

单亚静, 吴坤坦, 高健玮, 等. 耐高温纤维素降解菌对高温处理的动物尸体堆肥过程中氮素损失的影响[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(4): 36-42. DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.04.005

## 耐高温纤维素降解菌对高温处理的动物尸体堆肥过程中氮素损失的影响

单亚静, 吴坤坦, 高健玮, 杨旭晨, 郑嵘

华中农业大学动物科学技术学院, 武汉 430070

**摘要** 为探究纤维素降解菌在堆肥腐熟中的应用效果, 试验将高温处理后的畜禽尸体与秸秆混匀后, 分为不添加菌剂的对照组和添加1%的耐高温纤维菌(*Parageobacillus thermoglucosidasius*)的菌剂组, 采用好氧静态通风的方式堆肥28 d, 测定堆肥过程中的理化参数(温度、pH、含水率、铵态氮、硝态氮、亚硝态氮、总碳和总氮)和氮素转化功能基因拷贝数的变化等氮素损失相关的指标。结果显示, 菌剂组的铵态氮含量和亚硝态氮含量均显著高于对照组, 但最终总氮含量菌剂组低于对照组。堆肥前期对照组的*nirK*拷贝数显著高于菌剂组, 且与 $\text{NH}_4^+$ 含量显著正相关; 菌剂组的*nirS*拷贝数极显著高于对照组, 且与 $\text{NO}_3^-$ 含量极显著正相关。堆肥中期, 对照组的*narG*拷贝数极显著高于菌剂组, 且与 $\text{NH}_4^+$ 含量相关性接近显著水平( $P=0.064$ ); 堆肥后期, 对照组的*nosZ*拷贝数极显著高于菌剂组。以上结果表明, 耐高温纤维素降解菌主要通过氨氧化作用和反硝化作用在堆肥的前期来改变堆体的氮素循环, 但也会促进反硝化作用导致氮素损失的增加。

**关键词** 畜禽尸体; 高温处理; 堆肥; 氮素损失; 纤维素降解菌

**中图分类号** S141.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)04-0036-07

高温处理可以减少动物尸体中存在的病原菌<sup>[1]</sup>, 但将高温处理后的动物尸体直接施用于农田, 将造成“二次发酵”, 导致烧苗现象<sup>[2]</sup>, 因此需对高温处理后的尸体进行发酵腐熟的堆肥处理。但堆肥过程中的高温、高pH促使 $\text{NH}_3$ 逸出、厌氧条件下反硝化作用引起的 $\text{N}_2\text{O}$ 和 $\text{N}_2$ 弥散以及水溶性含氮成分的渗滤均造成了氮素损失<sup>[3]</sup>。在猪尸体堆肥中加入氨转化细菌、亚硝酸盐转化菌和固氮菌可以加速氮的积累, 减少氮素的损失<sup>[4]</sup>。而具有纤维素降解性和固氮性的菌剂可以促进木质纤维素的降解, 提高堆肥效果<sup>[5]</sup>。如孙元烽等<sup>[6]</sup>筛选到的细菌能有效强化菌剂的纤维素降解能力, 并一定程度上提高堆肥中的总养分; 武肖莎等<sup>[7]</sup>筛选得到枯草芽孢杆菌应用于牛粪-秸秆的堆肥中, 发现菌剂组能有效提高堆肥效率。目前关于纤维素降解菌的研究大多是应用在畜禽粪便、秸秆和生活有机废弃物上, 而用于畜禽尸体的研究相对较少<sup>[8]</sup>。课题组前期从猪尸体和秸秆堆肥样品中筛选到1株能在80℃下生存的纤维素降解

菌株, 鉴定为热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌(*Parageobacillus thermoglucosidasius* BGSC 95A1)<sup>[9]</sup>。该菌降解纤维素的能力很强, 但其应用于堆肥中对堆肥效率的影响尚不清楚。检测堆肥中氮元素相关的物质(铵态氮、硝态氮、亚硝态氮和总氮)和氮素转化功能基因拷贝数<sup>[10-11]</sup>的变化能反映不同堆肥时期氮素转化作用的变化。因此, 本试验将热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌加入到高温处理后的动物尸体中与秸秆混合进行堆肥, 检测氮元素相关物质和氮素转化功能基因拷贝数的变化, 探究菌剂影响动物尸体堆肥氮素损失的途径, 以为未来在堆肥中添加纤维素降解菌等微生物来促进堆肥过程和减少氮素损失提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

1) 菌株的来源。试验菌株为笔者所在实验室前期获得的热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌(*P. thermoglucosi-*

收稿日期: 2022-01-06

基金项目: 湖北省技术创新专项重大项目(2017ABA137); 湖北省重点研发计划项目(2021BBA082)

