

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.16.009

高温蛋白质降解菌的筛选及其在鸡粪发酵中的应用 *

袁小懿[#] 梁钰灵[#] 蒋 敏 郭明月 徐爱玲[△]

(青岛理工大学环境与市政工程学院 山东 青岛 266033)

摘要 目的:本研究通过对高温蛋白质降解菌的富集培养、筛选与分离,旨在为鸡粪资源的合理利用,生产高质量的有机肥料奠定基础。**方法:**通过高温条件下对高效降解蛋白质的高温菌种进行富集培养、纯化与分离。**结果:**分离得到 24 株高温高效降解蛋白质菌株,经鉴定其分别属于短芽孢杆菌属(*Brevibacillus spp.*)、嗜热芽孢杆菌属(*Bacillus spp.*)、假黄单胞菌(*Pseudoxanthomonas spp.*)等 8 种菌属。将制备的复合菌液接种于鸡粪中发现,实验组升温速率明显快于对照组,在发酵后 16 h 左右到达高温阶段,比空白组提前将近 8 h,且加入耐高温蛋白质降解菌的 FJ3 组,高温期比空白组延长 24 h 左右,持续时间长达 56 h;发酵过程 pH 值比空白组下降较快,pH 值最低到 5.5 左右;物料的含水率从 65%降至 20%左右,N、P、K 等营养元素所占比例有所增加,且发酵产物质地松散、柔软,带有较浓的酸香味。**结论:**实验表明添加外源高温降解蛋白质菌株,能够减少鸡粪发酵产生的恶臭,活化养分,提高堆肥效果,对鸡粪便的处理有重要意义。

关键词:高温菌;蛋白质降解菌;鸡粪发酵

中图分类号:Q-33;S831 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)16-3043-07

Screening of High Temperature Protein Degrading Bacteria and Its Application in Poultry Dung Fermentation*

YUAN Xiao-yi[#], LIANG Yu-ling[#], JIANG Min, GUO Ming-yue, XU Ai-ling[△]

(School of Environmental and Municipal Engineering, Qingdao University of Technology, Qingdao, Shandong, 266033, China)

ABSTRACT Objective: This study aims to lay the foundation for the rational use of chicken manure resources and the production of high-quality organic fertilizers through the enrichment cultivation, screening and separation of high-temperature protein degrading bacteria. Due to the lack of protein-degrading bacteria and high-temperature bacteria in the process of chicken manure fermentation, the fermentation heating time is slow, the high temperature maintenance time is short, and the fermentation time is long. **Methods:** Enriched culture, purification and separation of high-temperature strains that efficiently degrade proteins under high-temperature conditions. **Results:** 24 strains of high-temperature and highly efficient protein degradation bacteria were isolated and identified as belonging to 8 species, including *Brevibacillus spp.*, *Bacillus spp.*, and *Pseudoxanthomonas spp.*. Inoculation of the prepared compound bacterial solution in chicken manure found that the temperature rise rate in the experimental group with the bacterial agent was significantly faster than that in the control group. It reached the high temperature stage about 16h after fermentation, nearly 8h ahead of the blank group, and which was nearly 8 h earlier than that in the control group. And the FJ3 group, which was added with high-temperature protein-degrading bacteria. Compared with that in the control group, the high temperature period was prolonged by about 24 hours, and the duration reached 56 hours. The pH of the fermentation process decreased faster than that of the control group, the lowest pH value was around 5.5. The moisture content of the poultry dung reduced from 65% to about 20%, the proportion of N, P, K and other nutrients increased, and the fermentation product is loose and soft, with a strong acid flavor. **Conclusion:** Therefore, the addition of high-temperature protein-degrading bacteria could increase the temperature rise rate, prolong the period of high temperature, accelerate the ferment process of poultry dung, and reduce the loss of nutrients, which has great significance for the treatment of poultry dung.

Key words: High-temperature bacteria; Protein-degrading bacteria; Chicken manure

Chinese Library Classification(CLC): Q-33; S831 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)16-3043-07

前言

随着集约化养鸡业的出现,鸡粪的无害化处理和资源化利用引起社会的广泛关注。研究表明添加微生物菌剂有利于鸡粪

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31170509);山东省重点研发计划项目(2017GF220001)

[#] 为共同第一作者

作者简介:袁小懿,女,本科生,环境科学专业;

梁钰灵,女,本科生,环境科学专业

[△] 通讯作者:徐爱玲,女,博士,教授,硕士生导师,研究方向:环境微生物,E-mail: xalcsu@sina.com

(收稿日期:2020-04-05 接受日期:2020-04-30)

堆肥的腐熟及物质的转化,但专门针对鸡粪中蛋白质降解的菌株研究较少。规模化养鸡场每饲养 10 万只鸡,日产鸡粪可达 10 t^[1]。鸡粪便自然发酵所需时间长达三个月,发酵过程中有机物质发酵产生恶臭、滋生蚊蝇,对大气、土壤、水体均产生危害,严重破坏生态环境,危害人体健康^[2]。近年来,越来越多的学者开始研究如何有效提高鸡粪发酵速度。研究表明,添加芽孢杆菌、酵母菌和乳酸菌等外源微生物不仅能促进堆肥迅速升温,延长高温期持续时间,缩短发酵时间,而且还可以抑制氨气挥发量,减少恶臭气体的产生和营养元素损失^[3-8]。

