

岳丹,王磊,乔莉娟,等. 高效纤维素降解菌株筛选及其复合微生物菌剂在有机堆肥中的应用效果[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):273-276.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.070

高效纤维素降解菌株筛选及其复合微生物菌剂 在有机堆肥中的应用效果

岳丹¹,王磊²,乔莉娟²,李丹花²,咎立峰²

(1. 邯郸学院实验与实训中心,河北邯郸 056005; 2. 邯郸学院生命科学与工程学院,河北邯郸 056005)

摘要:采用羧甲基纤维素钠(CMC-Na)平板法和刚果红染色法从竹林表层土壤中分离出高效纤维素降解菌株,经16S rDNA序列同源性比对鉴定菌株后,通过液体发酵法将菌株制备成复合菌剂,将复合菌剂添加至堆肥物料中进行效果验证。结果表明,所得菌株L1和L2为小麦苍白杆菌(*Ochrobactrum tritici*),L-3为中华根瘤菌属(*Sinorhizobium* sp.),L-4为绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*),L5为枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)。将制备的微生物复合菌剂添加到堆肥中进行堆肥试验,结果表明,接种复合微生物菌剂的菌剂组堆肥最高温度为62.2℃,高温维持10 d,对照组堆肥最高温度为58℃,高温维持7 d;菌剂组碳氮比从30下降到15.4,对照组碳氮比从30.6下降到18;菌剂组堆肥纤维素含量降至24.7%,对照组堆肥纤维素含量降至17.3%。菌剂组和对照组堆肥均达到了腐熟无害化标准,接种复合菌剂可以显著提高堆肥温度,缩短堆肥周期,保证堆肥质量。

关键词:纤维素;高效降解菌;筛选鉴定;复合菌剂;堆肥

中图分类号: X71;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0273-03

随着我国社会经济的进步以及人口的增长,农业和畜牧业持续健康发展,规模不断壮大,我国国民生活水平得到有效改善。但是在粮食种植和畜禽养殖过程中产生了大量作物秸秆、玉米芯、畜禽粪便等各类有机废弃物,对我国空气、水、土壤等都造成了严重的污染和危害^[1]。鉴于自然排放的畜禽粪便等废弃物对环境的污染和危害,目前国际上对其主要以无害化、资源化的原则进行处理。目前采用的方法有生产沼气和能源,制作发酵饲料和高温堆肥技术等。其中高温堆肥技术以其无害化程度高、腐熟程度好、处理规模大、成本较低等优点逐渐成为畜禽粪便处理的首选^[2]。

堆肥是一个有机物生物分解的过程,分为4个阶段,即中温、高温、降温、成熟熟化阶段^[3]。在此过程中,微生物群落结构不断变化,易氧化的有机质变成更加稳定的有机质,最终形成堆肥产物。堆肥产物已经被广泛用作土壤调节剂和土壤肥料^[4],在改善土壤肥力和抵抗病菌方面具有巨大潜能。研究表明,在微生物参与的堆肥生产过程中,最初的碳氮比在(25~30):1之间被认为是堆肥生产的最佳条件^[5],所以畜禽粪便堆肥中常常加入作物秸秆来调节物料最初的碳氮比^[6],这也利于农业有机废弃物的资源化利用。虽然很多研究表明接种外源微生物菌剂可以促进堆肥进程,加快堆肥的腐熟^[7-9],但是堆肥混合物料中的纤维素降解缓慢,一直是

影响堆肥产品稳定性的重要因素。通过在堆肥过程中添加高效纤维素降解菌可以有效促进纤维素的降解,加快堆肥腐熟和稳定。因而,筛选和鉴定具有高效纤维素降解能力的菌株、制备微生物菌剂,是提高高纤维堆肥稳定性的重要手段^[10-12]。

