

单菌株与复合菌对有机物料腐熟性能的影响

何宗均, 梁海恬, 李峰 (天津市农业资源与环境研究所, 天津 300192)

摘要 [目的]研究单菌株和复合菌的腐熟性能。[方法]测定了单菌株和复合菌的拮抗效果、除臭能力、纤维素酶和蛋白酶活性,以及复合菌对有机物料的除臭和腐熟效果。[结果]由 TARE1013KC、TARE1003DY、TARE2012SR、TARE2009MQ 和 TARE2008LS 这 5 种菌株组成的复合菌具有较强的纤维素、蛋白质分解能力及除臭能力,综合性能高于任何单一菌株。复合菌作为腐熟剂进行应用后,从菌数、速效养分、C/N、气味和发酵周期效果来看,对有机物料的腐熟和除臭都起到了显著的促进作用。[结论]复合菌在促进有机物料腐熟及除臭方面效果优于单菌株。

关键词 复合菌;有机物料;腐熟

中图分类号 S144 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)05-0045-02

The Effects of Rotten Performance of Single Strain and Compound Bacterium on Organic Material

HE Zong-jun, LIANG Hai-tian, LI Feng (Tianjin Institute of Agriculture Resources and Environmental Science, Tianjin 300192)

Abstract [Objective] To study the maturity performance of single strain and compound bacteria. [Method] The antagonistic effect, deodorization ability, cellulose and protease activity of single strain and compound bacteria, and deodorization and effect of decomposition of compound bacteria on organic materials were determined. [Result] The test result showed that compound bacterium made up by TARE1013KC, TARE1003DY, TARE2012SR, TARE2009MQ and TARE2008LS had strong comprehensive ability of cellulose, protein decomposition and deodorization ability than any single strain. After compound bacterium as rotten agent was applied in composting, it has played a significant role in promoting the effect of the rotten and deodorization on organic material by indicators of bacterial count, available nutrients, C/N ratio, smell and fermentation cycle. [Conclusion] The compound bacteria in promoting the decomposition of organic materials and deodorization effect was better than that of single strain.

Key words Compound bacterium; Organic material; Rotten

我国是世界上农业废弃物产出量最大的国家,每年产生的农业废弃物约 40.0 亿 t,其中畜禽粪便 26.0 亿 t,农作物秸秆 7.0 亿 t,蔬菜废弃物 1.0 亿~1.5 亿^[1]。随着我国经济的发展,菇渣、中药渣、园林剪切物废弃物的产生量也迅猛增加,这些废弃物由于大部分得不到很好的处理和应用,已对水体、大气、土壤、人体健康及生态系统造成了严重危害。应用有机物料腐熟菌剂快速分解处理有机废弃物生产有机肥料,是国内外解决以上问题的主要措施,这项技术在国内外已经得到了广泛应用。近年来,我国在这方面已进行了大量研究^[2-21]。笔者研究了单菌株与复合菌的纤维素酶活性、蛋白酶活性和除臭性能,旨在为有机物料腐熟菌剂的推广应用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 细菌菌株 TARE1013KC、TARE1003DY,真菌菌株 TARE2012SR、TARE2009MQ、TARE2008LS。营养肉汁琼脂:由蛋白胨 5 g、氯化钠 5 g、牛肉膏 3 g 和蒸馏水 1.0 L 组成,pH 7.0。

马铃薯、葡萄糖琼脂培养基(PDA):取去皮的马铃薯 200 g,切成小块,加水 1.0 L 煮沸 30 min,滤去马铃薯块,将滤液补足至 1.0 L,加葡萄糖 20 g,溶化后分装,灭菌 30 min,pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的培养。TARE1013KC 和 TARE1003DY 培养基均为液体营养肉汁培养基,经 121 °C 实罐灭菌 30 min 后,

28~30 °C 培养 36~48 h。TARE2012SR、TARE2009MQ 和 TARE2008LS 采用马铃薯、葡萄糖培养基,把液体培养基分装于 0.5 L 三角瓶中,经灭菌后接入各真菌斜面菌种,于 180 r/min 28~30 °C 培养 48 h,当摇瓶内出现菌丝密度大,菌丝球明显不浑浊即可。

