

研究报告

一株水生产碱杆菌(*Alcaligenes aquatilis*)的分离鉴定及其氨氧化效果

王梓宇¹, 王佳丽¹, 唐德富¹, 孙旭春², 韩向敏¹, 孙丽坤^{*1}

1 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070

2 临夏回族自治州畜牧技术推广站, 甘肃 临夏 731100

王梓宇, 王佳丽, 唐德富, 孙旭春, 韩向敏, 孙丽坤. 一株水生产碱杆菌(*Alcaligenes aquatilis*)的分离鉴定及其氨氧化效果[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2002-2016.

WANG Ziyu, WANG Jiali, TANG Defu, SUN Xuchun, HAN Xiangmin, SUN Likun. Isolation, identification, and deamination characterization of a strain of *Alcaligenes aquatilis*[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2002-2016.

摘要:【背景】随着畜牧业的高速发展, 资源化利用畜禽粪便并减少其所造成的污染是一项艰巨的任务。好氧堆肥作为一种有效利用畜禽粪便污染的途径而成为重点研究方向。【目的】通过筛选具有高效氮转化能力的微生物, 用于减少好氧堆肥中氮素损失, 从而提高肥力、减少污染。【方法】通过对牛粪中异养硝化细菌的分离鉴定及对氨氧化能力的研究得到氨氧化能力较强的菌株 NS-1。在不同工艺参数下培养菌株 NS-1, 进一步研究其氨氧化能力。【结果】通过形态学鉴定及 16S rRNA 基因序列鉴定, 最终确定菌株 NS-1 为水生产碱杆菌(*Alcaligenes aquatilis*)。试验结果表明当碳源为丁二酸钠、C/N 为 15、温度为 35 °C、pH 7.0 时菌株 NS-1 的氨氧化能力有大幅度提升。菌株 NS-1 在 32 h 内将 1 230.694 7 mg/L 的氨氮完全去除, 去除率达到了 100%, 去除速率高达 38.46 mg/(L·h)。【结论】菌株 NS-1 优良的氨氧化能力对于减少堆肥过程中的氮素流失有重要意义, 可为生产优质生物有机肥提供微生物材料和技术支持。

关键词: 硝化细菌; 氮素转化; 异养硝化; 水生产碱杆菌

资助项目: 国家自然科学基金(32160756); 甘肃农业大学“伏羲杰出人才培养计划”(GAUfx-04J03); 甘肃省科技计划重大项目(21ZD4NA012)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160756), the “Fuxi Outstanding Talent Cultivation Plan” of Gansu Agricultural University (GAUfx-04J03), and the Major Program of the Science and Technology Research Plan of Gansu Province (21ZD4NA012).

*Corresponding author. E-mail: sunlk_baby@126.com

Received: 2022-06-28; Accepted: 2022-11-18; Published online: 2023-02-07

Isolation, identification, and deamination characterization of a strain of *Alcaligenes aquatilis*

WANG Ziyu¹, WANG Jiali¹, TANG Defu¹, SUN Xuchun², HAN Xiangmin¹, SUN Likun^{*1}

1 College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 Animal Husbandry Technology Extension Station of Linxia Hui Autonomous Prefecture, Linxia 731100, Gansu, China

Abstract: [Background] With the rapid development of animal husbandry, it becomes a challenging task to utilize animal manure and reduce the pollution caused by it. Aerobic composting, as an effective way to utilize manure, has become the focus of research. [Objective] By screening microorganisms with efficient nitrogen conversion capabilities for use in reducing nitrogen losses in aerobic composting, thus improving fertility and reducing pollution. [Methods] We isolated and identified the strain NS-1 with strong ammonia-oxidizing capacity from the heterotrophic nitrifying bacteria in cow dung. Furthermore, we cultured the strain NS-1 under different conditions to investigate its ammonia-oxidizing capacity. [Results] The strain NS-1 was identified as *Alcaligenes aquatilis* based on morphological characteristics and 16S rRNA sequence. When being cultured in the medium with sodium succinate as the carbon source, the C/N ratio of 15, and pH 7.0 at 35 °C, strain NS-1 demonstrated significantly improved ammonia-oxidizing capacity. The validation experiment showed that strain NS-1 completely removed 1 230.694 7 mg/L ammonia nitrogen within 32 h, with the removal efficiency of 100% and the removal rate of 38.46 mg/(L·h). [Conclusion] The strain NS-1 with excellent ammonia-oxidizing capacity is of great significance for reducing nitrogen loss in the composting process. This study provides microbial materials and technical support for the production of high-quality bio-organic fertilizer.

Keywords: nitrifying bacteria; nitrogen transformation; heterotrophic nitrification; *Alcaligenes aquatilis*

畜牧业是我国农民最大的经济来源, 给农民带来了丰厚的经济效益, 同时畜牧业也为人们的生活提供了动物源性食品, 保证人民饮食结构合理化。畜牧业在农业结构中起着非常重要的作用, 是农业产业的基础和支柱。近十几年来, 我国的畜牧业发展已取得良好的成绩, 但是相对应的诸多问题也逐渐显现了出来。尤其是污染问题, 破坏了空气、土壤和地下水等环境, 影响了群众的生活和健康。2015年《中国环境年鉴》数据显示, 我国畜禽养殖业污染

物排放量中化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)、氨氮、总氮、总磷排放量占农业污染排放总量的比例分别达 95.17%、76.82%、63.36%、76.97%^[1], 粪便中的氨、亚硝酸盐、硝酸盐等含氮污染物的过量排放造成严重的水污染和富营养化, 进一步破坏生态平衡, 甚至严重威胁人们的健康^[2], 畜禽养殖污染已成为农业污染的最主要来源之一。如果不采取措施, 畜禽污染问题将会加剧恶化。畜禽粪污也是资源, 不合理利用是污染, 合理利用

就是资源。因此要充分认识畜禽养殖废弃物资源化处理的意义^[3]。

根据农业农村部规定,目前我国要加强农业废弃物的资源化利用,畜禽粪便必须经过无害化处理后还田。好氧堆肥是将畜禽粪便无害化、资源化利用为有机肥的重要处理方法^[4]。好氧堆肥技术的应用,需要在好氧环境下对畜禽粪便中的有机物进行微生物降解和转化,从而杀灭畜禽粪便中的病原体,并在此基础上分解畜禽粪便中的有毒物质和有害气体。好氧微生物是好氧堆肥技术的重要基础。在氧化还原过程中,畜禽粪便中的有机氧化物被分解,有机氧化物转化为无机物。这一过程为好氧微生物提供了发展条件。在畜禽粪便处理中科学应用好氧堆肥技术,可以有效发挥畜禽粪便的积极作用,借助好氧堆肥技术促进畜禽粪便向资源化利用方向发展,从而缓解畜禽粪便处理不合理造成的环境污染,进而提高畜禽粪便的应用价值和效果。

经过长期的研究发现,在堆肥过程中加入相应的外源微生物可以缩短发酵周期,保持养分,加快肥料腐熟^[5-6]。在对外源微生物的研究中,对异养硝化细菌的研究相对热门。近年来,越来越多分离的异养硝化细菌被报道,如假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[7]、芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[8]、脱氮副球菌属(*Paracoccus*)^[9]等。然而大部分对异养硝化细菌的研究主要是针对污泥和废水的处理,对其氨氧化特性的研究目前还有一定的空缺。污水处理中的生物脱氮过程通常包括硝化和反硝化两种不同的微生物活动^[2]。一般情况下在污泥和废水中分离的异养硝化菌株在具有氨氧化作用的同时兼具很强的异养反硝化作用;异养反硝化作用是利用异养反硝化细菌中厌氧反硝化将 NO_3^- -N或 NO_2^- -N生成 N_2 的过程。在这个过程中,污泥和废水完