单亚静, E-mail: 289795749@qq.com

通信作者: 郑嵘, E-mail: zhengrong@mail.hzau.edu.cn

*dasius* BGSC 95A1)<sup>[9]</sup>。该菌株可在 80 °C 下生存且产酶的最适温度为 65 °C, 其纤维素酶活性高达 94.00 U/mL。根据菌株生长的最适条件, 将 *P. thermoglucosidasius* 培养约 1 周, 至分光光度计在 600 nm 波长下测定菌液吸光度值为 1.2 左右时, 作为最终的高温纤维素菌剂备用。

2) 堆肥处理。将鸡和鸭的尸体(华中农业大学鸡场提供)在焚烧炉内进行高温处理后再开展堆肥试验。堆肥在规格为 138 L 的泡沫箱中进行, 堆肥方式为好氧静态通风堆, 均采用 60 L/(m<sup>3</sup>·min) 的通风处理。将高温处理后的动物尸体分为 2 组, 分别是不添加菌剂的对照组和菌剂组(根据每个堆体的总质量添加 1% 高温纤维素菌剂), 每组 3 个重复。动物尸体在高温焚烧炉进行高温处理(160 °C 处理 12 h)后, 将动物尸体与秸秆进行混合, 利用秸秆和竹粉调节碳氮比为 30:1, 初始含水率为 60% 左右, 堆肥时间为 28 d。采用五点采样法采集尸体与秸秆的混合物作为分析样品, 混匀后将样品分为 2 份, 一份保存于 4 °C 冰箱, 用于测定堆肥过程中的理化参数, 包括温度、pH、含水率、铵态氮、硝态氮、亚硝态氮、总碳和总氮。另一份保存于 -80 °C 冰箱, 用于测定样本中氮素转化功能基因的拷贝数。

## 1.2 试验方法

1) 温度、pH 和含水率的测定。记录环境温度并用长柄电子温度计按照时间间隔, 测定堆体中心不同区域的温度, 取其平均值。堆肥样品的 pH 用精密 pH 计(PHS-3C, 上海宇隆仪器有限公司)测定。在烘箱中 105 °C 烘干样品至恒质量, 通过前后质量的变化计算含水率。

2) 铵态氮、硝态氮和亚硝态氮含量的测定。用 2 mol/L 氯化钾对堆肥样品进行前处理, 过滤后用靛酚蓝分光光度法检测铵态氮含量。用标准曲线法和紫外分光光度计(721, 上海第三分析仪器厂)测定吸光度, 计算硝态氮浓度。用盐酸萘乙二胺分光光度法测定亚硝态氮浓度。

3) 总氮和总碳含量的测定。将堆肥样品在烘箱中 80 °C 烘干 24 h 后, 过筛孔径为 0.15 mm 的标准筛, 用分析天平称取约 4.0~4.5 mg 的样品。采用锡盒将样品包裹成圆球状, 然后用同位素质谱分析仪(Isoprime100, 德国元素分析系统公司)进行总碳和总氮含量的测定。

4) DNA 的提取与荧光定量 PCR 检测。为了减少外源 DNA 和酸性物质所造成的污染, 首先对堆肥

样品进行适当的前处理。先加入脱腐缓冲液(100 mmol/L Tris, 100 mmol/L Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 100 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 1.0% PVP, 100 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100, pH=10.0), 涡旋混匀并 12 000 r/min 离心, 后续加入氯化钙溶液(0.5 mol/L)和草酸钠(0.05 mol/L)继续前处理。用改进的蛋白酶 K-CTAB 法粗提取堆肥样品中的总 DNA, 然后检测总 DNA 的浓度和质量。基因的引物设计如表 1 所示, 引物合成在武汉奥科鼎盛生物科技有限公司进行。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 15 s(16S rDNA 为 53 °C 退火 45 s), 72 °C 延伸 20 s(16S rDNA 为 72 °C 退火 90 s), 35 个循环; 再 72 °C 延伸 10 min。纯化回收得到的 PCR 产物按初始浓度的 10<sup>-1</sup> 至 10<sup>-10</sup> 共 11 个浓度并根据不同浓度所对应的 Ct 值绘制标准曲线, 然后计算样品中相应基因的拷贝数。荧光定量 PCR 所需的引物参考文献[12]来设计(表 1), 反应条件同 PCR 条件。最后根据定量数据中标准品的数值绘制标准曲线, 并计算实际样品中的基因拷贝数。每个基因均做 5 个技术重复。将基因的原始拷贝数进行对数转换, 利用 Canoco 4.5 软件和 SPSS 21.0 软件对各个理化参数与氨单加氧酶基因(ammonia monooxygenase, *amoA*)、硝酸盐还原酶基因(nitrate reductase subunit alpha, *narG*)、亚硝酸盐还原酶基因(copper-containing nitrite reductase, *nirS* 和 *nirK*)和氧化亚氮还原酶基因(nitrous oxide reductase, *nosZ*)的拷贝数分别进行相关性分析, 确定理化参数与基因数量之间的线性相关性。

