第 18 卷　第 34 期　2018 年 12 月
1671—1815(2018)034-0248-05

科　学　技　术　与　工　程
Science Technology and Engineering

Vol. 18　No. 34　Dec. 2018
ⓒ　2018　Sci. Tech. Engrg.

引用格式:刘　标, 尹红梅, 刘惠知. 病死猪堆肥降氨除臭微生物的筛选与鉴定[J]. 科学技术与工程, 2018, 18(34): 248—252
Liu Biao, Yin Hongmei, Liu Huizhi. Screening and identification of deodorant microorganism for dead-pig composting[J]. Science Technology and Engineering, 2018, 18(34): 248—252

环境科学、安全科学

病死猪堆肥降氨除臭微生物的筛选与鉴定

刘　标　尹红梅　刘惠知*
(湖南省微生物研究院,长沙 410009)

摘　要　为了获取高效的病死猪堆肥降氨除臭微生物菌株,利用氨气选择性培养基定性初筛和硼酸吸收法复筛相结合的方法,分离筛选高效降氨微生物,并对其菌种分类进行了鉴定。从猪粪、土壤、病死猪堆肥等样品中共分离筛选获得 7 株对 NH_3 具有降解效果的菌株,分别编号为 YX-1、YX-2、YX-3、YX-4、YX-6、YX-7、YX-8。在 30 d 模拟堆肥周期中,菌株 YX-3 对氨气的去除效率最高,达 56.9%。根据形态学特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析,该菌鉴定为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensi*)。通过单因素试验,确定菌株 YX-3 降氨除臭的最佳温度为 30 ~ 40 ℃,最佳接种量为 8%。菌株 YX-3 对 H_2S 的去除能力显著低于对氨气的去除能力,说明该菌去除臭气成分的功能专一。筛选获得的菌株 YX-3 丰富了堆肥除臭微生物资源库,在农业环保领域具有潜在的应用价值。

关键词　病死猪堆肥　降氨　除臭菌　菌种鉴定
中图法分类号　X51;　　**文献标志码**　B

中国是生猪养殖大国,每年因各类疾病死亡的生猪数量较多。病死猪携带大量的病原体,如果随意丢弃,将对生态环境造成了严重破坏[1]。利用堆肥法处理死畜禽是近年来国内外研究的热点内容[2—5],也是中国农业农村部在《病死动物无害化处理技术规范》中推荐的方法之一。堆肥过程中产生的高温能够有效杀灭病原微生物,实现无害化处理;且堆肥产品可以制成有机肥,又能实现畜禽死体的资源化利用,因此该方法应用前景广阔。畜禽死体堆肥是将畜禽死体和碳源物质混匀,利用堆体中的自然微生物分解动物尸体。由于畜禽死体中含有大量的蛋白质,堆肥过程中释放的氨气非常严重,不仅造成严重的空气污染,而且降低了肥料中的氮素含量,因此,开展病死猪堆肥的除臭研究具有重要的意义。

堆肥除臭的方法很多,其中微生物除臭法是目前治理臭气的一种简单有效的方法[6]。微生物除臭法是指在堆肥中添加外源除臭菌剂,利用微生物在代谢过程中可利用某些臭气成分,或可抑制臭气成分的产生等特点,从而达到除臭的目的。目前,日本、德国在微生物除臭方面的研究取得了较多的成果,而中国在这方面的研究刚刚起步,拥有自主知识产权的微生物除臭菌株稀少。本研究以氨气为筛选指标,通过分离筛选除臭微生物,研究其除臭效果,旨在丰富堆肥除臭微生物菌种资源库,减少病死猪堆肥过程中产生的恶臭气体对环境的污染。

2018 年 7 月 31 日收到　　湖南省科技厅重点研发计划(2017NK2155)和湖南省生猪产业技术体系生猪产业规模养殖与环境控制岗位项目资助

第一作者简介:刘　标(1986—),男,汉族,湖南浏阳人,助理研究员。研究方向:环境微生物。E-mail: 280795307@qq.com。
*通信作者简介:刘惠知,男,汉族,湖南宁乡人,教授。研究方向:环境微生物学。E-mail: hndwwsw@126.com。

