

特定有益菌对奶牛粪便中温厌氧消化体系稳定性和指示菌存活的影响

孙翠平, 柴同杰, 张红双, 姚美玲, 李晓霞, 段会勇

(山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 本文研究了添加假单胞菌、芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌和放线菌对奶牛粪便中温 (35 ℃) 厌氧消化过程中消化体系稳定性和指示菌 (粪大肠菌群、产气荚膜梭菌、厌氧菌和需氧菌) 存活情况的影响。通过采用 1 L 抽滤瓶作为消化罐, 置于恒温箱内 35 ℃ 模拟中温厌氧消化。检测厌氧消化过程中粪大肠菌群、产气荚膜梭菌、厌氧菌和需氧菌数量的变化, 同时对挥发性脂肪酸(VFA) 含量、NH₄⁺-N 含量和 pH 值等指标进行测定。结果发现, 在厌氧消化体系中添加假单胞菌、芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌和放线菌对整个消化过程中 VFA 含量、NH₄⁺-N 含量和 pH 值没有显著影响 ($P>0.05$), 但可提高酸化阶段丁酸和乙酸的产量, 降低丙酸的产量, 有利于形成一个良好、稳定的厌氧消化体系。添加的微生物可以显著促进粪大肠菌群数量的减少 ($P<0.05$), 但对产气荚膜梭菌、厌氧菌和需氧菌的数量并没有显著的影响 ($P>0.05$)。试验结果表明, 假单胞菌、芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌和放线菌在厌氧消化处理畜禽排泄物过程中的应用有一定的理论推广价值, 其实际应用的研究有待进一步开展。

关键词: 牛粪; 中温厌氧消化; 有益微生物; 指示菌

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)03-1183-07

The Effects of Selected Effective Bacteria on Gas Production and Survival of Indicative Bacteria During Mesophilic Anaerobic Digestion of Dairy Cattle Dung

SUN Cui-ping, CHAI Tong-jie, ZHANG Hong-shuang, YAO Mei-ling, LI Xiao-xia, DUAN Hui-yong
(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: The study was to evaluate inactivation of indicative bacteria or bacterial flora: *Fecal Coliforms*, *C. perfringens* (*Clostridium perfringens*), the total number of anaerobic and aerobic bacteria, by bioaugmenting anaerobic digestion of cow dung slurry with a commercial product containing selected strains of bacteria from genera *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Microzymes* and *Actinomycetes*, along with ancillary organic compounds containing various micronutrients. Specifically, the effects of the bioaugment on the concentration of volatile fatty acids, NH₄⁺-N, the value of pH, the number of *Fecal Coliforms* and *C. perfringens* during anaerobic digestion of dairy cattle dung slurry were studied. The results indicated that the bioaugmenting anaerobic digestion could reduce the number of *Fecal Coliforms* significantly ($P<0.05$), as well as could be of advantage to form a better and more stable digestive system, however, no obvious effect on reduction of the number of *C. perfringens*, the total number of anaerobic and aerobic bacteria were observed. The bioaugmenting anaerobic digestion could not significantly affect the output of volatile fatty acids (VFA), NH₄⁺-N and the value of pH ($P>0.05$). In brief, the bioaugmenting anaerobic digestion could improve anaerobic digestive microecology and could be used for treatment of dairy cattle dung slurry before their land application.

Keywords: dairy cattle dung; mesophilic anaerobic digestion; effective microorganism; indicator bacterium

收稿日期: 2007-07-04

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划课题: 畜禽养殖污染物减排和废弃物资源循环利用技术研究与示范”之课题 9 畜禽养殖环境污染物监测与减排技术研究” (2006BAD14B09)

作者简介: 孙翠平 (1983—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为畜禽排泄物的无害化处理研究。E-mail: suncp2002@163.com

通讯作者: 柴同杰

中国是世界上重要的牛奶生产大国之一。2005年中国牛奶生产量达2 865万t,奶牛存栏数为1 216万头。随着畜牧业的不断发展,奶牛养殖业的经营方式逐渐由分散饲养向集约化、规模化转变。这种经营方式的转变,给奶牛粪便的卫生化处理带来很大困难,引起了严重的环境污染。粪便中的病原微生物特别是人畜共患病的病原菌通过污染水、空气和土壤,引起疾病的爆发和流行,危害人和动物的健康。

