

## 研究报告

## 除臭菌株组合强化猪粪堆沤细菌群落结构分析

张明叶<sup>1,2</sup>, 赵远东<sup>1,2</sup>, 孙将<sup>1</sup>, 吴国芳<sup>3</sup>, 王磊<sup>3</sup>, 王彦伟<sup>\*1</sup>, 胡国全<sup>\*1,3</sup>

1 农业农村部成都沼气科学研究所, 四川 成都 610041

2 中国农业科学院研究生院, 北京 100081

3 青海大学畜牧兽医科学院 青海省高原家畜遗传资源保护与创新利用重点实验室 农业农村部青藏高原畜禽遗传育种重点实验室, 青海 西宁 810016

张明叶, 赵远东, 孙将, 吴国芳, 王磊, 王彦伟, 胡国全. 除臭菌株组合强化猪粪堆沤细菌群落结构分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1013-1031.

ZHANG Mingye, ZHAO Yuandong, SUN Jiang, WU Guofang, WANG Lei, WANG Yanwei, HU Guoquan. Bacterial community structure in pig manure composted with a deodorizing strain combination[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1013-1031.

**摘要:**【背景】好氧堆肥是处理农业固体废弃物常用的资源化利用方式, 但在此过程中会产生恶臭气体(NH<sub>3</sub>和H<sub>2</sub>S), 对人类和畜禽的健康造成威胁。微生物除臭技术成本低、效果好, 但单菌株的环境适应性差、作用单一。【目的】开发高效微生物除臭菌株组合, 优化微生物除臭技术, 解决堆肥恶臭问题。【方法】通过筛选除臭微生物、控温模拟堆肥研究微生物除臭菌株组合对堆肥过程中细菌群落结构变化的影响, 并对相关功能基因进行分析和注释。【结果】添加微生物除臭菌株组合 E 的堆肥中, NH<sub>3</sub>和H<sub>2</sub>S的最高释放量仅有添加商用菌剂 X 组的 40%左右。物种分类结果表明, 堆肥过程中相对丰度较高的门包括变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinomycetota*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)等, 相较于 X 组和 CK 组, 变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinomycetota*)在 E 组的样本中具有更高的相对丰度; 优势菌属包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、假纤细芽孢杆菌属(*Pseudogracilibacillus*)等, 其中棒杆菌属在 E 组样本中一直占据优势。KEGG 数据库注释结果表明, 微生物除臭菌株组合 E 的添加促进了堆肥中微生物群落的氨基酸代谢水平; 功能基因注释结果也表明氨同化相关基因(*gs*, *gdh*, *asn*, *gln*)和含硫氨基酸合成相关基因(*cysC*)的丰度较高, 因此, 组合 E 减少 NH<sub>3</sub>和 H<sub>2</sub>S 排放的主要机制是促进了氮和硫元素转化为氨基酸等有机物。【结论】微生物除臭菌株组合 E 能够在粪污堆肥过程中有效抑制 NH<sub>3</sub>和 H<sub>2</sub>S 的释放, 为粪污资源化利用过程中产生的臭气处理提供了微生物资源基础。

**关键词:** 除臭菌株组合; 好氧堆肥; 氨气; 硫化氢; 细菌群落

资助项目: 青海省科学技术厅科技成果转化专项(2022-NK-124); 国家成都农业科技中心地方财政专项(NASC2023TD06); 成都市科技计划(2022-YF05-00753-SN)

This work was supported by the Special Project for Technology Achievement Transformation of Science and Technology Department of Qinghai Province (2022-NK-124), the Local Finance Special Project of National Chengdu Agricultural Science and Technology Center (NASC2023TD06), and the Chengdu Science and Technology Program (2022-YF05-00753-SN).

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Yanwei, wangyanwei@caas.cn; HU Guoquan, huguoquan@caas.cn

Received: 2024-05-15; Accepted: 2024-11-04; Published online: 2024-12-12

## Bacterial community structure in pig manure composted with a deodorizing strain combination

ZHANG Mingye<sup>1,2</sup>, ZHAO Yuandong<sup>1,2</sup>, SUN Jiang<sup>1</sup>, WU Guofang<sup>3</sup>, WANG Lei<sup>3</sup>, WANG Yanwei<sup>\*1</sup>, HU Guoquan<sup>\*1,3</sup>

1 Biogas Institute of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610041, Sichuan, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

3 Plateau Livestock Genetic Resources Protection and Innovative Utilization Key Laboratory of Qinghai Province, Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding on Tibetan Plateau, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Academy of Animal Science and Veterinary, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

**Abstract:** **[Background]** Aerobic composting is a common resource utilization method to treat agricultural solid waste, while odorous gases (NH<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>S) generated during the composting process pose a threat to the health of humans and animals. Microbial deodorization has low costs and good effects, while single strains have poor environmental adaptability and limited effects. **[Objective]** To develop a combination of efficient deodorizing strains and optimize microbial deodorization conditions to address the foul odor in composting. **[Methods]** The effects of the deodorizing strain combination on the changes of bacterial community structure during composting were studied by screening of deodorizing microbial strains and temperature-controlled simulated composting. Furthermore, the relevant functional genes were analyzed and annotated. **[Results]** The maximum release of NH<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>S from the compost supplemented with the deodorizing strain combination E was only about 40% of that from the compost treated with the commercial microbial agent X. The species classification results show that the phyla with relatively high abundance during composting include *Proteobacteria*, *Actinomycetota*, *Firmicutes* and *Bacteroidota*. Group E showed higher relative abundance of *Proteobacteria* and *Actinomycetota* than groups X and CK. The dominant genera included *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, and *Pseudogracilibacillus*, among which *Corynebacterium* kept being dominant in group E. The annotation results from the KEGG database indicated that the addition of the deodorizing strain combination E promoted the amino acid metabolism in the microbial community during composting. Similarly, functional gene annotation results revealed higher abundance of ammonia assimilation-related genes (*gs*, *gdh*, *asn*, and *gln*) and the sulfur-containing amino acid synthesis-related gene (*cysC*), suggesting that the combination E reduced NH<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>S emissions by facilitating the conversion of nitrogen and sulfur into amino acids and other organic compounds. **[Conclusion]** The deodorizing strain combination E can effectively inhibit the release of NH<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>S in the manure composting process, providing microbial resources for the treatment of waste gases generated in the manure resource utilization process.

**Keywords:** deodorizing strain combination; aerobic composting; NH<sub>3</sub>; H<sub>2</sub>S; bacterial community

近年来,我国生猪养殖业发展迅速,2021年生猪出栏67128万头,较2020年增长10.5%<sup>[1]</sup>。随着畜禽养殖的规模化、集约化发展,畜禽粪便作为养殖的副产物也在不断增加,处理不当不仅会滋生大量有害的细菌,还会对生态环境可持续发展造成严重威胁。目前,畜禽粪便资源化利用的处理方式主要有好氧堆肥、厌氧发酵和生产固体生物燃料等<sup>[2]</sup>。相较于其他处理方式,好氧堆肥法操作简单、工艺要求少、经济实惠,不仅可以去除堆肥中的有害物质,还可以将堆肥产品用于农业<sup>[3]</sup>,提供腐殖质或作为土壤改良剂,以此达到提高土壤肥力的目的<sup>[4]</sup>。然而,畜禽粪便好氧堆肥过程中会排放大量成分复杂恶臭气体,已成为堆肥发展的主要挑战<sup>[5]</sup>。氨气(NH<sub>3</sub>)、硫化氢(H<sub>2</sub>S)和挥发性有机物(volatile organic compound, VOC)是主要的恶臭气体成分<sup>[6]</sup>。空气中的颗粒物作为载体会将这些恶臭气体带到数公里以外,影响农业社区的生活环境。堆肥过程中氮素通过NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的形式浸出或通过NH<sub>3</sub>、N<sub>2</sub>O、N<sub>2</sub>等气体的形式逸出,造成的氮损失达到13%–70%<sup>[7]</sup>。H<sub>2</sub>S的形成主要是在堆肥的初期阶段,由于微生物的活动消耗了大量的氧气,堆肥内部出现缺氧或厌氧的微环境<sup>[8]</sup>,在这种情况下硫酸盐还原菌将硫酸盐还原为H<sub>2</sub>S<sup>[9]</sup>,同时其他含硫有机物发生去甲基化反应也会产生H<sub>2</sub>S<sup>[10]</sup>。H<sub>2</sub>S的嗅阈值很低,即使在低浓度下,也会对恶臭气体排放产生重大影响<sup>[11]</sup>。H<sub>2</sub>S的排放对生态环境质量和养殖场工作人员的健康构成了威胁<sup>[12]</sup>。

目前,恶臭气体的处理方式可以分为物理、化学和生物三大类<sup>[13]</sup>。相较于物理、化学除臭技术,添加微生物菌剂可以在中低温和大气压下进行<sup>[14]</sup>,并且在成本和环境友好性方面具有优势<sup>[15]</sup>。向粪便堆肥中添加高效除臭微生物在定殖后能够发挥“领头羊效应”<sup>[16]</sup>,减少致病微

生物的数量<sup>[17]</sup>,在加快形成稳定腐殖质的同时,从源头抑制恶臭气体的产生<sup>[18]</sup>。目前已有许多关于利用除臭微生物菌剂的研究,Zhao等<sup>[19]</sup>从堆肥样品中分离到耐热硝化细菌并将其作为微生物菌剂接种到堆肥中减少了29.7%的氨排放;牛永艳等<sup>[20]</sup>利用从沼渣和铁硫矿场土壤中分离到的微生物复配成微生物除臭菌剂应用到粪便堆肥中,NH<sub>3</sub>和H<sub>2</sub>S的释放量分别减少了62.84%和53.12%;Zhu等<sup>[21]</sup>的研究发现,接种微生物菌剂可以减少NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N产生,降低堆肥过程NH<sub>3</sub>挥发量,同时起到保氮除臭的作用,是控制含氮类恶臭气体产生的理想方法。

微生物在畜禽粪便堆肥过程中起着重要的作用,微生物群落结构的动态变化影响着有机物的降解和恶臭气体的产生,所以研究畜禽粪便堆肥过程中的微生物群落结构及多样性变化具有重要意义。传统的微生物研究方法,如末端限制性片段长度多态性(terminal-restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、PCR-变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)、16S rRNA基因克隆文库等方法检测环境中的微生物具有一些局限性。近年来,宏基因组测序技术在这方面取得了很大的进展,可以通过对样品中微生物基因序列的分析,快速确定微生物的种类和丰度<sup>[22]</sup>,成为研究环境微生物的重要工具。本文旨在探讨在实验室模拟堆肥的条件下,以某商用菌剂作对比,添加微生物除臭菌株组合对堆肥过程中NH<sub>3</sub>和H<sub>2</sub>S释放量的影响,并采用组学技术分析添加外源微生物对猪粪秸秆堆肥过程中优势细菌群落的组成和动态变化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

新鲜猪粪取自四川省成都市某养猪场;辅料

玉米秸秆取自四川省简阳市,机械粉碎至 3–5 cm 的小段。堆肥取自四川省成都市双流实验基地,污泥来自四川省成都市彭州污水处理厂。

库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*) 1-J-3, 保存于实验室。商用菌剂 X, 有效微生物包含枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 河南洛阳某生物科技有限公司。

