

高效纤维素分解菌在蔬菜-花卉秸秆联合好氧堆肥中的应用

黄得扬, 陆文静, 王洪涛*, 周辉宇, 王志超

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要:以滇池流域典型的蔬菜废物和花卉秸秆为堆肥原料,以本实验室筛选、保存的 17 株纤维素降解菌和 1 株购买的产黄纤维单胞菌(*Cellulomonas Flavigena*)为复合接种剂,对不同接种条件和控温条件下的联合堆肥中试进行了研究.实验结果表明,在一次发酵的初始阶段,以体积分数 0.5% 的接种量向堆肥中接种纤维素降解复合菌剂可有效提高发酵过程堆料中纤维素降解菌的种群密度,并使其迅速成为优势菌群,尤其是当堆体处于控温 55℃ 的工况条件时,其菌群密度可保持在 $3.84 \times 10^9 \sim 1.80 \times 10^{10}$ CFU/g;在二次发酵的初始阶段,以体积分数 1% 的接种量接种,可有效提高二次发酵阶段堆温的回升.对堆料中木质素和纤维素含量以及堆肥终产物的粒径分布指标——过筛率的检测表明,接种的复合纤维素降解菌可有效地降解堆料中的木质纤维素,接种处理中纤维素的降解率比不接种处理高 23.64%,接种处理堆肥终产物的过筛率($\phi 2.0$ cm)比不接种处理高 18.28%.研究表明,用纤维素降解复合菌剂进行二次接种二次发酵,能够有效地促进蔬菜-花卉秸秆联合好氧堆肥中物料的纤维素组分的降解,达到加快堆肥进程,提高堆肥品质的目的.

关键词:好氧堆肥;纤维素分解菌;木质纤维素

中图分类号:X705 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2004)02-0145-05

Application of High efficient Cellulose Utilization Microorganisms in Co composting of Vegetable Wastes and Flower Stalk

HUANG De-yang, LU Wen-jing, WANG Hong-tao, ZHOU Hui-yu, WANG Zhi-chao

(Dept. of Environ. Sci. and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: An inoculation composing 17 species of cellulose utilization microorganisms was used in co composting of vegetable wastes and flower stalk, and the efficiency of the inoculation on lignocellulose degradation was studied. The experiments result show that at the beginning of the first stage of composting, inoculating cellulose utilization microorganism in the substrates with 0.5% (V/V) can improve the biomass of the microorganisms into the substrates greatly and make them dominant ones. When the temperature was controlled as 55℃, the biomass of cellulose utilization microorganisms can keep between $3.84 \times 10^9 \sim 1.80 \times 10^{10}$ CFU/g. At the beginning of the second stage, inoculating with 1% (V/V) can improve the temperature during this period effectively. Monitoring of the content of lignocelluloses in the substrate shows that the inoculation of cellulose utilization microorganism can accelerate the degradation of cellulose. The degradation efficiency of cellulose under inoculation condition is 23.64% higher than those without inoculation. This shows that inoculating with cellulose utilization microorganisms in each stage of the composting can greatly decompose the lignocellulose in the substrates, accelerate the co composting process and improve the quality of composting production.

Key words: co composting; cellulose utilization microorganisms; lignocelluloses

作为一种最具发展潜力的有机废物处理处置方式,堆肥技术越来越受到国内外研究人员的重视.有机固体废物,尤其是农业秸秆、城市绿化废物和城市生活垃圾的主要成分为木质纤维素,它是地球上分布最为广泛,含量最为丰富的碳水化合物,占据了全球植物总干重的 60% 以上^[1].木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素构成,三者所占的比例分别是 40%, 20%~30% 和 20%~30%^[2].由于纤维素本身致密的结构及不易降解的特性导致其难以被充分利用或被大多数微生物直接作为碳源物质而转化利用^[3],阻碍了堆肥技术在处理有机固体废物领域的发展.在纤维素的降解机理方面,国内外学者已经

进行了大量的研究,文献[4~7]指出,纤维素的降解是多种酶协同作用的结果,因此,在堆肥中接种多种能够产生纤维素酶的复合菌群有利于木质纤维素的完全降解,加快堆肥的腐熟,提高堆肥产物的品质.能够降解木质纤维素的微生物种类很多,包括细菌、真菌和放线菌等,各种微生物的降解效果也有较大的差别^[8].本研究以木质纤维素含量较高的花卉秸秆和蔬菜废物为堆肥原料,进行了不同控温条件下

收稿日期:2003-04-25;修订日期:2003-06-16

基金项目:国家重大科技攻关专项(K99-05-35-02).