1　材料与方法

1.1　菌株分离样品

猪粪取自湖南不同生猪养殖场及有机肥厂,病死猪肉骨粉取自湖南原生生物科技股份有限公司,土壤样品取自养殖场周围。

1.2　培养基

NH_3 选择性培养基组成如下:蔗糖 50.0 g、氨水 10 mL、KH_2PO_4 2.0 g、$MgSO_4$ 0.5 g、$FeSO_4$ 0.1 g、$ZnSO_4$ 0.5 g、NaCl 2.0 g、H_2O 1 000 mL,自然 pH。

发酵培养基为牛肉膏蛋白胨培养基、马铃薯葡萄糖培养基。

1.3　除臭微生物的分离筛选

1.3.1　除臭菌的初筛

称取各菌株分离样品(猪粪、病死猪堆肥样品、

土壤)10 g 置于装有 90 mL 无菌水的三角瓶中,吸取 10 mL 稀释液接种至装有 100 mL NH_3 选择性培养基的三角烧瓶中,置于 30 ℃、180 r/min 摇床上恒温培养 5d 后,观察菌液变化,若浑浊表明菌株具有降解 NH_3 能力。利用梯度稀释平板法分离纯化菌液中的单菌落,将分离出的单菌落接种至试管斜面,4 ℃低温保存待用。

1.3.2　除臭菌的复筛

取 500 g 混合堆肥样品(猪粪、肉骨粉、麦麸质量比为5∶4∶1)加入到 2.5 L 的有盖塑料桶中,将初选菌株在相应的发酵培养基培养后,按堆肥质量的 10% 接种至堆肥样品中,桶中放入 100 mL 无菌小烧杯,内装有 50 mL 2% 硼酸溶液用于吸收 NH_3,用保鲜膜密封塑料桶,置于 30 ℃恒温箱中发酵培养。每个处理 3 个重复,对照组接种等量的清水。间隔 10 d 利用硼酸吸收凯氏法测定 NH_3 的释放量,测定周期为 30 d。

1.4　降氨高效菌株 YX-3 的菌种鉴定

1.4.1　形态学观察及生理生化鉴定

接种菌株 YX-3 在牛肉膏蛋白胨平板上培养 48 h 后观察其菌落形态特征及显微形态特征。生理生化特征的鉴定参照《微生物实验教程》中相关方法进行[7]。

1.4.2　16S rDNA 鉴定

用 DNA 提取试剂盒提取菌株 YX-3 的基因组 DNA,PCR 扩增采用 16S rDNA 通用引物 27F:5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3, 1492R: 5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3。PCR 反应条件如下:95 ℃,3 min;94 ℃,1 min;56 ℃,1 min;72 ℃,2 min,30 个循环;72 ℃,10 min,4 ℃终止。将 PCR 产物利用试剂盒纯化回收后交由上海生物工程有限公司测定其序列。

测得的序列通过 NCBI 比对分析,利用 Mega5.0 软件中 NJ 法构建 16S rDNA 系统发育树,确定该菌的种属类别。

1.5　菌株 YX-3 对 H_2S 的去除效果

取 500 g 混合堆肥样品(猪粪、肉骨粉、麦麸质量比为5∶4∶1)加入到 2.5 L 的有盖塑料桶中,按堆肥质量的 10% 接种菌株 YX-3 培养液至堆肥样品中,桶中放入 100 mL 无菌小烧杯,内装有 50 mL 锌胺络盐溶液用于吸收 H_2S,用保鲜膜密封塑料桶,置于 30 ℃恒温箱中发酵培养。每个处理 3 个重复,以等量的清水作为对照组。间隔 15 d 利用亚甲基蓝分光光度法[8]测定 H_2S 的释放量,测定周期为 30 d。

1.6　菌株 YX-3 降氨除臭条件优化

按照降氨除臭微生物复筛的方法,分别采用不同培养温度(25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃,接种量均为 10%)及接种量(2%、5%、8%、10%、12%、15%,培养温度均为 30 ℃)进行单因素试验,探讨菌株 YX-3 对堆肥中氨气的去除率。

