牛粪中异养硝化细菌的分离鉴定及其硝化能力的研究

王佳丽，王梓宇，马咏琪，姜云鹏，安亮嘉，韩向敏，孙丽坤*

（甘肃农业大学 动物科学技术学院，甘肃 兰州 730070）

摘 要 为降低好氧堆肥氮素的损失，提高堆肥肥力，减少环境污染，以牛粪为主要材料，筛选出一株高效异养硝化菌株 NB-2，并通过形态学特征及 16S rRNA 基因序列分析，确认其为粪产碱杆菌（*Alcaligenes faecalis*）。进一步研究显示，在以柠檬酸三钠为碳源、C/N 比为 15、温度为 35 ℃以及 pH 值为 9.0 的条件下，菌株 NB-2 的硝化能力显著提升，在好氧发酵 32 h 时，菌株 NB-2 的氨氮（NH_4^+-N）去除率为 100%，去除速率高达 33.38 mg/（L·h）。本研究结果表明，菌株 NB-2 应用于堆肥具有减少氮素损失的潜力，同时能提高肥料的质量和效率，从而促进畜牧业的可持续发展。

关键词 硝化细菌；氮素转化；异养硝化；粪产碱杆菌（*Alcaligenes faecalis*）；硝化特性

中图分类号 Q93-331 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2026)01-0033-11

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2026.01.004

Isolation and Identification of Heterotrophic Nitrifying Bacteria from Cow Manure and Their Nitrification Capacity

WANG Jia-li, WANG Zi-yu, MA Yong-qi, JIANG Yun-peng, AN Liang-jia, HAN Xiang-min, SUN Li-kun*

(*College of Animal Science and Technology*, *Gansu Agricultural University*, *Lanzhou* 730070)

Abstract To reduce nitrogen loss during aerobic composting, enhance compost fertility, and minimize environmental pollution, this study used cattle manure as the material to isolate a highly efficient heterotrophic nitrifying strain of NB-2.Through morphological characterization and 16S rRNA gene sequence analysis, the strain was identified as *Alcaligenes faecalis*. Further research showed that NB-2 exhibited significantly enhanced ammonia oxidation capacity under the conditions of sodium citrate as the carbon source, C/N ratio of 15, temperature of 35 ℃, and pH of 9.0.The ammonia nitrogen (NH_4^+-N) removal rate reached 100% at 32 hours, with a removal rate as high as 33.38 mg/(L·h). This study demonstrated the potential of strain NB-2 in composting applications to reduce nitrogen losses while improving fertilizer quality and efficiency, thereby promoting the sustainable development of the livestock industry.

Keywords nitrifying bacteria; nitrogen transformation; heterotrophic nitrification; *Alcaligenes faecalis*; nitrification characteristics

农业是我国经济发展的重要支柱，畜牧业作为其中的关键组成部分，为消费者提供了重要的肉类、奶制品和其他动物源性产品，支撑着农业整体的经济和生产结构。为满足人民群众日益增长的生活需求，大量养殖企业逐步由小型规模养殖向集约化、大型化方向转型[1]。然而，随着养殖业

基金项目：国家自然科学基金项目（32160756，32260354）；甘肃省自然科学基金计划项目（24JRRA644）；甘肃农业大学“伏羲杰出人才培育计划”项目（GAUfx-04J03）；甘肃生猪产业配套技术研发与应用项目（GNKJ-2024-46）