作者简介:黄得扬(1978~),男,硕士研究生,主要从事固体废物污染控制与资源化技术研究.

* 通信联系人

接种复合纤维素降解菌的联合堆肥实验,为复合微生物菌剂在高木质纤维素含量原料堆肥中的实际应用提供了技术基础.

1 材料与方法

1.1 实验装置

本研究采用 3 套中试堆肥设备进行实验,3 套设备均由发酵仓和通气系统 2 部分组成.其中,堆肥系统的上部为 1 m×1 m×2 m 的发酵仓,下部为“回”形通气沟,用于供气和收集渗滤液,通气沟的前端为通风管道,与风机相连,后端为渗滤液收集管,与渗滤液收集池相连,试验设备的结构图如图 1 所示.

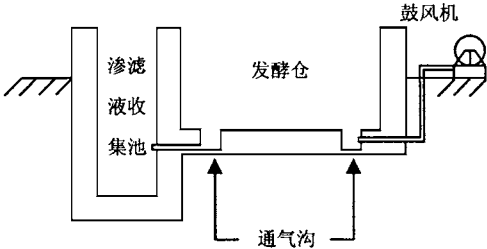


图 1 试验设备示意图

Fig.1 Diagram of experiment equipments

1.2 菌种

使用作者所在的实验室筛选、纯化并保存的 17 株纤维素降解菌(CU Ms)^[9,10]及从中科院微生物所购买的产黄纤维单胞菌(*Cellulomonas Flavigena*, 1.1002)一株.

1.3 堆肥物料

堆肥原料来自云南省呈贡县大渔乡农贸市场及地头产生的农业固体废物,包括康乃馨、满天星、勿忘我、玫瑰、水竹等花卉秸秆和以西芹和白菜为主的蔬菜废物.物料用饲料破碎机破碎至长度为 4~8 cm 后,按照质量比为 6/4 的比例将花卉秸秆与蔬菜废物混匀.

1.4 堆肥过程中的参数检测

(1)温度、含水率和有机质含量的测定 堆体温度的测量采用热电偶式温度传感器,取堆体上、中、下 3 个平面的温度的平均值作为其检测值;含水率采用 105℃烘干 24 h 恒重法;有机质采用马福炉灼烧 10 h 恒重法.

(2)纤维素降解菌种群密度的测定 采用 10 倍稀释平板培养计数法,取新鲜样品 50 g 加入盛有 450 mL 无菌生理盐水的锥形瓶中,在 30℃恒温摇床中振荡 30 min,吸取其浸出液逐级 10 倍稀释,并相应地在刚果红纤维素琼脂平板上涂板培养计数.刚

果红纤维素琼脂培养基用于纤维素分解菌的选择性培养和计数,其成分为: K₂HPO₄ 0.50 g, MgSO₄ 0.25 g, 琼脂 14.0 g, 明胶 2.0 g, 纤维素粉 1.88 g, 刚果红 0.08 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0.

(3)堆肥产物过筛率的测定 采用孔径为 2 cm 标准筛测量,以筛下物的质量与总质量的比作为过筛率.

(4)木质素和纤维素含量的测定 堆肥中木质素和纤维素含量的测定采用 Van soest 中性洗涤剂法^[11].

1.5 实验条件设计

3 组处理的实验条件设计如表 1 所示.

表 1 各处理组实验条件

Table 1 Experiment conditions for 3 conditional groups

处理	一次接种	二次接种	控温方式	通风量
1 号	0.5 %接种量的混合菌液	1 %接种量的混合菌液	控制堆体温度保持在 55℃	根据温度变化而自动调整
2 号	0.5 %接种量的混合菌液	1 %接种量的混合菌液	不控制堆体温度	30 m ³ /(h·m ³)
3 号 (对照组)	0.5 %接种量的蒸馏水	1 %接种量的蒸馏水	不控制堆体温度	30 m ³ /(h·m ³)

2 结果与讨论

2.1 堆体温度的变化

堆体温度能在一定程度上反映堆肥系统中的微生物活性,同时也对其中微生物的活性产生影响,因此,它是堆肥过程控制的一个重要指标.3 种处理的温度变化曲线如图 2 所示,其中,0~16 d 为一次发酵阶段,16~45 d 为二次发酵阶段.

