

微生物在堆肥化中的应用研究*

吴正松, 彭绪亚, 蔡华帅, 李明

(重庆大学 城市建设与环境工程学院, 重庆 400045)

摘要:介绍了堆肥化的基本原理、分类和堆肥微生物的种类,概括了目前国内外将微生物的混合培养应用于堆肥的情况,着重介绍了微生物的混合培养有利于对纤维素的降解以及提高微生物对纤维素降解能力的途径。

关键词:微生物;混合培养;纤维素;降解;酶

中图分类号:X712 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-7329(2005)01-0092-05

Study on Application of Microorganism in Composting

WU Zheng-song, PENG Xu-ya, CAI Hua-shuai, LI Ming

(College of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China)

Abstract: In this paper the fundamentals, classification of composting and categories of compost microorganism are introduced. The situation of use of mixed cultivation of microorganism in compost both at home and abroad is summarized. The emphasis is put on the fact that the mixed cultivation is good for the degradation of cellulose and the approach to improve the degradation ability of cellulose.

Keywords: microorganism; mixed cultivation; cellulose; degradation; enzyme

1 堆肥化与堆肥

1.1 概述

堆肥化是利用自然界广泛分布的细菌、放线菌、真菌等微生物,人为地促进可降解的有机物向稳定的腐殖质生化转化的微生物学过程。其产物为堆肥,是处理有机固体废物并使之实现资源化的一种重要技术。垃圾经堆制后,体积一般降为原来的50%~70%^[1]。现代化堆肥工艺,特别是城市生活垃圾堆肥工艺大都是好氧堆肥。好氧堆肥是以好氧菌为主对有机废物进行吸收、氧化、分解,微生物通过自身的生命活动,把一部分被吸收的有机物氧化成简单的无机物并放出生长活动所需的能量,把另一部分有机物转化合成成为新的细胞物质,使微生物生长繁殖产生更多的生物体。好氧堆肥系统温度一般为50~60℃,最高可达80~90℃。

1.2 堆肥微生物

好氧法制堆肥,参与有机物生化降解的微生物包括两类:嗜温菌和嗜热菌,两类微生物生活、繁殖的温度范围如表1^[1]。

表1 嗜温菌和嗜热菌生活繁殖的温度范围/℃

细菌	最低	适宜	最高
嗜温菌	15~25	25~40	43
嗜热菌	25~45	40~50	85

现在人们已经弄清在好氧堆肥中,有机底物的降解是细菌、放线菌和真菌等多种微生物共同作用的结果,因此,有必要对它们在堆肥过程中的变化情况进行研究。

* 收稿日期:2004-10-08

作者简介:吴正松(1974-),男,安徽庐江人,讲师,主要从事固体废物污染控制、理论与资源化技术研究。

1.2.1 细菌 在好氧堆肥过程中,细菌凭借强大的比表面积,可以快速将可溶性底物吸收到细胞中,其数量要比放线菌和真菌多得多。在堆肥过程中,细菌总数的变化趋势是高-低-高。堆肥初期,有机废物中携带有大量的细菌,微生物分解有机质使堆温上升,此时,常温细菌受到抑制,嗜温细菌活跃;当堆温升至高温阶段,只有少量的嗜热细菌可以活动,但高温期过后,随着温度的降低,嗜温及常温细菌又开始活跃,使细菌总数上升。Abdennaceur 等人^[2]的研究表明:在堆肥的初始阶段,嗜温细菌最为活跃,其数量为 $8.5 \times 10^8 \sim 5.8 \times 10^9$ 干物料之间;而在高温阶段的优势菌则主要是芽孢杆菌属 [*Bacillus*] 的一些种,如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*),地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 和环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)。