作者简介：王佳丽 女，硕士研究生。主要研究方向为畜牧微生物。E-mail：3566455911@qq.com

王梓宇 男，硕士研究生。主要研究方向为畜牧微生物。E-mail：2339422700@qq.com

王佳丽与王梓宇为并列第一作者。

* 通讯作者。女，副教授，博士。主要研究方向为畜牧环境微生物。E-mail：sunlk_baby@126.com

收稿日期：2025-10-06

的快速发展,部分养殖区域出现了养殖密度过高、畜禽废弃物未经有效处理即大量排放等问题。相关研究表明,目前我国的养殖废弃物年产量为 30.5 亿 t,年需处理养殖废弃物产量达 21.35 亿 t。虽然养殖废弃物的综合利用率已达 76%,但仍然有 34%的养殖废弃物未被开发利用,致使畜禽粪污进入自然环境,对环境造成严重破坏[2]。畜禽粪便排入水体会导致水体污染和富营养化;将未经处理的畜禽粪便直接灌溉土地会造成土壤板结,使大量有害污染物在土壤中积累,严重影响植物的正常生长[3-5]。因此,高效处理畜禽粪污,加快粪污资源化利用已成为目前畜牧业重点关注的问题。好氧堆肥作为一种解决畜禽粪便污染的有效途径,可以有效处理畜禽废弃物实现资源化利用。在堆肥过程中,微生物起到了重要的作用,其可将畜禽粪便降解转化为稳定的腐殖质,减少粪便中的有害物质,使处理后的粪便成为较好的有机肥料,不但降低了环境污染,还能有效提高土壤肥力[6]。好氧堆肥因其诸多显著的优点而受到广泛关注[7-8]。但是该技术目前仍存在一些问题,最典型的是堆肥过程中会释放大量氨气(NH_3)、硫化氢(H_2S)和一些温室气体[9],这些气体不仅造成环境污染,还会导致堆肥产品中的氮素大量流失,影响堆肥产品的品质。因此如何减少堆肥过程中有害气体的排放及氮素的保留成为堆肥效果的关键。研究发现,相较于物理和化学保氮方法,生物保氮更具有优势,其良好的环境适应能力、高稳定性和显著的应用效果等优点是其他方法所不能比拟的[10]。通过接种具有固氮功能的微生物至堆体,从而实现氮素的固定和富集,减少氮素损失,达到生物保氮的目的,是目前改良好氧堆肥技术最为有效的方式之一[11-12]。目前,研究人员通过向堆体中添加外源微生物功能菌剂,以提高堆肥的腐熟效率,增强堆肥的肥效[13],并减少病原微生物的产生[14],从而实现畜禽粪便的无害化处理[15]。在对外源微生物的研究中,异养硝化细菌备受关注。异养硝化细菌能够将堆肥中释放的氨氮(NH_4^+-N)(如尿素分解产生的氨)转化为亚硝酸盐(NO_2^--N)和硝酸盐(NO_3^--N),从而减少氨的挥发,提高氮的有效利用率,有助于提高堆肥的养分含量,改良土壤质量,减少有害气体排放[16]。近年来,许多异养硝化细菌,如粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)[17]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)[18]、固氮菌(*Azotobacter*)[19]、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)[19]和脱氮副球菌属(*Paracoccus*)[20]等,已被广泛分离和报道。目前粪产碱杆菌的研究大多集中于从污泥或者污水环境中的分离筛选,从牛粪中分离的研究鲜有报道。陈青云等[21]从生活排污渠中分离筛选出粪产碱菌 Ni3-1。Honda 等[22]从市政污泥中分离获得粪产碱菌 No.4。综上所述,筛选和应用硝化能力较强的异养硝化细菌,能够显著提高好氧堆肥过程中氮的转化效率,减少氨气挥发等氮素损失,改善堆肥品质,使堆肥发酵过程更环保、更高效。本研究旨在筛选异养硝化能力较强的异养硝化细菌,通过优化环境影响因素进一步提升其硝化性能,并应用于好氧堆肥生产中,从而有效提高堆肥的氮素利用率,促进堆肥成熟,提高堆肥质量,最终优化堆肥的肥效。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 牛粪样品采集自甘肃省临夏回族自治州广河县大户赵家村盛欣养殖合作社,将采集的样品装入 50 mL 无菌采样管带回实验室进行后续试验。

