

肖 翰,雷 平,刘 标,等. 接种菌剂对发酵床垫料中微生物数量与酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):157-159.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.044

# 接种菌剂对发酵床垫料中微生物数量与酶活性的影响

肖 翰,雷 平,刘 标,许 隽,杜东霞,尹红梅

(湖南省微生物研究院,湖南长沙 410009)

**摘要:**以发酵床垫料与猪粪为原料,研究接种微生物菌剂对发酵床垫料中微生物数量和酶活性变化的影响。结果表明,接种菌剂试验组微生物数量高于对照组;接种菌剂提高了发酵床垫料温度,延长了高温保持的时间;接种菌剂有效地提高了发酵过程中各种酶的活性和峰值。酶活性的大小因酶种类和发酵时期的不同而各异,过氧化氢酶、纤维素酶在发酵初期活性高,B 试验组、对照组过氧化氢酶活性峰值分别为 8.26、4.72 U/g,纤维素酶活性峰值分别为 44.8、32.4 U/g;蛋白酶活性峰值出现在中期,B 试验组、对照组蛋白酶活性峰值分别为 36.2、27.6 U/g。

**关键词:**接种菌剂;发酵床;微生物数量;酶活

**中图分类号:**S815.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)08-0157-02

随着我国养殖业的迅速发展,畜禽粪尿及污水排放造成的环境污染问题日趋严重,加强畜禽养殖污染的防治已迫在眉睫<sup>[1]</sup>。发酵床养殖技术是为了实现畜禽养殖零污染、零排放的新型养殖技术。我国从 20 世纪 90 年代后期引进和应用该技术,随后迅速蔓延开来<sup>[2]</sup>。该技术将稻壳、锯末屑、粉碎的农作物秸秆等垫料、多种不同功能的饲料级微生物和米糠、红糖等辅助发酵剂按一定比例混匀,铺在发酵舍内,自然发酵,形成微生物发酵床,将畜禽饲养其上,利用微生物对畜禽粪尿原位降解,达到生态环境零污染的目的。微生物对畜禽粪尿的分解代谢能力取决于酶的活性<sup>[3]</sup>,分解的底物越丰富多样,所需要的酶系统就越复杂<sup>[4]</sup>。本研究初步探讨接种微生物菌剂对发酵床垫料中微生物含量及部分酶活的影响,以为微生物菌剂在发酵床垫料中的应用提供一些的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌剂

自制的 A(枯草芽孢杆菌)、B(枯草芽孢杆菌+干酪乳杆菌)、C(干酪乳杆菌)3 种菌剂,3 种菌剂活菌总数均为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 试验设计** 本试验在湖南省长沙市长沙县某猪场发酵床中进行。发酵床垫料由锯末屑、稻壳、稻草按 5:3:2 体积比配制而成,垫料深度约为 70 cm,接种的菌剂按 0.1% 的量喷洒到垫料中,充分拌匀,含水率保持在 55% 左右。发酵

床在夏季采用负压抽风降温。设置添加微生物菌剂 A、B、C 3 个处理组和不加菌剂的对照组,每个处理 3 次重复。

**1.2.2 采样时间及方法** 本试验于 2015 年 7 月 1 日开始,分别在 5、10、30、60、90、120 d 采样,采样点位于垫料表层下 20 cm 处,采用 5 点采样法取样。

**1.2.3 分析项目及方法** 在每个试验组垫料 20 cm 处插温度计,每天 11:30 测温度;采用平板菌落计数法测定垫料中微生物总量;采用高锰酸钾滴定法测定过氧化氢酶活性<sup>[5]</sup>;采用酪氨酸比色法测定蛋白酶活性<sup>[6]</sup>;采用 DNS 法测定纤维素酶活性<sup>[7]</sup>。所有检测项目均为 3 个重复,取其平均值。

