农业环境科学学报
JOURNAL OF AGRO-ENVIRONMENT SCIENCE
中文核心期刊/CSCD
请通过网上投稿系统投稿
网址：http://www.aes.org.cn

极端嗜热功能菌筛选及其促进堆肥腐熟效果研究

王玉，张晶，曹云，吴华山，黄红英，刘爱民

引用本文:
王玉, 张晶, 曹云, 等. 极端嗜热功能菌筛选及其促进堆肥腐熟效果研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(7): 1633-1642.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0007

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

畜禽粪便堆肥前期理化及微生物性状研究
曹云, 常志州, 黄红英, 徐跃定, 吴华山
农业环境科学学报. 2015, 34(11): 2198-2207 https://doi.org/10.11654/jaes.2015.11.023

鸡粪除臭菌的分离筛选及除臭效果分析
李玥, 李成成, 李静, 张潇月, 张紫薇, 黄议漫, 刘浩, 罗鸿, 张小平, 赵珂
农业环境科学学报. 2020, 39(5): 1103-1110 https://doi.org/10.11654/jaes.2019-1354

嗜盐碱高环PAHs降解菌的分离及其降解特性研究
范瑞娟, 刘雅琴, 张琇
农业环境科学学报. 2019, 38(6): 1280-1287 https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1023

牛粪稻秸新型静态堆肥中真菌群落组成的动态特征
张文浩, 门梦琪, 许本姝, 许修宏, 成利军, 孟庆欣, 邓利廷, 姜欣, 武晓桐, 盛思远
农业环境科学学报. 2018, 37(9): 2029-2036 https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1579

石油降解菌群的构建及其对混合烃的降解特性
范瑞娟, 郭书海, 李凤梅
农业环境科学学报. 2017, 36(3): 522-530 https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1266

关注微信公众号，获得更多资讯信息

王　玉, 张　晶, 曹　云, 等. 极端嗜热功能菌筛选及其促进堆肥腐熟效果研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(7): 1633-1642.
WANG Yu, ZHANG Jing, CAO Yun, et al. Screening of functional extreme thermophiles and their effects on improving the maturation of composting[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(7): 1633-1642.

开放科学OSID

极端嗜热功能菌筛选及其促进堆肥腐熟效果研究

王　玉[1,2], 张　晶[2,3,4], 曹　云[2,3,4], 吴华山[2,3,4], 黄红英[2,3,4*], 刘爱民[1*]

(1.安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 2.江苏省农业科学院循环农业研究中心, 南京 210014; 3.农业农村部种养结合重点实验室, 南京 210014; 4.江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心, 南京 210014)

摘　要:本研究采用富集培养方法从不同高温堆肥环境中分离筛选到9株极端嗜热菌,通过16S rDNA序列比对分析确定其分类地位,通过生长特性研究和酶活测定,优选出6株菌株复配成极端嗜热菌剂,采用模拟堆肥方法研究极端嗜热菌剂促进堆肥腐熟效果。结果表明:本研究分离得到的9株菌分别属于土芽孢杆菌属(*Geobacillus* sp.)、栖热菌属(*Thermus* sp.)、副土芽孢杆菌属(*Parageobacillus* sp.)和红嗜热菌属(*Rhodothermus* sp.)。所分离菌株最适生长温度均在65~70 ℃;菌株NY-44、D和E的最适生长pH为9.5,属于嗜碱菌;菌株NY-44最适生长盐浓度为20 g·L^{-1},属于嗜盐菌。土芽孢杆菌和副土芽孢杆菌所产蛋白酶活性相对其他菌株较高,且最适反应温度均不低于80 ℃。在堆肥30 d时,接种极端嗜热菌剂的处理与未接种相比,种子发芽指数(GI)和胡富比(HA/FA)分别提高了35.9%和21.3%。研究结果表明,接种极端嗜热菌剂能加快堆肥腐熟进程,提高堆肥品质。

关键词:极端嗜热菌;生长特性;酶活;堆肥;腐熟

中图分类号:S141.4　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1672-2043(2020)07-1633-10　　doi:10.11654/jaes.2020-0007

Screening of functional extreme thermophiles and their effects on improving the maturation of composting

WANG Yu[1,2], ZHANG Jing[2,3,4], CAO Yun[2,3,4], WU Hua-shan[2,3,4], HUANG Hong-ying[2,3,4*], LIU Ai-min[1*]

(1.College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China; 2.Recycling Agriculture Research Center, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3.Key Laboratory of Crop and Livestock Integrated Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China; 4.Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing 210014, China)

Abstract: Nine strains of extremely thermophilic bacteria were isolated during the high temperature period of different types of composts, and their classification statuses were identified by 16S rDNA analysis. Six strains were selected to be compounded into an extremely thermophilic inoculum according to their growth characteristics and enzyme activities. The effects of the extremely thermophilic inoculum on the maturation of composting were studied in a mimic experiment. The results showed that the nine strains isolated in this study belonged to the *Geobacillus* sp., *Thermus* sp., *Parageobacillus* sp., and *Rhodothermus* sp. The optimal growth temperatures of the isolated strains ranged from 65~70 ℃; Strains NY-44, D, and E were alkalophiles because their optimum growth pH was 9.5. Strain NY-44 was a halophile because its optimum growth salt concentration was 20 g·L^{-1}. The protease activities of *Geobacillus* and *Parageobacillus* strains were higher than those of other strains, and their optimal reaction temperatures were over 80 ℃. The seed germination index(GI) and the ratio of humic acids to fulvic acids(HA/FA) in the extreme thermophilic bacteria inoculation treatment were 35.9% and 21.3% greater than those in the non-inoculation control at 30 days of composting, respectively. The results indicate that inoculation with extreme thermophiles can accelerate the maturation of composting and improve the quality of the compost.

Keywords: extreme thermophiles; growth characteristics; enzyme activity; composting; maturity

收稿日期:2020-01-02　　**录用日期**:2020-03-24

作者简介:王　玉(1993—),女,安徽六安人,硕士研究生,从事环境微生物研究。E-mail:wy1309@126.com

***通信作者**:黄红英　E-mail:sfmicrolab@aliyun.com; 刘爱民　E-mail:amliu9393@163.com

基金项目:江苏省农业科技自主创新项目(CX(17)2024);国家重点研发计划项目(2017YFD0801403)

Project supported: Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX (17) 2024); National Key R&D Program of China (2017YFD0801403)

目前，畜禽粪便的利用仍然是个难题，堆肥是实现畜禽粪便资源化、无害化、减量化利用的重要途径。然而传统堆肥也面临着许多问题，诸如发酵温度低、发酵周期长、无害化不彻底、臭味污染严重等。近年来，有研究表明[1-2]，在堆肥过程中接种菌剂，能有效提高堆肥腐熟度，缩短堆肥周期。然而也有研究表明[3-4]，外源接种菌剂并不能在堆肥过程中很好地发挥作用。究其原因，主要是接种的微生物与土著微生物相比，对堆肥环境的适应性差，导致对堆肥有机物分解利用不充分，从而达不到预期效果。因此，如何获得对堆肥环境适应性好，并能稳定发挥作用的微生物菌剂是研究重点。

