

外源复合菌系对堆肥纤维素和金霉素降解效果的研究

秦莉¹,高茹英²,李国学³,刘潇威¹,李红¹,刘岩¹,王璐¹

(1.农业部环境保护科研监测所,天津 300191;2.中国农业大学水利与土木工程学院,北京 100083;3.中国农业大学资源环境学院,北京 100094)

摘要 采用野外堆肥装置,通过在以鸡粪和秸秆为原料的高温堆肥中加入经过驯化构建的具有降解纤维素和金霉素双重功能的复合菌系,研究了接菌处理对提高堆肥效率和降解抗生素类兽药污染物的效果。结果表明,该复合菌系对纤维素降解有明显的促进作用,接菌处理堆肥中的纤维素含量到堆肥结束时从开始的 22.00%减少到 8.25%,减少了 62.5%,而 CK 和 CK+金霉素两个未接菌处理分别减少了 54.28%和 53.78%。同时,高温堆肥过程本身对金霉素就具有一定的降解作用,CK 和 CK+金霉素两个未接菌处理对金霉素的降解效果差异不大,降解率在 60%左右,接种复合菌系处理的金霉素降解率达 82.23%,显著高于 CK 和 CK+金霉素两个未接菌的对照处理。

关键词 高温堆肥;复合菌系;纤维素;金霉素;降解

中图分类号 S141.4 文献标志码 A 文章编号:1672-2043(2009)04-0820-04

Decomposition Effect of Additive of Composite Microbial System on Cellulose and Chlortetracycline in Composting

QIN Li¹,GAO Ru-ying²,LI Guo-xue³,LIU Xiao-wei¹,LI Hong¹,LIU Yan¹,WANG Lu¹

(1.Agro-Environmental Protection Institute, the Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China;2.College of Water Conservancy and Civil Engineering,China Agricultural University,Beijing 100083, China;3.College of Resources and Environment Science,China Agricultural University,Beijing 100094, China)

Abstract The domesticated and constructed composite microbial system of degrading cellulose and chlortetracycline (CTC) were added in compost in order to test the improvement for composting efficiency and elimination of antibiotic medicines. The results indicated that the composite microbial system could improve the biodegradation of cellulose significantly. In the inoculated compost, cellulose was decomposed by 62.5% (from 22% to 8.25%), the CK and CK+CTC were decomposed separately by 54.28% and 53.78%. The biodegradation of CTC also occurred in the high temperature period, and the degradation ratio of the CK and CK+CTC were similar in the un-inoculated compost, the degradation ratio was 60%. But in the inoculated compost, the CTC degradation ratio was 82.23%, which was significantly more than the CK.

Keywords thermophilic compost; composite microbial system; cellulose; chlortetracycline; degradation

由于某些饲料添加剂和兽药的使用效果常被夸大,我国大中型养殖场生产过程中普遍存在超量使用抗生素的现象^[1]。金霉素(Chlortetracycline, CTC)作为畜禽动物饲养中常用的抗生素之一,时常被添加到动

物饲料中,以促进动物生长、预防、治疗动物某种疾病。匡光伟等^[2]研究发现,不同光照条件下 CTC 降解速率不同,避光条件下 CTC 在鸡粪中都比较稳定,不易降解。由于规模养鸡生产中,鸡场一般采取 1 个生产周期清扫 1 次鸡粪的清粪方式,鸡粪在鸡舍内不断堆积,大部分鸡粪处于避光的环境中。因此,舍内鸡粪中的 CTC 降解量较小,鸡粪在被清除出鸡舍后,如果不进行适当处理而直接进入环境,CTC 会对环境造成不良影响^[2]。堆肥处理不仅可以实现农牧业废弃物资源化,还可以作为生物修复技术处理有毒有害物质^[3-7]。然而,在堆肥过程中利用外源添加复合微生物对畜禽粪中兽药残留降解的研究国内鲜见报道。因

收稿日期:2008-04-30

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(农业部环境保护科研监测所资助,2006-aepi-05);教育部博士点基金(20050019037);国家科技支撑项目(2006BAD10B05,2007BAD89B07)