## 1.2 培养基

脱氮菌富集培养基(g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  10.0, 维氏盐溶液 50 mL, 121 °C 灭菌 15 min; 维氏盐溶液(g/L):  $\text{NaCl}$  2.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{MnSO}_4$  0.05。脱硫菌富集培养基(g/L):  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  0.8,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  10.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgCl}_2$  0.2,  $\text{NaHCO}_3$  5.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.6, 121 °C 灭菌 15 min。富集培养基添加琼脂(1.5 g/100 mL), 121 °C 灭菌 15 min 即作为筛选培养基。牛肉膏蛋白胨培养基(g/L):  $\text{NaCl}$  5.0, 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 121 °C 灭菌 15 min。猪粪浸提液培养基: 新鲜猪粪与水按照 1:5 的比例混合, 于 30 °C、180 r/min 振荡 1 h, 使之充分混匀, 静置 30 min, 用纱布过滤, 丢弃底部残渣, 滤液中添加琼脂(1.5–2.0 g/100 mL), pH 自然, 121 °C 灭菌 15 min。

## 1.3 主要试剂和仪器

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{CH}_3\text{COONa}$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 牛肉膏、蛋白胨、琼脂, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

pH 计, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 高压灭菌锅, 三洋公司; 恒温静置培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 垂直层流洁净工作台, 青岛海尔特种电器有限公司; 梯度 PCR 仪, 贝

克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司; 紫外分光光度计, 贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司; 荧光分光光度计, 普洛麦格(北京)生物技术有限公司; 安捷伦 2100 生物分析仪, 安捷伦科技(中国)有限公司; 便携式复合气体检测仪, 深圳市科尔诺电子科技有限公司。

## 1.4 除臭菌株的分离与鉴定

取堆肥和污泥混合样品 5.0 g 加入灭菌的三角瓶中, 内含有灭菌的玻璃珠和 45 mL 无菌水, 于 30 °C、150 r/min 振荡 30 min, 使样品充分混合均匀, 取出后静置 20 min, 吸取 10 mL 上清液分别接种到装有 40 mL 脱氮菌富集培养基和脱硫菌富集培养基的三角瓶中, 于 30 °C、180 r/min 富集培养, 每隔 3 d 更换新鲜的富集培养基进行传代, 连续传代 5 次。

吸取 1 mL 最后一次的富集菌液, 用无菌生理盐水进行梯度稀释至  $10^{-6}$ , 取 100  $\mu\text{L}$  各个梯度的稀释液分别均匀涂布于脱氮菌和脱硫菌的固体筛选平板上, 置于 30 °C 恒温培养箱倒置培养 2–3 d, 长势良好的单菌落在相应的固体筛选平板上划线纯化, 重复纯化 2–3 次, 直至得到形态、颜色相同的单菌落。纯化后的单菌落在牛肉膏蛋白胨固体斜面上划线培养, 4 °C 冷藏保存, 备用。

为了使构建的微生物除臭菌株组合能够在实际的猪粪环境中正常生长, 用无菌接种环从斜面上挑取纯化后的单菌落在猪粪浸提液固体培养基上划线, 置于 30 °C 恒温培养箱培养 3 d, 每隔 12 h 观察并记录平板上菌落的生长情况。以菌株的生长状态和生长速度为评价指标, 挑选长势较好、生长较快的菌株进行后续试验。

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit, Tiangen)提取用作后续实验的细菌菌株的基因组 DNA, 按照说明书进行实验操作。采用细菌 16S rRNA 基因通

用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAC AG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACG ACT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): DNA 模板 80 ng, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10.0  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.0  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 25 s, 58  $^{\circ}$ C 25 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳成像, 使用凝胶成像系统观察条带。选择大小正确的条带所对应的 PCR 产物送至北京擎科生物科技有限公司测序。将获得的序列上传至 EzBioCloud 网站(www.ezbiocloud.net)进行同源序列比对, 找到同源序列, 确定其科属, 最后运用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树并通过 bootstrap 检验法验证系统发育树的稳定性。

### 1.5 除臭强化菌群的筛选

将复筛得到的 4 株菌株(脱氮菌 N-43、N-48, 脱硫菌 S-3、S-10)以及菌株 1-J-3 接种至牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 于 30  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养至对数期( $OD_{600}$  约 0.8), 备用。以菌株为不同因素, 接种或不接种作为 2 水平, 设计正交试验如表 1 所示, 将上述菌液按照 1:1 的比例混合, 制成不同的微生物除臭菌株组合的种子液, 分别命名为 A-H。将新鲜的猪粪搅拌均匀, 每份 1.0 kg 置于 4 L 的一次性饭盒中, 按照 5%的接种量依次向准备好的新鲜猪粪中接入 A-H 组的微生物除臭菌株组合种子液, 置于 30  $^{\circ}$ C 进行发酵培养。为了排除由于种子液中牛肉膏蛋白胨培养基的加入对猪粪中的土著微生物群落及 NH<sub>3</sub> 和 H<sub>2</sub>S 的排放产生影响, 空白组接入等量灭菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基, 每组设置 3 个重复。在规定的时间内使用便携式复合气体检测仪检测氨气和硫化氢的释放量, 发酵周期为 52 h。

### 1.6 菌株组合强化猪粪、秸秆模拟堆沤

为进一步探究微生物除臭菌株组合 E 在猪

表 1 微生物除臭菌株组合构建正交试验设计表  
Table 1 Combination of microbial deodorizing strains to construct orthogonal test factor level table

Treatments	N-43	N-48	S-3	S-10	1-J-3
A	+	+	+	+	+
B	+	+	+	-	-
C	+	-	-	+	+
D	+	-	-	-	-
E	-	+	-	+	-
F	-	+	-	-	+
G	-	-	+	+	-
H	-	-	+	-	+

+: 接种; -: 不接种。

+: Inoculation; -: Not.

粪秸秆堆沤过程中的效果, 购买市售商用菌剂 X 作为对照。以玉米秸秆为辅料, 与新鲜猪粪按照 1:6 的比例混合均匀, 使堆肥的 C/N 在 25-30 之间, 含水率为 60%左右。取混合均匀的材料 700 g 分装到 3 L 的玻璃烧杯中, 分别接入 5%商用菌剂 X 和微生物除臭菌株组合 E, 记为 X 组和 E 组; 空白组接入等量灭菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基, 记为 CK, 每组设置 3 个重复, 充分搅拌, 混合均匀后用保鲜膜封口置于培养箱中, 通过调节培养箱的温度模拟堆肥过程, 第 1-2 天为室温, 第 3-4 天为 30  $^{\circ}$ C, 第 5-9 天为 55  $^{\circ}$ C, 第 10-15 天置于室温。中低温期每天翻堆 1 次, 高温期每天翻堆 2 次, 发酵周期为 15 d。

每天下午 14:00 使用复合气体检测仪检测 NH<sub>3</sub> 和 H<sub>2</sub>S 的释放量。

采样方法: 完成气体检测后, 打开覆盖在烧杯上的保鲜膜进行翻堆, 翻堆后随机选取 5 个点共取样 50 g, 采集的样品置于 4  $^{\circ}$ C 保存, 备用。

### 1.7 文库的构建和宏基因组测序

将采集的样品送至上海派森诺生物科技股份有限公司, 基于 Illumina NovaSeq/HiSeq 平台进行高通量测序和分析。采用标准的 Illumina TruSeq DNA 文库制备实验流程构建所需的基因

组上机文库。将质检合格的 DNA 样品随机打断,使其片段化,通过 End Repair Mix 中 3'-5'核酸外切酶和聚合酶修复末端,并在 3'端引入“A”碱基,在连接酶的作用下,3'末端含有单碱基“T”的接头与之相连,接头产物经过纯化,利用 PCR 选择性地富集两端连有接头的 DNA 片段,同时扩增 DNA 文库。利用 PicoGreen 荧光核酸染料和荧光分光光度计方法定量文库;并使用安捷伦 2100 生物分析仪对 PCR 富集片段进行质量控制,验证 DNA 文库的片段大小及分布。上机测序。

### 1.8 数据分析和处理

采用 Origin 2021 软件进行数据分析并作图。细菌群落分析数据由上海派森诺生物科技股份有限公司提供的基因云平台(<https://www.genescloud.cn/home>)完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株形态特征和分子生物学鉴定结果

将富集后的菌液稀释涂布,分别在脱氮、脱硫固体筛选培养基上分离纯化后,得到 51 株脱氮菌株、18 株脱硫菌株,分别编号为 N-1-N-51、S-1-S-18。纯化得到的菌株在猪粪浸提液固体培养基上划线,通过观察 72 h 内的生长情况进行筛选,经过复筛总共得到 2 株高效脱氮菌株(N-43, N-48)和 2 株高效脱硫菌株(S-3, S-10),

对 4 株菌进行初步的形态特征鉴定,菌落形态如图 1 所示。

对 4 株菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增,PCR 产物经送至北京擎科生物科技有限公司测序。将获得的序列上传至 EzBioCloud 网站进行比对,并构建系统发育树如图 2 所示;所获 4 株菌与模式菌株的基因序列相似性在 97.37%–99.81%,结合形态特征比较,确定菌株 N-43 为柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*),菌株 N-48 为假单胞菌属(*Pseudomonas*),菌株 S-10 为棒杆菌属(*Corynebacterium*)。而菌株 S-3 与模式菌株坦氏不动杆菌(*Acinetobacter tandoii*) DSM 14970<sup>T</sup>的最高相似度只有 97.37%,小于 98.7%的种间差异<sup>[23]</sup>,可能是未被定义的新物种。

### 2.2 除臭菌群效果评价

将 A–H 组的微生物除臭菌株组合接种到猪粪中,置于 30 °C 发酵,猪粪中氨气和硫化氢的释放量如图 3 所示。组合 A、B、C、D、G、H 的 NH<sub>3</sub> 和 H<sub>2</sub>S 的释放量都在第 8 h 达到峰值, NH<sub>3</sub> 释放量分别为 2.28、3.18、3.41、2.06、3.30、2.54 mg/m<sup>3</sup>, H<sub>2</sub>S 释放量分别为 6.60、6.81、9.96、6.12、11.05、7.16 mg/m<sup>3</sup>。组合 E 的 NH<sub>3</sub> 和 H<sub>2</sub>S 释放量在前 8 h 出现小幅度的上升,8–12 h 出现下降,之后一直保持平缓趋势,没有出现大幅度上升趋势, NH<sub>3</sub> 在 36 h 达到峰值 0.28 mg/m<sup>3</sup>,远低于 CK 组和其他 7 个组合。