厌氧消化是具有很大推广价值的一种粪便处理方法。厌氧消化粪便废水不仅可以降解其含有的大量有机质,而且还可以杀死其中的病原微生物;厌氧消化的另一个优势在于它的最终产物甲烷是一种能源,可以用来取暖或发电,以减少对石油能源的需求。有关厌氧消化有机物过程中可促进病原菌消亡的研究已有不少报道^[1-5]。活菌数量在消化过程中的消亡情况可以用 T_{90} (the decimation reduction time)值来表示^[6]。厌氧消化处理有机废弃物过程中不同细菌在不同温度条件下消亡速率和 T_{90} 值并不一样^[4,7]。由于可以形成孢子的缘故,产气荚膜梭菌和蜡样芽孢杆菌在高温和中温厌氧消化过程中数量都没有明显减少^[7,8]。

虽然高温杀菌效率很高,但维持高温必需提供能量,而且中温菌种类多,易于培养驯化、活性高,因此中温厌氧消化在生产中更加普及^[9]。但是,中温厌氧消化对致病菌的杀菌效果不如高温厌氧消化^[3,10]。因此,本实验旨在通过添加假单孢菌、放线菌、乳酸菌、酵母菌和芽孢杆菌促进中温厌氧消化牛粪过程中致病菌的消亡,提高中温厌氧消化的杀菌效果,降低粪便中病原微生物对空气、土壤、水源的污染,减少疾病特别是人畜共患病的发生与流行,使厌氧消化残渣作为有机肥料的使用更加安全。

1 材料与方法

1.1 试验设计

厌氧消化反应器由1 L带橡胶塞的抽滤瓶改装而成,抽滤口接橡皮管用于收集气体。厌氧消化反应器有效利用体积为800 mL,一次性进料后置于恒温

箱中35℃厌氧消化,运行周期为25 d。

试验组的厌氧消化反应器中加入1% (V/V)的特定有益微生物,对照组的厌氧消化反应器不加作为对照。每组两个重复,所得结果为两个重复的平均值。因为产气荚膜梭菌在粪便中存在的量少,达不到计数方法的检测下限水平,为提高其在消化液中的含量,在每个厌氧消化反应器中加入40℃培养24 h的产气荚膜梭菌肉汤0.5 mL^[19]。

产气荚膜梭菌为山东农业大学动科院微生物教研室保存。进料由新鲜奶牛粪便8% TS加10% (V/V)的种泥混合而成。种泥取自正在发酵的厌氧消化池污泥。添加的微生物制剂为液态制剂,活菌浓度为 $1\times 10^8\sim 1\times 10^9$ 个·mL⁻¹,由山东农业大学生科院提供。

1.2 相关指标的测定

消化液中挥发性脂肪酸(VFA)浓度采用配有氢离子火焰检测器的气相色谱仪(岛津GC-9A,日本)测定。样品预处理参照文献[11]进行。

测定条件:载气,氩气,50 mL·min⁻¹;H₂流量,50 mL·min⁻¹;空气流量,500 mL·min⁻¹;柱温,140℃;检测温,180℃;气化温,180℃;灵敏度,10²×2²;进样量,1 μL;检测器,FID。VFA标准品均为分析纯。

NH₄⁺-N的含量测定使用紫外分光光度计(UV-120-02),参照Weatherburn的方法进行^[12]。

pH值采用精密pH计(PHS-3C,上海)测定。

1.3 细菌计数

所取样品用0.9%灭菌生理盐水10倍倍比稀释,选择合适的3个连续稀释度接种于不同培养基进行厌氧菌、需氧菌、粪大肠菌群和产气荚膜梭菌计数。所用计数方法及主要培养基见表1。

接种厌氧菌、需氧菌的平板分别置于厌氧培养箱(YQX型,上海)、恒温箱(YY0027-90,上海)35℃培养24 h后观察结果。为了降低计数误差,如果培养基中有针尖状极小菌落,则继续培养至48 h后进行菌落计数。

1.4 数据分析

应用MICROSOFT EXCEL软件对数据进行初步

表1 细菌计数的方法和主要培养基
Table 1 Methods and major cultures for bacterial enumeration

细菌	计数方法	培养基
需氧菌	平板菌落计数法	普通营养琼脂
厌氧菌	平板菌落计数法	绵羊血琼脂
粪大肠菌群	多管发酵法(GB 5750—85)	乳糖胆盐发酵管等
产气荚膜梭菌	倾注平板法(GB/T 4789.13—2003)	SPS培养基等