成了脱氮的过程,而在堆肥过程中,为了保留堆体的养分、提高堆肥质量,需要降低 NH_3 排放,以此达到保氮的目的;在堆肥中添加氨氧化的异养硝化菌株会导致发生 NH_4^+ 或 NH_3 被氧化为 NO_2^- 至 NO_3^- 的一系列生化反应^[10]。通过氨氧化作用将铵态氮向硝态氮的转化过程中, NH_3 被氨单加氧酶氧化成 NH_2OH , NH_2OH 再被羟胺氧化还原酶氧化成 NO_2^- ,最后被亚硝酸氧化酶氧化成 NO_3^- ,降低堆肥中 NH_4^+ 的浓度,减少 NH_3 的挥发,在达到保氮目的同时也降低了对环境的污染^[11]。本试验从牛粪中筛选异养硝化细菌,并测定其脱氮能力,研究影响其氨氧化能力的几种条件,最终确定有利于菌株氨氧化速率的最优工艺参数,期望用于好氧堆肥保氮微生物调控。

鉴于筛选并利用氨氧化能力强的异养硝化细菌对改良好氧堆肥技术非常必要,因此,本研究的主要目的是筛选出氨氧化能力较强的异养硝化细菌并对其氨氧化能力进行优化,期望在之后的好氧堆肥实验中得到运用,以解决畜禽粪便好氧堆肥过程中氮素损失的问题。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集

新鲜牛粪样品来自甘肃省临夏回族自治州广河县三甲集镇新庄坪牛羊养殖农民专业合作社,采用五点法收集,将所采集的新鲜牛粪样品装入无菌采样袋,放入装有冰袋的泡沫盒中带回实验室,置于4℃冰箱保存,24h之内进行富集驯化。

1.2 培养基

LB培养基(g/L):酵母提取物 5.00,胰蛋白胨 10.00,氯化钠 10.00,固体培养基添加 15.00 g/L 琼脂粉;富集驯化培养基(g/L):硫酸铵 2.00,丁二酸钠 14.31,维氏盐溶液 50.00 mL,

pH 7.0; 分离培养基(g/L): 琼脂粉 18.00, 其他同富集驯化培养基; 筛选培养基(g/L): 硫酸铵 1.00, 丁二酸钠 7.16, 其他同驯化培养基; 维氏盐溶液(g/L): 磷酸氢二钾 5.00, 七水合硫酸镁 2.5, 氯化钠 2.50, 七水合硫酸亚铁 0.05, 硫酸锰 0.05^[12]。

1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。台式恒温振荡器、恒温培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司; 紫外可见分光光度计, 苏州安原仪器有限公司。

1.4 菌株的分离筛选及鉴定

1.4.1 细菌的分离筛选

1) 富集驯化

称取适量新鲜牛粪样品接入富集驯化培养基中, 37 °C、180 r/min 恒温培养 2-4 d 后, 取 10% 的富集液加入新的富集驯化培养基中 37 °C、180 r/min 恒温培养, 如此重复 4 次后, 取最后一次富集液。

2) 分离纯化

将最后一次富集得到的富集液进行稀释, 设置 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} g/mL 这 3 个梯度。各吸取 0.2 mL 稀释液分别涂布于分离培养基平板, 将涂好的平板放入培养箱中 37 °C 培养 12 h。观察菌落的长势, 选择合适的梯度挑取平板上的单菌落, 用平板划线法对其进行分离纯化, 将纯化后的单菌株接种于 LB 培养基中 4 °C 保存, 用于后续筛选。

1.4.2 菌株氨氧化能力的初筛

将纯化后的菌株接种于筛选培养基, 测定培养基初始的氨氮浓度后于 37 °C、180 r/min 恒温培养 24 h, 4 °C、5 500 r/min 离心 5 min 后取上清液测定氨氮浓度, 通过对比选取氨氮浓度低的菌株斜面保存备用。

1.4.3 菌株的鉴定

1) 形态学观察

将菌株进行平板划线, 观察其菌落特征, 对菌株进行革兰氏染色。在纯化后的平板上挑选长势优良的单个菌落, 将其连同周围培养基一起挑下来放入装有电镜固定液(戊二醛、磷酸盐、去离子水, pH 7.4)的离心管中, 在室温下固定 2 h, 将装有菌株的离心管放入冰盒中固定好送往武汉赛维尔生物科技有限公司做扫描电镜。在得到扫描电镜照片后观察其形态。

2) 分子生物学鉴定

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 NS-1 的全基因组 DNA, 利用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAT-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times PCR Taq Master Mix 12.5 μ L, 细菌 DNA (35 ng/ μ L) 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, ddH₂O 9.9 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至兰州天启基因生物科技有限公司测序, 测序结果通过 NCBI 数据库中的 BLAST 进行比对, 使用 MEGA 7.0.14 软件构建系统发育树, 初步鉴定其种属。

1.5 不同工艺参数对菌株脱氨特性的影响

1.5.1 不同碳源的影响

将低温保存的细菌 NS-1 接种至 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 恒温摇床活化培养 24 h, 再将活化后的菌液以 1% 的接种量分别接种于以葡萄糖、乙酸钠、柠檬酸钠、蔗糖、丁二酸钠为碳源的 5 种不同筛选培养基中, 调整 C/N 为 20, pH 7.0, 其余组分保持不变。在

180 r/min, 37 °C的恒温条件下培养 96 h, 每隔 12 h 取 1 mL 菌液至 1.5 mL 离心管中, 4 °C、5 500 r/min 离心 5 min, 取上清液测定 OD_{600} 及 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 浓度, 每次测定做 3 个重复, 除特殊声明外, 后续实验培养条件均与此相同。

1.5.2 不同 C/N 的影响

以丁二酸钠为唯一碳源, 调整 C/N 比分别为 5、10、15、20、25, 调节 pH 7.0, 将活化后的 NS-1 菌液分别接种于 LB 培养基, 37 °C、180 r/min 培养 48 h, 每隔 8 h 取样, 按照 1.5.1 中的方法测定 OD_{600} 及 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 浓度。

1.5.3 不同 pH 的影响

以丁二酸钠为唯一碳源, 调整 C/N 比为 15, 其他组分不变, 利用 NaOH 和 HCl 将培养基的初始 pH 分别调整为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 将活化后的 NS-1 菌液分别接种于这 5 种培养基培养 48 h, 每隔 8 h 取样, 按照 1.5.1 中相同的方法测定 OD_{600} 及 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 浓度。

1.5.4 不同温度的影响

以丁二酸钠为唯一碳源, 调整 C/N 比为 15, pH 7.0, 其他组分不变。将培养温度分别设置为 25、30、35、40、45 °C。将活化后的 NS-1 菌液接种至培养基, 分别放入不同温度的摇床中培养 48 h, 每隔 8 h 取样, 按照 1.5.1 中的方法测定 OD_{600} 及 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 浓度。

1.5.5 最优工艺参数验证实验

使用 1.5.1 中的最适碳源, 将 C/N 比调整至 1.5.2 中的最适值, 其他组分保持不变, 调整 pH 到 1.5.3 中的最适值, 将活化后的 NS-1 菌液接种至调节好的培养基内, 在 1.5.4 中的最适温度下培养 48 h, 每隔 8 h 取样, 按照 1.5.1 中的

方法测定 OD_{600} 及 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 浓度。各时间段氨氮去除速率的计算公式为: 氨氮去除速率[mg/(L·h)]=[初始氨氮浓度(mg/L)-该时间段氨氮浓度(mg/L)]÷时间(h)。

1.5.6 测定方法

参考《水和废水监测分析方法(第 4 版)》^[13] 中的测定方法对各浓度进行测定: 纳氏试剂分光光度法测定 NH_4^+ -N 的浓度; N-(1-萘基)乙二胺光度法测定 NO_2^- -N 的浓度; 紫外分光光度法测定 NO_3^- -N 的浓度。

1.6 数据分析

将得到的数据用 IBM SPSS Statistics 25 进行分析, 采用单因素 ANOVA 程序 Duncan 氏法进行单因素反差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。运用 Origin 8 软件作图, 利用平均值和标准偏差得到菌株的生长曲线和氨氮、亚硝氮、硝氮的浓度变化曲线。