作者简介:秦莉(1973—)女,博士,助理研究员,主要从事废弃物处理与资源化及农产品质量控制研究。E-mail:ql-tj@163.com

通讯作者:李国学 E-mail:ligx@cau.edu.cn

此,本试验以鸡粪和秸秆为堆制原料,研究比较了外源添加自行筛选、驯化和构建的具有降解纤维素和金霉素双重功能的复合微生物菌系和不添加该复合微生物菌系高温堆肥过程中纤维素和金霉素的降解特点,以便为今后规模化养殖畜禽粪无害化、资源化、产业化处理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 微生物复合菌系的筛选、驯化和构建

1.1.1 培养条件

纤维素蛋白胨培养基(PCS):其成分为 0.5%蛋白胨,0.5%纤维素(滤纸),0.5%NaCl,0.3%CaCO₃,0.1%酵母粉,自然 pH,在 50 °C 静止培养,使处于 DO 为 0.02~0.4 mg·L⁻¹ 的微好氧状态。

1.1.2 复合菌系的筛选、驯化和构建方法

步骤一:分别从各堆肥样品中取 5 g 加于 100 mL PCS 液体培养基中,在 50 °C 条件下恒温静止富集培养,待浸在培养液中的滤纸进入旺盛崩解断裂阶段时,将发酵液按 5%(V/V)接种量加入同样的新鲜培养液中,观察培养液的气泡、滤纸的颜色及崩解情况、培养液混浊程度。在滤纸分解的旺盛时期,连续传代,并测定其 pH 值,边传代边筛选出滤纸分解速度快而且 pH 保持稳定的菌系,将其中 pH 反应偏酸的和偏碱的进行混合接种,传代直至稳定。然后,取 5% 已选出的几种纤维素分解复合系培养液分别接种于 PCS 培养基中,并分别加入浓度为 50 mg·L⁻¹ 的金霉素,培养方法同上,然后逐渐提高金霉素用量,至培养液中的金霉素浓度分别达到 200 mg·L⁻¹,选出在此金霉素浓度下滤纸分解速度快、pH 稳定的复合菌系。

步骤二:在 100 mL 加有一定浓度金霉素的培养基中分别加入 5 g 上述堆肥样品,培养基组成及培养条件均同上。待浸在培养基中的滤纸完全崩解断裂进行转接。连续传代并逐渐提高金霉素用量,至培养液中的金霉素浓度达到 200 mg·L⁻¹,将 pH 反应偏酸的和偏碱的培养液混合接种,边传代边筛选出滤纸分解速度快的复合菌系。

以上两步同时进行,最后将经分别筛选出的菌系混和接种,连续传代,直至选出一组滤纸分解速度快、pH 稳定以及金霉素降解率高的高效稳定复合菌系。

为了保证供试菌种的一致性,本实验中将最终筛选出的高效稳定降解纤维素和金霉素的复合菌系进行连续继代培养,对第 30 代培养液加 20%(V/V)甘油,分装后-80 °C 冰冻保存,每次试验前将其活化后

作为供试菌种。

1.1.3 供试菌种的制备

配制 1 000 mL 的纤维素蛋白胨培养基(PCS),装入三角瓶中,在 121 °C 下灭菌 15 min 后,接种 5% 的笔者等自行驯化构建的降解纤维素和金霉素的复合菌系,在 50 °C 静止培养 3 d。

1.2 堆制材料

鸡粪取自天津武清养鸡场笼养蛋鸡的风干粪便,玉米秸秆取自天津宝坻农村,其基本性状见表 1。

表 1 堆肥原料的基本性质

Table 1 The basic characteristics of compost material

堆肥物料	含碳量/ %	含氮量/ %	C/N	水分含量/ %	金霉素含量/ mg·kg ⁻¹
鸡粪	12.26	1.23	9.97	8.3	4.56
玉米秸秆	15.18	0.31	48.97	42.5	—