根据环境中微生物最适生长温度的不同，可以将其分为嗜冷微生物（<20 ℃）、嗜温微生物（25~40 ℃）、嗜热微生物（40~60 ℃）、极端嗜热微生物（60~85 ℃）和超嗜热微生物（>85 ℃）[5]。Oshima等[6]首次发现极端嗜热微生物在高温堆肥过程中具有非常重要的作用。廖汉鹏等[7]发现土芽孢杆菌属（*Geobacillus*）、栖热菌属（*Thermus*）和 *Calditerricola* 等属的极端嗜热菌对提高堆肥堆体温度、促进堆肥腐熟的作用显著。目前，国内外关于堆肥用极端嗜热菌剂的报道不多，尤其是针对堆肥环境制备具有良好适应性和功能性的极端嗜热菌剂产品更是少有研究。为此，本研究从不同高温堆肥样品中筛选既能在高温、高pH、高盐浓度的畜禽粪便堆肥环境中存活，且同时具备大分子有机物降解能力的极端嗜热功能菌，按一定要求复配成极端嗜热菌剂，在猪粪堆肥中添加该复配菌剂，并考察不同堆肥时期的种子发芽指数、腐殖质组分及含量的变化来确定复配菌剂促进堆肥腐熟、提高堆肥品质的效果，以期获得具有商业价值的极端嗜热菌剂。

1 材料与方法

1.1 材料

分菌样品取自江苏、湖南等地不同有机肥厂的高温期畜禽粪便及秸秆堆肥。

新鲜猪粪取自江苏镇江乐甜仕猪场，水稻秸秆取自江苏省农科院水稻试验基地。

培养基：（1）LB培养基为胰蛋白胨10 g·L^{-1}，酵母浸粉5 g·L^{-1}，NaCl 10 g·L^{-1}，pH 7.2~7.4。固体培养基每1 L加琼脂10 g和结冷胶10 g。（2）富集培养基为NH_4NO_3 1.0 g·L^{-1}，K_2HPO_4 1.5 g·L^{-1}，KH_2PO_4 0.5 g·L^{-1}，$MgSO_4$ 0.2 g·L^{-1}，NaCl 1.0 g·L^{-1}，胰蛋白胨0.2 g·L^{-1}，酵母浸粉0.2 g·L^{-1}，pH 7.0。

1.2 极端嗜热菌的分离及鉴定

菌株分离：取不同堆肥高温期的样品10 g，放入90 mL富集培养基中，60 ℃振荡培养3 d后，以5%接种量转接至新鲜的富集培养基中，65 ℃振荡培养3 d，按相同方法再次转接，70 ℃振荡培养3 d。吸取第3次富集液梯度稀释后涂布于LB固体培养基上，将平板置于70 ℃恒温培养箱中培养2 d，挑取形态不同的单菌落，进一步划线纯化。最终分离出的单菌置于终浓度为10%的甘油中，-80 ℃保存。

菌株鉴定：各菌株提取总DNA进行PCR扩增，扩增引物为细菌16S rDNA序列通用引物27F/1492R，扩增体系及程序参考文献[8]，扩增产物送上海生工生物工程有限公司测序，测序结果在GenBank中进行blast比对，运用MEGA 5.0软件构建系统发育树。

1.3 菌株的生长特性研究

温度对菌株生长的影响：以2%的接种量，将新鲜菌体接种到LB液体培养基中，置于不同的生长温度下（35、45、55、65、70、75、80 ℃）振荡培养，24 h后取样测定其在OD_{600}处的吸光值。

pH对菌株生长的影响：以2%的接种量，将新鲜菌体接种到LB液体培养基中，培养基pH分别为3.5、5.5、6.5、7.5、9.5和11.5，65 ℃振荡培养，24 h后取样测定其在OD_{600}处的吸光值。

盐浓度对菌株生长的影响：以2%的接种量，将新鲜菌体接种到NaCl含量分别为1、5、10、20、50 g·L^{-1}和100 g·L^{-1}的LB液体培养基中（pH 7.2~7.4），65 ℃振荡培养，24 h后取样测定其在OD_{600}处的吸光值。

1.4 不同温度条件下的酶活测定

蛋白酶活力的测定：采用福林（Folin）法测定蛋白酶活力[9]，粗酶液与2%酪蛋白溶液分别在不同温度下（70、80、85、90、95 ℃）反应20 min，加入三氯乙酸终止反应，上清液加入碳酸钠和福林试剂进行显色反应，测定OD_{680}处的吸光值，根据酪氨酸标准曲线计算生成的酪氨酸量。酶活单位定义：一定条件下每分钟水解酪蛋白溶液生成1 μg酪氨酸所需要的酶量为1个酶活力单位。

淀粉酶活力的测定：采用DNS法测定淀粉酶活力[10]，粗酶液与1%的淀粉溶液分别在不同温度下（70、80、85、90、95 ℃）反应10 min，加入DNS试剂进行显色反应，测定OD_{540}处的吸光值，根据麦芽糖标准曲线计算生成的麦芽糖量。酶活单位定义：一定条件下每分钟水解淀粉释放1 μmol还原糖所需要的酶量为1个酶活力单位。

木聚糖酶活力的测定:采用DNS法测定木聚糖酶活力[11],粗酶液与1%木聚糖溶液分别在不同温度下(70、80、85、90、95 ℃)反应10 min,加入DNS试剂进行显色反应,测定OD_{540}处的吸光值,根据木糖标准曲线计算生成的木糖量。酶活单位定义:一定条件下每分钟水解木聚糖产生1 μmol还原糖(以木糖计)所需的酶量为1个酶活性单位。

脂肪酶活力的测定:采用滴定法测定脂肪酶活力[12],粗酶液与橄榄油乳化液分别在不同温度下(70、80、85、90、95 ℃)反应20 min,用NaOH滴定计算生成的脂肪酸量。酶活单位定义:一定条件下每分钟水解底物释放1 μmol脂肪酸所需要的酶量为1个酶活力单位。

1.5 极端嗜热菌剂制备

根据菌株生长特性和酶活测定结果,挑选出6株菌(NN-86、NY-44、LB-3、B、D、E)用于构建具有较好环境耐受性和有机物降解能力的复合菌剂。进一步通过拮抗试验确认各复配菌株间不存在拮抗现象。将各菌株分别培养制备成菌悬液后,取各菌株种子液等比例混合后接种于新鲜培养液中继续培养,至培养液中有效活菌数≥1×10^8 cfu·mL^{-1}时即获得极端嗜热复合菌剂。