整理并作图分析。 T_{90} 值参照 Olsen 和 Larsen 的方法进行计算^[7]。采用 SAS (Statistical Analysis System) v6.12 软件进行相关数据的统计分析。

2 结果与分析

2.1 厌氧消化过程中 pH 值的变化

pH 值是影响厌氧消化微生物活动过程的最重要因素之一。大量试验及实践经验表明,中温厌氧生物处理系统应维持的 pH 值比中温细菌要求的最适值略高,即 pH 值 7.0~7.6,以 7.2~7.3 最佳^[13]。从图 1 可以看出,厌氧消化 5 d 后,试验组和对照组的 pH 值均呈上升趋势,此后两组消化体系的 pH 值均稳定在 7.24~7.8 之间,这说明消化体系在整个运行过程中均处于良好、稳定的 pH 环境。对样本均值的 t 检验结果表明,试验组与对照组 pH 差异不显著 ($P>0.05$)。这说明特定有益微生物的添加并不会显著影响消化体系的 pH 值。这可能是由于消化体系具有良好的酸碱缓冲能力,能够缓冲由于微生物的添加对体系 pH 值的影响。

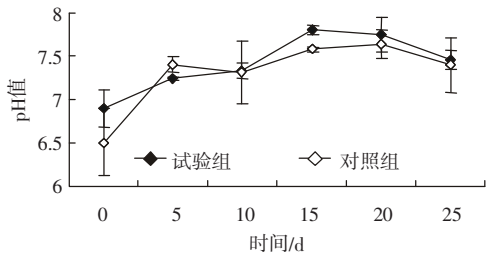


图 1 厌氧消化过程中的 pH 值

Figure 1 The pH value during anaerobic digestion

2.2 厌氧消化过程中 VFA 含量

短链脂肪酸是厌氧消化的重要中间产物,因此它的含量和成分变化可以作为系统正常运行的监测指标^[13]。本试验测定了乙酸、丙酸和丁酸 3 种挥发性脂肪酸。图 2 显示厌氧消化过程中试验组和对照组乙酸、丙酸和丁酸含量的变化情况。在第 5 d 和第 10 d,测定的对照组丙酸含量明显高于试验组丙酸含量,而第 5 d 试验组丁酸、乙酸的含量也明显高于对照组。在整个消化过程中,试验组平均丁酸、乙酸总浓度比对照组分别高 83.73%、9.33%。相反,丙酸的平均总浓度比对照组浓度低 17.78%。这可能是由于添加的微生物大多属于丁酸型发酵菌,在分解有机物时倾向于产生丁酸和乙酸,所以引起丁酸、乙酸产量的提高和丙酸产量的下降。或者添加的微生物有助于消化体系产酸相应形成稳定的丁酸型发酵类型,从而致使丁酸

和乙酸产量增加,并相应地减少了有机物分解所形成的丙酸的量。但统计分析显示,试验组和对照组乙酸、丙酸、丁酸的含量差异均不显著 ($P>0.05$)。这说明添加特定有益微生物虽然在厌氧消化前期(酸化阶段),可明显降低丙酸的积累,提高丁酸、乙酸的含量,但对整个厌氧消化过程中 3 种挥发性脂肪酸的含量并没有显著影响。因此,添加的微生物可以增强消化体系在产酸阶段的稳定性,但对整个消化过程的一些重要因素如 pH 值、挥发性脂肪酸含量等无显著影响。

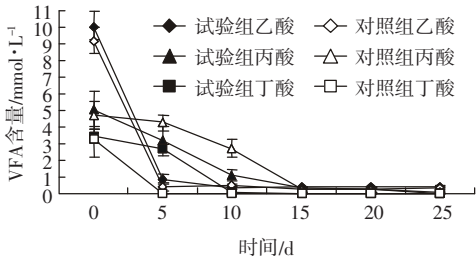


图 2 厌氧消化过程中乙酸、丙酸和丁酸的含量

Figure 2 Concentration of acetic acid, propionic acid and butyric acid during anaerobic digestion