发酵过程中高温期的控制是实现鸡粪资源化的关键,高温期出现时间的早晚以及维持时间的长短直接影响发酵效果^[9]。但升温过程,中、低温细菌数量和活性逐渐降低,发挥的作用较为有限^[10]。因此接种高温菌剂,增加高温微生物的数量,促进难降解物质的快速转化,可有效提高发酵效率^[11]。万磊兵^[12,13]等人发现向鸡粪中添加耐高温菌剂,能降解鸡粪中的有害组分,减少臭气产生,加速鸡粪的腐熟进程。

鸡肠道短,大量营养物质未被消化即被排出体外,导致鸡粪中蛋白质含量较高^[14]。蛋白质是引发鸡粪发酵产生恶臭的重要原因,但目前采用高温蛋白质降解微生物进行鸡粪发酵的研究相对不足。本试验通过对高温蛋白质降解菌的富集培养、筛选与分离,旨在为鸡粪资源的合理利用,生产高质量的有机肥料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 双缩脲试剂:1.5 g 硫酸铜,6.0 g 酒石酸钾钠溶于 500 mL 蒸馏水中,在不断搅拌下加入 300 mL 10%氢氧化钠溶液,用蒸馏水定容至 1000 mL。贮存涂石蜡的试剂瓶中,常温保存。

富集培养基:研碎鸡饲料(正大)10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,

1 L 蒸馏水。

基本培养基:黄豆饼粉 8 g,牛肉粉 3 g,氯化钠 5 g,1 L 蒸馏水。

固体培养基:在基本培养基中加入 15 g/L 的琼脂。

1.1.2 主要仪器设备 电热恒温水浴槽(HH420),台式离心机(美国 Thermo Scientific),微型离心机(德国 SIGMA),旋涡混合器 MS3 basic(德国 IKA),高压蒸汽灭菌锅(MLS-3750),恒温震荡培养(MQD-B2R),生化培养箱(SPX-150B-2),无菌操作台(Opti·MAIR),凯氏定氮仪(上海精密)、消解仪(上海精密),微量滴定仪,冰箱(HaierBCD-201)等。

1.2 实验方法

1.2.1 高效蛋白质降解菌的富集 利用海泊河污水处理厂活性污泥与发酵鸡粪 5:1 混合为出发菌种,设置曝气量维持在 60 L/min,培养温度为 50 温。每 24 h 测定装置内的剩余蛋白质浓度以及凯氏氮含量并根据蛋白质降解情况逐步在装置中添加富集培养基。富集培养历时 90 d,待复合菌液驯化富集的末期蛋白质浓度降解速率达到稳定。

1.2.2 蛋白质降解菌的分离纯化 在实验装置中,取富集末期蛋白质降解率稳定的复合菌液,根据菌液浓度稀释一定的梯度在固体培养平板上涂布培养,培养温度为 50 的。待菌株长出后,挑取长势较好的菌落接种于基本培养基中,重复多次分离直至单菌株。对单菌株进行分子生物学鉴定。

1.2.3 高效鸡粪发酵菌剂的制备 将前期的分离纯化出的菌株接种于木屑麸皮培养基上,50 期恒温培养 2-3 d,菌液全部烘干附着在木屑麸皮上后,将培养物等体积混合即成为接种剂。

1.2.4 好氧发酵处理 实验地点是潍坊市山东省三五环保科技有限公司,发酵原材料为鸡粪和锯末。调节物料碳氮比在 20-35 之间,含水率在 65%左右,维持发酵环境温度 35℃左右,发酵时间为 72 h,将物料充分混合并加入发酵菌剂搅拌均匀装入发酵反应器。发酵原料的理化性质见表 1。

表 1 鸡粪和物料的理化性质指标

Table 1 Physical and chemical properties of chicken manure and materials

Experimental Materials	Water conten(%)	Organic matter(%)	Totalnitrogen(%)	Full carbon(%)
Chicken manure	71.34	39.65	3.86	26.52
Sawdust	22.36	62.13	1.19	32.45

本试验共设置 4 个实验组,分别为 FJ1、FJ2、FJ3 和空白对照组,每个实验组设置两个平行实验,每个组添加的菌剂成分

见表 2。

表 2 鸡粪发酵中添加的菌剂成分

Table 2 Inoculum ingredients added in chicken manure fermentation

Experiment number	Add fungus ingredients
FJ1	compound bacterial solution early stage of enrichment culture
FJ2	compound bacterial solution early stage of enrichment culture +7 high-temperature-resistant protein-degrading functional strains
FJ3	7 high-temperature-resistant protein-degrading functional strains
Blank group	/

1.2.5 指标测定 (1)感官性能检测:分别检查发酵前后的鸡粪物料的气味、颜色和质地。

(2)温度检测:热敏温度计直接插入物料以下 25 cm 处,测量堆肥温度以及环境温度。

(3)酸度测定:取干重 5 g 左右的鲜样,按干重体积(dw/v)=1:10 加入双蒸水,振荡提取。静置,取上清液用 pH 计测定酸度值。

(4)含水率检测:取 5 g 左右鲜样于坩埚中,在 105℃ 的烘箱中烘干 24 h,通过前后粪样的质量差,来计算鸡粪发酵含水率。

(5)营养成分以及理化指标检测:采用《NY-525-2012》的标准对发酵完成后进行总有机碳、全氮进行检测,总蛋白采用凯氏氮法;全磷按国家标准 GB/ T 12393 食品营养成分测定方法 - 食品中磷含量的测定方法分光光度法进行;全钾按国家标准 GB/ T12397 食品营养成分测定方法 - 食品中钾、钠的测定方法火焰光度法进行。