1.6 极端嗜热菌剂促进堆肥腐熟效果研究

堆肥所用原料的基本性质见表1。

采用实验室模拟堆肥方法,将猪粪(主料)和秸秆(辅料)按比例混合,调节初始C/N为25,初始含水率为65%。试验设常规堆肥(未接种)和接种极端嗜热菌剂堆肥(接种,2%接种量),为排除培养基对堆肥结果的影响,常规堆肥组加入2%的液体培养基,每个处理组重复3次。将盛有混合物料的小型堆肥装置(2 L圆形带盖塑料桶)放入烘箱中,模拟自然高温堆肥温度变化控制堆体温度,堆肥过程中的温度控制条件见图1。每隔2 d翻堆一次,分别在第0、6、12、18、24、30 d和42 d取样,测定堆肥各时期的GI及腐殖质、胡敏酸和富里酸含量。GI测定参照Ke等[13]的方法进行,具体计算公式见式(1)。

$$GI=\frac{\text{堆肥浸提液的种子发芽率}\times\text{种子根长}}{\text{蒸馏水的种子发芽率}\times\text{种子根长}} \quad (1)$$

堆肥腐殖质及其组分的测定采用焦磷酸钠提取-重铬酸钾氧化容量法。

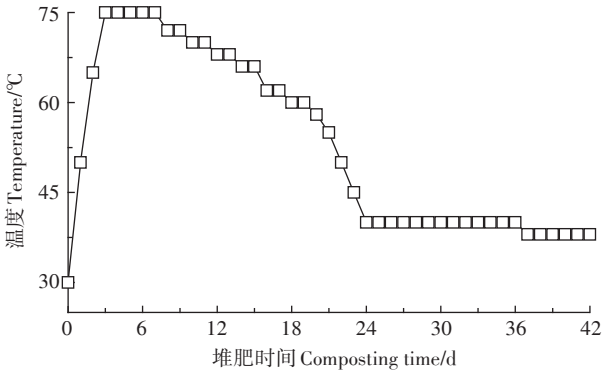

图1 模拟堆肥温度控制

Figure 1 Temperature control in the mimic experiment

2 结果与讨论

2.1 极端嗜热菌株的分离鉴定

堆肥高温期样品经过富集培养和分离纯化,共得到9株能在70 ℃生长的极端嗜热菌株,各菌株的菌落形态见图2,详细形态描述见表2。16S rDNA序列比对结果表明(表2):菌株NN-36、NN-86、LB-3、B与土芽孢杆菌属相似度最高;菌株NY-44与副土芽孢杆菌属相似度最高;菌株80-31、80-39、E与栖热菌属相似度最高;菌株D与红嗜热菌属相似度最高。同时,从构建的系统发育树可知(图3):菌株NN-36、NN-86、LB-3、B与土芽孢杆菌属聚为一类,因此初步鉴定其为*Geobacillus* sp.;菌株NY-44与副土芽孢杆菌属聚为一类,因此初步鉴定其为*Parageobacillus* sp.;菌株80-31、80-39、E与栖热菌属聚为一类,因此初步鉴定其为*Thermus* sp.;菌株D与红嗜热菌属聚为一类,因此初步鉴定其为*Rhodothermus* sp.。*Geobacillus* sp.和*Thermus* sp.是堆肥高温期常见优势菌株[14-15],*Parageobacillus* sp.和*Rhodothermus* sp.在堆肥中少有报道。本研究从高温堆肥环境分离获得的极端嗜热菌中,土芽孢杆菌和栖热菌占比高达80%左右,与前人研究结果一致。

2.2 菌株生长特性及酶活测定结果

2.2.1 菌株的生长特性

温度是影响菌株生长、繁殖、新陈代谢的重要指

表1 堆肥原料的理化性质

Table 1 Physiochemical properties of raw materials for composting

堆肥原料 Raw material	总碳 Total carbon/g·kg^{-1}	总氮 Total nitrogen/g·kg^{-1}	C/N	pH	含水率 Moisture content/%
猪粪 Pig manure	383.3±0.7	29.3±0.6	13.1±0.1	8.00±0.10	71.9±0.6
水稻秸秆 Rice straw	451.4±1.6	6.1±0.1	75.3±2.3	7.76±0.20	5.8±0.5

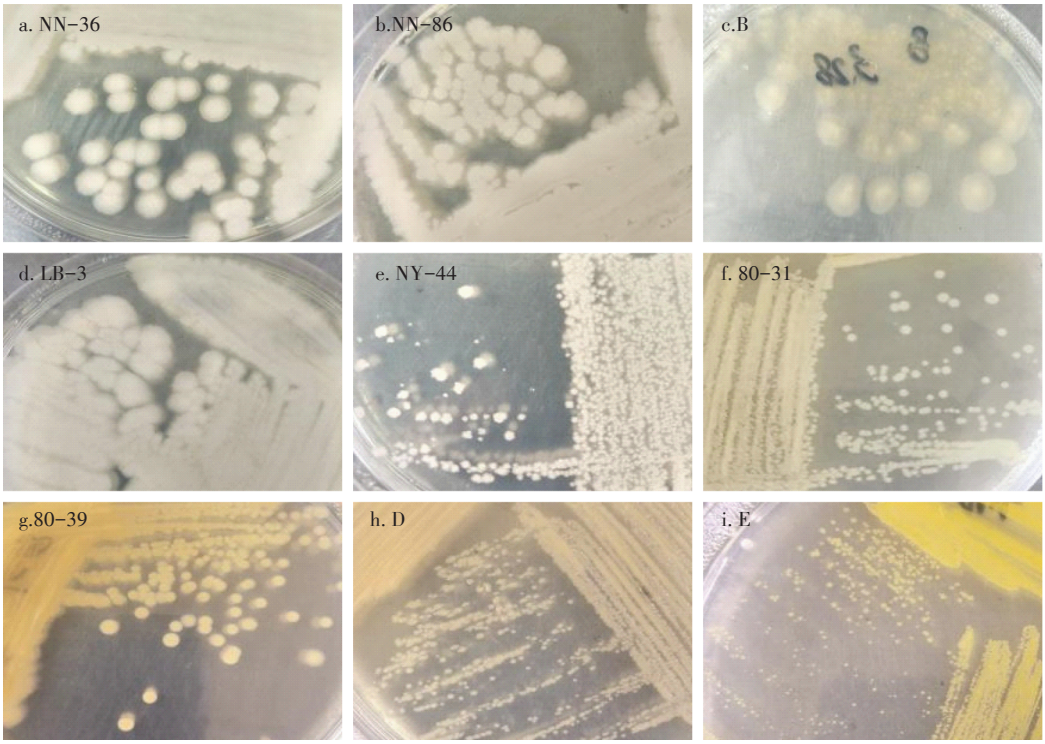

图2 9株菌株在LB培养基上的菌落形态

Figure 2 Colony morphology of nine strains on the LB medium

表2 菌株16S rDNA序列相似性分析及菌落形态描述

Table 2 Similarity analysis of the 16S rDNA sequences of the isolated strains and descriptions of colony morphology