2 结果与分析

2.1 菌株分离筛选及鉴定结果

2.1.1 菌株的形态学特征

牛粪样品经过分离、纯化、培养等步骤后, 筛选出一株高效去除氨氮的菌株 NS-1, 通过观察平板, 菌落的形态呈现出圆形、乳白色、有光泽、不透明、黏稠感、扁平、边缘完整等特征, 菌株革兰氏染色反应呈阴性, 通过扫描电镜可以看出菌体为短杆状, 大小为 $(0.40-0.58) \mu\text{m} \times (1.8-2.4) \mu\text{m}$ (图 1)。初步鉴定菌株 NS-1 为杆菌属。

2.1.2 菌株的分子生物学鉴定

菌株 16S rRNA 基因序列大小为 1 440 bp 左右(图 2)。将所得数据在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对后使用 MEGA 7.0.14 软件的 neighbor-joining 方法构建系统发育树(图 3), 分析结果显示该菌株与水生产碱杆菌(*Alcaligenes*

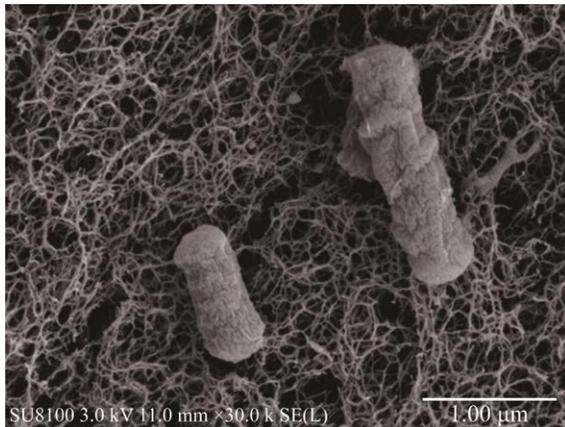


图 1 菌株 NS-1 扫描电镜图

Figure 1 Scanning electron microscope of strain NS-1.

aquatilis)亲缘关系最近, 相似度达 99%以上, 菌株 NS-1 鉴定为水生产碱杆菌。

2.2 不同工艺参数对菌株生长和氨氧化效果的影响

2.2.1 不同碳源的影响

碳是微生物生命活动所需的营养物质和能量来源, 通常我们认为有机碳是异养好氧细菌

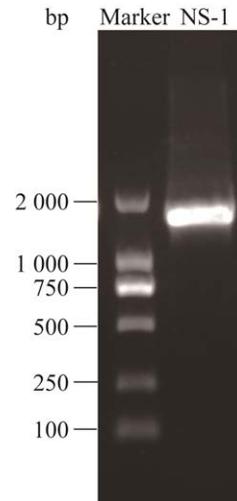


图 2 菌株 NS-1 的电泳图

Figure 2 Electrophoretic diagram of strain NS-1.

的电子受体^[14]。人们在对微生物的研究中发现常见的碳源有糖类、油脂、有机酸和小分子醇等, 由于微生物活动所产生酶系的差异, 不同的微生物可利用的碳源也不同。

如图 4 所示, 水生产碱杆菌 NS-1 对不同碳源的利用存在着明显差异, 当碳源为葡萄糖和

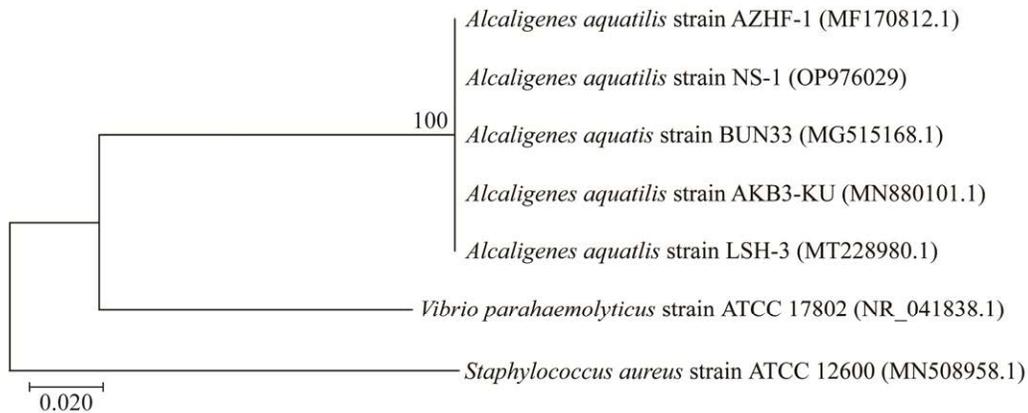


图 3 菌株 NS-1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 发育树节点数值表示 bootstrap 值; 发育树标尺为 0.02, 表示平均每个核苷酸位置有 0.02 个差异; 括号中序号为 GenBank 登录号

Figure 3 Phylogenetic tree of strain NS-1 based on 16S rRNA gene sequences. Numbers at nodes in the phylogenetic tree represent bootstrap percentages; Bar is 0.02, representing 0.02 substitutions per nucleotide position; The numbers in brackets are representative of GenBank accession numbers.

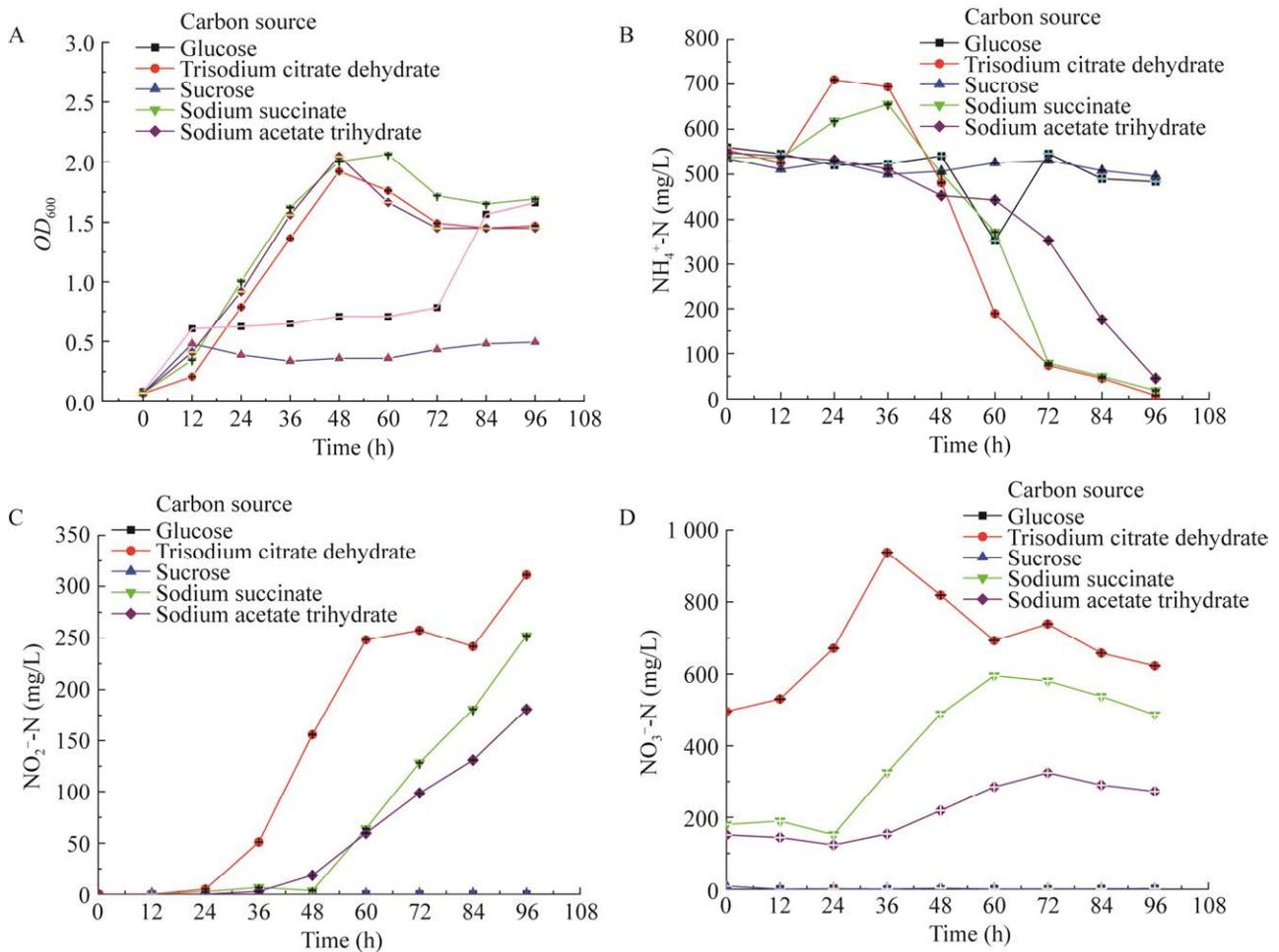


图4 不同碳源影响下 NS-1 在 0-96 h 的生长状况 A: 菌体细胞密度. B: 氨氮浓度的变化. C: 亚硝酸氮浓度变化. D: 硝氮浓度变化

Figure 4 Growth of NS-1 at 0-96 h under the influence of different carbon sources. A: OD_{600} . B: NH_4^+-N . C: $NO_2^- -N$. D: $NO_3^- -N$.