1.1.2 培养基(g/L) LB 培养基:富集驯化培养基:硫酸铵 2.00,丁二酸钠 14.31,维氏盐溶液 50 mL,pH 值 7.0;筛选培养基(异养硝化培养基):硫酸铵 1.00,丁二酸钠 7.16,其他同富集驯化培养基;维氏盐溶液:磷酸氢二钾 5.00,七水合硫酸镁 2.50,氯化钠 2.50,七水合硫酸亚铁 0.05,硫酸锰 0.05。以上培养基参考王梓宇等培养基配方[23],加入 1.5%的琼脂制成固体分离培养基。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 硫酸铵、丁二酸钠等化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。生化培养箱(LRH-250FN,南京东迈科技仪器有限公司);紫外分光光度计(V-50000,苏州安原仪器有限公司);显微镜(CX23,北京塞百奥科技有限公司);扫描电镜(SU8100,日本日立高新技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离筛选 将采集的牛粪样品接种于富集驯化培养基,重复培养 4 次,将富集培养的菌液进行连续梯度稀释(10^{-5}~10^{-7}),并涂布于 1.

1.2 中的固体分离培养基。通过反复划线分离培养,最终获得纯培养物。根据 24 h 菌株 NH_4^+-N 去除率,选择去除效果最佳的菌株 NB-2,并斜面保存备用。

1.2.2 菌株鉴定 ①形态学观察:平板划线培养,观察菌株的菌落特征;革兰染色鉴定;扫描电镜观察其形态。②分子生物学鉴定:提取细菌 DNA 后,PCR 扩增菌株 16S rRNA 基因序列,对 PCR 扩增产物进行测序。利用 NCBI 数据库中的 BLAST 比对分析测序结果,绘制系统发育树,确认该菌株的分类地位。引物序列及扩增条件参考文献[23]。

1.2.3 不同环境因素对菌株 NB-2 硝化特性的影响 以硫酸铵为氮源,在不同变量(碳源、C/N、温度和 pH)条件下进行菌株 NB-2 的发酵实验。分别以葡萄糖、柠檬酸三钠、蔗糖、丁二酸钠、乙酸钠为碳源,设置 C/N 为 5、10、15、20、25,培养温度为 25、30、35、40、45 ℃,调节 pH 值至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。在所有试验中,除变量外所有其他因素都控制在最佳条件下,37 ℃、180 r/min 恒温培养 96 h,每隔 12 h 取样,测定 OD_{600}、NH_4^+-N、NO_3^--N、NO_2^--N 浓度,3 个重复,绘制各浓度变化及生长曲线。

1.2.4 优化环境因素对菌株 NB-2 硝化能力的影响 以硫酸铵为唯一氮源,选择柠檬酸三钠作为碳源(对于碳源的选择,由于四组试验同时进行,前面的试验过程参考文献[23],将丁二酸钠作为碳源研究其特性。结果显示,柠檬酸三钠和丁二酸钠二者均可以被该菌株高效利用,但柠檬酸三钠优势更大),C/N 为 15,pH 值为 9,以上条件作为最适培养条件将菌株 NB-2 菌液接种于培养基,35 ℃、180 r/min 培养 48 h,每隔 8 h 取样,测定 OD_{600}和NH_4^+-N、NO_3^--N、NO_2^--N 浓度,3 个重复,绘制各浓度变化及生长曲线。

1.2.5 测定方法 利用分光光度法测定 OD_{600},分别采用紫外分光光度法、N-(1-萘基)-乙二胺光度法、钠氏试剂光度法测定 NO_3^--N、NO_2^--N、NH_4^+-N[22]。N 去除效率(%)=[($C_{0\,h}$−$C_{t\,h}$)/$C_{0\,h}$]×100%;N 去除速率(mg/(L·h))=($C_{0\,h}$−$C_{t\,h}$)/t;式中,$C_{0\,h}$和 $C_{t\,h}$表示以上 3 种含氮化合物的起始(0 h)浓度和终止(t h)浓度。