菌株编号(GenBank登录号) Strain number(accession number)	最大相似性菌株 Maximum similarity strain	相似度 Similarity/%	菌落形态 Colony morphology
NN-36(MT078689)	*Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus* F84b	99.93	圆形,白色,不透明,扁平,表面不光滑,边缘不整齐,直径4~5 mm
NN-86(MT078690)	*Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus* F84b	99.86	形状不规则,乳白色,不透明,扁平,表面不光滑,边缘不整齐,直径3~5 mm
LB-3(MT078691)	*Geobacillus thermodenitrificans* subsp. *calidus* F84b	99.86	形状不规则,白色,不透明,扁平,表面不光滑,边缘不整齐,直径4~6 mm
B(MT079736)	*Geobacillus vulcani* 3S-1	98.92	圆形,白色,半透明,扁平,表面光滑,边缘整齐,直径3~4 mm
NY-44(MT078692)	*Parageobacillus caldoxylosilyticus* NBRC 107762	98.35	形状不规则,白色,不透明,扁平,表面不光滑,边缘不整齐,直径1.5~2 mm
80-31(MT078687)	*Thermus parvatienis* RL	99.85	圆形,淡黄色,半透明,凸起,表面光滑,边缘整齐,直径1.5~2 mm
80-39(MT078688)	*Thermus thermophilus* HB8	98.88	圆形,橘红色,半透明,凸起,表面光滑,边缘整齐,直径1.5~2 mm
E(MT079738)	*Thermus thermophilus* HB8	99.78	圆形,黄色,半透明,凸起,表面光滑,边缘整齐,直径0.5~1 mm
D(MT079737)	*Rhodothermus marinus* DSM 4252	99.43	圆形,橘红色,半透明,凸起,表面光滑,边缘整齐,直径0.5~1 mm

标之一。由图4a可以看出,菌株80-31、80-39、D、E的最适生长温度为70 ℃,菌株NN-36、NN-86、NY-44、LB-3和B的最适生长温度为65 ℃。近年来已有研究表明提高堆体温度可加速腐殖化进程,缩短发酵周期[16-17]。在传统过程堆肥中温度超过70 ℃将抑制几乎所有微生物(包括嗜热微生物)的活性,导致后续堆肥过程难以稳定运行,因此分离筛选最适生长温度为65 ℃和70 ℃的高温菌株资源并应用到堆肥中具有重要意义。

由图4b可知,各个菌株对盐浓度的耐受能力不同。多数菌株的最适生长盐浓度为10 g·L^{-1},而菌株NY-44的最适生长盐浓度是20 g·L^{-1},比其他菌株能耐受更高盐浓度,属于嗜盐菌[18]。

由图4c可知,所分离菌株都能在pH 7.5以上生长,都属于耐碱菌。其中菌株NY-44、D和E的最适生长pH为9.5,属于嗜碱菌[19]。曹云等[20]在研究畜禽

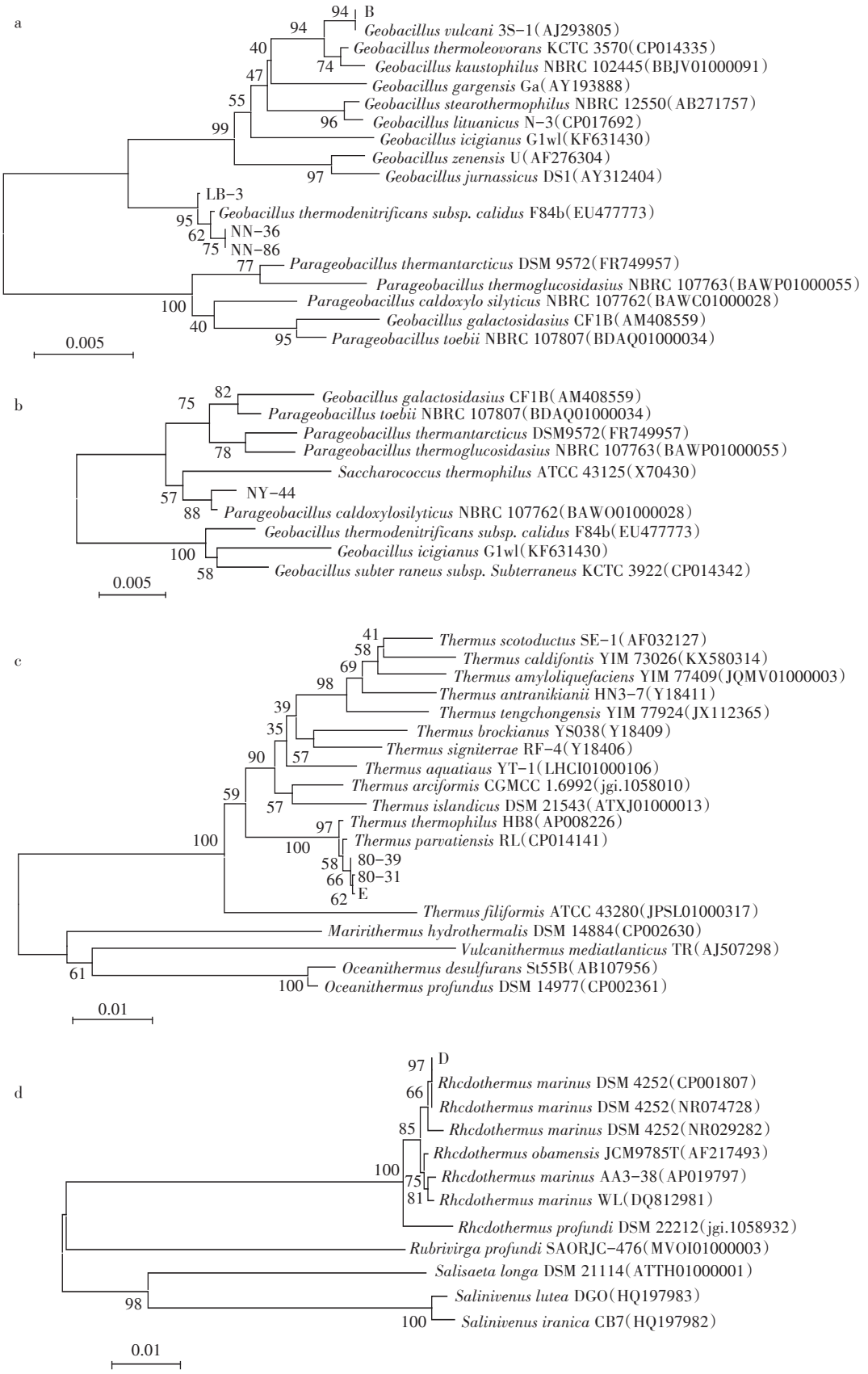

图3 9株菌株基于16S rDNA序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of nine strains based on 16S r DNA sequences

