

牛粪再生垫料生产过程中物料特性及致病菌变化

杜云¹, 王盼柳¹, 王斌圣¹, 段娜^{1,2*}, 施正香^{1,2}, 张源辉^{1,3}, 宋家西⁴

(1. 中国农业大学水利与土木工程学院, 农业农村部设施农业工程重点实验室, 北京 100083; 2. 北京市畜禽健康养殖环境工程技术研究中心, 北京 100083; 3. 美国伊利诺伊大学香槟校区农业与生物工程系, 伊利诺伊 IL61801; 4. 哈尔滨华美亿丰复合材料有限公司, 哈尔滨 150000)

摘要: 不同垫料生产方式因工艺差异导致垫料存在生物安全隐患, 不利于垫料技术的推广, 滚筒发酵具有高温、快速等优势, 探讨其垫料生产过程的致病菌变化特征, 可为解决产业问题提供支持。该研究以滚筒好氧发酵生产牛粪再生垫料过程为研究对象, 采用平板培养法对夏季和冬季垫料生产过程中滚筒不同位置处奶牛乳房炎主要致病菌(大肠杆菌、链球菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯氏菌)数量进行检测, 同时检测了物料的理化特性, 并进一步探究了影响奶牛乳房炎致病菌变化的主要因素。结果表明, 夏、冬季滚筒发酵生产牛粪再生垫料过程中筒仓内温度较稳定, 滚筒内部温度可维持在 55℃以上; 成品垫料的含水率均低于 45%; 链球菌和克雷伯氏菌在垫料成品中均未检出, 夏季垫料成品中的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌检测数量高于冬季; Pearson 相关性分析结果表明, 在选取的理化指标中影响致病菌数量变化的最主要因素为滚筒温度, 其次为总碳。该研究为滚筒发酵生产牛粪再生垫料技术的应用及推广提供支撑。

关键词: 生产; 发酵; 牛粪再生垫料; 物料特性; 奶牛乳房炎致病菌; Pearson 相关性

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.18.024

中图分类号: S2; S18

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2020)-18-0197-07

杜云, 王盼柳, 王斌圣, 等. 牛粪再生垫料生产过程中物料特性及致病菌变化[J]. 农业工程学报, 2020, 36(18): 197-203.

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.18.024 <http://www.tcsae.org>

Du Yun, Wang Panliu, Wang Binsheng, et al. Changes of material characteristics and pathogens in producing process of recycled manure solids[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(18): 197-203. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.18.024 <http://www.tcsae.org>

0 引言

2018 年中国奶牛存栏总量为 1 038 万头^[1], 按粪污日均产量 48 kg/(头·d)计算, 奶牛养殖全年粪污产生量为 1.82 亿 t^[2]。中国奶牛养殖业粪污排放总量巨大, 亟待对其进行无害化处理和资源化利用。传统垫料如沙子、秸秆、稻壳等存在市场价格波动大、不易获得且后续处理难(如沙子磨损设备)等问题^[3], 因此, 亟需新的可替代材料。近年来, 使用固体牛粪作垫料在中国一些奶牛场中广泛应用, 不仅实现了粪污的资源化利用, 可有效缓解农业面源污染, 同时也替代了传统垫料, 解决了垫料供应难、来源不足等问题。但由于牛粪再生垫料制作的原料为牛粪, 而新鲜牛粪中含有大量致病菌, 因此, 垫料产品的安全性受到广泛关注。

已有研究表明牛粪再生垫料的生产方式对垫料成品的理化特性及生物安全性有重要影响^[4-8]。目前, 牛粪再生垫料的生产方式主要有 3 种: 固液分离后的固体牛粪直接作垫料、也可经好氧发酵后作垫料、沼气发酵处理

后的沼渣沼液经固液分离后固体部分作垫料^[9]。固液分离属于物理挤压过程, 杀菌效果较差^[8]; 而沼气工程前期投资大, 多以能源产出为主, 垫料仅为副产物^[9-10], 适用于已建设沼气的奶牛场; 好氧发酵法生产牛粪再生垫料主要包括自然堆积式、条垛式、槽式和滚筒式, 其中, 滚筒好氧发酵具有生产效率高、占地面积小、机械化自动化程度高等优点, 且发酵过程温度基本可达 55℃以上, 能有效杀菌, 滚筒的转动也可保证垫料成品的均一性和稳定性^[11-13]。

目前, 国内外对滚筒发酵生产牛粪再生垫料的研究相对较少。Husfeldt 等^[5]利用滚筒发酵生产牛粪再生垫料, 经 18~24 h 发酵后其垫料含水率为 60.3%, 未检出大肠杆菌, 但有大量链球菌和芽孢杆菌。Fournel 等^[7]在实验室对滚筒发酵 24 和 72 h 生产牛粪再生垫料的效果进行比较, 结果表明发酵 24 h 即可达到垫料使用标准。汪保根等^[14]采用奥地利进口垫料生产设备(Bedding Recovery Unit, BRU)检测发酵温度、细菌种类和数量来评价垫料安全性, 结果表明 BRU 可保持高温 60℃以上 10 h, 检出的细菌为芽孢杆菌, 对奶牛无致病性。以上研究对滚筒发酵的工艺参数和安全性进行了初步探究, 但关于生产过程筒仓内温度及牛粪理化特性对其致病菌数量变化的影响程度分析较少。