1.7　数据分析

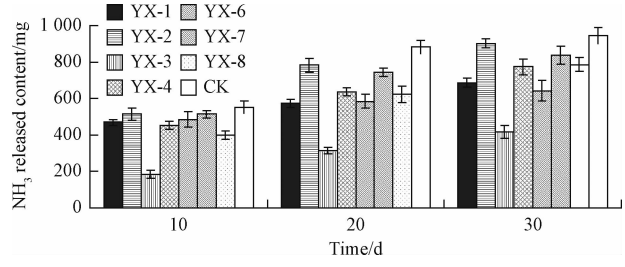
试验数据采用 Excel 2003 进行处理及作图,利用 SPSS 18.0 统计分析软件进行单因素方差分析。

2　结果与分析

2.1　降氨除臭菌的分离筛选

采用氨气选择性培养基初步分离筛选获得 7 株具有氨气去除效果的菌株,分别命名为 YX-1、YX-2、YX-3、YX-4、YX-6、YX-7、YX-8。其中,菌株 YX-1、YX-4 为真菌,其余菌株为细菌。

将初筛获得的 7 株菌株进行复筛试验,采用纳氏试剂分光光度法测定各菌株在发酵不同时间的氨气总释放量,结果如图 1 所示。结果显示,各组模拟堆肥试验中,氨气的释放主要集中在发酵前 20 d。在 30 d 模拟堆肥周期中,对照组(未接种外源菌剂)的氨气释放总量为 947.35 mg,所有接种初筛获得的菌剂组中氨气释放总量均比对照少,其中接种菌株 YX-3 的试验组 30 d 释放氨气总量最少,为 416.81 mg,显著少于对照组($P<0.05$)。



CK 为未接种外源菌剂组

图 1　不同菌株处理后 NH_3 的释放量

Fig. 1　NH_3 release amount after the treatments of different strains

初筛获得的菌株的氨气去除率如表 1 所示,在不同的堆肥时间内,菌株 YX-3 对氨气的去除率均为最高,因此,选择其作为后续研究对象。

2.2　菌株 YX-3 的菌种鉴定

2.2.1　菌株 YX-3 的菌落、显微形态特征及生理生化鉴定结果

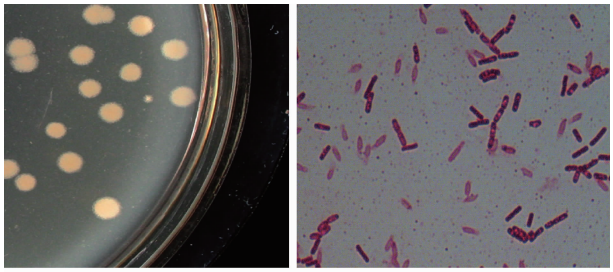
菌株 YX-3 在牛肉膏蛋白胨培养基上培养 48 h 后,其形态如图 2 所示。菌落呈圆形,边缘不整齐,菌落表面粗糙干燥,表面皱褶,不透明,呈微黄色。在油镜下观察,菌体呈杆状,形成芽孢。菌株 YX-3 的生理生化鉴定结果如表 2 所示。综合以上特征,可初步判断菌株 YX-3 属于芽孢杆菌。

表 1 不同菌株对堆肥氨气去除率的影响

Table 1 The effect of different strains on the ammonia degradation rate during composting

菌株	氨气去除率/%		
	10 d	20 d	30 d
YX-1	15.1^{c}	35.1^{b}	28.9^{b}
YX-2	7.1^{d}	11.4^{c}	6.6^{d}
YX-3	66.8^{a}	64.4^{a}	56.9^{a}
YX-4	18.2^{c}	27.8^{b}	20.0^{c}
YX-6	12.0^{c}	33.8^{b}	33.5^{b}
YX-7	6.9^{d}	15.9^{c}	13.4^{c}
YX-8	28.0^{b}	29.3^{b}	18.7^{c}

注:同一列中,不同小写字母上标表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。



(a) 菌落 (b) 显微形态特征(×1 000)

图 2 菌株 YX-3 菌落及显微形态特征

Fig. 2 The colony morphology and micromorphological characteristics of strain YX-3

