

# 降解牛粪纤维素的复合微生物菌剂制备

梁文涓<sup>1</sup>, 武肖媛<sup>1</sup>, 闫勇<sup>2</sup>, 刘欢<sup>1</sup>

(1. 沈阳建筑大学市政与环境工程学院, 辽宁沈阳 110168; 2. 沈阳建筑大学土木工程学院, 辽宁沈阳 110168)

**摘要** [目的]制备降解牛粪纤维素的复合微生物菌剂。[方法]通过正交试验,确定地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和放线菌属4株菌的最优配比,制成降解牛粪纤维素的复合微生物菌剂。[结果]复合微生物菌剂中HP2菌的所占比例为主要因素,各菌种最佳配合比例为TG1:P3:HP2:HN1=3:1:1:1。[结论]该研究为复合微生物菌剂在牛粪堆肥中的应用提供了理论依据。

**关键词** 复合微生物菌剂;牛粪纤维素;生长曲线;正交试验

**中图分类号** S811.6;Q939.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)21-243-02

## Preparation of Complex Microbial Inoculants for Degradation of Cellulose in Cow Dung

LIANG Wen-juan<sup>1</sup>, WU Xiao-yuan<sup>1</sup>, YAN Yong<sup>2</sup> et al (1. School of Municipal and Environmental Engineering, Shenyang Jianzhu University, Shenyang, Liaoning 110168; 2. School of Civil Engineering, Shenyang Jianzhu University, Shenyang, Liaoning 110168)

**Abstract** [Objective] The study aimed to prepare complex microbial inoculants for degradation of cellulose in cow dung. [Method] The optimal ratio of four strains of *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and *Actinomyces* was studied through orthogonal test, so as to generate microbial inoculants for the degradation of cow dung cellulose. [Result] The proportion of HP2 in microbial inoculants was the principal factor. The optimal mixture ratio of the strains was TG1:P3:HP2:HN1 = 3:1:1:1. [Conclusion] The research could provide theoretical references for the application of complex microbial inoculants in cow dung compost.

**Key words** Microbial inoculant; Cellulose in cow dung; Growth curve; Orthogonal test

我国畜牧养殖业快速发展的同时,畜禽粪便对环境的威胁成为一个不可忽视的问题。在减轻污染程度的基础上最大程度地实现固体废弃物资源化利用方式中,畜禽粪便的堆肥化处置是最佳的方式<sup>[1]</sup>。牛粪属于冷性堆肥材料,其中纤维素占了很大的比例,因而牛粪较其他畜禽粪便难于分解。将微生物菌剂应用于牛粪堆肥,可以加速牛粪中纤维素的降解,缩短起温时间,加快牛粪腐熟,提升堆肥质量。笔者研究了降解牛粪纤维素的复合微生物菌剂的制备,以期为进一步研究复合微生物菌剂在牛粪堆肥中的应用效果提供基础材料和数据支持。

## 1 材料与方

### 1.1 试验材料和仪器

**1.1.1 菌种。**前期研究中从腐熟牛粪与土壤中分离出HN1(枯草芽孢杆菌)、HP2(地衣芽孢杆菌)、TG1(放线菌)、P3(枯草芽孢杆菌)4株菌,用于复合菌剂制备。

**1.1.2 仪器。**主要仪器包括DPX-650型恒温培养箱、YJ-875型超净工作台、BHG-1型电热恒温干燥箱、HZQ-Q型摇床、628B型高压蒸汽灭菌锅、OLYMPUS型显微镜、DT5-2型离心机、UV-1100型紫外可见分光光度计。

**1.1.3 培养基。**羧甲基纤维素钠液体发酵培养基:CMC-Na 0.5%,蛋白胨0.3%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4%, $\text{CaCl}_2$  0.03%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03%,Tween-80 0.02%。豆饼粉液体发酵培养基:蔗糖0.7%,豆饼粉0.4%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.03%, $\text{MgSO}_4$  0.05%, $\text{FeCl}_3$  0.03%, $\text{CaCO}_3$  0.4%,酵母膏0.1%,pH=7.0。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 菌种活化。**将P3、HP2、HN1接种到牛肉膏液体培养