为此, 本研究以滚筒好氧发酵生产牛粪再生垫料过程为研究对象, 分析不同季节(夏季、冬季)生产过程

收稿日期: 2020-05-19 修订日期: 2020-08-29

基金项目: 现代农业(奶牛)产业技术体系(CARS-36)

作者简介: 杜云, 研究方向为奶牛场废弃物资源化利用。Email: duyun18838918884@163.com

*通信作者: 段娜, 高级工程师, 研究方向为农业废弃物资源化利用技术。

Email: duanna@cau.edu.cn

农业工程学会会员: 段娜(E041200617S)

中滚筒不同位置处(进料端、滚筒 1/3 处、滚筒 2/3 处和出料端)牛粪物料特性(温度、含水率、pH 值、灰分、总碳、总氮)和奶牛乳房炎主要致病菌(大肠杆菌、链球菌、金黄色葡萄球菌、克雷伯氏菌)的变化规律,并探究垫料生产过程奶牛乳房炎主要致病菌的影响因素,以期为滚筒发酵生产牛粪再生垫料技术的应用与优化提供参考依据。

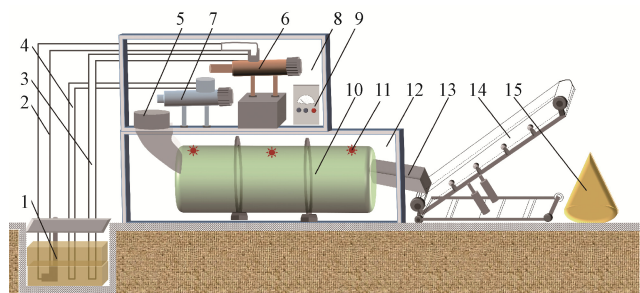
1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验在哈尔滨市双城区某奶牛养殖场进行,奶牛存栏总量为 1 800 头,其中泌乳牛 900 头。该奶牛场采用刮粪板干清粪工艺,粪污经地下暗管输送至储粪池。储粪池内的粪污经固液分离后固体牛粪进入滚筒发酵仓进行好氧发酵,生产牛粪再生垫料。

1.2 试验装置

本试验采用的滚筒发酵罐由哈尔滨华美亿丰复合材料有限公司与中国农业大学共同研发制造。如图 1 所示,滚筒式牛粪垫料再生系统主要包括两级固液分离机、卧旋式滚筒发酵罐以及进出料输送部件。粪污首先通过储粪池提升泵输送至上箱体中的两级固液分离机,经过 2 次固液分离后的固体牛粪进入滚筒发酵罐内进行好氧发酵。发酵后的物料经传送带输送至垫料库。滚筒发酵罐总容积为 30 m³(长 9.80 m,内径 2.00 m),罐体内的物料量为滚筒容积的 50%~70%,在进料端、罐体中心、出料端分别安装温度传感器对发酵过程堆体温度进行实时监测。固液分离设备和发酵罐采用如图 1 所示的上、下箱体进行保温隔热,以减少外环境对其温度的影响。



1.储粪池 2.进料管道 3.一次分离回流 4.二次分离回流 5.滚筒进料口
6.一次分离机 7.二次分离机 8.上箱体 9.监测控制系统 10.滚筒发酵罐
11.温度传感器 12.下箱体 13.滚筒出料端 14.传送装置 15.垫料成品
1.Manure pool 2.Feed pipe 3.Primary separation reflux 4.Secondary separation reflux 5.Drum inlet 6.Primary separator 7.Secondary separator
8.Upper box 9.Monitoring control system 10.Drum fermentor 11.Temperature sensor 12.Lower box 13.Drum outlet 14.Conveyer
15.Bedding products

图 1 再生垫料生产系统装置示意图

Fig.1 Schematic of recycled manure solids producing system

1.3 试验设计

试验分别于夏季(2019 年 6—2019 年 8 月)和冬季(2019 年 11 月—2020 年 1 月)进行。滚筒发酵罐的转速为 0.33 r/min,排风量为 600 m³/h,出料速度为 1.25 m³/h,发酵时间为 12~18 h。在上述条件下稳定运行一段时间后,对滚筒发酵生产牛粪再生垫料过程中不同位置(进料端、滚筒 1/3 处、滚筒 2/3 处和出料端)进行取样,每

个位置连续取样 3 次作为重复(约 1 000 g),每个季节试验重复 3 次,以确保数据的可靠性。样品分别被分为 2 份,1 份用于分析物料特性(含水率、pH 值、灰分、总碳、总氮、粒径),1 份用于分析奶牛乳房炎主要致病菌(大肠杆菌、链球菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯氏菌)。

1.4 数据采集及指标测定

根据土壤取样器原理自制物料取样器,长 10 m,并在 3.3 和 6.6 m 处用电焊枪做好标记,依次对滚筒进料端、1/3 处(取样器由进料端伸入滚筒,留在滚筒外的长度为 6.6 m)、2/3 处(取样器由进料端伸入滚筒,留在滚筒外的长度为 3.3 m)和出料端取样。样品采集后立即放入装有冰袋的保温箱并送至实验室待测。

含水率采用卤素水分测定仪(型号:XY-110MW,销售厂家:常州幸运电子设备有限公司,测量范围:0.00%~100.00%,精度:0.01%)进行测定;pH 值采用将样品与去离子水按 1:10 质量比进行混合,然后使用 pH 计(型号:FE28-Standard,销售厂家:北京海天友诚科技有限公司,pH 值测量范围:-2.00~16.00,精度:0.01)测定其悬浊液的 pH 值;灰分(Ash)采用马弗炉灼烧法进行测定;总碳(Total Carbon, TC)、总氮(Total Nitrogen, TN)采用元素分析仪(型号:vario PYRO cube,生产商:艾力蒙塔贸易(上海)有限公司)进行测定;粒径分布采用孔径为 0.5、2.0 mm 的筛网(绍兴市上虞华丰五金仪器有限公司)进行逐级筛分,得到的物料粒径范围为<0.5 mm、0.5~2.0 mm、>2.0 mm。