**1.2.4 数据统计分析** 采用 SPSS 16.0 对数据进行处理分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵床垫料温度变化

温度是影响微生物活性的关键因素,且能很好地反映发酵所处的状态<sup>[8]</sup>。从图 1 可以看出,试验组与对照组垫料 20 cm 处温度变化趋势基本一致,可分为升温阶段、高温阶段、降温阶段与温度稳定阶段;试验组与对照组在 50 ℃ 以上高温保持的时间不同,A、B、C 试验组、对照组高温保持的时间分别为 11、13、11、4 d;进行到 20 d 后,试验组 20 cm 处垫料温度一直维持在 40 ℃ 左右,而对照组温度接近室温。可见试验组温度更利于微生物生长繁殖,从而有效地促进畜禽粪便中有机物的降解。统计分析表明,试验组 A、B、C 之间温度变化无明显差异,但试验组与对照组之间温度变化差异明显。

### 2.2 发酵床垫料微生物含量变化

用平板计数法对发酵床垫料中微生物进行计数。由表 1 可知,在试验初期 5 d,接种了有益微生物菌种的 A、B、C 试验组微生物数量迅速达到峰值,分别为  $5.8 \times 10^{10}$ 、 $9.5 \times 10^{10}$ 、 $2.3 \times 10^{10}$  CFU/g,对照组微生物含量为  $7.2 \times 10^9$  CFU/g。这可能是因为发酵初期垫料中富含易分解的有机物,为中温和耐高温微生物提供丰富的营养,使其进行快速自身增殖,从而使其数量迅速增加。当试验进入 15 d 时,A、B、C 试验组与对照组微生物数量分别为  $2.6 \times 10^8$ 、 $8.5 \times 10^8$ 、 $5.6 \times 10^8$ 、 $6.3 \times$

收稿日期:2016-09-22

基金项目:湖南省科技重点研发计划(编号:2016NK2208);湖南省科技计划(编号:2015NK3057);湖南省生猪产业技术体系生猪产业规模养殖与环境控制岗位项目。

作者简介:肖 翰(1974—),男,湖南涟源人,工程师,主要从事环境微生物研究。E-mail:yyqhm@163.com。

通信作者:尹红梅,硕士,副研究员,研究方向为环境微生物。E-mail:66998902@qq.com。

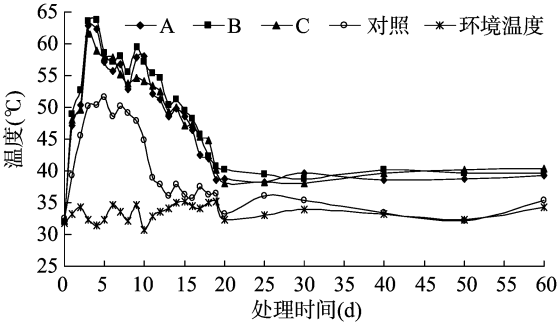


图1 发酵床垫料温度变化

$10^7$  CFU/g(表 1), 相对于初期微生物含量有大幅度下降, 可能是由于连续高温和营养物质的消耗, 大部分中温性微生物进入休眠或衰亡状态所致。试验进行到 30 d 后, 中温微生物又开始大量繁殖, 微生物数量有所上升。试验进行到 90 d 时, A、B、C 试验组与对照组微生物数量分别为  $9.2 \times 10^8$ 、 $1.6 \times 10^9$ 、 $6.5 \times 10^8$ 、 $4.8 \times 10^7$  CFU/g(表 1), 试验组垫料中微生物含量高, 有利于畜禽粪尿的分解。试验过程中, A、B、C 试验组微生物的数量始终比对照组高 1 个数量级以上, 差异明显。