1.2.6 数据分析 所有试验均设置 3 次重复,试验数据采用 SPSS Statistics 25 分析,$P<0.05$ 表示差异显著,$P>0.05$ 表示差异不显著。使用 Origin 2019 制图。

2 结果与分析

2.1 菌株分离鉴定

从牛粪样品中分离出一株 NH_4^+-N 去除率高的菌株 NB-2,该菌株菌落呈乳白色、圆形、扁平且边缘整齐,为革兰阴性菌,扫描电镜观察其为短杆状,大小为(0.40~0.65) μm×(0.50~1.00) μm(图 1A)。初步观察表明菌株 NB-2 属于杆菌属(*Alcaligenes*)。将菌株 NB-2 的 16S rRNA 基因序列(1 400 bp)(图 1B)上传至 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,使用 MEGA 7 构建系统发育树(图 2)。BLAST 分析结果表明,菌株 NB-2 为粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)。

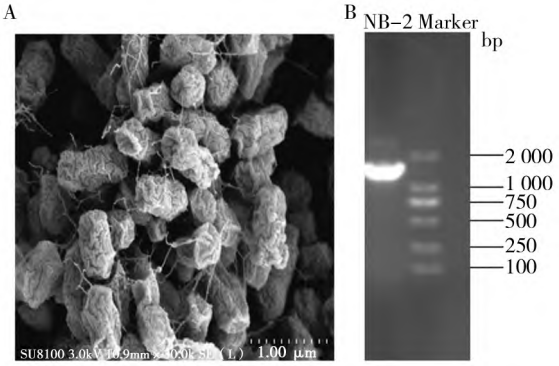


图 1 菌株 NB-2 的扫描电镜图片(A)和电泳图(B)

Fig.1 The Scanning electron microscopy(A) and electrophoretic map of strain NB-2(B)

2.2 不同环境因素对菌株的生长和硝化能力的影响

2.2.1 碳源对菌株 NB-2 的影响 在不同碳源条件下菌株 NB-2 硝化能力不同。如图 4 所示,菌株 NB-2 在葡萄糖和蔗糖中几乎不生长,而小分子碳源丁二酸钠和柠檬酸三钠更利于菌株 NB-2 进行异养硝化(图 3A)。当以丁二酸钠和柠檬酸三钠为碳源时,菌株 NB-2 的 OD_{600}值均超过 2.7,菌株 NB-2 在培养 60 h 时,NH_4^+-N 浓度分别由 561.49、542.56 mg/L 下降至 0 mg/L(图 3B)。以柠檬酸三钠为唯一碳源时,菌株 NB-2 培养 36 h 时,NO_2^--N 的浓度从 0 mg/L 增加至 48.54 mg/L,培养 36~48 h,其浓度快速下降至 0.03 mg/L,之

后保持稳定(图 3C),在 0~12 h 时, NO_3^--N 浓度由 477.23 mg/L 下降至 131.51 mg/L,72 h 时上升至 403.84 mg/L(图 3D)。菌株 NB-2 在以柠檬酸三钠为碳源,培养结束时菌株 NB-2 的 NH_4^+-N 去除速率和去除率分别为 5.61 mg/(L · h)和 100%,显著高于其他碳源 ($P>0.05$),在五种不同碳源条件下均具有显著性差异($P<0.05$)(图 4)。

