

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (9) :1117 - 1125; 4 September 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20140576

病死猪堆肥高温降解菌的筛选、鉴定及堆肥效果

李海龙¹, 李吕木^{1*}, 钱坤^{2*}, 许发芝¹

¹安徽农业大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230036

²安徽省畜牧生物工程技术有限公司, 安徽 合肥 230031

摘要: 【目的】为分离得到高温高效降解菌, 加快病死猪的降解。【方法】本研究通过稀释平板法和选择培养基初筛及酶活性复筛的方法, 从锯末和病死猪(粉碎)好氧堆肥样品中筛选获得两株能分别高效降解蛋白质和脂肪的高温菌株 N-3 和 Y-3。通过 16S rDNA 对两菌株进行鉴定, 并采用 $L_0(3^4)$ 正交设计对菌株培养条件进行优化。再利用 10 L 全自动发酵罐按优化后的培养条件对两菌进行发酵生产(菌数达到 10^8 CFU/mL) 并等体积混合制备成液体菌剂, 分别按发酵物料湿重的 0%、0.3%、0.6%、0.9% 接种至锯末 + 病死猪(粉碎)堆肥中进行堆肥效果验证。【结果】共分离得到两株高效降解菌, N-3 为芽孢杆菌(*Bacillus aestuarii*), 可高效降解蛋白质, 其最适生长温度 55 °C, pH 为 7.2, 转速 200 r/min, 通气量 4 L/min; Y-3 为嗜热脱氮芽孢杆菌(*Geobacillus thermodenitrificans*), 能高效降解脂肪, 其最适生长温度 60 °C, pH 为 7.2, 转速 300 r/min, 通气量 3 L/min。堆肥过程中对照组和接菌各组(0.3%、0.6%、0.9%) 最高温度分别为 58.3、69.0、68.9、66.3 °C, 各接菌组间无显著差异($P>0.05$), 但均极显著高于对照组($P<0.01$), 且各接菌组堆肥温度达到 60 °C 以上天数分别为 8、10、9 d, 极显著高于对照组的 0 d($P<0.01$)。至堆肥结束时, 对照组和接菌各组的病死猪降解率分别为 71.2%、75.7%、96.7%、97.1%。接菌各组(0.3% 接菌组除外) 病死猪降解率均极显著高于对照组($P<0.01$), 0.3% 接菌组与对照组间无显著差异($P>0.05$)。【结论】筛选获得的高温腐熟菌 N-3 和 Y-3 为能高效降解蛋白质和脂肪的高温菌株, 可以用于病死猪腐熟堆肥, 且两菌等体积混合后按 0.6% 添加量接种至病死猪堆肥中, 能提高堆肥温度, 维持高温时间, 加快病死猪的降解, 从而有效杀灭病原微生物, 达到无害化要求。

关键词: 病死猪, 高温降解菌, 筛选, 鉴定, 堆肥效果

中图分类号: X172 **文章编号:** 0001-6209(2015)09-1117-09

近年来, 随着规模化和集约化养殖业的发展, 至 2013 年我国生猪存栏 4.55 亿头、出栏 6.75 亿头, 其中母猪的存栏量达 5000 万头, 且有相关人士指出, 未来中国养猪行业仍有十年的黄金发展周

期^[1-2]。然而, 在规模化和集约化养殖过程中日常死亡或因疫情爆发导致的死亡是不可避免的。据调查, 我国畜禽传染病有 200 多种, 每年因各类疾病引起猪的死亡率在 8% - 12%^[3]。在部分地区, 畜禽

基金项目: 安徽省生猪产业现代农业生产发展项目(生猪 02-5)

* 通信作者。E-mail: 李吕木, llm56@ahau.edu.cn; 钱坤, qiankun581@126.com

作者简介: 李海龙(1985 -), 男, 河南周口人, 硕士研究生, 主要从事微生物学研究。E-mail: 874410333@qq.com

收稿日期: 2014-12-03; **修回日期:** 2015-03-11

因病死亡后尸体被填埋的比例不足 20%，能够进行无害化处理的比例更小^[4]。死畜禽携带大量的病原微生物，不仅污染环境，对人类及畜牧业的健康发展也存在非常严重的危害，如果不能及时有效处理，还可能会引发更大规模的疫情发生。2013 年发生在上海黄浦江上游的病死猪漂浮事件及在长江流域多次出现的病死猪污染问题再次提醒我们病死猪无害化处理的必要性和紧迫性。可见，如何无害化处理如此大量的病死猪，是目前养猪业亟需解决的问题。目前，较传统的染疫动物处理方法：掩埋、焚烧、化制等都存在一定的环境安全隐患或经济成本弊端^[5]。深埋法虽具有处理速度快、花费小等优点，但可能会造成地下水和土壤污染，且该方法处理周期长，在高速发展的现代社会不易找到适宜的深埋场地；焚烧法对动物尸体处理彻底，通过高温彻底消灭了病原微生物，有效地确保了生物安全性，但会带来空气污染，而且需要大量燃料，费用较高；化制也同样存在费用高的缺点。因而，堆肥法因其既生物安全又环保经济的特点，将是处理病死畜禽的一条新途径。国内外研究表明，通过对病死畜禽进行堆肥处理可以很好的分解畜禽残体，且堆肥过程中温度能达到 60 ℃ 以上，能有效杀死病原微生物实现无害化，是一种低成本的死畜禽处理方法^[6-8]。对死畜禽进行堆肥处理，还能在畜禽尸体降解的同时提高肥料品质^[9]。此外，目前的堆肥菌剂主要是针对畜禽粪便和城市生活垃圾等方面^[10-12]。而菌剂在畜禽尸体堆肥方面的应用还少有报道^[13]。由于畜禽尸体堆肥在各种理化性质上与其它种类的堆肥不同，因而找到一种能够促进畜禽尸体堆肥的微生物菌剂将有助于推广堆肥法在处理畜禽尸体方面的应用。因此本研究对可以加快尸体降解的高温菌株进行了筛选，并对其在病死猪堆肥中的效果进行了验证。