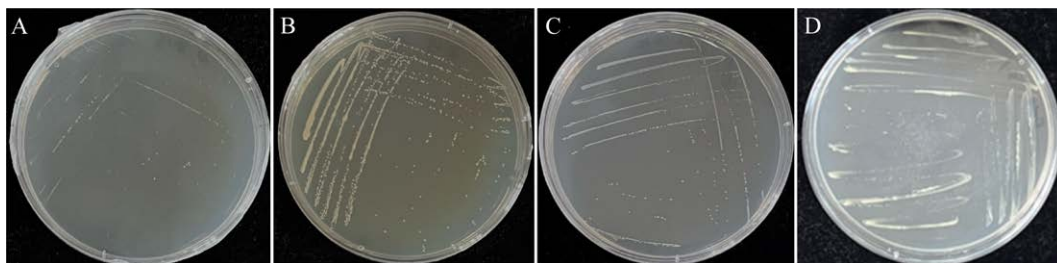
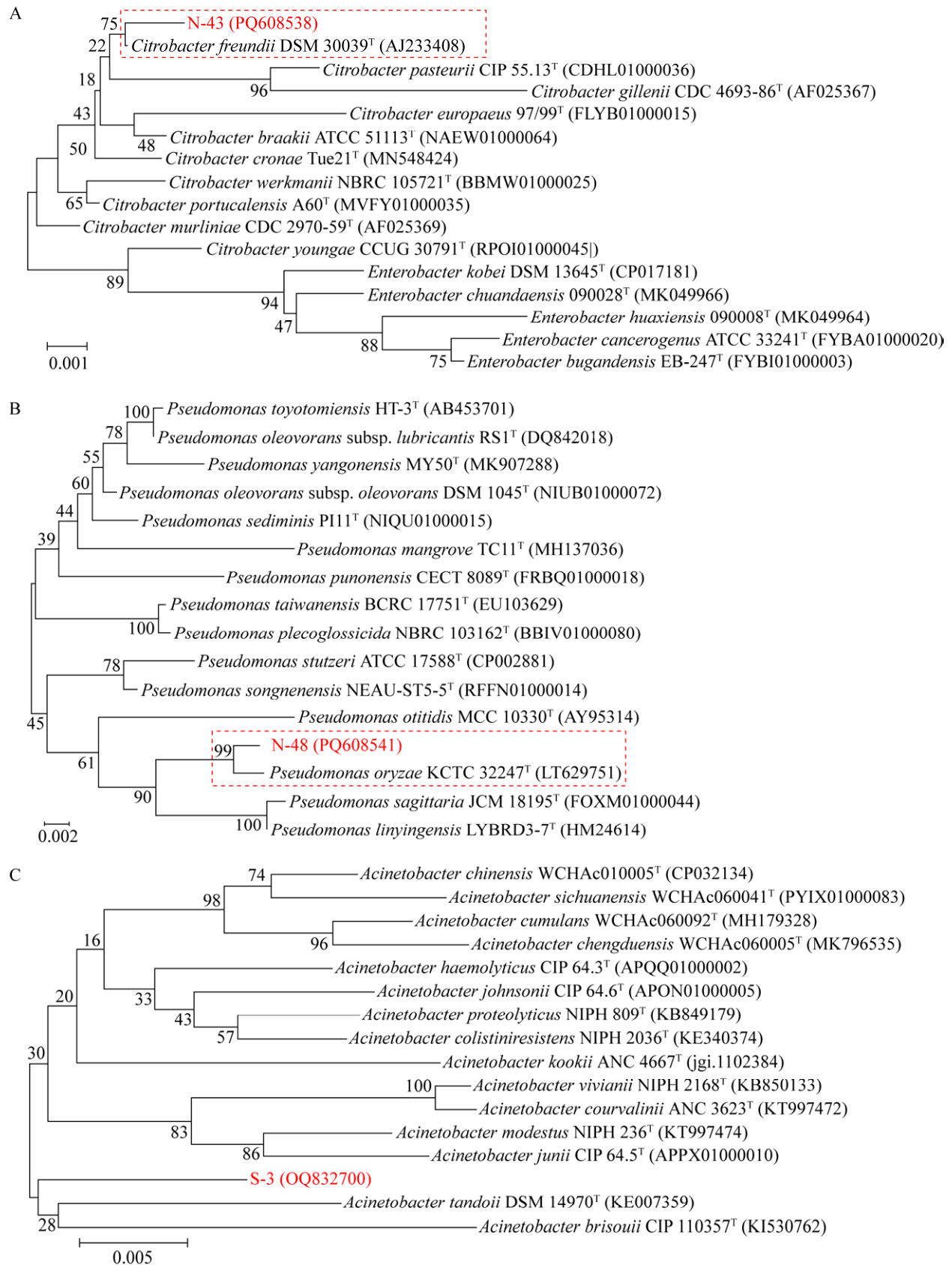


图 1 除臭菌株的菌落形态图

Figure 1 Colony morphology of deodorizing strains. A: Strain N-43; B: Strain N-48; C: Strain S-3; D: Strain S-10.





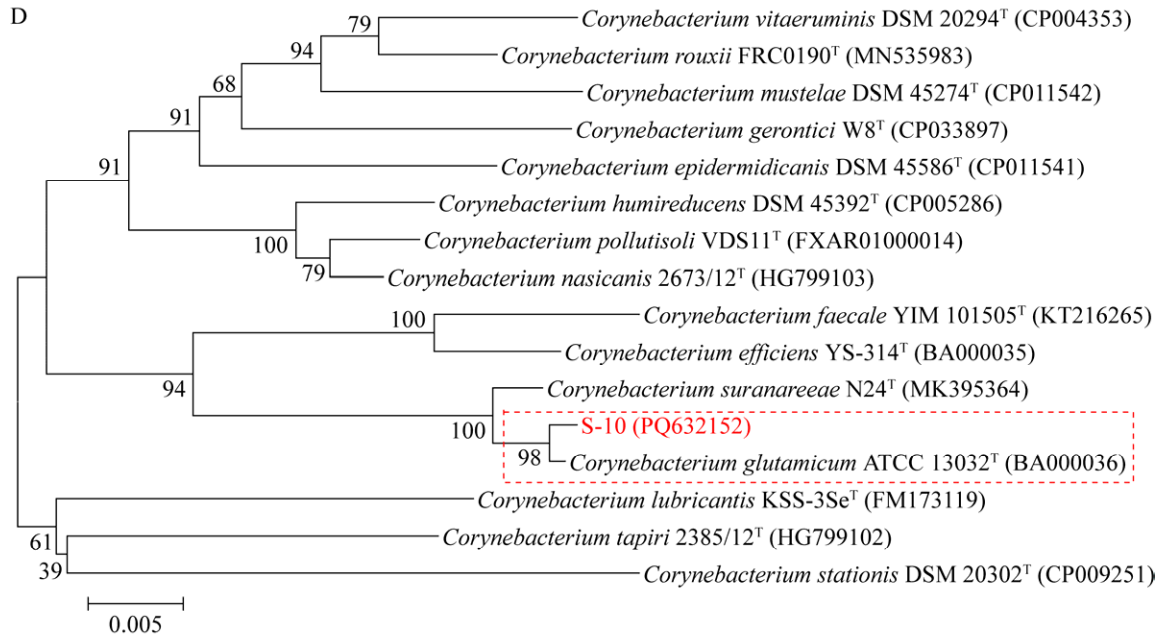


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的高效除臭菌株的系统发育树 A: 菌株 N-43; B: 菌株 N-48; C: 菌株 S-3; D: 菌株 S-10。括号内的序号为 GenBank 登录号; 分支点的数值代表 bootstrap 支持率; 刻度标尺表示每个核苷酸位点的置换率。

Figure 2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of highly effective deodorizing bacteria. A: Strain N-43; B: Strain N-48; C: Strain S-3; D: Strain S-10. The number in parentheses is GenBank accession number; Number on the branch points represent the support percentages of bootstrap; Bar indicates substitution per nucleotide position.

组合 E 在整个发酵过程中  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  的释放量最低, 达到峰值时分别仅有  $0.28 \text{ mg/m}^3$ 、 $0.71 \text{ mg/m}^3$ , 在下降后也未出现大幅度的波动, 说明组合 E 能够较好地抑制猪粪中  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  的释放, 并且能够保持稳定, 因此后续研究中选择由菌株 N-48 和菌株 S-10 组成的微生物除臭菌株组合 E 作为后续应用的微生物除臭菌株组合。

## 2.3 除臭菌株组合对猪粪模拟堆沤过程中 $\text{NH}_3$ 和 $\text{H}_2\text{S}$ 释放的影响

### 2.3.1 除臭菌株组合对堆沤过程中 $\text{NH}_3$ 释放的影响

为了探究构建的微生物除臭菌株组合 E (菌株 N-48 和 S-10) 对猪粪模拟堆沤过程中  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  释放的影响, 将组合 E 种子液、商用菌

剂 X 和等量灭菌的牛肉膏蛋白胨培养基添加到猪粪、秸秆混合物料中进行堆沤。堆沤过程中  $\text{NH}_3$  的释放如图 4A 所示, 前 3 天空白组 CK 和商用菌剂组 X、微生物除臭菌株组合 E 的  $\text{NH}_3$  释放量都有上升趋势, 在这一阶段 CK 组  $\text{NH}_3$  的释放量最多, 约为  $12.32 \text{ mg/m}^3$ , 这可能是堆肥原料中土著微生物分解有机物产生  $\text{NH}_3$ , 造成堆肥初期  $\text{NH}_3$  释放量增加, 添加了商用菌剂 X 和微生物除臭菌株组合 E 的实验组  $\text{NH}_3$  释放量都低于空白组。在第 3-4 天 3 组的  $\text{NH}_3$  释放量都出现下降趋势, 由于温度升高, 在第 4-5 天接着出现回升趋势, CK 组的  $\text{NH}_3$  释放量一直上升到第 6 天达到最大值  $69.39 \text{ mg/m}^3$ , 第 6-9 天开始缓慢下降, 第 9-10 天出现明显的下降趋势



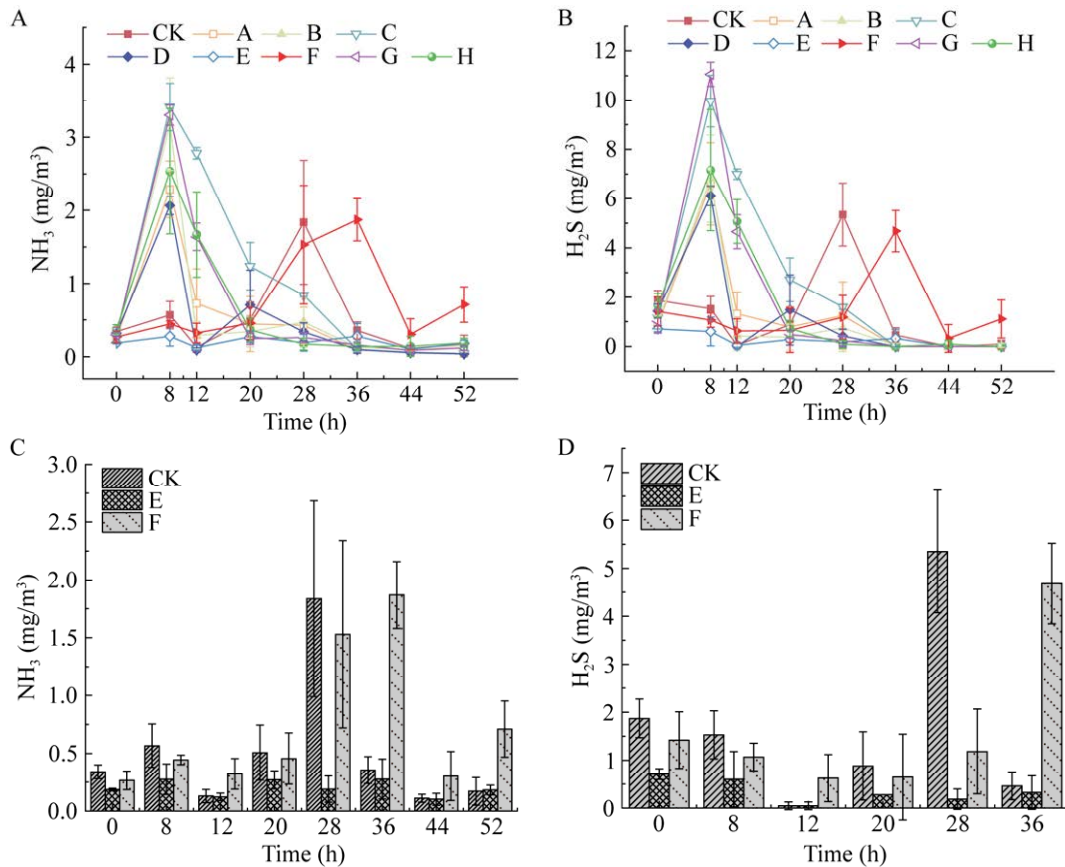


图 3 不同除臭菌株组合对猪粪发酵过程中  $\text{NH}_3$  (A、C)和  $\text{H}_2\text{S}$  (B、D)释放的影响 A–H: 本实验构建的不同除臭菌株组合, 如表 1 所示。