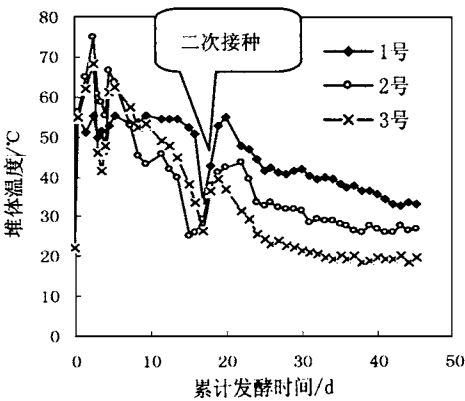


图 2 花卉秸秆-蔬菜废物联合堆肥加菌中试各仓堆体温度变化曲线

Fig.2 Temperature changes in piles during composting process

由图 2 可知,对于接种控温的 1 号处理,通过控制通风量的大小,可以有效地将一次发酵的堆体温度控制在 55℃左右,当堆肥进入到二次发酵阶段

时,由于进行了翻堆并接种了复合纤维素降解菌液,当天的堆体温度有所下降,但随后其堆体温度迅速回升,在二次接种后的第4天恢复到 55°C 。随着二次发酵的来临,由于堆料中易降解的有机物逐渐减少,散失的热量不断超过生物降解生成的热值,由此堆温逐渐下降,在二次发酵结束时,降到 30°C 左右。通过对接种的2号处理和未接种的3号处理之对比可以发现,二者的堆体温度在一次发酵阶段没有明显的差别,堆体温度保持在 55°C 以上的高温期均为6d,其中接种的2号处理的最高堆温较高,达到了 74.8°C ,而未接种的3号处理只有 68.2°C ,这说明接种菌液能有效地提高一次发酵过程中堆体的最高温度。进入二次发酵阶段后,与对照处理相比,加菌的1号和2号处理的堆体温度仍保持在较高的水平,并处于一个缓慢下降的趋势。其中,1号处理由第20天的 44.8°C 下降到第45天的 32.9°C ,2号处理则由第20天的 42.3°C 降低到第45d的 26.9°C ,而对照处理的堆体温度在30d后已基本接近环境温度。实验结果表明,在堆肥的一次发酵阶段和二次发酵阶段分别向堆料中接种纤维素降解复合菌剂,能有效提高堆肥二次阶段的堆体温度的回升和一次发酵阶段高温期的最高堆温,而较高的堆体温度更有利于堆料中有机成分的降解。通过改变通风量的大小,可以将一次发酵阶段的堆体温度稳定地控制在 55°C 左右,并可以在二次发酵阶段维持较高的堆体温度。

2.2 堆料含水率和有机质含量的变化

堆肥过程中的水分含量是一个重要的物理因素,它的作用主要在于:保持微生物的活性,溶解有机物以及通过蒸发调节堆体的温度。各处理在发酵过程中堆料含水率的变化情况及有机质含量的变化情况分别如图3和图4所示。各处理的含水率在整个堆肥过程中的变化趋势基本相同,在发酵的第16天即一次发酵结束时达到最低。由于在二次发酵开始时,再次向堆肥物料中接种了复合纤维素降解菌液,因此各处理的含水率也随之上升到68%左右,并在随后的时间里保持缓慢的下降趋势。实验结果表明,在堆料性质相同的条件下,环境的温度和湿度以及翻堆、日照蒸发等因素对堆料含水率的变化有着更为明显的影响,而微生物的活动对堆料的含水率变化不起决定作用。另外,堆料的水分损失主要发生在一次发酵阶段,而在二次发酵的初始再次向堆肥中接种复合菌液会大大提高堆料的含水率,直接影响堆肥终产物的品质。因此,利用固态载体发酵的