表 1 发酵床垫料微生物含量变化

时间 (d)	A (CFU/g)	B (CFU/g)	C (CFU/g)	对照 (CFU/g)
0	$4.7 \times 10^7$	$4.2 \times 10^7$	$4.6 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$
5	$5.8 \times 10^{10}$	$9.5 \times 10^{10}$	$2.3 \times 10^{10}$	$7.2 \times 10^9$
15	$2.6 \times 10^8$	$8.5 \times 10^8$	$5.6 \times 10^8$	$6.3 \times 10^7$
30	$1.5 \times 10^9$	$4.6 \times 10^9$	$7.1 \times 10^9$	$5.2 \times 10^8$
60	$4.8 \times 10^9$	$6.2 \times 10^9$	$5.1 \times 10^9$	$4.3 \times 10^8$
90	$9.2 \times 10^8$	$1.6 \times 10^9$	$6.5 \times 10^8$	$4.8 \times 10^7$

2.3 接种菌剂对垫料中酶活性的影响

在发酵床养猪模式中, 猪粪尿降解的生物化学过程都是在相关酶参与作用下进行的, 故研究垫料中的酶活性, 有助于了解垫料环境对猪粪尿降解能力的影响<sup>[9]</sup>。

2.3.1 过氧化氢酶 相关研究认为, 过氧化氢酶活性与有机质及微生物含量有关。由图 2 可以看出, A、B、C 试验组与对照组垫料中过氧化氢酶均呈先上升后缓慢下降的趋势, 均在 10 d 达到最大值, 分别为 7.81、8.26、8.15、4.72 U/g, A、B、C 试验组垫料之间的酶活性差异不明显, 而各试验组的酶活性明显高于对照组。过氧化氢酶活性初期上升中后期缓慢下降, 可能是因为初期垫料中有机质含量高, 中后期有机质大量降解, 微生物数量和种类减少<sup>[10-11]</sup>。

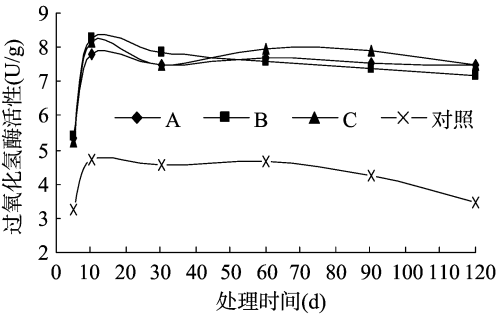


图2 过氧化氢酶活性变化

2.3.2 蛋白酶 蛋白酶是参与环境氮循环最重要的酶类之

一, 主要参与含氮物质的分解和氨基酸、蛋白质及其他含氮有机物的转化<sup>[12]</sup>。从图 3 可知, 各处理蛋白酶活性变化趋势相同, 初期垫料中蛋白酶迅速上升, 中后期呈缓慢下降趋势; 试验组 A、B、C 与对照组酶活均在 30 d 时达到最大值, 分别为 36.5、36.2、38.3、27.6 U/g, 各试验组之间的蛋白酶活性差异不明显, 但各试验组蛋白酶活性明显高于对照组, 表明接种菌剂能提高发酵床垫料中的蛋白酶活性。

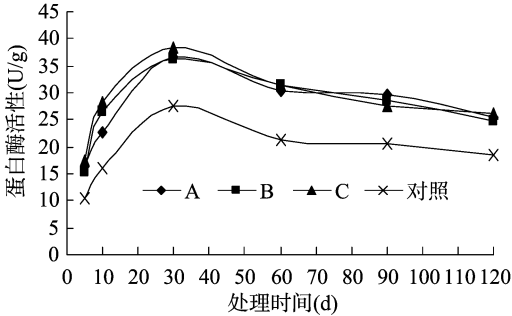


图3 蛋白酶活性变化

2.3.3 纤维素酶 纤维素降解与碳元素代谢紧密相关, 纤维素酶是碳循环中重要酶之一, 其活性变化可以间接反映堆肥发酵过程中碳物质的降解情况<sup>[13-14]</sup>。本研究试验组和对照组纤维素酶活性均呈先迅速上升后逐渐下降的趋势(图 4)。在发酵初期, 微生物快速繁殖, 纤维素酶活性不断上升, 由图 4 可见, 试验组 A、B、C 和对照组均在 5 d 达到峰值, 分别为 43.2、44.8、42.5、32.4 U/g, 对照组与各试验组纤维素酶差异明显。试验进入高温期后, 纤维素酶活性迅速下降, 这可能是由于纤维素的主要分解菌——真菌不耐高温, 大量死亡或者休眠所致。进入降温期后, 酶活性下降趋势减缓。试验组纤维素酶活性在各取样点均明显高于对照组, 可能是由于接种的外源菌剂对纤维素酶产生一定的促进作用。