1.2.2 放线菌 在堆肥过程中,放线菌的变化规律与细菌非常相似,但其总数比细菌约低两个数量级^[3]。

放线菌是具有多细胞菌丝的细菌,因此它又具有真菌的一些特征,但它比真菌能够忍受更高的温度和 pH 值。Waksman 等^[4]研究认为,诺卡氏菌 (*nocardia*)、链霉菌 (*streptomyces*)、高温放线菌 (*thermoactinomyces*) 和单孢子菌 (*micromonospora*) 等都是在堆肥中占优势的放线菌;放线菌很少利用纤维素,但它们能容易地利用半纤维素,并在一定程度上分解木质素。

1.2.3 真菌 堆肥化过程中,真菌对堆肥物料的分解和稳定起着重要的作用,真菌不仅能分泌胞外酶,水解有机物质,而且由于其菌丝的机械穿插作用,还对物料起一定的物理破坏作用,促进生化反应。温度是影响真菌生长的重要因素之一,一些中温类群包括嗜热真菌 (*mucor pusillns*) 和耐热真菌 (*aspergillus fumigatus*) 在升温的前几天就很快被杀死;一些高温期结束后很快出现的真菌如嗜热毛壳霉 (*chaetomium thermophile*) 和 (*humicola insolens*), 它们能快速利用纤维素和半纤维素且生长迅速;还有一些是在高温结束后一段时间——堆温下降阶段出现,它们包括两个嗜热真菌三个中温真菌和三个担子菌。据文献记载,真菌一般在 $40 \sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$ 活跃,温度 $> 60 \text{ }^\circ\text{C}$, 真菌几乎完全停止活动,死亡或处于休眠状态。

由于在堆肥过程中各种环境因素都是在不断变化,因此,在不同的堆肥环境中分离的微生物在分类学上具有多样性。陈世和等^[5]采用垃圾培养基,在城市生活垃圾堆肥处理过程中,温度达 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,分别对堆肥菌株进行分离鉴定,结果是,堆肥温度 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 时主要菌株包括:曲霉属 (*aspergillus*), 芽孢杆菌属 (*bacillus*), 肠道杆菌属 (*enterobacter*), 假单孢菌属 (*pseudomonas*) 和芽孢乳杆菌属 (*sporolactobacillus*); 垃圾堆肥 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 时主要菌株有:乳酸杆菌属 (*lactobacillus*), 芽孢杆菌属 (*bacillus*), 假单孢杆菌属 (*pseudomonas*), 链球菌属 (*streptococcus*), 小单孢菌属 (*micromonospora*)。

2 微生物的混合培养在堆肥化中的应用

全世界每年大约形成 $1\ 000 \sim 2\ 000$ 亿 t 植物有机物,其中有一半是纤维素物质,我国每年仅农业生产中形成的农作物残渣(稻草、秸秆等)就约 7 亿吨,工业生产中还有数百万吨的纤维素废物。随着人们生活水平的提高,城乡生活垃圾中有机废物日益增多,其中量最大的就是纤维素类物质。因此,微生物对纤维素类物质分解的快慢,直接决定着堆肥化的周期。

如今,已有很多关于纤维素分解菌的报道,其大部分是以纯培养方法分离和筛选,但在长期的实验和生产实践中,人们不断发现许多重要的生化过程是单株微生物不能完成或只能微弱地进行的^[6],而在两种或多种微生物的共同作用下,纤维素分解的效果会更好。

2.1 纤维素分解菌的分离筛选

纤维素分解菌大都都是从不同的自然环境中直接分离筛选的,有人从土壤、动物的粪便中分离筛选,许修宏等^[7]从土壤、马粪、牛粪中取样,在赫奇逊液体培养基 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 温箱中分离纤维素分解细菌菌群,然后依据滤纸崩解的快慢筛选出高效高温好气性纤维素分解菌群;有人从糖厂弃渣塘、木材厂木垛下、农园烂树叶堆里分离筛选的,平文祥等^[8]从糖厂弃渣糖、木材厂木垛下、农园烂树叶堆下和农田的土壤中取样,通过微生物在培养基上所出的微生物菌落周围水解圈的直径和菌落直径的比值大小作为初步判断纤维素分解能力的指标,进一步分离纯化,得到了纤维素酶高产菌株;也有直接从垃圾堆肥中分离筛选的,王晓芳等^[9]以新华滤纸为唯一碳源,从垃圾堆肥中筛选能够分解纤维素的菌株,采用刚果红鉴