菌剂(如锯末、麸皮等)作为二次发酵阶段的接种剂可能更有利于提高堆肥品质。

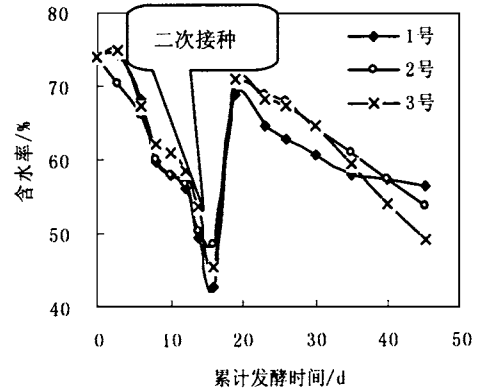


图3 含水率变化曲线

Fig.3 Moisture content in piles during composting process

在整个发酵过程中,3组处理中堆肥物料的有机质含量的变化趋势基本相同,都从最初的82%降低到55%~60%之间。相对于未接种的3号处理,接种了纤维素降解菌的1号和2号处理中物料的有机质含量降低速率更快,最终产物的有机质含量更低。一次发酵阶段中,控温在 55°C 的1号处理有机质降解速率较高,在一次发酵结束时,其有机质含量降到了61.63%;而在二次发酵阶段,不控温的2号处理的有机质含量降解最快,在二次发酵的第10天达到了54.8%。通过与各处理的温度变化曲线的对比可以发现,在堆肥的2个发酵阶段中,温度较低的接种处理中,相应的有机质降解速率更快,这说明过高的堆温会抑制接种微生物的活性,降低有机成分的降解速率。

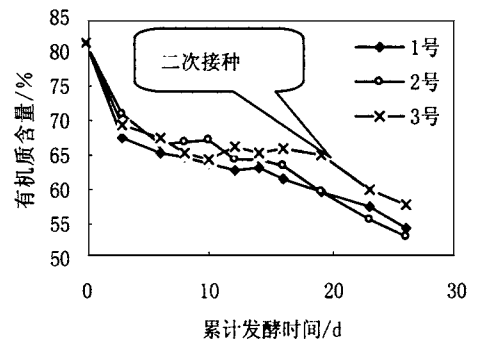


图4 有机质含量变化曲线

Fig.4 Organic matter content changes in piles during composting process

2.3 堆肥过程中 CUMs 种群动力学

在一个完整的好氧高温堆肥的各个阶段,微生物的群落结构演替非常迅速,每个阶段都有数目巨

大的多个微生物群体存在,包括细菌、真菌和放线菌。由于本实验的目的在于研究接种复合纤维素降解菌在好氧堆肥过程中所起的作用,因此堆肥中的广泛的微生物区系变化规律不是本研究的重点,这里仅对其中的纤维素降解菌的变化规律进行研究。实验中采用刚果红纤维素琼脂培养基对样品进行培养计数,由于它是一种选择性培养基,只有能够利用纤维素作为碳源的微生物才能在其上生长,因此就可以得到样品中纤维素降解菌的种群密度。中试堆肥过程中的 CUMs 种群密度动态消长见图 5。结果显示,在接种了复合纤维素降解菌的堆体中,当控制

堆体的温度保持在 55℃ 左右时,堆料中纤维素降解菌的密度在整个发酵过程中始终保持在 10^{10} CFU/g 左右,且明显高于对照组(不接种且不控制温度)同期的种群密度;对于接种不控温的 2 号处理,其堆料中的纤维素降解菌群密度则随着堆体温度的降低而相应地上升,从第 3 天的 1.25×10^8 CFU/g 上升到第 23 天的 2.67×10^{10} CFU/g。上述的结果说明,在堆肥初期接种纤维素降解菌能够显著提高堆肥中该种群的生物量,堆体温度保持在 55℃ 左右可提高该种群的繁殖率和活性,过高的温度则会对其产生抑制作用。