基,TG1接种到高氏液体培养基中进行活化。活化条件:30℃下转速为200 r/min的摇床中培养24 h。

**1.2.2 细菌和放线菌生长曲线测定。**将活化的P3、HP2、HN1菌株接种到羧甲基纤维素钠培养基中,每隔1 h取发酵液1 ml稀释,使OD值为0.1~0.6。每个发酵液样品按相同倍数稀释,分别测其OD值,直到20 h后细菌生长稳定期开始。以时间为横坐标,OD值为纵坐标,绘制各菌株的生长曲线。将活化的TG1菌株接种到豆饼粉液体培养基中,抽滤后称干重,测定放线菌的生长曲线,每12 h测一次菌体干重。称量时先将滤纸烘干再称重,菌体放在已称重的滤纸上抽滤,再将菌体与滤纸一起烘干后称重,菌体干重即为两次称量的差值<sup>[2]</sup>。采用与P3相同的方法,绘制TG1菌株的生长曲线。根据菌种的生长曲线,确定最佳转移接种时间。

**1.2.3 复合微生物菌剂配比的确定。**因牛粪粗纤维素含量高达32.5%,主要参考指标为纤维素酶活,将发酵好的菌液组合进行正交试验(表1),确定各菌种之间的配合比例。测定相应的纤维素酶活,选择最大纤维素酶活的菌种配比作为复合菌剂的最佳比例。

表1  $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

水平	因素			
	TG1(A)	P3(B)	HP2(C)	HN1(D)
1	0.5	0.5	0.5	0.5
2	1.0	1.0	1.0	1.0
3	1.5	1.5	1.5	1.5

**1.2.4 混合发酵液纤维素酶活的测定。**将菌株分别接种于羧甲基纤维素钠液体发酵培养基与豆饼粉液体发酵培养基中,培养64 h后测定纤维素酶活。羧甲基纤维素(CMC)酶活性测定依据《农用微生物菌剂》(GB 20287-2006)<sup>[3]</sup>;滤纸(FPA)酶活性测定依据《微生物肥料生产菌株质量评价通

**基金项目** 辽宁省沈阳市科技攻关项目(F-13-144-3-00)。

**作者简介** 梁文涓(1990-),女,山西长治人,硕士研究生,研究方向:污染修复生态学。

**收稿日期** 2015-06-01

用技术要求》(NY/T 1847-2010)<sup>[4]</sup>。

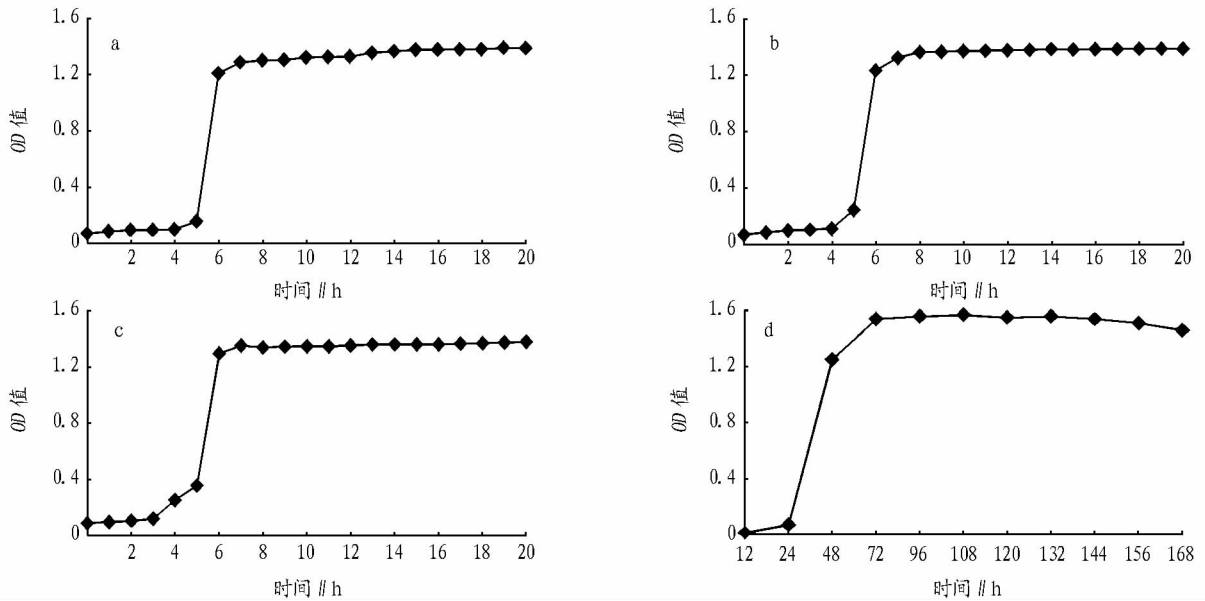
**1.2.5 固体复合微生物菌剂的制备** 将发酵好的菌液吸附于灭菌的稻壳粉中,每千克稻壳粉吸附 600 ml 发酵菌液,拌匀后风干。按照最佳配比混合拌匀后,测定混合发酵液纤维素酶活。

