



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20220035

生物有机肥发酵菌剂的制备工艺优化

宋冠林¹, 王安琪¹, 路来风^{1,2}, 张浩¹, 李守辉¹, 王昌禄^{1,2}

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457; 2. 食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457)

摘要: 利用复合功能菌发酵多元辅料研制出一种水分散性生物有机肥发酵菌剂。采用单因素和正交实验法进行优化, 确定了复合功能菌发酵基质最佳质量比为麦麸: 稻糠: 豆粕 = 18: 7: 25, 发酵条件为初始 pH 7.0、培养温度 30 ℃、培养时间 7 d、接种量 5%、含水率 40%。在发酵前添加 3% PEG6000 和 5% 吐温 80、烘干前添加 5% 多聚磷酸钠和 5% (NH₄)₂SO₄ 时, 较发酵后添加 4 种助剂, 水分散性更好、酶活水平更高。利用 5 L 发酵罐放大制备生物有机肥发酵菌剂, 其纤维素 (CMC) 酶的酶活力为 1 247.3 U/g、中性蛋白酶的酶活力为 216.5 U/g、 α -淀粉酶的酶活力为 21.9 U/g、H₂S 去除率为 58.7%、NH₃ 去除率为 63.1%、有效活菌数为 $7.86 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ 、润湿时间为 105.2 s、悬浮率为 40.7%、分散次数为 7.3 次, 水分散用量为 0.99%, 室温保存 1 个月, 菌剂有效成分损失不显著。以豆粕堆肥评价该菌剂腐熟效果, 使用该菌剂堆肥, 腐熟更为彻底, 各指标均符合农业行业标准《有机肥料》(NY/T 525—2021) 技术指标要求。研制成的生物有机肥发酵菌剂符合且优于我国国家标准《农用微生物菌剂》(GB 20287—2006) 中的要求, 水分散性好、成品保存期长, 可规模化处理固体废物制备生物有机肥, 应用前景广阔。

关键词: 多元辅料; 生物有机肥; 发酵菌剂; 复合功能菌; 堆肥

中图分类号: TS201.3; TS209; S144.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2022)06-0018-09

Optimization of Preparation Technology of Fermentation Agent of Bio-Organic Fertilizer

SONG Guanlin¹, WANG Anqi¹, LU Laifeng^{1,2}, ZHANG Hao¹, LI Shouhui¹, WANG Changlu^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin 300457, China)

Abstract: A kind of water-dispersible bio-organic fertilizer fermentation agent was developed by fermenting multiple auxiliaries with complex functional bacteria. Single factor and orthogonal experiments were used for optimization, and the optimal quality ratio of the fermentation substrate of the composite functional bacteria was determined as wheat bran : rice bran : soybean meal = 18 : 7 : 25, and the fermentation conditions were initial pH 7.0, incubation temperature 30 ℃, incubation time 7 d, inoculation amount 5%, and water content 40%. The addition of 3% PEG6000 and 5% Tween 80 before fermentation and 5% sodium polyphosphate and 5% (NH₄)₂SO₄ before drying resulted in better water dispersion and higher enzyme activity levels than the addition of the four additives after fermentation. With a 5 L fermenter to amplify and prepare fermentation agent of bio-organic fertilizer, the enzyme activity of carboxymethyl cellulose (CMC) enzyme was 1 247.3 U/g, neutral protease enzyme activity was 216.5 U/g, α -amylase enzyme activity was 21.9 U/g, H₂S removal rate was 58.7%, NH₃ removal rate was 63.1%, effective live bacterial count was $7.86 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$, wetting time was 105.2 s, suspension rate was 40.7%, the number of dispersion was 7.3 times, water dispersion dosage was 0.99%, and there was no significant loss of active ingredients of the bacterium for 1 month of storage at room temperature. The decomposing effect of the fungus was evaluated by soybean meal composting. The composting products with the fungus were more thoroughly decomposed, and all indexes met the technical index requirements of the agricultural industry standard of organic fertilizer (NY/T 525—2021).

收稿日期: 2022-02-27; 修回日期: 2022-05-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972177)

作者简介: 宋冠林(1996—), 男, 河北秦皇岛人, 硕士研究生; 通信作者: 王昌禄, 教授, 13032211686@qq.com

The developed bio-organic fertilizer fermenting bacterium is in line with and better than the national standard for agricultural microbial bacterium (GB 20287—2006) in China, with good water dispersion and long shelf life of the finished product, which can be used for large-scale treatment of solid waste to make bio-organic fertilizer and has a broad application prospect.

Key words: multiple auxiliaries; bio-organic fertilizer; fermenter; compound functional bacteria; composting

随着农业现代化进程的推进,农业生产(加工)产生的固体废物(主要组分为纤维素、蛋白质、淀粉等^[1-2])已造成严重的农业面源污染。在肥料资源化过程中,单菌株发酵物料常出现营养分解利用不充分、腐熟不彻底等问题,而复合功能微生物中的酶类可协同作用于目标物质^[3]。市售的复合微生物菌剂主要为粉剂和粒剂^[4],具有易分散、运输稳定性好等优势,但酶活性较低;市售的高酶活块状复合菌剂较少。

目前,国内已报道固体复合菌剂中温(37℃)产羧甲基纤维素(CMC)酶的酶活力最高为 5 289 U/g^[5]。王勇^[6]构建了三元混合真菌复合腐熟剂,产纤维素酶的酶活力为 75.36 U/g。有研究^[7]表明,嗜冷菌对堆肥升温有较好效果,且有更高酶活力的蛋白酶。彭宇等^[8]以酶活力为 80 U/g 的中性蛋白酶菌剂 B 生产甘蔗有机肥,可以明显提高有机肥中的营养指标及有效活菌含量。罗立津等^[9]在耐低温木质纤维素降解菌群 A25-3 的基础上补充酿酒酵母和绿色木霉制成固体复合菌剂, α -淀粉酶的酶活力为 47.89 U/g,可以有效提高堆肥体系的温度,高效降解秸秆。为提高菌剂水解酶类酶活力、降低成本、延长菌剂保存时间,本研究以实验室专利菌株白黄链霉菌(*Streptomyces albobiflavus*) TD-1 与前期筛选出的优势菌构建复合微生物体系,优化发酵条件和多元辅料配比,得到酶活力较高的固态基质,并在发酵前后合理补充助剂,经 5 L 发酵罐放大,旨在建立一种新型水分散性生物有机肥发酵菌剂的制备工艺,为进行规模化堆肥提供一种可靠的生物有机肥发酵菌剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与原料