奶牛乳房炎主要致病菌的检测采用平板计数法^[8,15-16]。大肠杆菌采用麦康凯琼脂培养基在 37 ℃恒温培养箱培养 24 h,生长粉红色菌落;链球菌采用改良爱德华培养基在 37 ℃恒温培养箱培养 24 h,生长白色菌落;金黄色葡萄球菌采用 Baird-Parker 琼脂培养基在 37 ℃恒温培养箱培养 48 h,生长黑色菌落;克雷伯氏菌采用麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂 MIAC 在 37 ℃恒温培养箱培养 24 h,生长紫红色菌落。菌落计数结果以每克垫料干物质的菌落数的对数表示,即 lgcfu/g 干物质。

1.5 数据处理

数据处理采用 SPSS 25.0 统计软件进行平均值、标准偏差、方差、相关性分析,绘图采用 Graphpad Prism 8.0。

2 结果与讨论

2.1 滚筒内堆体温度变化

温度是滚筒发酵过程的重要参数。由表 1 可知夏季和冬季牛粪再生垫料生产过程中滚筒不同位置堆体温度从小到大均表现为进料端、出料端、中心,且三者差异显著($P<0.05$)。同时滚筒温度在不同季节存在显著差异($P<0.05$),其中夏季滚筒进料端的平均温度为(65.52±0.79)℃,比冬季高 9.80 ℃,夏季滚筒出料端和中心处温度基本保持在 70 ℃以上,平均温度分别为(70.94±1.39)和(73.00±0.69)℃,比冬季滚筒出料端、中心处温度分别高 5.10 和 3.35 ℃。夏季滚筒温度高于冬季,分析其原因可能是由于受外环境温度的影响,冬季温度

较低，受环境温度影响微生物活性较弱。

由表 1 知，冬季滚筒内平均温度（63.74±6.06）℃显著低于夏季（69.82±3.33）℃，但夏、冬 2 季滚筒发酵过程中温度均在 65℃以上，这可能是由于垫料生产过程为连续进出料，好氧微生物在滚筒内富集，同时滚筒出料端的引风机与出料口将发酵过程产生的水蒸气、CO₂ 等排出罐体形成负压，让氧气从进料端进入罐体的方式补充氧气，保证了发酵罐内物料的有氧环境和好氧微生物活性，促进有机物分解产生热量，从而维持发酵温度的稳定。前人研究表明温度高于 55℃可对乳房炎致病菌有很好的抑制作用^[6]。因此，滚筒发酵过程中筒内温度满足高温杀菌条件。另外 Fournel 等^[7]在实验室条件下，控制环境湿度进行滚筒发酵生产牛粪垫料，结果表明滚筒上、下层物料间温差较小，上层温度基本维持在 60℃左右，也验证了滚筒发酵可保证稳定的高温发酵环境。

表 1 夏季和冬季滚筒不同位置温度差异性
Table 1 Temperature difference at different positions of the drum in summer and winter

季节 Season	进料端 Inlet	中心 Center	出料端 Outlet	平均值 Mean
夏季 Summer	65.52±0.79 ^c	73.00±0.69 ^a	70.94±1.39 ^b	69.82±3.33 ⁿ
冬季 Winter	55.72±1.51 ^c	69.65±0.80 ^a	65.84±1.39 ^b	63.74±6.06 ^m

注：a~c 指滚筒不同位置间温度差异性，m~n 指不同季节间滚筒内温度间差异显著（*P*<0.05）。
Note: a-c means temperature difference in different drum position, m-n means temperature difference in different season (*P*<0.05).

2.2 生产过程牛粪再生垫料物料特性变化

在滚筒生产牛粪再生垫料过程中，牛粪原料的含水率是微生物好氧发酵的重要因素，发酵过程需要水分参与有机物的溶解和微生物的新陈代谢，同时高温发酵过程水分蒸发可带走部分热量，调节发酵温度^[17]。发酵物料含水率过低会抑制微生物的活性，过高则会造成厌

氧环境，因此，发酵含水率应控制在 40%~65%^[18]。由表 2 可知，夏季和冬季滚筒进料端物料含水率分别为 43.12%和 55.10%，满足好氧发酵对含水率的要求。发酵过程中物料含水率均逐渐降低，滚筒不同位置处物料的含水率在夏季差异不显著（*P*>0.05），而在冬季存在显著差异（*P*<0.05），这与田雪力等^[19]的研究一致，冬季滚筒内不同位置处物料含水率均高于夏季。垫料成品含水率是衡量垫料安全性与舒适性的重要指标，含水率过高会影响奶牛躺卧的舒适度^[20]，且易滋生致病菌；含水率过低，铺设和使用过程易产生粉尘，影响奶牛呼吸道健康^[21]。施正香等^[3,22]提出垫料成品的含水率应小于 50%。由此表明，夏、冬季出料端牛粪再生垫料的含水率均符合要求。