粪便堆肥前期理化性质发现，堆肥前期由于微生物分解蛋白质类有机物产生氨氮，促使pH值上升，pH可达到8~9。

综上，所分离菌株具有耐高温、耐碱和耐盐等特性，而堆肥过程是有着高温、高pH和高盐环境的，菌株的这些特性有助于它们在堆肥过程中更好地适应堆肥环境从而存活，而这也是菌剂在堆肥中发挥功能的先决条件。

2.2.2 菌株不同温度条件下的酶活性质

如图5a所示，所分离菌株都能检测出高温蛋白酶活性，菌株NN-36和NY-44所产蛋白酶在80 ℃酶

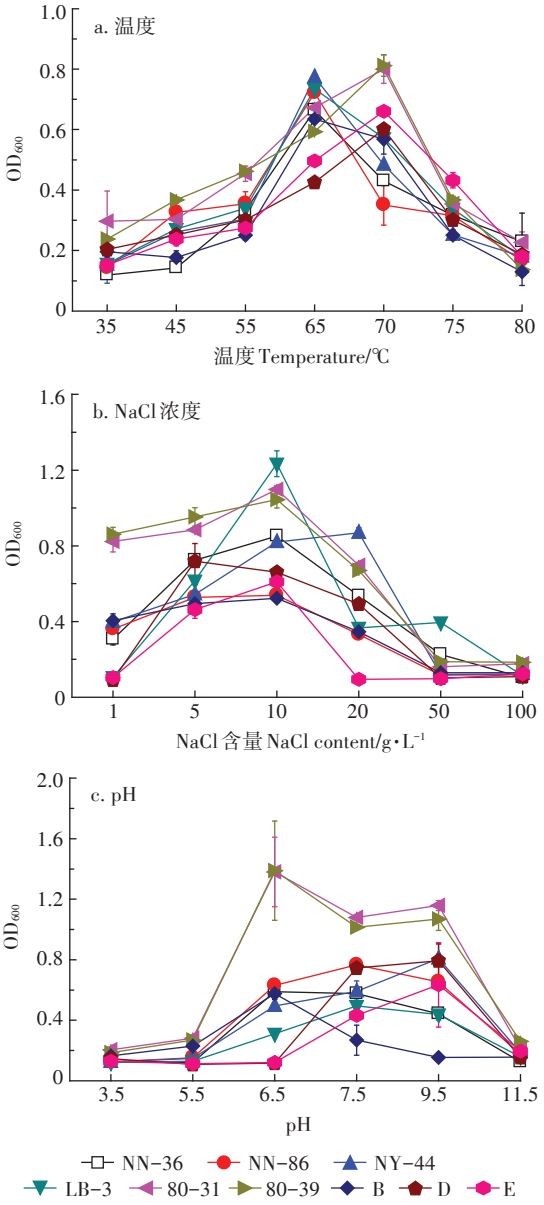

图4 温度、NaCl浓度、pH值对各菌株生长的影响

Figure 4 Effects of temperature, NaCl concentration, and pH value on the growth of each strain

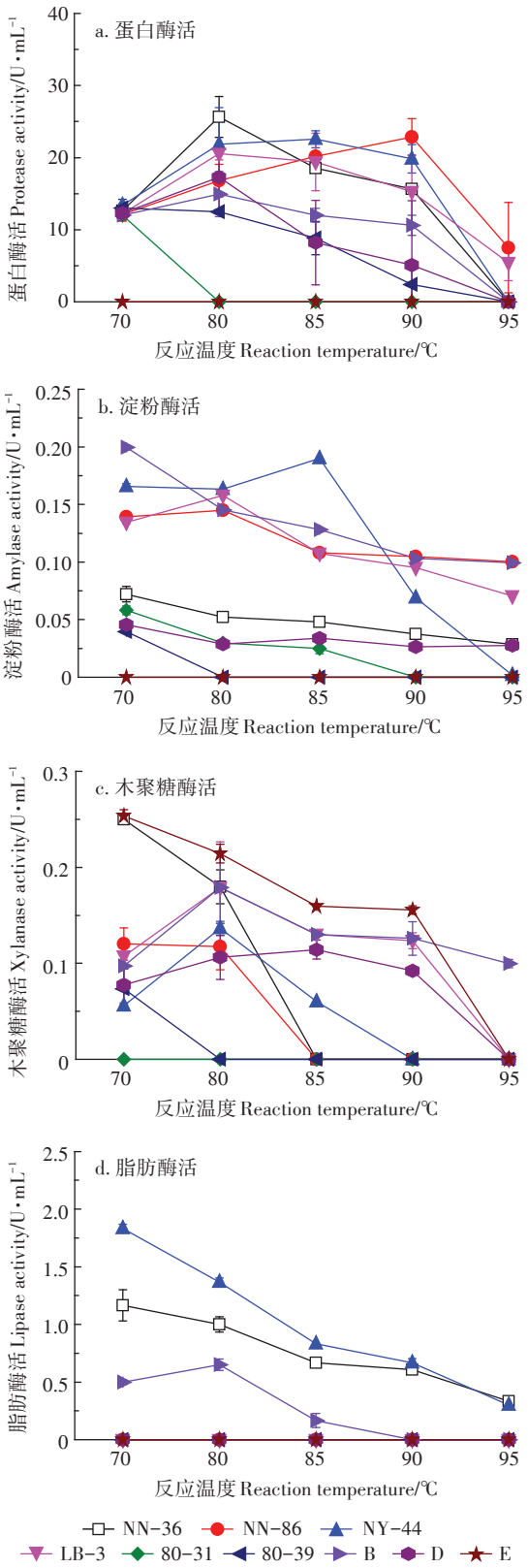

图5 各菌株在不同温度下的蛋白酶活、淀粉酶活、木聚糖酶活和脂肪酶活

Figure 5 Protease activity, amylase activity, xylanase activity, and lipase activity of each strain at different temperatures

活最大,分别为25.6 U·mL^{-1}和21.8 U·mL^{-1};菌株NN-86、LB-3和D所产蛋白酶均在90 ℃酶活最大,分别为22.9、23.3 U·mL^{-1}和29.1 U·mL^{-1}。所有菌株均能检测出高温淀粉酶和木聚糖酶活性,但活性都较弱,其中菌株B所产淀粉酶在70 ℃酶活最大,为0.20 U·mL^{-1};菌株E所产木聚糖酶在70 ℃酶活最大,为0.25 U·mL^{-1}(图5b、图5c)。如图5d所示,只有菌株NY-44、NN-36和B检测到了脂肪酶活,且活性均不高,其中菌株NY-44所产脂肪酶在70 ℃酶活最大,为1.80 U·mL^{-1}。