白黄链霉菌(*Streptomyces albobiflavus*) TD-1、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) KC1、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) SY07、乳酸杆菌(*Lactobacillus*) RS1、绿色木霉(*Trichoderma viride*) LM1 均为实验室保藏菌株。耐高温蛋白分解菌 F19,从纳米膜发酵鸡粪有机肥中分离筛选。耐高温纤维素分解菌 XWS2、硝化细菌 XN1、亚硝化细菌 YN3、硫化氢

分解菌 HS1、硫化氢分解菌 HS2 均从鸡粪条垛堆肥中分离筛选,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) NJ1 从安琪酿酒酵母粉中分离筛选。

麦麸、豆粕、稻壳,商丘马培中食品有限公司;菌糠,天津市某食用菌公司;糠醛渣,日照苔上海洋生物科技有限公司;强兴堆肥发酵菌剂,河南恒信农化有限公司。

1.1.2 试剂与仪器

3,5-二硝基水杨酸(DNS),天津百奥泰科技发展有限公司;三聚磷酸钠(STPP)、木质素磺酸钠(CLF),天津市江天化工科技有限公司;羧甲基纤维素,天津市百世化工有限公司;酪蛋白、十二烷基硫酸钠(SDS)、聚乙二醇 6000(PEG6000)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS)、糊精,北京索莱宝公司;海藻酸钠(SA),上海麦克林试剂公司;丙三醇、吐温 80,天津康科德科技有限公司;其他常用试剂均为国产分析纯试剂。

Allegra X-30 型台式高速离心机,美国 Beckman 公司;Infinite M200 PRO 型酶标仪,瑞士 Tecan 公司;Seven Easy 型酸度计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.1.3 培养基

乳粉培养基(g/L):牛肉膏 5,蛋白胨 10,NaCl 5,脱脂乳粉 30,pH 7.0~7.2。

H₂S 选择培养基(g/L):葡萄糖 5.0,K₂HPO₄ 0.5,KNO₃ 1.0,MgCl₂ 0.5,NaCl 0.5,NH₄Cl 0.5,Na₂CO₃ 1.0,FeCl₂ 0.01。在盛有 50 mL 该培养基的 250 mL 三角瓶中放置 1 个 10 mL 离心管,离心管中加入 3 mL 25% H₂SO₄ 和 1 g FeS,用于产生 H₂S。

无机盐培养基(g/L):KH₂PO₄ 1.0,NaCl 0.5,MgSO₄ 0.5,CaCl₂ 0.1,FeSO₄ 0.01,CoCl₂ 0.01。

以上培养基灭菌条件为 121℃ 灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 多元辅料固态发酵基质的筛选

选取麦麸、菌糠、糠醛渣、稻糠(稻壳)、豆粕共 5 种辅料,粉碎后以碳源与氮源质量比为 1:1、碳氮比(C/N)为 25 设计基质配比(表 1)。

将 100 g 基质置于 500 mL 三角瓶中,添加无机盐培养基,调节含水率为 40%~50%,121℃ 灭菌

20 min. 将菌种活化后转接至各自的种子培养基中: XWS2、F19、XN1、YN3、HS1、HS2、KC1、SY07 转接至 LB 培养基^[10], LM1 转接至 PDB 培养基^[11], NJ1 转接至麦芽汁培养基^[12], RS1 转接至乳粉培养基, TD-1 转接至链霉菌 TD-1 种子液培养基^[11]. 菌株培养至对数期的 80%^[13], 通过前期拮抗实验, 确定菌悬液比例为 NJ1 : SY07 : TD-1 : XWS2 : F19 : XN1 : YN3 : HS1 : HS2 : LM1 : KC1 : RS1 = 3 : 3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1, 混合后得到混合菌液. 将混合菌液以 10% 的接种量接种至发酵基质上, 30 °C 发酵 7 d, 每天翻拌 1 次, 防止结块, 测定 CMC 酶、中性蛋白酶、 α -淀粉酶的酶活力.

表 1 固态发酵基质配制方案

Tab. 1 Program for solid-state fermentation substrate preparation

编号	基质配方	质量比
1	麦麸 : 菌糠 : 糠醛渣 : 豆粕	10 : 18.75 : 21.25 : 50
2	麦麸 : 糠醛渣 : 稻糠 (稻壳) : 豆粕	26 : 12 : 12 : 50
3	麦麸 : 菌糠 : 稻糠 (稻壳) : 豆粕	10 : 19 : 21 : 50
4	麦麸 : 菌糠 : 糠醛渣 : 稻糠 (稻壳) : 豆粕	14 : 11 : 14 : 11 : 50
5	麦麸 : 稻糠 (稻壳) : 豆粕	24 : 26 : 50
6	麦麸 : 糠醛渣 : 豆粕	27 : 23 : 50

1.2.2 固态发酵基质 C/N 的确定

将筛选得到的高酶活固态发酵基质物料以 C/N 为 15、20、25、30、35 重新调整比例发酵. 测定 CMC 酶、中性蛋白酶、 α -淀粉酶的酶活力.

1.2.3 固态发酵条件优化

在固态发酵基质基础上, 依据前期发酵条件单因素实验结果, 确定各因素实验区间, 参照 $L_{16}(4^5)$ 正交表调整发酵参数, 设置初始 pH (5、6、7、8)、培养温度 (25、30、35、40 °C)、培养时间 (5、7、9、11 d)、接种量 (5%、10%、15%、20%)、初始含水率 (40%、50%、60%、70%) 进行正交实验优化固态发酵条件.

1.2.4 水分散性助剂筛选及用量的确定

将质量分数为 3% 的润湿剂 (SDS、PEG6000、SDBS) 添加至最佳发酵产物上, 加水混匀后装入柱状模具中压紧, 在鼓风干燥烘箱中 40 °C 风干至含水率为 15%, 按照国家标准 (GB/T 1600—2001) 进行水分测定和监控; 再经高速粉碎机破碎成粉, 按照国家标准 (GB/T 5451—2001) 测定润湿时间. 调整润湿剂添加量 (1%、3%、5%), 确定润湿剂种类和用量.

在含有润湿剂的发酵产物上, 添加分散剂

(CMC、CLF、STPP), 方法同润湿剂的实验方法, 按照国家标准 (GB/T 14825—2006) 测定悬浮率, 确定分散剂的种类及用量.

