农业环境科学学报
JOURNAL OF AGRO-ENVIRONMENT SCIENCE
中文核心期刊/CSCD
请通过网上投稿系统投稿
网址：http://www.aes.org.cn

消毒剂卫可施用对猪粪污厌氧消化系统运行及微生物多样性的影响

邓觅, 钟华, 夏嵩, 吴永明, 李荣富, 金丹凤, 梁培瑜

引用本文:
邓觅, 钟华, 夏嵩, 吴永明, 李荣富, 金丹凤, 梁培瑜. 消毒剂卫可施用对猪粪污厌氧消化系统运行及微生物多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(4): 891-900.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0706

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

人尿施用对生菜品质性状及土壤细菌群落结构的影响
于广泉, 魏孝承, 王倩, 王强, 张春雪, 杨波, 郑向群
农业环境科学学报. 2023, 42(3): 558-567 https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0811

微生物群落对厌氧干发酵挥发性脂肪酸抑制的响应
王思淇, 张克强, 孔德望, 高文萱, 韦红, 梁军锋, 李佳佳, 杜连柱
农业环境科学学报. 2022, 41(1): 171-182 https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0529

猪粪厌氧发酵消化液回流体系微生物群落结构特征与产气关系研究
孔德望, 张克强, 房芳, 高文萱, 梁军锋, 梁雨, 杜连柱
农业环境科学学报. 2018, 37(3): 559-566 https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1241

铁改性生物炭对水稻土中砷/铁还原的影响
何璇, 钱子妍, 吴川, 崔梦倩, 薛生国
农业环境科学学报. 2022, 41(4): 755-764 https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0961

牛粪原料浓度对厌氧消化削减四环素类抗性基因的影响
朱文博, 张秋萍, 许继飞, 庞小可, 刘建国, 赵吉
农业环境科学学报. 2021, 40(8): 1808-1817 https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0033

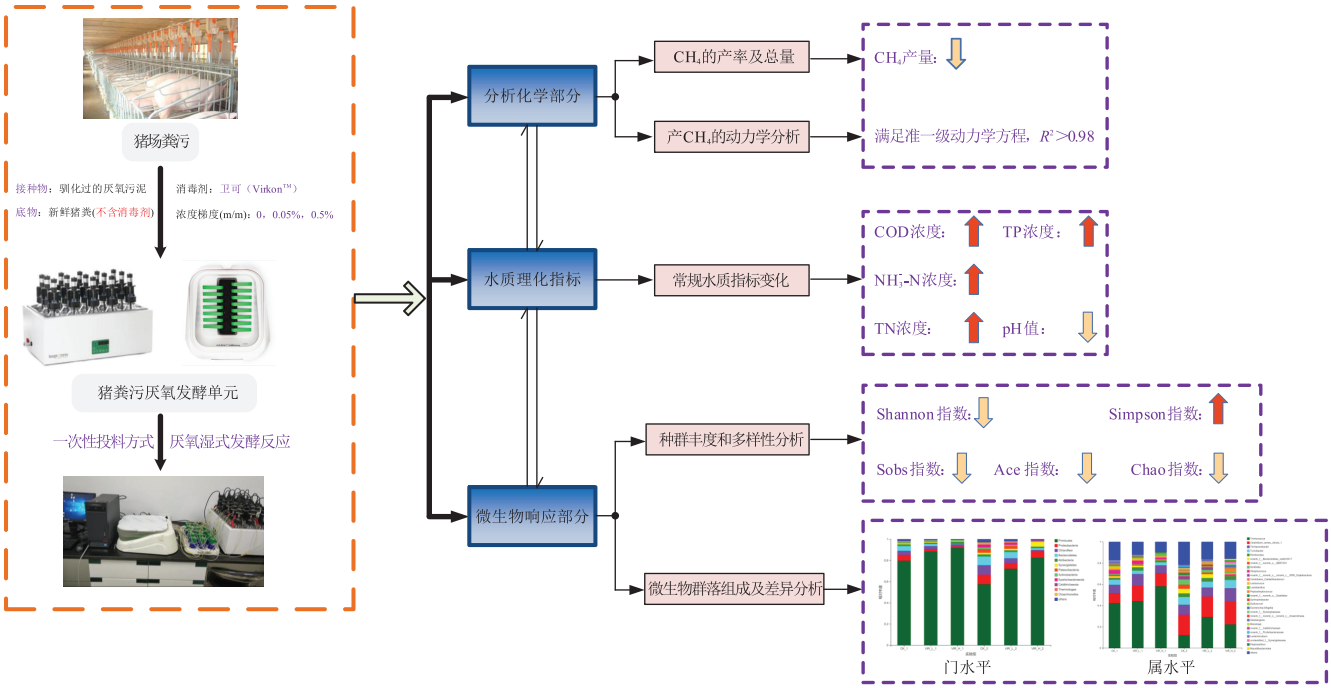
关注微信公众号，获得更多资讯信息

邓觅, 钟华, 夏嵩, 等. 消毒剂卫可施用对猪粪污厌氧消化系统运行及微生物多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(4): 891-900.
DENG M, ZHONG H, XIA S, et al. Characteristics of the phytoplankton community in a land-based container aquaculture system with recycling water[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(4): 891-900.

消毒剂卫可施用对猪粪污厌氧消化系统运行及微生物多样性的影响

邓觅[1], 钟华[2], 夏嵩[3], 吴永明[1*], 李荣富[1], 金丹凤[1], 梁培瑜[1]

(1.江西省科学院微生物研究所, 南昌 330096; 2.武汉大学水利水电学院, 武汉 430072; 3.江西省科学院能源研究所, 南昌 330096)



摘　要:为全面评估大量消毒剂施用对猪场粪污厌氧发酵系统造成的损害程度,选择卫可(Virkon™)消毒剂为研究对象,在全自动甲烷潜力测试系统(AMPTS Ⅱ)中采取一次性投料的厌氧湿式发酵方式,探索质量浓度为0.05%和0.5%的卫可对系统产CH_4、水质污染物降解、微生物群落等方面影响。结果表明:卫可会导致厌氧发酵系统出现抑制产CH_4、COD不降反升、大幅促进氮磷释放等异常现象。对照组(CK组,新鲜猪粪添加接种污泥)和0.05%、0.5%卫可试验组(分别记为L组和H组)的最大产CH_4速率分别为(23.54±0.06)、(18.90±1.49) $mL\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$、(7.73±0.01) $mL\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$,且L组和H组的$CH_4$总产量分别降低7.53%和92.60%($P<0.001$),而$CH_4$速率常数也由0.267 d^{-1}(CK组)下降到0.225 d^{-1}(L组);理化指标方面,在第0天(启动期)和第12天(结束期),H组较CK组的COD、TP、NH_3-N、TN分别显著高出148.77%和368.97%、214.11%和498.12%、64.79%和44.37%、68.77%和53.30%。高通量测序发

收稿日期:2022-07-12　　**录用日期**:2022-10-12
作者简介:邓觅(1989—),男,江西赣州人,博士,副研究员,主要从事畜禽养殖粪污资源化、减量化、无害化处理。E-mail:dmi190816@163.com
*通信作者:吴永明　E-mail:7086006@qq.com
基金项目:国家自然科学基金项目(31860154);江西省科技创新基地计划(20212BCD42014);江西省重点研发计划一般项目(20202BBGL73085)
Project supported: The National Natural Science Foundation of China (31860154); Jiangxi Province Science and Technology Innovation Base Plan (20212BCD42014); General Projects of Key R&D Programs of Jiangxi Province (20202BBGL73085)