有研究表明,土芽孢杆菌可产生多种高温酶,比如高温蛋白酶、淀粉酶和木聚糖酶等[21]。本研究结果也证明土芽孢杆菌同时具有高温蛋白酶、淀粉酶和木聚糖酶活性,且部分土芽孢杆菌还同时具备脂肪酶活性,说明土芽孢杆菌有较强的饲料酶系[22-23],有利于堆肥过程中大分子有机物的降解,从而促进堆肥升温和腐熟。高温菌所产的降解酶具有较好的热稳定性,能将发酵温度维持在较高的温度下,可以更加有效地杀死病原微生物,达到卫生化的要求。此外,高温酶不仅耐热,而且对不良化学环境也具有高度的耐受性,从而能提高有机废弃物处理效率,缩短堆肥生产周期。

2.3 接种极端嗜热菌剂对猪粪堆肥腐熟进程的影响

2.3.1 极端嗜热菌剂的复配

经过比较各菌株生长特性和不同温度下的酶活结果:NY-44既是嗜碱菌又是嗜盐菌;D和E是嗜碱菌;NN-86、LB-3在90 ℃时有最大蛋白酶活;菌株B能产脂肪酶和淀粉酶。最终选择NN-86、NY-44、LB-3、B、D和E这6株菌用于复配耐碱、耐盐和具备良好蛋白质、淀粉、脂肪和半纤维素高温降解能力的极端嗜热菌剂。

2.3.2 极端嗜热菌剂对堆肥GI的影响

GI是判断堆肥腐熟程度极为重要的指标之一。不同堆肥处理的GI变化如图6所示。在堆肥过程中,接种和未接种处理的GI都呈先下降再上升的趋势,且两组处理均在12 d时GI降到最低。堆肥初期发芽指数降低可能是因为有机物降解产生大量酚类化合物、挥发性有机酸和氨等植物毒素[24-25]。12 d后接种和未接种处理的GI均呈逐渐上升趋势,且接种处理的GI增加更为迅速,在30 d即达到了56.8%,已达到基本腐熟标准[26],而此时未接种堆肥的GI仅为41.8%。堆肥结束时,接种处理的GI为72.1%,比未接种处理高14.8%,堆肥结束时,未接种处理与接种处理的GI均超过50%,表明此时堆体已无明显植物毒性[27]。以上结果说明接种极端嗜热菌剂有利于加快猪粪堆肥的腐熟进程,从而缩短堆肥周期。

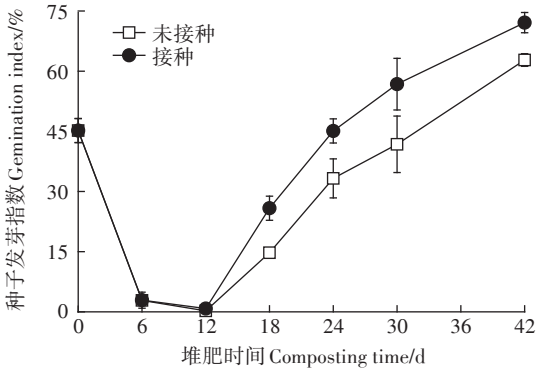

图6 堆肥过程中种子发芽指数(GI)变化

Figure 6 Changes of GI during composting

2.3.3 极端嗜热菌剂对堆肥腐熟进程的影响

在堆肥过程中,有机质在微生物的作用下,进行降解的同时还进行着腐殖化的过程。从图7a可以看出,接种和未接种堆肥总腐殖质含量均呈现先下降后上升再下降的变化趋势。堆肥12 d后接种处理的腐殖质含量一直高于未接种组,直至堆肥结束,接种处理腐殖质含量较未接种高出4.2%。堆肥结束时,接种处理和未接种处理腐殖质含量较初始值分别降低了12.8%和16.3%。现有研究关于堆肥过程腐殖质总量变化趋势没有统一结论,与堆肥原料以及堆肥工艺的选择有关。鲍艳宇等[28]研究以奶牛粪为原料的堆肥,发现腐殖质碳呈逐渐增加的趋势。本研究结果与曹云等[29]的研究结果相一致,以猪粪为原料堆肥时,堆肥腐熟后腐殖质总含量与初始相比均降低。

胡敏酸是一种分子量大、稳定性高的物质。图7b显示,在整个堆肥过程中胡敏酸含量总体呈现先略降低后逐渐上升的趋势。堆肥12 d后接种处理的胡敏酸含量一直高于未接种组,直至堆肥结束,接种处理胡敏酸含量较未接种高出7.8%。42 d时,接种处理和未接种处理胡敏酸含量分别为52.87 g·kg^{-1}和49.03 g·kg^{-1},较初始值分别提高了58.0%和46.5%。富里酸是腐植酸中分子量较小、活性较大、氧化程度较高的组分[30]。由图7c可知,堆肥过程中富里酸含量呈下降趋势,这主要是由于富里酸类物质分子量相对较小、分子结构简单,易被微生物降解。堆肥结束时,未接种处理和接种处理富里酸含量分别是34.97 g·kg^{-1}和34.63 g·kg^{-1},差异不显著。

