

尹红梅,刘 标,郭照辉,等. 1株畜禽粪便堆肥脱氨除臭菌的筛选及特性[J]. 江苏农业科学,2020,48(17):261-265.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.052

1 株畜禽粪便堆肥脱氨除臭菌的筛选及特性

尹红梅,刘 标,郭照辉,许丽娟,杜东霞,陈 薇
(湖南省微生物研究院,湖南长沙 410009)

摘要:为了探索微生物除臭菌对畜禽粪便中氨气的处理效果,采用富集、平板划线分离法,从堆肥样品中共分离出25株菌株,通过氨气选择性培养基筛选出1株高效抑制氨气的菌株,命名为菌株YS1。根据形态学观察、内部转录间隔区(ITS)rDNA序列同源性比对、系统进化分析对菌株YS1进行多相鉴定,初步鉴定该菌株为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。结果表明,菌株YS1接种到硝化培养基后反应96 h, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量从100.0 mg/L下降至9.4 mg/L, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的去除率达90.6%,体系总氮削减率达58.6%。在反硝化培养基中反应96 h, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的浓度由初始的99.3 mg/L下降为17.6 mg/L,降解率达82.3%,体系总氮削减率达35.4%。溶血性试验表明,YS1菌株无溶血性。

关键词:尖孢镰刀菌;除臭菌;脱氨;堆肥; $\text{NH}_4^+ - \text{N}$; $\text{NO}_3^- - \text{N}$; 菌株YS1

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)17-0261-05

随着畜禽养殖业的快速发展,畜禽养殖废弃物大量堆积,导致严重的环境污染问题,也影响养殖场的卫生防疫和人体健康。禽畜粪便是畜禽养殖

废弃物的主要来源。据有关数据统计,2015年规模化畜禽养殖粪污产生量为 3.834×10^9 t,远超同期工业固体废弃物的排放量,据初步估计,到2020年我国养殖业产生的畜禽粪便将超过60亿t^[1]。好氧堆肥技术由于工艺简单、能耗低、投资少,被广泛运用于畜禽粪便的处理,但是传统的好氧堆肥处理容易产生恶臭,氮素损失严重,不仅污染大气,还降低了肥料的养分含量。当前,除臭保氮技术是国内外畜禽粪便堆肥研究的重点和热点,但是迄今为止成效甚微。畜禽粪便堆肥产生的恶臭气体的主要成

收稿日期:2019-09-05

基金项目:湖南省科技重点研发计划(编号:2017NK2155);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。

作者简介:尹红梅(1979—),女,湖南邵阳人,硕士,副研究员,研究方向为环境微生物。E-mail:yyqhm@163.com。

通信作者:陈 薇,硕士,高级农艺师,研究方向为环境微生物。E-mail:66998902@qq.com。

Environmental and Water Resources Congress 2018: Watershed Management, Irrigation and Drainage, and Water Resources Planning and Management. Reston, VA: American Society of Civil Engineers, 2018:498-508.

[3]辛国省,龙瑞军,尚占环,等. 青藏高原东北缘放牧草地土壤矿物元素含量及分布特征[J]. 草业学报,2012,21(2):8-17.

[4]Finley J W. Bioavailability of selenium from foods[J]. Nutrition Reviews,2006,64(3):146-151.

[5]Rayman M. Selenium intake and status in health & disease[J]. Free Radical Biology and Medicine,2017,112:5.

[6]Fordyce F. Selenium geochemistry and health[J]. AMBIO,2007,36(1):94-97.

[7]唐玉霞,王慧敏,吕英华,等. 硒肥浸种对小麦生长发育及产量和籽粒含硒量的影响[J]. 麦类作物学报,2010,30(4):731-734.

[8]蒋 卉,韩爱芝,蔡雨晴,等. 新疆引进红枣中微量元素和重金属含量的测定与聚类分析[J]. 食品科学,2016,37(6):199-203.

[9]赵 晗,蔡 超. 恩施地区玉米硒的生物可给性及其健康风险评估[J]. 江苏农业科学,2018,46(4):228-230.

[10]陈 冰,刘婉贞. 富硒肥料制备及其在水稻上的应用和影响效果研究[J]. 大氮肥,2019,42(3):148-150.

[11]胡汝骥. 中国天山自然地理[M]. 北京:中国环境科学出版社,2004:35-430.

[12]刘志兴,徐俊荣,李梅英,等. 新疆巩乃斯河水化学分析[J]. 干旱区地理,2010,33(1):23-28.