(6)中、高温菌数量检测

采用平板计数法测定发酵过程中、高温菌的数量,在发酵

过程中每隔 12 h 采样,将样品进行一系列的 10 倍稀释,涂布到基本培养基平板上,分别在 50 释下培养 24 h,待长出菌落后,统计计数。

(7)微生物群落结构中属种分析

在复合菌液驯化富集末期,蛋白质降解效率稳定后,将实验装置中不同培养温度的复合菌液进行离心浓缩,菌泥于 -20℃ 保存。提取不同温度溶液中微生物的总 DNA,用超微量分光光度计检测其纯度与浓度。所提取 DNA 委托上海美吉生物科技有限公司进行高通量测序。

2 结果与分析

2.1 蛋白质降解菌株富集降解效果

随着富集时间的进行。复合菌液蛋白质降解速率、凯氏氮降解速率均逐渐增高,且降解周期逐渐缩短,至富集末期,蛋白质降解速率最高可达 4000 mg/L·d,凯氏氮降解速率可达 9 mg/mL·d,降解周期为 2 天。蛋白质降解菌在富集期间降解效果见表 3。

表 3 蛋白质降解菌株富集降解效果

Table 3 Enrichment and degradation effects of protein-degrading strains

Enrichment time	Protein degradation rate(mg/L/d)	Kjeldahl degradation rate (mg/mL/d)	Degradation cycle(d)
Early	2000	4	5
Mid-term	3500	7	3
End stage	4000	9	2

2.2 蛋白质降解菌株的分离、纯化

通过对富集菌液的分离纯化,得到 24 株高效蛋白质降解菌株,将 24 组菌株样品分别接种在基本培养基中,并向每个培养基中加入 7.450 mg/mL 的蛋白质,每 24 h 后测定一次剩余蛋白质的含量。图 1 可知,随着菌株培养时间的增加,蛋白质的含量均逐渐减少,各菌株在培养第 6 d,蛋白质的含量降至 0.15 mg/mL 左右,蛋白质降解率达到 65%左右;其中 1 号、24 号菌株在培养至第 8 d 的降解率达到 80%,降解效果最好,属于蛋白质高效降解优质菌株;18 号、20 号菌株降解效果相对较差,但整体来说各菌株降解效果良好。

2.3 高效蛋白质降解菌的分子生物学鉴定

对 24 株高效蛋白质降解优质单菌株的 DNA 进行提取,并进行 16S rDNA 序列的 PCR 扩增,将 PCR 产物送至上海派森诺生物科技有限公司测序,测序结果见表 4。

其中,1 号、24 号菌株同属于短芽孢菌属,蛋白质降解效果最好,可降解基本培养基中 80%以上的蛋白质,与 Khali^[19]等人从温泉中分离出的博氏短杆菌 AK1 相一致,同属嗜热菌,可降解聚乙烯(塑料)和长链烃污染物难分解的物质;4 号、17 号菌株为假黄单胞菌属,与 Chen^[10]等分离出的新型嗜热细菌菌株相一致,生长温度为 30℃-60℃之间,还原亚硝酸盐和非硝酸盐,可仅产生 N₂O;16 号菌株属于博德特氏菌属,与于鑫^[17]等人从餐厨降解基质中筛选出博德特氏菌(*Bordetella petrii*)相一

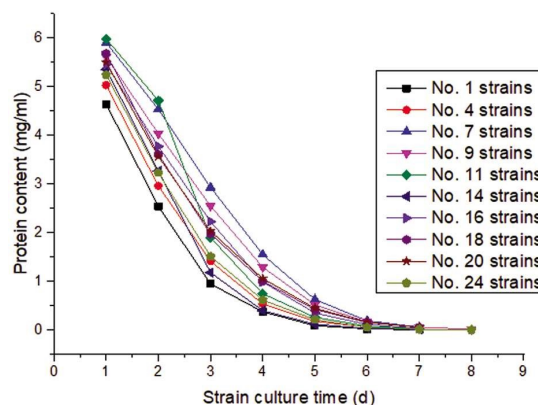


图 1 接种各菌株培养不同时间后剩余蛋白质含量

Fig.1 Remaining protein content after inoculating each strain for different cultivation time

致,对基本培养基中蛋白质的降解率可达 75%;3 号、20 号、22 号菌株为嗜热芽孢杆菌同属芽孢杆菌属,5 号、6 号、7 号、10 号、11 号、14 号、18 号、23 号同属根瘤菌属,8 号菌株为螯台球菌,12、13、15 号菌株属于藤黄单胞菌属,均可降解蛋白质,对基本培养基蛋白质的降解率均在 65%以上;2 号、9 号、19 号、21 号菌株属于产碱杆菌属,众多文献^[18-20]研究发现(*Caenimicrobium hargitense*)为条件致病菌,可能对生态环境产生威胁,故后期实验对其舍去。