2.3 厌氧消化过程中氨态氮含量的变化

NH_3 的存在对厌氧过程非常重要,一方面高浓度的 NH_3 对细菌有抑制作用^[14];另一方面它也是微生物的营养物质,为细菌生长的主要氮源。氨态氮含量在整个厌氧消化过程中的变化如图 3 所示。消化初期,随着发酵细菌对蛋白质、氨基酸等含氮物质的不断分解,体系的氨态氮含量不断增加。随着酸化阶段向产甲烷阶段的过渡,产甲烷菌开始大量生长繁殖,作为其惟一氮源的氨态氮不断被消耗,氨态氮的消耗量大于生产量,氨态氮的含量开始降低。消化后期,由于产甲烷菌代谢底物的减少,产甲烷菌的生长繁殖受到抑制,因此,氨态氮的需求量减少,氨态氮含量再次升高。统计结果显示,试验组的氨态氮含量与对照组的氨态氮含量差异也不显著 ($P>0.05$)。由此说明,添加的有益微生物对消化液中氨氮含量也没有显著影响。这可能是因为添加的微生物利用自身分解有机物产生的氨态氮作为氮源,所以不会显著影响消化过程中氨态氮的含量。

2.4 厌氧消化过程中粪大肠菌群、产气荚膜梭菌、厌氧菌和需氧菌的数量变化

图 4 显示了厌氧消化过程中的粪大肠菌群数量的变化情况。可以看出,虽然前 5 d 消化体系具有较低的 pH 值(图 1)和较高的挥发性脂肪酸浓度(图

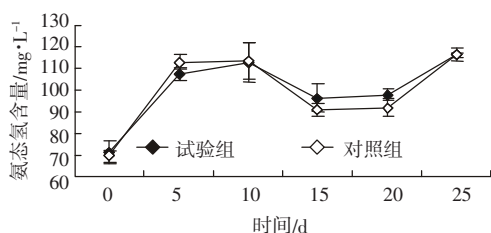


图3 厌氧消化过程中氨态氮含量

Figure 3 Concentration of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ during anaerobic digestion

2), 试验组和对照组的粪大肠菌群数量并没有明显变化(图4), 这可能由于短链脂肪酸是粪大肠菌群中大部分细菌的生长基质, 可以提高其对酸性不良环境的抵抗力^[15]。随着厌氧消化的进行, 试验组的粪大肠菌群数量呈线型下降, 下降速率明显高于对照组, 两组粪大肠菌群数量的差异达显著水平 ($P < 0.05$)。试验组和对照组的 T_{90} 值分别为 3.47 d 和 5.09 d。可以看出, 添加的有益微生物对厌氧消化过程中粪大肠菌群细菌的死亡有显著影响, 可明显促进厌氧消化体系中粪大肠菌群细菌的消亡。20 d 后, 虽然试验组的粪大肠菌群的数量远低于对照组, 但两组数量降低趋势均趋于平缓, 呈现明显的“托尾”现象。McGee 等人在检测牛粪污泥中 *Escherichia coli* O157:H7 的数量变化时发现一个堆肥牛粪堆中出现了类似现象^[16]。Hutchison 等人也发现粪大肠菌群在牛粪堆放过程中出现了一定程度的“托尾”现象^[17]。关于这种现象的解释有以下3种假设: (1) 细菌向消化罐中某个特殊区域聚集, 造成消化体系中细菌的分布不均匀; (2) 在计数时, 多个细菌群集在一起形成一个菌落, 如果试验计数方法没有将他们分开, 即使细菌的消亡呈对数线性下降也观察不到。(3) 通过长期的选择, 少量细菌对消化体系中的环境逐渐适应、对不良生长条件形成抗性而生长繁殖。