表 1 试验所用引物序列

Table 1 Sequence of different primers used in this experiment

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
<i>amoA</i> -F	GGGGTTTCTACTGGTGGT
<i>amoA</i> -R	CCCCCKGSAAAGCCTTCTTC
<i>narG</i> -F	TAYGTGGCAGGARAACGTG
<i>narG</i> -R	CGTAGAAGAAGCTGGTGCTGTT
<i>nirS</i> -F	G TSAACG TSAAGGARACSGG
<i>nirS</i> -R	GASTTCGGRTGSGTCTTGA
<i>nirK</i> -F	TCATGGTGCTGCCGCGYGANGG
<i>nirK</i> -R	GAACTTGCCGGTKGCCAGAC
<i>nosZ</i> -F	GGGCTBGGCCRTTGCA
<i>nosZ</i> -R	GAAGCGRTCCTTSGARAACCTG
16S rDNA-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S rDNA -R	TACCTTGTTACGACT

## 2 结果与分析

### 2.1 温度、总碳和总氮的变化

堆肥过程中环境温度在20℃以下,虽然堆肥环境温度较低,但堆体温度最高值均达到60℃以上。菌剂组在第8~10天达到最高值,均值为62.6℃。对照组在第10天温度达到最高,均值为49.0℃(图1A)。由此可以看出,菌剂组温度上升较快,且温度较高,持续时间长,堆肥效果较好。在第10天之后2组的温度都出现了明显的下降趋势,且第11天环境温度突然降低到10℃以下,堆肥温度也迅速下降。由于经过高温处理的动物尸体较大部分蛋白质等被

高温变性,容易被微生物分解利用,因此堆肥时间较短,堆肥进程较快。

菌剂组的总氮的变化趋势为“升高→降低→升高→降低”,在第5天达到最高值5.8%。堆肥结束,总氮含量为4.5%。对照组总氮的变化趋势为先增高后降低,在第8天总氮含量达到最高值6.3%,最终总氮含量为5.5%(图1B)。而堆肥过程中总碳含量的变化呈现多次波动,最终对照组和菌剂组的总碳含量分别为47.5%和47.2%(图1C)。菌剂组堆肥温度高且持续时间长,总碳利用率为0.6%,但总氮含量比对照组降低了0.8%。说明微生物菌剂的添加可以提高堆肥效果,但氮素损失也会略微增加。

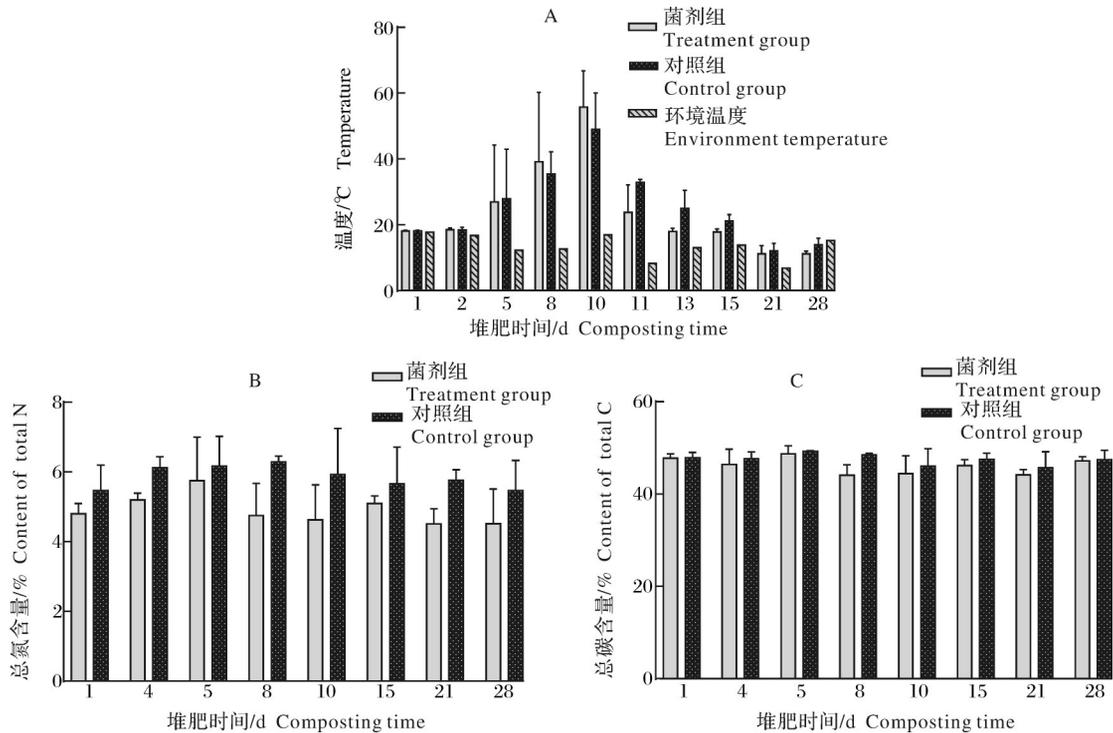


图1 堆肥过程中温度(A)、总氮(B)和总碳(C)的变化

Fig.1 Changes in temperature (A), total nitrogen (B) and total carbon (C) during composting

