-	-
X <sub>5</sub>	+	-	-		+	-	+
X <sub>11</sub>	+	+	-	+		-	-
X <sub>12</sub>	-	-	-	-	-		-
真菌 Z <sub>1</sub>	-	-	-	+	-	-	

注:“-”代表菌株间不拮抗“+”代表菌株间拮抗。

2.5 功能菌株分类

16S rDNA 序列分析结果(表 4)显示:D<sub>4</sub> 属于腐败希瓦氏菌,X<sub>2</sub> 和 X<sub>3</sub> 同属于弯曲假单胞菌。D<sub>4</sub> 菌落为圆形,乳红色,表面湿润凸起,菌体细胞短杆状,革兰氏阴性,无芽孢,过氧化氢酶实验和产 H<sub>2</sub>S 实验为阳性,吡啶,MR 和 VP 实验为阴性。X<sub>2</sub> 和 X<sub>3</sub> 菌落均为圆形,乳白色,表面湿润,菌体细胞长杆状,革兰氏阴性,无芽孢,过氧化氢酶实验为阳性,能利用葡萄糖和 D-果糖。根据上述结果鉴定 D<sub>4</sub> 为假单胞菌属腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*),X<sub>2</sub> 和 X<sub>3</sub> 为假单胞菌属弯曲假单胞菌(*Pseudomonas geniculata*)。真菌 Z<sub>1</sub> 菌丝匍匐弓状弯曲,与基质相接触处产生假根;假根发达,分枝多,褐色,两节间距离 1 ~ 3 mm;孢囊梗直立不分枝,1 ~ 10 枝丛生在假根上方;孢子形状不对称,近球形、卵形或多角形,鉴定为根霉属黑根霉(*Rhizopus nigricans*)。

表 4 牛粪中筛选的 3 株细菌菌株的分类从属关系

菌株编号	GenBank 登录号	高相似度的菌株	碱基数 (bp)	相似度 (%)
D <sub>4</sub>	KC905740	<i>Shewanella putrefaciens</i> (NR074817.1)	1 535	99
X <sub>2</sub>	KC905741	<i>Pseudomonas geniculata</i> (NR024708.1)	1 497	99
X <sub>3</sub>	KC905742	<i>Pseudomonas geniculata</i> (NR024708.1)	1 497	99

2.6 低温型复合腐熟剂对牛粪堆肥的发酵作用

2.6.1 堆体气味和颗粒变化 堆肥开始时各处理的堆料呈黄褐色,颗粒较大,具有很强烈的刺激性臭味。随着堆肥发酵的进行,处理 1、处理 2 和对照 1 的堆料臭味逐渐减少,发酵堆体堆料的颜色开始逐渐变黑,牛粪的颗粒变小;当发酵结束时,堆体的臭味消失,堆体料的颜色变成黑色或黑褐色,堆料颗粒变细变小,均匀,不再具有粘性,呈疏松的团粒结构,而对照 2 的变化缓慢。

2.6.2 堆肥中温度变化 图 3 显示,在发酵初期,2 个处理和对照 1 的堆体温度上升,显示加入微生物菌剂的堆肥升温

效果均明显强于不加菌剂的对照 2,说明加入微生物菌剂均能不同程度地促进有机物分解,加入低温型复合菌剂的肥堆在低温下起温时间加快了 24 h 左右,提前 2 d 进入高温期。在发酵后 11 d 用翻抛机进行翻抛,二次加入菌剂后,低温型复合菌剂的起温效果还是好于其他 2 个处理,提前 3 d 进入高温期,堆肥升到的最高温度低于第一次的堆肥升到的最高温度。这是因为第一次微生物已经利用了肥堆中可溶性的碳源和氮源,对翻抛后微生物的生长有影响。处理 1 和对照 1 的堆肥经 2 次翻抛,在 27 d 时完成腐熟过程,添加低温型腐熟剂的处理 2 堆肥在 22 d 时完成腐熟过程,堆肥生产时间比