在含有润湿剂、分散剂的发酵产物上, 添加崩解剂 (CaCl₂、(NH₄)₂SO₄、SA), 方法同润湿剂的实验方法, 崩解指标分散次数的测定采用量筒混合法^[14], 确定崩解剂的种类及用量.

在含有润湿剂、分散剂、崩解剂的发酵产物上添加保护剂 (丙三醇、吐温 80、糊精), 方法同润湿剂的实验方法, 确定保护剂的种类和用量.

1.2.5 非离子表面活性助剂对菌剂发酵的影响

非离子表面活性助剂可以提高菌剂的发酵产酶活性, 将 3% PEG6000、5% 吐温 80 在发酵前加入, 5% STPP、5% (NH₄)₂SO₄ 在发酵后加入, 分别在发酵第 5 天和第 7 天取样烘干成型, 测定 3 种水解酶的酶活力、水分散性指标. 分别采用锌氨络盐吸收比色法^[15]和靛酚蓝分光光度法^[16]测定菌剂的 H₂S 去除率和 NH₃ 去除率.

1.2.6 生物有机肥发酵菌剂制备工艺的放大

放大发酵前使用 75% 乙醇对自制 5 L 发酵罐擦拭消毒, 罐口覆 8 层纱布. 将装料量由 100 g/500 mL 放大为 1 kg/5 L, 放大后的基质不进行灭菌处理. 将发酵好的菌剂置于 1.5 L 泡沫箱中, 碾压成块状, 其他发酵条件同 1.2.3 节中最佳发酵条件、助剂添加时间与添加量同 1.2.5 节, 将 500 mL 三角瓶与 5 L 发酵罐发酵的实验效果进行比较. 按照标准 NY/T 798—2004 《复合微生物肥料》中稀释涂布平板法测定有效活菌数, 按照标准 GB 20287—2006 《农用微生物菌剂》测定 pH.

1.2.7 生物有机肥发酵菌剂贮藏稳定性的测定

将生物有机肥发酵菌剂在 20 ~ 25 °C 密封贮存 30 d, 检测菌剂中的有效活菌数、水解酶的酶活力及除臭性能, 评估生物有机肥发酵菌剂的贮藏稳定性.

1.2.8 生物有机肥发酵菌剂的豆粕堆肥效果验证

采用豆粕复配辅料稻壳粉、菌糠、香蕉皮粉进行豆粕堆肥, 调整 C/N 为 25 : 1, 即 600 g 豆粕、150 g 菌糠、150 g 稻壳粉、9 g 香蕉皮粉. 称取 909 g 混合物料装入 3 L 底部开孔的泡沫箱中, 加入适量水将堆肥物料润湿, 按质量比 0.5% 添加各类菌剂. 实验组先将生物有机肥发酵菌剂溶于水中制成质量分数为 0.99% 的悬浮液, 然后倒入堆肥物料中; 对照组与空白组分别为向堆肥物料中直接撒入商业强兴堆肥发酵菌剂菌粉与生物有机肥发酵菌剂未发酵基质, 调整含水率至 60%, 翻拌均匀, 静置发酵.

采用人工翻堆供氧,覆扎孔塑料薄膜保温,将其置于 30 ℃ 恒温培养箱中,发酵高温期(50 ℃)前每 2 d 翻堆 1 次,进入高温期后待温度下降即翻堆,使高温期维持 10 d 左右,揭膜覆盖 8 层纱布,在发酵第 40 天测定堆肥品质,按标准 NY/T 525—2021《有机肥料》评价该生物有机肥发酵菌剂发酵效果。

1.3 水解酶类活性测定方法

1.3.1 CMC 酶的酶活力测定

称取 10.0 g 固体菌剂,加入装有 100 mL 蒸馏水和玻璃珠的 500 mL 三角瓶中,静置 20 min,180 r/min 振荡 30 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液即为粗酶液,采用 DNS 法测定 CMC 酶^[17]的酶活力。

1.3.2 中性蛋白酶的酶活力测定

参照 GB/T 23527—2009《蛋白酶制剂》中福林酚法测定中性蛋白酶的酶活力。

1.3.3 α -淀粉酶的酶活力测定

称取 1.0 g 固体菌剂置于研钵中,加入少量二氧化硅和 2 mL 蒸馏水,研磨匀浆。将匀浆倒入离心管中,用 6 mL 蒸馏水分次将残渣清洗并转入离心管。提取液在室温下静置提取 15 min,每隔 2 min 搅动 1 次;4 000 r/min 离心 10 min,将上清液倒入 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,摇匀,即为淀粉酶原液。采用 DNS 法测定 α -淀粉酶^[18]的酶活力。

1.4 菌剂其他指标测定方法

1.4.1 除臭性能计算

考虑到菌剂可能在发酵过程中产生不良气体,设置 2 个空白对照组,命名为 CK1、CK2。CK1 为在 NH₃ 选择培养基^[19]与 H₂S 选择培养基中不添加菌剂、添加外源臭味气体组,CK2 为在上述两种培养基中添加菌剂、不添加外源臭味气体组。实验组为上述两种培养基中添加菌剂和外源臭味气体组。按照式(1)和式(2)分别计算 NH₃ 去除率(r_1)和 H₂S 去除率(r_2)。

$$r_1 = \frac{G_1 - (G_2 - G_3)}{G_1 + G_3} \times 100\% \quad (1)$$

$$r_2 = \frac{G_4 - (G_5 - G_6)}{G_4 + G_6} \times 100\% \quad (2)$$

式中: G_1 、 G_2 、 G_3 分别为 CK1 组、实验组、CK2 组 NH₃ 释放量,mg/L; G_4 、 G_5 、 G_6 分别为 CK1 组、实验组、CK2 组 H₂S 释放量,mg/L。

1.4.2 有效活菌数及存活率计算

按照式(3)和式(4)分别计算有效活菌数(n_m)和贮藏后有效菌存活率(r)。

$$n_m = \frac{\bar{x} \cdot k \cdot V_1}{m_0 \cdot V_2} \times 10^{-8} \quad (3)$$

式中: \bar{x} 为有效菌落平均数; k 为稀释倍数; V_1 为基础液体积,mL; V_2 为菌悬液加入量,mL; m_0 为样品质量,g。

$$r = \frac{n_1}{n} \times 100\% \quad (4)$$

式中: n 、 n_1 分别为贮藏 30 d 前后菌剂的有效活菌数, g^{-1} 。

1.4.3 电导率的测定

将豆粕堆肥样品与去离子水按质量体积比 1 : 10 混合,30 ℃、180 r/min 振荡 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,用 0.45 μ m 滤膜过滤。用电导率仪测定上清液的电导率(σ)。