由表 2 可知，夏、冬季发酵过程中 pH 值变化范围为 8.43~9.04。Bernal 等^[23]提出适宜微生物生长的 pH 值范围是 6.7~9.0，因此该发酵过程基本满足微生物对环境酸碱性的要求。夏季和冬季生产过程物料 pH 值变化趋势一致，先降低，后小幅增长，这是由于发酵初期牛粪中营养物质充足，牛粪中的有机物被微生物分解产生有机酸使 pH 值下降，伴随高温发酵过程，小分子有机酸和含氮有机物被分解产生氨态氮(NH₄⁺-N)又使 pH 值升高^[24-25]。

牛粪再生垫料在生产过程中，总碳含量随发酵时间增加而逐渐减少，灰分和总氮含量逐渐增加。这可能是因为牛粪中含大量未消化的有机物如纤维素、蛋白质、脂肪等，其中的碳源和氮源被好氧微生物分解利用^[26]，有机物逐渐减少，灰分含量增加，总碳含量减少。而总氮含量增加，其原因可能是发酵过程中物料的质量和体积不断减少，氮素被浓缩，导致总氮浓度增加^[27]。由表 2 知不同季节的灰分含量无显著差异（*P*>0.05），而夏、冬季总碳和总氮含量存在显著差异（*P*<0.05），夏季总碳、总氮含量整体上低于冬季。

表 2 夏季和冬季垫料生产过程物料特性变化
Table 2 Changs of material characteristics during bedding producing process in summer and winter

季节 Season	取样点 Sampling point	含水率 Moisture/%	pH 值 pH value	灰分 Ash/%	总碳 TC/%	总氮 TN%
夏季 Summer	进料端	43.12±0.69 ^a	8.79±0.26 ^a	10.35±0.63 ^b	42.87±0.11 ^a	0.73±0.02 ^c
	滚筒 1/3（下同）	42.07±1.55 ^a	8.46±0.44 ^a	10.65±0.63 ^{ab}	41.52±0.05 ^b	0.75±0.03 ^b
	滚筒 2/3（下同）	41.8±1.44 ^a	8.47±0.31 ^a	11.00±0.69 ^{ab}	41.24±0.09 ^c	0.77±0.01 ^b
	出料端	41.12±0.58 ^a	8.59±0.04 ^a	11.51±0.73 ^a	40.73±0.08 ^d	0.85±0.01 ^a
冬季 Winter	进料端	55.10±1.01 ^a	9.04±0.10 ^a	9.90±0.25 ^c	44.77±0.12 ^a	0.71±0.01 ^d
	滚筒 1/3	53.78±3.61 ^a	8.52±0.27 ^b	10.43±0.30 ^b	44.53±0.04 ^b	0.80±0.01 ^c
	滚筒 2/3	51.27±1.37 ^b	8.43±0.37 ^b	10.63±0.27 ^{ab}	44.44±0.06 ^b	0.87±0.02 ^b
	出料端	44.67±0.61 ^c	8.54±0.04 ^b	10.90±0.26 ^a	44.22±0.09 ^c	0.92±0.03 ^a
不同季节物料特性差异 Material characteristics difference in different seasons		<i>P</i> <0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> >0.05	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05

注：同列数字肩头不同字母表示差异显著（*P*<0.05），灰分、总碳、总氮（%）是基于干质量。
Note: Different letters on the shoulder of the same column indicate significant difference (*P*<0.05), Ash, Total Carbon TC, and Total Nitrogen TN (%) are based on dry weight.

发酵过程物料的粒径大小对微生物生长有重要影响。物料粒径过大，则固体颗粒比表面积较小，不利于微生物对其进行充分分解；粒径过小，则会降低物料间的空隙率，造成局部厌氧，降低微生物活性^[23]。此外，

垫料成品对粒径大小也有要求，垫料颗粒粒径较小时，易沾染在奶牛乳房皮肤表面，附着在奶牛体表的细小颗粒会携带致病菌在奶牛乳孔开张时进入其乳房内部，进而感染奶牛乳房，增加奶牛罹患乳房炎的风险。Statz 等^[28]对回

收利用的沙子垫料进行粒径筛分时,将 $<0.6\text{ mm}$ 的沙子定义为小粒径, $0.6\sim 2.0\text{ mm}$ 定义为中粒径, $>2.0\text{ mm}$ 定义为大粒径。本研究将 $<0.5\text{ mm}$ 定义为小粒径, $0.5\sim 2.0\text{ mm}$ 定义为中粒径, $>2.0\text{ mm}$ 定义为大粒径。

由图 2 可知,在滚筒进料端,夏季和冬季固体牛粪粒径主要分布在 $0.5\sim 2.0\text{ mm}$,二者占比分别为 69.05% 和 54.91%,粒径 $<0.5\text{ mm}$ 的占比最少。发酵过程中,夏季和冬季 $>2.0\text{ mm}$ 的粒径均逐渐减少,并向小粒径和中粒径转化,分析其原因可能是由于大颗粒有机物被微生物分解,从而形成小颗粒物质。在滚筒出料端,夏季和冬季 $<2.0\text{ mm}$ 粒径的颗粒占比分别约为 94.25% 和 89.17%,而康奈尔废弃物研究所^[4]滚筒发酵 24 h 生产的垫料粒径 $<2.0\text{ mm}$ 的颗粒质量占比为 74.3%,本试验比其高约 15%~20%,分析其原因可能是由于出料端牛粪再生垫料的含水率不同,康奈尔生产的垫料成品含水率为 63.7%,本试验成品含水率 $<45\%$,含水率高的垫料颗粒易粘连在一起,因此筛分时大颗粒的物料占比较高,造成二者粒径分布的差异。由图 2 可观察到冬季生产的垫料粒径要大于夏季,这与上述原因一致,也是由于含水率差异导致。因此,固液分离后的固体牛粪初始含水率控制在 50%~65%即可,含水率过高会影响微生物发酵活性,含水率过低会造成小粒径颗粒占比增多,且固液分离过程能耗较大。