表 4 蛋白质降解菌株测序结果
Table 4 Sequencing results of protein-degrading strains

Strain number	Similar strain names	Registration number of similar strains	Coverage	Similarity
1	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	NR_113799.1	100%	99.93%
2	<i>Caenimicrobium hargitense</i>	NR_156161.1	98%	97.55%
3	<i>Bacillus thermophilus</i>	NR_109677.1	99%	100%
4	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>	NR_113974.1	99%	99.86%
5	<i>Chelativorans composti</i>	NR_113183.1	100%	99.85%
6	<i>Chelativorans composti</i>	NR_113183.1	100%	99.70%
7	<i>Chelativorans composti</i>	NR_113183.1	100%	99.70%
8	<i>Chelatococcus composti</i>	NR_156158.1	99%	99.87%
9	<i>Caenimicrobium hargitense</i>	NR_156161.1	100%	97.53%
10	<i>Chelativorans composti</i>	NR_113183.1	99%	99.71%
11	<i>Chelativorans composti</i>	NR_113183.1	99%	99.93%
12	<i>Luteimonas composti</i>	NR_043983.1	99%	95.42%
13	<i>Luteimonas marina</i>	NR_044458.1	100%	95.34%
14	<i>Chelativorans composti</i>	NR_113183.1	100%	98.85%
15	<i>Luteimonas composti</i>	NR_043983.1	99%	95.62%
16	<i>Bordetella petrii</i>	NR_074291.1	100%	97.67%
17	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>	NR_113974.1	100%	100%
18	<i>Chelativorans composti</i>	NR_025198.1	99%	99.93%
19	<i>Caenimicrobium hargitense</i>	NR_156161.1	98%	97.63%
20	<i>Bacillus thermophilus</i>	NR_109677.1	99%	100%
21	<i>Caenimicrobium hargitense</i>	NR_156161.1	100%	97.44%
22	<i>Bacillus thermophilus</i>	NR_109677.1	98%	100%
23	<i>Chelativorans composti</i>	NR_113183.1	99%	100%
24	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	NR_113799.1	100%	99.93%

2.4 鸡粪好氧发酵实验结果

2.4.1 发酵过程中温度变化 由图 2 可知,温度的变化经历了升温阶段、高温阶段以及稳定阶段,发酵初期即升温阶段,室温维持在 35℃ 时,四组发酵物料在 8 h 内温度达到 40℃ 以上,其中 FJ3 组最快,8 h 达到 47℃;而随着室温降低,FJ1、FJ3 和空白组温度上升速率减慢,FJ2 组温度上升速率相对较快,到 32 h 时温度上升幅度不大,达到稳定阶段,4 个实验组的温度分别达到了 54℃、58℃、56℃、52℃,FJ3 组在 48 h 升温至最高温度 60℃,从温度上升时间以及高温持续时间来,FJ3 组升温速率最快,而 FJ2 组在高温阶段也表现出明显的优势,说明接种优质的发酵菌剂可以使发酵提前达到高温期,延长高温阶段的持续时间。

2.4.2 发酵过程中 pH 的变化 pH 是影响生物体生命活动的重要因素之一,由图 3 可知,在升温阶段,各组 pH 值均先下降再升高,但添加菌剂的实验组比空白组的 pH 值下降更多,其中 FJ2 组降至 5.5 左右;随着发酵进入高温阶段,各组物料的 pH 值又下降再升高,在发酵 32 h 后,pH 值上升速度开始有所减缓,持续到发酵结束,pH 值最终基本稳定在 8.0~8.5 之间,

《NY 525-2012 有机肥料》标准中规定有机肥酸碱度 (pH) 在 5.5~8.5,因此鸡粪发酵后产物符合腐熟堆肥 pH 值标准。

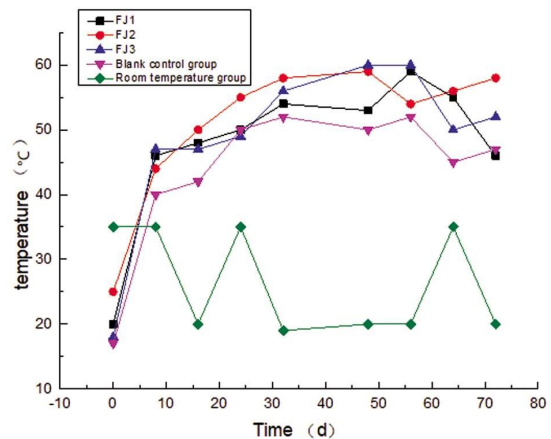


图 2 发酵过程中温度变化曲线

Fig.2 Temperature change curve during fermentation

2.4.3 发酵过程中含水率的变化 由图 4 可以看出在随着发

酵实验的进行,4个实验组物料中的含水率均逐渐下降,但添加菌剂的实验组比空白组下降更多,发酵后20 h,空白组的含水率比添加菌剂的实验组高出约6.2%,到72 h时,4个实验组物料含水率分别为24.69%、19.97%、21.26%和36.58%,其中FJ2组含水率最低,由此可以看出,在鸡粪发酵过程中添加外源微生物,使发酵物料升温快、温度高及高温期维持时间长,有利于水分的蒸发,从而有利于鸡粪中保持好氧环境,促进好氧发

酵反应。

2.4.4 鸡粪发酵前后感官性能变化 鸡粪发酵前后的感官性能变化见表5。添加菌剂的鸡粪在经过本试验的发酵后臭味全部消失,颜色呈棕褐色,发酵产物质地柔软、松散,带有较浓的酸香味。而未添加菌剂的空白组经过发酵后有微酸腐臭味,手抓成团、手松散开,颜色呈现灰棕色,说明添加菌剂对鸡粪发酵进程有着极大的促进作用。发酵后物料图见图5。