本研究从竹林表层土壤筛选高效纤维素降解菌,将多种菌株混合制备成复合微生物菌剂并添加到堆肥原料中进行高温发酵,研究菌剂的堆肥效果,为构建高效降解纤维素的复合微生物菌剂提供菌种资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种分离材料来自河北省邯郸市竹林表层土壤。采集样品时取1 g土壤放入无菌锥形瓶中,加入玻璃珠振荡培养1 h备用。

1.2 菌株的筛选

将土壤样品制成不同稀释倍数的菌悬液,分别接种至羧甲基纤维素钠平板中进行恒温培养,将所得菌株多次划线分离,得到的菌株纯培养。将所分离菌株点接于纤维素刚果红培养基中,量取并计算菌株透明圈直径(D)和菌圈直径(d)的比值,即为HC比值。

1.3 菌株的鉴定

分别提取细菌基因组DNA,以基因组DNA为模板,以27F和1492R为16S rDNA的引物进行细菌基因组DNA的PCR扩增^[13]。PCR产物通过琼脂糖凝胶回收试剂盒(Solarbio公司)回收目的条带,连接到pGM-T载体(Solarbio公司),转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞中,将阳性重组子送至北京擎科新业生物技术有限公司测序。将得到的序列通过BLAST软件与GeneBank中相关序列进行

收稿日期:2017-12-17

基金项目:河北省高等学校科学技术研究(编号:Z2017058);河北省邯郸市科技计划(编号:1622201002ZC、1423109105、1464601095-5);邯郸学院校内委托项目(编号:14301)。

作者简介:岳丹(1980—),男,河北邯郸人,硕士,讲师,研究方向为微生物菌剂应用。E-mail:yuedan1980@gmail.com。

通信作者:咎立峰,博士,副教授,研究方向为应用微生物。E-mail:tengfei007zlf@126.com。

比对,并利用 MEGA 5.0 软件进行聚类分析构建进化树。

1.4 微生物菌剂的制备

将分离纯化的纤维素降解菌株分别置于 25 ℃、150 r/min 的摇床中进行液体发酵培养,待菌量达到 10^8 个/mL 时,取菌株的菌悬液分别按照体积比等比例混合,制成微生物菌剂备用。

1.5 堆肥试验

将猪粪和秸秆混合后调节碳氮比至(25~30):1 之间,水分控制在 60% 左右。试验共分为菌剂组、对照组这 2 组,每组 3 次重复,每组物料初始质量均为 20 kg。

菌剂组为每千克物料喷施 5 mL 自制菌剂并混合均匀^[14]。对照组只添加相同体积的无菌水。菌剂和物料充分混匀后分别放置于泡沫箱中,每 3 d 翻堆 1 次。

1.6 指标测定

试验期间每天 09:00 和 16:00 分别在距堆体表面 10 cm 处测量温度,取温度平均值作为堆体温度。总有机碳含量采用重铬酸钾容量-外加加热法测定,总氮含量采用凯氏定氮法测定^[15]。碳氮比(C/N)为总有机碳含量和总氮含量的比值。纤维素降解率的测定参照刘旭的测定方法^[16]。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选及鉴定

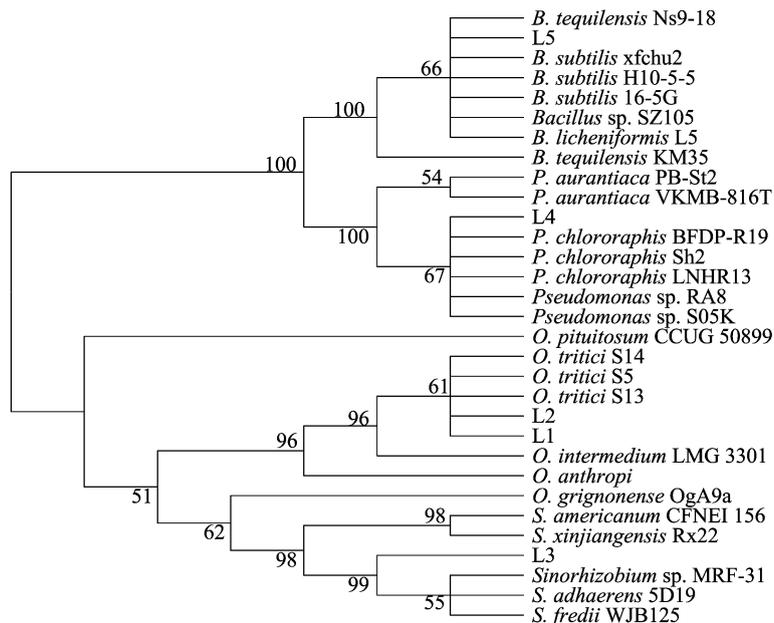
通过羧甲基纤维素钠平板法和刚果红染色法的初步筛选和纯化,共得到 5 株菌株。对菌株进行形态学观察并测定菌株圈直径与菌落直径的比值(HC),由表 1 可知,5 株菌株具有细菌的典型形态特征,且均具有明显的透明圈,具备降解纤