1.3 堆制、发酵管理及采样

野外堆肥实验在农业部环境保护科研监测所网室内自行设计的堆肥池中进行,将鸡粪和切碎为 3~5 cm 左右的玉米秸秆按 C/N 为 20~25 的比例混合均匀,调节混合物料水分含量在 60% 左右。堆制成 3.0 m×2.5 m×1.5 m 大小的堆体。堆肥装置如图 1 所示。堆体采用强制通风供氧方式,每间隔 1 h 进行 2 h 的通气,在每次取样时则采用人工翻堆。试验设 3 个处理,一个处理为自然堆制(CK),一个处理为不接种添加金霉素(CK+金霉素)50 mg·kg⁻¹;一个处理为接种复合菌系(接种量为 0.5%(V/W))并添加金霉素(CK+金霉素+菌)50 mg·kg⁻¹。各处理在尼龙网兜中进行,即将上述混合均匀的堆肥物料,取 5 kg 装入尼龙网兜,按处理方案处理后,置于堆体中部一起进行堆制。堆制时间为 45 d。堆制期间,每日早晚两次测定堆体上、中、下部的温度,计算其平均温度,同时测定堆肥现场的环境温度。分别在 0、5、10、15、20、27、35、45 d 时取样,质量为 100~300 g,样品分成两份,一份为鲜样储存 4 °C 冰箱中待用,另一份在 105 °C 下烘干测定水分,粉碎留做干样待用。待采集全过程样品后,统一进行测定。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 测定指标

指标有温度、水分、纤维素、金霉素。

1.4.2 测定方法

(1)堆肥温度采用热敏电阻法;

(2)堆肥含水量采用烘干法;

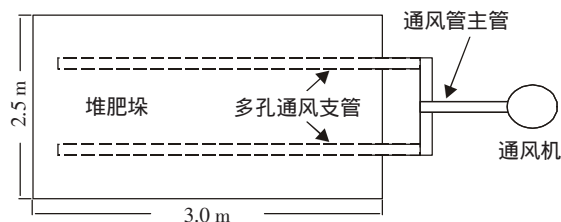


图1 野外堆肥装置示意图

Figure 1 Sketch map of field compost equipment

(3)纤维素的测定采用范氏洗涤纤维分析法^[8];

(4)金霉素测定采用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{EDTA}-\text{Mcll}-\text{vaine}(\text{pH}=4.0 \pm 0.05)$ 缓冲溶液提取,经离心后,上清液用 Oasia HLB 或相当的固相萃取柱和阴离子交换柱净化,具紫外检测器的惠普 HP-1100 型高效液相色谱仪(HPLC)测定。色谱条件为:柱为 ODS-C18($5 \mu\text{m}$) $6.2 \text{ mm} \times 15 \text{ cm}$;检测波长为 355 nm ;灵敏度为 0.002 AUFS ;柱温为室温;流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量为 $10 \mu\text{L}$;流动相为乙腈+ $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液(用 30%硝酸溶液调节 $\text{pH}2.5$)=35+65,使用前用超声波脱气 10 min ^[9]。

2 结果与分析

2.1 高温堆肥过程中温度的变化

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]。野外堆肥过程中的温度变化趋势如图 2 所示。堆肥初期,物料中易分解的有机物质在好氧微生物的作用下迅速分解,并释放热能,导致第 2 d 堆肥温度就上升至 $53.5 \text{ }^\circ\text{C}$,第 4 d 上升至 $61.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 。高温期温度持续在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上达 12 d,温度持续在 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上达 38 d,在此过程中温度有较大起伏主要是因为通风不充分,堆体内的氧气不充足,致使温度有所降低,通过翻堆人为的补充水分和氧气后微生物活性增强,温度又会出现回升的结果。

2.2 高温堆肥过程中水分的变化

在堆肥过程中,水分是一个重要的物理因素。水分的主要作用在于:(1)溶解有机物,参与微生物的新陈代谢;(2)水分蒸发时带走热量,起调节堆肥温度的作用。水分的多少,直接影响好氧堆肥反应速度的快慢,影响堆肥的质量,甚至关系到好氧堆肥工艺的成败^[3]。因此,水分的控制十分重要。从图 3 中可以看出,随着堆肥的进行,水分含量逐渐下降,由于高温时