现，卫可会使厌氧系统中细菌群落组成、多样性和丰度发生显著变化，其中Ace、Chao和Shannon指数，L和H组均低于CK组，而Simpson指数则相反；厚壁菌门（Firmicutes）是第一优势菌群，其次是变形菌门（Proteobacteria）、绿弯菌门（Chloroflexi）和拟杆菌门（Bacteroidetes），其他微生物丰度均低于5%，且Firmicutes丰度与卫可剂量呈正相关，Proteobacteria、Chloroflexi和Bacteroidetes则相反，甚至热袍菌门（Thermotogae）和阴沟单胞菌门（Cloacimonetes）会因高剂量卫可而消失；在属水平，束毛球菌属（*Trichococcus*）由42%~59%降至12%~30%，消化链球菌属（*Peptostreptococcus*）、埃希氏-志贺菌属（*Escherichia-Shigella*）和*Macellibacteroides*属则显著增加。

关键词：猪场粪便；厌氧消化；消毒剂；产甲烷性能；微生物多样性；高通量测序

中图分类号：X713　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1672-2043(2023)04-0891-10　　doi:10.11654/jaes.2022-0706

Effects of Virkon™ application on the operation and microbial diversity of the anaerobic digestion system in pig farms

DENG Mi[1], ZHONG Hua[2], XIA Song[3], WU Yongming[1*], LI Rongfu[1], JIN Danfeng[1], LIANG Peiyu[1]

(1. Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China; 2. School of Water Resources and Hydropower Engineering, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 3. Institute of Energy, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China)

Abstract: To comprehensively evaluate the degree of damage caused by the application of a large number of disinfectants to the anaerobic fermentation system of manure in pig farms, Virkon™ disinfectant was selected as the research object. The effects of 0.05% and 0.5% Virkon™ on CH_4 production, water pollutant degradation, and microbial communities in the system were explored through anaerobic wet fermentation with one-time feeding in the Automatic Methane Potential Test System Ⅱ. The results showed that Virkon™ could inhibit the production of CH_4, increase COD, and greatly promote the release of nitrogen and phosphorus in the anaerobic fermentation system. The maximum gas production rate of the control check group (CK group), 0.05%, and 0.5% Virkon™ groups (L group and H group, respectively) were (23.54±0.06), (18.90±1.49) $mL\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$, and (7.73±0.01) $mL\cdot g^{-1}\cdot d^{-1}$, respectively. The total CH_4 production of groups L and H decreased by 7.53% and 92.60% ($P<0.001$), respectively. While the CH_4 rate constant decreased from 0.267 d^{-1} (CK group) to 0.225 d^{-1} (L group). In terms of physical and chemical indicators: on the 0th day (start-up phase) and the 12th day (end phase), in the H group compared with the CK group, COD increased by 148.77% and 368.97%, TP increased by 214.11% and 498.12%, NH_3-N increased by 64.79% and 44.37%, and TN increased by 68.77% and 53.30%, respectively. Simultaneously, all of them showed significant differences. High-throughput sequencing found that Virkon™ caused significant changes the composition, diversity and abundance of bacterial communities in the anaerobic systems. The Ace, Chao, and Shannon indexes in the L and H groups were lower than those in the CK group, while the opposite was seen for the Simpson index. The Firmicutes was found to be the first dominant bacterial group, followed by Proteobacteria, Chloroflexi, and Bacteroidetes. The abundance of other microorganisms were all lower than 5%, and Firmicutes increased with the increase of Virkon™ concentration, but Proteobacteria, Chloroflexi, and Bacteroidetes were the opposite. And even Thermotogae and Cloacimonetes disappeared due to high doses of Virkon™. At the genus level, *Trichococcus* decreased from 42%-59% to 12%-30%; in contrast, *Peptostreptococcus*, *Escherichia-Shigella*, and *Macellibacteroides* were increased significantly.

Keywords: pig manure; anaerobic digestion; disinfectant; methanogenic performance; microbial diversity; high-throughput sequencing

非洲猪瘟（African swine fever，ASF）蔓延对我国养猪行业产生巨大冲击，消毒作为一种可有效切断病原微生物传播途径和控制传染病的重要防疫手段，导致消毒剂用量激增，进而造成大量消毒剂残留于猪场粪尿并随粪尿一同流入后端废水处理系统，从而对以“微生物作用”为主体的废水处理系统产生不利影响，导致出水水质变差[1-2]。

当前猪场常用的消毒剂主要包括碱类、醛类、卤素类、酚类和氧化剂等，其主要是通过使微生物的蛋白质、酶、核酸结构发生致死性改变，使酶系统和细胞结构受损，从而抑制细胞代谢机能[1]。近些年，练植婵等[3]、吴园园[4]和张京景等[5]报道了多种残留消毒剂对厌氧发酵系统的影响，并指出过量消毒剂会抑制CH_4产生且会降低COD、NH_3-N等污染物去除效果，但这些研究均未从微生物层面对这些现象进行分析。基于当前畜禽养殖粪污处理，关于微生物多样性的研究多集中于重金属和抗生素等方面[6-8]，而有关高剂量残留消毒剂对厌氧发酵过程中微生物多样性变化的影响研究甚少。在非洲猪瘟尚未得到遏制的情况下，可以预见今后消毒剂在各类环境介质中将普遍存在且浓度将逐年增加，因此，本文选择一款杀菌效果明显的国际知名、且使用广泛的商品消毒剂——卫可（Virkon™，主要成分是过硫酸氢钾）作为研究对象[9]，从CH_4产量[10]、COD等理化指标[11]和微生物群落的结

构及组成[12]等角度出发，探讨上述多尺度效应与微生物响应的关系，评估猪场常用消毒剂大量使用对厌氧发酵系统造成损伤的程度，揭示消毒剂对厌氧菌群间的相互作用关系，以期为指导猪场疫（病）情期间消毒剂的合理使用提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

厌氧消化污泥取自未受消毒剂影响的南昌某规模化养猪场厌氧发酵罐高活性污泥；新鲜猪粪取自南昌某规模化猪场育肥猪正常排泄物，未接触消毒剂。

1.2 试验设置

消毒剂浓度：基于联合国粮农组织（FAO）公布的《非洲猪瘟——发现与诊断（中文版）》、农业农村部2021年5月6日发布的《非洲猪瘟疫情应急实施方案（第五版）》以及卫可生产厂家推荐的1∶200兑水使用浓度[9,13-14]，并结合消毒剂使用后经猪舍冲洗水稀释及环境滞留、降解等影响，最终选定卫可质量浓度分别为0.05%和0.5%，以探究其对厌氧消化系统的影响。每组试验设3个重复。

试验组设置：空白组为超纯水中添加接种污泥，以评价接种污泥的生物活性，记为Blank组；对照组为新鲜猪粪添加接种污泥，记为CK组；试验组为新鲜猪粪添加接种污泥后分别添加质量浓度为0.05%和0.5%的卫可，记为L组和H组。