1.4.4 终点 C/N : 初始 C/N 的测定

总碳(TOC)含量 = 有机质含量/1.732。总氮(TN)含量按照 H₂SO₄ 消解凯氏定氮法测定。有机质含量参照 NY/T 525—2021《有机肥料》中重铬酸钾容量法测定。

1.4.5 种子发芽指数的测定

种子发芽指数(GI)按照标准 NY/T 525—2021《有机肥料》测定。

1.5 数据处理与分析

运用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA),结合邓肯(Duncan)氏法进行差异显著性检验,结果与分析表中数据同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 生物有机肥发酵菌剂固态发酵基质的筛选

固态发酵基质水解酶的酶活力测定结果见表 2。

表 2 固态发酵基质水解酶的酶活力

Tab. 2 Enzyme activity of solid-state fermentation substrate hydrolase

实验组	酶活力/(U·g ⁻¹)		
	CMC 酶	中性蛋白酶	α -淀粉酶
1	190.97 ± 15.64 ^b	82.59 ± 7.14 ^c	—
2	644.65 ± 43.82 ^d	41.41 ± 3.69 ^b	—
3	320.63 ± 33.46 ^c	39.38 ± 5.12 ^b	—
4	280.17 ± 21.75 ^c	4.73 ± 0.88 ^a	4.48 ± 0.25 ^a
5	1 276.54 ± 78.66 ^c	124.68 ± 9.68 ^d	21.42 ± 1.74 ^b
6	100.10 ± 9.32 ^a	82.2 ± 6.81 ^c	3.21 ± 0.36 ^a

含有糠醛渣与菌糠的组合水解酶的酶活力较低。虽然糠醛渣含有大量有机质^[20],可供微生物生

长所需营养,但其微孔结构中酸度过大^[21],会抑制微生物的生长;菌糠为食用菌培养基残渣,其粗纤维等组分已降解和转化^[22],不足以提供微生物代谢所需养分.因此,选用麦麸和稻糠为碳源,豆粕为氮源作为固态发酵基质.

2.2 固态发酵基质 C/N 的确定

麦麸、稻糠、豆粕发酵基质比例见表 3.

表 3 麦麸、稻糠、豆粕发酵基质比例

Tab. 3 Fermentation substrate ratio of wheat bran, rice bran and soybean meal

C/N	麦麸/%	稻糠(稻壳)/%	豆粕/%
15	47	3	50
20	36	14	50
25	24	26	50
30	14	36	50
35	3	47	50

不同 C/N 下固态发酵基质水解酶的酶活力结果

表 5 固态发酵条件正交优化

Tab. 5 Orthogonal optimization of solid-state fermentation conditions

实验组	因素					酶活力/(U·g ⁻¹)		
	初始 pH	培养温度/°C	培养时间/d	接种量/%	含水量/%	CMC 酶	中性蛋白酶	α-淀粉酶
1	5	25	5	5	40	1 485.4	135.1	24.5
2	5	30	7	10	50	1 480.7	182.7	29.1
3	5	35	9	15	60	1 436.6	158.3	21.7
4	5	40	11	20	70	1 342.3	104.3	25.8
5	6	25	7	15	70	1 746.0	142.7	31.2
6	6	30	5	20	60	1 854.3	201.1	28.8
7	6	35	11	5	50	1 791.6	165.1	30.5
8	6	40	9	10	40	1 536.6	127.2	27.4
9	7	25	9	20	50	1 632.7	139.7	18.7
10	7	30	11	15	40	1 975.1	207.4	27.6
11	7	35	5	10	70	1 773.6	161.2	32.4
12	7	40	7	5	60	1 580.7	131.0	36.1
13	8	25	11	10	60	997.4	135.1	20.3
14	8	30	9	5	70	1 356.3	191.3	34.6
15	8	35	7	20	40	1 133.8	159.3	33.4
16	8	40	5	15	50	940.5	126.5	30.4
k ₁	1 436.3	1 460.4	1 513.5	1 553.5	1 532.7			
k ₂	1 732.1	1 666.6	1 485.3	1 442.1	1 461.4			
k ₃	1 740.5	1 533.9	1 490.6	1 524.6	1 462.3			
k ₄	1 102.0	1 350.0	1 521.6	1 490.8	1 554.6			
R	638.5	316.6	36.3	111.4	93.2			
k ₁	145.1	138.2	156.0	155.6	157.2			
k ₂	159.0	195.6	154.0	151.6	153.5			
k ₃	159.8	161.0	154.1	158.7	156.4			
k ₄	153.1	122.3	153.0	151.1	149.9			
R	14.7	73.4	3.0	7.6	7.4			
k ₁	25.3	23.7	29.0	31.4	28.2			
k ₂	29.5	30.0	32.5	27.3	27.2			
k ₃	28.7	29.5	25.6	27.7	26.7			
k ₄	29.7	29.9	26.1	26.7	31.0			
R	4.4	6.4	6.9	4.8	4.3			

见表 4. 当初始 C/N 为 25 时, CMC 酶和中性蛋白酶的酶活力均处于最低水平; C/N 为 20 时, CMC 酶和 α-淀粉酶的酶活力最高; C/N 为 30 时, 中性蛋白酶的酶活力最高. 综合考虑, 选取 C/N 为 20.

表 4 不同 C/N 下固态发酵基质水解酶的酶活力

Tab. 4 Enzyme activity of solid-state fermentation substrate hydrolase under different C/N

C/N	酶活力/(U·g ⁻¹)		
	CMC 酶	中性蛋白酶	α-淀粉酶
15	1 320.1 ± 183.4 ^a	200.1 ± 18.8 ^c	18.6 ± 1.6 ^d
20	1 778.6 ± 109.2 ^c	154.3 ± 12.9 ^b	29.9 ± 2.1 ^e
25	1 253.4 ± 176.4 ^a	112.4 ± 6.7 ^a	6.0 ± 0.8 ^a
30	1 668.1 ± 144.3 ^{bc}	226.9 ± 19.1 ^c	13.5 ± 1.2 ^c
35	1 383.5 ± 210.9 ^{ab}	161.2 ± 14.3 ^b	8.5 ± 0.8 ^b

2.3 固态发酵条件正交优化

根据单因素实验结果, 以水解酶的酶活力为指标, 优化初始 pH(A)、培养温度(B)、培养时间(C)、接种量(D)、含水率(E)发酵条件, 结果见表 5.