1 材料和方法

1.1 试验设备

筛菌试验主要设备包括：DNP-9162-1A 电热恒温培养箱、立式压力蒸汽灭菌器、超净工作台等。堆肥试验主要装置为直径 35 cm，高 50 cm 的塑料桶，分别在 10、25、35 cm 高度处均匀打 10 个直径 2 cm 的孔，呈 3×10 布置。长×宽×高为 1.2 m×1.2 m×1.2 m

的试验池、竹靶、石棉瓦、尼龙袋（15 cm×10 cm，40 目）及尼龙绳。斯瑞德 TS5515 动物尸体破碎机，主轴转速 27 r/min。

1.2 材料

菌种分离材料为锯末和病死猪（粉碎）好氧堆肥第 10 d 样品。

1.3 培养基

1.3.1 牛肉膏蛋白胨液体培养基 (g/L)：牛肉膏 3，蛋白胨 10，氯化钠 5，蒸馏水 1 L，pH7.2-7.4；牛肉膏蛋白胨固体培养基：在液体培养基的基础上加入 2% 的琼脂；油脂培养基 (g/L)：蛋白胨 10，牛肉膏 3，氯化钠 5，花生油 10，1.6% 中性红水溶液 1 mL，蒸馏水 1 L，琼脂 2%，pH7.0-7.2。

1.3.2 酪蛋白分离培养基 (g/L)：蛋白胨 10.0，葡萄糖 1.0，氯化钙 0.1，酪氨酸 0.1，氯化钠 5.0，酪蛋白 5.0，琼脂 20.0，蒸馏水 1 L，pH7.0-7.2；产脂肪酶培养基 (g/L)：蛋白胨 20，蔗糖 5，(NH₄)₂SO₄ 1，K₂HPO₄ 1，MgSO₄·7H₂O 0.5，花生油 20 mL，蒸馏水 1 L；产蛋白酶培养基 (g/L)：葡萄糖 10，酵母粉 20，NaCl 5，K₂HPO₄ 1.0，MgSO₄ 0.4，蒸馏水 1 L，pH7.0-7.2。

1.4 高温菌株的筛选

1.4.1 采样及菌株的初筛：采用四点取样法取锯末和病死猪（粉碎）好氧堆肥样品。采用稀释涂布涂平板法取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 梯度涂布于相应的分离培养基上，每个梯度 3 个重复，置于 60 ℃ 培养箱内培养，挑取生长较大、较多的菌株采用平板划线法进行分离纯化，于 4 ℃ 冰箱内保存备用^[14-15]。

1.4.2 复筛：将初筛得到的菌株分别接入相应的 100 mL 灭菌产酶培养基中，60 ℃ 静置培养 72 h 后取菌液 6000×g 离心 10 min，得到粗酶液。脂肪酶采用橄榄油浮化法^[16]，蛋白酶采用福林酚法^[17]测定各自酶活。选择酶活性高的菌株送生工生物工程（上海）股份有限公司进行 16S rDNA 鉴定，用 NCBI 中的 BLAST 软件在线分析菌株 N-3 和 Y-3 的 16S rDNA 序列，并与 GenBank 数据库中不同菌株的 16S rDNA 序列进行同源性比较，用 MEGA 4.0 软件绘制 N-J 系统进化树。

1.4.3 菌种培养条件优化：采用 L₉(3⁴) 正交试验方法（表 1），利用 10 L 全自动发酵罐对优选菌株的温度、pH、转速及通气量进行优化，培养时间为 24 h，以细菌数目为指标确定培养条件的最佳组合，

并进行验证试验, 得出菌株最优的培养条件组合。

表 1. 正交试验因素水平表
Table 1. Orthogonal factors table

Level	T/℃	pH	Rotate speed r/min	Throughput/(L/min)
1	55	6.5	100	3
2	60	7.2	200	4
3	65	8.0	300	5

1.5 病死猪堆肥试验

1.5.1 堆肥原料: 堆肥物料为锯末及病死猪, 两者均由安徽省凤阳县某猪场提供, 试验前对病死猪进行粉碎并称量, 锯末及粉碎后病死猪的全碳含量分别是 52.1% 和 57.6%、总氮含量分别为 0.12% 和 11.2%、含水率分别为 10.0% 和 73.4%。

1.5.2 堆肥菌剂的制备: 利用 10 L 全自动发酵罐按优化后的培养条件对上述筛选到的两菌株进行发酵生产, 菌液浓度达到 10^8 CFU/mL。将生产后的两种菌液等体积混合即制备成液体微生物菌剂。