反应条件设置：采取一次性投料的厌氧湿式发酵方式，选择卫可消毒剂，在XT5018GP型全自动甲烷潜力测试系统（AMPTS Ⅱ，瑞典Bioprocess Control公司，见图1）中开展试验[15]。接种污泥（驯化的厌氧污泥，VSS含量0.015 2 g·mL^{-1}）和物料（不含消毒剂的新鲜猪粪，VSS含量0.209 1 g·g^{-1}，湿质量）按挥发性固体（VSS）比2∶1进行混合[16]，通过添加一定量的超纯水以保证总固体（TS）浓度为2%，并将400 g上述混合物加入到500 mL玻璃反应瓶（厌氧消化单元）中，于中温（37±0.5）℃水浴加热，通过电机自动控制搅拌循环（5 min搅拌，5 min停止），直至当天产气量不足累计产气量1%，视为试验结束[15]。接种时，在玻璃反应瓶内接入500 mL·min^{-1}氮气流，保持1 min左右，保证整个反应体系处于严格的厌氧环境。

1.3 样品的采集与分析

CH_4的收集：AMPTS Ⅱ装置（图1）配备有可控温的发酵单元，内含NaOH溶液+石蕊指示剂的CO_2吸收瓶（图1a），15组分辨率为10 mL的微量气体流量计组阵

（a）厌氧发酵单元 Anaerobic fermentation unit　（b）计量与数据处理单元 Metering and data processing unit

图1 全自动甲烷潜力测试系统（AMPTS Ⅱ）

Figure 1 Automatic methane potential test system Ⅱ

（图1b），可实现整个厌氧发酵周期连续全自动批量采集CH_4，并通过内置的温度及压力传感器自动校正数据，获取精确的气体流量等数据[16]。

理化指标及污泥样本收集：在启动期（第0天）和结束期（第12天）测定pH，并从各玻璃反应瓶（厌氧发酵单元）中取15 mL摇匀后的泥水混合样本，在4 ℃下，于离心机中以3 000 *g*离心分离5 min，取底泥0.5~1.0 g保存于无菌离心管中，离心管先放入液氮中，后于-80 ℃保存，用于微生物多样性分析；上清液用于测试COD、NH_3-N、TN和TP等理化指标，对应测定方法依次参照《HJ 828—2017》《HJ 535—2009》《HJ 636—2012》和《GB 11893—1989》。

微生物多样性分析：按照Xu等[17]和Benay等[18]报道的方法，采用E.Z.N.A.®土壤DNA提取试剂盒（Omega，美国）对样品微生物群落总DNA进行提取，使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取质量，并通过NanoDrop2000测定DNA的浓度和纯度；待检验合格后，以338F（5′-ACTCCTACGGGAGGCA GCAG-3′）和806R（5′-GGACTACHVGGGTWTCTA AT-3′）为引物，对16S rRNA基因V3~V4区进行PCR扩增，使用NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit建库，利用Illumina公司的MiSeq PE300平台测序，以分析厌氧活性污泥中微生物多样性的变化。

1.4 数据处理分析

采用Origin 8.5和GraphPad Prism软件进行数据处理和差异显著性分析，$P<0.05$表示差异显著；微生物多样性数据处理借助上海美吉生物云平台完成[19]。

2 结果与分析

2.1 消毒剂对厌氧消化产甲烷特征的影响

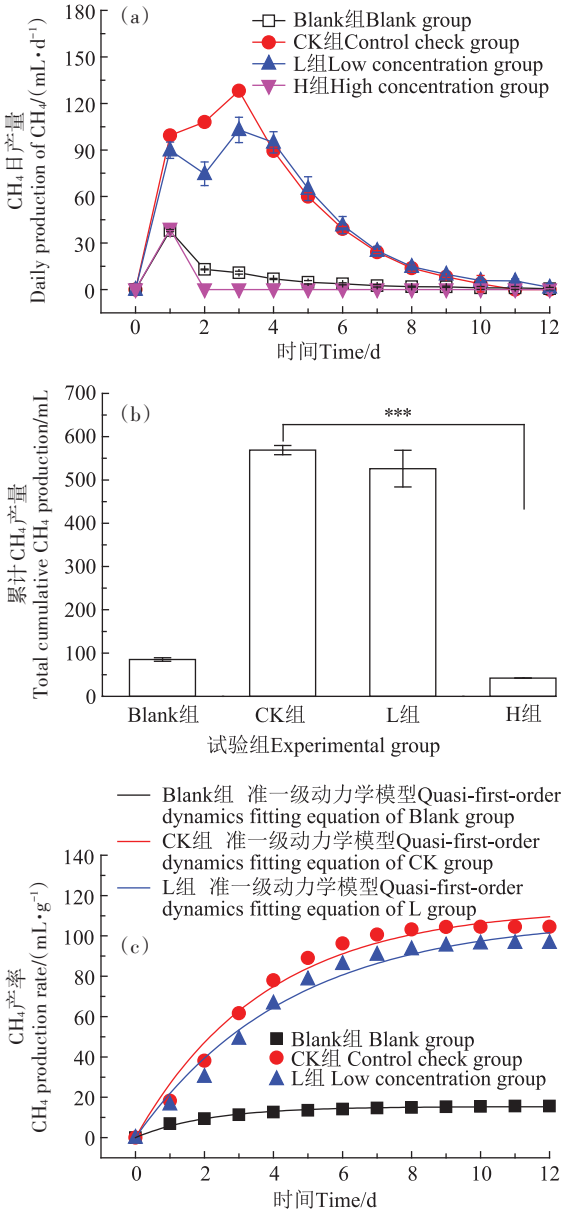
由图2a和图2b可知，空白组持续产气12 d，累计产气量达（85.10±3.99）mL，表明接种污泥具有较高

的活性[13]。CK组初始阶段快速产气，无明显迟滞期。与CK组相比，试验组显示厌氧消化系统中卫可的存在会影响CH_4的产生，且表现出明显的剂量关系。由图2b可知：CH_4产生量在L组和H组受到抑制，产量分别比CK组降低了7.53%（P>0.05）和92.60%（P<0.001）；对于产气周期，L组和H组分别为12 d和1 d，较CK组（10 d）分别延长20%和缩短90%。由图2a可知，CK组、L组和H组的产气高峰时间分别出现在第3天、第3天和第1天，其最高日产CH_4量分别为（128.15±0.35）、（102.93±8.11）、（39.07±1.07）mL·d^{-1}，单位质量可挥发性有机物（猪粪的VSS）对应的最大产CH_4速率依次为（23.54±0.06）、（18.90±1.49）、（7.73±0.01）mL·g^{-1}·d^{-1}，相应地，消化结束后总产CH_4量分别为（104.51±1.93）、（96.64±7.80）、（7.73±0.01）mL·g^{-1}。