蔗糖时菌体生长迟缓且不能对氨氮进行有效的去除。其中当碳源为丁二酸钠、柠檬酸钠和乙酸钠时菌株 NS-1 的 OD_{600} 均可以达到 1.9 以上, 且氨氮的平均去除速率分别为 5.4、5.7、5.2 $mg/(L \cdot h)$; 去除率分别为 96.6%、98.6%、91.7%, 而且从表 1 可以看出菌株 NS-1 不论在哪个时间段内不同处理间均有明显差异 ($P < 0.05$)。这说明小分子碳源更有利于 NS-1 进行异养硝化(图 4A、4B)。当柠檬酸钠为碳源时, 亚硝氮的浓度由 0 h 的 0 mg/L 上升到 96 h

的 311.09 mg/L (图 4C), 硝氮的浓度由 0 h 的 496.498 5 mg/L 上升至 36 h 的 937.477 0 mg/L , 之后开始下降, 于 96 h 下降至 622.339 4 mg/L (图 4D)。综合各项数据考虑, 菌株 NS-1 在以柠檬酸钠为碳源时, 氨氮去除率在 96 h 时达到了 98.6%, 具有良好的氨氧化能力。

2.2.2 不同 C/N 的影响

不同 C/N 对 *Alcaligenes aquatilis* strain NS-1 的影响如图 5 所示, 在前 16 h, 不同 C/N 的生长速率和氨氮去除率均比较相近, 16 h 后

表1 不同碳源影响下菌株 NS-1 在各时间段的氨氮浓度

Table 1 Ammonia nitrogen concentration of strain NS-1 in different time periods under the influence of different carbon sources (mg/L)

时间 Time (h)	葡萄糖 Glucose	柠檬酸钠 Sodium citrate	蔗糖 Sucrose	丁二酸钠 Succinic acid sodium	乙酸钠 Sodium acetate
0	559.85a	553.89b	534.81e	538.09d	547.78c
12	545.54a	525.12d	511.11e	536.60c	540.03b
24	519.75e	709.68a	527.95d	617.99b	531.53c
36	523.48c	694.17a	499.78e	655.11b	511.55d
48	540.77a	480.84d	506.63b	501.27c	452.67e
60	352.49d	189.40e	525.27a	372.02c	442.68b
72	545.99a	74.02e	530.64b	79.23d	352.94c
84	489.64b	45.39e	507.98a	49.72d	175.39c
96	483.23b	7.53e	495.45a	18.56d	45.39c

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$). 下同

Different lowercase letters mean significant difference, similarly for the following tables ($P<0.05$). The same below.

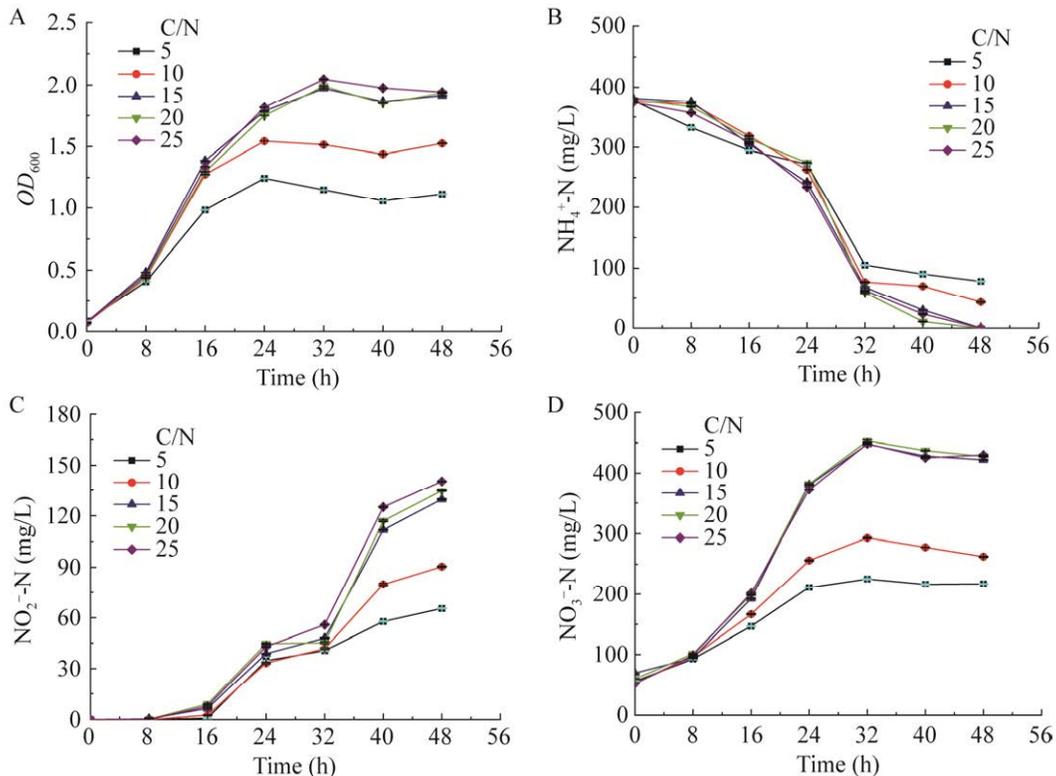


图5 不同 C/N 影响下 NS-1 在 0-48 h 的生长状况
A: 菌体细胞密度. B: 氨氮浓度的变化. C: 亚硝
氮浓度变化. D: 硝氮浓度变化

Figure 5 Growth of NS-1 at 0-48 h under the influence of different C/N. A: OD_{600} . B: NH_4^+-N . C: $NO_2^- -N$. D: $NO_3^- -N$.

菌株 NS-1 在 C/N 为 5 和 10 中生长开始减缓, 在 24 h 后生长停止, 说明培养基中的碳源不足时细菌的生长会受到限制, 从而导致异养硝化效果不完全; 而当 C/N 为 15、20、25 时 OD_{600} 在 16 h 之后继续上升, 最终均达到了 1.9 以上, 对氨氮的去除效果 3 个处理之间相差无几, 均在 48 h 内将氨氮浓度降至 0, 氨氮去除速率分别为 7.95、7.89、7.81 mg/(L·h), 去除率均为 100% (图 5A、5B), 且之间无差异性 ($P>0.05$) (表 2)。从图 5C、5D 可以看出, 高 C/N 比有助于菌株亚硝氮和硝氮的累积。

2.2.3 不同 pH 的影响

图 6A 可以看出, 环境 pH 在 5.0-9.0 这个范围内菌株 NS-1 的生长并未受到很大的影响, 菌株 NS-1 在各 pH 条件下的增长速率相差

表2 不同C/N影响下菌株NS-1在各时间段的氨氮浓度

Table 2 Ammonia nitrogen concentration of strain NS-1 in different periods under different C/N ratios (mg/L)