可能由于后期厌氧环境的形成、芽孢的产生以及长期驯化对环境的适应, 产气荚膜梭菌数量虽然在前

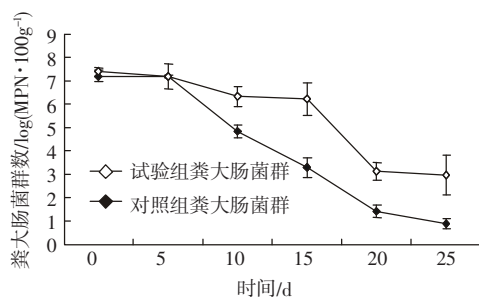


图4 厌氧消化过程中粪大肠菌群的数量

Figure 4 Survival of *Fecal Coliforms* during anaerobic digestion

10 d 呈线型下降, 但在第 10~25 d 内一直维持在 27 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右不减少。试验组与对照组的产气荚膜梭菌数量差异不显著 ($P > 0.05$), T_{90} 值分别为 10.03 d 和 11.18 d (图5)。说明添加微生物对消化过程中产气荚膜梭菌的数量无显著影响。这可能是由于产气荚膜梭菌能够生成芽孢, 从而抵抗和耐受不良生存环境的缘故, 也可能是添加的微生物不会对其生长繁殖产生不利影响的缘故。试验组和对照组的厌氧菌 T_{90} 值分别为 23.03 d 和 23.4 d, 需氧菌的 T_{90} 值分别为 18.57 d 和 17.57 d。统计分析结果显示, 试验组需氧菌和厌氧菌数量与对照组需氧菌和厌氧菌数量差异不显著 ($P > 0.05$)。可以看出, 添加的有益微生物对消化体系中需氧菌和厌氧菌的存活并没有显著影响。说明添加的微生物虽然可以促进部分微生物的消亡, 如粪大肠菌群, 但它本身的添加也导致消化体系细菌数量的增加, 从而致使微生物添加对消化体系细菌总数影响不明显。从图5可以看出, 厌氧菌和需氧菌数量在整个厌氧消化过程中降低较缓慢, 消化前后数量变化不大。这说明厌氧消化的杀菌效果有待进一步提高, 消化残渣中病原菌含量有必要进行进一步检测, 消化残渣作为有机肥料的生物安全性有待评估。值得一提的是, 像产甲烷菌等专性厌氧菌在本实验的厌氧培养条件下并不能生长, 因此, 厌氧菌计数的测定值远小于消化液的厌氧菌真实值。所以本试验测定的厌氧菌数量变化仅可反映常规可培养的厌氧菌在厌氧消化过程中的存活情况。

2.5 厌氧消化过程中影响细菌数量变化的因素分析

低 pH 值和高浓度的质子化挥发性脂肪酸具有杀菌作用^[1, 15]。但由图4和5可以看出, 试验组和对照组厌氧消化体系中细菌数量变化发生在 5 d 以后, 此

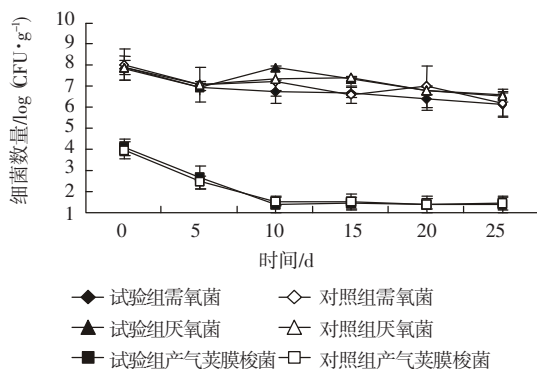


图5 厌氧消化过程中产气荚膜梭菌、厌氧菌和需氧菌数量

Figure 5 Survival of *Clostridium perfringens*, anaerobic bacteria and aerobic bacteria during anaerobic digestion

时两组的 pH 值均处于中性偏碱的范围。在此 pH 范围内,挥发性脂肪酸的质子化程度很低,起不到杀菌作用。作为厌氧消化污泥中细菌主要生长基质成分之一,游离氨也是引起细菌和病毒死亡的主要因素^[20]。在常温下,可引起革兰氏阴性细菌大量死亡的游离态氨的最低浓度为 30 mmol·L⁻¹^[21]。细菌数量与氨态氮含量、pH 值的相关分析表明(表 2),试验组需氧菌数量与氨态氮含量呈显著负相关($P<0.05$),而对照组需氧菌数量与氨态氮含量的相关系数未达显著水平($P>0.05$)。这说明添加的微生物可以增强氨态氮对需氧菌的抑菌或杀菌作用,但并不能增强氨态氮对厌氧菌的抑菌或杀菌,目前对这一现象还无法解释。试验组和对照组产气荚膜梭菌数量与 pH 值分别呈显著($P<0.05$)和极显著负相关($P<0.01$),这说明消化液中的 pH 值对产气荚膜梭菌的存活有显著影响(回归分析略)。厌氧菌和粪大肠菌群数量与两因素的相关性在两组中均未达显著水平($P>0.05$)。但有意思的是试验组粪大肠菌群数量与两因素负相关系数的绝对值均大于对照组粪大肠菌群数量与两因素负相关系数的绝对值。这说明虽然添加有益微生物对 pH 值和氨态氮含量影响不显著,但可在一定程度上加强两因素对粪大肠菌群在厌氧消化过程中消亡的影响。同时说明除 pH 值和氨态氮含量外,还有更重要的影响消化过程中粪大肠菌群数量变化的影响因素。