维素的能力。

表 1 菌株的形态特征

菌株	菌落特征、细胞形态	纤维素降解能力	HC 比值
L1	圆形,黄白色,表面湿润有光泽,边缘整齐	+	1.17 ± 0.14
L2	圆形,黄白色,表面湿润有光泽,边缘整齐	+	1.75 ± 0.67
L3	不规则型,乳白色,表面干燥无光泽,边缘不整齐	+	1.45 ± 0.05
L4	脐状圆形,土黄色,表面湿润有光泽,边缘整齐	+	1.20 ± 0.13
L5	圆形,乳白色,表面湿润有光泽,边缘整齐	+	1.16 ± 0.11

菌株 L1、L2、L3、L4、L5 的 16S rDNA 测序长度分别为 997、968、672、1026、940 bp。将序列在美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,简称 NCBI)的 Blast 软件中进行同源性比对,在 GeneBank 中下载同源性高的菌株序列构建系统发育树。由图 1 可知,菌株 L1、L2 为小麦苍白杆菌(*Ochrobactrum tritici*),L3 为中华根瘤菌属(*Sinorhizobium* sp.),L4 为绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*),L5 为枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)。堆肥是微生物参与的高温发酵过程。相对真菌而言,细菌具有更快的生长速率和更高的温度耐受力,在堆肥的稳定和腐熟中发挥重要作用^[17]。因此,采用筛选出的具有高效纤维素降解能力的细菌制备微生物菌剂,可以增加堆肥中微生物的数量、堆肥中有机质和纤维素的降解效率,增强堆肥稳定性。



B. tequilensis—特基拉芽胞杆菌; *B. subtilis*—枯草芽胞杆菌; *Bacillus* sp.—芽胞杆菌; *B. licheniformis*—地衣芽胞杆菌; *P. chlororaphis*—绿针假单胞菌; *P. aurantiaca*—桔黄假单胞菌; *Pseudomonas* sp.—假单胞菌; *O. tritici*—小麦苍白杆菌; *O. intermedium*—中间苍白杆菌; *O. anthropi*—人苍白杆菌; *S. americanum*—美洲中华根瘤菌; *S. xinjiangensis*—新疆中华根瘤菌; *Sinorhizobium* sp.—中华根瘤菌; *S. fredii*—费氏中华根瘤菌

图 1 菌株的系统发育树

2.2 3 堆肥的温度变化

将制备的微生物复合菌剂添加到堆肥中进行堆肥试验,每天定时测定堆体温度,得到堆肥生产过程中的温度变化情

况。由图 2 可知,接种复合微生物菌剂的菌剂组堆体的最高温度为 62.2 ℃,高于对照组堆体(最高温度为 58 ℃);菌剂组、对照组堆体温度维持在 50 ℃ 以上的时间分别为 10.7 d,