如图2c所示，通过对反应时间和CH_4产率的数据拟合发现，除H组外（产CH_4仅1 d）的整个厌氧消化产气过程满足准一级动力学方程[20]，并具体表现为：Blank组、CK组和L组的准一级动力学拟合方程分别为$G(t)=15.387\ 55(1-e^{-0.470\ 78t})$、$G(t)=114.131\ 23(1-e^{-0.266\ 78t})$和$G(t)=108.935\ 23(1-e^{-0.224\ 6t})$，相关系数（$R^2$）依次为0.990 0、0.980 7和0.980 0，对应的理论CH_4产率（G_∞）分别为15.39、114.13 mL·g^{-1}和108.94 mL·g^{-1}，与实测的（15.63±0.73）、（104.51±1.93）mL·g^{-1}和（96.64±7.80）mL·g^{-1}相近；同时，产CH_4速率常数也因消毒剂的添加受到抑制，由CK组的0.267 d^{-1}下降到L组的0.225 d^{-1}。由此可见，卫可会抑制厌氧消化产CH_4的性能，并表现出明显的剂量关系。

2.2 消毒剂对厌氧消化过程中理化性质的影响

由图3可知，无论是刚加入消毒剂的启动期（第0天），还是反应的结束期（第12天），卫可对厌氧消化液中的COD、TP、NH_3-N、TN和pH值5个理化指标均有显著影响，且其作用是快速、持久的。具体表现为：相较于CK组，H组对反应体系中的5个理化指标均表现出极显著影响（P<0.01或P<0.001），L组则仅对pH值造成显著性下降。COD表现出与卫可剂量呈正相关，在第0天，L组和H组比CK组[（669.50±4.33）mg·L^{-1}]分别高出16.48%和148.77%（P<0.001），而第12天反应结束时，L组和H组比CK组[（506.50±2.50）mg·L^{-1})]分别高出11.91%和368.97%（P<0.001），由图3a可见，经过厌氧消化反应后，CK组和L组的COD均呈现正常的下降现象，而H组的COD反而大幅升高；对于TP，在第0天和第12天时L组中TP浓度的提升



*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001。下同The same below。

图2 卫可对厌氧消化产甲烷特征的影响

Figure 2 Effect of Virkon™ on the characteristics of methane production from anaerobic digestion

效果不显著，但H组中TP浓度分别高达（151.99±7.34）mg·L^{-1}和（293.25±4.61）mg·L^{-1}，比CK组分别高出214.11%（P<0.001）和498.12%（P<0.001），表明卫可在厌氧环境下也会促进磷的释放；NH_3-N和TN整体呈现出相似的变化趋势，随着反应时间的进行，浓度逐渐上升，但相较于CK组，L组的NH_3-N和TN释放效应不显著，H组则呈现显著性增加，在第0天，H组NH_3-N和TN浓度分别为（203.47±4.31）mg·L^{-1}和（350.02±6.61）mg·L^{-1}，比CK组高出64.79%（P<

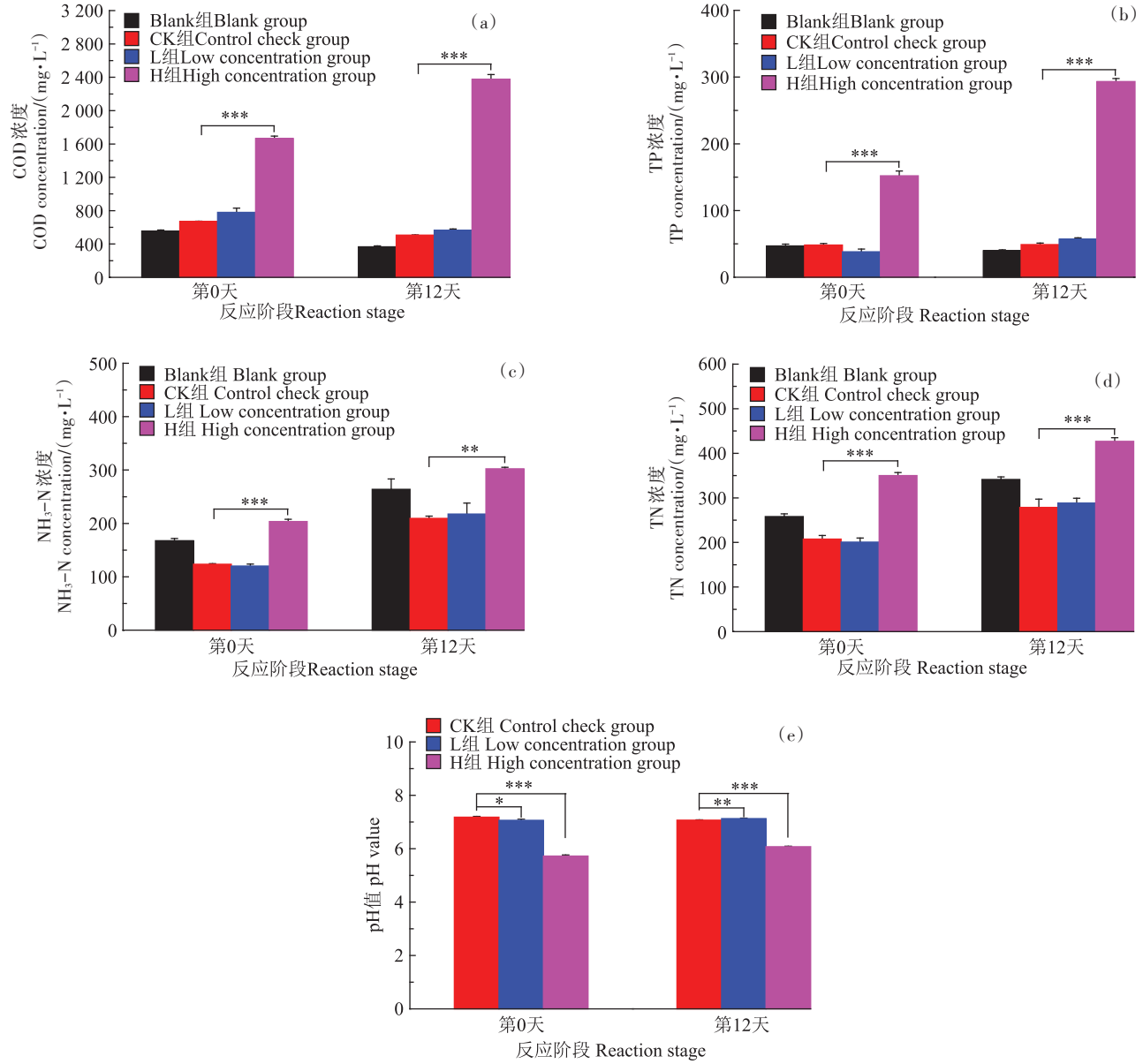


图3 厌氧发酵前后理化性质的变化

Figure 3 Changes of physicochemical properties during anaerobic fermentation

0.001）和68.77%（P<0.001），到第12天时，对应的NH_3-N和TN浓度分别达到（302.27±2.80）mg·L^{-1}和（426.88±8.21）mg·L^{-1}，比CK组高出44.37%（P<0.01）和53.30%（P<0.001），表明卫可在厌氧环境下会促进氮素的释放；对于pH值，则表现出明显的剂量效应，卫可含量越高，系统pH值越低，但反应前后变化较小，在第0天和第12天，H组的pH值分别为（5.73±0.04）和（6.08±0.02），较CK组分别低1.45（P<0.001）和0.99（P<0.001）。综上可知，卫可会导致厌氧发酵液中COD不降反升，且大幅促进TP、NH_3-N和TN的释放，同时伴随pH值的下降。