Time (h)	5	10	15	20	25
0	377.53b	375.89c	381.41a	378.88b	374.70c
8	332.66e	372.61b	375.89a	367.55c	357.11d
16	294.80e	318.50a	305.08d	313.73b	308.51c
24	271.69b	262.45c	241.88d	274.22a	233.97e
32	105.17a	76.99b	68.35c	59.11e	63.13d
40	90.41a	70.14b	30.04c	10.81e	23.33d
48	78.34a	43.60b	0.00c	0.00c	0.00c

并不大,大部分微生物通常都可以在一个较宽的 pH 范围内进行生长^[15]。从表 3 可以看出, NS-1 各处理下氨氮含量差异显著($P<0.05$),从图 6B 可以看出, pH 对于氨氮的转化具有一定影响。当 pH 7.0 时,氨氮在 48 h 时下降至 0.521 8 mg/L,其去除速率为 7.89 mg/(L·h),去除率为 99.9%。其他组在 24 h 的去速速率分别为 5.60、4.12、3.46、3.82 mg/(L·h),去除率分别为 65.5%、53.2%、46.3%、52.3%。由此可以看出,菌株 NS-1 在中性环境下对氨氮的转化能力最大。从图 6C、6D 可以看出菌株 NS-1 在偏酸性环境时亚硝氮浓度升高,硝态氮降

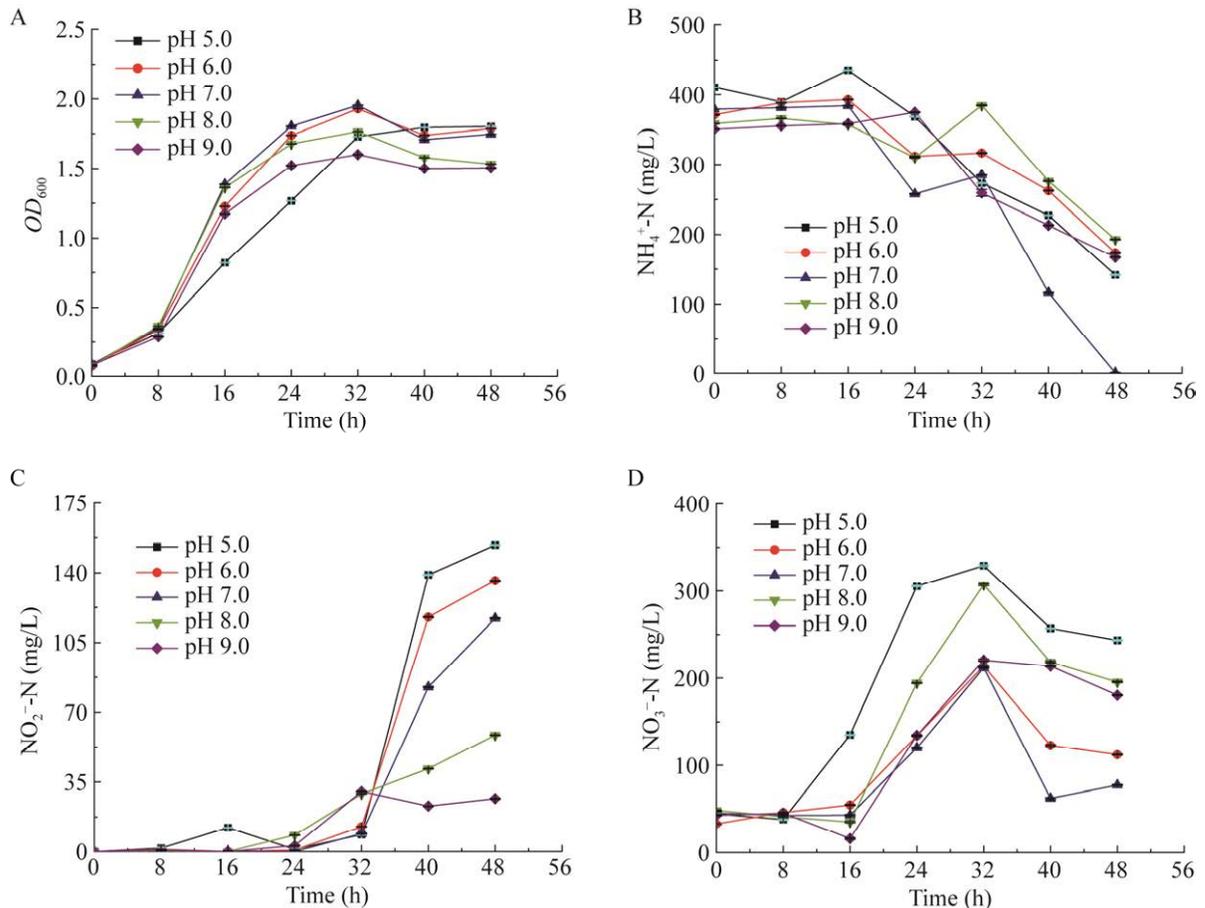


图6 不同pH影响下NS-1在0-48h的生长状况

氨氮浓度变化. C: 亚硝氮浓度变化. D: 硝氮浓度变化

Figure 6 Growth of NS-1 at 0-48 h under the influence of different pH. A: OD_{600} . B: NH_4^+-N . C: $NO_2^- -N$. D: $NO_3^- -N$.

表 3 不同 pH 影响下菌株 NS-1 在各时间段的氨氮浓度

Table 3 Ammonia nitrogen concentration of strain NS-1 in different time periods under different pH (mg/L)

Time (h)	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
0	410.63a	371.27c	379.17b	358.90d	350.70e
8	389.76a	388.42b	381.26c	366.06d	355.62e
16	435.38a	393.04b	384.09c	357.26d	358.60e
24	368.59b	311.94c	257.68e	310.15d	374.70a
32	273.33c	316.71b	285.26c	384.54a	259.32e
40	227.27c	262.45b	116.50e	276.31a	213.10d
48	141.70d	173.60b	0.52e	192.83a	167.19c

低; 在偏碱性环境时, 亚硝氮浓度降低, 硝态氮浓度反而升高。

2.2.4 不同温度的影响

如图 7A 所示, 温度对菌株 NS-1 的生长有很大的影响, 35 °C 时菌株 NS-1 生长状况最好, 45 °C 时 OD_{600} 最低。从图 7B 可以看出, 菌株 NS-1 在 35 °C 时, 氨氮在 48 h 从 379.174 1 mg/L 下降至 0 mg/L, 去除率为 100%, 其余温度下氨氮的转化都受到了影响, 去除率分别为 62.4%、95.2%、99.7%、6.3%; 从图 7C 和图 7D 可以看出, 相较于低温, 高温对亚硝氮和硝氮的转化影响最大。从表 4 可以看出, 温度为 35 °C 和 40 °C 时菌株 NS-1 在 48 h 的生长状况差异不显著 ($P>0.05$)。