Figure 3 Effects of different deodorizing strains on the release of  $\text{NH}_3$  (A, C) and  $\text{H}_2\text{S}$  (B, D) during pig manure fermentation. A–H: Different deodorizing strain combinations constructed in this experiment, as shown in Table 1.

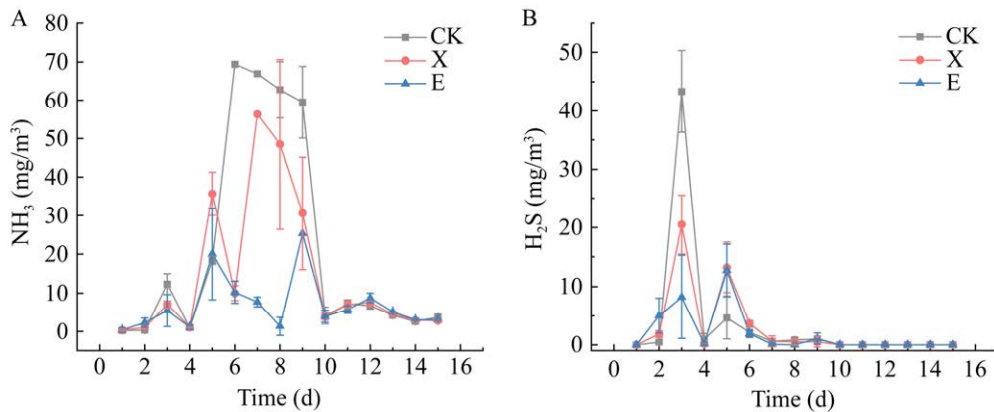


图 4 堆肥过程  $\text{NH}_3$  (A)和  $\text{H}_2\text{S}$  (B)的释放 X: 商用菌剂; E: 构建的除臭菌株组合。

Figure 4 Release of  $\text{NH}_3$  (A) and  $\text{H}_2\text{S}$  (B) during composting. X: Commercial bactericide; E: Deodorizing strain combinations constructed in this experiment.

后保持稳定；由于添加菌剂的作用，菌剂组 X 和除臭菌株组合 E 的  $\text{NH}_3$  释放量第 5 天就开始下降，不同的是菌剂组 X 第 6 天再次出现快速回升趋势，第 7 天释放量达到最高值  $56.34 \text{ mg/m}^3$ ，之后开始下降，第 10 天开始基本稳定，而除臭菌株组合 E 的下降趋势一直持续到第 8 天，之后出现小幅度的上升，第 9 天  $\text{NH}_3$  释放量达到整个发酵过程的最高值  $25.33 \text{ mg/m}^3$ ，之后开始下降且一直趋于稳定。在整个模拟堆肥过程中， $\text{NH}_3$  的释放量在整体上呈现先上升后下降，再上升然后下降至稳定阶段的趋势，中间过程出现小幅度的波动。综上所述，整个堆肥过程中，CK 组、商用菌剂 X 组、微生物除臭菌株组合 E 的  $\text{NH}_3$  释放量的最大值分别为 69.39、56.34、 $25.33 \text{ mg/m}^3$ ，组合 E 的  $\text{NH}_3$  释放量远低于商用菌剂 X 组和 CK 组，而且整个发酵过程中上升幅度不明显，波动较小，说明添加微生物除臭菌株组合能够极大程度地抑制堆肥中  $\text{NH}_3$  的释放，并且添加微生物除臭菌株组合 E 比商用菌剂 X 对  $\text{NH}_3$  的抑制效果更显著。

### 2.3.2 除臭菌株组合对堆肥过程中 $\text{H}_2\text{S}$ 释放的影响

堆肥过程中  $\text{H}_2\text{S}$  的释放量如图 4B 所示，在整个发酵过程中，空白组 CK 和商用菌剂组 X、微生物除臭菌株组合 E 中  $\text{H}_2\text{S}$  的释放趋势大致相同。在前 2 天  $\text{H}_2\text{S}$  的释放量较低，第 2-3 天开始增加，其中 E 组缓慢匀速上升，而 CK 组和商用菌剂 X 组急剧上升，并且第 3 天就达到整个发酵过程中  $\text{H}_2\text{S}$  释放量的最高值，分别为  $43.30 \text{ mg/m}^3$  和  $20.51 \text{ mg/m}^3$ ，此阶段 E 组的  $\text{H}_2\text{S}$  释放量只有  $8.20 \text{ mg/m}^3$ 。第 3-4 天 3 个组的  $\text{H}_2\text{S}$  释放量都迅速下降，可能是翻堆增加了氧气的含量，致使大部分  $\text{H}_2\text{S}$  被氧化；第 4-5 天，由于温度的升高，细菌的活性下降， $\text{H}_2\text{S}$  的抑制作用减弱，3 组的  $\text{H}_2\text{S}$  释放量再次升高，组合 E 和

商用菌剂 X 组的上升速度几乎相同，CK 组相对较缓，推测可能是上一阶段 CK 组中大部分有机物被分解产生  $\text{H}_2\text{S}$  且已经被氧化，而此时堆体中的也没有足够有机物供微生物分解产生新的  $\text{H}_2\text{S}$ ，所以增加较缓慢。在第 5 天之后 3 组中  $\text{H}_2\text{S}$  都开始下降，并且在最低点保持不变，直至发酵过程结束。整个堆肥周期，组合 E 中  $\text{H}_2\text{S}$  的释放量最高值为  $12.76 \text{ mg/m}^3$ ，明显低于 CK 组和商用菌剂 X 组的最高释放量，说明本实验筛选的微生物除臭菌株组合 E 对  $\text{H}_2\text{S}$  的释放有很好的抑制效果。

### 2.4 好氧堆肥过程中细菌群落结构组成分析

细菌群落主成分分析(principal component analysis, PCA)如图 5A 所示，PC1 对总变异的贡献率为 52.5%，PC2 为 14.7%。不同取样时间的细菌群落结构在 PC1 轴上明显分离，表明随着发酵的进行，堆肥中的细菌群落组成发生了改变。

为探究添加微生物除臭菌株组合对堆肥过程中细菌群落结构的影响，选取了相对丰度前 10 的门水平的细菌进行分析，结果如图 5B 所示。3 组不同处理主要的优势菌门包括：放线菌门(*Actinomycetota*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、螺旋体门(*Spirochaetota*)和疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)等，这些优势菌门的整体相对丰度在全部菌门中占 90%以上，说明这些微生物在堆肥过程中发挥了重要作用。厚壁菌门能够产生耐高温的芽孢并有效降解大分子有机物<sup>[24]</sup>，Cao 等<sup>[25]</sup>利用宏基因组分析了厨余垃圾堆肥过程中的微生物群落变化，结果表明放线菌门的耐热性更强，能在高温期存活下来，因此表现出最高的相对丰度，成为堆体中的主要细菌类群，这与本文的研究结果一致。Wright 等<sup>[26]</sup>报道了放线

菌门、变形菌门、厚壁菌门、疣微菌门可以利用硝酸盐、亚硝酸盐和氨。Wang 等<sup>[27]</sup>的研究结果也表明了变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门是参与硝化和反硝化作用的常见微生物,在脱氮过程中发挥了至关重要的作用,并且具有很强的降解有机物和维持微生物群落稳定的能力。

在上述主要门类中,升温阶段结束后,添加除臭微生物的 E 组中放线菌门的相对丰度高于商用菌剂 X 组,拟杆菌门、变形菌门的相对丰度同时高于 CK 组和商用菌剂 X 组。经过降温阶段后, E 组中放线菌门和拟杆菌门的相对丰度仍高于 CK 组和商用菌剂 X 组,分别为 29.96%和 7.19%。整体变化趋势表明,厚壁菌门和放线菌门的相对丰度随着时间的变化出现先降低后增加的趋势,在堆肥的初始阶段和腐熟阶段的硝化过程中具有重要作用。螺旋体门、变形菌门、拟杆菌门的相对丰度出现先升高后降低的趋势,其中,螺旋体门能够降解堆肥中的难降解有机物<sup>[28]</sup>;变形菌门主要参与堆肥过程中的碳氮代谢,可以加速有机物的降解<sup>[29]</sup>;拟杆菌门主要参与堆肥过程中的反硝化作用,其相对丰度与温度呈负相关,可能是温度的变化和堆肥中有机物的降解导致了其相对丰度的变化。微生物除臭菌株组合 E 中含有的 S-10 和 N-48 则分别是放线菌门和变形菌门的细菌,推测菌株 S-10 和 N-48 通过调节体系中放线菌门及变形菌门实现堆肥的氮素转化和有机物降解。

图 5C 反映了堆肥过程中细菌菌群在属水平的变化。在这个过程中优势菌属包括短杆菌属(*Brevibacterium*)、小短杆菌属(*Brachybacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、假纤细芽孢杆菌属(*Pseudogracilibacillus*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)等,与 Chen 等<sup>[30]</sup>对猪粪

好氧堆肥中细菌群落变化的研究结果基本相似。小短杆菌属的细菌具有硝化作用,能促进  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  转化,使秸秆中的 N 主要以  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的形式保留在堆体中,减少氮素损失,降低  $\text{NH}_3$  的产生<sup>[31]</sup>。假单胞菌属能够参与纤维的降解,具有固氮能力,为堆肥增加氮源,减少了氮素损失<sup>[32]</sup>。尹思倩等<sup>[33]</sup>的研究表明假单胞菌属、棒杆菌属与氮损失呈显著负相关,说明增加这些菌属的丰度能够降低氮损失。