**1.2.6 复合微生物菌剂的菌数测定** 堆肥用的微生物菌剂应符合《农用微生物菌剂》(GB 20287-2006)的要求,对自制

复合微生物菌剂采用平板计数法测定菌数。

## 2 结果与分析

**2.1 菌株最佳接种时间的确定** 由图 1 可知,P3 在 5 h 之前生长滞后,菌体生长量不大;5 h 之后进入了对数生长期,菌体开始大量繁殖;8 h 之后进入了稳定期,菌体不再大量生长,与环境形成了相对稳定的状态。8 h 为 P3 对数生长期的末期,单个菌体的活性较强,且菌数也较高,所以第 8 小时为



注:a. P3;b. HP2;c. HN1;d. TG1。

图1 P3、HP2、HN1、TG1 菌株生长曲线

P3 的最佳转移接种时间。同理,第 9 小时为 HP2 的最佳转移接种时间,第 8 小时为 HN1 的最佳转移接种时间,第 96 小时为 P3 的最佳转移接种时间。

**2.2 复合微生物菌剂配比的确定** 由表 2 可知,TG1:P3:HP2:HN1=3:1:1:1 时,纤维素酶活最大。各个因素的极差为: $R_A=0.664$ , $R_B=0.783$ , $R_C=1.130$ , $R_D=0.994$ ,因此 HP2 所占比例为主要因素。由于正交试验当中没有此比例,所以单做 TG1:P3:HP2:HN1=3:1:1:1 的试验,测定其纤维素酶活为 6.91 U/ml,此值大于正交试验的任何结果。

表 2 正交试验结果

试验号	因素				纤维素酶活 U/ml
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	6.78
2	1	2	2	2	4.42
3	1	3	3	3	4.35
4	2	1	2	3	4.67
5	2	2	3	1	5.47
6	2	3	1	2	5.45
7	3	1	3	2	6.23
8	3	2	1	3	5.78
9	3	3	2	1	5.53
均值 1 //U/ml	5.183	5.839	6.003	5.927	
均值 2 //U/ml	5.197	5.223	4.873	5.367	
均值 3 //U/ml	5.847	5.110	5.350	4.933	
极差 R	0.664	0.783	1.130	0.994	

**2.3 固体复合微生物菌剂的制备** 按照最优配比制得固

体复合微生物菌剂,菌剂为暗黄色,带有腥味。

**2.4 复合微生物菌剂菌数测定** 通过平板计数法,测得复合微生物菌剂中的微生物数目为 3 cfu( $10^8$ /g) > 2 cfu,符合《农用微生物菌剂》(GB 20287-2006)的要求。

## 3 结论与讨论

(1) 试验中细菌的生长停滞期较短,对数期来临较早且持续时间短,一般 12 h 内便可完成细菌对数期的生长过程。放线菌的迟缓期较长,对数生长期来的晚,且持续时间长,增速也比细菌慢。

(2) 在确定菌种转移的时间时,试验采取了对数期末、稳定期前的时间,主要是由于此时单个微生物的生长速率较快,并且活菌数达到较大值。

(3) 通过正交试验确定复合微生物菌剂的配比,可以大大减少试验的工作量。从各因素极差可以看出,HP2 菌的所占比例为主导因素。最终正交试验优化结果显示,各菌种最佳配比为 TG1:P3:HP2:HN1=3:1:1:1。

## 参考文献

- [1] 章明奎. 畜禽粪便资源化循环利用的模式和技术[J]. 资源与环境科学,2010(14):280-283.
- [2] 李天枢. 畜禽堆肥高效复合微生物菌剂的研制与应用[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.
- [3] 沈德龙,李俊,姜昕,等. GB 20287-2006,农用微生物菌剂[S]. 北京:中国标准出版社,2006.
- [4] 关大伟,陈慧君,李俊,等. NY/T 1847-2010,微生物肥料生产菌株质量评价通用技术要求[S]. 北京:中国农业出版社,2010.