### 2.2 铵态氮、硝态氮和亚硝态氮含量的变化

由图2A可见,堆肥过程中铵态氮的变化整体呈现“升高→降低→升高”的趋势。在堆肥第5天之后铵态氮含量逐渐上升,第8天达到最高值,菌剂组为7.8 mg/L,对照组为6.0 mg/L。第8~10天为高温期,较高的温度造成NH<sub>3</sub>大量排放,氮素损失较多,铵态氮含量逐渐降低。直至第15天降到最低值,菌剂组为3.0 mg/L,对照组为2.0 mg/L,2组差异显著( $P < 0.05$ )。堆肥后期堆肥温度逐渐降低,NH<sub>3</sub>的排放减少,铵态氮含量逐渐升高。堆肥结束时菌剂组铵态氮为5.4 mg/L,对照组为3.6 mg/L。表明高温

纤维素菌促进了堆肥过程的氨化作用,有利于铵态氮的积累。

由图2B可见,亚硝态氮的整体变化趋势是先升高后降低,菌剂组在第10天之前一直处于增加状态,在第10天达到最高值1.9 mg/L,显著高于对照组( $P < 0.05$ ),之后随着NO和NO<sub>2</sub>的排放,亚硝态氮含量逐渐降低。对照组亚硝态氮含量在第5天达到最高值1.1 mg/L,在第8天之后开始逐渐下降。至堆肥结束,菌剂组的亚硝态氮含量为0.8 mg/L,对照组为0.4 mg/L,菌剂组亚硝态氮含量显著高于对照组( $P < 0.05$ )。这可能是因为菌剂组中的高温纤维素

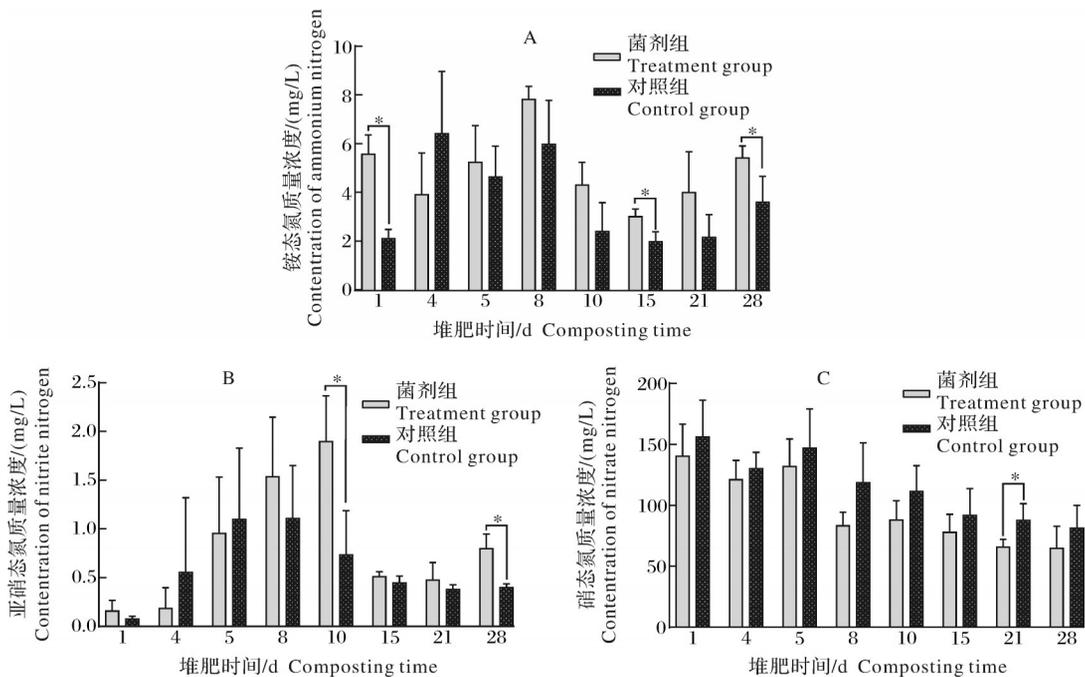
菌在繁殖过程中造成氧气减少,使得菌剂组的反硝化作用强于对照组。

由图2C可见,硝态氮含量初期较高,菌剂组和对照组硝态氮含量分别为140.6 mg/L和156.3 mg/L。堆肥第5天硝态氮含量小幅度上升可能的原因是堆肥初期温度适合硝化细菌的生长繁殖,部分铵态氮转化为硝态氮,造成硝态氮含量的升高。第5天之后由于温度升高不利于硝化细菌的生长繁殖,硝化作用减弱,且高温造成氮素的大量损失,硝态氮含量持续降低直至堆肥结束。最终菌剂组和对照组的硝态氮含量分别为64.9、81.5 mg/L,菌剂组与对照组无显著差异( $P>0.05$ ),硝态氮降低幅度分别为53.8%和47.9%。