在堆肥升温阶段的第 1-4 天, X 组、E 组及 CK 组的优势菌属均为棒杆菌属,其中 E 组中棒杆菌属的细菌的相对丰度最高(12.2%)。第 6-8 天处于高温阶段,细菌的群落结构随之发生变化,假单胞菌属的细菌的相对丰度逐渐下降,在这一阶段 3 组不同处理的优势菌属仍是棒杆菌属。第 12 天处于控温的冷却阶段,堆体逐渐向腐熟化进行,在这一阶段,CK 组和 E 组的优势菌属为棒杆菌属,棒杆菌属能够将  $\text{NO}_2^-$  氧化为  $\text{NO}_3^-$ ,防止  $\text{NO}_2^-$  还原为  $\text{N}_2\text{O}$  或  $\text{NO}_x$ ,E 组样本中棒杆菌属的相对丰度(12.86%)>CK 组(10.51%),表明添加除臭组合 E 可以减少含氮气体的产生<sup>[34]</sup>。而 X 组的优势菌属则是假纤细芽孢杆菌属(12.04%)。微生物除臭菌株组合 E 中的有效微生物菌株 S-10 属于棒杆菌属,菌剂 X 中的有效微生物多为芽孢杆菌,本研究的结果表明添加的微生物菌剂有助于堆肥过程中棒杆菌属和假纤细芽孢杆菌属的繁殖。棒杆菌属于放线菌门,放线菌门是堆肥过程中参与 N 转化的主要门,研究表明放线菌门能够参与氮代谢并将堆肥中难降解有机物分解为小分子有机酸,降低堆体的 pH,减少  $\text{NH}_3$  的挥发<sup>[35]</sup>。王瑞飞等<sup>[36]</sup>的研究表明,添加菌剂提高了具有有机物降解和同化作用的假纤细芽孢杆菌的相对丰度,使堆体中的有机质含量降低,全氮含量增加。

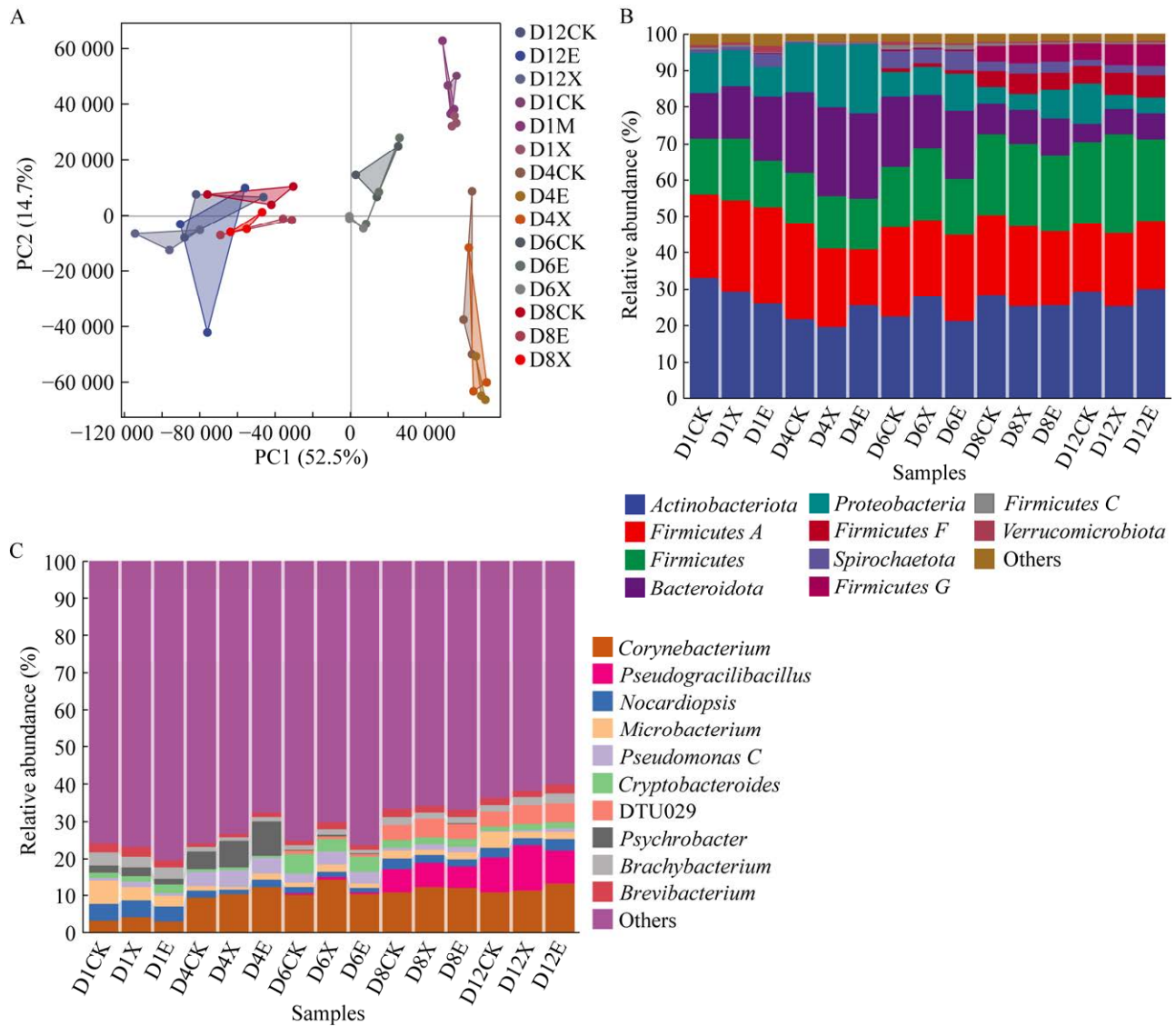


图5 猪粪秸秆堆肥中细菌群落的组成 A: 细菌群落 PCA 分析; B: 细菌群落门水平相对丰度; C: 细菌群落属水平相对丰度。

Figure 5 Composition of bacterial community in pig manure straw compost. A: PCA analysis of bacterial community; B: Relative abundance of bacterial community at the phylum level; C: Relative abundance of bacterial community at the genus level.

## 2.5 细菌群落功能注释

将非冗余基因集序列与 KEGG 数据库中收录的数据进行比对, 并根据比对结果进行基因功能注释。如图 6A 所示, 在 Level 1 水平上主要参与或涉及的六大途径包括: 新陈代谢(metabolism)、遗传信息处理(genetic information processing)、

细胞进程(cellular processes)、人类疾病(human diseases)、环境信息处理(environmental information processing)和生物体系统(organismal systems)。如图 6B 所示, 在 KEGG level 2 水平上, 猪粪秸秆堆沤体系的微生物主要含有丰富的碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、氨基酸代

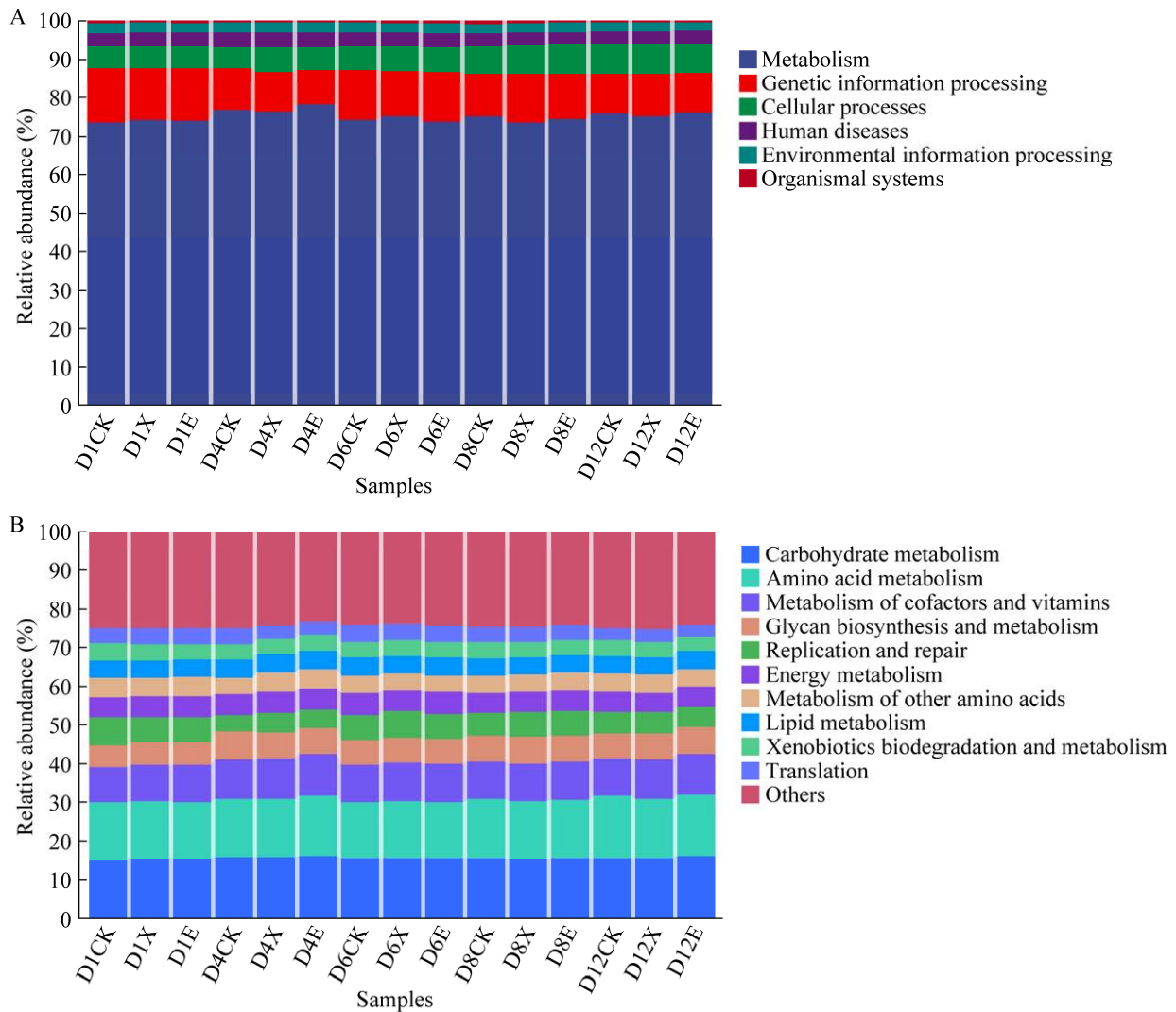


图 6 KEGG 代谢通路相关功能基因统计图

Figure 6 KEGG metabolic pathway related functional gene statistics. A: Level 1; B: Level 2.