2.3 微生物多样性特征分析

2.3.1 微生物群落组成特征

通过对18个样品进行高通量测序，共获得791 710条高质量序列，每个样品33 313~74 828条，平均50 874条。所有样品共获得51个门、98个纲、212个目、362个科、699个属、1 200个种和2 172个OTU。

2.3.2 微生物群落丰度和多样性分析

对合格序列均一化处理后，选择Sobs、Simpson、Shannon、Ace和Chao等α多样性分析指数，对厌氧发酵前后微生物群落的丰富度和多样性进行评估，具体见表1。

表1 不同处理组在厌氧发酵前后细菌群落多样性指数变化(OTU水平)

Table 1 Changes of bacterial community diversity index in different treatment groups during anaerobic fermentation(OTU level)

反应阶段 Reaction stage	试验组 Experimental group	Sobs指数 Sobs index	Shannon指数 Shannon index	Simpson指数 Simpson index	Ace指数 Ace index	Chao指数 Chao index
启动期(第0天)	CK组	951±80a	3.25±0.20a	0.196±0.029a	1 474±178a	1 408±87a
	L组	739±74ab	2.80±0.17ab	0.239±0.060a	1 333±99a	1 104±83ab
	H组	593±10b	2.26±0.08b	0.352±0.025a	1 166±84a	970±34b
结束期(第12天)	CK组	866±23a	4.20±0.09a	0.046±0.004a	1 399±115a	1254±77a
	L组	767±72a	3.51±0.15ab	0.115±0.008a	1 384±129a	1174±120a
	H组	542±17b	3.19±0.27b	0.117±0.039a	773±21b	770±25b

注:数值为平均值±标准误(mean±SE),n=3;同一列数据中(分启动期和结束期)不同字母表示有显著差异(P<0.05)。

Note: All data are presented as mean±SE(n=3); Different letters in each column(start-up and end phase) indicate a significant difference(P<0.05).

由表1知,作为反映微生物菌群丰度的Ace和Chao指数,无论是刚加入卫可的第0天,还是反应结束的第12天,L组和H组均比CK组低,且反应时间越长其抑制效果越明显,反应结束时H组的Ace和Chao指数分别为(773±21)和(770±25),显著低于CK组对应的(1 399±115)和(1 254±77)(P<0.05)。而针对反映微生物菌群多样性的Shannon和Simpson指数,无论是第0天还是第12天,Shannon指数均表现为L组和H组低于CK组,Simpson指数则与之相反,且表现出与消毒剂之间明显的剂量关系,其中高的Shannon指数和低的Simpson指数代表高的菌群多样性[21]。此外,H组较CK组的Shannon指数显著下降(P<0.05),而Simpson指数虽然在3个试验组间无显著差异,但均表现为CK组<L组<H组,说明微生物多样性随着消毒剂剂量的增加而减少(P>0.05),这也进一步表明微生物多样性与微生物丰度的结果相似。

2.3.3 微生物群落组成分析

从门水平和属水平分析不同试验组在厌氧发酵前后微生物群落组成差异,结果见图4。由图4可知,不同试验组中微生物菌群的组成明显不同,且厌氧发酵结束后对应优势菌门也有所改变。

在门水平,厌氧发酵前后均表现出厚壁菌门(Firmicutes)是第一优势菌群,其在启动期和结束期时的占比分别为79.72%(CK组)、88.21%(L组)、91.77%(H组)和57.49%(CK组)、72.14%(L组)和82.43%(H组),这与黄潇[22]、闫冰等[23]和朱文博等[24]关于厚壁菌门是发酵系统中的优势菌群的结论一致;其次是变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和拟杆菌门(Bacteroidetes),其他微生物丰度均低于5%。此外,无论是刚加入卫可的启动期,还是厌氧发酵反应的结束期,厚壁菌门丰度均随消毒剂剂量的增加而增大,变形菌门、绿弯菌门和拟杆菌门则与之相反,随卫可剂量的增加而减少,其中拟杆菌门在刚开始阶段反应最为敏感,短时间内直接由4.39%(CK组)降低至0.31%(H组),但到反应结束时会再次上升至1.81%(H组);而绿弯菌门则由3.89%(CK组)下降至1.83%(H组),直至反应结束再次降低至0.81%(H组)。对于其他关键微生物菌群中的互养菌门(Synergistetes)、热袍菌门(Thermotogae)和阴沟单胞菌门(Cloacimonetes)在添加卫可后变化较为明显,前者由启动期的0.42%(H组)大幅提升至结束期的4.32%,增幅约10倍;后两者在高剂量卫可添加下,丰度快速地由未添加消毒剂的0.20%~0.28%(CK组)降低至0,且直至12天后的反应结束期,其丰度依然为0,表明热袍菌门和阴沟单胞菌门会因高剂量卫可的添加而消失。

在属水平,优势菌属主要包括束毛球菌属(*Trichococcus*)、严格梭菌属(*Clostridium_sensu_stricto_1*)、己酸菌属(*Terrisporobacter*)、苏黎世杆菌属(*Turicibacter*)等,其丰度占比分别为12.03%~59.16%、9.20%~22.12%、7.18%~13.06%、2.82%~8.36%。在经厌氧消化后,部分细菌群落在属水平发生了较大变化,束毛球菌属由42.15%~59.26%降至12.02%~30.37%,且厌氧消化反应前后均表现出消毒剂试验组高于CK组;也有一些菌属在加入卫可后相对丰度显著降低并在厌氧消化结束后甚至被杀灭,其中吉斯伯格菌属(*Giesbergeria*)和*Lentimicrobium*属的丰度就与卫可表现出明显的剂量关系,H组较CK组短时间内两菌属丰度明显减少,分别在启动期由2.309%降至0.003%和由0.105%降至0.002%,且厌氧消化结束后均被杀灭(相对丰度为0)。此外,也存在部分菌属丰度显著增加的现象,如消化链球菌属(*Peptostrepto-*