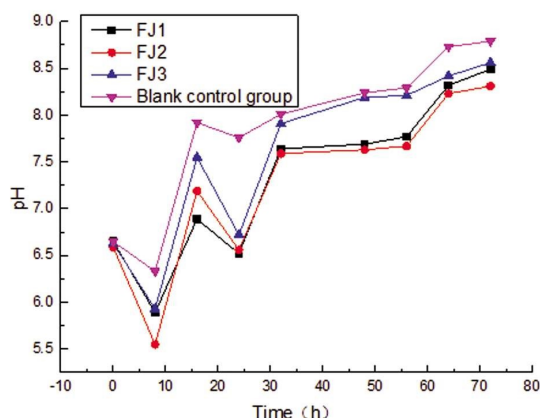


图3 发酵过程中pH变化曲线

Fig.3 pH change curve during fermentation

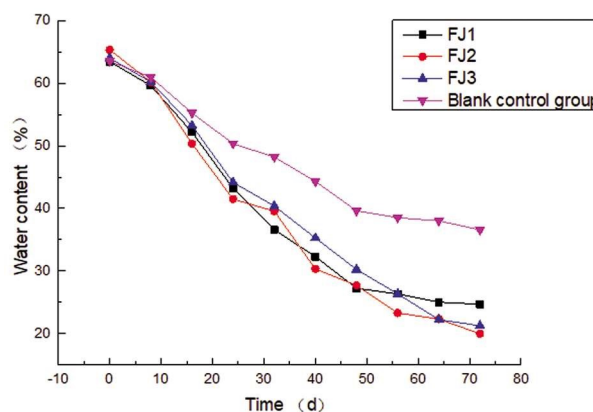


图4 发酵过程中含水率的变化曲线

Fig.4 Variation curve of water content during fermentation

表5 鸡粪发酵前后感官性能变化

Table 5 Sensory performance changes of chicken manure before and after fermentation

Number	Project	Odor		Colour		Texture	
		Before fermentation	After fermentation	Before fermentation	After fermentation	Before fermentation	After fermentation
FJ1		Fecal smell	Sour fragrance	Dark brown	Brown	Sticky and clot	Soft and loose
FJ2		Fecal smell	Sour fragrance	Dark brown	Brown	Sticky and clot	Soft and loose
FJ3		Fecal smell	Sour fragrance	Dark brown	Brown	Sticky and clot	Soft and loose
Blank control group		Fecal smell	Slightly acid,rancid smell	Dark brown	Brown	Sticky and clot	Clot by hand and spreads when you let go



图5 发酵后鸡粪状态图

Fig.5 State diagram of chicken manure after fermentation

2.4.5 鸡粪发酵前后营养成分的变化 由表6可知,鸡粪经过好氧发酵后,总有机碳的含量有所增加,4个实验组分别增加了6.9%、4.6%、6.3%和2.1%;总蛋白含量有所下降,4个实验组分别下降了10.0%、12.1%、9.7%和3.0%,添加菌剂的实验组总蛋白的减少量明显多于对照组,说明本试验添加的发酵菌剂促进蛋白质降解效果显著,主要原因是微生物的发酵呼吸,产生

了小分子碳氮化合物;添加菌剂的实验组全磷、全钾、全氮相对含量有所增加,但含量增加差异不明显。整体来说添加发酵菌剂的实验组的效果优于空白对照组,从蛋白质降解来讲,发酵效果最好的为FJ2实验组。

2.4.6 中、高温菌数量的检测 由表7可知,鸡粪在好氧发酵过程中,添加菌剂的实验组中温菌的数量变化呈现逐渐下降的

趋势,尤其是在物料进入高温阶段,中温菌数量减少更加显著,但高温菌呈现先升高再降低的趋势,在高温阶段保持一定的数量级,且数量最多,说明高温菌在鸡粪发酵过程的高温阶段活性更强;未添加菌剂的实验组,中温菌的数量比高温菌多,说明

鸡粪自然发酵过程中,高温菌数量不足从而导致发酵效果不佳;因此,通过人为方式接种耐受高温的菌剂在鸡粪中,能有效提高鸡粪的发酵效果。

表 6 鸡粪发酵前后营养成分的变化(%)

Table 6 Changes of nutrients before and after chicken manure fermentation (%)

Groups	Time	Total organic carbon	Total protein	Total nitrogen	Total phosphorus	Total potassium
Control group	Before fermentation	28.3	29.3	5.05	2.04	2.49
FJ1	After fermentation	35.2	19.3	5.26	2.36	2.77
FJ2	After fermentation	32.9	17.2	5.28	2.21	2.79
FJ3	After fermentation	34.6	19.6	5.13	2.42	2.62
Blank control group	After fermentation	30.4	26.3	5.09	2.19	2.52

表 7 鸡粪发酵过程中中、高温菌数量的变化(cfu/g)

Table 7 Changes in the number of medium and high temperature bacteria during the fermentation of chicken manure(cfu/g)

Test items	Groups	Before fermentation	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
Mesophilic bacteria (Cultivation at 37℃)	FJ1	2.69×10^8	1.6×10^8	2.6×10^6	2.42×10^6	3.3×10^5	5.269×10^4	1.21×10^4
	FJ2	1.08×10^9	7×10^8	5×10^6	1.07×10^6	2.8×10^5	1.29×10^4	1.02×10^4
	FJ3	4.2×10^8	5.2×10^8	1.2×10^6	4.44×10^5	1.6×10^5	2.53×10^4	9.26×10^3
	Blank	4.87×10^8	9.23×10^8	1.9×10^8	8.39×10^7	1.73×10^6	1.8×10^6	1.03×10^5
High temperature bacteria (Cultivation at 50℃)	FJ1	9.2×10^5	1.93×10^6	6.98×10^6	1.96×10^7	2.66×10^6	6.34×10^6	1.29×10^5
	FJ2	2.3×10^5	4.5×10^6	8.1×10^6	7.4×10^6	7.3×10^5	1.7×10^6	6.1×10^5
	FJ3	4×10^5	3.92×10^6	9.7×10^6	1.73×10^7	6.4×10^6	2.8×10^6	1.02×10^6
	Blank	6.1×10^5	2.59×10^5	2.8×10^5	3.4×10^5	2.34×10^5	2.1×10^4	1.3×10^4