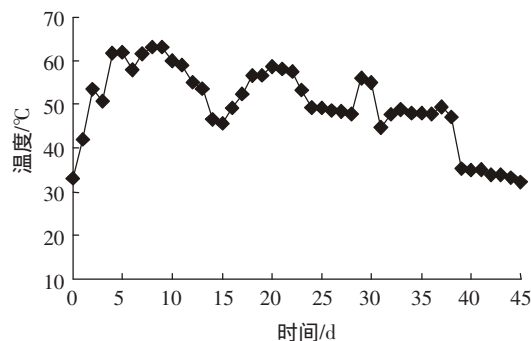


图2 堆肥过程中温度变化

Figure 2 The effect of composite microbial system on the temperature of compost

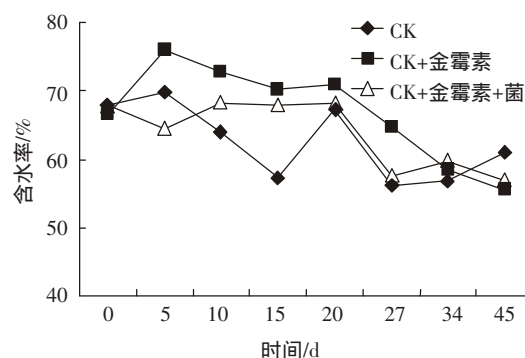


图3 复合菌系的接种对堆肥中水分含量的影响

Figure 3 The effect of composite microbial system on the water content of compost

期持续时间长,水分蒸发量也大,因此本试验通过喷水不断补充水分。在本试验条件下,供试的外源复合微生物菌系对堆肥过程中的水分含量变化影响不大。

2.3 高温堆肥过程中纤维素的变化

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,在堆肥中接种复合菌系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。由图 4 可以看出,所有处理的纤维素含量都随着堆肥发酵的进行而降低,而且在发酵开始前 5 d 变化较小,纤维素的快速分解主要集中在 5~34 d 左右进行,此时正是发酵的高温期。接菌处理堆肥中的纤维素含量到堆肥结束时从开始的 22.00% 减少到 8.25% ,减少了 62.5% ,而 CK 和 CK+金霉素分别减少了 54.28% 和 53.78% 。

2.4 高温堆肥过程中金霉素的降解情况

将堆肥发酵的第 0、10、20、45 d 的样品进行分析,结果见图 5。

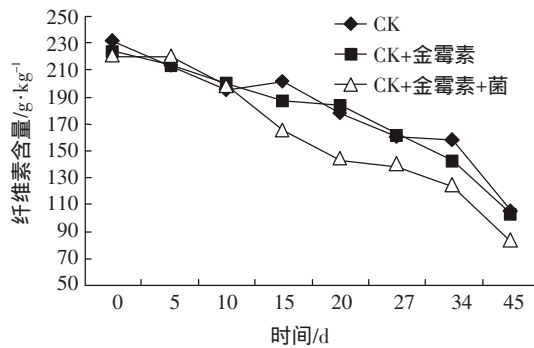


图 4 复合菌系的接种对堆肥中纤维素的影响
Figure 4 The effect of composite microbial system on the cellulose of compost

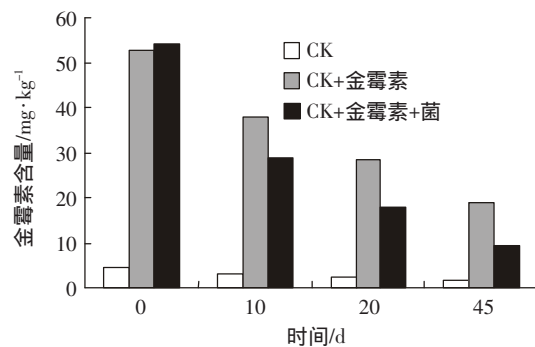


图 5 复合菌系的接种对堆肥中金霉素的影响
Figure 5 The effect of composite microbial system on the CTC of compost