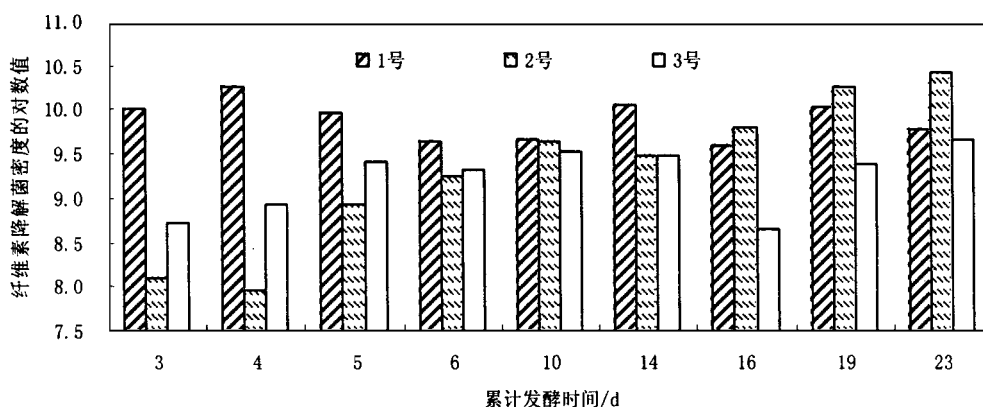


图 5 接种堆肥过程中 CUMs 种群变化趋势

Fig. 5 Biomass of CUMs changes in piles during composting process

2.4 堆肥过程中木质纤维素含量的变化

堆肥物料中存在的木质纤维素是影响好氧堆肥进程的一个重要制约因素,在堆肥中接种复合纤维素降解菌的主要就是通过完全降解或部分降解纤维素、半纤维素和木质素分子,破坏其形成的复杂的网状大分子结构的屏蔽作用,从而加快好氧堆肥的进程。本次实验中,不同接种条件和温度控制条件下,纤维素和木质素含量的变化分别如图 6、图 7 所示。在本次堆肥过程中,各处理中物料的纤维素含量都有明显的变化,其中,接种控温的 1 号处理变化最为显著,其纤维素含量由最初的 14.85% 降低到 26d 后的 5.02%,其次为接种不控温的 2 号处理,由最初的 14.85% 降低到 7.03%,变化最小的为不接种不控温的 3 号处理,其 26d 后的纤维素含量为 8.53%;研究结果表明,在堆肥过程中进行二次纤维素降解菌接种并保证适宜的温度条件,可以有效地加快纤维素的降解速率,达到降低堆肥中纤维素含量的目的。相对于对照,控温 55℃ 并接种菌剂的处理中,纤维素的降解量增加了 23.64%,在接种不控温处理中,纤维素的降解量增加了 10.1%。另外,在

进入二次发酵阶段后,各处理中纤维素含量的减少明显加快,这可能是由于微生物在一次发酵阶段为纤维素的进一步降解提供了条件,增大了反应的比表面积,同时降解中间产物的其它微生物活性增强、数量增多,促进降解过程不断向正反应方向进行。相对于纤维素降解情况,各处理中木质素的含量则无明显的变化,始终保持一个非常缓慢的下降趋势,这是木质素在自然条件下极难生物降解的缘故,各处理之间也无显著差别。在堆肥的第 26 天时,3 个处理中木质素的含量分别由最初的 12.13% 降低到 10.93%、10.76% 和 11.48%。上述的实验结果表明,好氧堆肥中的木质素是极难生物降解的,在整个过程中其含量呈缓慢下降的趋势,但是,通过向堆肥中接种纤维素降解菌仍可以对木质素的降解有所促进。

2.5 堆肥终产物的过筛率比较

本实验室已有的研究成果表明,堆肥产物的过筛率是一个能够反映堆肥系统物理性状即产物粒径分布变化和微生物分解活性强弱的指标^[8],本文也采用该指标就各处理对堆肥终产物的物理性状的影

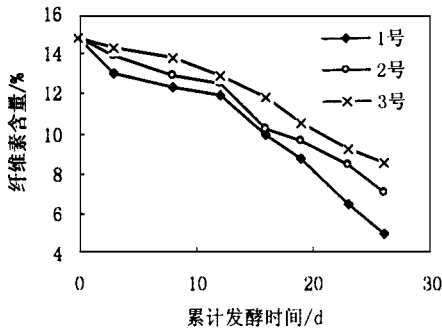


图 6 堆肥中纤维素含量的变化曲线

Fig. 6 Cellulose content changes in piles during composting process

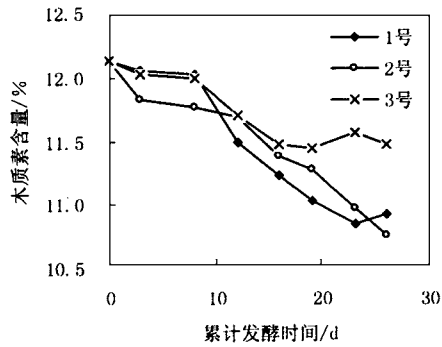


图 7 堆肥中木质素含量的变化曲线

Fig. 7 Lignin content changes in piles during composting process

响进行了研究.表 2 是 3 个处理的终产物的过筛率以及相应的含水率.