堆体升温到最高温度所用时间分别为6、9 d,温度降至40℃以下所用时间分别为21、27 d。在堆肥生产过程中,微生物将有机物质发酵,降解至堆肥腐熟。温度是该过程中影响微生物新陈代谢最主要的因素,也是影响堆肥效果和堆肥产品质量的重要参数^[5]。研究表明,堆肥原料堆体温度处于50℃以上的时间必须保持在5~7 d,以确保病原体的有效灭活^[18]。这说明菌剂组和对照组堆肥均达到了腐熟无害化的标准,但是接种复合微生物菌剂可以提高堆肥温度,缩短堆肥周期,保证堆肥质量。

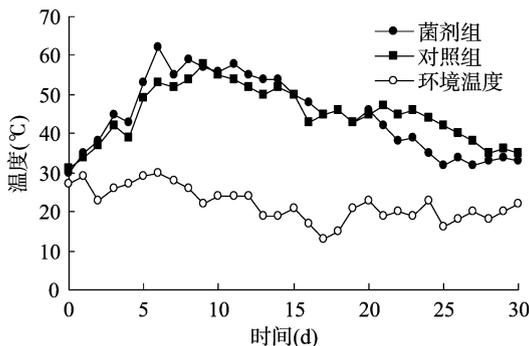


图2 堆肥过程中堆体温度的变化

2.3 堆肥碳氮比值的变化

在堆肥过程中,随着有机物的降解,碳氮比(C/N)不断发生变化^[19]。由于C/N与堆肥过程中的许多化学特性有关,所以C/N是描述不同堆肥稳定性最合适的参数^[20-21]。由图3可知,随着堆肥的发酵,C/N逐渐降低。菌剂组C/N从最初的30下降到15.4,对照组从最初的30.6下降到18。有研究表明,当堆肥的C/N低于20时,有机物达到稳定状态,堆肥腐熟^[22]。由此可见,菌剂组和对照组堆肥均达到腐熟标准,且菌剂组比对照组先达到腐熟。在堆肥过程中,菌剂组堆肥C/N呈先升高再降低的趋势,整体呈下降趋势,这可能是由于高温增加了氨的排放量,导致较高的氮素损失,从而使难分解的有机物质的降解速率减缓,使得一定时期C/N相对较高^[8,23]。

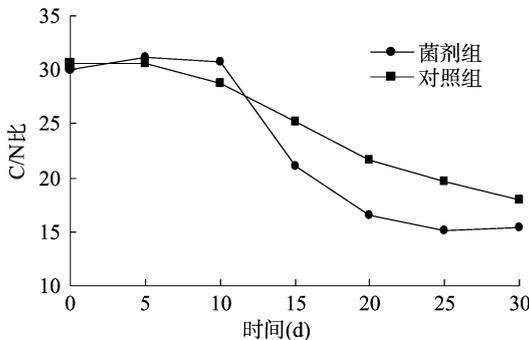


图3 堆肥过程中C/N的变化

2.4 堆肥的纤维素含量变化

堆肥的纤维素含量变化是反映堆肥处理效果的直接指标,结果如图4所示。30 d时,菌剂组堆肥纤维素降解率为24.7%,对照组堆肥纤维素降解率为17.3%,这说明接种复合菌剂能够降低堆肥中的纤维素含量。

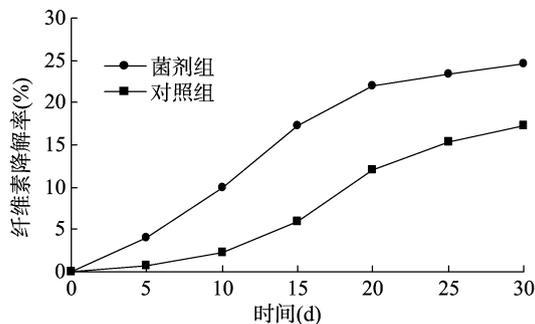


图4 堆肥过程中堆体纤维素含量的变化情况

3 结论

本试验中筛选得到5株高效纤维素降解菌株,将菌株L1、L2、L3、L4、L5的16S rDNA序列在NCBI的Blast软件中进行同源性比对,确定L1和L2为小麦苍白杆菌,L-3为中华根瘤菌属,L-4为绿针假单胞菌,L5为枯草芽孢杆菌。