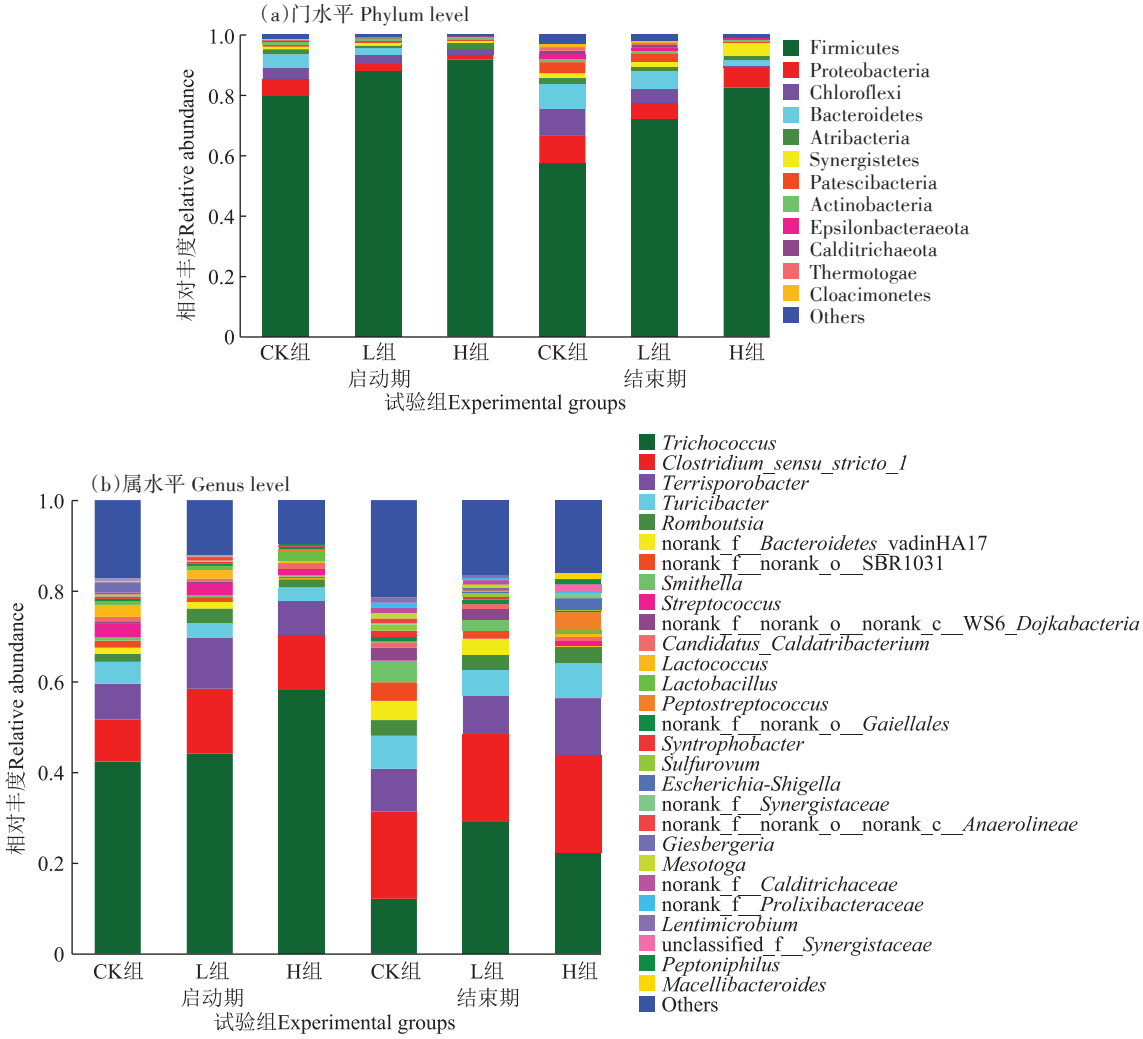


图4 卫可消毒剂添加下发酵细菌群落变化

Figure 4 Fermentation bacterial community changes under Virkon™ disinfectant additions

coccus）在厌氧消化开始时由0.003%（CK组）快速增至0.385%（H组），增幅约128倍，在厌氧消化结束后H组继续增至4.007%，增幅约10倍；埃希氏-志贺菌属（*Escherichia-Shigella*）在厌氧消化开始时由0.070%（CK组）降至0.002%（H组），厌氧消化结束后H组大幅增至2.542%，增幅达1 270倍；*Macellibacteroides*在厌氧消化开始时由0.013%（CK组）降至0.001%（H组），厌氧消化结束后H组大幅增至1.445%，增幅达1 444倍。

2.3.4 微生物与厌氧消化理化指标的相关关系

在门水平，选择丰度前20的菌群，分析其与厌氧消化理化指标之间的相关性，结果见图5。除了厚壁菌门和梭杆菌门（Fusobacteria）与COD和TP降解呈极显著正相关外，其余大部分菌门（绿弯菌门、阴沟单胞菌门等）都与COD和TP降解呈显著负相关[25]。通过结合图4指出阴沟单胞菌门在添加卫可后其相对丰度增幅约10倍的现象也进一步佐证了TP异常上升的原因。而在NH_3-N和TN的转化和降解方面，变形菌门、互养菌门、Epsilonbacteraeota门、梭杆菌门等与之呈正相关，绿弯菌门与TN降解呈显著负相关，其余菌门均不能显著影响NH_3-N和TN。

3 讨论

通过围绕不同剂量卫可对猪场粪污厌氧消化影响的研究发现：CK组初始阶段会快速产气，无明显的迟滞期，表明接种物具有较高的活性且对猪粪和厌氧环境条件具有良好的适应性；虽然接种物经过良好的驯化，具有了较高的生物活性，但厌氧消化系统中卫可的存在仍会影响CH_4的产生，且表现出明显的剂量关系，结合图2可知，相较CK组，L组和H组会抑制产

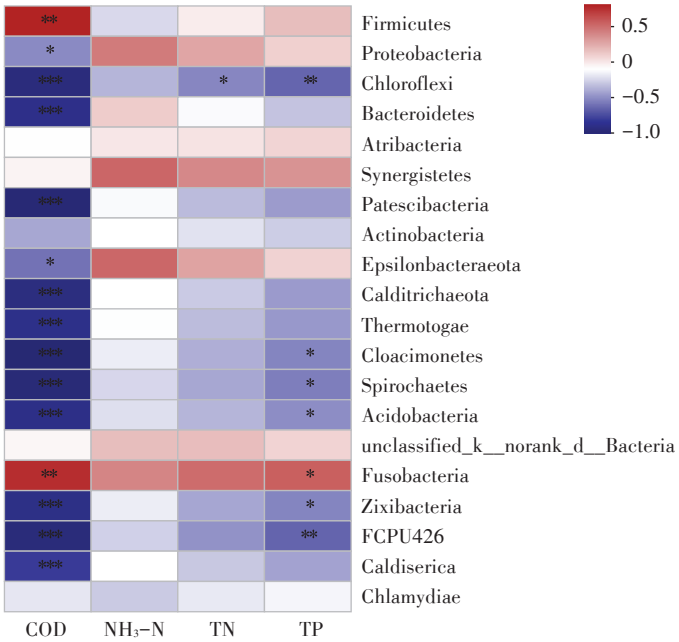


图5 主要微生物菌群与关键理化指标之间的相关性分析

Figure 5 Correlation analysis between main microbial flora and key physicochemical indexes