表 2 菌株 YX-3 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain YX-3

测试项目	结果	测试项目	结果	测试项目	结果
淀粉水解	+	伏普试验	−	山梨醇	−
过氧化氢酶	+	木糖发酵	−	柠檬酸盐	−
明胶水解	+	蔗糖发酵	−	吲哚试验	−
甲基红试验	+	麦芽糖发酵	−	脲酶试验	+

注:+表示反应呈阳性;−表示反应呈阴性。

2.2.2 菌株 YX-3 的分子鉴定结果

以菌株 YX-3 的基因组为模板,PCR 扩增出长度为 1 436 bp 的 16S rDNA 片段,将该片段的序列在 NCBI 数据库中 BLAST 比对后显示,其与 *Bacillus siamensi* 的相似性最高,达到 98%,系统进化树分析结果也表明(图 3),菌株 YX-3 与 *Bacillus siamensi* 聚为一簇。结合形态学特征、生理生化鉴定结果及 16S rDNA 序列分析结果,可以确定菌株 YX-3 为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensi*)。

2.3 菌株 YX-3 对 H_2S 的去除效果

在堆肥过程中释放的臭气成分很复杂,但主要成分是氨气和硫化氢,因此,进一步分析了菌株 YX-3 对堆肥过程中 H_2S 的去除效果。结果如图 4 所示,菌株在 30 d 堆肥周期中,对 H_2S 的去除率仅为 8.6%,显著低于该菌株对氨气的去除率,说明该菌株对硫化氢的去除效果不佳。

2.4 温度及接种量对菌株 YX-3 降氨率的影响

由图 5 可知,当温度从 25 ℃升高至 30 ℃时,菌株 YX-3 对氨气的去除率从 38.2% 显著增加至 58.2%;在 30 ~ 40 ℃温度范围内,YX-3 对氨气的去除率无显著性差异,但提高温度至 45 ℃时,氨气的去除率显著降低,原因可能是温度影响了菌株降氨除臭过程中相关酶的活性,因此,初步确定菌株 YX-3 降氨除臭的适宜温度为 30 ~ 40 ℃。

图 6 结果显示,当接种量从 5% 增加至 8% 时,菌株 YX-3 对堆肥氨气去除率显著增加;继续提高接种量时,菌剂对氨气的去除率并无显著变化,因此,从堆肥的成本角度考虑,确定菌剂的最佳接种量为 8%。

3 小结与讨论

目前,堆肥法成为资源化、无害化处理死畜禽的一种新的途径,相比畜禽粪便堆肥,畜禽死体堆肥过程中产生的氨气更多,严重污染环境和影响人类健康,成为制约该方法推广的主要因素之一。通过添加外源菌剂,改变堆肥中含氮物质的代谢途径,可以显著减少堆肥过程中氨气的释放量[9]。同时,由于减少了氨气的释放,可提高堆肥产品的氮素含量,可兼顾除臭和保氮两方面的要求,因此,微生物除臭法是堆肥除臭的重点发展方向之一。微生物除臭法的关键在于筛选高效的除臭微生物。为此,通过初筛