产 CMC 酶、中性蛋白酶、 α -淀粉酶的最佳发酵条件分别为 $A_3B_2C_4D_1E_4$ 、 $A_3B_2C_1D_3E_1$ 、 $A_4B_2C_2D_1E_4$ 。综合考虑, 确定最佳发酵条件为方案 $A_3B_2C_2D_1E_1$, 即: 初始 pH 7.0、培养温度 30 °C、培养时间 7 d、接种量 5%、含水率 40%。以上述条件进行验证, CMC 酶、中性蛋白酶、 α -淀粉酶的酶活力分别为 1 878.6、203.8、37.0 U/g, 说明方法稳定可行。

2.4 水分散性助剂的筛选

对固态发酵基质的润湿剂、分散剂、崩解剂进行筛选, 结果如图 1 所示。

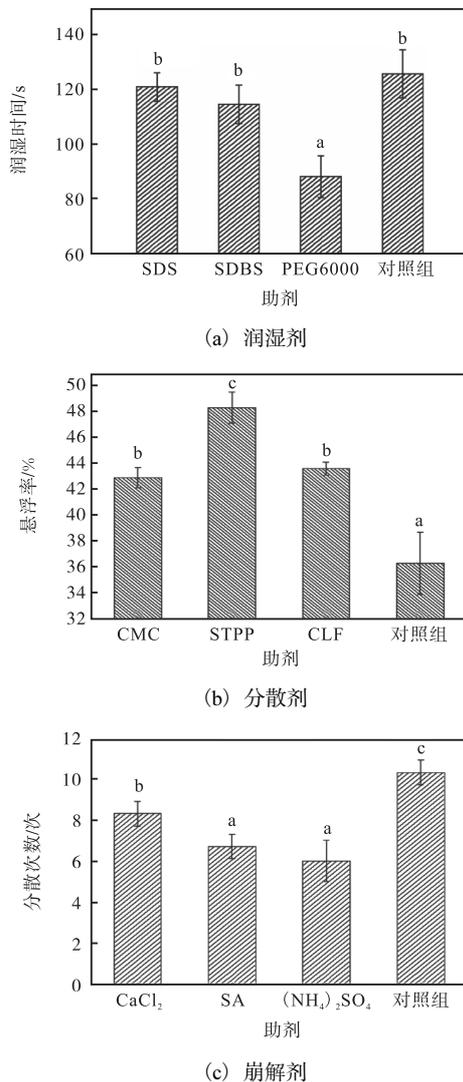


图 1 固态发酵基质的润湿剂、分散剂、崩解剂的筛选

Fig. 1 Screening of wetting agent, dispersant and disintegrating agent for solid fermentation substrate

润湿时间及悬浮率是衡量分散剂效果的重要指标^[23]。不同润湿剂类别影响生物有机肥发酵菌剂的润湿时间, 润湿时间越短, 说明润湿效果越好。图 1(a)为添加 3 种润湿剂的生物有机肥发酵菌剂的润

湿时间。当选取 PEG6000 为润湿剂时, 生物有机肥发酵菌剂的润湿时间最短。

悬浮率的测定用来确定菌剂的最高喷洒浓度, 悬浮率越高则水分散性越高。图 1(b)为固态发酵基质添加不同分散剂的悬浮率。分散剂为非离子表面活性剂 STPP 时, 菌剂悬浮率显著高于各处理组 ($P < 0.05$)。

分散次数为崩解剂测定指标, 即将水中沉积物分散至不可再分散的颠倒次数。图 1(c)为菌剂中添加不同崩解剂的分散次数。结果表明, $(NH_4)_2SO_4$ 作为崩解剂时分散次数最少, 故崩解剂选用 $(NH_4)_2SO_4$ 。

在 40 °C 烘干时, 测定 3 种保护剂(丙三醇、吐温 80、糊精)对菌剂水解酶酶活力的保护作用, 结果如图 2 所示。当选用丙三醇时, CMC 酶的酶活力达 1 377.2 U/g, CMC 酶的酶活力增加量最大; 当选用吐温 80 时, CMC 酶的酶活力与其他两种保护剂相比略低, 无显著性差异 ($P \geq 0.05$), 但吐温 80 组的中性蛋白酶和 α -淀粉酶的酶活力均为最高, 与各处理组中性蛋白酶的酶活力和 α -淀粉酶的酶活力差异显著 ($P < 0.05$)。综合考虑, 选用非离子表面活性剂吐温 80 作为保护剂。

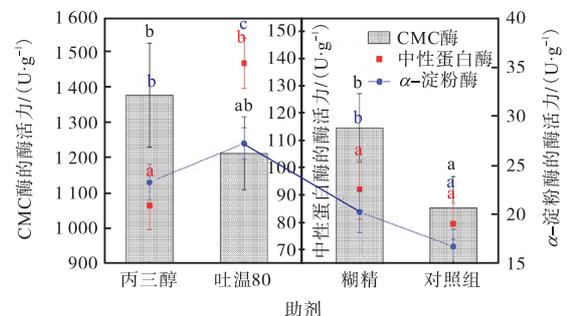


图 2 固态发酵基质添加不同保护剂的水解酶的酶活力
Fig. 2 Hydrolytic enzyme activity of solid-state fermentation substrate with different protective agents

2.5 水分散性助剂用量的确定

助剂用量筛选单因素实验结果见表 6。由表 6 可知: 助剂选用 3% PEG6000、5% STPP、5% $(NH_4)_2SO_4$ 时, 水分散性指标最优。虽然需考虑生产成本, 但用 1% 吐温 80 时菌剂的中性蛋白酶的酶活力最高, CMC 酶的酶活力与 5% 吐温 80 相差甚大, 故保护剂吐温 80 的用量为 5%。

2.6 非离子表面活性剂类助剂对菌剂发酵及质量的影响

助剂中 PEG6000 和吐温 80 为非离子表面活性剂, 将这两种助剂在发酵前添加, 基质发酵 5 d、7 d,

烘干后的生物有机肥发酵菌剂各指标测定结果见表 7. 与 2.5 节中 CMC 酶的酶活力相比, 非离子表面活性剂不能加速基质发酵进程, 生物有机肥发酵菌剂发酵 7 d 产水解酶的酶活力显著高于发酵 5 d ($P < 0.05$). 菌剂中 H_2S 分解菌 HS1 和 HS2 可有效去除 H_2S , 亚硝化细菌 YN3 和硝化细菌 XN1 可抑制 NH_3 的逸出, 将其转化固定为离子, 发酵 7 d 对臭味物质 H_2S 的去除率与发酵 5 d 相比有显著性差异 ($P < 0.05$),

两组 NH_3 去除率与水分散性差异不显著 ($P \geq 0.05$).