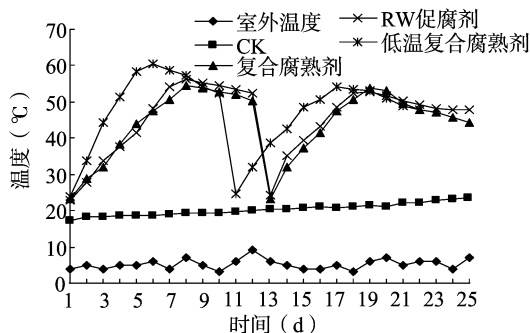


图3 牛粪堆肥发酵过程中温度的变化

处理 1 和对照 1 提前 5 d。

2.6.3 堆肥中水分变化 图 4 可见,牛粪堆肥中加入复合腐熟剂、低温型复合腐熟剂和 RW 促腐剂的 3 个牛粪堆肥中水分都显著下降,分别降低了 49.2%、54.0% 和 51.1%,说明加入微生物的牛粪堆肥中的水分由于微生物代谢产生生物热,散失较快,从而达到了有机肥生产的要求。未加入菌剂的对照 2 的牛粪堆肥中水分没有显著变化,说明牛粪中的本土微生物对堆肥的腐熟作用缓慢。

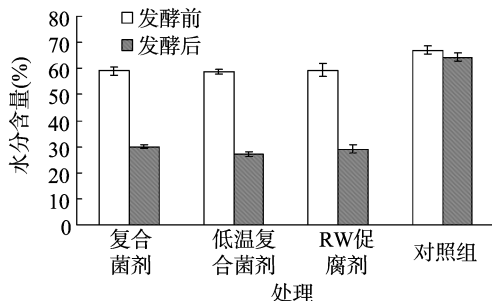


图4 牛粪堆肥发酵前后水分的变化

2.6.4 堆肥中 C/N 变化 牛粪堆肥全碳和全氮含量的变化反映了微生物对堆肥基质的降解程度。整个堆肥过程中,加入复合腐熟剂、低温型腐熟剂和 RW 促腐剂的牛粪堆肥 C/N 的值分别下降了 39.5%、42.5%、38.1%,都达到了 20 的腐熟标准,对照 2 牛粪堆肥的 C/N 没有显著的变化(图 5)。堆肥过程中,总碳的相对含量逐步降低,总氮含量先降低后缓慢增加,但总碳含量下降幅度大于总氮,导致了 C/N 的降低,这是由于微生物活动消耗了牛粪堆肥中的大量的有机碳源。

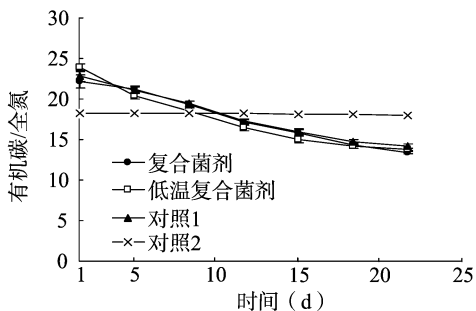


图5 堆肥发酵过程中C/N的变化

## 2.7 堆肥浸提液种子发芽的影响

表 5 表明,处理 1、处理 2 和对照 1 堆肥的提取液对幼根的生长有明显的促进作用,而且相对发芽指数都高于清水对

照和不添加腐熟剂的对照 2 堆肥提取液,因此,经过添加腐熟剂的肥堆,经过高温发酵,各处理物料已经基本腐熟。

表 5 堆肥浸提液对种子发芽的影响

处理	种子发芽率 (%)	根长 (mm)	相对发芽指数
清水对照	80.1	15.9 ± 0.11b	
复合菌剂(处理 1)	86.5	17.8 ± 0.13c	1.21 ± 0.01b
低温复合菌剂(处理 2)	88.5	19.3 ± 0.15e	1.34 ± 0.02d
对照 1	84.0	18.5 ± 0.16d	1.22 ± 0.01c
对照 2	76.0	13.5 ± 0.24a	0.81 ± 0.02a