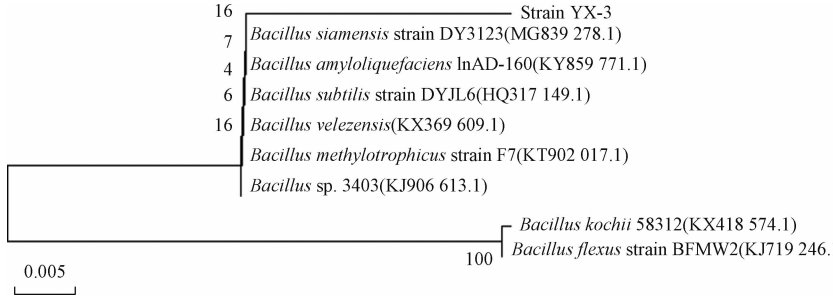


图 3 菌株 YX-3 基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain YX-3

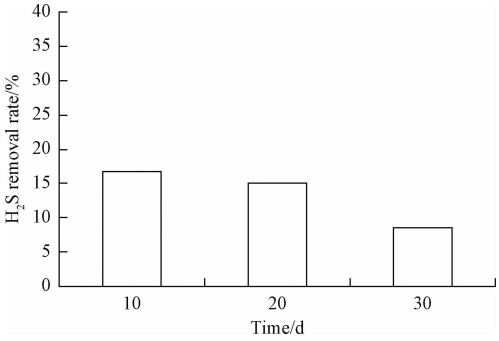


图 4　菌株 YX-3 对堆肥 H_2S 的去除率的影响

Fig. 4　Effect of strain YX-3 on the H_2S removal rate during composting

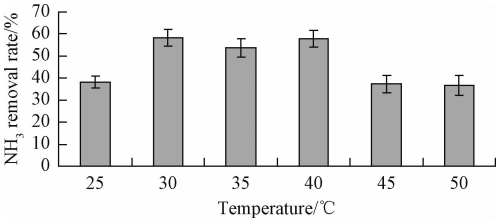


图 5　温度对 YX-3 氨气去除率的影响

Fig. 5　Effect of temperature on YX-3 removal of ammonia

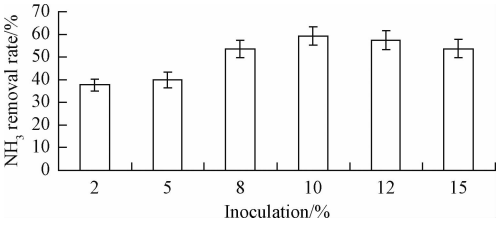


图 6　接种量对 YX-3 氨气去除率的影响

Fig. 6　Effect of inoculation on YX-3 removal of ammonia

获得 7 株能够降氨除臭的微生物菌株,其中菌株 YX-3 降氨效果最佳。通过菌株形态特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析,将该菌鉴定为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensi*)。菌株 YX-3 在30 d 的模拟堆肥实验中,对氨气的去除率达 56.9%,但对硫化氢的去除率仅为 8.6%,说明该菌对臭气中不同成分的降解能力不同。对菌株降氨除臭条件优化结果显示:最佳温度为 30 ~ 40 ℃,最佳接种量为 8%。

在已有的报道中,暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensi*)可以产生丰富的抗菌活性物质,主要用于生防领域[10,11],菌株 YX-3 由于可以产生芽孢,可以耐受堆肥过程中的高温,因此,在堆肥实践中具有实际的应用价值。

堆肥中释放的臭气成分复杂,主要成分有 NH_3、H_2S、VOCs 等。每种微生物菌株一般只对单一的臭气成分去除效率高,如果只使用单一除臭菌株,达不到高效除臭的目的,因而堆肥除臭菌群的筛选成为研究的热点[12]。本试验结果显示,菌株 YX-3 对 H_2S 的去除效果不佳,因此,下一步研究需要筛选对硫化氢去除效果强的菌株,并将其与 YX-3 按照一定比例复配成高效除臭的复合菌群,并对其作用机理进行深一步的探讨。

参 考 文 献

1　薛瑞芳. 病死畜禽无害化处理的公共卫生学意义. 畜牧业,2012;(11):54—55
Xue Ruifang. The public health significance of harmless treatment the mortality of livestock and poultry. Livestock and Poultry Industry, 2012;(11):54—55

2　陈腾飞,吴志明,刘阳利,等. 热辅快速生物发酵分解工艺无害化处理病死猪尸体效果评估. 动物医学进展,2015;36(5):81—85
Chen Tengfei, Wu Zhiming, Liu Yangli, *et al*. Evaluation of effect on harmless treatment of dead pig carcass by process of rapid biological fermention decomposition. Progress in Veterinary Medicine, 2015; 36(5):81—85

3　陶秀萍,董红敏. 畜禽尸体堆肥无害化处理技术现状. 现代畜牧兽医,2014;(7):25—29
Tao Xiuping, Dong Hongmin. Livestock and poultry carcass composting: A review. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014;(7):25—29

4　Berge A C, Glanville T D, Millner P D, *et al*. Methods and microbial risks associated with composting of animal carcasses in the United States. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2009; 234(1):47—56