别培养基进行识别,并进一步进行液体培养,测定酶活,得到一株酶活较高的曲霉 B-6 (*Aspergillus sp.*)。总之,纤维素分解菌的筛选途径多样,来源广泛。

2.2 微生物的混合培养在堆肥中的应用

微生物与生物环境之间的关系有多种,人们较多的是从微生物之间的互生和共生关系入手来对微生物的混合培养及其应用进行研究。

2.2.1 通过互生关系对微生物混合培养及其应用的研究 所谓互生是指两种可以单独生活的生物,当它们生活在一起时,通过各自的代谢活动而有利于对方,或偏利于一方的一种生活方式。因此,这是一种“可分可合,合比分好”的相互关系。在微生物之间,尤其在土壤微生物间互生现象是及其普遍的。例如,当好氧性自生固氮菌与纤维素分解细菌生活在一起时,后者因分解纤维素产生的有机酸可供前者用于固氮,而前者所固定的有机氮化物则可满足后者对氮素养料的需要。蒲一涛等^[10]就是利用这个原理通过对筛选的自生固氮菌和纤维素分解菌进行混合培养发现:自生固氮菌和纤维素分解菌可混合培养,自生固氮菌利用纤维素分解菌分解纤维产生的葡萄糖作为碳源,纤维素分解菌利用固氮菌固定的氮作为氮源,两者相互利用、相互依存,进行生长和繁殖,两者混合培养的菌数和发酵液总含氮量明显高于各自单独培养;自生固氮菌和纤维素分解菌的混合菌液作用于生活垃圾,可大大提高生活垃圾的降解速度,同时其降解物的含氮量也有明显提高。

2.2.2 通过共生关系对混合培养的研究 所谓共生是指两种生物共居在一起,相互分工协作,相依为命,甚至达到难分难解、合二为一的一种相互关系。Murray 对 *Bacteroides cellulosolvens* 和 *Clostridium saccharolyticum* 混合培养分解纤维素进行研究发现:前者分解纤维素为后者提供生长所需碳源,后者又可利用前者产生的有毒中间产物,消除对前者分解纤维素的反馈抑制。Mori 认为, *Clostridium Thermohydrosulfurium* YM3 和 *C. thermocellum* YM4 混合培养降解纤维素效果明显高于单菌培养,主要原因是两菌互相提供了对方所需的生长因子。

另外,优良菌株的混合培养会增加其对纤维素的降解能力^[11],有目的地构建稳定的复合菌系将是环境微生物应用上的另一条有效的途径^[12]。

3 提高微生物降解纤维素的途径

纤维素类物质在有机废弃物中占有的比重较大,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大多数微生物直接作为碳源物质而转化利用。因此,堆肥物料中存在的纤维素类物质是影响好氧堆肥进程的一个重要制约因素。

3.1 纤维素降解酶的分泌与活力

大量的研究认为,纤维素的降解是多种酶协同作用的结果。因此,提高微生物对纤维素分解酶的活性是加快纤维素的重要途径之一。目前,人们研究得比较多的是分解木质纤维素较强的白腐菌,通过研究发现白腐菌降解木质素的能力主要取决于木素过氧化物酶、锰过氧化物酶、漆酶等活力的高低^[13]。