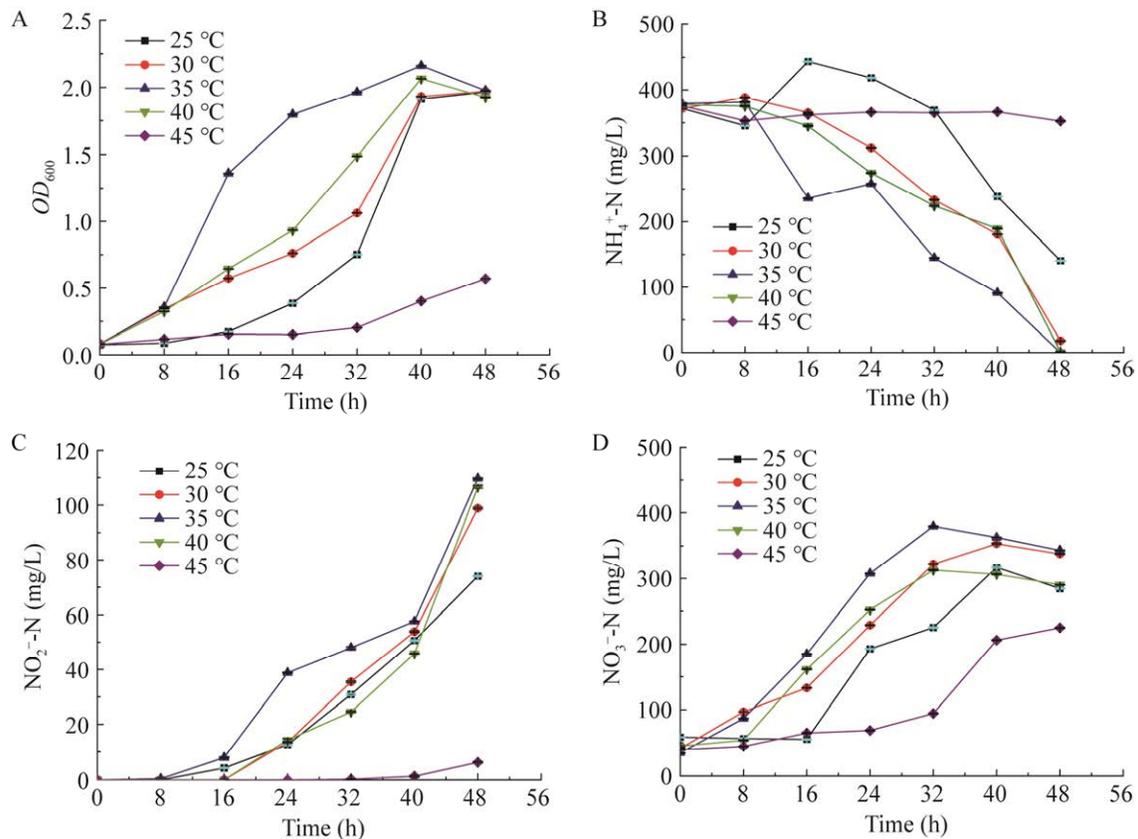


图 7 不同温度影响下 NS-1 在 0-48 h 的生长状况

Figure 7 Growth of NS-1 at 0-48 h under the influence of different temperatures. A: OD_{600} . B: NH_4^+-N . C: $NO_2^- -N$. D: $NO_3^- -N$.

A: 菌体细胞密度. B: 氨氮浓度的变化. C: 亚硝氮浓度变化. D: 硝氮浓度变化

表 4 不同温度影响下菌株 NS-1 在各时间段的氨氮浓度

Table 4 Ammonia nitrogen concentration of strain NS-1 in different time periods was affected by different temperatures (mg/L)

Time (h)	25	30	35	40	45
0	371.72d	371.27d	379.17a	377.39b	375.75c
8	345.33e	388.42a	381.26b	375.15c	352.79d
16	443.57a	365.31b	235.76e	344.89d	362.03c
24	418.53a	311.93c	257.68e	274.22d	365.91b
32	369.04a	233.38c	144.68e	224.14d	365.01b
40	238.30b	180.61d	91.16e	189.25c	366.35a
48	140.50b	17.96c	0.00d	0.97d	352.19a

2.2.5 最优工艺参数验证实验

如图 8 所示, 菌株 NS-1 在各项参数最优的条件下 32 h 内就能将 1 230.694 7 mg/L 的氨氮完全去除, 去除速率达到了 38.46 mg/(L·h), 去除率达到了 100%。氨氧化速率远远大于目前研究的大部分异养硝化细菌。

3 讨论

微生物的生命活动离不开碳源的支持, 不同微生物对碳源的利用程度也各不相同。在本试验中, 当碳源为柠檬酸钠和丁二酸钠时, 菌株 NS-1 无论是去除速率还是去除率都远远高于

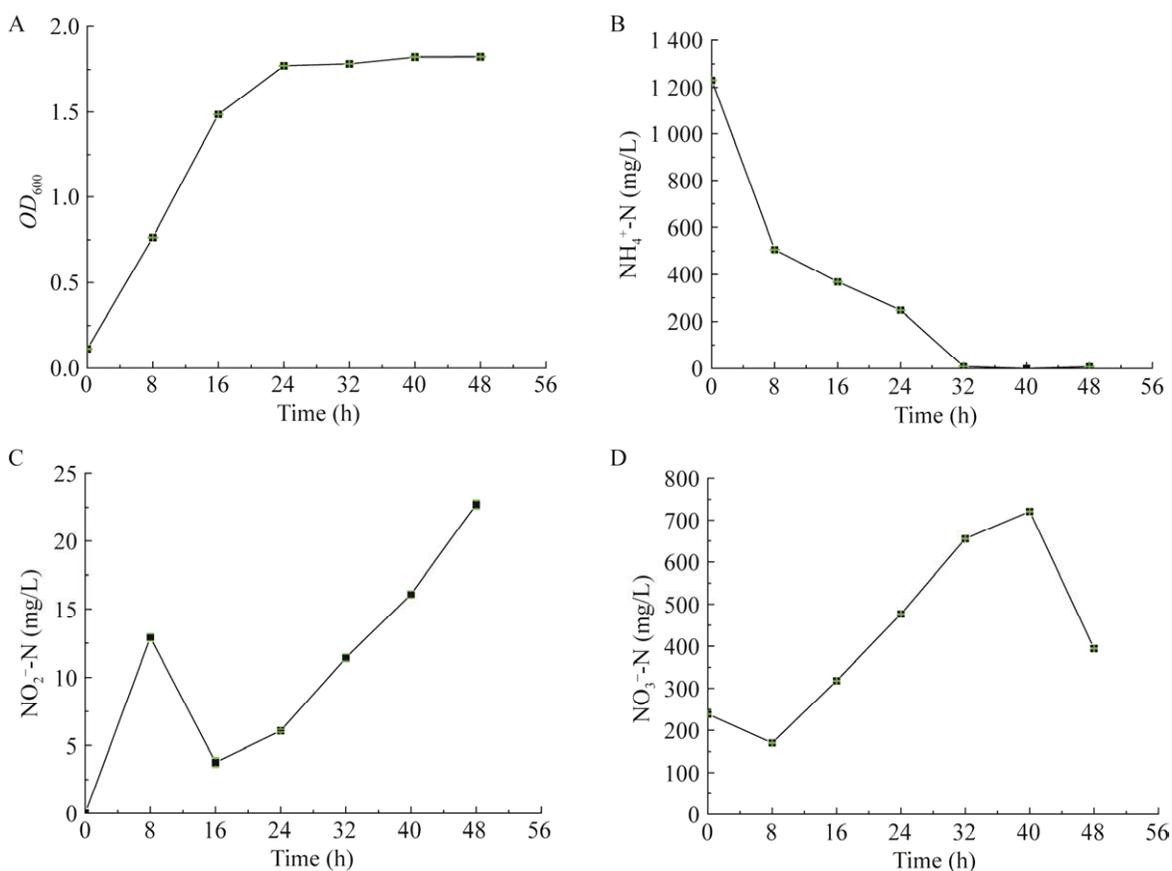


图 8 NS-1 在各项参数最优条件下的生长状况 A: 菌体细胞密度. B: 氨氮浓度的变化. C: 亚硝酸氮浓度变化. D: 硝氮浓度变化

Figure 8 Growth of NS-1 under optimal conditions for all parameters. A: OD_{600} . B: $NH_4^+ - N$. C: $NO_2^- - N$. D: $NO_3^- - N$.