### 2.3 氮素转化关键基因拷贝数的变化

与氮素相关功能基因拷贝数的变化可以反映堆肥过程中氮素转化作用的强弱,与硝化/反硝化作用相关的同一基因中拷贝数越高,表明硝化/反硝化作用越强。如图3所示,氨氧化反应相关的*amoA*基因在菌剂组和对照组中的基因拷贝数分别在堆肥第1

天和第8天达到最高值,菌剂组的基因拷贝数是对照组的41.1%。*amoA*的基因拷贝数变化说明氨氧化反应(硝化作用)主要发生在堆肥前期和中期,而堆肥后期氨氧化反应较弱。对照组的*narG*基因拷贝数要高于菌剂组。对照组在第8天达到最高值,极显著高于菌剂组( $P<0.01$ )。菌剂组在第15天达到最高值,与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。*nirK*基因和*nirS*基因的拷贝数整体变化趋势为先升高后降低。菌剂组的*nirK*和*nirS*的基因拷贝数分别在在第8天和第1天达到最高值,极显著高于对照组( $P<0.01$ )。对照组在第5天*nirK*的基因拷贝数达到最高值,丰度显著高于菌剂组( $P<0.05$ )。第8天*nosZ*的基因拷贝数达到最高值,菌剂组低于对照组。第28天对照组*nosZ*基因拷贝数显著高于菌剂组( $P<0.05$ )。整个堆肥进程中对照组的*nosZ*基因拷贝数要整体要高于菌剂组。与亚硝酸盐还原反应相关基因(*narG*、*nirK*、*nirS*和*nosZ*)的拷贝数变化,说明菌剂组降低和延缓了反硝化过程。



\*: 与对照组的结果相比,菌剂组的结果差异显著( $P < 0.05$ ) Compared with the control group, the results of the treatment group are significantly different ( $P < 0.05$ ).

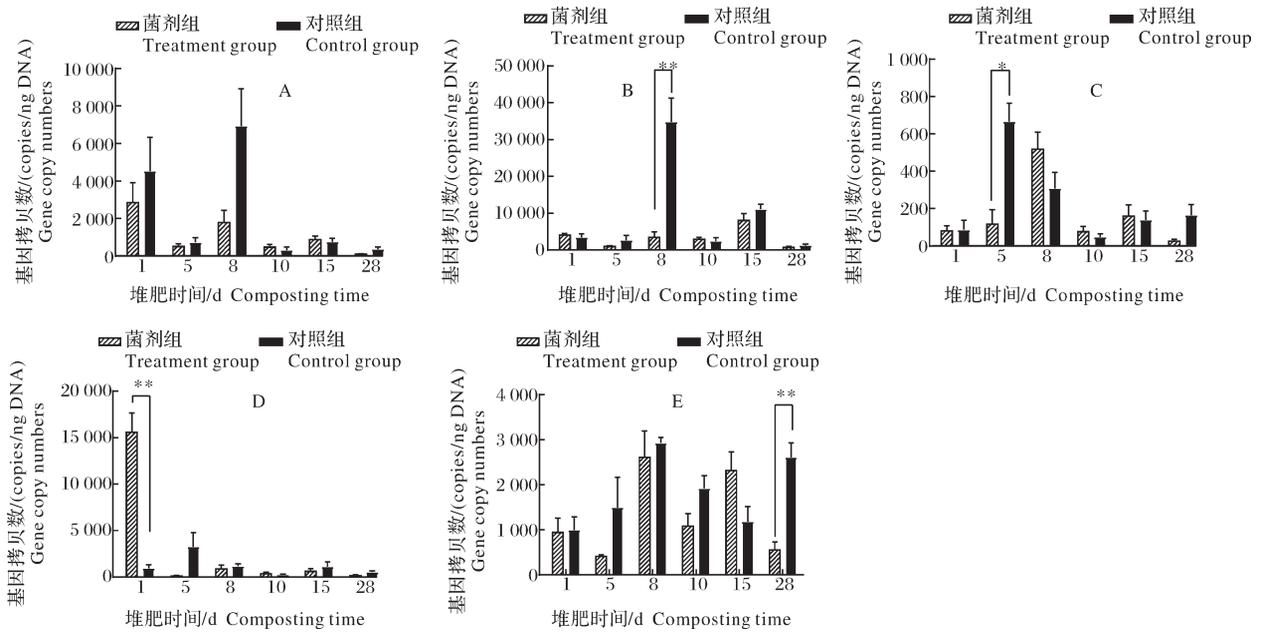
图2 堆肥过程中铵态氮(A)、亚硝态氮(B)和硝态氮(C)的变化

Fig.2 Changes in ammonium (A), nitrite (B), nitrate (C) nitrogen during composting