[13]刘光崧,蒋能慧,张连第. 土壤理化分析与剖面描述[M]. 北京:中国标准出版社,1996:56-258.

[14]鲍士旦. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业科技出版社,2000:233-300.

[15]田应兵. 若尔盖高原湿地生态系统的恢复与土壤碳、硒变化的研究[D]. 重庆:西南农业大学,2003:45-47.

[16]田应兵,陈 芬,熊明彪,等. 若尔盖高原湿地土壤硒的数量、形态与分布[J]. 水土保持学报,2004,18(3):66-70.

[17]杨玉雪,杨兰芳. 土壤硒对植物生长影响研究进展[J]. 耕作与栽培,2014(2):50-52.

[18]杨兰芳. 土壤中的硒[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2000,18(1):43-46.

分是氨气、硫化氢等,且氨气占比最大。当下畜禽粪便堆肥脱氮除臭的方式多种多样,可分为物理、化学、生物、微生物方式等^[2]。微生物处理方式是借助微生物的生理功能以及代谢作用,对其中的恶臭物充分降解,在实际使用中具有脱氮效果稳定突出、避免二次污染等诸多优势,已成为当下解决臭气问题的关键方法之一^[3]。微生物脱氮除臭的主要作用机制是微生物的硝化和反硝化作用^[4],因此这种除臭技术的关键是筛选得到高效优势的微生物。

在除臭领域的微生物筛选、产品设计中,日本、欧美的技术更全面先进,目前取得了一系列的成果。而我国该领域的基础研究有一定滞后,集中在相关除臭剂的基础试验上^[5],具备知识产权和科技创新的除臭制剂产品的研究不多。本研究以堆肥腐熟样为分离材料,分离筛选得到1株脱氮除臭效果好的菌株,命名为YS1。进行了形态观察、内转录间隔区(ITS)测序等方式鉴定,同时分析了菌株YS1的降氮能力,以期控制畜禽粪便形成的恶臭气体,改善生态环境,为微生物除臭剂的开发和应用提供更多的理论参考及技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料

腐熟堆肥样采自湖南省株洲市某有机肥厂,用于具有脱氮效果的微生物菌株筛选。

分离培养基:牛肉膏蛋白胨培养基、高氏一号培养基等。

NH₃选择性培养基:蔗糖50.0 g, KH₂PO₄ 2.0 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.1 g, ZnSO₄ 0.5 g, NaCl 2.0 g, H₂O 1 000 mL等。

硝化培养基:葡萄糖5.00 g, (NH₄)₂SO₄ 0.47 g, NaCl 1.00 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.05 g, K₂HPO₄ 0.50 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.25 g, 蒸馏水1 000 mL, pH值7.0, 于121℃灭菌20 min。

反硝化培养基:葡萄糖5.000 g, KNO₃ 0.722 g, NaCl 1.000 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.050 g, K₂HPO₄ 0.500 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.250 g, 蒸馏水1 000 mL, pH值7.0, 于121℃灭菌20 min。

1.2 方法

1.2.1 脱氮除臭菌的富集、分离与纯化 取腐熟堆肥样10 g接种于装有90 mL无菌水的三角瓶中,室温环境下于180 r/min摇床处理30 min,随后在摇床中静置20 min,取5 mL接种在95 mL NH₃培养基

中,于30℃、180 r/min摇床培养5 d,取5 mL发酵液继续接种在NH₃培养基中,以淘汰不能利用NH₄⁺-N的微生物,如此反复连续富集7代。将发酵液适当稀释后,涂散在不同的培养基平板上,于30℃培养箱中培养,筛选其中长势良好的菌落,多次分离纯化,直至获得完全纯的单菌落,作斜面保存。

1.2.2 脱氮除臭菌的复筛 参照Liu等的筛选方法^[6],将分离得到的单菌株接种培养过夜后,以体积比5%的接种量接种至NH₃选择性培养基中,30℃、180 r/min摇床培养。于培养后24、48、96 h取样,采用凯氏定氮法测定NH₃的释放量。

1.2.3 高效脱氮菌株的鉴定

1.2.3.1 形态观察 将目标菌株YS1接种至固体培养基平板上,于28℃下恒温培养。待菌落长出后,观察菌落的大小、形状、颜色等属性,结合《真菌鉴定手册》^[7]进行初步鉴定。