胡敏酸和富里酸含量的比值(HA/FA)是评价堆肥腐殖化程度的一个重要指标,能较好地反映出堆肥

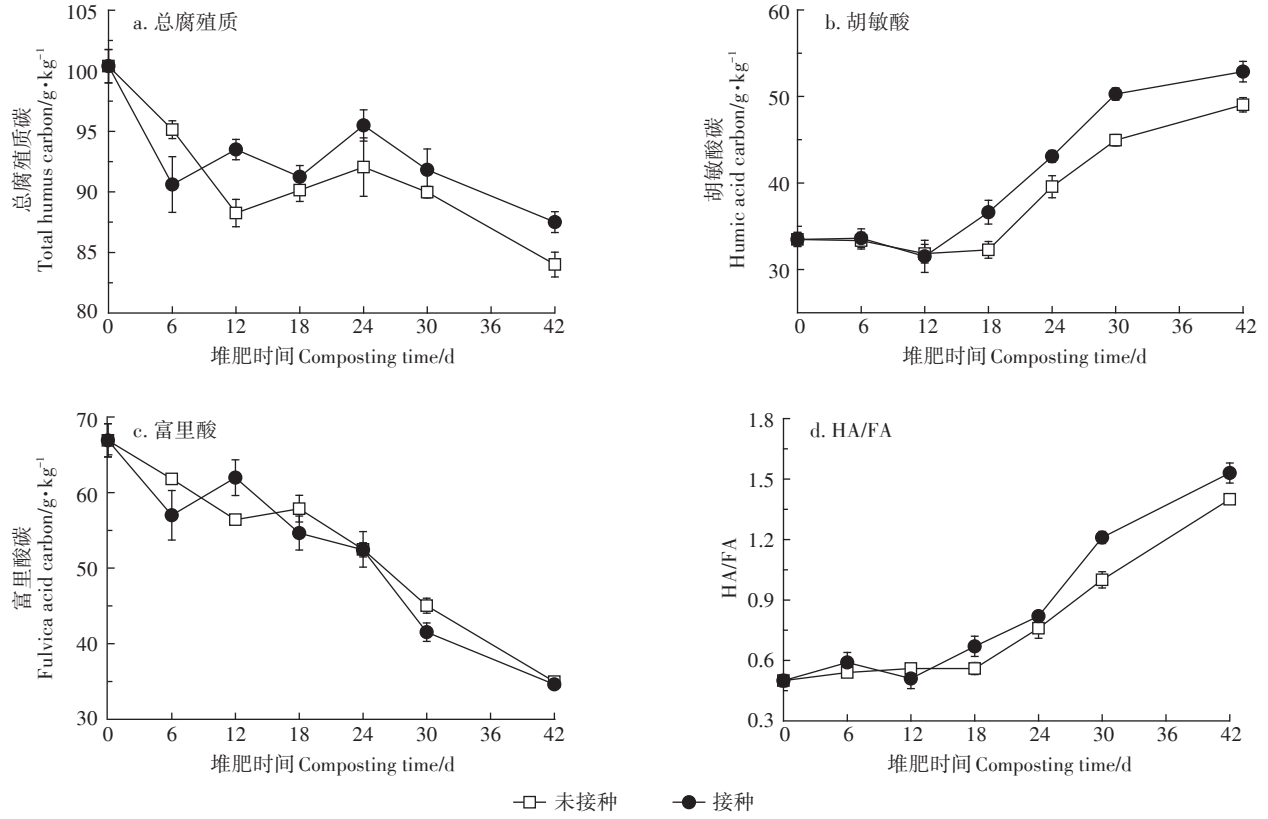

图7 堆肥过程中总腐殖质、胡敏酸、富里酸、HA/FA变化

Figure 7 Dynamics of humic substance, humic acid, fulvic acid, and HA/FA during composting

过程中腐殖质的聚合程度[31-32]。如图7 d所示，在整个堆肥过程中，各处理的HA/FA总体呈现增加的趋势。18 d后，接种处理HA/FA一直高于不接种处理组，42 d时，接种处理的HA/FA较未接种处理高出7.1%。有研究表明[33-34]，堆肥过程中HA/FA值在1.4以上，就可以判断堆肥腐熟。在42 d时，两组处理都超过1.4，说明堆肥结束时，两组堆肥都已腐熟。但接种处理的HA/FA在第36 d时已达到1.4，达到腐熟时间缩短了6 d。

结果表明，接种极端嗜热菌剂对猪粪堆肥腐殖质组成及含量的变化有着显著影响。接种菌剂促进了腐殖化进程，有利于胡敏酸的形成，提高了HA/FA，表明接种极端嗜热菌剂可以提高猪粪堆肥的腐殖化程度，提高堆肥产品质量。

3 结论

（1）本研究从高温堆肥环境中筛选出9株极端嗜热菌，经16S rDNA序列同源性比对，鉴定为：*Geobacillus* sp. 4株，*Thermus* sp. 3株，*Parageobacillus* sp. 1株，*Rhodothermus* sp. 1株。*Geobacillus* sp. 和 *Thermus* sp. 是堆肥高温期常见优势菌株，*Parageobacillus* sp. 和 *Rhodothermus* sp. 在堆肥中的应用少有报道，本研究为堆肥高温菌剂制备扩充了菌种资源。

（2）所分离菌株最适生长温度均在65~70 ℃；NY-44、D和E最适生长pH为9.5，属于嗜碱菌，其中NY-44最适生长盐浓度是20 g·L^{-1}，同时属于嗜盐菌；所分离土芽孢杆菌同时具有高温蛋白酶、淀粉酶和木聚糖酶活性，且部分土芽孢杆菌还兼具高温脂肪酶活性，有利于堆肥过程中大分子有机物的降解。

(3)堆肥结束时，接种极端嗜热菌剂的处理与未接种相比，GI提高了14.8%，总腐殖质含量和胡敏酸含量分别增加了4.2%和7.8%，HA/FA高出了7.1%。可见，接种本研究的极端嗜热菌剂有利于加快堆肥腐熟，增强堆肥的腐殖化程度和堆肥产品质量。对复配菌株比例的优化可能会进一步提升该极端嗜热菌剂促进堆肥腐熟效果，有待后续研究确认。

参考文献：

[1] Li C N, Li H Y, Yao T, et al. Microbial inoculation influences bacterial community succession and physicochemical characteristics during pig

manure composting with corn straw[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289:121653.

[2] Fang Y, Jia X B, Chen L J, et al. Effect of thermotolerant bacterial inoculation on the microbial community during sludge composting[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2019, 65(10):750-761.

[3] Golueke C G, Card B J, Mcgauhey P H. A critical evaluation of inoculums in composting[J]. *Applied Microbiology*, 1954, 2(1):45-53.

[4] 马 放, 冯玉杰, 任南琪. 环境生物技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2003.
MA Fang, FENG Yu-jie, REN Nan-qi. Environmental biotechnology [M]. Beijing:Chemical Industry Press, 2003.

[5] Mehta D, Satyanarayana T. Diversity of hot environments and thermophilic microbes[C]//Thermophilic microbes in environmental andindustrial biotechnology. Netherlands:Springer, 2013.

[6] Oshima T, Moriya T. A preliminary analysis of microbial and biochemical properties of high-temperature compost[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1125(1):338-344.

[7] 廖汉鹏, 陈 志, 余 震, 等. 有机固体废物超高温好氧发酵技术及其工程应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2017, 46(4):439-444.
LIAO Han-peng, CHEN Zhi, YU Zhen, et al. Development of hperthermophinic aerobic composting and its engineering applications in organic solid wastes[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2017, 46(4):439-444.

[8] 张海霞, 李昕晨, 孙晓红. 污泥堆肥微生物菌剂的筛选优化及应用[J]. 环境污染与防治, 2019, 41(8):910-915.
ZHANG Hai-xia, LI Xin-chen, SUN Xiao-hong. Screening and optimization of microbial agents and its application in sludge composting[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2019, 41(8):910-915.

[9] 尹春筱. 产高温蛋白酶菌株的分离鉴定及蛋白酶基因的克隆与表达[D]. 南昌:东华理工大学, 2018.
YIN Chun-xiao. Screening of thermostable protease-producing strains and cloning expression protease gene[D]. Nanchang: East China Institute of Technology, 2018.

[10] Mamo G, Gessesse A. Thermostable amylase production by immobilized thermophilic *Bacillus* sp.[J]. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(6):447-450.