1.2.2 菌株间的相互拮抗试验。采用钢圈法进行抑菌试验。取其中 1 种菌(A)的发酵液 0.10 mL 涂于平板上,然后在每个平板的固体培养基上摆放 2 个已灭菌的钢圈,再在每个钢圈中加入 0.25 mL 的 A 菌之外的任何 1 种菌(B)的发酵液,每个处理重复 3 次,以只接 A 菌的平皿为对照(CK)。28 °C 培养并定期观察抑菌情况。

1.2.3 除臭能力的测定。采用氨气检测、硫化氢检测和感官检测对微生物菌剂的除臭能力进行评价。将活化后的 TARE1013KC、TARE1003DY、TARE2012SR、TARE2009MQ 和 TARE2008LS 分别用液体培养基培养,得到各个菌株的菌液。将各个菌株的菌液和复合菌剂分别进行如下试验:将菌液接在发酵除臭基质内,于 500 mL 烧杯中混匀(每份发酵除臭基质接种 10 mL 菌液),作为试验样本,设置发酵除臭基质作为对照样本,各样本用牛皮纸及 1 层塑料纸封口。每个样本(6 种试验样本和 1 种对照样本)设置 3 个平行处理,每个平行处理设置 3 次重复。在第 1 个平行中放置内盛 20 mL 2% 硼酸溶液的小烧杯,用以吸收发酵过程中产生的氨气,第 7 天用酸滴定法测定;在第 2 个平行中放置内盛 20 mL 0.05 kg/L 乙酸锌溶液,用以吸收发酵过程中产生的硫化氢,第 7 天用碘量法测定;第 3 个平行,第 7 天进行感官测定。

1.2.4 蛋白酶和纤维素酶活性的测定。蛋白酶活性测定方法参照中华人民共和国轻工行业标准 QB/T 1803—1993《工业酶制剂通用试验方法》中附录 A3 蛋白酶的测定方法。

基金项目 天津市农业科技成果与推广项目(201202090)。

作者简介 何宗均(1976—),男,江西宁都人,副研究员,从事农业微生物与废弃物资源化处理技术研究。

收稿日期 2016-12-23

纤维素酶活性的测定方法:称取样品用蒸馏水稀释10倍,充分振荡,静置30 min,过滤,其滤液即为原样酶液。取3支带有20 mL刻度的试管,1支作为空白对照,其余2支作为平行样品管。样品管中加1 mL原样酶液,然后3支试管中分别加入4 mL已预热至60 ℃的底物溶液,在60 ℃水浴锅中反应20 min取出,每管立即加入1 mL 2.0 mol/L氢氧化钠溶液和2 mL DNS显色液,摇匀后在对照管中再加入1 mL原样酶液。将3支试管放入沸水浴中,显色5 min后立即取出,流水冷却,定容至20 mL,用分光光度计于490 nm处测定OD值。

根据标准曲线换算成葡萄糖量(μg), $U = (M_1 - M_0) / 20$ 。式中, U 为样品的酶活力($\mu\text{g}/\text{min}$); M_0 为对照葡萄糖量(μg); M_1 为分解后样品质量(μg);20为酶与底物反应时间(min)。1 mL原样酶液1 min产生1 μg 葡萄糖定义为1个酶活力单位(U)。

表1 菌种间的拮抗效果

Table 1 Antagonistic effect between strains

菌株 Strain	TARE1013KC	TARE1003DY	TARE2012SR	TARE2009MQ	TARE2008LS
TARE1013KC		-	-	-	-
TARE1003DY	-		-	-	-
TARE2012SR	-	-		-	-
TARE2009MQ	-	-	-		-
TARE2008LS	-	-	-	-	

注:“-”表示拮抗反应为阴性

Note:“-” indicated that the antagonistic reaction was negative

2.3 除臭能力 结合感官、氨气和硫化氢含量的检测结果可知,由TARE1013KC、TARE1003DY、TARE2012SR、TARE2009MQ和TARE2008LS组成的复合菌与TARE1013KC单个菌株的除臭效果不存在显著差异,但显著好于TARE1003DY、TARE2012SR、TARE2009MQ、TARE2008LS和CK(表2)。