### 2.4 理化性质与氮素相关功能基因相关性分析

分别对菌剂组和对照组的高温处理尸体堆肥的理化性质和氮素相关功能基因之间的相关性进行RDA分析,结果见图4。图4中射线夹角的余弦值代

表相关性的大小,余弦值越大,相关性越大。菌剂组的第1排序轴、第2排序轴的特征值分别为0.697、0.086;对照组的第1排序轴、第2排序轴的特征值分别为0.467、0.018。



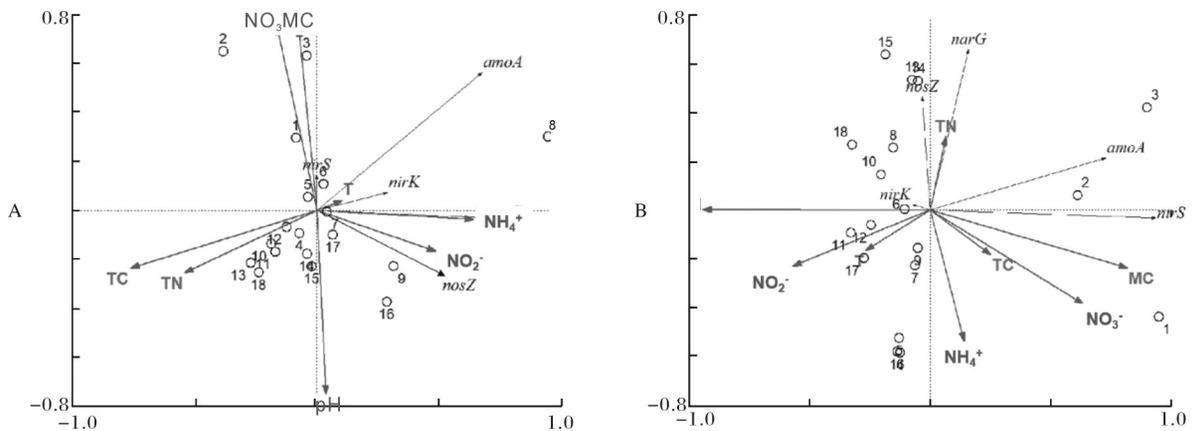
\*和\*\*分别表示与对照组的结果相比,菌剂组的结果差异显著( $P < 0.05$ )、差异极显著( $P < 0.01$ )。\* and \*\* indicate that compared with the control group, the results of the treatment group are significantly different ( $P < 0.05$ ) and very significantly different ( $P < 0.01$ ), respectively.

图3 堆肥过程中 *amoA*(A)、*narG*(B)、*nirK*(C)、*nirS*(D)和 *nosZ*(E)基因拷贝数的变化

Fig.3 Changes in *amoA* (A), *narG* (B), *nirK* (C), *nirS* (D) and *nosZ* (E) gene copy numbers during composting

对图4分析发现,添加菌剂后 *amoA* 基因拷贝数与  $\text{NO}_3^-$  含量相关性增加,说明添加菌剂使堆肥的氨氧化作用增强;*narG* 基因与  $\text{NO}_2^-$  含量在菌剂组呈正相关,在对照组则呈负相关,表明添加菌剂使堆肥的反硝化作用增强;*nirK* 基因和  $\text{NH}_4^+$  在菌剂组和对照

组均呈极显著正相关( $P < 0.01$ ),但菌剂组的相关性大于对照组,表明菌剂组的氨氧化-反硝化作用更强;*nirS* 基因在菌剂组中与  $\text{NO}_2^-$  含量呈显著负相关( $P < 0.05$ ),在对照组中则呈正相关,表明菌剂组中  $\text{NO}_2^-$  还原为  $\text{NO}$  和  $\text{NO}_2$  作用更强。



A. 菌剂组 Bacterial agent group; B. 对照组 Control group.

图4 理化性质与氮素相关功能基因相关性分析

Fig.4 Correlation analysis between physical and chemical properties and nitrogen-related functional genes

### 3 讨论

在好氧堆肥中加入纤维素降解菌,能够促进纤维素的转化,缩短堆肥进程,提高堆肥效率<sup>[13]</sup>。本研究在动物尸体中添加耐高温纤维素降解菌,堆肥温

度达  $63.5^\circ\text{C}$  且加速了尸体和秸秆的降解,表明微生物菌剂能够有效提高堆肥温度,促进堆肥快速腐熟。黄颖婕等<sup>[14]</sup>的堆肥最高温度比本研究中的耐高温纤维素菌高,高温期也更维持,但纤维素酶活低于本研究中的菌株。结果不一致的原因可能是黄颖婕等<sup>[14]</sup>

研究中使用的是牛粪,本研究使用的则是动物尸体,在纤维素含量和微生物的种类与丰度上存在差异。有研究在猪尸体堆肥过程中添加复合微生物菌剂,菌剂组促进了尸体降解并改变了其中菌落结构和多样性<sup>[13]</sup>。