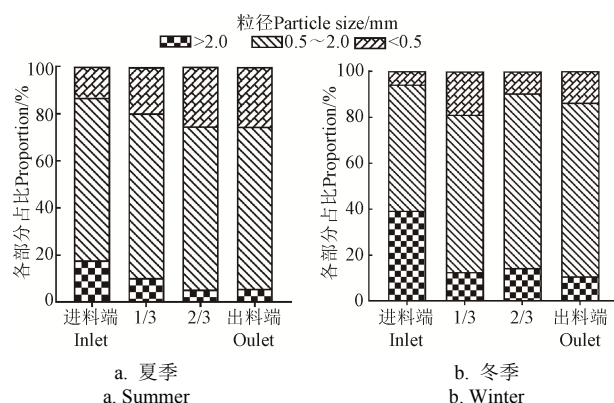


图 2 夏季和冬季垫料生产过程粒径分布情况

Fig.2 Particle size distribution during producing process of recycled manure solids in summer and winter

2.3 牛粪再生垫料中奶牛乳房炎主要致病菌的变化

根据奶牛乳房炎致病菌的来源和传播途径的不同,可将其分为环境性乳房炎致病菌和传染性乳房炎致病菌。奶牛环境性乳房炎致病菌主要包括大肠杆菌、链球菌和克雷伯氏菌,它们来源分布广泛、较难控制;而传染性乳房炎致病菌主要为金黄色葡萄球菌。因此,本试验重点检测了以上 4 种奶牛乳房炎主要致病菌的变化规律。

由图 3 可知夏季和冬季 4 种奶牛乳房炎致病菌数量均在滚筒进料端最高,夏季进料端牛粪中金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌和克雷伯氏菌数量分别为 6.95、6.07、5.33 和 4.59 lg cfu/g,冬季与夏季数量相差不大。由图 3a 可知,夏季成品垫料中(出料端样品)只有大肠杆菌和金黄色葡萄球菌可检出,其数量分别为 4.12

和 5.00 lg cfu/g,链球菌和克雷伯氏菌在成品垫料中均未检出。冬季成品垫料(出料端样品)中链球菌和克雷伯氏菌均未检出,与夏季一致,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的检出数量分别 1.23 和 1.30 lg cfu/g (见图 3b)。与夏季相比,冬季垫料生产过程大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀灭效果存在较大差异,分析可能与滚筒进料端物料的含水率有关。

分析夏、冬季滚筒发酵过程奶牛乳房炎主要致病菌数量变化情况可知,滚筒发酵过程对链球菌和克雷伯氏菌具有较好的杀菌效果,而对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌杀菌效果较差。夏、冬季滚筒发酵过程大肠杆菌和金黄色葡萄球菌数量均先减少,后有所增加(见图 3),分析其原因可能与滚筒出料端外环境污染有关。

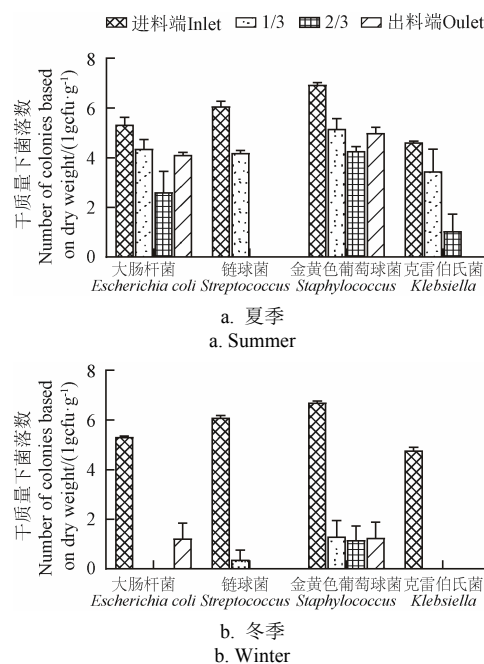


图 3 夏季和冬季垫料生产过程乳房炎主要致病菌数量变化
Fig.3 Changes of the number of main mastitis pathogens during producing process of recycled manure solids in summer and winter

