

堆肥制作中微生物侵染秸秆的环境扫描电镜 (ESEM) 观察

朴哲^①, 李玉敏, 马帅, 陈德莹, 梅丽娟, 殷士学 (扬州大学环境科学与工程学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 为了探索堆肥制作中木质纤维素类物质的生物降解过程, 在堆肥进程中取不同分解阶段的秸秆样品, 利用环境扫描电镜 (ESEM) 观察微生物的分布情况, 并从机械作用的角度探讨了微生物在秸秆分解过程中的作用。结果表明, 堆肥制作前新鲜秸秆表面未发现微生物分布, 堆肥制作前期微生物开始附着在秸秆表面, 随着堆肥进程, 秸秆表面微生物密度有所增加, 秸秆分解时产生的裂缝中发现也有微生物分布。堆肥制作中, 参与秸秆分解的微生物以群落形式分布, 从个体形态来看, 这些微生物主要由球菌和丝状菌组成, 但不同形态微生物个体大小差异较大。分析认为大型丝状菌通过秸秆分解产生的裂缝侵入秸秆内部时所产生的机械作用可促进秸秆的崩解。

关键词: 堆肥; 微生物; 秸秆; 环境扫描电镜

中图分类号: X705 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673 - 4831(2011)05 - 0098 - 03

Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) Observation of Microbial Colonization Process in Straw Composting. PIAO Zhe, LI Yu-min, MA Shuai, CHEN De-ying, MEI Li-juan, YIN Shi-xue (School of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: To understand the biodegradation processes of rice straw in composting, samples of the straw were taken at different composting stages for observation on the environmental scanning electron microscope (ESEM) to explore distribution of microorganisms in the straw and their effects in decomposing the straw from the angle of mechanical action. Results show that no microorganisms were found on the surface of raw straw, and they began to appear on the surface of straw at the initial stage of composting. With the composting proceeding, the microorganisms grew dense on the surface and were also found in cracks formed on the straw in decomposing. Microorganisms participating in decomposing of straw were distributed in colonies, and dominated with cocci and hyphomycete, which varied sharply in individual size. The observation reveals that large-sized hyphomycetes intrude into cracks formed in the straw being composted creating mechanical action that helps break down the straw.

Key words: compost; microorganism; straw; environmental scanning electron microscope (ESEM)

堆肥是在人为控制条件下, 依靠自然界广泛分布的微生物, 将有机物转化为稳定的腐殖质类物质的生物化学过程。作为有机废弃物资源化、无害化、减量化处理的有效途径, 高温堆肥越来越受到人们的重视。有机废弃物中富含木质纤维素类物质, 而这些物质是堆肥制作中公认的难降解物质。如何快速分解木质纤维素类物质, 成为提高堆肥制作效率的关键^[1-2]。堆肥制作中微生物分解某种物质的前提是微生物分泌的酶能够和底物有效接触, 但通常酶的作用范围有限, 因此微生物与底物结合情况直接影响其降解效率。为了加快堆肥腐熟进程, 国内外学者围绕堆肥微生物 (如功能微生物) 筛选及其生物学特性、微生物群落及演替、快腐菌剂研制等方面开展了广泛而深入的研究, 但关于堆肥制作中微生物与堆肥底物如何结合等微观方面的研究鲜有报道^[3-7]。

对环境样品不需要进行任何处理, 可直接观察新鲜样品。笔者采集堆肥进程中不同分解阶段的秸秆样品, 利用 ESEM 观察秸秆分解过程中微生物的分布情况, 以期为促进堆肥制作中秸秆等难分解物质的降解提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 高温堆肥制作

堆肥原料为新鲜猪粪和稻秆, 稻秆作为调理剂用以调节孔隙度和 C/N 比值。堆肥原料性质见表 1。

将稻秆切成约 5 cm 长的小段, 与猪粪按 C/N 比值为 30 的比例均匀混合, 含水率 w 调整为 55%

收稿日期: 2011 - 04 - 26

基金项目: 国家自然科学基金 (22677047); 农业部农业公益性行业科研专项 (201103004)

① 通信作者 E-mail: piaozhe@yzu.edu.cn

环境扫描电镜 (ESEM) 是一种新型的扫描电

左右,堆成 1.5 m(直径)×1 m(高度)左右的锥型堆体,通过翻堆方式进行通风。堆肥制作前期即升温至高温阶段每天翻堆 1 次,降温至腐熟阶段每 3~5 d 翻堆 1 次。堆料中全 C 和全 N 等理化指标按文献[8]的方法测定。

表 1 堆肥原料性质

Table 1 Properties of the raw materials of the compost

材料	w/%					
	全 N	全 C	全 P	全 K	有机物	粗灰分
秸秆	0.51	43.8	0.08	1.23	85.7	9.8
猪粪	3.41	38.4	0.89	1.64	61.7	29.8