3 讨论

鸡粪中蛋白质含量高达 31%,在畜禽粪便中营养成分含量最高,自然堆放会释放 NH_3 、 H_2S 等恶臭气体影响环境卫生,但经过微生物发酵可以回收再利用,作为其他动物的饲料^[21]。赵京音^[22]等人向鸡粪中添加 EM 菌(有效微生物群),除臭效果好,鸡粪无害化能提前 20 d 完成;杨恕玲^[23]等人发现,酵母菌和乳酸菌可以提高发酵过程的温度,延长高温持续时间;王国强^[24]等人将干酪乳杆菌、产朊假丝酵母菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌按最佳配比制成复合菌剂加入鸡粪中,能降低臭气叫噪、大肠杆菌等的含量,减少鸡粪对环境的污染。这些研究都探索了添加菌剂能改善鸡粪的发酵效果,但利用高温蛋白质降解微生物针对鸡粪中蛋白质去除的研究相对不足。本试验利用筛选出的短短芽孢杆菌属(*Brevibacillus spp.*)、假黄单胞菌(*Pseudoxanthomonas spp.*)、嗜热芽孢杆菌属(*Bacillus spp.*)等 7 种菌属制备的菌剂耐高温,且有高效降解蛋白质的功能,能显著影响鸡粪的发酵效果,有效解决鸡粪中蛋白质处理难的问题。

温度的控制是提高鸡粪发酵效果的关键,传统的自然堆肥是利用鸡粪中原有的土著菌进行发酵,由于堆肥前期生物量少,增殖需要一定的时间,所以到达高温期的时间会延长^[25]。本

试验添加菌剂的实验组,升温速率加快,但在发酵 8 h 后的一段时间,由于室温降低,温度上升有所减缓,可能是因为鸡粪外表面温度降低,影响了外层高温菌的生活。柳冬梅^[26]等人添加由枯草芽孢杆菌、酵母菌、黑曲菌等组成有机物料发酵剂于鸡粪中,大约在发酵后 24 h 达到高温期,而本试验加入高温菌剂仅需 16 h 左右就能到达高温阶段,可能是因为高温菌数量增加,能快速启动发酵;并且高温持续时间长达 56 h,比空白组延长约 24 h,其中富集培养前期菌液和 7 株耐高温的高效蛋白质降解菌制备的菌剂高温持续效果好,与洪久^[27]等人向鸡粪中添加混合菌剂鸡粪处理效果的研究一致,添加的微生物都在高温阶段表现出的优势。所以,将高温菌接种于鸡粪,能增加发酵初期和高温阶段的微生物数量,快速启动发酵,延长高温期时间,推进鸡粪的发酵过程。

pH 值是反应发酵过程的重要指标,多数微生物适宜生长的 pH 值是呈中性或微碱性,所以酸度降低有利于抑制致病菌的生长^[28];相关报道称控制 pH 值上升还可以减少氮素的损失和臭气的产生^[29]。鸡粪发酵初期,由于产酸菌分解大量有机物产生有机酸,导致 pH 值显著下降,其中添加富集培养前期菌液和 7 株高温高效蛋白质降解菌制备的菌剂的 FJ2 组,pH 值最低下降至 5.5 左右,说明增加菌群的多样性,有利于降低堆

体的酸度。随着堆体中大分子有机物减少,有机酸被进一步分解并产生少量氨气,使 pH 值缓慢上升,最终稳定在 8.0~8.5 之间,满足腐熟堆肥 pH 值标准。而未添加菌剂的空白组的 pH 值相对较高,由此可以看出,接种优质的发酵菌剂可以有效的降低发酵物料的 pH 值,减少氨气的产生,有利于氮素的保持。翟红^[30]等人研究沼渣和秸秆混合物初始含水率对堆肥的影响,表明含水率是堆肥过程需要控制的重要参数。含水率过高,堆体内部易形成厌氧环境,不利于好氧菌的生长,易产生腐臭味。本试验中各组含水率在堆肥过程中均呈现下降趋势,接种菌剂的实验组从 65%降至 20%左右,而空白组降至 40%左右,与李群岭^[30]研究发现一致。说明外源引入高温菌有利于堆体水分的蒸发,增加物料中含水率的减少量。

通过微生物发酵处理,减少鸡粪便环境污染现状,可以满足人类保护环境的愿望,发酵产物可以作为肥料、饲料等回收再利用,还能实现资源的可持续发展。相关研究试图通过太阳暴晒、锅中翻炒、机器烘干等方法提供高温去除鸡粪中臭味,难以满足规模化养殖产生的鸡粪便,且散发出的臭味污染周边环境^[31]。本试验对照组鸡粪发酵后有微酸腐臭味,手抓成团、手松散开,而接种发酵菌剂使发酵产物臭味全部消失,质地柔软、松散并带有较浓的酸香味,与郭苏晓^[31]等人研究添加复合益生菌改善鸡粪感官性状一致,并且操作简单可行,适用于大规模的处理鸡粪。发酵后鸡粪中的 N、P、K 等营养元素所占比例都有所增加,说明发酵能够减少营养元素损失,与王道泽^[32]等人研究一致,但接种菌剂的总蛋白含量下降更多,说明我们添加的高温高效降解蛋白质菌能有效去除鸡粪中的蛋白质。