1.2.3.2 ITS序列的聚合酶链式反应(PCR)扩增和测序研究 YS1基因组DNA的提取过程参照Ferre等的方法^[8]完成。结合真菌ITS引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[9-10]扩增ITS rDNA序列。PCR参照刘建利的方法^[10]进行。PCR产物经回收、纯化等处理后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。ITS rDNA结果在GenBank中完成同源性比较,挑选相似性>96%的序列,结合MEGA 5.0软件构建ITS rDNA序列的系统进化树^[11]。

1.2.4 溶血性试验 将活化后的YS1及对照菌株LY-3接种于血平板上,在30℃静置培养48 h,观察是否有溶血圈出现,以对照菌株LY-3作为指示菌株,判断尖孢镰刀菌YS1是否具有溶血性^[12]。

1.2.5 种子液制备 将斜面上保存的YS1接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基中,28℃、180 r/min培养48 h,制得种子液用于后续试验。

1.2.6 脱氮性能的测定 用“1.2.5”节中制备形成的菌悬液,以2%的接种量接种至硝化、反硝化培养基中,于30℃、180 r/min摇床培养。每隔24 h取样,样品经8 000 r/min离心20 min,取上清液测定NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、总氮含量,每个取样点设置3个平行。

1.2.7 分析测定 硝基氮含量采用紫外分光光度法进行检测,氨氮含量采用纳氏试剂分光光度法进行检测,总氮含量采用凯氏定氮法测定。菌丝干质量采用称质量法测定。

1.3 数据处理

数据采用 SPSS 19.0 统计软件 One - way ANOVA 程序进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选结果

猪粪腐熟堆肥样经富集、分离纯化后,共获得 25 株脱氨除臭菌株。将分离得到的 25 株菌株接种到 NH_3 选择性培养基,发酵培养 48 h 后,复筛得到 7 株脱氨效率较好、生长旺盛的单菌,分别编号为 YS1、YS3、YS4、YS5、YX1、YX3、YX4。这 7 株菌株对氨气的去除率如表 1 所示,可以看出,培养 48 h 后,菌株 YS1 对氨气的降解率达 81.20%,显著高于其他菌株($P < 0.05$)。最后选择除氨效率高、生长速度快的 YS1 为目标菌株进行后续试验。

2.2 菌株 YS1 的鉴定

2.2.1 菌落及菌体形态学观察 如图1所示,菌株

YS1 在 PDA 培养基上培养 48 h 后,菌落呈白色,突起絮状,高 2 ~ 4 mm。菌丝白色质密,呈绒毛状,孢子呈粉质,其孢子呈纺锤形。菌落与孢子的形态特征与镰刀菌分类鉴定标准基本一致。

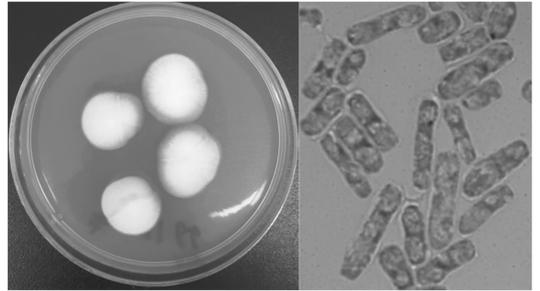


图1 YS1 的菌落形态及孢子形态

表 1 菌株对氨气的去除率

菌株	氨气去除率 (%)
YS1	81.21 ± 2.91a
YS3	51.53 ± 1.82b
YS4	35.16 ± 0.73c
YS5	34.31 ± 0.52c
YX1	53.96 ± 1.25b
YX3	47.50 ± 0.92b
YX4	38.65 ± 0.73c
CK	10.50 ± 0.92b

注:不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

2.2.2 ITS 序列分析及系统发育树构建 PCR 扩增获得 YS1 菌株的 ITS 序列长度为 532 bp,在 GenBank 数据库中进行 Blast 同源性比对分析,结果显示其与 *Fusarium oxysporum* 同源性达 98% 以上。利用 MEGA 5.0 软件对菌株 YS1 的 ITS rDNA 构建系统发育树,结果见图 2。结合菌株的菌落形态、显微形态特征及 ITS rDNA 序列分析的结果,YS1 菌株可鉴定为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)。

2.3 菌株 YS1 溶血性

以 LY - 3 为参照菌株,检测菌株 YS1 溶血性。从图 3 可以看出,LY - 3 菌株菌落附近形成了尺寸偏大的溶血圈(图 3 - B),而尖孢镰刀菌 YS1 菌落周围没有出现溶血圈(图 3 - A),说明尖孢镰刀菌 YS1 不具有溶血性。