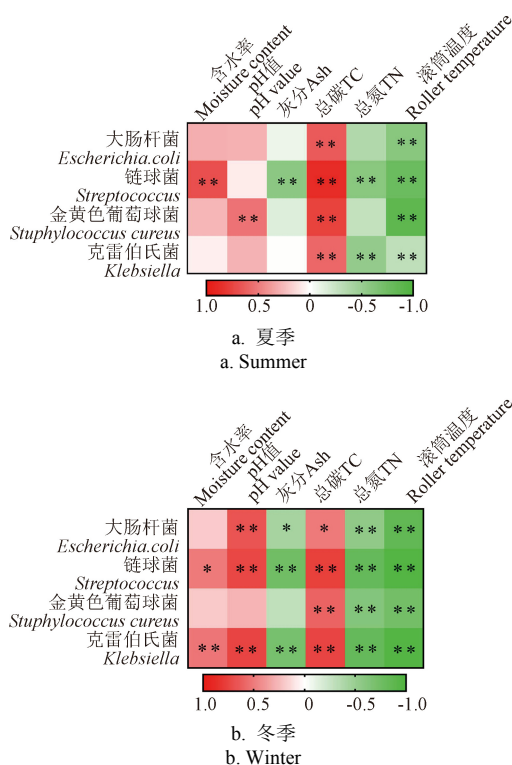
2.4 奶牛乳房炎主要致病菌影响因素分析

利用 Pearson 相关分析法对滚筒发酵生产牛粪再生垫料过程堆体温度及牛粪理化特性与 4 种奶牛乳房炎主要致病菌的相关性进行分析。结果如图 4 所示,夏、冬季垫料生产过程,固体牛粪的含水率、pH 值、总碳与 4 种致病菌均呈正相关关系,而灰分、总氮、滚筒温度与其均呈负相关关系,且滚筒温度与 4 种致病菌均呈极显著负相关关系($P<0.01$),总碳与 4 种致病菌(除夏季大肠杆菌外)均呈极显著正相关关系($P<0.01$)。由此可知,在牛粪垫料生产过程(不局限于滚筒生产方式),降低牛粪的含水率、pH 值及总碳含量,或提高牛粪的灰分、总氮含量及滚筒温度,可有效抑制奶牛乳房炎主要致病菌数量的增长。

由以上分析可知,影响奶牛乳房炎致病菌的主要因素为滚筒温度,即随温度的升高,奶牛乳房炎主要致病菌的数量将逐渐减少,体现在滚筒不同位置处温度的差异带来致病菌数量上的变化。相关研究表明,大肠杆菌和克雷伯氏菌增殖的最适温度为 $15\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$,当温度高于 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 开始

死亡; 链球菌生长的最佳温度为 25~42 °C, 高于 42 °C 开始死亡; 金黄色葡萄球菌能在 6~48 °C 存活^[29-30]。本试验夏季和冬季滚筒内温度均在 55 °C 以上, 可有效杀灭奶牛乳房炎主要致病菌。试验中, 链球菌和克雷伯氏菌未检出, 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌满足安全性要求, 但未被完全杀灭。说明温度是影响奶牛乳房炎主要致病菌的关键因素, 但可能还受其他因素的影响, 须进一步探究。

总碳对奶牛乳房炎致病菌的影响仅次于滚筒温度。总碳与奶牛乳房炎主要致病菌呈显著正相关, 即总碳含量高时, 奶牛乳房炎主要致病菌的数量也会增长。分析其原因为, 牛粪中的含碳有机物为奶牛乳房炎致病菌的生长繁殖提供了营养来源, 可满足其生长代谢对营养物质的需求。



注: *代表 $P < 0.05$, **代表 $P < 0.01$, r 值为相关系数, 取值范围在-1 到 1 之间, 在图中以不同颜色展示, 其中红色代表正相关, 绿色代表负相关, 热图下方色卡是 r 值不同颜色分区。

Note: *Significant at $P < 0.05$, ** Significant at $P < 0.01$, r value is the correlation coefficient, ranges from -1 to 1. It is displayed in different colors in the figure, where red represents positive correlation, green represents negative correlation, and the color card below the heat map is the color division of r value.

图 4 夏季和冬季垫料生产过程物料特性与乳房炎主要致病菌相关性热图

Fig.4 Correlation heat map between material characteristics and main mastitis pathogens during bedding producing process in summer and winter

在国内外相关研究中, 对滚筒发酵生产牛粪再生垫料过程奶牛乳房炎致病菌的影响因素研究较少, 但对于牛粪再生垫料使用过程, Godden 等^[31]认为垫料中细菌的繁殖能力与垫料的物理、生化或营养特性及卧床管理有关, Narula 等^[32]认为垫料的含水率与致病菌数量有关, 含水率越低, 致病菌数量越小。因此, 牛粪再生垫料的生产及使用过程, 应对其理化特性进行严格控制, 以避免致病菌的孳生, 影响奶牛及工作人员的健康。

3 结论

1) 滚筒发酵生产牛粪再生垫料过程, 可保证稳定的杀菌温度 (>55 °C), 且成品垫料含水率低于 45%, 符合牛粪再生垫料水分的控制要求。

2) 滚筒发酵生产牛粪再生垫料的季节性差异较明显, 夏季滚筒内温度较高, 固体牛粪含水率较低, 但成品垫料中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌数量较多。建议对牛粪中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌数量反复增长的原因作进一步探究。

3) 根据 Pearson 相关性分析可知, 滚筒发酵生产牛粪再生垫料过程影响奶牛乳房炎致病菌 (大肠杆菌、链球菌、金黄色葡萄球菌和克雷伯氏菌) 的主要因素为滚筒温度, 其次为总碳含量。因此, 应加强对滚筒内温度的控制, 保证滚筒内部高温条件, 从而达到杀灭奶牛乳房炎致病菌的目的。

[参 考 文 献]