发酵前添加非离子表面活性剂(T 组)对菌剂质量影响结果见表 8. 发酵前添加非离子表面活性剂可在一定程度上提高水解酶的酶活力水平, 特别是中性蛋白酶的酶活力可达 267.8 U/g, 与发酵后添加非离子表面活性剂(CK 组)相比提高了 95.8%, 亦可促进臭味物质 H_2S 的吸收, 但基本不影响生物有机肥发酵菌剂的 NH_3 吸收与其水分散性.

表 6 助剂用量的筛选

Tab. 6 Screening of the dosage of auxiliaries

助剂 用量/%	PEG6000	STPP 悬浮	$(NH_4)_2SO_4$ 分散次数/次	酶活力/(U·g ⁻¹)		
	润湿时间/s	率/%		CMC 酶	中性蛋白酶	α -淀粉酶
1	120.0 ± 5.6 ^b	44.6 ± 1.8 ^a	7.0 ± 1.0 ^a	1 132.9 ± 108.2 ^a	189.2 ± 20.1 ^b	28.0 ± 1.9 ^{ab}
3	86.0 ± 4.8 ^a	48.5 ± 2.4 ^{ab}	7.0 ± 0.0 ^a	1 244.9 ± 111.7 ^a	139.0 ± 7.5 ^a	25.5 ± 1.4 ^a
5	113.0 ± 6.6 ^b	50.0 ± 2.2 ^b	6.5 ± 0.5 ^a	1 625.4 ± 131.8 ^b	136.8 ± 6.6 ^a	28.7 ± 1.7 ^b

表 7 非离子表面活性剂类助剂对发酵进程的影响

Tab. 7 Effects of non-ionic surfactants on fermentation process

培养 时间/d	酶活力/(U·g ⁻¹)			H_2S	NH_3	润湿时间/s	悬浮率/%	分散次数/次
	CMC 酶	中性蛋白酶	α -淀粉酶	去除率/%	去除率/%			
5	841.7 ± 58.7 ^a	125.8 ± 8.6 ^a	17.3 ± 1.5 ^a	61.9 ± 3.7 ^a	60.8 ± 4.9 ^a	80.1 ± 5.2 ^a	48 ± 0.8 ^a	6.3 ± 2.0 ^a
7	1 688.4 ± 128.4 ^b	267.8 ± 14.5 ^b	29.1 ± 1.8 ^b	73.8 ± 4.2 ^b	66.6 ± 6.3 ^a	85.8 ± 4.3 ^a	49.5 ± 0.9 ^a	6.0 ± 1.0 ^a

表 8 发酵前添加非离子表面活性剂对菌剂质量的影响

Tab. 8 Effect of adding non-ionic surfactants before fermentation on the quality of microbial agents

处理组	酶活力/(U·g ⁻¹)			H_2S	NH_3	润湿时间/s	悬浮率/%	分散次数/次
	CMC 酶	中性蛋白酶	α -淀粉酶	去除率/%	去除率/%			
T	1 688.4 ± 128.4 ^b	267.8 ± 14.5 ^b	29.1 ± 1.8 ^b	73.8 ± 4.2 ^b	66.6 ± 6.3 ^a	85.8 ± 4.3 ^a	49.5 ± 0.9 ^a	6.0 ± 1.0 ^a
CK	1 625.4 ± 131.8 ^b	136.8 ± 6.6 ^a	29.1 ± 1.7 ^b	63.7 ± 2.9 ^a	64.3 ± 4.8 ^a	86.0 ± 4.8 ^a	50.0 ± 2.2 ^b	6.5 ± 1.0 ^a

2.7 5 L 发酵罐放大制备生物有机肥发酵菌剂

将原有制备工艺放大, 研究放大后指标变化, 结果见表 9. 放大后菌剂水解酶的酶活力、水分散性、除臭效果、有效活菌数均低于三角瓶发酵, 5 L 发酵罐发酵产 CMC 酶的酶活力、中性蛋白酶的酶活力、 α -淀粉酶的酶活力、 H_2S 去除率、有效活菌数, 与

500 mL 三角瓶发酵具有显著性差异 ($P < 0.05$). 这说明放大发酵不易翻堆与拌匀, 造成中心物料发酵不充分, 基质未经灭菌, 原著微生物同外源微生物发生拮抗作用. 菌剂用作水分散剂时, 推荐使用量为 0.99%, 生物有机肥发酵菌剂成品指标均符合国家标准 GB 20287—2006《农用微生物菌剂》.

表 9 生物有机肥发酵菌剂放大发酵后指标变化

Tab. 9 Index changes of fermentation agent of bio-organic fertilizer after amplification and fermentation

处理组	酶活力/(U·g ⁻¹)			H_2S	NH_3	有效活菌数/ (10 ⁸ g ⁻¹)	润湿 时间/s	悬浮 率/%	分散 次数/次
	CMC 酶	中性蛋白酶	α -淀粉酶	去除率/%	去除率/%				
三角瓶发酵	1 688.4 ± 128.4 ^b	267.8 ± 14.5 ^b	29.1 ± 1.8 ^b	73.8 ± 4.2 ^b	66.6 ± 6.3 ^a	12.58 ± 12.1 ^b	95.8 ± 4.3 ^a	49.5 ± 0.9 ^b	6.0 ± 1.0 ^a
发酵罐发酵	1 247.3 ± 103.7 ^a	216.5 ± 16.8 ^a	21.9 ± 1.8 ^a	58.7 ± 3.1 ^a	63.1 ± 3.6 ^a	7.86 ± 6.8 ^a	105.2 ± 4.8 ^a	40.7 ± 2.4 ^a	7.3 ± 0.6 ^a

2.8 生物有机肥发酵菌剂贮藏稳定性的测定

表 10 列出了生物有机肥发酵菌剂成品密封室温贮藏 30 d 后指标变化. 贮藏后菌剂水解酶的酶活力发生了一定变化, CMC 酶的酶活力由 1 247.3 U/g 提升至 1 718.9 U/g, 主要由于贮藏时纤维素分解菌仍可利用菌剂基质中残留的营养物质代谢; 中性蛋白酶的