1.5.3 堆肥方案: 病死猪堆肥在安徽省凤阳县某猪场的粪污处理场进行, 采用单因素 4 水平 3 重复设计, 在塑料桶内进行堆肥。对照组、试验 1 组、试验 2 组和试验 3 组微生物菌剂添加量分别为混合物料湿重的 0%、0.3%、0.6%、0.9%。按病死猪 (粉碎) 和锯末 1:1 的比例混合均匀, 调节含水率 60% 左右, 每个重复 30 kg。另外称取 300 g 粉碎后的猪肉装入尼龙袋内并编号, 每个重复 4 袋, 用于猪肉降解率的测定。然后将混合均匀的物料装入桶内, 并在填装过程中将带肉的尼龙袋随机放入桶中。最后将塑料桶放置在长 × 宽 × 高为 1.2 m × 1.2 m × 1.2 m 的试验池内, 桶四周和底部填充小麦秸秆进行保温, 顶部用石棉瓦覆盖。

每 5 d 人工倒桶翻堆一次, 并随机取出一个装肉的尼龙袋, 测定袋内剩余猪肉的质量。每天上午 9:00 和下午 15:00 测量环境温度和桶内温度并记录, 取平均值作为当天温度值。

1.6 死猪降解率计算

按以下公式 (1) 计算病死猪的降解率 (Q)。

$$Q = M_0(1 - N_0) - M(1 - N) - M_0(1 - N_0) \times 100\%$$

公式 (1)

式中, M_0 : 装袋时猪肉的重量 (kg); N_0 : 装袋时猪肉的含水率; M : 提取尼龙袋时剩余猪肉的重量 (kg); N : 提取尼龙袋时剩余猪肉的含水率。

1.7 数据统计与分析

采用 Microsoft Excel 软件对数据进行整理, 采用 SAS 9.1 软件中的 ANOVA 语句进行方差分析, 并用邓肯新复极差法进行显著性多重比较。

2 结果和分析

2.1 高温降解菌筛选

试验共得到 20 株细菌 (表 2), 其中 N-1 到 N-10 为产蛋白酶菌, Y-1 到 Y-10 为产脂肪酶菌。从表 2 中可以看出, N-3 蛋白酶活性最高, 达到 2.68 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$; Y-3 脂肪酶活性最高, 达到 7.40 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$ 。说明两者分别具有较高的降解蛋白质和脂肪的能力, 故选择这两株菌进行后续研究。

表 2. 酶活性测定结果

Table 2. The results of enzyme activity

Strains	Proteinase activity / $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$	Strains	Lipase activity / $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$
N-1	1.44	Y-1	-
N-2	0.28	Y-2	-
N-3	2.68	Y-3	7.40
N-4	1.16	Y-4	5.15
N-5	1.60	Y-5	1.42
N-6	1.64	Y-6	0.45
N-7	0.96	Y-7	0.60
N-8	-	Y-8	0.20
N-9	0.84	Y-9	0.10
N-10	0.60	Y-10	0.35

- : Have no activity.

2.2 菌种鉴定

经鉴定, 菌株 N-3 的 16S rDNA 基因全序列总长 1450 bp 与芽孢杆菌属的多个菌株具有同源性, 与 *Bacillus aestuarii* JP1 的同源性达到 99.5%, 说明菌株 N-3 为芽孢杆菌 (*Bacillus aestuarii*)。挑选同源性高的菌株及同属其它种的菌株构建系统发育树 (图 1)。菌株 Y-3 的 16S rDNA 基因全序列总长 1463 bp, 与 *Geobacillus* 属的多个菌株具有同源性, 与 *Geobacillus* sp. SY-9 同源性为 99.2%, 说明菌株 Y-3 为嗜热脱氮芽孢杆菌 (*Geobacillus thermodenitrificans*)。挑选同源性较高的菌株及同属其它种的菌株构建系统发育树 (图 2)。

2.3 培养条件优化

2.3.1 Y-3 培养条件优化: 菌数的极差分析结果 (表 3) 表明 RA > RC > RB > RD, 对菌数影响最大的是培养温度, 其次是转速, 然后是 pH 和通气量。方

差分析结果(表4)表明,培养温度、转速、通气量和 pH 值对菌数的影响均达到了极显著水平($P < 0.01$),通过 Duncan 多重比较(表4)进一步确定每种因素各水平间的显著性,得出最优组合为 $A_2B_2C_3D_1$,即培养温度 $60\text{ }^\circ\text{C}$, pH7.2, 搅拌转速 300 r/min , 通气量 3 L/min 。

2.3.2 N-3 培养条件优化:菌数的极差分析结果(表5)表明 $RA > RC > RD > RB$,对菌数影响最大的是培养温度,其次是转速,然后是通气量和 pH。方差分析结果(表6)表明,培养温度、转速、通气量和 pH 值对菌数的影响均达到了极显著水平($P < 0.01$),通过 Duncan 多重比较(表6)进一步确定每种因素各水平间的显著性,得出最优组合为 $A_1B_2C_2D_2$,即培养温度 $55\text{ }^\circ\text{C}$, pH7.2, 搅拌转速 200 r/min , 通气量 4 L/min 。