3 讨论

Fukushi 等人采用 500 mL 锥形瓶作为消化罐模拟厌氧消化,取得了很好的效果,说明较小的消化罐也可以很好的模拟厌氧消化反应体系^[15]。因此本实验采用 1L 抽滤瓶作为厌氧消化奶牛粪便的消化罐,探讨添加芽孢杆菌、假单孢菌、放线菌、酵母菌和乳酸杆菌对厌氧消化过程中消化体系稳定性和需氧菌、厌氧菌、粪大肠菌群及产气荚膜梭菌的数量的影响。

3.1 添加的微生物对消化体系稳定性的影响

产甲烷菌可以直接利用乙酸产生甲烷,产甲烷细菌对丁酸的转化速率也远高于对丙酸的转化速率^[9],因此,大量丙酸的产生往往导致丙酸的积累,而引起厌氧反应器中 pH 值降低,即导致反应器酸化,并因此影响产甲烷菌的活性,对产甲烷菌生长繁殖有抑制作用^[13]。在本试验中,添加的有益微生物对整个厌氧消化过程中乙酸、丙酸和丁酸的产量没有显著影响,但在酸化阶段试验组的丙酸产量明显低于对照组,丁酸和乙酸产量也明显高于对照组(图 2)。这与 Metin 的研究结果一致。说明添加的微生物能够促进发酵过程中乙酸和丁酸的生成,减少丙酸的产生,防止反应器酸化,有利于产酸阶段向产甲烷阶段的过渡,形成了一个更加稳定,良好的厌氧消化体系。

3.2 添加的微生物对指示菌的影响

关于粪大肠菌群在厌氧消化过程中数量变化的研究报道已有很多。Christian 等人研究发现在 36±1 ℃ 的温度下,厌氧消化已经好氧处理的废水,20 d 后,粪大肠菌群数量减少了 1~2 lg(CFU·100 mL⁻¹)^[8]。Michael 利用连续消化反应器和分批消化反应器相结合,高温(51~55 ℃)厌氧消化有机废弃物,在水力停留时间为 4~4.3 d 的连续消化反应过程中,粪大肠菌群去除量达 3.6~4.9 lg(MPN·g⁻¹ TS),而后期分批消化在 2 h 内,粪大肠菌群数量就降低到 1 000 MPN·g⁻¹ TS 含量以下^[9]。在本试验中,试验组的粪大肠菌群数量在整个消化过程中减少了 6.3 lg (MPN·100 g⁻¹),对照组减少了 4.42 lg (MPN·100g⁻¹)。试验组的消化残留液中的粪大肠菌群含量为 0.9 lg (MPN·100 g⁻¹),远低于国家规定的废水排放标准(1 000 MPN·100 g⁻¹)。这说明添加的微生物可以显著降低厌氧消化过程中的粪大肠菌群存活率,从而提高厌氧消化残液作为有机肥施于土壤的生物安全性。添加的微生物之所以促进厌氧消化过程中的粪大肠菌群细菌的死亡,原因可能有以下 3

表 2 细菌数量与氨态氮含量、pH 值的相关系数

Table 2 Correlation coefficients between bacterial numbers and concentration of NH₄⁺-N, pH value

影响因子	需氧菌	厌氧菌	粪大肠菌群	产气荚膜梭菌
氨态氮(试验组)	-0.819 2 [*]	-0.512 1	-0.448 1	-0.762 6
pH (试验组)	-0.768 0	-0.516 0	-0.767 3	-0.850 0 [*]
氨态氮(对照组)	-0.632 8	-0.708 4	-0.291 4	-0.640 8
pH (对照组)	-0.791 6	-0.691 7	-0.529 1	-0.918 9 ^{**}

注:* 表示相关系数达显著 ($P<0.05$) 差异水平;** 表示相关系数达极显著 ($P<0.01$) 差异水平

Note: * denote correlation coefficient significantly different at 0.05 probability level; ** denote correlation coefficient significantly different at 0.01 probability level