2.4 菌株 YS1 脱氮性能测定

2.4.1 菌株 YS1 硝化性能测定 将菌株 YS1 种子

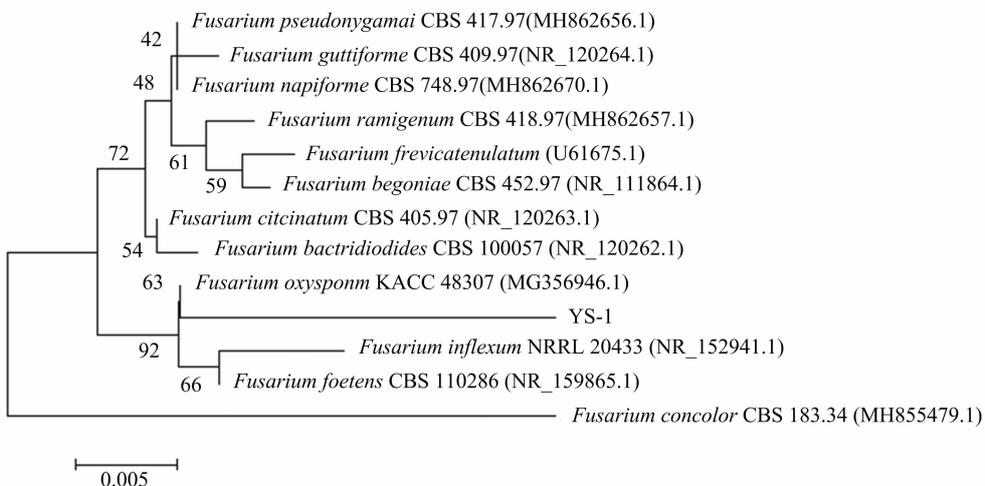
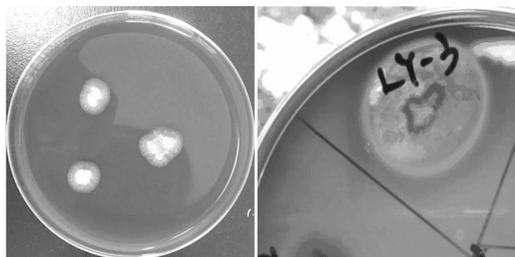


图2 菌株 YS1 系统发育树



A. YS1

B. LY-3

图3 尖孢镰刀菌 YS1 及对照菌株 LY-3 溶血性

液以 5% 的接种量接种于硝化培养基中, 考察 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 转化情况, 结果见图 4。菌株 YS1 在 24 h

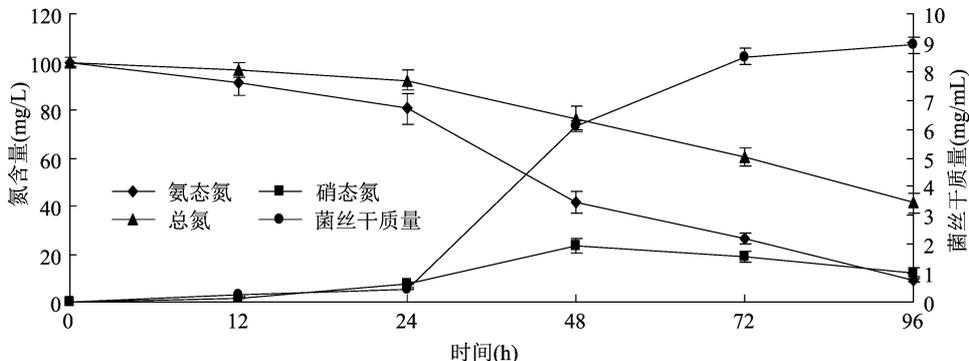


图4 菌株 YS1 对氨态氮的去除及菌丝干质量的变化

2.4.2 菌株 YS1 反硝化性能测定 将菌株 YS1 接种于反硝化培养基中, 测定反应过程中菌丝干质量及硝态氮、氨态氮、总氮含量的变化。由图 5 可知, 在反应 96 h 时, YS1 菌丝干质量达 6.12 mg/mL, 表明菌株 YS1 在反硝化培养基上长势理想。菌株 YS1 对数期后 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的转化速率很快提升, 经反应 96 h, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 含量从最初的 99.3 mg/L 降至