谢(amino acid metabolism)、辅因子和维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins)、多糖的生物合成和代谢(glycan biosynthesis and metabolism)、复制损伤修复(replication and repair)、能量代谢(energy metabolism)、其他氨基酸代谢(metabolism of other amino acids)、脂质代谢(lipid metabolism)、异种生物降解和代谢(xenobiotics biodegradation and metabolism)及翻译(translation)等功能基因占比较高。

微生物除臭菌株组合 E 的样本中氨基酸代谢和碳水化合物代谢的基因是数量最多的功能基因，其中氨基酸代谢功能基因在整个堆肥过程中占到 13.98%–15.41%。在生物体中，氮和硫的代谢都与氨基酸代谢密切相关，氨基酸通常是氮代谢和硫代谢的主要源头。微生物可以将氨基酸转化为酰胺、游离氨基和蛋白质等其他有机氮化合物；此外，氨基酸还可以参与到硫循环过程中，提供硫原子，从而促进硫元素的

利用。在第 4 天的样本中,相较于对照组(CK 组)和菌剂 X 组,添加微生物除臭菌株组合 E 显著提高了氨基酸代谢相关功能基因的丰度。这可以归因于组合 E 的添加导致了棒杆菌属相对丰度的增加(图 5C)。氨基酸代谢是谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)重要的代谢途径,它能够参与 L-谷氨酸和 L-赖氨酸等氨基酸的合成<sup>[37]</sup>,通过这一代谢途径,堆肥中的氮素被转化为氨基酸,并固定在微生物体内,而不是转化为游离氨被释放,这与第 4 天 NH<sub>3</sub> 的释放降低的结果一致(图 4A)。碳水化合物代谢相关基因的相对丰度在整个堆肥过程中占 14.52%–15.67%,碳水化合物的代谢能够为氮和硫的循环提供 ATP 等能量物质,同时代谢产物也可以作为氨基酸合成中间体。因此,碳水化合物代谢、氨基酸代谢与氮和硫元素的循环之间是相互协调、相互影响的,这一发现进一步解释了添加微生物除臭菌株组合 E 通过提高氨基酸代谢,减少了 NH<sub>3</sub> 释放的结果。

### 2.5.1 氮代谢

将 KEGG 氮代谢通路与功能基因信息库进行比对,结果如图 7 所示。猪粪秸秆堆肥样本中检测到的氮循环功能基因包括亚硝酸盐还原酶基因 *nirB*、硝酸盐还原酶基因 *NR*、氨同化过程相关的基因(*gs*, *gdh*, *asn*, *gln*)、谷氨酰胺酶基因 *glsA* 以及 2-萘酸单加氧酶基因 *nmo* 等。*nirB* 和 *NR* 是氮循环过程中的重要基因,也是研究堆肥过程中硝化和反硝化微生物的标记基因之一,在氮循环过程中分别参与了将硝酸还原成亚硝酸和亚硝酸还原成氮气的过程。微生物除臭菌株组合 E 的样本中预测到的 *nirB* 和 *NR* 的丰度分别在 2.13%–2.34%和 1.91%–2.96%之间,其中,第 4 天组合 E 的样本中 *nirB* 和 *NR* 的相对丰度都高于 CK 组和菌剂 X 组,并且 *NR* 相对丰

度之间的差异更显著。这一结果表明,添加微生物除臭菌株组合 E 能够促进硝酸盐和亚硝酸盐的还原,产生 N<sub>2</sub> 或 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,减少了亚硝酸盐的积累。而氨同化相关基因可以利用上述过程中产生的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>合成氨基酸,从而减少 NH<sub>3</sub> 的产生。谷氨酰胺合成途径在氨同化中起着至关重要的作用,第 4 天时组合 E 样本中编码谷氨酰胺合成酶相关基因的丰度较高也证实了这一结论。这与 Xiao 等<sup>[38]</sup>的研究结果一致,NH<sub>3</sub> 排放的减少可能与氨同化基因的丰度增加有关,该基因可能是参与氨排放调节的关键基因。

### 2.5.2 硫代谢

硫循环相关功能基因如图 8 所示,包括胱硫醚 β-裂解酶基因 *metC*、硫酸盐通道蛋白相关基因 *cysU*、硫代硫酸盐转移酶基因 *glpE*、磷酸乙酰转移酶 *pta*、苹果酸脱氢酶基因 *mdh*、胱硫醚 β-合成酶基因 *cysK*、半胱氨酸合成酶基因 *cysC*,以及与磺酸盐利用相关的 *ssuB* 和 *ssuC* 等。*mdh* 与微生物中的硫代谢处于同一个调控网络中,*mdh* 可以通过将 NADH 的还原能转移给硫代谢产物,从而维持硫代谢通路的活性;*cysC* 能够催化半胱氨酸的形成,促进细菌对环境中的硫元素的利用,由图 8 可知,第 4 天、第 8 天、第 12 天时组合 E 样本中的 *cysC* 相对丰度高于空白对照 CK 组和菌剂 X 组,尤其高于菌剂 X 组,这可能是导致在这三个阶段 H<sub>2</sub>S 的释放量极少的原因(图 4B)。由于其高反应活性,半胱氨酸硫醇可以与活性氧反应生成磺酸和亚磺酸<sup>[39]</sup>,而 *ssuB* 和 *ssuC* 编码的蛋白能够参与脂肪族和/或芳香族磺酸盐的利用<sup>[40]</sup>。因此,堆肥中的硫可能在添加的微生物除臭菌株组合 E 的影响下更多地参与到含硫氨基酸和其他含硫有机物的合成中,从而使得 H<sub>2</sub>S 的释放量降低。



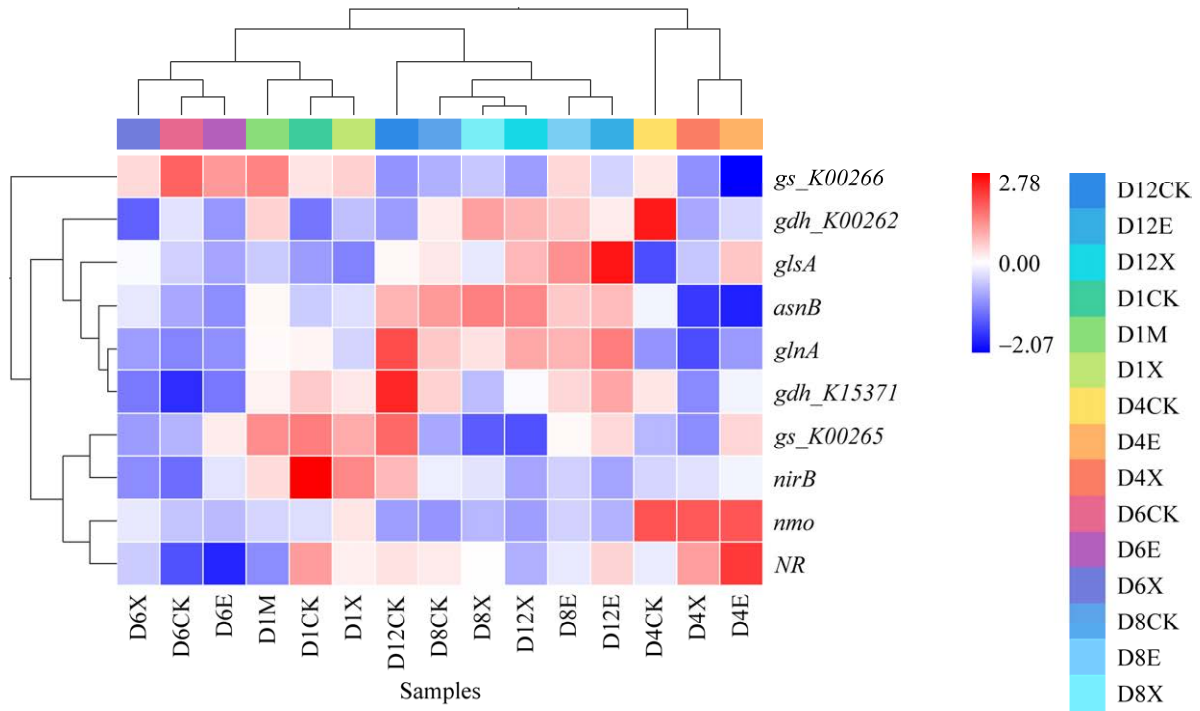


图 7 氮循环功能基因热图

Figure 7 Heat map of nitrogen cycle function genes.

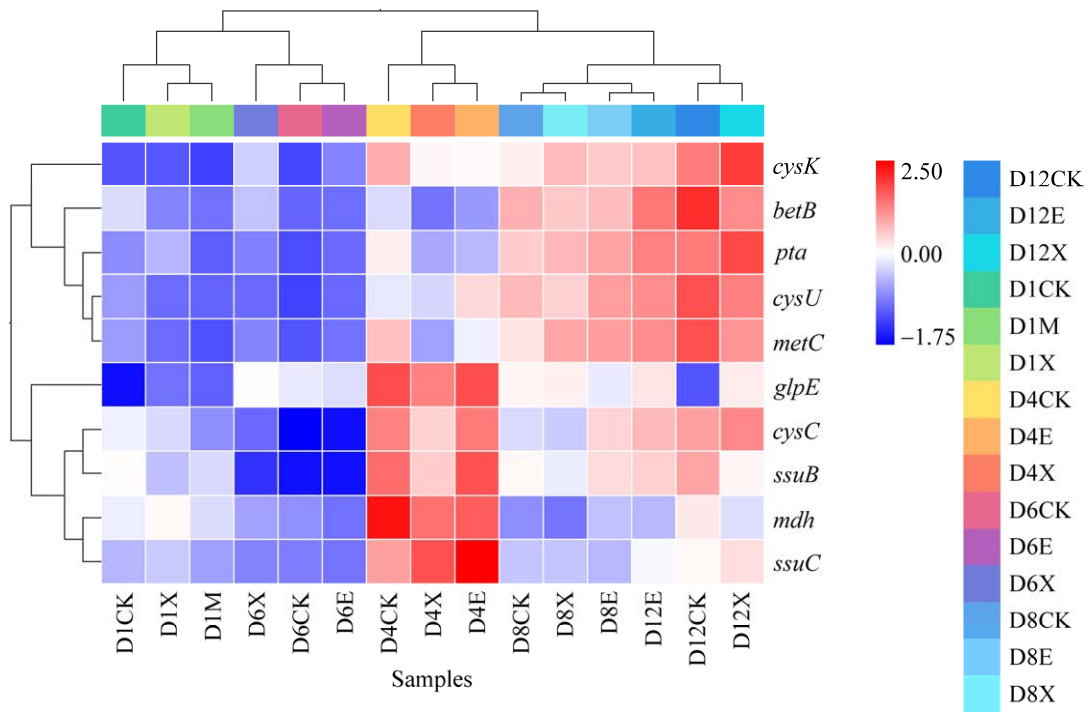


图 8 硫循环功能基因热图

Figure 8 Heat map of sulfur cycling functional genes.