种:第一,由于奶牛粪便的消化液可以为添加的微生物提供充足的营养,致使其大量生长繁殖,并与粪大肠菌群中的细菌竞争营养物质,从而导致粪大肠菌群细菌的快速死亡。第二,添加的微生物可以分泌一些物质,这些物质对粪大肠菌群细菌有抑制甚至杀伤作用。如放线菌可产生抗生物质,能直接抑制病原菌。芽孢杆菌能够产生细菌素,具有抑制细菌生长和溶解细胞的作用^[22,23]。第三,以常温下 NH_3 的解离常数进行计算,在本试验中,试验组中游离氨的浓度为 $0.39\sim 3.10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对照组中游离氨的浓度为 $0.12\sim 1.99\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但考虑到在本试验温度为 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下, NH_3 的解离常数 pK_a 以及游离氨杀菌效果都会有所提高,因此也可能是因为添加的微生物对蛋白质的快速降解引起了消化液中游离氨浓度的升高,从而加快了粪大肠菌群细菌的死亡。但统计分析结果表明这并不是主要因素。

已往研究表明,由于产气荚膜梭菌产生芽孢抵抗不良环境,厌氧消化仅能抑制其生长繁殖,并不能消除畜禽粪便等有机废弃物中存在的产气荚膜梭菌^[7,19]。可能因为刚加入的产气荚膜梭菌对消化反应瓶中环境的不适应,细菌数量在 $0\sim 10\text{ d}$ 呈线性下降,统计分析显示影响产气荚膜梭菌繁殖体数量下降的主要因素是 pH 值。但添加的微生物对消化液中产气荚膜梭菌的生长并没有显著影响。产气荚膜梭菌在消化残渣中含量较高,因此,如有动物患有产气荚膜梭菌引起的疾病,其粪便必须进行特殊消毒处理,以防疾病的传播与流行。

关于消化过程中细菌数量变化的研究多集中于病原菌和一些污染指示菌方面^[4,5,15,19,24]。对于常规可培养厌氧菌和需氧菌的研究未见报道。从图 5 可以看出,无论在试验组还是对照组,需氧菌和厌氧菌数量在整个消化过程中一直处于较高水平,下降并不明显。结合以往报道,除一些产芽孢细菌如产气荚膜梭菌、蜡状芽孢杆菌之外,大多数病原菌和指示菌数量在消化过程中都有不同程度的减少,包括本试验中的粪大肠菌群数量也有明显下降。但是,根据粪大肠菌群的“托尾”现象、产芽孢细菌数量消化后期的不减少以及本试验中的厌氧菌和需氧菌在消化过程中的高水平存在可以推断,在厌氧消化残渣中仍含有一定量的致病菌。这些潜在的病原菌一旦遇到适宜的生长环境,便会大量生长繁殖^[25]。因此,厌氧消化残液如不作进一步消毒处理,建议仅施用于耕地,勿施于即将进入收获期的菜园、果园或牧场,以防潜在的病原菌人

或动物的食物链,引起疾病的爆发与流行。

综上所述,添加假单胞菌、芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌和放线菌可以显著加速粪大肠菌群细菌的消亡,从而提高中温厌氧消化对畜禽排泄物的消毒效果。同时添加上述有益微生物还可以促进形成一个良好、稳定的厌氧消化体系。因此,假单胞菌、芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌和放线菌在厌氧消化处理畜禽排泄物过程中的应用有一定的理论推广价值,其实际应用的研究有待进一步开展。

参考文献:

- [1] Abdul P, Lloyd D. Pathogen survival during anaerobic digestion: Fatty acids inhibit anaerobic growth of *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 1985, 7:125-128.
- [2] John Elmerdahl Olsen. Studies on the reduction of pathogenic and indicator bacteria in liquid pig manure treated by sedimentation and anaerobic filter digestion for methane generation[J]. *Biological Wastes*, 1988, 24(1): 17-26.
- [3] Watanabe H, Kitamura T, Ochi S, et al. Inactivation of pathogenic bacteria under mesophilic and thermophilic conditions[J]. *Water Sci Technol*, 1997, 36: 25-32.
- [4] Kuma R, Gupta M K, Kanwar S S. Fate of bacterial pathogens in cattle dung slurry subjected to anaerobic digestion [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1999, 15: 335-338.
- [5] Caroline Côté, Daniel I Massé, Sylvain Quessy. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 686-691.
- [6] Schlundt J. Survival of pathogenic enteric bacteria in anaerobic digestion on slurry-treated land[J]. *Dissertation Abstracts International*, 1984, 45(4): 1025.
- [7] John Elmerdahl Olsen, Holger Errebo Larsen. Bacterial decimation times in anaerobic digestion of animal slurries[J]. *Biological wastes*, 1987, 21(3): 153-168.
- [8] Christian Chauret, Susan Springthorpe, Syed Sattar. Fate of Cryptosporidium oocysts, Giardia cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1999, 45: 257-262.
- [9] 任南琪,王爱杰. 厌氧生物技术原理与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
REN Nan-qi, WANG Ai-jie. Principles and applications of anaerobic biotechnology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
- [10] John Elmerdahl Olsen, Jørgen Berg Jørgensen, Peter Nansen. On the reduction of Mycobacterium paratuberculosis in bovine slurry subjected to batch mesophilic or thermophilic anaerobic digestion[J]. *Agricultural wastes*, 1985, 13(4): 273-280.
- [11] 王正兰,李兰英. 沼气发酵液中挥发性脂肪酸的快速气相色谱法测定[J]. 太阳能学报, 1988, 9 (2): 215-219.
WANG Zheng-lan, LI Lan-ying. A fast gas chromatographic analysis of VFA in anerobic digestion[J]. *Acta Energiæ Solaris Sinica*, 1988, 9 (2):

215–219.

- [12] Weatherburn M W. Phenol–Hypochlorite reaction for determination of ammonia[J]. *Analytical Chemistry*, 1967, 39(8): 971–974.
- [13] 马溪平. 厌氧微生物学与污水处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- MA Xi–ping. Anaerobic microbiology and sewage treatment[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [14] Leejeerajumnean A, Ames J M, Owens J D. Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 30: 385–389.
- [15] Fukushi K, Babel S, Burakrai S. Survival of *Salmonella* spp. in a simulated acid–phase anaerobic digester treating sewage sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 86: 177–181.
- [16] McGee P, Bolton D J, Sheridan J J, et al. The survival of *Escherichia coli* O157:H7 in slurry from cattle fed different diets[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 32: 152–155.
- [17] Hutchison M L, Walters L D, Moore A, et al. Declines of zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on–farm[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99: 58–65.
- [18] Metin Duran, Nalan Tepe, Deniz Yurtsever, et al. Bioaugmenting anaerobic digestion of biosolids with selected strains of *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Actinomyces* species for increased methanogenesis and odor control[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 73: 960–966.
- [19] Michael D Aitken, Mark D Sobsey, Mina Shehee, et al. Laboratory evaluation of thermophilic –anaerobic digestion to produce class A biosolids. 2. Inactivation of pathogens and indicator organisms in a continuous–flow reactor followed by batch treatment [J]. *Water Environment Research*, 2005, 77(7): 3028–3036.
- [20] Ottoson J, Nordin A, von Rosen D, et al. *Salmonella* reduction in manure by the addition of urea and ammonia [J]. *Bioresource Technology*, 2007, doi: 101016/j.biortech.2007.04.009.
- [21] Park G W, Diez–Gonzalez F. Utilization of carbonate and ammonia–based treatments to eliminate *Escherichia coli*. O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 from cattle manure[J]. *Appl Microbiol*, 2003, 94: 675–685.
- [22] 郑 虹, 施巧琴, 等. 芽孢杆菌对养殖水体净化作用的比较研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(6): 41–44.
- ZHENG Hong, SHI Qiao–qin, et al. Comparison of *Bacillus* sp. on depuration of aquaculture water–body[J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(6): 41–44
- [23] 刘永锋, 陈志谊, 等. 枯草芽孢杆菌 Bs–916 的抑菌活性及其抑菌物质初探[J]. 农药学报, 2007, 9 (1): 92–95.
- LIU Yong–feng, CHEN Zhi–yi. Analysis on the antifungal activity of *Bacillus subtilis* strain Bs–916 and its extract[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2007, 9 (1): 92–95.
- [24] Horana N J, Fletcher L, Betmal S M, et al. Die–off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion [J]. *Water Research*, 2004, 38: 1113–1120.
- [25] Reza Iranpour, Huub H J Cox. Recurrence of *Fecal Coliforms* and *Salmonella* Species in biosolids following thermophilic anaerobic digestion[J]. *Water Environment Research*, 2006, 78(9): 1005–1012.