CH_4，且H组表现出显著差异，而在产气周期上，H组相对于CK组也缩短90%，可见，0.5%卫可会明显抑制产气量且极大缩短产气时间。究其原因为过硫酸氢钾作为卫可的主要成分具有强氧化性，这与国内外学者关于其他氧化型消毒剂的研究结果相似，如Eunseok等[26]指出500、1 500 mg·L^{-1}和3 000 mg·L^{-1} NaClO使厌氧条件下CH_4产率分别下降13%、24%和60%，Yang等[27]也强调0.03 g·g^{-1}和0.24 g·g^{-1}过硫酸氢钾会导致CH_4产量下降约33%和89%，同时毕培等[28]也表明过硫酸钾会通过抑制产甲烷菌活性而使CH_4产量下降。此外，结合CH_4产率（图2）与COD、TP、NH_3-N、TN、pH等常规理化指标（图3）的变化发现，在刚加卫可的第0天，对于COD，L组和H组较CK组分别高出16.48%和148.77%，对于TP，分别高出214.11%和498.12%；H组NH_3-N和TN浓度分别较CK组高出64.79%和68.77%，同时L组和H组的pH分别较CK组下降1.45（P<0.001）和0.99（P<0.001），据此推测卫可的添加很有可能会导致厌氧消化系统发生快速的水解酸化，使之发酵产生的有机物浓度高于微生物自身的代谢利用能力，从而导致酸化产物积累，而COD、氮、磷的异常升高则很有可能是由卫可的主要成分过硫酸氢钾对微生物细胞的破坏和溶解所造成[26]；直至整个厌氧消化反应结束期（第12天），COD不降反升，且大幅促进TP、NH_3-N和TN释放的异常现象不仅没有恢复，反而加剧恶化，说明其反应体系中的厌氧微生物活性可能受到卫可的明显抑制甚至失活，而Peter等[29]和王旭东等[30]关于NaClO和柠檬酸消毒剂对微生物的影响机制可以较好地证明该推测。由此进一步表明，卫可对猪场粪污发酵系统的抑制作用是快速且持久的，其中pH值降低除了受过硫酸氢钾自身显酸性影响外，更与挥发性脂肪酸的积累密切相关[31]。

此外，通过分析发酵过程中微生物群落功能多样性，可科学评估微生物群落状态与功能变化，进而揭示微生物的生态特征及影响发酵效能的生物因素[10,32]。由表1可知，在不同阶段的厌氧发酵期，卫可均表现出对厌氧系统中微生物多样性的不利影响，在启动期，呈现出抑制微生物多样性（Shannon和Simpson指数）和物种丰度（Ace和Chao指数），且H组具有显著抑制性（P<0.05）；随着发酵时间延长，就Shannon指数而言，L组由启动期的（2.802±0.165）增加至结束期的（3.513±0.145），相应地H组由（2.26±0.08）增至（3.19±0.27），由此表明，试验结束期较启动期增加了微生物菌群多样性和物种丰度。其原因可能在于厌氧发酵初期，卫可对微生物生长有抑制作用，导致微生物群落多样性降低，随着发酵时间的延长，卫可诱导产生了具有显著优势度的抗药性菌群，使得微生物菌群多样性和物种丰度增高[27,31]。同时结合图2a亦可进一步证明，L组在添加卫可的前4 d，其产气率均低于CK组，但第5天后卫可对微生物的抑制作用减弱，进而出现了其产率与CK组接近的现象。

结合图4分析可知，在厌氧消化反应前后，添加卫可的试验组均表现出厚壁菌门相对丰度随着反应时间延长而降低，而变形菌门相对丰度则与之相反。其原因可能是由于厌氧过程使系统有机物浓度降低，使得可供厚壁菌门吸收利用的物质减少，从而导致其丰度减小[33]；对于变形菌门，正如Hyun等[34]研究指出其可能是一类兼性或专性厌氧细菌或寡营养菌，其在厌氧环境或有机物质浓度较少的环境下更易存活。对于这两类优势菌门，添加卫可后，无论是启动期，还是结束期，厚壁菌门丰度均随消毒剂剂量增加而增大，变形菌门丰度大体呈现随卫可剂量增加而减小，这表明添加卫可会促进原料（猪粪）或者污泥（微生物）的水解或者裂解，导致厌氧系统中可利用的有机物浓度增高，而结合COD等理化指标不降反升（图3）和厚壁菌门与COD降解呈极显著正相关（图5）的现象也可进一步佐证这一可能性[2,26,35]。

4 结论

（1）卫可消毒剂在猪场粪污厌氧消化系统中的质量浓度为0.05%和0.5%时，均会导致猪粪污厌氧消化系统的功能不同程度受损，并表现为：抑制厌氧产CH_4效能，对COD、TP、NH_3-N、TN和pH值5个理化指标具有显著性影响（$P<0.01$），并伴随COD不降反升、大幅促进氮磷释放等异常现象，且该作用是快速、持久的。

（2）高通量测序发现，卫可会导致厌氧系统中细菌群落组成、多样性和丰度发生显著性变化，其中，Shannon指数均表现为L组和H组低于CK组（$P<0.05$），Simpson指数则与之相反，表现为CK<L<H（$P>0.05$）；优势菌门中的厚壁菌门丰度随卫可剂量增加而增大，变形菌门、绿弯菌门和拟杆菌门则与之相反；另外，阴沟单胞菌门会因0.5%卫可而消失。

（3）在丰度前20的菌门中，厚壁菌门和梭杆菌门与COD降解呈极显著正相关，变形菌门、Epsilonbacteraeota、互养菌门、梭杆菌门等与NH_3-N和TN降解呈正相关，同时绿弯菌门与TN降解呈显著负相关。

参考文献：

[1] JUSZKIEWICZ M, WALCZAK M, WOZNIAKOWSKI G. Characteristics of selected active substances used in disinfectants and their virucidal activity against ASFV[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2019, 63(1):17-25.

[2] HUA W, YUNONG T, TAMER S, et al. Evaluating the effects of the preoxidation of H_2O_2, NaClO, and $KMnO_4$ and reflocculation on the dewaterability of sewage sludge[J]. *Chemosphere*, 2019, 234:942-952.

[3] 练植婵, 杨亦文, 邱锦麟, 等. 戊二醛消毒剂对猪场废水处理系统运行的影响[J]. 养猪, 2019, 3:85-88. LIAN Z C, YANG Y W, QIU J L, et al. Effect of glutaraldehyde disinfectant on the operation of pig farm wastewater treatment system[J]. *Swine Production*, 2019, 3:85-88.

[4] 吴园园. 残留消杀剂对厌氧发酵产沼的影响研究[D]. 南宁：广西大学, 2021:22-24. WU Y Y. Study on the effect of residual disinfentant on methane production byanaerobic fermentation[D]. Nanning: Guangxi University, 2021:22-24.

[5] 张京景, 苏有勇, 李昊, 等. 消毒剂对沼气发酵影响的实验研究[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(3):78-80. ZHANG J J, SU Y Y, LI H, et al. Experimental study on the effect of disinfectants on biogas fermentation[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2011, 28(3):78-80.

[6] SHEHATA E, CHENG D M, MA Q Q, et al. Microbial community dynamics during composting of animal manures contaminated with arsenic, copper, and oxytetracycline[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2021, 20(6):1649-1659.

[7] FU C X, DING H J, ZHANG Q Q, et al. Comparative analysis of antibiotic resistance genes on a pig farm and its neighboring fish ponds in a lakeside district[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 303:119180.

[8] LIU Y W, CHENG D M, XUE J M, et al. Changes in microbial community structure during pig manure composting and its relationship to the fate of antibiotics and antibiotic resistance genes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 389:122082.

[9] JON D, SHANNON B H, KENT M. Eskridge, et al. Swine slurry characteristics as affected by selected additives and disinfectants[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 260:114058.

[10] GAVILANES J, NOORI M T, MIN B. Enhancing bio-alcohol production from volatile fatty acids by suppressing methanogenic activity in single chamber microbial electrosynthesis cells (SCMECs)[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2019, 7:100292.

[11] DUERSCHNER J, BARTELT-HUNT S, ESKRIDGE K M, et al. Swine slurry characteristics as affected by selected additives and disinfectants[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 260:114058.