注:表中数据为 3 次以上重复的平均值;同列数据后不同字母表示在差异达 0.05 显著水平。

## 3 讨论

堆肥物料中有机物的降解是在不同种类的微生物群共同作用下进行的,适当加入外源菌剂可以对堆肥进程起到很大的促进作用。目前,国内外对于堆肥接种技术的研究已经有了很大的发展,明显地促进了堆肥反应的进程。传统堆肥微生物在低温下需要较长时间才能繁殖起来,因此传统堆肥在低温下存在发酵时间长、产生臭味且肥效低等问题。研究低温型腐熟剂目的是为了有有机物堆肥在冬季等低温下快速达到腐熟,缩短发酵时间,减少肥效损失,同时能确保快速地处理畜禽粪便,减轻畜禽粪便对环境的污染。试验结果表明加入低温菌的促腐熟剂在低温情况下使牛粪堆肥升温效果显著,能提前 5 d 完成堆肥周期。

低温下微生物生长受到抑制,生理代谢无法正常运转。由于低温菌细胞膜含有大量的不饱和脂肪酸,使膜在低温下也能保持半流动状态,运输物质;加之核糖体结构和功能对低温不敏感,酶和蛋白质仍可以合成并发挥作用。冬季低温时堆肥内的中、高温菌在低温下难以正常繁殖,也不能发挥它们的酶活作用,故可利用低温菌特殊的生理机制分解糖、淀粉等简单有机物使堆肥起温,进而启动中温菌和高温菌<sup>[7]</sup>。向堆体中接种微生物能够增加微生物总数和提高微生物分解的效能,充分利用不同功能微生物之间的相互协同作用,分解堆体有机物,并释放热量,使堆肥温度快速升高,从而能够使堆肥提前进入高温期。温度是堆肥腐熟的重要因素,可以直接反映堆肥的进程。温度上升是微生物代谢产热及堆体保温效应共同作用的结果。堆肥温度保持 50℃ 以上 5~7 d 是杀灭堆肥中的病卵、有害生物和保证堆肥腐熟的必要条件<sup>[16]</sup>。本研究加低温菌和不加低温菌促腐剂处理的牛粪堆肥产品均达到堆肥腐熟的要求,但加低温菌的堆肥升温快,温度高。

在堆肥过程中,含 C、含 N 的有机质为微生物代谢提供了能源和碳源和氮源,同时微生物将有机质降解为无机物质等,用于自身的生长繁殖。因而堆肥的全 C 和全 N 的变化能在一定程度上反映出堆肥进程。对于 C/N 为 25~30 的堆肥材料,当 C/N 降到 20 以下时,则可认为堆肥基本腐熟。加入低温型腐熟剂堆肥 C/N 变化比不加低温菌腐熟剂和 RW 促腐剂处理的堆肥快。

堆肥浸提液种子发芽试验是判断堆肥是否已经腐熟的重要方法之一。目前较为公认的评价有机固体废物腐熟度的指标为种子发芽指数(GI),GI 值可综合体现发酵物料的低

毒性(影响根长)或高毒性(影响发芽),被认为是最敏感、可靠、有效和最能反映发酵产品无害化和腐熟度的参数。Zuconit等<sup>[17]</sup>认为,当  $GI$  值  $>0.5$  时,发酵物料对植物已基本没有毒性,发酵物料已基本腐熟;当  $GI$  值  $>0.8$  时,发酵物料完全腐熟<sup>[18]</sup>。本试验研制的低温型复合腐熟剂用于牛粪堆肥经过 22 d 达到腐熟,同时相对市售的 RW 促腐剂发酵的堆肥,其浸提液对种子发芽和根的生长有促进作用。

目前,我国微生物发酵剂种类繁多,但有些只是将发酵菌株简单地混合在一起,对菌株之间的拮抗作用研究的不透彻<sup>[19]</sup>。本试验对筛选出的所有菌株进行两两相互的拮抗试验,通过研究其相互关系<sup>[20]</sup>,选出协同作用强的菌株,有效地避免了菌株间的拮抗作用,使制备的复合微生物腐熟剂应用效果明显。

通过低温诱导,筛选分离到 1 株耐低温菌株  $D_4$ ,该菌株在低温条件下快速增殖,产生生物热使堆肥物料温度迅速上升,解决了低温条件下堆肥发酵不能快速升温的问题。经过形态学和分子学鉴定,耐低温菌株  $D_4$  为腐败希瓦氏菌。