通过参与硝化作用的 *amoA* 基因,以及参与反硝化作用的 *narG*、*nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因拷贝数的变化可以评价堆肥过程中氮素转化作用的强度<sup>[14]</sup>。Guo 等<sup>[15]</sup>发现在好氧堆肥过程中 *amoA* 基因表达丰度与  $\text{NO}_3^-$  含量呈显著正相关 ( $P < 0.05$ )。本研究中耐高温纤维素菌提高了 *amoA* 在堆肥高温期的表达丰度,表明其能通过上调 *amoA* 基因的表达来增强氨氧化作用,进而将更多的  $\text{NH}_4^+$  转化为  $\text{NO}_3^-$ , 最终减少  $\text{NH}_3$  排放。含氮气体的排放多少与反硝化作用的强弱有关。*nirK* 基因编码的酶在  $\text{NO}$  的排放起主导作用<sup>[16]</sup>, 而 *narG*<sup>[17]</sup>、*nirS* 和 *nosZ*<sup>[18]</sup> 浓度与  $\text{N}_2$  的排放显著相关<sup>[19]</sup>。本研究发现耐高温纤维素降解菌在堆肥前期主要是降低了 *nirK* 拷贝数,在堆肥中期降低了 *narG* 拷贝数。虽然降低和延缓反硝化过程,但由于在堆肥前期 *nirS* 的拷贝数增加促进了反硝化作用,使氮素损失加强。本研究中菌剂组的总氮含量比对照组降低了 0.8%, 这些结果与敖冬玲<sup>[8]</sup> 在猪尸体堆肥和胡春晓<sup>[20]</sup> 在农业废物好氧堆肥过程中反硝化作用和氮素损失增加的结果一致。因此,添加耐高温纤维素降解菌能加快堆肥腐熟,改变氮素循环,但也会因促进了反硝化作用而造成氮素损失的增加。因此筛选效率高、造成氮素损失低的复合微生物菌剂是未来畜禽废弃物堆肥的发展方向之一。

## 参考文献 References

- [1] 余波,张云,易梦杰,等.病死动物高温生物降解无害化处理技术推广应用探讨[J].中国猪业,2014,9(3):58-60.YU B, ZHANG Y, YI M J, et al. Discussion on popularization and application of high-temperature biodegradation harmless treatment technology for dead animals[J]. China swine industry, 2014, 9(3): 58-60 (in Chinese).
- [2] 焦洁婷,王宇宁.病死动物的无害化高温生物降解处理技术应用[J].当代畜牧,2016(32):59-60.JIAO J T, WANG Y N. Application of harmless high-temperature biodegradation treatment technology for dead animals[J]. Contemporary animal husbandry, 2016(32):59-60 (in Chinese).
- [3] MAEDA K, HANAJIMA D, TOYODA S, et al. Microbiology of nitrogen cycle in animal manure compost[J]. Microbial biotechnology, 2011, 4(6): 700-709.
- [4] 周辉宇,陆文静,王洪涛,等.高效纤维素分解菌生物强化技术在工厂化好氧堆肥中的应用初探[J].农业环境科学学报, 2005, 24(1): 182-186.ZHOU H Y, LU W J, WANG H T, et al. A preliminary study on the application of high-efficiency cellulolytic bacteria bio-enhancement technology in industrial aerobic composting [J]. Journal of agricultural environmental science, 2005, 24(1): 182-186 (in Chinese with English abstract).
- [5] WEI Y Q, WU D, WEI D, et al. Improved lignocellulose-degrading performance during straw composting from diverse sources with actinomycetes inoculation by regulating the key enzyme activities[J]. Bioresource technology, 2019, 271: 66-74.
- [6] 孙元烽,钟杰,郑娟,等.高效纤维素降解菌筛选鉴定及在羊粪堆肥中的初步应用[J].黑龙江畜牧兽医,2019(24):57-61,174. SUN Y F, ZHONG J, ZHENG J, et al. Screening and identification of efficient cellulose-degrading bacteria and preliminary application in sheep manure composting[J]. Heilongjiang animal science and veterinary medicine, 2019(12): 57-61, 174 (in Chinese).
- [7] 武肖莎,李再兴,黄亚丽,等.高温木质纤维素降解菌的筛选鉴定及其堆肥应用[J].安徽农业科学,2021,49(20):68-71. WU X S, LI Z X, HUANG Y L, et al. Screening, identification and its composting application of high-temperature strain for degrading lignocellulose[J]. Journal of Anhui agricultural sciences, 2021, 49(20): 68-71 (in Chinese with English abstract).
- [8] 敖冬玲.猪尸体堆肥中参与氮循环的功能基因丰度与理化参数间关系的研究[D].武汉:华中农业大学,2018.AO D L. Study on the correlation between abundance of functional genes in nitrogen cycle and physic-chemical parameters during pig carcass composting[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [9] 韩珍珍.猪尸体堆肥中高温纤维素降解菌的筛选[D].武汉:华中农业大学,2020.HAN Z Z. Screening of high-temperature cellulose-degrading bacteria in compost of pig carcasses [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [10] TIQUIA S M, TAM N F. Fate of nitrogen during composting of chicken litter[J]. Environmental pollution, 2000, 110(3): 535-541.
- [11] PAJARES S, BOHANNAN B J. Ecology of nitrogen fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2016, 7: 1045 [2022-01-06]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01045>.
- [12] YANG X C, HU Q Q, HAN Z Z, et al. Effects of exogenous microbial inoculum on the structure and dynamics of bacterial communities in swine carcass composting[J]. Canadian journal of microbiology, 2018, 64(12): 1042-1053.
- [13] YANG X C, HAN Z Z, RUAN X Y, et al. Composting swine carcasses with nitrogen transformation microbial strains: succession of microbial community and nitrogen functional genes [J]. Science of the total environment, 2019, 688: 555-566.
- [14] 黄颖婕,周尚峰,刘震夷,等.牛粪堆肥纤维素高效降解菌的筛选和应用[J].湖南农业科学,2018(2):50-53. HUANG Y J, ZHOU S F, LIU Z Y, et al. Screening and application of efficiently cellulose degradation bacteria in cow dung composte [J]. Hunan agricultural sciences, 2018(2): 50-53 (in Chinese with English abstract).
- [15] GUO H H, GU J, WANG X J, et al. Beneficial effects of bacterial agent/bentonite on nitrogen transformation and microbial com-