其他碳源, 主要因为它是微生物将复杂有机物(如糖类、蛋白质和脂类)转化为简单小分子有机物时三羧酸循环过程中的中间产物, 能够直接用于生物合成^[16]。然而菌株对乙酸钠的利用率高是因为乙酸钠的分子结构简单, 与微生物优先选用分子量更小的有机物作为碳源的结论^[17]相符。由于目前对于水生产碱杆菌的研究报道极少, 我们参考其他具有氨氧化效果的菌株。例如, Cao 等通过研究发现 *A. aquatilis* AS1 在琥珀酸、乙酸或柠檬酸盐上都能很好地生长, 而葡萄糖或蔗糖则不能支持细胞生长^[18]; 梁贤对菌株 *Pseudomonas aeruginosa* YL 的研究也得到了相同的结果^[19]。菌株 NS-1 在一定条件下还具有还原硝酸盐的功能, 这与大部分异养硝化细菌具有反硝化能力的研究结果一致。除了碳源, 合适的碳氮比也会影响菌株的生长繁殖。异养硝化菌进行氮降解的最适碳氮比通常在 10–15 之间^[20], 如 Kundu 等分离的 *Chryseobacterium* sp. R31^[21]在 C/N 为 10 时脱氮率最高, Yang 等分离的 *Acinetobacter junii* YB^[22]在 C/N 为 15 时降解效果最佳。在异养硝化的过程中, 高 C/N 被普遍认为更有利于反应进行, 但是过高的 C/N 往往又会抑制细菌对氨氮的去除^[23-24]。这与本实验中菌株 NS-1 的表现又有所不同: 当 C/N 为 15 时 NS-1 对氨氮的去除率达到了 100%, 而在 C/N 继续增大时保持稳定不变, 说明过高的 C/N 比并未对 NS-1 的脱氮作用产生影响。在本试验中, 从图 5C、5D 可以看出, 高 C/N 比有助于菌株积累亚硝氮和硝氮, 而这一结论与李丛娜等的研究结果^[25]一致。但是 C/N 比过高会导致资源的浪费, 综合考虑运行效果和经济效益, 确定菌株 NS-1 脱氮的最适宜 C/N 比为 15。

一些环境因素也会或多或少地使得菌株生长受到限制, 其中影响较大的为 pH 和温度。

有研究表明, 产碱杆菌属微生物大多都是中性和耐碱性的微生物^[26]。也有部分异养硝化细菌可以在酸性条件下进行高效异养硝化, 如菌株 *A. faecalis* C16^[27]、*Acinetobacter* sp. JR1 (pH 4.5)^[28]通过对数据的分析, 我们可以看出菌株 NS-1 在弱酸和弱碱性环境下仍然具有一定的脱氮能力, 表明菌株 NS-1 的应用范围更为广泛。综上所述, 当环境 pH 7.0 时菌株的除氮能力最强。温度对异养硝化细菌存在一定的影响, 因为异养硝化过程是由多种酶共同作用的, 温度会对这些酶的活性产生影响^[29], 温度升高造成生物活性物质变性, 细胞功能下降甚至死亡, 最终影响反应效果^[30]。综合比较而言, 菌株 NS-1 的最佳反应温度为 35 °C, 此结果与所报道的大多数异养硝化菌的最佳温度 (30–37 °C)一致^[31-33]。综上所述, 菌株 NS-1 的最适生长温度为 35 °C。

在最终进行的验证实验中菌株 NS-1 显现出了优良的脱氮特性, 该菌株的脱氮效果也优于大部分异养硝化细菌, 如 Cao 等在研究中发现, 当氨氮初始浓度增加到 1 300 mg/L 时, *A. aquatilis* AS1 处理 60 h 后对氨氮的去除率达到了 95.1%^[18]。陈青云等在生活排污渠中分离筛选出的高效异养硝化菌株 *Alcaligenes faecalis* Ni3-1 在 48 h 可脱除 93.2%的氨氮^[34]。余润兰等从湘江生活污水排污口分离纯化的一株菌 *Alcaligenes* sp. S3, 在氨氮浓度为 400 mg/L 时, 经过 192 h 的降解, 氨氮的去除率达到 88%^[35]。黄廷林等从水源水库沉积物中筛选出一株具有较高脱氮效率的异养硝化-好氧反硝化菌 *Delftia* sp. SF9, 在 SND1 和 SND2 培养基中氨氮去除率分别达 81%和 74%^[36]。综上所述, 本研究筛选的菌株 NS-1 的氨氮去除率高于 *A. aquatilis* AS1、*Alcaligenes faecalis* Ni3-1、*Alcaligenes* sp. S3 和 *Delftia* sp. SF9。

上述结果表明, 菌株 NS-1 对碳源、C/N、pH 具有较宽的适应范围, 表明其氨氧化能力在堆肥方面有良好的发展前景, 为更好地应用菌株 NS-1 的高效氨氮转化能力, 我们还应该在实际堆肥中进行氨氧化性能的验证, 对其进行应用适应性的研究。

4 结论

经过富集驯化、分离、纯化、初筛, 从牛粪样品中筛选出一株硝化细菌 NS-1, 通过形态学和分子生物学鉴定初步确定其为水生产碱杆菌(*Alcaligenes aquatilis*), 且最适碳源为丁二酸钠, 异养硝化作用最适工艺参数为 C/N 15、pH 7.0、温度 35 °C。在验证实验中, 菌株 NS-1 在 32 h 内将 1 230.694 7 mg/L 的氨氮完全去除, 去除率达到了 100%, 去除速率为 38.46 mg/(L·h)。

本研究筛选的菌株 NS-1 在培养基中对氨氮去除率最高达 100%, 表现出较好的异养硝化性能, 高于国内外报道的异养硝化能力优异的菌株。菌株 NS-1 呈现出的高效氨氮转化能力, 丰富与拓展了将异养硝化细菌应用到好氧堆肥过程的研究, 为解决畜牧业污染、畜禽粪污资源化利用提供理论依据。今后的工作应该对脱氮条件进行进一步优化、完善以异养硝化菌为主体的各种脱氮方式, 指导异养硝化细菌在工程上更深层次的应用。

REFERENCES

- [1] 《中国环境年鉴》编辑委员会. 中国环境年鉴-2015[M]. 北京: 中国环境年鉴社, 2015.
China Environment Yearbook Editorial Board. China Environment Yearbook[M]. Beijing: China Environmental Yearbook, 2015 (in Chinese).
- [2] ZHANG M, TASHIRO Y, ASAKURA Y, ISHIDA N, WATANABE K, YUE SY, AKIKO MN, SAKAI KJ. Lab-scale autothermal thermophilic aerobic digestion can maintain and remove nitrogen by controlling shear stress and oxygen supply system[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 132(3): 293-301.
- [3] 石晓晓, 郑国砥, 高定, 陈同斌. 中国畜禽粪便养分资源总量及替代化肥潜力[J]. 资源科学, 2021, 43(2): 403-411.
SHI XX, ZHENG GD, GAO D, CHEN TB. Quantity of available nutrient in livestock manure and its potential of replacing chemical fertilizers in China[J]. Resources Science, 2021, 43(2): 403-411 (in Chinese).
- [4] HUANG GF, WU QT, WONG JWC, NAGAR BB. Transformation of organic matter during co-composting of pig manure with sawdust[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(15): 1834-1842.
- [5] 王道泽, 谢国雄, 李丹, 杨文叶, 王京文. 不同微生物菌剂在鸡粪堆肥中的应用效果[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(5): 1074-1078.
WANG DZ, XIE GX, LI D, YANG WY, WANG JW. Application of microorganism agents in the composting of chicken manure[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2013, 25(5): 1074-1078 (in Chinese).
- [6] 王守红, 朱凌宇, 徐荣, 张家宏, 寇祥明, 王桂良, 韩光明, 唐鹤军, 毕建花. 菌剂添加对牛粪堆肥氮素变化及腐熟度影响[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(4): 659-664.
WANG SH, ZHU LY, XU R, ZHANG JH, KOU XM, WANG GL, HAN GM, TANG HJ, BI JH. Nitrogen changes and maturity of cow manure composting influenced by microbial inoculum[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2017, 44(4): 659-664 (in Chinese).
- [7] HE XL, SUN Q, XU TY, DAI M, WEI DS. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel halotolerant bacterium *Pseudomonas mendocina* TJPU04[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, 42(5): 853-866.
- [8] ROUT PR, BHUNIA P, DASH RR. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal[J]. Bioresource Technology, 2017, 244: 484-495.
- [9] JAFFER YD, VINOTHKUMAR R, IRFAN AB, ISHFAQ NM, AHMAD GANIE P, BHAT RAH, VENNILA A. Isolation and characterization of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification and sulphur-oxidizing bacterium *Paracoccus saliphilus* strain SPUM from coastal shrimp ponds[J]. Aquaculture International, 2019, 27(5): 1513-1524.
- [10] 钟广智. 市政污泥超高温好氧堆肥过程中氮素损失