2.4 腐熟堆肥

2.4.1 温度的变化:堆肥过程中微生物的生长代谢与堆肥温度密切相关,整个堆肥过程中各组温度的变化如图3所示。从图中可以看出,整个堆肥过程堆体温度经历了上升、维持而后下降的过程。在第6、11和16天时则是因为翻堆而造成一定幅度的下降。伴随着高温期的维持以及有机物的消耗,微生物代谢也减弱,热产量逐渐减少,对照组和接菌各组的温度分别在第14天和第16天时降到 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 以下,进而继续下降至 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 左右。此外,堆肥过程中对照组和接菌各组最高温度分别为 58.3 、 69.0 、 68.9 、 $66.3\text{ }^\circ\text{C}$,各接菌组间无显著差异($P > 0.05$),但均极显著高于对照组($P < 0.01$),且各接菌组堆肥温度达到 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 以上天数分别为 8、10、9 天,极显著高于对照组的 0 天($P < 0.01$)。

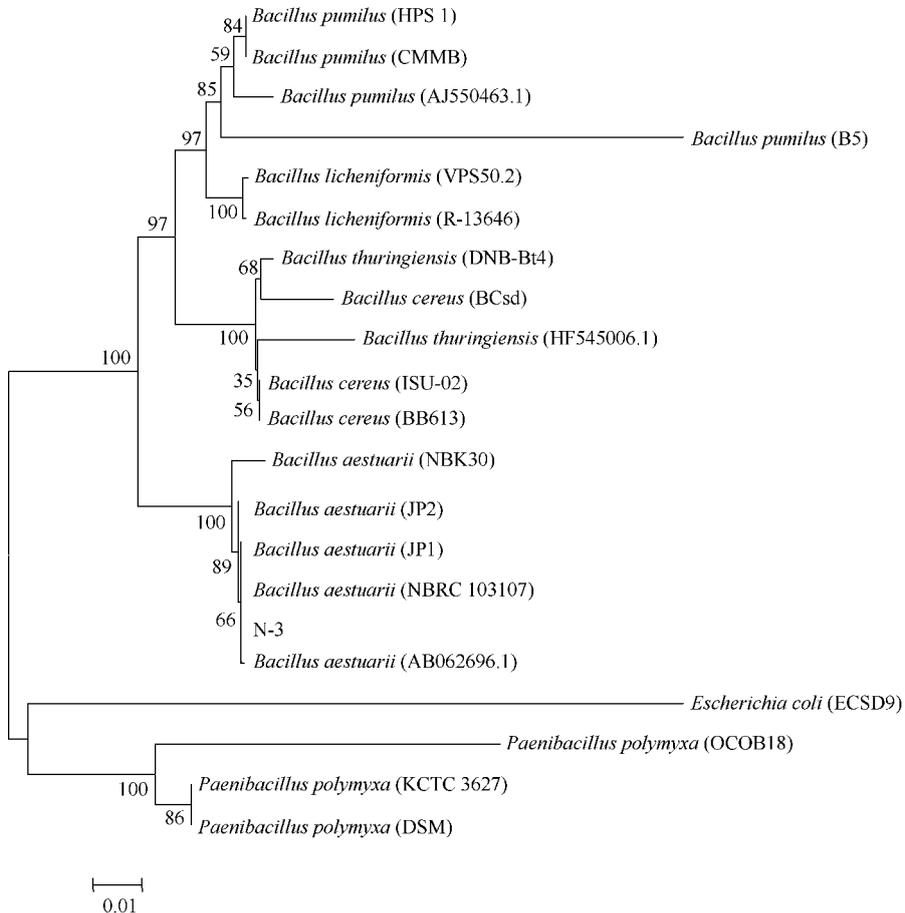


图 1. N-3 系统发育树

Figure 1. The phylogenetic tree of N-3 and related strains. The tree rooted was constructed by Neighbor-Joining method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node that indicated the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets after each bacterial name are 16S rRNA gene sequence accession numbers in GenBank (0.01 mean 1% differences between two sequences).