将制备的微生物复合菌剂添加到堆肥中进行堆肥试验,结果表明,接种复合微生物菌剂的菌剂组、对照组堆体最高温度分别为62.2、58℃,50℃以上的时间分别为10、7 d,C/N分别从30、30.6下降到15.4、18;菌剂组和对照组堆肥均达到了腐熟无害化标准,但是接种复合微生物菌剂可以提高堆肥温度,缩短堆肥周期,保证堆肥质量。

在堆肥试验中,为了适应微生物的生长需要,加入了作物秸秆作为调理剂调节堆肥物料最初的C/N^[6]。作物秸秆中的纤维素是堆肥中的难降解物质,堆肥试验结果表明,30 d时菌剂组、对照组堆肥纤维素含量分别降至24.7%、17.3%,复合微生物菌剂可以高效降解堆肥中的纤维素,促进堆肥进程。

参考文献:

- [1]孔祥才,王桂霞.我国畜牧业污染治理政策及实施效果评价[J].西北农林科技大学学报(社会科学版),2017,17(6):75-80.
- [2]鲁耀雄,崔新卫,龙世平,等.不同促腐菌剂对有机废弃物堆肥效果的研究[J].中国土壤与肥料,2017(4):147-153.
- [3]Tang J C,Shibata A,Zhou Q,et al. Effect of temperature on reaction rate and microbial community in composting of cattle manure with rice straw[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2007,104(4):321-328.
- [4]Wu S C,Cao Z H,Li Z G,et al. Effects of biofertilizer containing N-fixers,P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial[J]. Geoderma,2005,125(1):155-166.
- [5]Vallini G,Gregorio S D,Pera A,et al. Exploitation of composting management for either reclamation of organi [J]. Environmental Reviews,2002,10(4):195-207(13).
- [6]Sadaka S,Taweel A E. Effects of aeration and C:N ratio on household waste composting in Egypt [J]. Compost Science & Utilization,2003,11(1):36-40.
- [7]张陇利,劳德坤,李季,等.密闭式堆肥反应器中复合微生物菌剂对堆肥效果的影响[J].环境工程,2014,32(1):102-107.
- [8]刘东海,李双来,乔艳,等.不同菌剂在鸡粪堆肥中的应用效果[J].中国土壤与肥料,2015(2):111-116.
- [9]曹云,常志州,黄红英,等.畜禽粪便堆肥前期理化及微生物性状研究[J].农业环境科学学报,2015,34(11):2198-2207.

来雪慧,任晓莉,安晓阳,等. 三江平原小流域土地利用类型与土壤理化性质的灰色关联分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):276-280.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.071

三江平原小流域土地利用类型与土壤理化性质的灰色关联分析

来雪慧,任晓莉,安晓阳,贺晓晨,白田宇

(太原工业学院环境与安全工程系,山西太原 030008)

摘要:以三江平原阿布胶河流域为研究区,分析了0~10 cm、>10~20 cm土层中旱地、水田、湿地、林地4种土地利用类型与土壤pH值、阳离子交换量、土壤粒径分布含量、土壤有机碳以及土壤养分含量的关联性。结果表明,对于同一土地利用类型,土壤pH值、阳离子交换量、有机碳含量、全氮含量、全磷含量、碱解氮含量、有效磷含量、速效钾含量随着土层深度的加深而减小,而土壤粒径分布则没有明显的变化规律。相同土层中水田的pH值最大,湿地的阳离子交换量最大,林地的有机碳、氮、钾含量最高;而水田的磷含量则较高。同时,除全磷和有效磷含量外,湿地的有机碳、氮、钾含量均高于旱地和水田。按照灰色关联度大小,0~10 cm土层各土地利用类型由大到小的排序为水田(0.863 7) > 旱地(0.835 1) > 湿地(0.717 1) > 林地(0.573 6); >10~20 cm土层的排序为湿地(0.986 0) > 旱地(0.682 6) > 水田(0.539 5) > 林地(0.515 5)。综合分析,筛选出湿地为改善土壤理化性质和养分含量的最佳土地利用方式。