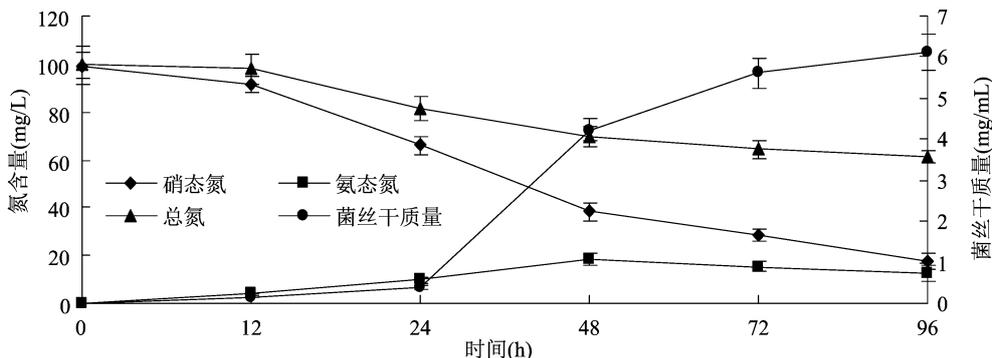


图5 菌株 YS1 对硝态氮的去除及菌丝干质量的变化

3 讨论与结论

堆肥处理是实现畜禽粪便无害化与资源化的一个十分有效的途径。堆肥过程中散发的恶臭气体中的主要成分是氨气、硫化氢、三甲胺等, 其中氨气占比最大。有研究表明, 在堆肥过程中, 有

后进入对数期, 随后开始快速转化 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, 96 h 内将 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 量从 100.0 mg/L 降至 9.4 mg/L, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的去除率达 90.6%。在 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 氧化的同时, 培养基中积累 $\text{NO}_3^- - \text{N}$, 反应 48 h 后, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度达 23.4 mg/L, 随后缓慢下降。体系总氮含量初始值为 99.6 mg/L, 反应前 24 h, 发酵液的总氮含量维持在一个稳定的水平, 24 h 后, 体系总氮含量开始下降, 96 h 时为 41.2 mg/L, 总氮含量的削减率达 58.6%。证明 YS1 菌株有良好的硝化性能。

17.6 mg/L, 降解率达 82.3%。从图 5 中还可以看出, 反硝化培养基中有 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 积累, 反应 48 h 后, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量达 18.6 mg/L, 随后逐渐下降。体系总氮含量在菌株 YS1 进入对数期后迅速减少, 后逐渐稳定, 反应 96 h 后总氮含量从最初的 99.6 mg/L 减少到 64.3 mg/L, 削减率为 35.4%。初步确定 YS1 菌株有良好的反硝化性能。

98% 的氮以 NH_3 形式挥发损失^[13]。氮的损失和形成的恶臭不仅污染环境, 影响人体健康, 而且降低了肥料中的养分含量。

本试验以堆肥腐熟样为分离源, 以 NH_3 的释放量为分析菌株除臭性能指标因素, 并从堆肥样本中分离获得 1 株脱氨除臭性能最为突出的菌株

YS1,根据菌株菌落、菌体形态与 ITS rDNA 序列分析结果,鉴定菌株 YS1 为尖孢镰刀菌。

溶血性是体外对相关菌株安全性测定过程中需要分析的关键指标之一。根据溶血特点,可对该指标分成2类: α 溶血,表现为菌落周围存在草绿色的溶血圈,对人致病力差; β 溶血,表现为菌落周围存在透明溶血圈,易让人体发病。若不存在溶血便不会形成溶血圈。本试验观察到菌株 YS1 无溶血圈形成,说明菌株 YS1 不具有溶血性。

将菌株 YS1 接种于硝化培养基中,96 h 内对氨态氮的去除率达 90.6%。同时发现在 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 氧化的同时,培养基中积累 $\text{NO}_3^- - \text{N}$,反应 48 h 后, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 含量达 23.4 mg/L。将菌株 YS1 接种于反硝化培养基中,在 96 h 内对硝态氮的去除率达 82.3%,同时发现培养基中有 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 积累,在反应 48 h 后, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 含量达 18.6 mg/L。初步判断 YS1 菌株具有良好的硝化、反硝化能力。

以往的反硝化理论指出,反硝化需要在缺氧的环境下展开,溶解氧的存在对菌株反硝化发挥了一定的抑制效果。好氧反硝化环节中,由于内部存在相应的还原酶,所以可借助 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 与氧气,完成协同呼吸^[14]。YS1 的菌体中也可能具有相应的还原酶,从而可借助氧和硝酸盐共呼吸,这样可在好氧环境下实现反硝化作用。