- [1] 农业农村部畜牧兽医局, 中国奶业协会. 2019 中国奶业统计摘要[J]. 中国奶牛, 2019.
- [2] 施正香, 孙飞舟, 刘志丹, 等. 我国奶牛养殖粪污综合治理和资源有效利用的现状与对策[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(20): 35-40.
- [3] 施正香, 王盼柳, 张丽, 等. 我国奶牛场粪污处理现状与综合治理技术模式分析[J]. 中国畜牧杂志, 2016, 52(14): 62-66.
- [4] Shi Zhengxiang, Wang Panliu, Zhang Li, et al. State of dairy waste treatment and comprehensive management mode in China[J]. Chinese Journal of Animal Science. 2016, 52(14): 62-66. (in Chinese with English abstract)
- [5] Harrison E, Bonhot J, Schwarz M. Using manure solids as bedding[R]. Ithaca, NY: Cornell Waste Management Institute, 2008.
- [6] Husfeldt A W, Endres M I. Association between stall surface and some animal welfare measurements in freestall dairy herds using recycled manure solids for bedding[J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(10): 5626-5634.
- [7] Cole K J, Hogan J S. Short communication: Environmental mastitis pathogen counts in freestalls bedded with composted and fresh recycled manure solids[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(2): 1501-1505.
- [8] Fournel S, Godbout S, Ruel P, et al. Production of recycled manure solids for use as bedding in Canadian dairy farms: II. composting methods[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(2): 1847-1865.
- [9] Fournel S, Godbout S, Ruel P, et al. Production of recycled manure solids for bedding in Canadian dairy farms: I. solid-liquid separation[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(2): 1832-1846.
- [10] 王盼柳, 施正香, 曾雅琼, 等. 牛床再生垫料生产技术模式和产业需求分析[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(3): 147-153.
- [11] Wang Panliu, Shi Zhengxiang, Ceng Yaqiong et al. Analysis of production technology models and industry demand of recycled manure solids as bedding[J]. Chinese Journal of Animal Science 2017, 53(3): 147-153. (in Chinese with English abstract)

- English abstract)
- [10] 冯晶, 刘国华, 马继涛, 等. 规模化秸秆沼气工程集成技术及工程运行效果研究[J]. 农业工程学报, 2018, 34(S1): 81-85.
Feng Jing, Liu Guohua, Ma Jitao, et al. Study on integrated technology of large scale straw biogas plant and its operation effect[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2018, 34(Suppl.1): 81-85. (in Chinese with English abstract)
- [11] Alkokaik Fahad, Abdel-Ghany Ahmed, Rashwan Mohamed, et al. Energy analysis of a rotary drum bioreactor for composting tomato plant residues[J]. Energies, 2018, 11(2): 449.
- [12] 冯康, 孟海波, 周海宾, 等. 一体化好氧发酵设备研究现状与展望[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(6): 69-79.
Feng Kang, Meng Haibo, Zhou Haibin, et al. Research status and prospect of integrated aerobic fermentation equipment[J]. Journal of Agricultural Science and Technology 2018, 20(6): 69-79. (in Chinese with English abstract)
- [13] Kalamdhad Ajay S, Pasha Muneer, Kazmi A A. Stability evaluation of compost by respiration techniques in a rotary drum composter[J]. Resources, Conservation and Recycling, 2008, 52(5): 829-834.
- [14] 汪保根, 殷冬冬, 宫晓华, 等. 应用发酵牛粪垫料提高奶牛生产性能的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(26): 159-162.
Wang Baogen, Yin Dongdong, Gong Xiaohua, et al. Study on improving the production performance of dairy cows by using fermented cow dung as bedding[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences 2015, 43(26): 159-162. (in Chinese with English abstract)
- [15] Rowbotham R F, Ruegg P L. Bacterial counts on teat skin and in new sand, recycled sand, and recycled manure solids used as bedding in freestalls[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(8): 6594-6608.
- [16] Kester E, Holzhauer M, Frankena K. A descriptive review of the prevalence and risk factors of hock lesions in dairy cows[J]. The Veterinary Journal, 2014, 202(2): 222-228.
- [17] 王永江, 黄光群, 韩鲁佳. 猪粪麦秸反应器好氧堆肥水分平衡模型研究[J]. 农业机械学报, 2012, 43(6): 102-106.
Wang Yongjiang, Huang Guangqun, Han Lujia. Modeling of moisture balance during pig slurry reactor composting[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(6): 102-106. (in Chinese with English abstract)
- [18] 张雄. 规模化奶牛场粪便高温堆肥应用研究[D]. 武汉: 华中科技大学环境工程, 2008.
Zhang Xiong. Application Study on High Temperature Manure Composting for Large-scale Dairy Farm[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology 2008. (in Chinese with English abstract)
- [19] 田雪力, 翟中葳, 丁飞飞, 等. 奶牛场粪污制备卧床垫料过程中物料性质及污染物含量的周年变化规律[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(3): 552-558.
Tian Xueli, Zhai Zhongwei, Ding Feifei, et al. Annual variation of material properties and pollutant content in the process of dairy manure making bedding in dairy farm[J]. Journal of Agro-Environment Science 2018, 37(3): 552-558. (in Chinese with English abstract)
- [20] Fregonesi J A, Veira D M, von Keyserlingk M A G, et al. Effects of bedding quality on lying behavior of dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(12): 5468-5472.
- [21] Leach Katharine A, Archer Simon C, Breen James E, et al. Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risks for UK dairy farms[J]. The Veterinary Journal, 2015, 206(2): 123-130.
- [22] 彭英霞, 李俊卫, 王浚峰, 等. 奶牛场固体牛粪用作卧床垫料的工艺分析[J]. 中国奶牛, 2015(2): 47-51.
Peng Yingxia, Li Junwei, Wang Junfeng, et al. Analysis of dried solid manure used as bedding for dairy farm[J]. China Dairy Cattle 2015(2): 47-51. (in Chinese with English abstract)
- [23] Bernal M P, Albuquerque J A, Moral R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment: A review[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(22): 5444-5453.
- [24] 史向远, 王秀红, 周静, 等. 牛粪联合玉米秸秆好氧堆肥理化性状分析[J]. 山西农业科学, 2019, 47(7): 1217-1221.
Shi Xiangyuan, Wang Xiuhong, Zhou Jing, et al. Analysis of physicochemical characters of aerobic composting of cattle manure combined with corn straw[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences 2019, 47(7): 1217-1221. (in Chinese with English abstract)
- [25] Mao H, Lv Z, Sun H, et al. Improvement of biochar and bacterial powder addition on gaseous emission and bacterial community in pig manure compost[J]. Bioresource Technology, 2018, 258: 195-202.
- [26] Kalamdhad Ajay S, Kazmi Absar A. Rotary drum composting of different organic waste mixtures[J]. Waste Management & Research, 2009, 27(2): 129-137.
- [27] 许修宏, 赵晓雨, 李洪涛, 等. 牛粪堆肥中氮素转化关键菌群的动态变化影响[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(8): 26-31.
Xu Xiuhong, Zhao Xiaoyu, Li Hongtao, et al. Dynamic variation of key nitrogen transformation microflora in cow manure compost[J]. Journal of Northeast Agricultural University 2015, 46(8): 26-31. (in Chinese with English abstract)
- [28] Statz L R, Lammers P J, Hardyman K A L. Analysis of particle size and organic matter in recycled sand bedding[J]. Journal of Animal Science, 2017, 95(Suppl.2): 195.
- [29] Black R A, Taraba J L, Day G B, et al. The relationship between compost bedded pack performance, management, and bacterial counts[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(5): 2669-2679.
- [30] Ward W R, Hughes J W, Faull W B, et al. Observational study of temperature, moisture, pH and bacteria in straw bedding[J]. Veterinary Record, 2002, 151: 199-206.
- [31] Godden S, Bey R, Lorch K, et al. Ability of organic and inorganic bedding materials to promote growth of environmental bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 2008, 91(1): 151-159.
- [32] Narula R. Pathogen Reduction and factors responsible for pathogen reduction in dairy farm operations treating dairy manure[J]. Biological Engineering, 2011, 4(3): 115-131.