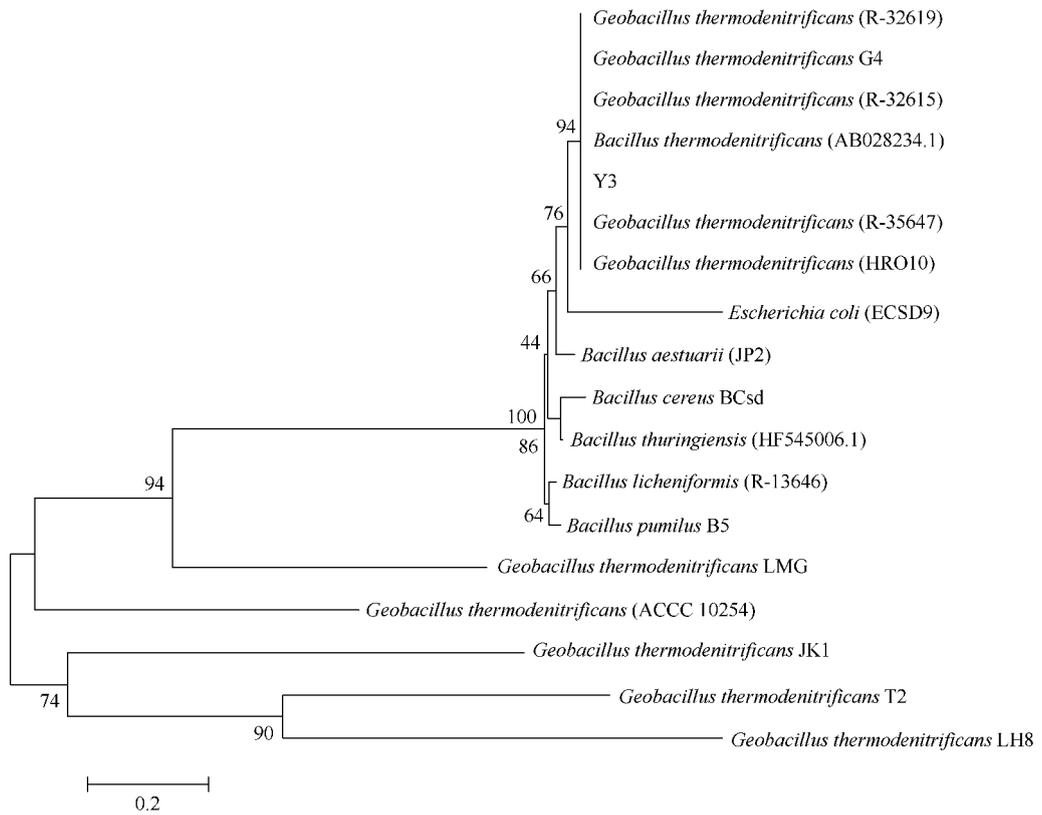


图 2. Y-3 系统发育树

Figure 2. The phylogenetic tree of Y-3 and related strains. The tree rooted was constructed by Neighbor-Joining method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node that indicated the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets after each bacterial name are 16S rRNA gene sequence accession numbers in GenBank (0.2 mean 20% differences between two sequences).

表 3. 正交试验结果与分析

Table 3. Results and analysis of orthogonal test

No.	A (°C)	B (pH)	C (r/min)	D (L/min)	(x) (* 10 ⁸ CFU/mL)
1	1 (55)	1 (6.5)	1 (100)	1 (3)	1.47 ± 0.31
2	1	2 (7.2)	2 (200)	2 (4)	2.27 ± 0.21
3	1	3 (8.0)	3 (300)	3 (5)	2.97 ± 0.49
4	2 (60)	1	2	3	2.07 ± 0.21
5	2	2	3	1	6.53 ± 0.81
6	2	3	1	2	3.50 ± 1.10
7	3 (65)	1	3	2	2.10 ± 0.36
8	3	2	1	3	0.87 ± 0.15
9	3	3	2	1	1.70 ± 0.30
K ₁	2.24 × 10 ⁸	1.88 × 10 ⁸	1.95 × 10 ⁸	3.23 × 10 ⁸	
K ₂	4.03 × 10 ⁸	3.22 × 10 ⁸	2.01 × 10 ⁸	2.62 × 10 ⁸	
K ₃	1.56 × 10 ⁸	2.72 × 10 ⁸	3.87 × 10 ⁸	1.97 × 10 ⁸	
R	2.48 × 10 ⁸	1.34 × 10 ⁸	1.92 × 10 ⁸	1.26 × 10 ⁸	

K: the average of bacterial count; R: the range of bacterial count.

表 4. Duncan 多重比较结果

Table 4. Results of Duncan multiple comparison

Source of variation	Significance	Level		
		1	2	3
$T/^{\circ}\text{C}$	* *	2.23 ^b	4.03 ^a	1.58 ^c
pH	* *	1.90 ^b	3.22 ^a	2.72 ^a
rotate speed (r/min)	* *	1.94 ^b	2.01 ^b	3.89 ^a
throughput (L/min)	* *	3.23 ^a	2.64 ^b	1.97 ^c

* * means the significance level at 1% ($P < 0.01$), the letters represent the significance level at 5% ($P < 0.05$).

表 5. 正交试验结果与分析

Table 5. Results and analysis of orthogonal test

No.	A ($^{\circ}\text{C}$)	B (pH)	C (r/min)	D (L/min)	(\bar{x}) ($\times 10^8$ CFU/mL)
1	1 (55)	1 (6.5)	1 (100)	1 (3)	2.93 \pm 0.60
2	1	2 (7.2)	2 (200)	2 (4)	5.87 \pm 0.59
3	1	3 (8.0)	3 (300)	3 (5)	4.67 \pm 0.49
4	2 (60)	1	2	3	1.97 \pm 0.47
5	2	2	3	1	1.20 \pm 0.44
6	2	3	1	2	0.87 \pm 0.12
7	3 (65)	1	3	2	1.00 \pm 0.10
8	3	2	1	3	1.17 \pm 0.15
9	3	3	2	1	0.67 \pm 0.21
K_1	4.49×10^8	1.97×10^8	1.66×10^8	1.60×10^8	
K_2	1.35×10^8	2.75×10^8	2.84×10^8	2.58×10^8	
K_3	0.95×10^8	2.07×10^8	2.29×10^8	2.60×10^8	
R	3.54×10^8	0.78×10^8	1.18×10^8	1.00×10^8	

K : the average of bacterial count; R : the range of bacterial count.