表2 各菌株和复合菌的发酵除臭能力

Table 2 Fermentation deodorization ability of each strains and compound bacteria

处理 Treatment	臭气等级 Odor level	氨气含量 Ammonia content	硫化氢含量 Hydrogen sulfide content
CK	++++	0.007 13 c	0.654 32 c
TARE1013KC	+	0.002 60 a	0.323 21 a
TARE1003DY	++	0.003 90 b	0.459 13 b
TARE2012SR	+++	0.004 25 b	0.473 42 b
TARE2009MQ	++	0.004 10 b	0.436 17 b
TARE2008LS	++	0.003 85 b	0.459 12 b
复合菌 Compound bacteria	+	0.002 10 a	0.316 28 a

注:“+”臭气等级,“+”越多表示感官测定越臭;同列不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)

Note:“+” indicated odor level, the more “+” meant the more smelly in the sensory measurement. Different lowercases in the same column indicated significant at 0.05 level

表4 复合菌的除臭能力和腐熟效果

Table 4 Effect of deodorization and decomposition of compound bacteria

处理 Treatment	达到55 ℃所需天数 Days required to reach 55 ℃ //d	速效N、P、K总量 Total content of available N, P, K //g/kg	菌数 Number of bacteria //亿个/g	气味 Smell	颜色 Colour	C/N	发酵周期 Fermentation cycle d
复合菌 Compound bacteria	2	18.4	32.2	无臭味	黑褐色	15.3	15
CK	4	16.3	18.1	有臭味	浅色	22.3	32

1.2.5 复合菌在有机物料的除臭和腐熟上的应用试验。堆肥原料:鸡粪、牛粪、玉米秸秆、可堆腐生活垃圾和蘑菇渣,质量比为5:5:3:2:2。设2个处理,即加复合菌处理和未加菌剂的空白对照(CK),每个处理2 t原料,3次重复,垛型堆制发酵。发酵周期以发酵温度降至室温为止计算所得,发酵第15天对2个处理进行取样分析,包括速效氮、速效磷、速效钾总量、C/N、菌数和大肠杆菌,并观察发酵的物理状态。

2 结果与分析

2.1 复合菌 将TARE1013KC、TARE1003DY、TARE2012SR、TARE2009MQ和TARE2008LS单菌种质量比为3:2:2:1:2混合拌匀后制得复合菌,复合菌有效活菌数达 2×10^8 个/g。

2.2 拮抗试验 由表1可知,TARE1013KC、TARE1003DY、TARE2012SR、TARE2009MQ和TARE2008LS 5种菌之间无抑制作用,拮抗反应均为阴性。

2.4 纤维素酶和蛋白酶活性 由表3可知,由TARE1013KC、TARE1003DY、TARE2012SR、TARE2009MQ和TARE2008LS菌株组成的复合菌具有很强的纤维素和蛋白质分解能力,综合性能高于任何单一菌株,也高于有机物料腐熟剂国家标准规定的纤维素酶活性(30.00 U/mL)和蛋白酶活性(15.00 U/mL)的要求,复合菌可以作为有机物料腐熟剂进行使用。

表3 各菌株和复合菌的纤维素酶和蛋白酶活性

Table 3 Cellulose and protease activity of each strains and compound bacteria

处理 Treatment	纤维素酶活性 Cellulase activity	蛋白酶活性 Protease activity
TARE1013KC	68.00	27.20
TARE1003DY	56.20	35.20
TARE2012SR	71.58	—
TARE2009MQ	76.32	27.23
TARE2008LS	80.62	—
复合菌 Compound bacteria	78.70	31.58

2.5 复合菌对有机物料的除臭能力和腐熟效果 由表4可知,从各项指标来看,复合菌的发酵效果好于CK,其中复合

温升至 28 ℃ 左右,养殖的小龙虾和河蟹就陆续发病,死亡量巨大,使用各种抗生素无明显效果,可能是病毒感染所致。

克氏原螯虾是 WSSV 的易感宿主之一,曾作为 WSSV 的实验动物模型^[10-11],因此在大力发展虾蟹混养的同时,要注意防范 WSSV 带来的风险。WSSV 为一种无包涵体病毒,宿主范围广,流行范围大,传染性强,目前尚无有效的治疗药物,还不能有效地控制疫情。