- 机理研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2020.
- ZHONG GZ. Study on the mechanism of nitrogen loss in municipal sludge hyperthermophilic aerobic composting[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2020 (in Chinese).
- [11] 翁洵, 王炎, 郑孟菲, 何长征. 堆肥过程中氮素转化及保氮措施研究进展[J]. 中国农学通报, 2017, 33(27): 26-32.
- WENG X, WANG Y, ZHENG MF, HE CZ. Nitrogen transformation and nitrogen conservation in composting: research progress[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(27): 26-32 (in Chinese).
- [12] 孙将, 李建章, 袁月祥, 闫志英, 廖银章. 高效除氮氮异养硝化细菌的分离鉴定及其脱氮条件优化[J]. 农业工程学报, 2018, 34(S1): 35-41.
- SUN J, LI JZ, YUAN YX, YAN ZY, LIAO YZ. Study on isolation and identification of heterotrophic nitrifying bacteria and optimal denitrification conditions[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2018, 34(S1): 35-41 (in Chinese).
- [13] 国家环保局水和《废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- The State Environmental Protection Administration and the Water and Wastewater Monitoring Analysis Method Editorial Board. Water and Wastewater Monitoring Analysis Method[M]. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002 (in Chinese).
- [14] POCHANA K, KELLER J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND)[J]. Water Science and Technology, 1999, 39(6): 61-68.
- [15] 陈燕飞. pH对微生物的影响[J]. 太原师范学院学报(自然科学版), 2009, 8(3): 121-124, 131.
- CHEN YF. pH to uygur biology influence[J]. Journal of Taiyuan Normal University (Natural Science Edition), 2009, 8(3): 121-124, 131 (in Chinese).
- [16] 汪旭晖, 杨垒, 任勇翔, 陈宁, 肖倩, 崔坤, 郦丹. 异养硝化细菌 *Pseudomonas putida* YH 的脱氮特性及降解动力学[J]. 环境科学, 2019, 40(4): 1892-1899.
- WANG XH, YANG L, REN YX, CHEN N, XIAO Q, CUI S, LI D. Nitrogen removal by heterotrophic nitrifying bacterium *Pseudomonas putida* YH and its kinetic characteristics[J]. Environmental Science, 2019, 40(4): 1892-1899 (in Chinese).
- [17] 陈茂霞, 王欢, 周后珍, 李杨, 谭周亮, 李旭东. 异养硝化-好氧反硝化菌 HN-02 的筛选及其特性[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(4): 688-693.
- CHEN MX, WANG H, ZHOU HZ, LI Y, TAN ZL, LI XD. Screening and characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain HN-02[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(4): 688-693 (in Chinese).
- [18] CAO XH, ZHAO BH, WU YM, HUANG J, WANG HZ, SUN XY, LI SJ. Characterization of *Alcaligenes aquatilis* as a novel member of heterotrophic nitrifier-aerobic denitrifier and its performance in treating piggery wastewater[J]. Bioresource Technology, 2022, 354: 127176.
- [19] 梁贤. 一株异养硝化细菌 YL 的筛选及其脱氮特性研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学硕士学位论文, 2015.
- LIANG X. Isolation and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifying bacterium YL[D]. Xi'an: Master's Thesis of Xi'an University of Architecture and Technology, 2015 (in Chinese).
- [20] TAYLOR SM, HE YL, ZHAO B, HUANG J. Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL[J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(10): 1336-1341.
- [21] KUNDU P, PRAMANIK A, DASGUPTA A, MUKHERJEE S, MUKHERJEE J. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Chryseobacterium* sp. R31 isolated from abattoir wastewater[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 436056.
- [22] YANG L, REN YX, LIANG X, ZHAO SQ, WANG JP, XIA ZH. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater[J]. Bioresource Technology, 2015, 193: 227-233.
- [23] WANG T, DANG QF, LIU CS, YAN JQ, FAN B, CHA DS, YIN YY, ZHANG YB. Heterotrophic nitrogen removal by a newly-isolated alkalitolerant microorganism, *Serratia marcescens* W5[J]. Bioresource Technology, 2016, 211: 618-627.
- [24] WAN WJ, HE DL, XUE ZJ. Removal of nitrogen and phosphorus by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a denitrifying phosphorus-accumulating bacterium *Enterobacter cloacae* HW-15[J]. Ecological Engineering, 2017, 99: 199-208.
- [25] 李丛娜, 吕锡武, 稻森悠平. 同步硝化反硝化脱氮研究[J]. 给水排水, 2001, 27(1): 22-24, 1.
- LI CN, LYU XW, YUHEI I. Study on nitrogen removal by simultaneous nitrification and

- denitrification[J]. *Water & Wastewater Engineering*, 2001, 27(1): 22-24, 1 (in Chinese).
- [26] THANGAM EB, RAJKUMAR GS. Studies on the production of extracellular protease by *Alcaligenes faecalis*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16(7): 663-666.
- [27] 刘玉香. 两株异养硝化—好氧反硝化菌的分离鉴定和脱氮性能研究[D]. 太原: 太原理工大学博士学位论文, 2012.
LIU YX. Identification and nitrogen removal characteristics of two heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria[D]. Taiyuan: Doctoral Dissertation of Taiyuan University of Technology, 2012 (in Chinese).
- [28] YANG JR, WANG Y, CHEN H, LYU YK. Ammonium removal characteristics of an acid-resistant bacterium *Acinetobacter* sp. JR1 from pharmaceutical wastewater capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 274: 56-64.
- [29] YANG M, LU DW, QIN BD, LIU QL, ZHAO YM, LIU HL, MA J. Highly efficient nitrogen removal of a coldness-resistant and low nutrient needed bacterium, *Janthinobacterium* sp. M-11[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 256: 366-373.
- [30] 杨秀玲, 杨宗政, 庞金钊, 王宗华. 具有硝化作用的异养菌脱除氨氮的性能研究[J]. *天津科技大学学报*, 2005, 20(1): 24-26, 48.
YANG XL, YANG ZZ, PANG JZ, WANG ZH. Study on removal of $\text{NH}_3\text{-N}$ using nitrification and heterotrophic bacteria[J]. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*, 2005, 20(1): 24-26, 48 (in Chinese).
- [31] ZHANG JB, WU PX, HAO B, YU ZN. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(21): 9866-9869.
- [32] SU JF, SHI JX, HUANG TL, MA F. Kinetic analysis of simultaneous denitrification and biomineralization of novel *Acinetobacter* sp. CN₈₆[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 109(1): 87-94.
- [33] YANG L, REN YX, ZHAO SQ, LIANG X, WANG JP. Isolation and characterization of three heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria from a sequencing batch reactor[J]. *Annals of Microbiology*, 2016, 66(2): 737-747.
- [34] 陈青云, 江林峰, 陈建奇, 赵稳, 毛涛, 李利, 余知和. 高效异养硝化细菌 *Alcaligenes faecalis* Ni3-1 的分离及其脱氮特性研究[J]. *环境工程*, 2015, 33(5): 48-53.
CHEN QY, JIANG LF, CHEN JQ, ZHAO W, MAO T, LI L, YU ZH. Isolation and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ removal characteristics of a high-efficient heterotrophic nitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* ni3-1[J]. *Environmental Engineering*, 2015, 33(5): 48-53 (in Chinese).
- [35] 余润兰, 苗雷. 异养硝化细菌 *Alcaligenes* sp. S3 除氮特性及动力学[J]. *环境工程学报*, 2012, 6(3): 869-872.
YU RL, MIAO L. Character of ammonia removal by heterotrophic nitrifying bacteria *Alcaligenes* sp. S3 and its kinetics[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(3): 869-872 (in Chinese).
- [36] 黄廷林, 白士远, 张海涵, 周石磊, 何秀秀. 一株贫营养异养硝化-好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮特性[J]. *环境工程学报*, 2015, 9(12): 5665-5671.
HUANG TL, BAI SY, ZHANG HH, ZHOU SL, HE XX. Identification and denitrification characteristics of an oligotrophic heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(12): 5665-5671 (in Chinese).