[11] 陈学敏, 刘培培, 张 波. 一株产木聚糖酶嗜热菌的鉴定及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2):151-156.
CHEN Xue-min, LIU Pei-pei, ZHANG Bo. Identification of a thermophilic bacterium and preliminary characterization of the secreted xylanase[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(2):151-156.

[12] Pignède G, Wang H, Fudalej F, et al. Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(10):2802-2810.

[13] Ke G R, Lai C M, Liu Y Y, et al. Inoculation of food waste with the thermo-tolerant lipolytic actinomycete *Thermoactinomyces vulgaris* A31 and maturity evaluation of the compost[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(19):7424-7431.

[14] Beffa T, Blanc M, Lyon P F, et al. Isolation of thermus strains from hot composts(60 to 80 degrees C)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(5):1723-1727.

[15] Sung M H. *Geobacillus toebii* sp. nov. a novel thermophilic bacterium isolated from hay compost[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(6):2251-2255.

[16] Yamada T, Miyauchi K, Ueda H, et al. Composting cattle dung wastes by using a hyperthermophilic pre-treatment process: Characterization by physicochemical and molecular biological analysis[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 104(5):408-415.

[17] 薛兆骏, 周国亚, 俞肖峰, 等. 超高温自发热好氧堆肥工艺处理剩余污泥[J]. 中国环境科学, 2017, 37(9):3399-3406.
XUE Zhao-jun, ZHOU Guo-ya, YU Xiao-feng, et al. Ultra high temperature aerobic composting process in treating municipal sludge[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(9):3399-3406.

[18] 刘铁汉, 周培瑾. 嗜盐微生物[J]. 微生物学通报, 1999, 26(3):232.
LIU Tie-han, ZHOU Pei-jin. Halophilic microorganism[J]. *Microbiology*, 1999, 26(3):232.

[19] 裴凌鹏, 骆海朋. 极端微生物浅谈[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2003, 24(1):48-54.
PEI Ling-peng, LUO Hai-peng. Extremophiles[J]. *Journal of Capital Normal University(Natural Science Edition)*, 2003, 24(1):48-54.

[20] 曹 云, 黄红英, 吴华山, 等. 畜禽粪便超高温堆肥产物理化性质及其对小白菜生长的影响[J]. 农业工程学报, 2018, 34(12):251-257.
CAO Yun, HUANG Hong-ying, WU Hua-shan, et al. Physico-chemical properties of hyperthermophilic composting from livestock manures and its effects on growth of Chinese cabbage[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2018, 34(12):251-257.

[21] 王 佳, 易 弋, 夏 杰, 等. 嗜热微生物的分离及其产酶特性的初步研究[J]. 食品工业, 2014, 35(11):278-281.
WANG Jia, YI Yi, XIA Jie, et al. Isolation and enzyme system preliminary analysis of thermophilic microorganisms[J]. *The Food Industry*, 2014, 35(11):278-281.

[22] 冯定远. 饲料酶制剂应用技术与产业开发现状和展望[J]. 饲料工业, 2018, 39(17):1-6.
FENG Ding-yuan. Application technology of feed enzyme preparation and its development status and prospect[J]. *Feed Industry*, 2018, 39(17):1-6.

[23] 冯定远. 饲料酶中的主效酶与辅效酶[J]. 饲料工业, 2019, 40(17):1-11.
FENG Ding-yuan. The main and coenzyme properties of feed enzymes [J]. *Feed Industry*, 2019, 40(17):1-11.

[24] Zubillaga M S, Lavado R S, et al. Phytotoxicity of biosolids compost at different degrees of maturity compared to biosolids animal manures[J]. *Compost Science and Utilization*, 2006, 14(4):267-270.

[25] Tsai S H, Liu C P, Yang S S, et al. Microbial conversion of food wastes for biofertilizer production with thermophilic lipolytic microbes[J]. *Renewable Energy*, 2007, 32(6):904-915.

[26] Zucconi F, Forte M, Monac A, et al. Evaluating toxicity of immature compost[J]. *Biocycle*, 1981, 22:54- 57.

[27] Tang J C, Maie N, Tada Y, et al. Characterization of the maturing pro-

cess of cattle manure compost[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(2): 380-389.

[28] 鲍艳宇, 周启星, 娄翼来, 等. 奶牛粪好氧堆肥过程中不同含碳有机物的变化特征以及腐熟评价[J]. 生态学杂志, 2010, 29(11): 2111-2116.
BAO Yan-yu, ZHOU Qi-xing, LOU Yi-lai, et al. Change patterns of different carbon-containing compounds in dairy manure during its aerobic composting and assessment of composting maturity[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(11): 2111-2116.

[29] 曹 云, 黄红英, 孙金金, 等. 超高温预处理对猪粪堆肥过程碳氮素转化与损失的影响[J]. 中国环境科学, 2018, 38(5): 194-202.
CAO Yun, HUANG Hong-ying, SUN Jin-jin, et al. Effect of hyperthermerphilic pretreatment on transformation and losses of C and N during pig manure composting[J]. *China Environmental Science*, 2018, 38(5): 194-202.

[30] 王玉军, 窦 森, 张晋京, 等. 农业废弃物堆肥过程中腐殖质组成变化[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(8): 79-81.
WANG Yu-jun, DOU Sen, ZHANG Jin-jing, et al. Changes of humic components during agricultural waste composting[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2009, 37(8): 79-81.

[31] 张 阅, 王 磊, 陈金海. 物料预处理对堆肥减量化、腐殖化和稳定化的影响及其微生物机制[J]. 工业微生物, 2015, 45(1): 7-14.
ZHANG Yue, WANG Lei, CHEN Jin-hai. Effect of windrow pretreatment on reduction and humification during composting and its microbial mechanism[J]. *Industrial Microbiology*, 2015, 45(1): 7-14.

[32] 李文圣, 王旭东. 猪粪和牛粪与秸秆配合堆腐过程中腐殖物质的变化特征[J]. 生态与农村环境学报, 2014, 30(4): 541-544.
LI Wen-sheng, WANG Xu-dong. Variation of humus in mixture of swine or bovine manure and wheat straw during composting[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2014, 30(4): 541-544.

[33] 李国学, 张福锁. 固体废物堆肥化与复混肥生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
LI Guo-xue, ZHANG Fu-suo. Composting of solid wastes and organic compound fertilizer manufacturing[M]. Beijing: Chemical Engineering Press, 2000.

[34] 魏自民, 席北斗, 赵 越, 等. 城市生活垃圾外源微生物堆肥对有机酸变化及堆肥腐熟度的影响[J]. 环境科学, 2006, 27(2): 376-380.
WEI Zi-min, XI Bei-dou, ZHAO Yue, et al. Inoculating microbes on municipal solid wastes composting affects organic acids and maturity [J]. *Environmental Science*, 2006, 27(2): 376-380.