王亚飞^[33]等人发现鸡粪堆肥在高温阶段微生物的数量会减少,因为温度升高,中温菌生长被抑制,而高温菌数量不足,导致总的生物量减少。而本试验接种高温菌在鸡粪中,使高温菌数量比空白组多,一直保持大于 105 数量级,且在高温阶段数量最多,而中温菌数量随着发酵逐渐减少,说明增加鸡粪中高温菌的数量,可以提高在高温阶段的优势地位。本试验空白组高温菌的数量先升高再降低,但升高趋势不明显,其数量始终小于其他添加菌剂的实验组,中温菌仍然呈现逐渐降低的趋势,与兰时月^[34]等人发现堆肥高温阶段细菌总数、真菌和放线菌数量均减少,只有耐高温菌还保持活性的现象一致,说明高温菌的缺乏可能是导致鸡粪发酵效果不佳的重要原因。

因此,外源引入高温蛋白质降解菌,能够保证高温阶段微生物的数量,提高升温速率,延长高温时间,又能针对鸡粪中蛋白质的去除,解决鸡粪处理难的问题。从整体来看富集前期菌液和高温高效蛋白质降解菌制备的菌剂发酵效果最好,可能是因为其中微生物种类多、群落结构复杂,能更好的适应整个鸡粪发酵过程环境的变化。

综上所述,优质的高温发酵菌剂在粪便发酵工艺中占有举足轻重的作用。本研究针对鸡粪发酵过程中蛋白质降解菌的缺失和高温菌数量不足造成发酵升温时间慢、高温维持时间较短、发酵时间过长等问题,通过在高温条件下对高效降解蛋白质的高温菌种进行富集培养、纯化与分离得到 24 株高效降解蛋白质菌株,将其制备发酵菌剂接种于鸡粪,进行好氧发酵实验发现,添加菌剂的实验组升温更快,最高温度达 60℃,持续时间更长,pH 和含水率下降更多;发酵后的物料感官性能更

好,营养元素减少更少,且富集前期菌液和高温高效蛋白质降解菌制备的菌剂发酵效果最好。试验表明添加外源高温降解蛋白质菌株,能够减少鸡粪发酵产生的恶臭,活化养分,提高堆肥效果,对鸡粪便的处理有重要意义。

参考文献(References)

- [1] 王磊,张永东,马斌,等. 鸡粪的资源化利用途径 [J]. 畜牧兽医杂志, 2016, 35(06): 81-82
- [2] 张玉玲,钟俊,李海蓉,等. 畜禽养殖废弃物处理利用现状 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2019, (08): 30-31
- [3] 石星群,殷培杰,何随成,等. 发酵鸡粪的高温蛋白分解菌的筛选[J]. 土壤通报, 2005, (06): 132-135
- [4] 程旭艳,霍培书,尚晓瑛,等. 堆肥中高温降解菌的筛选、鉴定及堆肥效果[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(5): 105-111
- [5] 欧亚玲,陈强,邹宇,等. 鸡粪高温发酵除臭细菌的筛选及效果[J]. 武汉大学学报(理学版), 2008, 54(2): 234-238
- [6] Nie H, Jacobi H F, Strach K, et al. Mono-fermentation of chicken manure: Ammonia inhibition and recirculation of the digestate[J]. Biore-source Technology, 2015, 178: 238-246
- [7] Agbogbo F K, Holtzaple M T. Fixed-bed fermentation of rice straw and chicken manure using amixed culture of marine mesophilic microorganisms[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(8): 1586-1595
- [8] 肖卡. 贵妃鸡鸡粪的营养成分分析与评价 [J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013, 29(05): 49-46
- [9] 李恕艳,李吉进. 高温堆肥温度变化及无害化效果试验 [J]. 蔬菜, 2013, (2): 52-56
- [10] 李茜,赵杏,杨京平,等. 高温与降雨对不同茶龄土壤碳氮养分及胞外酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(3): 557-565
- [11] 胡莉,秦莉,吕振宇,等. VT 菌剂对鸡粪堆肥的微生物指标变化的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(s1): 214-218
- [12] 万磊兵. 鸡粪堆肥快速腐熟专用复合菌剂的制备及效果评价[D]. 大连理工大学, 2014
- [13] 孟磊,杨兵,薛南冬,等. 高温堆肥对鸡粪中氟喹诺酮类抗生素的去除[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(02): 377-383
- [14] Wang X J, Li Y B, Yang G H, et al. Fermentation and process optimization of mixed cow dung, chicken manure and rice straw for bio-gas production[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(3): 104-108
- [15] Khalil A B, Neelamegam S, Muhammad A, et al. Insights into, *Brevibacillus borstelensis*, AK1 through whole genome sequencing: a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Saudi Arabia[J]. BioMed Research International, 2018, 2018: 1-9
- [16] Chen M Y, Tsay S S, Chen K Y, et al. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* ssp. nov. a novel thermophilic, N₂O-producing species isolated from hot springs[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2002, 52(6): 2155-2161
- [17] 于鑫,邵晨,田兴军. 餐厨降解菌的生物特性研究 [J]. 环境科学学报, 2014, 34(7): 1781-1787
- [18] 吴清,卢亚陵,许涛. 非发酵菌的分布及耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2004, 4(1): 40-42
- [19] 范昕建,廖昉. 产碱杆菌感染 [J]. 中国实用内科杂志, 1999, (2): 73-74
- [20] 吴雄英,杨长亮. 伴类产碱杆菌感染的胆脂瘤型中耳炎 1 例[J]. 华南国防医学杂志, 2016, (11): 758-759