表 6. Duncan 多重比较结果

Table 6. Results of Duncan multiple comparison

Source of variation	Significance	Level		
		1	2	3
$T/^{\circ}\text{C}$	* *	4.49 ^a	1.34 ^b	0.94 ^b
pH	* *	1.97 ^b	2.74 ^a	2.07 ^b
rotate speed (r/min)	* *	1.66 ^b	2.83 ^a	2.28 ^a
throughput (L/min)	* *	1.60 ^b	2.58 ^a	2.60 ^a

* * means the significance level at 1% ($P < 0.01$), the letters represent the significance level at 5% ($P < 0.05$).

2.4.2 堆肥过程中病死猪降解率的变化: 堆肥过程中各组病死猪降解率如图 4 所示,随着堆肥时间的变化,各组降解率不断增加。至堆肥结束时,对照组和接菌各组的降解率分别为 71.2%、75.7%、96.7% 和 97.1%。接菌各组 (0.3% 接菌组除外) 的降解率均极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 0.3% 接菌组与对照组间无显著差异 ($P > 0.05$)。接菌各组中, 0.6% 接菌量组和 0.9% 接菌量组间无显著差异 ($P > 0.05$), 但均极显著高于 0.3% 接菌量组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

目前的堆肥菌剂尤其高温降解菌在畜禽粪便和城市生活垃圾等堆肥中已经得到广泛应用,且大量研究证明在堆肥中接种高温菌剂可提高堆温,促进堆肥腐熟,而关于高温降解菌在畜禽尸体堆肥方面的应用研究还较少,且对 *Bacillus aestuarii* 和 *Geobacillus thermodenitrificans* 两菌在堆肥方面的研

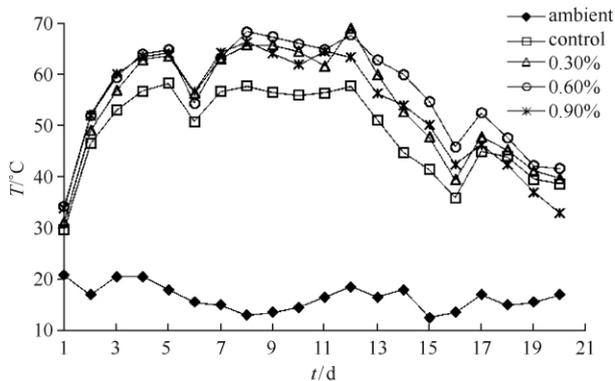


图 3. 堆肥过程中堆料的温度变化

Figure 3. Changes of the temperature of composted material during composting.

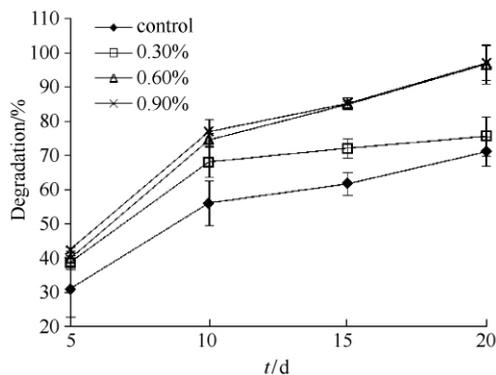


图 4. 堆肥过程中降解率变化

Figure 4. Degradation rate changes in the compost process.

究也尚未见报道。因此有必要对两菌在堆肥生产上进行小规模试验, 确定其最佳参数, 从而更好地在生产中推广。

堆肥的温度变化是反应发酵是否正常最直接、最敏感的指标, 也是生物能量积累的重要标志。根据我国无害化卫生标准 (GB 7959-2012) 规定, 堆肥温度最高堆温应达到 50 °C 以上, 至少持续 10 d, 或堆温 ≥ 60 °C, 至少持续 5 d, 方能认为堆肥达到了无害化标准^[18]。而温度的变化和微生物的代谢活动紧密相关, 和病原菌的灭活直接相关^[19]。在本试验中, 当各处理温度达到 50 °C 以上时, 接菌组 (0.3%、0.6%、0.9%) 的温度迅速升高并达到 60 °C 以上, 这是因为接入菌剂后, 高温菌快速繁殖产生了大量热量, 从而使堆肥温度升高。且堆肥过程中, 接菌各组与对照组 60 °C 以上高温天数分别为 8、10、9 和 0 d, 接菌各组最高温度接近 70 °C, 比对照组最高温度 (58.3 °C) 高 11.7 °C。说明堆肥中接入由高温

菌 N-3 和 Y-3 制备的菌剂可以提高堆肥温度及高温维持时间, 进而可以有效杀灭堆肥中的病原微生物。

在无害化的前提下, 降解率则是反应死猪堆肥效果的直接指标。总的来说, 体积越大, 越不利于和物料混合, 导致堆肥降解越困难^[20-21]。本试验中, 对猪尸进行了粉碎处理, 从而使肉块在堆肥过程中和物料混合更加均匀, 有利于微生物对其降解利用。郭东坡等^[22]对死猪 (整猪) 堆肥试验中指出, 在试验 6 周后, 死猪降解率 (以湿基计) 达到 95% 左右, 仅剩下大部分骨骼。本试验结果表明: 在第 20 天时, 0.6% 和 0.9% 接种组对猪肉降解率 (干物质) 最高达到了 95% 以上。可见, 接入高温菌剂后, 高温菌在快速生长繁殖的同时分泌了大量酶类, 加快了有机物质的降解。而在添加量增加到一定程度后, 降解率并没有明显提高, 这是因为一定的营养条件下, 微生物快速繁殖达到一定数量时, 由于营养物质的相对缺乏等因素导致竞争, 从而降低了微生物的活性。因此, 添加适量由高温菌 N-3 和 Y-3 制备的菌剂, 在提高堆肥温度的同时可以加快有机物质的降解。