Changes of material characteristics and pathogens in producing process of recycled manure solids

Du Yun¹, Wang Panliu¹, Wang Binsheng¹, Duan Na^{1,2*}, Shi Zhengxiang^{1,2}, Zhang Yuanhui^{1,3}, Song Jiaxi⁴

(1. Key Laboratory of Agricultural Engineering in Structure and Environment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Water Resources and Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Beijing Research Center for Livestock and Poultry Healthy Environmental Engineering Technology, Beijing 100083, China; 3. Department of Agricultural and Biological Engineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois IL 61801, USA; 4. Harbin Hua Mei Yi Feng Composite Materials Co., Ltd., Harbin 150000, China)

Abstract: The use of Recycled Manure Solids (RMS) as dairy bedding material has become a promising technology with the merits of sustainable manure management and cost saving for purchasing traditional bedding. However, cow dung contains certain amounts of pathogenic bacteria, thus the use of RMS would increase the risk of direct contact of pathogens with cows' udder. Such serious problem has undermined the use of RMS as dairy bedding material. Drum fermentation for the bedding production has many advantages (i.e. high temperature, short time), thereby it is getting more and more attention. The objective of this study was to investigate the stability and biological safety of RMS production process using drum fermentation in different seasons, and to clarify the factors affecting the growth of pathogenic bacteria in the dairy cows' mastitis. The drum-type RMS producing system employed was composed of a two-stage solid-liquid separator, a horizontal-rotation drum fermentation tank, as well as feeding and discharging components. The automatic control system monitored equipment operation and temperature changes in real time. The drum temperature was obtained by the temperature sensors installed on the inner wall of the drum including inlet, center, and outlet. Samplings were performed from the inlet, 1/3, 2/3, and outlet of the drum. The plate culture method was used to detect the main mastitis pathogenic bacteria (i.e., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, and *Klebsiella*) at different positions within the drum during the summer and winter. At the same time, the physical and chemical properties (water content, pH, total carbon, total nitrogen, ash, particle size distribution, roller temperature) of RMS were also tested. Additionally, the main factors affecting the growth of mastitis pathogens was investigated via Pearson correlation analysis. The results indicated that the fermentation temperature during the production process was stable and maintained above 55 °C both in summer and winter, and the final moisture content at the drum outlet was less than 45%. In both seasons, the particle size distribution at different positions of the roller was mainly concentrated at 0.5 to 2.0 mm. With the fermentation process, the large particle size gradually converted to small and medium particle size. The number of mastitis pathogens in summer and winter was highest at the drum inlet, and gradually decreased at higher fermentation temperature. At 1/3 of the drum, the number of major mastitis pathogens was significantly reduced. *Streptococcus* and *Klebsiella* were not detected at the drum outlet in both seasons. However, the number of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* at the outlet of the drum in summer was higher than that in winter. It may be related to the moisture content of the cow dung at the inlet of the drum. Therefore, the moisture content of the inlet of the drum should be strictly controlled between 50% and 65%. Using the Pearson correlation analysis, it was found that the major factor affecting main mastitis pathogen was drum temperature, followed by total carbon. From the security point of view, RMS should be used immediately after production to avoid environmental impacts. The results found in this study can provide deep insight for the application of drum fermentation technology to produce safer RMS.

Keywords: producing; fermentation; Recycled Manure Solids (RMS); material characteristics; mastitis pathogens; Pearson correlation analysis