3.1.1 碳、氮源对酶分泌及酶活的影响 微生物的生长需要合适的碳氮比,但不同的碳、氮源会影响微生物酶的分泌。桑希斌等^[14]研究了不同碳源、氮源对采绒革盖菌锰过氧化物酶分泌的影响及锰过氧化物酶的部分特性,结果显示:以淀粉作碳源,以大豆粉作氮源有利于锰过氧化物酶的分泌;以淀粉、麸皮或麦芽糖为碳源,玉米粉或大豆粉为氮源,可以提高锰过氧化物酶的活力。浦跃武等^[15]在对白腐菌 *Phanerochaete chrysosporium* MIC383 产锰过氧化物酶条件的研究中发现:葡萄糖为最佳碳源,并进一步指出高碳低氮培养基有利于酶的合成,高浓度氮对酶的合成有抑制作用,酒石酸铵 2mmol/l 葡萄糖 10g/l 的碳氮配比产酶活最高。Kahraman 等^[16]认为,轧棉残余物能刺激白腐菌产生漆酶。

3.1.2 其它环境因素对酶分泌及酶活的影响 除了碳、氮源对酶的分泌及活力有较大影响之外,环境温度、pH 值等也影响着酶的分泌及活力。桑希斌等^[14]研究发现,锰过氧化物酶最适 pH 值为 4.0, 20 ~ 40 °C 时酶活均较高,最适温度 30 °C; Mg^{2+} 、 Mn^{2+} (均为 1.5 mg/ml) 对其有激活作用, Ag^{+} 、 Cl^{-} 能明显抑制酶活性。王宜磊等^[17]测定了采绒革盖菌在 PDY 液体培养基中的多酚氧化酶活性特性,即:酶作用的最

适酸碱度为 pH5.0,最适作用温度 30 ℃; Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子对多酚氧化酶有激活作用, Ag^+ 、 Fe^{3+} 等离子对酶活有明显的抑制作用。浦跃武等^[15]认为,锰过氧化物酶在 37 ℃时酶活达最高,温度过高(大于 40 ℃)不利于产酶,pH 值为 4.5 时酶活最高,吐温 80 浓度为 0.10% 对产酶较有利,在 $[Mn^{2+}] \leq 10 \mu g/L$ 条件下,锰过氧化物酶的活力随 Mn^{2+} 的浓度增加而提高,当锰浓度超过 10 $\mu g/L$ 以后,产酶则受到抑制。M. J. Lopez 等人发现^[18],在白腐菌对木质纤维素进行生物转化过程中,通气速率对木质素酶的生成是一个非常重要的影响因素。

总之,在堆肥过程中,纤维素类物质的去除效率随不同的堆肥物料而有所不同,良好的培养条件,包括适当的物料配比、水分、通气量和温度都有助于提高微生物的活性,从而加速堆体中纤维素类物质的降解。

3.2 Fenton's 试剂(H_2O_2/Fe^{2+})与纤维素的降解

自 Halliwell(1965)提出 Fenton's 试剂(H_2O_2/Fe^{2+})产生的羟基自由基 OH^\cdot ($H_2O_2 + Fe^{2+} = Fe^{3+} + OH^- + OH^\cdot$) 具有极强的纤维素降解能力^[19]后,人们就推测 OH^\cdot 氧化机制可能是褐腐菌在纤维素降解初期的一个重要机制^[20]。王蔚等^[21]利用褐腐菌在滤纸上进行固体培养时,在培养初期,纤维素的聚合度均呈现大幅度下降,但不表现失重,其主要原因是 OH^\cdot 可使纤维素氧化断裂,使之成为短小纤维从而大幅度降低聚合度。方靖等^[22]研究发现,裂褶菌纤维二糖脱氢酶(cellobiose dehydrogenase, CDH) 可以提高纤维素酶对纤维素的降解。其机理是:纤维素酶水解纤维素生成纤维二糖,以纤维二糖为电子供体,CDH 还原 Fe^{3+} 和 H_2O_2 最终生成具有强氧化性的 OH^\cdot , OH^\cdot 可以发生夺取氢原子、羟基化等反应,可使糖、蛋白质、核酸及脂类发生氧化受到破坏, OH^\cdot 氧化碳水化合物,使原来的羟基被氧化生成羰基,这样,靠羰基形成的氢键就会消失,键间作用力因此变小而使结构变得松散,从而使纤维素的结晶区趋向于无定型化,进一步的反应会导致纤维素的超分子发生断裂,这可能是 CDH 作用于纤维素生成短小纤维的原因;因此,CDH 可以促使纤维素酶对纤维素的降解。但是,由于 OH^\cdot 是强氧化剂,不仅可以破坏纤维素,同样也可使酶失活。因此,当的加量过多、溶液中纤维二糖浓度较大时,就会生成超过生理需要的 OH^\cdot , 引起酶的失活,从而使得纤维素的降解下降。由此可见,纤维素的降解过程中并非 CDH 的量越多越好。