随着堆肥进程,堆肥温度变化出现明显的升温期(第 0~3 天)、高温期(第 4~21 天)、降温期(第 22~30 天)和稳定期(第 31~40 天)4 个阶段,符合好氧高温堆肥温度变化规律。采用 PCR-DGGE 技术分析微生物群落特征,发现堆体中微生物群落结构发生相应变化(另文待刊)。

1.2 取样

随着堆肥进程,每隔 2 d 从堆体采集秸秆样品,取样时尽量保持秸秆原样。取样点位于堆体中间离表层 15 cm 处,每次选 4 个不同位置。从采集的秸秆样品中,挑选能够反映不同分解阶段的秸秆样品,待观察。

1.3 环境扫描电镜观察

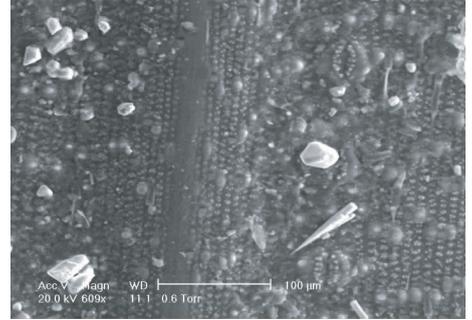
将待观察的秸秆切成 2 mm×2 mm 大小,用导电双面胶将样品贴在样品托上,用 Philips 公司生产的 XL-30 型 ESEM 进行观察。观察前,将 Peltier 样品台温度降至 0℃。观察时 Peltier 冷台温度选定为 5℃,样品室气压约为 6.7×10^2 Pa,相对湿度约为 85%,加速电压为 20 kV。

2 结果与讨论

通过 ESEM 观察发现,堆肥发酵前秸秆结构完整,秸秆表面无微生物分布(图 1)。堆肥制作第 2 天,微生物就已侵入并分布在秸秆表面(图 2),之后随着堆肥进程,分布在秸秆表面的微生物密度有所增加(图 3~4)。

堆肥 15 d 时,秸秆原有的结构被破坏,此时已进入分解阶段,微生物不仅分布在秸秆表面,而且还侵入到秸秆分解时产生的缝隙中(图 3~4)。分析认为当微生物侵入到秸秆内部时,微生物或其分泌的分解酶能够有效接触内部尚未分解的底物,这有利于秸秆的进一步分解,可加快秸秆腐熟进程。另一方面,秸秆分解时产生的缝隙中发现大型丝状菌,

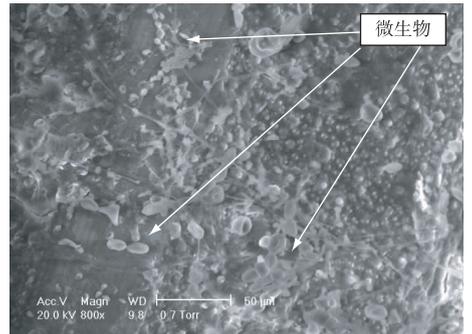
认为这些大型丝状菌通过狭小缝隙侵入秸秆内部时产生的挤压、扩张等机械作用,也有利于秸秆的崩解。



堆肥 0 d 时电镜扫描结果。

图 1 新鲜秸秆表面

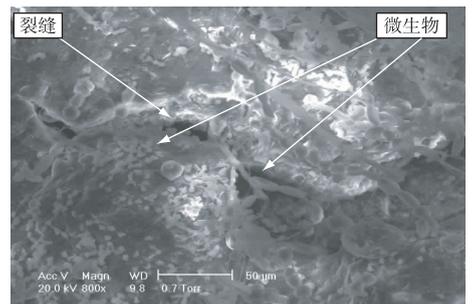
Fig. 1 Surface of fresh straw



堆肥 2 d 时电镜扫描结果。

图 2 堆肥前期秸秆表面

Fig. 2 Surface of the straw at the initial composting stage



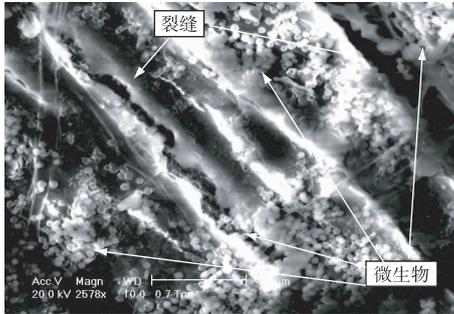
堆肥 15 d 时电镜扫描结果。

图 3 分解初期的秸秆及微生物分布

Fig. 3 Straw and distribution of microorganisms on the straw at the initial composting stage

在秸秆的分解过程中,微生物均以群落的形式分布。从个体形态特征来看,参与秸秆分解的微生物以球状体和丝状体为主,但两者大小差异明显(图 2~4)。认为球状体为单细胞球菌(细菌)、芽

孢及各种孢子的形态,丝状体为放线菌、霉菌等丝状菌的形态。可见,堆肥制作中不同类群的微生物共同参与秸秆的分解。



堆肥 30 d 时电镜扫描结果。

图 4 分解后期的秸秆及微生物分布

Fig. 4 Straw and distribution of microorganisms on the straw at the late composting stage