本试验筛选得到的尖孢镰刀菌具有同步硝化与反硝化特性,这在国内外文献中鲜见报道。尖孢镰刀菌分致病性与非致病性2种。尖孢镰刀菌致病菌是农作物重要的土传性真菌性病原菌,会引起植物根部腐烂、维管束褐变及植株萎蔫,导致茄科、芭蕉科与葫芦科等许多重要农作物严重减产^[15]。非致病性尖孢镰刀菌能在植株中定殖,不会造成植物病害且对致病性尖孢镰刀菌有良好的抑制作用,因此已被作为生防菌株应用于防治番茄、黄瓜、康乃馨等植物的枯萎病^[16-17]。为了确定菌株 YS1 是否能用于生产实践,在后续研究中,将进一步鉴定其为致病菌株还是非致病性菌株。

本研究从猪粪腐熟堆肥样中共获得 25 株脱氨除臭菌株,通过氨气选择性培养基复筛,得到 1 株脱氨除臭效率最高的菌株 YS1,经鉴定为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*),该菌株无溶血性。

菌株 YS1 具有良好的硝化与反硝化性能。将菌株 YS1 接种于硝化培养基中,96 h 后 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的去除率达 90.6%;将菌株 YS1 接种于反硝化培养基中,反应 96 h 后,菌株 YS1 菌丝干质量达

6.12 mg/mL, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的降解率达 82.3%。

参考文献:

- [1] 武淑霞,刘宏斌,黄宏坤,等. 我国畜禽养殖粪污产生量及其资源化分析[J]. 中国工程科学,2018,20(5):103-111.
- [2] Gwyther C L, Williams A P, Golyshin P N, et al. The environmental and biosecurity characteristics of livestock carcass disposal methods: a review[J]. Waste Management, 2011, 31(4): 767-778.
- [3] Chen X G, Geng A L, Yan R, et al. Isolation and characterization of sulphur-oxidizing *Thiomonas* sp. and its potential application in biological deodorization[J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 39(6): 495-503.
- [4] Wang D W, Yao T, Yang Q L, et al. Screening and degradation characterization of efficient and stable cellulose degrading microbial communities[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2014, 23(2): 253-259.
- [5] Ni J Q, Heber A J, Sutton A L, et al. Effect of swine manure dilution on ammonia, hydrogen sulfide, carbon dioxide, and sulfur dioxide releases[J]. Science of the Total Environment, 2010, 408(23): 5917-5923.
- [6] Liu Z, Powers W, Murphy J, et al. Ammonia and hydrogen sulfide emissions from swine production facilities in North America: a meta-analysis[J]. Journal of Animal Science, 2014, 92(4): 1656-1665.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979: 226-227.
- [8] Ferrer C, Colom F, Frases S, et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8 S ribosomal DNA typing in ocular infections [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(8): 2873-2879.
- [9] 尹乐斌,雷志明,孔彦卓,等. 一株高产果胶酶的真菌分离鉴定及酶学特性[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 93-97.
- [10] 刘建利. 利用 28S rDNA D1/D2 区和 ITS rDNA 序列鉴定甜瓜白粉病病原菌[J]. 植物保护学报, 2011, 38(1): 47-51.
- [11] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [12] 孟祥晨,李雪,姚蕾,等. 两株植物乳杆菌作为潜在益生菌的体外评价[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(9): 44-51.
- [13] Pagans E, Barrena R, Font X, et al. Ammonia emissions from the composting of different organic wastes. Dependency on process temperature[J]. Chemosphere, 2006, 62(9): 1534-1542.
- [14] 樊杰,林炜铁. 一株硝化脱氮除臭菌的筛选鉴定及其多途径氮代谢功能的研究[J]. 环境科学学报, 2010, 30(4): 722-728.
- [15] Kaur R, Kaur J, Rama R S. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent[J]. Plant Pathology Journal, 2010, 9(3): 79-91.
- [16] Shishido M, Miwa C, Usami T, et al. Biological control efficiency of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments [J]. Phytopathology, 2005, 95(9): 1072-1080.
- [17] Abeyasinghe S. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, the casual agent of root and stem rot of *Cucumis sativus* by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* [J]. Ruhuna Journal of Science, 2006, 1: 24-31.