由图 5 可以看出, 接种与未接种处理中的金霉素含量都迅速减少, 说明高温堆肥过程本身对污染物就具有降解作用, 接种复合菌系处理对金霉素降解率达 82.23%, 未接种两个处理对金霉素的降解效果差异不大, 降解率在 60% 左右, 说明接种复合菌系对堆肥中金霉素的降解有一定的促进作用。这与张树清等研究结果相符^[10]。试验结果还表明金霉素在堆肥中的降解主要在高温期进行, 复合菌系在高温期对金霉素有较好的降解效果。这源于本复合微生物菌系是在 50 °C、有较高浓度金霉素、好气和兼气条件下分离筛选出来的, 因此它们可适应高温好氧的堆肥环境, 并较快的繁殖, 形成优势种群, 有效提高降解效率。

3 小结

(1) 外源复合菌系在堆肥高温期纤维素的生物降解中发挥了积极的作用, 接种处理使堆肥过程中的纤维素从堆肥开始时的 22.00% 减少到 8.25%, 减少了 62.5%, 显著高于两个对照处理。

(2) 金霉素在堆肥中的降解主要在高温期进行, 堆肥过程中外源复合菌系的引入使金霉素的降解效率提高了约 20% 左右。

参考文献:

- [1] 孔维栋, 朱永官. 抗生素类兽药对植物和土壤微生物的生态毒理学效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(1): 1-9
KONG Wei-dong, ZHU Yong-guan. A review on ecotoxicology of veterinary pharmaceuticals to plants and soil microbes[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology* 2007, 2(1): 1-9
- [2] 匡光伟, 邓 昉, 董燕德, 等. 金霉素在鸡粪中的降解研究[J]. 动物医学进展, 2007, 28(6): 50-52.
KUANG Guang-wei, DENG Fang, DONG Yan-de, et al. Study on the degradation of antibacterial medicine of tetracyclines in chicken feces [J]. *Progress in Veterinary Medicine* 2007, 28(6): 50-52.
- [3] 李国学, 张福锁. 固体废弃物堆肥化与有机复混肥生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
LI Guo-xue, ZHANG Fu-suo. Composting of solid wastes and producing of organic compost[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001.
- [4] 沈德中. 污染物的原位生物处理—生物清消技术[J]. 环境科学进展, 1993, 1(5): 56-59.
SHEN De-zhong. The technique of bioremediation—insitu biological treatment of pollutants[J]. *Progress in Environment Science*, 1993, 1(5): 56-59.
- [5] Mcfarland M J, Qiu X J. Removal of benzo[a] pyrene in soil composting systems amended with the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Journal of Hazardous Material*, 1995, 42: 61-70.
- [6] Gupta G, Tao J. Bioremediation of gasoline-contaminated soil using poultry litter[J]. *Environ Health*, 1996, 31: 2395-2407.
- [7] Michel F C, Adinarayana Reddy C, Forney L J. Microbial degradation and humification of the lawn care pesticide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid during the composting of yard trimmings[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(7): 2566-2571.
- [8] 夏玉宇, 朱 丹. 饲料质量分析检验[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994.
XIA Yu-yu, ZHU Dan. Analyze and test of the feed quality[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1994.
- [9] 李俊锁, 邱月明, 王 超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
LI Jun-suo, Qiu Yue-ming, WANG Chao. Analyze of veterinary pharmaceuticals residues[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002.
- [10] 张树清, 张夫道, 刘秀梅, 等. 高温堆肥对畜禽粪中抗生素降解和重金属钝化的作用[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 337-343.
ZHANG Shu-qing, ZHANG Fu-dao, LIU Xiu-mei, et al. Degradation of antibiotics and passivation of heavy metals during thermophilic composting process[J]. *Scientia Agricultura Sinica* 2006, 39(2): 337-343.