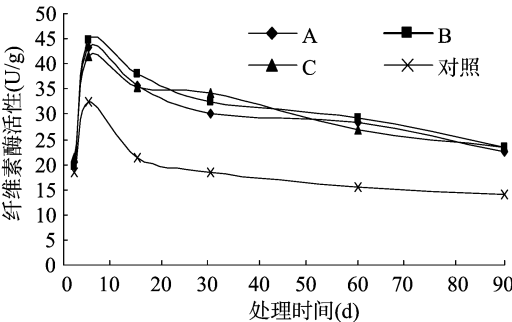


图4 纤维素酶活性变化

3 小结

接种菌剂能够加快发酵床垫料温度升高, 延长高温保持的时间。A、B、C 试验组与对照组高温保持的时间分别为 11、13、11.4 d, 试验组与对照组之间高温期间温度变化差异明显。

在试验过程中, 试验组和对照组中的微生物总量变化趋势相似, 均经历了升高—降低—升高的过程。但试验期间, A、B、C 试验组微生物的数量始终比对照组高 1 个数量级以上, 差异明显。

接种菌剂后能明显提高垫料的酶活性。整个试验过程中, 试验组与对照组所检测的酶活性变化趋势相似, 但所有试

李 晨,包国章,成文革,等. 黑麦草幼苗对冻融及酸沉降的生理响应特征[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):159-162.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.045

# 黑麦草幼苗对冻融及酸沉降的生理响应特征

李 晨<sup>1</sup>,包国章<sup>1</sup>,成文革<sup>2</sup>,李子勇<sup>2</sup>,李艳芳<sup>1</sup>

(1. 吉林大学环境与资源学院,吉林长春 130021; 2. 吉林省生物研究所,吉林长春 130012)

**摘要:**以黑麦草品种冬牧 70 为材料,研究冻融及 pH 值 4.5 模拟酸沉降条件对黑麦草幼苗体内抗氧化酶活性和渗透调节物质含量的影响。结果表明,在冻融胁迫下,黑麦草幼苗体内可溶性蛋白、可溶性糖、丙二醛(MDA)含量呈上升趋势,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性明显提升,最高值分别为 107.35、6.23 U/mg;在 pH 值 4.5 酸沉降胁迫下,黑麦草幼苗体内可溶性蛋白含量逐渐降低,在 -2℃ 时降到最低点,下降了 20.37%,可溶性糖、丙二醛含量随温度下降而降低,最低值分别为 10.42 mg/g、17.61 μmol/g;冻融与酸沉降复合胁迫处理对黑麦草幼苗的作用高于单一胁迫的作用效果,黑麦草幼苗体内可溶性蛋白、丙二醛含量、POD 活性呈上升趋势,可溶性糖含量、SOD 活性分别下降。试验结果表明,黑麦草幼苗对冻融和酸沉降逆境胁迫存在着明显的相互适应现象,对冻融及酸沉降型伤害有很强的适应性,且有一定的耐酸性和耐寒性。

**关键词:**黑麦草幼苗;冻融胁迫;酸沉降胁迫;生理特性

**中图分类号:** S181 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0159-04

二年生黑麦草(ryegrass)是我国重要的牧草和草坪草之一,广泛分布于温带地区,具有抗寒性强、覆盖能力强、返青早、抗病虫害能力强等特性<sup>[1-2]</sup>。黑麦草富含蛋白质、矿物质及维生素,其经济利用价值较高。冬牧 70 黑麦草是从美国引进的越年生禾本科植物,是我国北方重要的牧草和草坪草之一,于 20 世纪 90 年代初引入我国,种植冬牧 70 黑麦草是改善我国北方农区春季饲草严重不足现状的可行途径之一,