低温条件下接种低温型腐熟剂的堆肥温度明显高于接种 RW 促腐剂堆肥(对照 1)和不加任何菌剂堆肥(对照 2),3 d 时温度达到 40 ℃,6 d 时达到 60 ℃,高温期 5~7 d,发酵周期比接种 RW 促腐剂堆肥缩短 5 d。

#### 参考文献:

- [1] 刘益仁,刘光荣,李祖章,等. 微生物发酵菌剂对猪粪堆肥腐熟的影响[J]. 江西农业学报,2006,18(5):36-38.
- [2] 黄懿梅,曲 东,李国学,等. 两种外源微生物对鸡粪高温堆肥的影响[J]. 农业环境保护,2002,21(3):208-210.
- [3] 曹慧玲,王 琦,胡青平,等. 添加复合菌剂好氧发酵牛粪产生生物肥料的工艺优化[J]. 农业工程学报,2009,25(1):189-193.
- [4] 王心歌,张松林,韩友青,等. 一种对有机物堆肥好氧发酵装置:中国,CN10179234A[P]. 2012-12-19.
- [5] 李秀金,张 华,庞云芝,等. 一种带有温室增温和强制增氧的可调螺旋搅拌式堆肥装置:中国,CN101200386B[P]. 2010-08-

11.

- [6] 籍宝霞,张丽萍,程辉彩,等. 低温微生物菌剂处理鸡粪研究[J]. 中国家禽,2009,31(18):41-43.
- [7] 谢宇新,徐凤花,王彦伟,等. 低温菌株的筛选及对堆肥温度的影响[J]. 农业环境科学学报,2011,30(7):1436-1442.
- [8] 沈 萍,范秀荣,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999.
- [9] 尚晓瑛,程旭艳,霍培书,等. 1 株堆肥耐低温纤维素降解菌的筛选、鉴定及生长特性的初步研究[J]. 华中农业大学学报,2012,31(5):558-563.
- [10] NY 525—2011 有机肥料[S].
- [11] 包 衍,王晓辉,张伟琼,等. 纤维素分解菌的选育及酶活测定[J]. 生物学杂志,2007,24(2):56-58.
- [12] 闫淑珍,陈双林. 微生物学拓展性实验的技术与方法[M]. 北京:高等教育出版社,2012:67-70.
- [13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [14] Qiu, Ying H, Lei S, et al. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57:405-408.
- [15] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [16] GB 7959—1987 粪便无害化卫生标准[S].
- [17] Zuconit F, Pera A, Forte M, et al. Evaluating toxicity of immature compost[J]. Biocycle, 1981, 22:54-57.
- [18] 鲍艳宇,周启星,颜丽,等. 畜禽粪便堆肥过程中各种氮化合物的动态变化及腐熟度评价指标[J]. 应用生态学报,2008,19(2):374-380.
- [19] He X T, Terry L, Samuel T. Physical and chemical characteristics of selected U. S. municipal solid waste composts[J]. Environ Qual, 1995, 24:543-552.
- [20] 徐 智,汤 利,李少明,等. 两种微生物菌剂对西番莲果渣高温堆肥腐熟进程的影响[J]. 应用生态学报,2007,18(6):1270-1274.

(上接第 239 页)

- [6] 刘 绍,刘卉琳,周月华,等. 中国大鲵营养成分的分析[J]. 营养学报,2010,32(2):198-200.
- [7] 张丽萍,吴 峰,梁 刚. 中国大鲵皮肤、肌肉与骨骼中 6 种微量元素测定[J]. 营养学报,2009,31(5):519-520.
- [8] 曹 妍,徐 杰,高 焱,等. 白燕与血燕的营养成分分析和比较[J]. 食品工业科技,2011(10):414-417.

- [9] 陈 炜,孟宪治,陶 平. 2 种壳色皱纹盘鲍营养成分的比较[J]. 中国水产科学,2004,11(4):367-370.
- [10] 杨公明,徐怀德,段旭昌,等. 甲鱼营养成分分析研究[J]. 营养学报,2003,25(4):443-445.
- [11] 王远红,王 聪,郭丽萍,等. 海参科(Holothuriidae)中 4 种海参的营养成分分析[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2010,40(7):111-114.