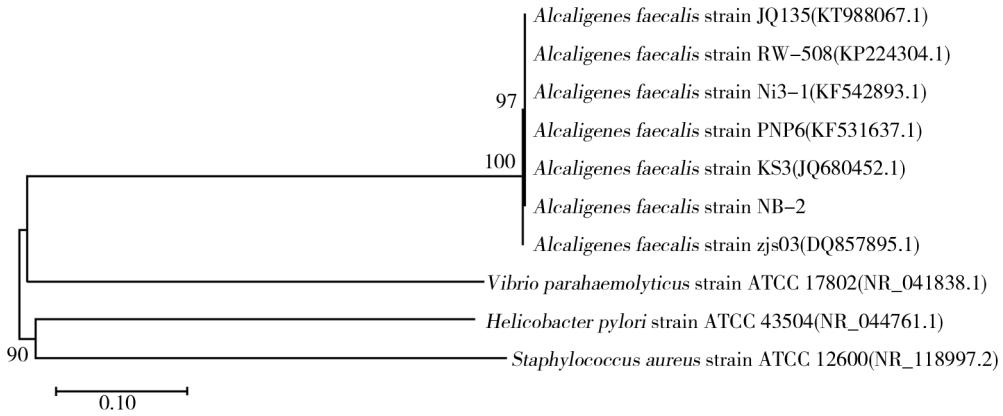


图 2 菌株 NB-2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig.2 The phylogenetic tree of strain NB-2 constructed based on the 16S rRNA gene sequence

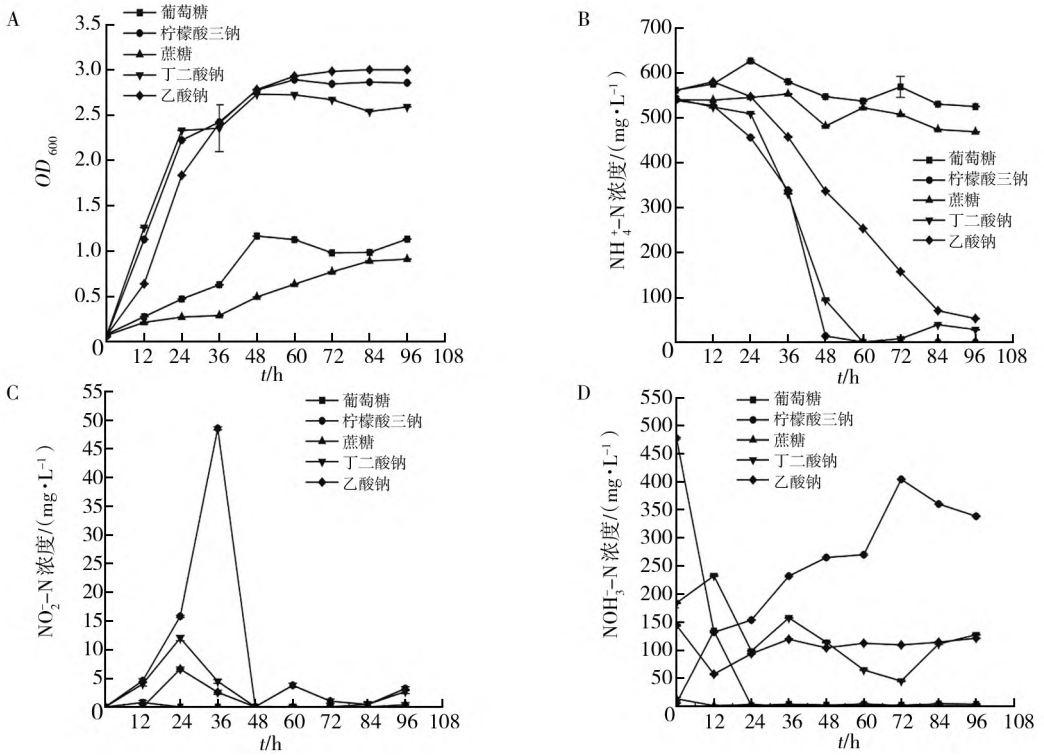


图 3 碳源对菌株 NB-2 的 OD_{600}(A)及 NH_4^+-N(B)、NO_2^--N(C)、NO_3^--N(D) 浓度的影响

Fig.3 Effects of carbon sources on OD_{600}(A) and the concentrations of NH_4^+-N(B), NO_2^--N(C), NO_3^--N(D) of strain NB-2