WSSV 主要侵害皮下组织、表皮角质层组织、触角腺、造血组织、鳃、血淋巴器官等组织器官,在对虾严重患病组织中可见明显的细胞核肿大细胞。对发病的中华绒螯蟹鳃和肝胰腺进行组织切片观察,其鳃和肝胰腺均可见大量核肿大细胞,该病变与 WSSV 引起的虾组织病变相一致。

该研究对江苏省吴中地区的虾蟹混养池塘的发病中华绒螯蟹进行了调查研究,通过流行病学、细菌学、病毒学和组织病理学 3 个方面的调查,确定引起中华绒螯蟹发病的病原为 WSSV。该研究结果可为今后中华绒螯蟹养殖疾病的防控提供理论依据。

(上接第 46 页)

菌的发酵温度在 2 d 内能够达 55 ℃,CK 需要 4 d;发酵的结果表现为复合菌微生物数量生长繁殖活跃,菌数和速效 N、P、K 含量均高于 CK,发酵周期也大大缩短,其中复合菌为 15 d,CK 32 d,复合菌发酵颜色黑褐色,无臭味,而 CK 为浅色,有臭味。发酵 15 d 后复合菌和 CK 的 C/N 分别为 15.3、22.3,C/N 愈低,表示微生物对堆肥有机物料中纤维素降解作用越好。从菌数、速效养分、C/N、气味和发酵周期效果来看,加入复合菌对有机物料的腐熟和除臭都有促进作用。

3 结论与讨论

(1) 该研究表明,由 TARE1013KC、TARE1003DY、TARE2012SR、TARE2009MQ 和 TARE2008LS 菌株组成的复合菌具有较强的纤维素、蛋白质分解能力及除臭能力,综合性能高于任何单一菌株,作为有机物料腐熟剂进行应用后,从菌数、速效养分、C/N、气味和发酵周期效果来看,对有机物料的腐熟和除臭都起到了显著的促进作用。柳玲玲等^[2]对不同腐熟菌剂对鸡粪堆肥效果的影响研究表明,鸡粪堆肥通过接种微生物菌剂,可以明显提高堆肥初期的发酵温度,加快堆肥物料的水分挥发,缩短堆肥发酵周期,促进堆肥快速腐熟。赵晓锋等^[8]分离筛选出细菌 KB217、放线菌 KA46 和真菌 KF21 这 3 个菌株,使鸡粪堆肥的氨气释放量分别降低了 59.40%、55.05% 和 56.38%。3 种菌株之间无拮抗作用,三者混合制剂能使氨气释放量降低 67.33%,且缩短氨气释放时间,这与该研究结果相似。

(2) 微生物菌株是一种容易变异的生物,生长繁殖受环境影响也非常大,因此,微生物腐熟剂或除臭剂的特性易变异,性能不稳定,对有机物料的腐熟和除臭效果也会造成不同程度的影响,今后应该在这方面加大研究力度。

参考文献

- [1] 姜静颖,邢殿楼,王斌,等.池塘养殖中华绒螯蟹幼蟹的一种球状病毒粒子的电镜观察[J].大连水产学院学报,1996,11(1):51-53.
- [2] 陆宏达,范丽萍,薛美.中华绒螯蟹小核糖核酸病毒病及其组织病理学[J].水产学报,1999,23(1):61-68.
- [3] 沈锦玉,尹文林,钱冬,等.中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病病原的研究[J].中国水产科学,2000,7(3):89-92.
- [4] 严维辉,唐建清,刘炜,等.小龙虾、河蟹与鱼高效混养技术[J].水产养殖,2008,29(2):26-27.
- [5] 雷燕,戚瑞荣,唐绍林,等.褐篮子鱼虹彩病毒病的诊断[J].大连海洋大学学报,2014,29(3):236-240.
- [6] 雷燕,戚瑞荣,崔龙波,等.大口黑鲈鱼种弹状病毒病的诊断[J].大连海洋大学学报,2015,30(3):305-308.
- [7] 蔡生力,黄捷,王崇明,等.1993-1994 年对虾暴发病的流行病学研究[J].水产学报,1995,19(2):112-117.
- [8] INOUE K, MIWA S, OSEKO N, et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: Electron microscopic evidence of the causative virus[J]. Fish pathology, 1994, 29(2): 149-158.
- [9] LIGHTNER D V, REDMAN R M, POULOS B T, et al. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp[J]. Rev Sci Tech, 1997, 16(1): 146-160.
- [10] 朱建中,陆承平.对虾白斑综合征病毒在螯虾动物模型的感染特性[J].水产学报,2001,25(1):47-51.
- [11] 朱建中,陆承平.用动物模型检验消毒剂对对虾白斑综合征病毒的灭活效果[J].中国兽药杂志,2001,35(2):6-7.