5　Eamens G J, Dorahy C J, Muirhead L, *et al*. Bacterial survival studies to assess the efficacy of static pile composting and above ground burial for disposal of bovine carcass. Journal Applied Microbiology, 2011; 110(6):1402—1413

6　申彦晶,饶力群,任　杰,等. 除氨除臭芽孢杆菌的筛选鉴定及其氮素迁移过程. 微生物学通报,2015;42(7):1234—1240
Shen Yanjing, Rao Liqun, Ren Jie, *et al*. Identification and nitrogen migration of an ammonia-oxidizing and deodorizing *Bacillus*. Microbiology China, 2015;42(7):1234—1240

7　赵　斌,何绍江. 微生物学实验. 2 版. 北京:科学出版社,2002:148—149
Zhao Bin, He Shaojiang. Microbiology experiment. 2rd ed. Beijing: Science Press, 2002:148—149

8　孙　静,朱　艳. 亚甲基兰分光光度法测定气态硫化氢方法研究. 环境科学与技术,2004;27(增刊 1):52—54
Sun Jing, Zhu Yan. Method study on determination of gaseous H_2S with methylene blue spectrophotometry. Environmental Science and Technology, 2004; 27(S1):52—54

9　王守红,朱凌宇,徐　荣,等. 菌剂添加对牛粪堆肥氮素变化及腐熟度影响. 安徽农业大学学报,2017;44(4):659—664
Wang Shouhong, Zhu Lingyu, Xu Rong, *et al*. Nitrogen changes and maturity of cow manure composting influenced by microbial inoculum. Journal of Anhui Agricultural University, 2017;44(4):659—664

10　陈倩倩,刘　波,王阶平,等. 芽孢杆菌 FJAT-28592 抗真菌脂肽的研究. 农业生物技术学报,2016;24(2):261—269
Chen Qianqian, Liu Bo, Wang Jieping, *et al*. Anti-fungal lipopetides produced by *Bacillus siamensis* FJAT-28592. Journal of Agri-

cultural Biotechnology, 2016;24(2):261—269

11 许本宏,林俊芳,叶志伟,等. 带鱼肠道中芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵液抗菌性质研究. 水产科学,2018;37(2):193—200
Xu Benhong, Lin Junfang, Ye Zhiwei, *et al*. Isolation and identification of *Bacillus* from gastrointestinal tract of hairtail and antibacterial characteristics of their fermented liquids. Fisheries Science, 2018;37(2):193—200

12 张生伟,姚 拓,黄旺洲,等. 猪粪高效除臭微生物菌株筛选及发酵条件优化. 草业学报,2015;24(11):38—47
Zhang Shengwei, Yao Tuo, Huang Wangzhou, *et al*. Optimization of fermentation conditions of swine manure and screening for efficient microbial deodorant strains. Acta Prataculturae Sinica, 2015;24(11):38—47

Screening and Identification of Deodorant Microorganism for Dead-pig Composting

LIU Biao, YIN Hong-mei, LIU Hui-zhi*
(Hunan Microbiology Institute, Changsha 410009, China)

[**Abstract**] In order to obtain deodorant microorganisms for dead-pig composting, effective strains were screened by combining NH_3 selective media and the boric acid absorption method and the phylogenetic position of YX-3 was determined. Seven strains with ammonia emission ability were sceened from pig compost, soil and dead-pig compost samples, labeles as YX-1、YX-2、YX-3、YX-4、YX-6、YX-7、YX-8. In a composting experiment of 30 d, the NH_3 emission rate of strain YX-3 was 56.9%, which was higher than other six strains. Based on the results of morphology, physio-biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis, strain YX-3 was identified as *Bacillus siamensi*. The single-factor test was used to determine the optimum deodorant conditions of YX-3. The optimum culture temperature was 30 ~ 40 ℃ and the best inoculation amount was 8%. Compared with the NH_3 emission rate, YX-3 showed lower H_2S emission ability, which indicated that efficient H_2S emission strains should be screened for high deodorizing effect. The result shows that *Bacillus siamensi* YX-3 has great potential application prospects in the field of agriculture and environment protection.

[**Key words**] dead-pig composting ammonia emission deodorant strain strain identification