- munity dynamics during aerobic composting of pig manure [J/OL]. *Bioresource technology*, 2020, 298: 122384 [2022-01-06]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122384>.
- [16] ZHANG L H, ZENG G M, ZHANG J C, et al. Response of denitrifying genes coding for nitrite (*nirK* or *nirS*) and nitrous oxide (*nosZ*) reductases to different physico-chemical parameters during agricultural waste composting [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, 99(9): 4059-4070.
- [17] REYNA L, WUNDERLIN D A, GENTI-RAIMONDI S. Identification and quantification of a novel nitrate-reducing community in sediments of Suquia River Basin along a nitrate gradient [J]. *Environmental pollution*, 2010, 158(5): 1608-1614.
- [18] 王朱珺, 王尚, 刘洋炎, 等. 宏基因组技术在氮循环功能微生物分子检测研究中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2018, 34(1): 1-14.
- WANG Z J, WANG S, LIU Y Y, et al. The applications of metagenomics in the detection of environmental microbes involving in nitrogen cycle [J]. *Biotechnology bulletin*, 2018, 34(1): 1-14 (in Chinese with English abstract).
- [19] ANGNES G, NICOLOSO R S, DA S M, et al. Correlating denitrifying catabolic genes with N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> emissions from swine slurry composting [J]. *Bioresource technology*, 2013, 140: 368-375.
- [20] 胡春晓. 农业废物好氧堆肥中反硝化功能基因及其分布特征的研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2013. HU C X. The research on denitrification genes and the distribution of them during agricultural waste composting [D]. Changsha: Hunan University, 2013 (in Chinese with English abstract).

## Effect of adding high-temperature cellulose-degrading bacteria on nitrogen loss during high-temperature composting

SHAN Yajing, WU Kuntan, GAO Jianwei, YANG Xuchen, ZHENG Rong

*College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** In order to explore the application effect of cellulose-degrading bacteria in compost decomposing, the experiment mixed the carcasses of livestock and poultry with straw after high temperature treatment, and divided them into the control group without adding bacterial agent and adding 1% high temperature resistant cellulose bacteria (*Parageobacillus thermoglucosidasius*). The compost was composted by aerobic static ventilation for 28 days, and the physical and chemical parameters (temperature, pH, moisture content, ammonium nitrogen, nitrate nitrogen, nitrite nitrogen, total carbon and total nitrogen) and nitrogen conversion function during the composting process were determined. The results showed that the ammonium nitrogen content and nitrate nitrogen content of the bacterial agent group were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the control group, but the final total nitrogen content of the bacterial agent group was lower than the control group. The copy number of *nirK* in the control group in the pre-composting period was significantly higher than that in the inoculum group ( $P < 0.05$ ) and was significantly positively correlated with the content of  $\text{NH}_4^+$  ( $P < 0.05$ ); the copy number of *nirS* in the inoculum group was extremely significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ), and has a very significant positive correlation with  $\text{NO}_3^-$  content ( $P < 0.01$ ). In the middle stage of composting, the copy number of *narG* in the control group was significantly higher than that in the inoculum group ( $P < 0.01$ ), and the correlation with  $\text{NH}_4^+$  content was close to the significant level ( $P = 0.064$ ); in the late stage of composting, the copy number of *nosZ* in the control group was extremely significantly higher than bacterial agent group ( $P < 0.01$ ). The high temperature-resistant cellulose-degrading bacteria mainly change the nitrogen cycle of the compost through ammonia oxidation and denitrification in the early stage of composting, but also promotes denitrification and increases nitrogen loss.

**Keywords** livestock and poultry carcasses; high-temperature treatment; composting; nitrogen loss; cellulose-degrading bacteria

(责任编辑:边书京)