2.2.2 C/N 对菌株 NB-2 的影响 在发酵的前 16 h,不同 C/N 条件下的 OD_{600} 值表现出相似的趋势。16 h 后,C/N 比为 5 和 10 的两组的 OD_{600} 值开始趋于平稳,表明培养基中的碳源接近耗尽,菌体数量不再增加,菌株对 NH_4^+-N 的利用也逐渐停止。而 C/N 为 15、20、25 三组的 OD_{600} 值则继续上升,NH_4^+-N 浓度继续下降,均在 48 h 时 NH_4^+-N 浓度降至 0(图 5A、B)。在发酵的前

32 h,各 C/N 条件下 NO_2^--N 的浓度增加均相近,32 h 后由于 C/N 为 5 和 10 的两组菌体数量不再增加,开始进入衰亡期,NO_2^--N 的浓度增加平缓,40 h 时,NO_2^--N 的浓度不再增加(图 5C)。在 0~8 h,各 C/N 条件下的 NO_3^--N 浓度增加差异不明显,8~16 h 时,C/N 为 15、20、25 的三组以同样的速率快速增加,而 C/N 为 5 和 10 的两组虽然 NO_3^--N 的浓度仍在增加,但却远远低于另外三组(图 5D)。菌株 NB-2 对 NH_4^+-N 的去除速率和去除率均为 100%无显著性差异($P>0.05$),C/N 为 15 时,在 48 h 内,菌株 NB-2 的 NH_4^+-N 去除率达 100%,NO_2^--N 的浓度从 0 mg/L增加至 162.55 mg/L,NO_3^--N 的浓度则从 55.06 mg/L 增加至 365.00 mg/L。结果表明,菌株 NB-2 的 NH_4^+-N 去除速率和去除率的最佳C/N比为 15(图 6)。

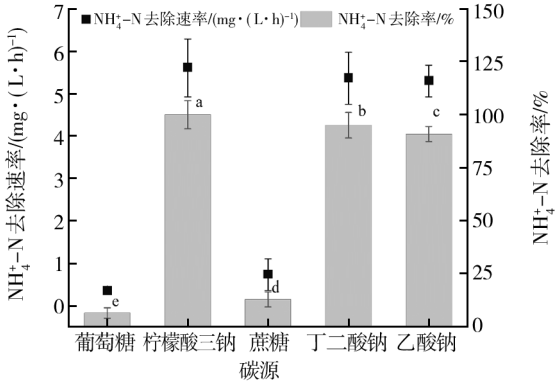


图 4　不同碳源下菌株 NB-2 的 NH_4^+-N 去除速率和去除率

Fig.4　Graph of NH_4^+-N removal rates and NH_4^+-N removal efficiency of strain NB-2 under different carbon sources

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),图 6、8、10 同

Different lowercase letters indicate significant differenes, same as figure 6, 8, 10