具有巨大的经济效益和社会效益。

冻融是指气候的日、年和多年变化导致特定气候区域地球表层一定范围的土冻结和融化作用,地球上受冻融作用的面积约占全球陆地总面积的 70%,我国受冻融作用的面积约占国土陆地总面积的 98%。冻融过程引起的环境改变对植物生长发育产生一系列直接或间接影响,使植被形态特征和生理功能等方面形成了特殊的适应性。揭示黑麦草对逆境环境的适应机制是培养抗寒性强的黑麦草品种的关键,这有助于采取有效的措施减轻低温对植物造成的危害。

酸沉降胁迫对植物的生长发育会产生严重不利影响,这已成为全球性环境污染问题之一。研究黑麦草幼苗对模拟酸沉降生理指标的影响,可以了解黑麦草抗酸沉降的能力,为研究植物对酸沉降胁迫适应能力提供理论依据。

过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)是清除活

收稿日期:2016-06-27

基金项目:国家自然科学基金(编号:31070286、31270367);吉林省自然科学基金(编号:20150101089JC)。

作者简介:李 晨(1988—),女,吉林长春人,硕士研究生,主要从事应用生态学研究。E-mail:399055695@qq.com。

通信作者:包国章,博士,教授,主要从事草地生态恢复的研究。Tel:(0431)85168429;E-mail:baogz@jlu.edu.cn。

验组的酶活性都比对照组的高,这说明接种菌剂可以提高垫料中相关酶的产生,加快有机质的分解和转化,有效促进猪粪尿的降解。

## 参考文献:

- [1] 杨朝飞. 加强畜禽粪便污染防治迫在眉睫[J]. 环境保护,2001(2):32-35.
- [2] 黄振兴,陈 谊. 猪粪尿“零排放”无污染研究与可行性探讨[J]. 上海畜牧兽医通讯,2001(6):10-11.
- [3] Castaldi P, Garau G, Melis P. Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and water-soluble fractions[J]. Waste Management, 2008, 28(3): 534-540.
- [4] 黄得扬,陆文静,王洪涛. 有机固体废物堆肥化处理的微生物学机理研究[J]. 环境工程学报,2004,5(1):12-18.
- [5] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京:科学出版社,1987:267-279.
- [6] 周景祥,王桂芹,余 涛. 蛋白酶和淀粉酶活性检测方法探讨

- [J]. 中国饲料,2001(11):23-27.
- [7] 中华人民共和国农业部. 有机物料腐熟剂:NY 609—2002[S]. 北京:中国标准出版社,2002:11.
- [8] 倪姆娣,陈志银,程绍明. 不同填充料对猪粪好氧堆肥效果的影响[J]. 农业环境科学学报,2005,24(增刊1):204-208.
- [9] 朱 洪. 基于畜禽废弃物管理的发酵床技术研究[D]. 南京:南京农业大学,2007:103.
- [10] 汪恒英,周守标,常志州,等. 接种一株嗜热球杆菌对堆肥腐熟进程的影响[J]. 江苏农业科学,2004(3):78-81.
- [11] Chang J I, Tsai J J, Wu K H. Thermophilic composting of food waste[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(1):116-122.
- [12] 戴 芳,曾光明,牛承岗,等. 堆肥化过程中生物酶活性的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2005(增刊1):148-151.
- [13] 沈其荣,王瑞宝,王 岩,等. 堆肥制作中的生物化学变化特征[J]. 南京农业大学学报,1997,20(2):51-57.
- [14] 倪治华,薛智勇. 猪粪堆制过程中主要酶活性变化[J]. 植物营养与肥料学报,2005,11(3):406-411.