酶活力显著下降, 可能由于自然条件下酶活力水平存在一定损失; 有效活菌数随时间的延长有所下降, 虽与贮藏前相比有显著性差异, 但存活率达到了 83.2%; α -淀粉酶的酶活力、水分散性指标、除臭指标、有效活菌数之间差异不显著. 贮藏 30 d 的生物有机肥发酵菌剂成品指标也均符合国家标准 GB

20287—2006《农用微生物菌剂》。

表 10 生物有机肥发酵菌剂贮藏 30 d 后指标变化

Tab. 10 Index changes of fermentation agent of bio-organic fertilizer after 30 days storage

处理组	酶活力/(U·g ⁻¹)			H ₂ S	NH ₃	有效活菌数/ (10 ⁸ g ⁻¹)	润湿 时间/s	悬浮 率/%	分散 次数/次
	CMC 酶	中性蛋白酶	α -淀粉酶	去除率/%	去除率/%				
C	1 247.3 ± 103.7 ^a	216.5 ± 16.8 ^b	21.9 ± 1.8 ^a	58.7 ± 3.1 ^a	63.11 ± 3.58 ^a	78.6 ± 6.8 ^b	105.2 ± 4.8 ^a	40.74 ± 2.42 ^a	7.3 ± 0.6 ^a
C ₃₀	1 718.9 ± 187.5 ^b	158.2 ± 20.6 ^a	20.4 ± 1.4 ^a	52.4 ± 3.5 ^a	57.88 ± 4.12 ^a	65.4 ± 4.6 ^a	103.6 ± 6.7 ^a	38.18 ± 1.97 ^a	7.3 ± 0.6 ^a

注: C 代表生物有机肥发酵菌剂成品, C₃₀ 表示贮藏 30 d 的生物有机肥发酵菌剂成品

2.9 生物有机肥发酵菌剂在豆粕堆肥中效果验证

国家农业行业标准 NY/T 525—2021《有机肥料》中规定腐熟有机肥料技术指标要求: 含水率 ≤ 30%、pH 5.5 ~ 8.5、有机质 ≥ 30%、总养分(TN+P₂O₅+K₂O) ≥ 4.0%、种子发芽指数(GI) ≥ 70%。70% GI 只能说明堆肥对作物抑制作用较小; GI ≥ 85%, 才说明堆肥完全腐熟; 当 GI ≥ 100% 时, 堆肥对作物无毒性^[24]; 腐熟完全的堆肥要求 $\sigma < 9.0$ mS/cm、终点 C/N : 初始 C/N < 0.6^[25-26], 此时对种子发芽无抑制作用。本研究以 GI ≥ 85%、 $\sigma < 9.0$ mS/cm、终点 C/N : 初始 C/N < 0.6 为腐熟评判标准。

30 °C 发酵 40 d 后豆粕堆肥指标测定结果见表 11。添加生物有机肥发酵菌剂组(KJ)、强兴发酵菌剂组

(QX) 含水率显著低于对照组(CK)。外源微生物代谢活跃促使堆肥温度升高, 揭膜后加速了水分蒸发。堆肥发酵过程中, pH 会呈现先下降后上升的趋势。在初始阶段, 由于可利用的能量物质较多, 微生物繁殖快, 其代谢产生的有机酸使 pH 下降; 堆肥继续进行, 有机酸随着温度升高而挥发, 同时, 有机氮向铵态氮类物质转化所产生的氨使 pH 又开始回升。堆肥有机质含量反映了有机物分解菌的分解能力, 其产生的水解酶类加速了有机质的分解, 可知 KJ 组和 QX 组中的分解菌在发酵过程中占据主导地位, CK 组中原有微生物分解能力较弱, 发酵后 KJ 组的有机质最低, 与 CK 组有显著性差异。

表 11 40 d 生物有机肥发酵菌剂豆粕堆肥评价表

Tab. 11 Evaluation table of soybean meal composting with 40 d fermentation agent of bio-organic fertilizer

处理组	含水率/%	pH	有机质/%	TN/%	P ₂ O ₅ /%	K ₂ O/%	σ /(mS·cm ⁻¹)	终点 C/N : 初始 C/N	GI/%
KJ	23.61 ± 1.59 ^a	7.95 ± 0.26 ^a	44.55 ± 2.75 ^a	3.07 ± 0.16 ^b	0.79 ± 0.04 ^b	1.68 ± 0.16 ^b	2.67 ± 0.22 ^a	0.34 ± 0.02 ^a	143.15 ± 11.96 ^c
QX	25.16 ± 2.03 ^a	8.02 ± 0.22 ^a	48.54 ± 2.26 ^{ab}	2.84 ± 0.18 ^b	0.76 ± 0.08 ^b	1.52 ± 0.12 ^{ab}	2.98 ± 0.25 ^a	0.40 ± 0.03 ^b	118.75 ± 9.65 ^b
CK	29.37 ± 2.48 ^b	8.31 ± 0.25 ^a	53.35 ± 3.24 ^b	2.41 ± 0.20 ^a	0.62 ± 0.03 ^a	1.33 ± 0.15 ^a	3.91 ± 0.36 ^b	0.51 ± 0.04 ^c	89.45 ± 5.85 ^a

从表 11 结果来看, 添加菌剂可在一定程度上增加养分, 菌剂中未添加根际促生菌, 但起升温作用的微生物具备一定的养分分解释放的作用, KJ 组的 TN 含量、P₂O₅ 含量、K₂O 含量均最高, 同 CK 组差异均显著。电导率反映堆肥浸提液中可溶性盐的含量, KJ 组和 QX 组在发酵后可显著降低堆肥的含盐量。KJ 组终点 C/N : 初始 C/N 的值最小, 腐熟更为彻底。KJ 组在发酵后种子发芽指数显著高于 QX 组和 CK 组, 堆肥中有机酸等中间产物和 NH₃、H₂S 等毒性物质已被充分分解转化。以上 3 种堆肥产品均达到 NY/T 525—2021《有机肥料》的要求。

以腐熟度指标电导率、终点 C/N : 初始 C/N、种子发芽指数为最终评价指标, 可得出腐熟度为 KJ 组 > QX 组 > CK 组。这说明该生物有机肥发酵菌剂腐熟效果最优, 加速了堆肥腐熟。同时, 总养分结果表明, KJ 组和 QX 组的菌剂提高了堆体品质。