此外, 堆肥试验在秋季进行, 由于桶体积较小, 保温设备不完善, 堆肥温度受环境影响较大, 在堆肥后期堆温迅速下降。且本研究仅以温度和降解率为指标对高温菌的堆肥效果进行了考察, 在一定程度上反映了 N-3 和 Y-3 对堆肥过程的促进效果, 但还不全面, 有待进行较大型的堆肥试验并进一步研究其价值。

4 结论

本研究通过稀释平板法和选择培养基初筛及酶活性复筛的方法, 从锯末和病死猪 (粉碎) 好氧堆肥样品中筛选获得两株能分别高效降解蛋白质和脂肪的高温菌株 N-3 和 Y-3。经鉴定及培养条件优化, 确定 N-3 为芽孢杆菌 (*Bacillus aestuarii*), 最适生长温度 55 °C, pH7.2, 转速 200 r/min, 通气量 4 L/min; Y-3 为嗜热脱氮芽孢杆菌 (*Geobacillus thermodenitrificans*), 最适生长温度 60 °C, pH7.2, 转速 300 r/min, 通气量 3 L/min。且堆肥结果表明: 在锯末 + 病死猪 (粉碎) 的堆肥中接种由 N-3 和 Y-3 等体积制备的液体菌剂 (菌数 $\geq 10^8$ CFU/mL) 可以促进堆肥升温, 提高堆肥的温度, 延长高温维持时间, 加速病死猪的降解, 且高温维持时间达到无害化标准要求。就本试验而言, 最适添加量为 0.6%。

参考文献

- [1] Liao F. The situation of china determine the future direction of the pig industry. *Animals Breeding and Feed*, 2014,2014(3):1-2. (in Chinese)
廖峰. 中国国情决定养猪业未来方向. 养殖与饲料, 2014,2014(3):1-2.
- [2] Yu CZ. The pig industry of China will face fierce competition. *Animals Breeding and Feed*, 2014, 2014(6):1-3. (in Chinese)
喻传洲. 中国养猪业将面临激烈竞争. 养殖与饲料, 2014,2014(6):1-3.
- [3] Wang XP. The technology and policy about how to deal with the dead animal bodies. *Gangsu Animal and Veterinary Sciences*, 2011,41(6):26-27. (in Chinese)
王兴平. 病死动物尸体处理的技术与政策探讨. 甘肃畜牧兽医,2011,41(6):26-27.
- [4] Xue RF. The public health significance of harmless treatment the mortality of livestock and poultry. *Livestock and Poultry Industry*, 2012, (11):54-55. (in Chinese)
薛瑞芳. 病死畜禽无害化处理的公共卫生学意义. 畜禽业,2012,(11):54-55.
- [5] Xi JL, Dong HM, Zhu ZP, Tao XP, Huang HK. Research progress on composting treatment of dead livestock. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(2):76-80. (in Chinese)
习佳林,董红敏,朱志平,陶秀萍,黄宏坤. 死畜禽堆肥化处理研究进展. 中国农业科技导报, 2010, 12(2):76-80.
- [6] Eamens GJ, Dorahy CJ, Muirhead L, Enman B, Pengelly P, Barchia IM, Gonsalves JR. Bacterial survival studies to assess the efficacy of static pile composting and above ground burial for disposal of bovine carcass. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110(6):1402-1413.
- [7] Wang S, Jin JL, Zhao TT, Fan S, Na H, Cao JJ. Composting and evaluation of avian influenza virus infected chicken carcasses. *Chinese Abstracts of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2011, 28(9):45-47. (in Chinese)
王爽,金礼吉,赵彤彤,范时,那啥,曹际娟. 感染禽流感病毒鸡尸体的堆肥处理与评价. 中国畜牧兽医文摘, 2011, 28(9):45-47.
- [8] Schwarz M, Bonhotol J, Harrison E, Brinton W, Storms P. Effectiveness of composting road-killed deer in New York State. *Compost Science & Utilization*, 2010, 18(4):232-241.
- [9] Sivakumar K, Ramesh Saravana Kumar V, Mohamed Amanullah M. Composting of poultry carcass with farm yard manure in summer. *Research Journal of Agriculture and Biological Science*, 2007, 3(5):356-361.
- [10] Gu SY, Gu SC, Zhao XY. Biochemical characterization during municipal solid wastes composting with microbial inoculation. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2012, 43(2):78-82. (in Chinese)
谷思玉,谷邵臣,赵昕宇. 微生物接种对生活垃圾堆肥生化特性的影响. 东北农业大学学报, 2012, 43(2):78-82.
- [11] Qin L, Gao RY, Xu YP, Hu J. Construction of a high-efficiency complex microbial system to degrade cellulose and chlortetracycline and oxytetracycline in compost. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014,33(30):465-470. (in Chinese)
秦莉,高茹英,徐亚平,胡菊. 堆肥中高效降解纤维素及金霉素和土霉素的复合菌系的构建. 农业环境科学学报, 2014,33(30):465-470.
- [12] Gareth LJ, Callum T, Erik B, Julian P. Protease-and keratinase-producing microbial strains for compost bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*,64(2010):574-580.
- [13] 范时. 染疫动物尸体堆肥菌剂的制备及效果评价. 大连理工大学硕士学位论文, 2012.
- [14] Allegretti L, Revolledo L, Astolfi-Ferreira C S, Martins L M, Seixas G H F, Ferreira A J P. Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. from faeces of the blue-fronted Amazon parrot in Brazil. *Beneficial Microbes*,2014,5(4):497-503.
- [15] Cheng XY, Huo PS, Shang XY, Wang DM, Li J. Isolation and identification of a thermophilic bacterium strain with high degradation from compost and its compost effects. *Journal of China Agricultural University*, 2012,17(5):105-111. (in Chinese)
程旭艳,霍培书,尚晓瑛,王定美,李季. 堆肥中高温降解菌的筛选、鉴定及堆肥效果. 中国农业大学学报, 2012,17(5):105-111.
- [16] Xia Y, Zhou WH, Deng XL, Wu JE. Isolation of high lipase-producing strains and optimization of lipase producing conditions. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2013, 33(9):116-120. (in Chinese)
夏宇,周文化,邓学良,伍金娥. 脂肪酶高产菌株的筛选及产酶条件优化. 中南林业科技大学学报, 2013, 33(9):116-120.