此外,许多简单金属元素和一些稀有金属以及一些非金属元素对微生物的代谢有着重要的影响,一些碱性金属元素像 Ca 和 Mg 既是组成微生物体结构的重要成分,又对微生物的代谢起着一定的催化作用,一些金属元素比如 V、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、Mo、和 W 以及非金属元素 Se 在微生物的代谢中都起到一定的催化作用^[23]。

4 微生物制剂在堆肥化中的应用

近年来,微生物学家已开始将从自然界中分离得到的多种微生物接种到有机堆肥中,强化其中的物质转化和能量传递,并收到了良好的处理效果。幕永红等^[24]研究发现,复合微生物菌剂主要利用纤维素类物质的果胶质,促进农作物秸秆和残茬的腐熟。日本能源会社微生物研究所研制的富含光合细菌、放线菌、酵母菌和乳酸菌等多种微生物的复合微生物制剂,能够分解纤维素和半纤维素。黄得扬等^[25]以自己实验室筛选、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,在蔬菜-花卉秸秆联合好氧堆肥中的一次发酵初始阶段,以体积分数 0.5% 的接种量向堆肥中接种上述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;在二次发酵初始阶段,以体积分数 1% 的接种量接种,可提高二次发酵阶段堆温的回升。而且接种复合接种剂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%。顾希贤等^[26]从堆肥、畜粪、土壤等 22 个样品中,分离得到纤维素分解菌 198 株,选其中 2 株生长快、粗纤维分解能力强的菌株制成菌剂,以 0.05% ~ 0.1% 的接种量加入到二次发酵垃圾堆肥中,结果显示,接菌堆肥比不接菌堆肥升温快且高,高温维持时间长,真菌和纤维素分解菌数量增多,腐殖质含量提高 21% ~ 26%。

5 微生物在堆肥化中应用的展望

随着人们意识到大量使用无机化肥对土壤的危害程度增加,用堆肥和其它无机化肥组成的复合肥

料越来越受人们欢迎,而对有机废物进行堆肥化处理是通过微生物将有机废物转变成可再利用的肥料。目前,利用微生物制剂在农业废物、生活厨余和食品工业废物堆肥化中的应用已有报道,但作为城市生活垃圾主要组成部分的园林废物(包括草屑、残叶、树木与灌木剪枝以及少量的砂土等),由于其在填埋场中占据很大的体积,故越来越多的国家和地区开始禁止用填埋的方法来处理园林废物,而对其进行焚烧处理又是对资源的一种浪费,因此,提倡对其进行堆肥化处理,以制成堆肥应用于苗圃、园林绿化和农业生产。园林废物的主要成分为木质纤维素,自然界中,木质纤维素的降解是多种微生物联合作用的结果,而目前人们对此类微生物的研究还局限在单一种属的实验上,所以开发和研制新型高效的复合微生物制剂,来加速好氧堆肥过程中木质纤维素的降解,将其制成高效的有机复混肥亟待解决的、符合可持续发展的新途径。

参考文献:

- [1] 杨国清. 固体废物处理工程[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] Abdennaceur Hassen, Kaouala Belguith, Naceur Jedidi. Microbial characterization during composting of municipal solid waste[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 80: 217 - 225.
- [3] 李国学, 张福锁. 固体废物堆肥化与有机复混肥生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [4] Waksman S. A., Cordon T. C., Hulpoi N. Influence of temperature upon the microbiological population and decomposition processes in composts of stable manure[J]. *Soil Sci.*, 1939b, 47: 83 - 114.
- [5] 陈世和, 张所明. 城市生活垃圾堆肥处理的微生物特性研究[J]. *上海环境科学*, 1989, 8(8): 17 - 20.
- [6] 冯树, 周樱桥. 微生物混合培养及其应用[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(3): 92 - 95.
- [7] 许修宏, 肖玉珍. 高效纤维素分解菌分离筛选的研究[J]. *东北农业大学学报*, 1998, 29(4): 330 - 333.
- [8] 平文祥, 孙剑秋. 纤维素酶产生菌的分离及其不同生境纤维素分解菌数量的对比研究[J]. *齐齐哈尔师范学院学报(自然科学版)*, 1997, 14(4): 59 - 61.
- [9] 王晓芳, 徐旭士. 一株纤维素分解菌的分离与筛选[J]. *生物技术*, 2001, 11(2): 27 - 30.
- [10] 蒲一涛, 钟毅沪. 固氮菌和纤维素分解菌的混合培养及其对生活垃圾降解的影响[J]. *环境科学与技术*. 1999, (1): 15 - 17.
- [11] 宋颖琦, 刘睿倩. 纤维素降解菌的筛选及其降解特性的研究[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2002, 34(2): 197 - 200.
- [12] 崔宗均, 李美丹. 一组高效稳定纤维素分解菌复合系 MC1 的筛选及功能[J]. *环境科学*, 2002, 23(3): 36 - 39.
- [13] 王宜磊, 孙迅. 木素生物降解研究进展[J]. *微生物学杂志*, 1998, 18(1): 48 - 51.
- [14] 桑希斌, 王宜磊. 采绒革盖菌锰过氧化物酶的诱导及部分特性研究[J]. *山东师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 17(2): 76 - 78.
- [15] 浦跃武, 甄浩铭等. 白腐菌产锰过氧化物酶条件的研究[J]. *菌物系统*, 1998, 17(3): 251 - 255.
- [16] Sibel S. Kahraman, Ismail H. Gurdal. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi[J]. *Bioresource Technology*, 2002, (82): 215 - 217.
- [17] 王宜磊, 赵良田. 采绒革盖菌多酚氧化酶活性研究[J]. *植物学通报*, 1999, 16(4): 454 - 456.
- [18] M. J. Lopez, M. A. Elorreta, et al. The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white - rot fungi[J]. *Bioresource Technology*, 81(2002): 123 - 129.
- [19] Halliwell G. Catalytic Decomposition of Cellulose under Biological Conditions[J]. *Biochem.* 1965, 95: 35 - 40.
- [20] 王蔚, 段新源等. 褐腐真菌产生的羟基自由基 HO· 对纤维素作用的研究[J]. *菌物系统*, 2002, 21(3): 400 - 405.
- [21] 王蔚, 卢雪梅等. 褐腐真菌产生的低分子化合物对纤维素的解聚作用研究[J]. *菌物系统*, 1997, 16(1): 40 - 46.
- [22] 方靖, 高培基. 纤维二糖脱氢酶在纤维素降解中的作用研究[J]. *微生物学通报*, 2000, 27(1): 15 - 18.
- [23] H. L. Ehrlich. *Microbes and metals*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, (48): 687 - 692.
- [24] 幕永红等. 生物菌剂在寒地水稻秸秆还田上的应用[J]. *垦殖与稻作*, 1999, 1(3): 31 - 32.
- [25] 黄得扬, 陆文静等. 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[J]. *环境科学*, 2004, 25(2): 145 - 150.
- [26] 顾希贤, 许月蓉. 垃圾堆肥微生物接种实验[J]. *应用与环境生物学报*, 1995, 1(3): 274 - 278.