[12] ZHOU H, XU G. Integrated effects of temperature and COD/N on an up-flow anaerobic filter-biological aerated filter: Performance, biofilm characteristics and microbial community[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 293:122004.

[13] 农业农村部关于印发《非洲猪瘟疫情应急实施方案（第五版）》的通知[EB/OL]. (2021-05-06)[2022-06-15]. https://zycpzs.mofcom.gov.cn/html/gongzuotongzhi/2021/5/1620440957467.html. Circular of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs on the issuance of the Emergency Implementation Plan for African Swine Fever epidemic (fifth Edition)[EB/OL]. (2021-05-06)[2022-06-15]. https://zycpzs.mofcom.gov.cn/html/gongzuotongzhi/2021/5/1620440957467.html.

[14] 农业农村部兽医局和中国动物疫病预防控制中心共同翻译制作了联合国粮农组织（FAO）手册《非洲猪瘟-发现与诊断》中文版[EB/OL]. (2018-09-06)[2022-06-21]. http://www.nahs.org.cn/zt_10027/fzzwfk/kpzs/201903/t20190313_338872.htm. The Veterinary Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs and the China Center for Animal Disease Control and Prevention have jointly translated and produced the Chinese version of the Food and Agriculture Organization (FAO) manual African Swine Fever: Detection and Diagnosis[EB/OL]. (2018-09-06)[2022-06-21]. http://www.nahs.org.cn/zt_10027/fzzwfk/kpzs/201903/t20190313_338872.htm.

[15] 夏嵩, 付嘉琦, 付尹宣, 等. 三种湿地植物厌氧发酵产甲烷特性及产物稳定性研究[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(9):2061-2066. XIA S, FU J Q, FU Y X, et al. Methanogenesis and digestate stability of three wetland plants treated by anaerobic digestion[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(9):2061-2066.

[16] ALOUN Manosane, 杨朝晖, 徐锐, 等. 猪粪与污泥不同配比对其厌氧共消化与微生物多样性的影响[J]. 环境工程学报, 2017, 11(11):6014-6021. ALOUN M, YANG Z H, XU R, et al. Impacts of different mix ratio of pig manure and dewatered sludge on anaerobic digestion performance and microbial community diversity[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(11):6014- 6021.

[17] XU N, TAN G, WANG H, et al. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2016, 74:1-8.

[18] BENAY A, DANIEL L, KYLE B. Glutaraldehyde inhibits biological

treatment of organic additives in hydraulic fracturing produced water [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 666:1161-1168.

[19] DANG C Y, WANG J W, HE Y F, et al. Rare biosphere regulates the planktonic and sedimentary bacteria by disparate ecological processes in a large source water reservoir[J]. *Water Research*, 2022, 216: 118296.

[20] 杜连柱, 梁军锋, 杨鹏, 等. 猪粪固体含量对厌氧消化产气性能影响及动力学分析[J]. 农业工程学报, 2014, 30(24):246-251. DU L Z, LIANG J F, YANG P, et al. Influence of total solid content on anaerobic digestion of swine manure and kinetic analysis[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2014, 30(24):246-251.

[21] YI M L, ZHANG L L, LI YANG, et al. Structural, metabolic, and functional characteristics of soil microbial communities in response to benzo[a]pyrene stress[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 431: 128632.

[22] 黄潇. 多级 AO-深床滤池工艺深度处理城市污水效能及微生物特征[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2019:142-143. HUANG X. Multistage A/O combined with deep bed filter process treating municipal wastewater: performance and microbial characteristics[D]. Haerbin: Harbin Institute of Technology, 2019:142-143.

[23] 闫冰, 夏嵩, 桂双林, 等. 厌氧氨氧化菌富集培养过程微生物群落结构及多样性[J]. 环境科学, 2020, 41(12):5535-5543. YAN B, XIA S, GUI S L, et al. Microbial community structure and diversity during the enrichment of anaerobic ammonium oxidation bacteria[J]. *Environmental Science*, 2020, 41(12):5535-5543.

[24] 朱文博, 张秋萍, 许继飞, 等. 牛粪原料浓度对厌氧消化削减四环素类抗性基因的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(8):1808-1817. ZHU W B, ZHANG Q P, XU J F, et al. Role of substrate concentrations in the removal of tetracycline resistance genes in anaerobic digestion of dairy manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(8):1808-1817.

[25] 代媛. 餐厨垃圾沼气发酵接种物驯化过程中水解酶活和微生物群落的变化研究[D]. 昆明:云南师范大学, 2017:55-62. DAI Y. The variation of hydrolase activity and microbial community during acclimation process of inoculum used as biogas fermentation of food waste [D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2017:55-62.

[26] EUNSEOK L, PRANGYA R R, CHUNGHEON S, et al. Effects of sodium hypochlorite concentration on the methanogenic activity in an anaerobic fluidized membrane bioreactor[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 678:85-93.

[27] YANG J N, LIU X R, WANG D B, et al. Mechanisms of peroxymonosulfate pretreatment enhancing production of short-chain fatty acids from waste activated sludge[J]. *Water Research*, 2019, 148:239-249.

[28] 毕培, 宋秀兰, 刘美琴, 等. 过硫酸钾对剩余污泥厌氧发酵过程的影响[J]. 工业水处理, 2018, 38(10):58-62. BI P, SONG X L, LIU M Q, et al. Influences of $K_2S_2O_8$ on the process of excess sludge anaerobic fermentation[J]. *Industrial Water Treatment*, 2018, 38(10):58-62.

[29] PETER W K, LAURA J L, ANGELIQUE C E, et al. Chemical disinfection of high-consequence transboundary animal disease viruses on nonporous surfaces[J]. *Biologicals*, 2011, 39:231-235.

[30] 王旭东, 高淼, 王莹莹, 等. 在线 NaClO 反洗对倒置 A^2/O-MBR 系统微生物群落的影响[J]. 环境科学, 2019, 40(7):3208-3215. WANG X D, GAO M, WANG Y Y, et al. Effect of on-line NaClO backwashing on microbial communities in an inverted A^2/O-MBR system[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(7):3208-3215.

[31] 穆兰. 城市源有机固体废弃物厌氧消化特性及强化策略研究[D]. 大连:大连理工大学, 2021:51-53. MU L. Anaerobic digestion of municipal organic solid waste: performance and enhancement strategies[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2021:51-53.

[32] 张敏, 张俊, 钱金秋, 等. 磺胺二甲嘧啶对沼气发酵过程中酶活性和微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2017, 33(7):653-659. ZHANG M, ZHANG J, QIAN J Q, et al. Effects of sulfamethazine on enzyme activities and microbial community functional diversity during biogas fermentation[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2017, 33(7):653-659.

[33] WANG R, CHEN M X, FENG F, et al. Effects of chlortetracycline and copper on tetracyclines and copper resistance genes and microbial community during swine manure anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 238:57-69.

[34] HYUN M J, HYUN K J, JEONG H H, et al. Bacterial and methanogenic archaeal communities during the single-stage anaerobic digestion of high strength food wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 165(8):174-182.

[35] CAI W, LIU J, ZHANG X, et al. Generation of dissolved organic matter and byproducts from activated sludge during contact with sodium hypochlorite and its implications to on-line chemical cleaning in MBR[J]. *Water Research*, 2016, 104:44-52.