- [17] Xun HJ, Zhong HB, Lei FF, Cui C, Zhao MM. Study on isolation and identification of protease-producing marine bacteria and optimization of fermentation medium. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34 (24) : 181-185. (in Chinese)
 郇惠杰, 钟泓波, 雷芬芬, 崔春, 赵谋明. 产蛋白酶海洋细菌的筛选、鉴定及发酵培养基的研究. *食品工业科技*, 2013, 34 (24) : 181-185.
- [18] GB 7959-2012. 粪便无害化卫生要求. 2012.
- [19] Xi JL, Dong HM, He AG, Tao XP, Shang B. The effect of different ventilation rates on composting of dead hens. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33 (5) : 1314-1320. (in Chinese)
 习佳林, 董红敏, 贺爱国, 陶秀萍, 尚斌. 不同通风条件下堆肥处理死鸡效果研究. *环境科学学报*, 2013, 33 (5) : 1314-1320.
- [20] Keener H M, Elwell D L, Monnin M J. Procedures and equations for sizing of structures and windrow for composting mortalities. *Applied Engineering in Agriculture*, 2000, 16 (6) : 681-692.
- [21] Kalbasi A, Mukhtar S, Hawkins SE, Auvermann BW. Carcass composting for management of farm mortalities: a review. *Compost Science and Utilization*, 2005, 13 (3) : 180-193.
- [22] Guo DP, Tao XP, Shang B, Dong HM. Selection of ventilation rates on dead pig composting. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2013, 29 (5) : 187-193. (in Chinese)
 郭东坡, 陶秀萍, 尚斌, 董红敏. 死猪堆肥处理的通风率选择探讨. *农业工程学报*, 2013, 29 (5) : 187-193.

Isolation and identification of thermophilic bacteria for efficient dead-pig composting

Hailong Li¹, Lvmu Li^{1*}, Kun Qian^{2*}, Fazhi Xu¹

¹College of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, Anhui Province, China

²Anhui Animal Biological Engineering Technology Research Center, Hefei 230031, Anhui Province, China

Abstract: [Objective] To isolate thermophilic bacteria to degrade organic substances of dead-pig. [Methods] Primary screening was done by using diluted plate count and selective medium, and then enzyme activity was measured for secondary screening. Two thermophilic bacterial strains N-3 and Y-3 were isolated, and could degrade protein and lipids. To test their effect, the isolates were mixed ($V:V = 1:1$, the number of bacteria was 10^8 CFU/mL) and inoculated in dead-pigs and sawdust composting with different doses (0%, 0.3%, 0.6% and 0.9% of the wet weight of fermentation materials). [Results] Strain N-3 was identified as *Bacillus aestuarii* and Y-3 as *Geobacillus thermodenitrificans*, based on their 16S rDNA gene sequences. The composting temperature of the 0.3%, 0.6% and 0.9% inoculation group could reach 60 °C and maintain at the high temperature for about 10 d, which is higher than control ($P < 0.01$). At the end of composting, the dead-pig degradation rate of the (0%, 0.3%, 0.6% and 0.9% inoculation groups were 71.2%, 75.7%, 96.7% and 97.1%, respectively. The groups of 0.6% and 0.9% were significantly higher than the control ($P < 0.01$). [Conclusion] Sufficient amount inoculation of thermophilic bacteria ($> 0.6%$) could effectively increase composting temperature, maintain thermophilic stage for longer time, and accelerate degradation of dead-pig by composting.

Keywords: dead pig, thermophilic bacteria, isolation, identification, composting effect

(本文责编:张晓丽)