3 结 语

本文依托复合功能菌发酵多元辅料研制成一种水分散性生物有机肥发酵菌剂, 该发酵菌剂基质质量比为麦麸 : 稻糠 : 豆粕 = 18 : 7 : 25, 发酵条件为初始 pH 7.0、培养温度 30 °C、培养时间 7 d、接种量 5%、含水率 40%, 在发酵前添加 3% PEG6000 和 5% 吐温 80、烘干前添加 5% STPP 和 5% (NH₄)₂SO₄, 经 5 L 发酵罐放大后产 CMC 酶的酶活力为 1247.3 U/g, 中性蛋白酶的酶活力为 216.5 U/g, α -淀粉酶的酶活力为 21.9 U/g, H₂S 去除率为 58.7%, NH₃ 去除率为 63.1%, 有效活菌数为 7.86×10^9 g⁻¹, 润湿时间为 105.2 s, 悬浮率为 40.7%, 分散次数为 7.3 次, 水分散用量为 0.99%, 具有良好的贮藏稳定性。菌剂应用于豆粕堆肥中可加速腐熟, 制备的生物有机肥堆体总养

分(TN + P₂O₅ + K₂O)含量高达 5.54%,电导率为 2.67 mS/cm,终点 C/N : 初始 C/N 为 0.34, GI 高达 143.15%,符合国家农业行业标准 NY/T 525—2021 《有机肥料》的要求. 所用固态发酵基质成分简单、价格低廉、培养时间短、产水解酶的酶活力高,将水分散体系应用于生物有机肥发酵菌剂开发,兼具制备方法简易、成本低廉、分散性较好等优点;攻克了传统腐熟发酵菌剂发酵不充分、菌群单一、堆肥操作复杂等问题;适合规模化生产,本工艺稍作优化还可应用于饲料添加剂,在农业生产中具有实际应用意义.

参考文献:

- [1] KHUI P L N, RAHMAN M R, BAKRI M K B. A review on the extraction of cellulose and nanocellulose as a filler through solid waste management[J]. *Journal of thermoplastic composite materials*, 2021, 1(1): 1-22.
- [2] 李忠徽,王旭东. 不同发酵辅料下牛粪腐解过程温度和养分的变化规律[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 33(3): 471-477.
- [3] 叶峰. 降解 BTX 的复合微生物菌剂制备及高效降解菌的研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2009.
- [4] 魏蔚,吴昊,宋时丽,等. 复合菌剂对小麦秸秆降解速率、土壤酶和土壤微生物类群的影响[J]. *土壤*, 2019, 51(5): 955-963.
- [5] 宫玉胜,李玉成,吴旺宝,等. 中温(37℃)纤维素分解菌的筛选及混合培养研究[J]. *生物技术*, 2010, 117(2): 50-53.
- [6] 王勇. 秸秆纤维素降解菌的筛选及其腐熟剂的制备[D]. 太谷:山西农业大学,2019.
- [7] WANG L, WANG L Y, WANG D M, et al. Isolation and application of thermophilic and psychrophilic microorganisms in the composting process[J]. *Waste and biomass valorization*, 2014, 5(3): 433-440.
- [8] 彭宇,郭亚丽,马莹,等. 不同微生物菌剂对甘蔗渣有机肥发酵质量的影响[J]. *安徽农业大学学报*, 2016, 154(6): 961-966.
- [9] 罗立津,万立,陈宏,等. 耐低温降解生物质废弃物复合菌剂的混料设计优化[J]. *科技导报*, 2015, 33(8): 24-29.
- [10] 易旻. 耐高温纤维素降解菌分离筛选及其复合菌剂用于制取生化黄腐酸有机肥工艺研究[D]. 吉首:吉首大学,2017.
- [11] 张亚丽. 链霉菌 TD-1 代谢产生抑菌物质条件优化及分离纯化[D]. 天津:天津科技大学,2018.
- [12] 刘仁禄,陶兴无,许晓梅,等. 乳酸菌与酵母菌混合发酵麦芽汁饮料工艺研究[J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(4): 988-992.
- [13] 王佳宁. 猪粪堆肥复合菌剂制备及其效果评价[D]. 大连:大连理工大学,2017.
- [14] 魏玉梅,王峥业. 噻苯胺磺隆水分散粒剂配方筛选研究[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(18): 131-134.
- [15] YAN Z Y, LIU X F, YUAN Y X, et al. Deodorization study of the swine manure with two yeast strains[J]. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 2013, 18(1): 135-143.
- [16] KIM S H, BYUN G S, HONG S. Determination of ammonia in environmental samples using the diode laser/fiber optic colorimetric spectrometer[J]. *Optical engineering*, 2000, 39(7): 1985-1988.
- [17] 刘最,何姣姣,何丽芳,等. 一株纤维素降解菌分离鉴定及其活性初步测定[J]. *纤维素科学与技术*, 2017, 25(4): 42-47.
- [18] 张俊风,段新芳,李庆梅,等. 壳聚糖处理对柠条种子萌发及幼苗生长的影响研究[J]. *种子*, 2009, 28(9): 80-83.
- [19] 袁爱平. 猪粪除臭菌株的筛选、鉴定及复合菌制剂的初步应用[D]. 广州:华南农业大学,2018.
- [20] 师伟杰,裴晖平,秦嘉海,等. 制种玉米多功能复混肥对土壤理化性质的影响及最佳施肥量的研究[J]. *干旱地区农业研究*, 2013, 31(2): 66-72.
- [21] 牛彦波,吴皓琼,李智. 载体、灭菌方式及 pH 对生物肥料产品活菌数及保存期的影响[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2003(3): 36-39.
- [22] 王德汉,项钱彬,陈广银. 蘑菇渣资源的生态高值化利用研究进展[J]. *有色冶金设计与研究*, 2007(Z1): 262-266.
- [23] 何霜霜. 马铃薯黄萎病生防复合菌菌剂的研制[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2020.
- [24] 张亚宁. 堆肥腐熟度快速测定指标和方法的建立[D]. 北京:中国农业大学,2004.
- [25] SWEETEN J M, AUVERMANN B W. Composting manure and sludge[EB/OL]. [2022-02-26]. https://www.researchgate.net/publication/26905089_Composting_Manure_and_Sludge.
- [26] 鲁如坤. 土壤-植物营养学原理和施肥[M]. 北京:中国农业出版社,1998.

责任编辑:郎婧