关键词:三江平原小流域;土地利用类型;土壤理化性质;加权灰色关联

中图分类号: S153.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0276-05

三江平原是我国最大的沼泽湿地分布区,地势表现为西南高、东北低的趋势。由于自然和人为因素的影响,近60年来三江平原的土地利用结构发生了明显变化,由原来的湿地基质变为现在以农田为主要土地利用类型的国家重要粮食生

产基地^[1]。对于土地利用方式与土壤理化性质之间的关系,国内研究主要集中在黄土高原区、东北黑土区、南方红壤区等地区^[2-3],国外研究更多的是印度碱性土和美国沙壤土等^[4-5]。不同土地利用方式对小流域的土壤理化性质具有显著影响^[6],但目前对于三江平原的研究主要针对的是农田和湿地对土壤性质的影响^[7],对小流域的相关研究较少。本研究选取三江平原阿布胶河小流域为研究对象,通过灰色关联层次分析法探讨小流域不同土地利用类型对土壤理化性质的影响。这不仅有利于更多地考虑各影响因素的权重,同时也

收稿日期:2017-04-05

基金项目:山西省高等学校科技创新项目(编号:2014151);山西省自然科学基金(编号:2015011018)。

作者简介:来雪慧(1984—),女,山西大同人,博士,副教授,主要从事农业面源、环境规划研究。E-mail:laixuehui@mail.bnu.edu.cn。

[10] 王海滨,韩立荣,冯俊涛,等. 高效纤维素降解菌的筛选及复合菌系的构建[J]. 农业生物技术学报,2015,23(4):421-431.

[11] 徐杰,许修宏,刘月. 强化堆肥中木质纤维素降解的功能菌株筛选鉴定[J]. 中国土壤与肥料,2014(6):100-105.

[12] 张喜庆,勾长龙,娄玉杰,等. 高效纤维素分解菌的分离鉴定及堆肥效果研究[J]. 农业环境科学学报,2016,35(2):380-386.

[13] Lane D J. 16S/23S rRNA Sequencing [M]//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. West Sussex: John Wiley & Sons Limited, 1991:115-147.

[14] Zeng G M, Hong L H, Dan L H, et al. Effect of inoculating white-rot fungus during different phases on the compost maturity of agricultural wastes[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(4):396-400.

[15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社,2000:433-440.

[16] 刘旭. 奶牛粪便高效降解菌的筛选及混合菌发酵研究[D]. 成都:四川农业大学,2005.

[17] 聂文翰,戚志萍,冯海玮,等. 复合菌剂秸秆堆肥对土壤碳氮含量和酶活性的影响[J]. 环境科学,2017,38(2):783-791.

[18] Vinnerås B, Björklund A, Jönsson H. Thermal composting of faecal

matter as treatment and possible disinfection method—laboratory-scale and pilot-scale studies[J]. Bioresource Technology, 2003, 88(1):47-54.

[19] Margesin, R, Cimadom, J, Schinner, F. Biological activity during composting of sewage sludge at low temperatures[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2006, 57(2):88-92.

[20] Bernai M P, Paredes C, Sánchez-Monedero M A, et al. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes[J]. Bioresource Technology, 1998, 63(1):91-99.

[21] Eklind Y, Kirchmann H. Composting and storage of organic household waste with different litter amendments. I: carbon turnover[J]. Bioresource Technology, 2000, 74(2):115-124.

[22] Eklind Y, Kirchmann H. Composting and storage of organic household waste with different litter amendments. II: nitrogen turnover and losses[J]. Bioresource Technology, 2000, 74(2):125-133.

[23] Eklind Y, Sundberg C, Smårns S, et al. Carbon turnover and ammonia emissions during composting of biowaste at different temperatures[J]. Journal of Environmental Quality, 2007, 36(5):1512-1520.