- acids, 2018, 10(undefi ned): 245-253
- [18] Leatherwood C, Speyer CB, Feldman CH, et al. Clinical characteristics and renal prognosis associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) and vascular injury in lupus nephritis biopsies[J]. Seminars in arthritis and rheumatism, 2019, 49(3): 396-404
- [19] Yung S, Yap DY, Chan TM. Recent advances in the understanding of renal inflammation and fibrosis in lupus nephritis[J]. F1000Research, 2017, 6: 874
- [20] Leelahavanichkul A, Souza AC, Street JM, et al. Comparison of serum creatinine and serum cystatin C as biomarkers to detect sepsis-induced acute kidney injury and to predict mortality in CD-1 mice [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 307(8): F939-48
- [21] Barreto EF, Rule AD, Murad MH, et al. Prediction of the Renal Elimination of Drugs With Cystatin C vs Creatinine: A Systematic Review [J]. Mayo Clinic proceedings, 2019, 94(3): 500-514
- [22] Ghys L, Paepe D, Smets P, et al. Cystatin C: a new renal marker and its potential use in small animal medicine[J]. J Vet Intern Med, 2014, 28(4): 1152-164
- [23] Pavkov ME, Knowler WC, Hanson RL, et al. Comparison of serum cystatin C, serum creatinine, measured GFR, and estimated GFR to assess the risk of kidney failure in American Indians with diabetic nephropathy[J]. Am J Kidney Dis, 2013, 62(1): 33-41
- [24] Kar S, Paglialunga S, Islam R. Cystatin C Is a More Reliable Biomarker for Determining eGFR to Support Drug Development Studies [J]. Journal of clinical pharmacology, 2018, 58 (10): 1239-1247
- [25] Miller WG, Jones GRD. Estimated Glomerular Filtration Rate; Laboratory Implementation and Current Global Status [J]. Advances in chronic kidney disease, 2018, 25(1): 7-13
- [26] Ghys L, Paepe D, Smets P, et al. Cystatin C: a new renal marker and its potential use in small animal medicine[J]. J Vet Intern Med, 2014, 28(4): 1152-1164
- [27] Pavkov ME, Knowler WC, Hanson RL, et al. Comparison of serum cystatin C, serum creatinine, measured GFR, and estimated GFR to assess the risk of kidney failure in American Indians with diabetic nephropathy[J]. Am J Kidney Dis, 2013, 62(1): 33-41
- [28] Björk J, Nyman U, Berg U, et al. Validation of standardized creatinine and cystatin C GFR estimating equations in a large multicentre European cohort of children [J]. Pediatric nephrology (Berlin, Germany), 2019, 34(6): 1087-1098
- [29] Mao W, Liu S, Wang K, et al. Cystatin C in Evaluating Renal Function in Ureteral Calculi Hydronephrosis in Adults[J]. Kidney & blood pressure research, 2019, undefined(undefined): 1-13
- [30] Peco-Antić A, Ivanišević I, Vulićević I, et al. Biomarkers of acute kidney injury in pediatric cardiac surgery [J]. Clin Biochem, 2013, 46 (13-14): 1244-1251
- [31] Zhou B, Zou H, Xu G. Clinical Utility of Serum Cystatin C in Predicting Diabetic Nephropathy Among Patients with Diabetes Mellitus: a Meta-Analysis [J]. Kidney & blood pressure research, 2016, 41(6): 919-928
- [32] Chen H, Li H. Clinical Implication of Cystatin C and β 2-Microglobulin in Early Detection of Diabetic Nephropathy[J]. Clinical laboratory, 2017, 63(2): 241-247

(上接第 3049 页)

- [21] 徐春厚. 鸡粪发酵饲料的开发与饲用 [J]. 饲料博览, 2000, (07): 43-45
- [22] 赵京音, 姚政. 微生物制剂 EM 控制鸡粪堆制过程恶臭的研究[J]. 农村生态环境, 1995, (04): 54-56
- [23] 杨恕玲, 侯丽鹏, 翟玉蕊, 等. 菌种和辅料对鸡粪堆肥效果的影响 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(24): 56-60
- [24] 王国强, 路文华, 常娟, 等. 复合微生物制剂在鸡粪无害化处理中的应用研究[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(02): 113-117
- [25] 席北斗, 孟伟, 黄国和, 等. 生活垃圾堆肥接种技术 [J]. 环境科学, 2003, (01): 157-160
- [26] 柳冬梅, 姜寿涛, 张云影, 等. 不同菌剂处理鲜鸡粪发酵试验研究 [J]. 东北农业科学, 2019, 44(04): 59-62
- [27] 于洪久, 郭炜, 王大蔚, 等. 微生物菌剂对堆肥过程中氨挥发的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2016, 28(01): 73-75
- [28] 杨柳燕, 肖琳. 环境微生物技术 [M]. 北京科技出版社, 2003, 257-241
- [29] Smars S, Gustafsson L, Beck-Friis B, et al. Improvement of the composting time for household waste during an initial low pH phase by mesophilic temperature control[J]. Bioresource Technology, 2002, 84 (3): 237-241
- [30] 李群岭. 不同发酵菌的堆肥效果研究[D]. 湖南农业大学, 2014
- [31] 郭苏晓, 肖正中. 复合益生菌对鸡粪饲料发酵效果的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, (14): 184-185
- [32] 王道泽, 谢国雄, 李丹, 等. 不同微生物菌剂在鸡粪堆肥中的应用效果[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(05): 1074-1078
- [33] 王亚飞, 李梦婵, 邱慧珍, 等. 不同畜禽粪便堆肥的微生物数量和养分含量的变化[J]. 甘肃农业大学学报, 2017, 52(03): 37-45
- [34] 兰时乐, 戴小阳, 李立恒, 等. 油菜秸秆和鸡粪高温堆肥中微生物数量变化研究[J]. 江苏农业科学, 2010, (02): 365-368