表 2 堆肥最终产物的过筛率 (φ2cm) 及含水率

Table 2 Sifting ratio (φ2cm) and moisture content of composting product

项目	指标	1 号	2 号	3 号
终产物	湿重/kg	225	220	156
	干重/kg	126.6	118.1	60.8
	含水率/%	56.25	53.67	38.96
筛上物	湿重/kg	55.5	55.5	67.0
	干重/kg	31.5	31.5	27.1
	含水率/%	56.70	56.70	40.50
筛下物	湿重/kg	169.5	144.5	89.0
	干重/kg	95.1	75.9	33.6
	含水率/%	56.10	52.50	37.80
过筛率/%	湿基	75.33	72.25	57.05
	干基	75.59	74.07	58.14

表 2 显示,3 个处理的堆肥终产物的过筛率差异显著,对于湿基的过筛率,接种控温的 1 号处理和接种不控温的 2 号处理分别比对照 3 号处理高出 18.28 %和 15.20 %;干基的过筛率,接种控温的 1 号处理和接种不控温的 2 号处理分别比对照高出 17.45 %和 15.93 % . 这进一步说明纤维素降解复合菌剂对堆肥物料中的木质纤维素有较强的降解作

用,能够有效地破坏堆肥物料中花卉秸秆的纤维素结构,降低堆料的粒径,显著改善堆肥终产物的物理性状和品质,从而提高堆肥精细产品得率.

3 结论

蔬菜-花卉秸秆联合高温好氧堆肥过程中,通过在一次发酵和二次发酵阶段向堆肥中接种纤维素降解复合菌剂,可有效地提高堆料中纤维素的降解程度,改善堆肥终产物的物理性状,加快堆肥的进程.而接种对于堆温,含水率等参数的影响不明显.本研究结果显示,堆体温度是影响纤维素降解菌接种效果的重要因素,过高的温度会抑制接种菌的活性,55℃左右更有利于接种菌的生长和降解性能的发挥.利用改变通风量大小的方法,可以将堆体温度稳定地控制在适合接种菌生长的范围内,保持接种菌的活性,并使其迅速成为堆肥中的优势种群.在好氧堆肥的二次发酵阶段,以液态方式向堆肥中接种纤维素降解复合菌会造成堆料含水率升高,较高的含水率不利于堆肥产物在二次发酵结束后形成理想的终产物,因此,建议以固态载体方式向堆肥中接种.

参考文献:

[1] Tengerdy R P, Szakacs G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation[J]. Biochemical Engineering, 2003, 13(2~3): 167~179.

[2] Tuomela M, Vikman M, Halakka A, Itavaara M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review[J]. Bioresource Technology, 2000, 72(2): 169~183.

[3] 邹仪明.植物纤维素化学(第 2 版)[M].北京:中国轻工业出版社,1995. 152~154.

[4] Reese E T, Siu R G H, Levinson H S. The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives and Its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis[J]. Journal of Bacteriology, 1950, 59(5): 485~497.

[5] Wood T M, Macgregor S I. In bioconversion of cellulose substance into energy[A]. Chemicals and microbial proteins, Edited by T. K. Ghose Gall, India: 1978, 111~141.

[6] Beguin P, Aubert J P. The biological degradation of cellulose [J]. FEMS Microbiol. Review, 1994, 13(3): 25~58.

[7] Mandels M Reese, et al. Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, 22(4~5): 225~240.

[8] 邱向阳.高效花卉秸秆木质纤维素分解菌群选育及应用研究[D].北京:清华大学,2002.

[9] 邱向阳,陆文静,黄鼎曦,黄得扬,王洪涛.蔬菜-花卉秸秆混合堆肥性状表征及纤维素分解菌群选育研究[J].北京大学学报(自然科学版), 2003, 39(2): 254~261.

[10] 黄鼎曦,陆文静,邱向阳,王洪涛.农村蔬菜废物分散化微生物处理技术研究[J]. 清华大学学报(自然科学), 2003, 43(10): 1347~1350.

[11] 王玉万,徐文玉.木质纤维素基质发酵物中半纤维素、纤维素和木素的定量分析程序[J].微生物学通报,1987, 13(2): 82~84.