参考文献

- [1] 郜玉环,李彦,孙明,等.山东省可农有机废弃物的利用现状与技术分析[J].山东农业科学,2011(7):98-101.
- [2] 柳玲玲,范成五,苟久兰,等.不同腐熟菌剂对鸡粪堆肥效果的影响[J].耕作与栽培,2015(5):18-19.
- [3] 梁雄.不同秸秆腐熟剂应用效果对比研究[J].安徽农学通报,2011,17(15):127-129.
- [4] 刘军.产高温蛋白酶高温菌的筛选[J].武汉工业学院学报,2004,23(4):22-23.
- [5] 翁海波,敬蔚然,杨丹丽,等.产高温碱性蛋白酶菌株筛选及酶学性质研究[J].郑州大学学报(工学版),2010,31(1):70-73.
- [6] 杨冠东,杜少平,杨砾华,等.产碱性蛋白酶的嗜热菌株筛选及发酵条件研究[J].食品与发酵工业,2008,34(10):71-73.
- [7] 刘月,许修宏,徐杰,等.功能菌剂对堆肥中木质纤维素降解的影响[J].中国土壤与肥料,2014(4):81-86.
- [8] 赵晓锋,于文清,田艳洪,等.鸡粪除氨菌株的分离、筛选与菌剂配制[J].黑龙江农业科学,2012(6):85-87.
- [9] 徐大勇,黄为一.接种外源腐熟菌剂对牛粪高温堆肥的影响[J].安徽农业科学,2012,40(13):7759-7762.
- [10] 熊骏生,魏姣姣,陆倩,等.垃圾堆肥过程恶臭污染及其控制技术研究进展[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2015,14(4):405-411.
- [11] 曾苏,李南华,贺琨,等.垃圾微生物除臭剂的筛选、复配及其培养条件的优化[J].微生物学杂志,2015,35(2):72-77.
- [12] 席锋,高颖,吴良政,等.生物除臭剂的制备及除臭效果测定[J].贵州畜牧兽医,2011,35(3):1-3.
- [13] 梁军,罗洪,罗英,等.生物除臭剂对鸡粪除臭处理的研究[J].四川环境,2012,31(S1):13-17.
- [14] 刘胜洪,周玲艳,刘文,等.生物除臭菌对猪粪堆肥腐熟效果的影响[J].南方农业学报,2014,45(3):425-428.
- [15] 张云峰.嗜热蛋白酶生产菌的筛选[J].西南师范大学学报(自然科学版),2006,31(2):157-161.
- [16] 陆文龙,崔广明,陈浩泉,等.微生物除臭剂对污泥和生活垃圾臭气抑制效果的中试研究[J].环境卫生工程,2012,20(2):23-25.
- [17] 赵晓锋,隋文志.微生物除臭剂研究进展[J].现代化农业,2011(6):26-28.
- [18] 刘胜洪,程驹,郭长江,等.微生物除臭菌对改善畜禽养殖场环境的应用初探[J].天津农业科学,2011,17(4):25-27.
- [19] 杨伯杰,张淑娟,林剑发,等.污泥堆肥恶臭气体生物处理技术的研究进展[J].广东化工,2014,41(16):124-125.
- [20] 李南华,胡子全,赵海泉,等.新型生物除臭剂在垃圾渗滤液除臭效果评估[J].广州环境科学,2013,28(1):18-19,30.
- [21] 崔玉雪,郭广寨,黄皇,等.用于填埋场恶臭气体控制的微生物除臭剂筛选及其除臭机制研究[J].环境污染与防治,2014,36(1):60-63.