通过传统分离方法研究堆肥微生物的结果表明,杆菌是堆肥微生物中较为常见的类群^[9-11]。而笔者试验条件下,在整个秸秆分解过程中很少发现杆菌分布。分析其原因,认为一方面原位贫营养条件下杆菌生长受到抑制,用 ESEM 直接观察秸秆样品时,杆菌也表现为近球状;另一方面,在传统的分离培养条件下,可培养的堆肥微生物中杆菌比例较高,且生长速度快。关于堆肥制作中杆菌参与秸秆等难分解物质的分解问题还有待研究。

根据传统理论,堆肥制作前期中温微生物(如中温细菌、真菌等)分解易分解物质所产生的热能使堆体温度升高;进入高温期,嗜热微生物如嗜热芽孢菌、放线菌等替代中温微生物,继续分解纤维素等难降解物质;至降温腐熟期,中温放线菌、真菌重新替代嗜热微生物,使堆肥进一步腐熟^[12-15],即随着堆肥进程微生物群落发生演替。笔者通过 ESEM 直接观察堆肥制作中秸秆表面的微生物群落特征发现,随着堆肥进程,秸秆表面微生物群落在个体形态上没有明显变化,如参与秸秆分解的微生物主要由球状菌和丝状菌组成(图 2~4)。至于随着堆肥的进程这些个体形态(如球状或丝状)相似的微生物是否属相同的种类还有待研究。

笔者通过 ESEM 直接观察了堆肥制作中微生物侵染底物(秸秆)时期微生物群落分布和群落中微生物个体形态等特征,从机械作用的角度探讨了微生物在秸秆分解过程中的作用,即大型丝状菌通过秸秆分解产生的裂缝侵入秸秆内部时所产生的机械作用可促进秸秆的崩解。

3 结论

堆肥制作第 2 天微生物就已侵入秸秆表面,随着堆肥进程,秸秆表面微生物密度有所提高。在堆制过程中,参与秸秆分解的微生物以群落形式存在,从个体形态上看这些微生物以球菌和丝状菌为主,但个体大小有较大差异。随着堆肥进程,秸秆分解时产生的裂缝中也有微生物分布。

参考文献:

- [1] 朱能武. 堆肥微生物学研究现状与发展前景[J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(4): 36-40.
- [2] TUOMELA M, VIKMAN M, HALAKKA A, *et al.* Biodegradation of Lignin in a Compost Environment: A Review [J]. *Bioresource Technology*, 2000, 72(2): 169-183.
- [3] 傅以钢, 王峰, 何培松, 等. DGGE 污泥堆肥工艺微生物种群结构分析[J]. 中国环境科学, 2005, 25(增刊): 98-101.
- [4] 张建栋, 王梦亮, 刘滇生. PLFA 方法对堆肥化过程中微生物群落结构变化的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(3): 534-535.
- [5] 杨朝晖, 曾光明, 蒋晓云, 等. 城市垃圾堆肥过程中的生物学问题研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 57-61.
- [6] 李竺, 方萍, 陈玲, 等. 快速高效堆肥处理城市污泥微生物多样性研究[J]. 同济大学学报: 自然科学版, 2005, 33(5): 649-653.
- [7] 黄得扬, 陆文静, 王洪涛. 有机固体废物堆肥化处理的微生物学机理研究[J]. 环境污染治理技术与设备, 2004, 5(1): 12-18, 71.
- [8] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1999: 257-331.
- [9] 王伟东, 刘建斌, 牛俊玲, 等. 堆肥化过程中微生物群落的动态及接菌剂的应用效果[J]. 农业工程学报, 2006, 22(4): 148-152.
- [10] 喻曼, 许育新, 曾光明, 等. RFLP 法研究接种对农业废物堆肥微生物多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(2): 396-399.
- [11] 党秋玲, 刘驰, 席北斗, 等. 生活垃圾堆肥过程中细菌群落演替规律[J]. 环境科学研究, 2011, 24(2): 236-242.
- [12] ABDENNACEUR H, KAOUALA B, NACEUR J, *et al.* Microbial Characterization During Composting of Municipal Solid Waste[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 80(3): 217-225.
- [13] 张嘉超, 曾光明, 喻曼, 等. 农业废物好氧堆肥过程因子对细菌群落结构的影响[J]. 环境科学学报, 2010, 30(5): 1002-1010.
- [14] 马丽红, 黄懿梅, 李学章, 等. 牛粪堆肥化中氮素形态与微生物生理群的动态变化和耦合关系[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(12): 2674-2679.
- [15] 黄翠, 杨朝晖, 肖勇, 等. 堆肥嗜热纤维素分解菌的筛选鉴定及其强化堆肥研究[J]. 环境科学学报, 2010, 30(12): 2457-2463.

作者简介: 朴哲(1968—), 男, 朝鲜族, 吉林珲春人, 副教授, 博士, 主要从事有机废弃物资源化处理方面的研究。E-mail: piaoche@yzu.edu.cn