### 3 讨论

本研究筛选到的除臭菌株 N-48 和 S-10 分别属于假单胞菌属和棒杆菌属。现有的研究证明假单胞菌可以通过异养硝化和好氧反硝化途径直接实现脱氮,具有去除氨氮的潜力<sup>[41]</sup>。Qing 等<sup>[42]</sup>从活性污泥中分离出一株假单胞菌,鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) AD-1,该菌株能够同时高效利用不同形式的氮源,通过同化作用去除大量的氮,对高氨氮环境中的生物修复具有突出潜力。Chen 等<sup>[43]</sup>在猪粪堆肥中同样分离到 1 株施氏假单胞菌(*P. stutzeri*) SDU10,对猪舍废水中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除率最高达到 97.6%。此外,假单胞菌还可将堆肥中的含硫物质和  $\text{H}_2\text{S}$  转化为硫酸盐,减少堆肥中  $\text{H}_2\text{S}$  的排放<sup>[44]</sup>。恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)常被接种于生物过滤器中,去除  $\text{H}_2\text{S}$ <sup>[45-46]</sup>。Geng 等<sup>[47]</sup>从污泥中分离到 1 株能够代谢  $\text{H}_2\text{S}$  的假单胞菌,对于生物除臭过程具有潜在的促进作用。谷氨酸棒杆菌中存在与氨同化作用相关的 3 种酶:谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)、谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT)和谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)<sup>[48]</sup>,被广泛用于氨基酸的商业生产,而氨基酸的生产与氮代谢存在直接联系。堆肥体系中氨氮的含量对于  $\text{NH}_3$  的挥发具有决定性作用,微生物的氨同化作用可以将氨氮转化为有机氮,直接用于其自身的细胞合成,通过强化氨同化作用,减少或缓解氨氮的积累,对控制  $\text{NH}_3$  的挥发具有一定的可行性<sup>[49]</sup>。本研究分离到的 2 株菌对于减少堆肥中  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  的排放具有较大潜力。

各种微生物的功能不同,单一菌株难以达到理想的除臭效果。赵晓锋等<sup>[50]</sup>分离到一株假单胞菌能够使鸡粪堆肥的  $\text{H}_2\text{S}$  减少 76.28%,将该菌与小单胞菌属(*Micromonospora*)复配成后

使用,  $\text{H}_2\text{S}$  去除率提高到了 78.69%。刘艳薇等<sup>[51]</sup>利用假单胞菌(*Pseudomonas sp.*) A21、芽孢杆菌(*Bacillus sp.*) A38、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) S33、解糖假苍白杆菌(*Pseudochrobactrum saccharolyticum*) S61 复配除臭菌株组合,以解决单一菌株对堆肥除氨效果不佳的问题,结果表明,假单胞菌和施氏假单胞菌能够加快物料腐熟,减少碳氮损失。本研究利用分离到的除臭菌株 N-48 和 S-10 构建了一组微生物除臭菌株组合 E,接种于模拟堆肥体系中评估了微生物除臭菌株组合 E 和商用除臭菌剂 X 的除臭效果。结果显示,CK 组及商用菌剂 X、微生物除臭菌株组合 E 的  $\text{NH}_3$  释放量都在高温阶段达到最高值,分别为 69.34、56.34、25.33  $\text{mg/m}^3$ ;  $\text{H}_2\text{S}$  释放量在升温阶段达到峰值,CK 组 43.30  $\text{mg/m}^3$ 、X 组 20.51  $\text{mg/m}^3$ 、E 组 12.76  $\text{mg/m}^3$ ,说明添加的微生物除臭菌株组合能够有效抑制  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  的释放。相较于商用菌剂 X,微生物除臭菌株组合 E 能够更好地抑制  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  的释放,该组  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  的最高释放量仅有商用菌剂 X 组的 40%左右。唐建等<sup>[52]</sup>利用假单胞菌、毕氏酵母(*Pichia pastoris*)、根霉菌(*Rhizopus sp.*)组成了微生物复合菌剂喷洒于垃圾好氧反应器表面,对硫化氢总去除率为 35.50%,氨气总去除率为 31.30%,抑制了填埋场的臭气产生。张国言等<sup>[53]</sup>利用谷氨酸棒杆菌、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)等制备了复合菌剂 CR,接种于兔粪和香油渣堆肥中,结果表明,菌剂 CR 降低了  $\text{NH}_3$  的挥发,增加了堆肥中的有机氮含量。

Ding 等<sup>[54]</sup>建立了一种机器学习模型对堆肥系统中的关键微生物进行探索,结果显示芽孢杆菌属、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、热杆菌属(*Rhabdotherrmus*)、假单胞菌属、冷杆菌属(*Cryobacterium*)和嗜热菌属(*Thermophagus*)是

主要的菌属,在堆肥中起关键作用。本研究采用组学技术检测堆肥过程中细菌菌群的组成和物种的多样性,同一堆肥时期,添加不同的菌剂物种多样性和丰富度也不相同,微生物除臭菌株组合 E 的添加在一定程度上提高了物种的多样性和群落的丰富度。整个堆肥过程中的优势菌门包括疣微菌门、厚壁菌门、螺旋体门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门等,优势菌属包括短杆菌属、小短杆菌属、假单胞菌属、微杆菌属、拟诺卡氏菌属、假纤细芽孢杆菌属、棒杆菌属等。微生物除臭菌株组合 E 中的菌株 N-48 和菌株 S-10 分别属于变形菌门假单胞菌属和放线菌门棒杆菌属,说明微生物除臭菌株组合 E 在门水平和属水平都占据了优势地位,促进了堆肥过程中有机物的降解,有效抑制了  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  的释放。

## 4 结论

菌株 N-48 和 S-10 经过初步鉴定属于假单胞菌属和棒杆菌属,菌株组合添加到猪粪堆沤的过程中可以有效地抑制  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  的释放, $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  的最高释放量仅有添加商用菌剂组的 40%左右。通过改变猪粪堆沤过程中的微生物群落结构,提高了变形菌门、放线菌门的相对丰度且促进了氮和硫元素转化为氨基酸过程,抑制了堆肥过程中氨和硫化氢的释放。菌株组合可以为农业废弃物处理提供菌种资源与技术支撑。

## REFERENCES

- [1] 付嘉琦,王函韵,王涛,桂双林. 猪粪厌氧发酵中的氨抑制及缓解对策[J]. 能源研究与管理, 2022(4): 85-90, 145.  
FU JQ, WANG HY, WANG T, GUI SL. Ammonia inhibition and mitigation strategies in anaerobic digestion of pig manure[J]. Energy Research and Management, 2022(4): 85-90, 145 (in Chinese).
- [2] MARDOYAN A, BRAUN P. Analysis of Czech subsidies for solid biofuels[J]. International Journal of Green Energy, 2015, 12(4): 405-408.
- [3] OUYANG JX, SHI Z, ZHONG H, LIU W, CHAI Q, YUAN XZ. Static aerobic composting of municipal sewage sludge with forced ventilation: Using matured compost as bulking conditioner[J]. Journal of Central South University, 2014, 21(1): 303-309.
- [4] CHI CP, CHU SH, WANG B, ZHANG D, ZHI YE, YANG XJ, ZHOU P. Dynamic bacterial assembly driven by *Streptomyces griseorubens* JSD-1 inoculants correspond to composting performance in swine manure and rice straw co-composting[J]. Bioresource Technology, 2020, 313: 123692.
- [5] 宋修超,郭德杰,成卫民,罗佳,徐焯红,王光飞,刘新红,马艳. 工厂化条件下外源添加剂对猪粪堆肥过程中  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}_2\text{S}$  的减排效果[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(9): 2014-2020.  
SONG XC, GUO DJ, CHENG WM, LUO J, XU YH, WANG GF, LIU XH, MA Y. Pilot-scale study on effects of exogenous additives on reducing  $\text{NH}_3$  and  $\text{H}_2\text{S}$  emissions from pig manure compost[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2021, 40(9): 2014-2020 (in Chinese).
- [6] 李永双,孙波,陈菊红,彭霞薇,白志辉,庄绪亮. 纳米膜覆盖对畜禽粪便好氧堆肥进程及恶臭气体排放的影响[J]. 环境科学, 2021, 42(11): 5554-5562.  
LI YS, SUN B, CHEN JH, PENG XW, BAI ZH, ZHUANG XL. Effects of nano-membrane on aerobic composting process and odor emission of livestock manure[J]. Environmental Science, 2021, 42(11): 5554-5562 (in Chinese).
- [7] KACPRZAK M, MALIŃSKA K, GROSSER A, SOBIK-SZOŁTYSEK J, WYSTALSKA K, DRÓŹDŹ D, JASIŃSKA A, MEERS E. Cycles of carbon, nitrogen and phosphorus in poultry manure management technologies—environmental aspects[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2023, 53(8): 914-938.
- [8] HOU TT, ZHOU YJ, CAO X, LI WG, ZHANG SM, ZHAO Y, CHEN L, AN Q, MENG LQ. Effects of microbial inoculum on microbial community and enzyme activity involved in nitrogen-sulfur metabolism during sewage sludge composting[J]. Science of the Total Environment, 2023, 858: 159954.
- [9] XUE JL, YAO YH, LI WS, SHI K, MA GB, QIAO YL, CHENG DL, JIANG Q. Insights into the effects of operating parameters on sulfate reduction performance and microbial pathways in the anaerobic sequencing batch reactor[J]. Chemosphere, 2023, 311: 137134.
- [10] 刘歆,陈群,邱玉朗,李林,侯国喜,闫晓刚,李忠和,陈龙,高星爱,柳冬梅,翟迪,闫秋良. 鸡粪堆肥含氮和含硫废气产生机制及控制技术进展[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(5): 2166-2174.  
LIU X, CHEN Q, QIU YL, LI L, HOU GX, YAN XG, LI ZH, CHEN L, GAO XA, LIU DM, ZHAI D, YAN QL. Research progress on the production mechanism and control technology of chicken manure composting nitrogen-containing and sulfur-containing waste gases[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(5): 2166-2174 (in Chinese).
- [11] DENG Z, GENG XY, SHI MZ, CHEN XM, WEI ZM. Effect of different moisture contents on hydrogen sulfide malodorous gas emission during composting[J]. Bioresource Technology, 2023, 380: 129093.
- [12] CHEN L, LI WG, ZHAO Y, ZHANG SM, MENG LQ. Evaluation of bacterial agent/nitrate coupling on enhancing sulfur conversion and bacterial community succession during aerobic composting[J]. Bioresource

- Technology, 2022, 362: 127848.
- [13] 吴伟霞, 席北斗, 黄彩红, 李艳红, 李伟, 马彩云, 郭威, 唐朱睿. 有机固废堆肥中产臭及除臭技术的微生物作用机制研究进展[J]. 环境科学研究, 2021, 34(10): 2486-2496.  
WU WX, XI BD, HUANG CH, LI YH, LI W, MA CY, GUO W, TANG ZR. Review on microbial mechanism of odor generation and deodorization technology during organic solid waste composting[J]. Research of Environmental Sciences, 2021, 34(10): 2486-2496 (in Chinese).
- [14] BARBUSINSKI K, KALEMBA K, KASPERCZYK D, URBANIEC K, KOZIK V. Biological methods for odor treatment: a review[J]. Journal of Cleaner Production, 2017, 152: 223-241.
- [15] SHAN GC, LI WG, GAO YJ, TAN WB, XI BD. Additives for reducing nitrogen loss during composting: a review[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 307: 127308.
- [16] 王茄灵, 吕青阳, 刘杨, 许力山, 秦维, 闫志英. 基于原位控制技术的粪污除臭菌剂研发现状[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28(5): 1357-1366.  
WANG JL, LYU QY, LIU Y, XU LS, QIN W, YAN ZY. Research and development status of fecal microbial deodorant based on *in-situ* control technology[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental, 2022, 28(5): 1357-1366 (in Chinese).
- [17] MATUSIAK K, OLEKSY M, BOROWSKI S, NOWAK A, KORCZYŃSKI M, DOBRZAŃSKI Z, GUTAROWSKA B. The use of *Yucca schidigera* and microbial preparation for poultry manure deodorization and hygienization[J]. Journal of Environmental Management, 2016, 170: 50-59.
- [18] GAO XZ, XU ZC, LI Y, ZHANG LX, LI GX, NGHIEM LD, LUO WH. Bacterial dynamics for gaseous emission and humification in bio-augmented composting of kitchen waste[J]. Science of the Total Environment, 2021, 801: 149640.
- [19] ZHAO Y, LI WG, CHEN L, MENG LQ, ZHENG ZJ. Effect of enriched thermotolerant nitrifying bacteria inoculation on reducing nitrogen loss during sewage sludge composting[J]. Bioresource Technology, 2020, 311: 123461.
- [20] 牛永艳, 穆永松, 毛婷, 郑群, 叶泽, 季彬, 王治业. 除臭微生物的筛选复配及其在堆肥中的应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1531-1540.  
NIU YY, MU YS, MAO T, ZHENG Q, YE Z, JI B, WANG ZY. Deodorizing microorganisms: screening and application in composting[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1531-1540 (in Chinese).
- [21] ZHU FX, HONG CL, WANG WP, LYU HH, ZHU WJ, XV H, YAO YL. A microbial agent effectively reduces ammonia volatilization and ensures good maggot yield from pig manure composted *via* housefly larvae cultivation[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 270: 122373.
- [22] 王慧丽, 江娟. 锯末牛粪堆肥微生物多样性的宏基因组学分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(7): 28-32.
- [23] CHUN J, OREN A, VENTOSA A, CHRISTENSEN H, ARAHAL DR, Da COSTA MS, ROONEY AP, YI HN, XU XW, de MEYER S, TRUJILLO ME. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(1): 461-466.
- [24] 陈倩倩, 车建美, 刘国红, 刘波, 王阶平, 阮传清, 连亨平. 嗜热复合菌对堆肥品质及微生物群落演替的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2023, 29(4): 745-755.  
CHEN QQ, CHE JM, LIU GH, LIU B, WANG JP, RUAN CQ, LIAN HP. Effects of thermophilic compound bacteria on composting and microbial community succession[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2023, 29(4): 745-755 (in Chinese).
- [25] CAO LL, LIAO LM, SU CY, MO TH, ZHU FH, QIN RH, LI RT. Metagenomic analysis revealed the microbiota and metabolic function during co-composting of food waste and residual sludge for nitrogen and phosphorus transformation[J]. Science of the Total Environment, 2021, 773: 145561.
- [26] WRIGHT CL, SCHATTEMAN A, CROMBIE AT, COLIN MURRELL J, LEHTOVIRTA-MORLEY LE. Inhibition of ammonia monooxygenase from ammonia-oxidizing Archaea by linear and aromatic alkynes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(9): e02388-19.
- [27] WANG SS, NIU QQ, ZHU PF, HUANG YT, LI KC, LI QL. Metagenomics analysis unraveled the influence of sulfate radical-mediated compost nitrogen transformation process[J]. Journal of Environmental Management, 2022, 317: 115436.
- [28] HAN B, ADDO FG, MU XY, ZHANG LS, ZHANG SH, LV XY, LI X, WANG PF, WANG C. Epiphytic bacterial community shift drives the nutrient cycle during *Potamogeton malaianus* decomposition[J]. Chemosphere, 2019, 236: 124253.
- [29] ZHONG XZ, MA SC, WANG SP, WANG TT, SUN ZY, TANG YQ, DENG Y, KIDA K. A comparative study of composting the solid fraction of dairy manure with or without bulking material: performance and microbial community dynamics[J]. Bioresource Technology, 2018, 247: 443-452.
- [30] CHEN PZ, CHENG WM, LI SP. Optimization strategies for mitigating nitrogen loss in the aerobic composting of pig manure and microbial changes revealed by metagenomic analysis[J]. Process Safety and Environmental Protection, 2023, 169: 270-284.
- [31] 曹丽娜, 王岩, 王跃, 李沛, 郑珂, 刘佳琪, 李红丽. 添加麦秸对鸡粪堆肥过程中氮素减排及细菌群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(11): 2560-2569.  
CAO LN, WANG Y, WANG Y, LI P, ZHENG K, LIU JQ, LI HL. Effects of wheat straw addition on nitrogen emission reduction and bacterial community during chicken manure composting[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2023, 42(11): 2560-2569 (in Chinese).
- [32] ZHANG WM, YU CX, WANG XJ, HAI L. Increased abundance of nitrogen transforming bacteria by higher C/N ratio reduces the total losses of N and C in chicken manure and corn stover mix composting[J]. Bioresource Technology, 2020, 297: 122410.
- [33] 尹思倩, 张文明, 常馨怡, 陈开山, 邢彦宏, 杨迎香. 鸡粪和羊粪混合发酵对堆肥优势细菌演替和碳氮损失的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2023, 58(1): 193-201, 213.  
YIN SQ, ZHANG WM, CHANG XY, CHEN KS, XING YH, YANG YX. Effects of mixed fermentation of chicken manure and sheep manure on the dominant

- bacteria succession and loss of carbon and nitrogen in compost[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2023, 58(1): 193-201, 213 (in Chinese).
- [34] TANG JH, LI X, CUI P, LIN JY, ZENG RJ, LIN H, ZHOU SG. Nitrification plays a key role in N<sub>2</sub>O emission in electric-field assisted aerobic composting[J]. Bioresource Technology, 2020, 297: 122470.
- [35] ALI N, KHAN S, LI YY, ZHENG NG, YAO HY. Influence of biochars on the accessibility of organochlorine pesticides and microbial community in contaminated soils[J]. Science of the Total Environment, 2019, 647: 551-560.
- [36] 王瑞飞, 孔盈利, 魏艺璇, 白双, 展莉平, 张昊, 李明军, 杨清香. 菌剂对鸡粪-生物炭堆肥理化性质和微生物群落结构的影响[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(4): 966-977. WANG RF, KONG YL, WEI YX, BAI S, ZHAN LP, ZHANG H, LI MJ, YANG QX. Effects of microbial agents on physicochemical properties and microbial community structure of chicken manure-biochar compost[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2023, 39(4): 966-977 (in Chinese).
- [37] 王钰, 郑平, 孙际宾. 谷氨酸棒杆菌的代谢工程使能技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1603-1618. WANG Y, ZHENG P, SUN JB. Recent advances in developing enabling technologies for *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(5): 1603-1618 (in Chinese).
- [38] XIAO SS, ZHANG HD, ZHU RK, LIAO XD, WU YB, MI JD, WANG Y. Ammonia reduction by the *gdhA* and *glnA* genes from bacteria in laying hens[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 222: 112486.
- [39] KOHL JB, MELLIS AT, SCHWARZ G. Homeostatic impact of sulfite and hydrogen sulfide on cysteine catabolism[J]. British Journal of Pharmacology, 2019, 176(4): 554-570.
- [40] van der PLOEG JR, IWANICKA-NOWICKA R, BYKOWSKI T, HRYNIEWICZ MM, LEISINGER T. The *Escherichia coli* *ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator *cbl*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(41): 29358-29365.
- [41] LI CE, YANG JS, WANG X, WANG ET, LI BZ, HE RX, YUAN HL. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24[J]. Bioresource Technology, 2015, 182: 18-25.
- [42] QING H, DONDE OO, TIAN CC, WANG CB, WU XQ, FENG SS, LIU Y, XIAO BD. Novel heterotrophic nitrogen removal and assimilation characteristic of the newly isolated bacterium *Pseudomonas stutzeri* AD-1[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 126(3): 339-345.
- [43] CHEN LF, LIN JQ, PAN D, REN YL, ZHANG J, ZHOU B, CHEN LX, LIN JQ. Ammonium removal by a newly isolated heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria *Pseudomonas stutzeri* SDU10 and its potential in treatment of piggery wastewater[J]. Current Microbiology, 2020, 77(10): 2792-2801.
- [44] LIU YD, WANG HH, ZHANG H, TAO YY, CHEN R, HANG S, DING XY, CHENG MD, DING GC, WEI YQ, XU T, LI J. Synergistic effects of chemical additives and mature compost on reducing H<sub>2</sub>S emission during kitchen waste composting[J]. Journal of Environmental Sciences, 2024, 139: 84-92.
- [45] SHU CH, CHEN CK. Enhanced removal of dimethyl sulfide from a synthetic waste gas stream using a bioreactor inoculated with *Microbacterium* sp. NTUT26 and *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(1): 95.
- [46] CHUNG YC, LIN YY, TSENG CP. Removal of high concentration of NH<sub>3</sub> and coexistent H<sub>2</sub>S by biological activated carbon (BAC) biotrickling filter[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(16): 1812-1820.
- [47] GENG AL, CHEN XG, GOULD WD, NG YL, YAN R, LEE CC, LIANG DT. Removal of odorous sulphur-containing gases by a new isolate from activated sludge[J]. Water Science and Technology, 2004, 50(4): 291-297.
- [48] SCHULZ AA, COLLETT HJ, REID SJ. Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 205(2): 361-367.
- [49] 吴传栋. 基于碳源调控的污泥堆肥氮素转化及氨同化作用机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2018. WU CD. Study on nitrogen transformation and ammonia assimilation during sewage sludge composting based on carbon source control[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2018 (in Chinese).
- [50] 赵晓锋, 于文清, 隋文志. 鸡粪异养除硫化氢菌株的分离、筛选与菌剂配制[J]. 现代化农业, 2012(9): 30-32.
- [51] 刘艳薇, 顾欣, 惠悦然, 念文彩, 纪立东, 石伟勇. 除氨菌复配对鸡粪堆肥除臭和腐熟效果的影响[J]. 河南农业科学, 2019, 48(11): 75-83. LIU YW, GU X, HUI YR, NIAN WC, JI LD, SHI WY. Impact of combined ammonia-removal bacteria on chicken manure compost deodorization and decomposing effect[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2019, 48(11): 75-83 (in Chinese).
- [52] 唐建, 唐恒军, 司马卫平, 梁超, 邱忠平. 生物除臭菌剂除臭效能及其对微生物影响研究[J]. 四川理工学院学报(自然科学版), 2021, 34(5): 26-32. TANG J, TANG HJ, SIMA WP, LIANG C, QIU ZP. Study on Deodorization efficiency and influence on microorganism of biological deodorizer[J]. Journal of Sichuan University of Science and Engineering (Natural Science Edition), 2021, 34(5): 26-32 (in Chinese).
- [53] 张国言, 董元杰, 孙桂阳, 于滨, 徐珂. 复合菌剂对兔粪堆肥碳氮转化与损失的影响[J]. 中国农业大学学报, 2022, 27(11): 153-165. ZHANG GY, DONG YJ, SUN GY, YU B, XU K. Effects of compound bacterial inoculant on the conversion and loss of carbon and nitrogen during rabbit manure composting[J]. Journal of China Agricultural University, 2022, 27(11): 153-165 (in Chinese).
- [54] DING S, JIANG LY, HU JY, HUANG WJ, LOU LP. Microbiome data analysis via machine learning models: exploring vital players to optimize kitchen waste composting system[J]. Bioresource Technology, 2023, 388: 129731.