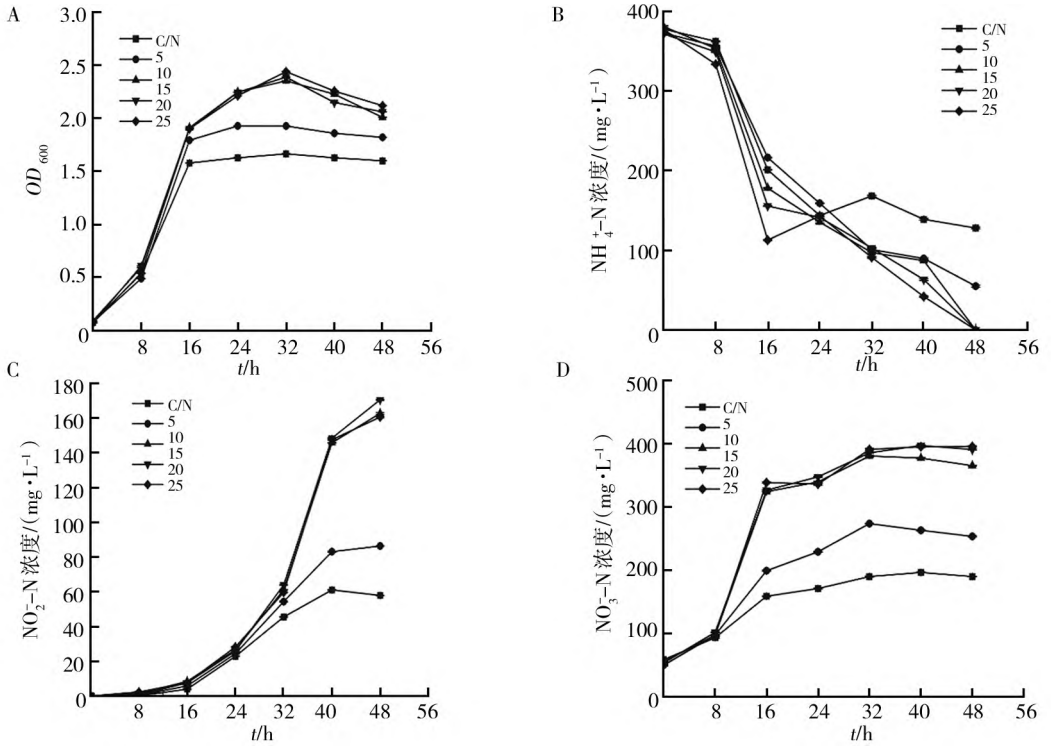


图 5　C/N 对菌株 NB-2 的 OD_{600}(A)及 NH_4^+-N(B)、NO_2^--N(C)、NO_3^--N(D)浓度的影响

Fig.5　Effects of C/N ratios on OD_{600}(A) and the concentrations of NH_4^+-N(B), NO_2^--N(C), NO_3^--N(D) of strain NB-2

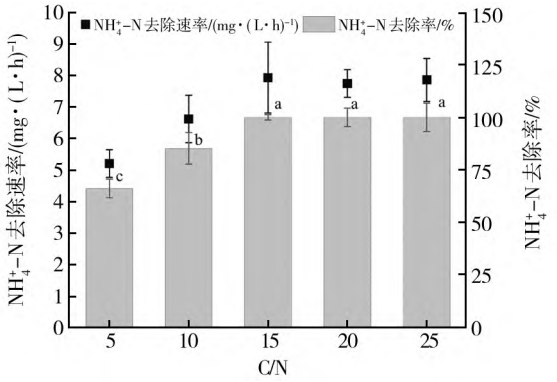


图 6 菌株 NB-2 在不同 C/N 条件下 NH_4^+-N 去除速率和去除率

Fig.6 Graph of NH_4^+-N removal rates and NH_4^+-N removal efficiency of strain NB-2 under different C/N ratios

2.2.3 pH 对菌株 NB-2 的影响 pH 对菌株 NB-2 的 OD_{600} 在 pH 值小于 9 的条件下影响并不明显，当 pH 值为 5、6、7、8、9 时，菌株 NB-2 的生长速率极为接近，但 pH 值为 10 时，菌株生长速率明显降低(图 7A)。pH 对于氮转化的影响较大，菌株 NB-2 在 pH 值为 5 和 6 时，NH_4^+-N 浓度下降最慢，当 pH 值为 9 时，NH_4^+-N 浓度下降最快(图 7B)。菌株 NB-2 在偏酸性条件下 NO_2^--N 浓度增加，偏碱性条件下 NO_2^--N 浓度开始下降，而 NO_3^--N 浓度在偏酸与偏碱条件下均下降(图 7C、7D)。当 pH 值为 9 时，培养结束时 NH_4^+-N 去除速率为 6.85 mg/(L · h)，去除率为 100%。而 pH 值为 5、6、7、8、10 时，去除速率分别为4.73、6.22、6.38、4.35、5.58 mg/(L · h)，去除率分别为 76.41%、68.53%、81.69%、92.53%、63.29%(图 8)。

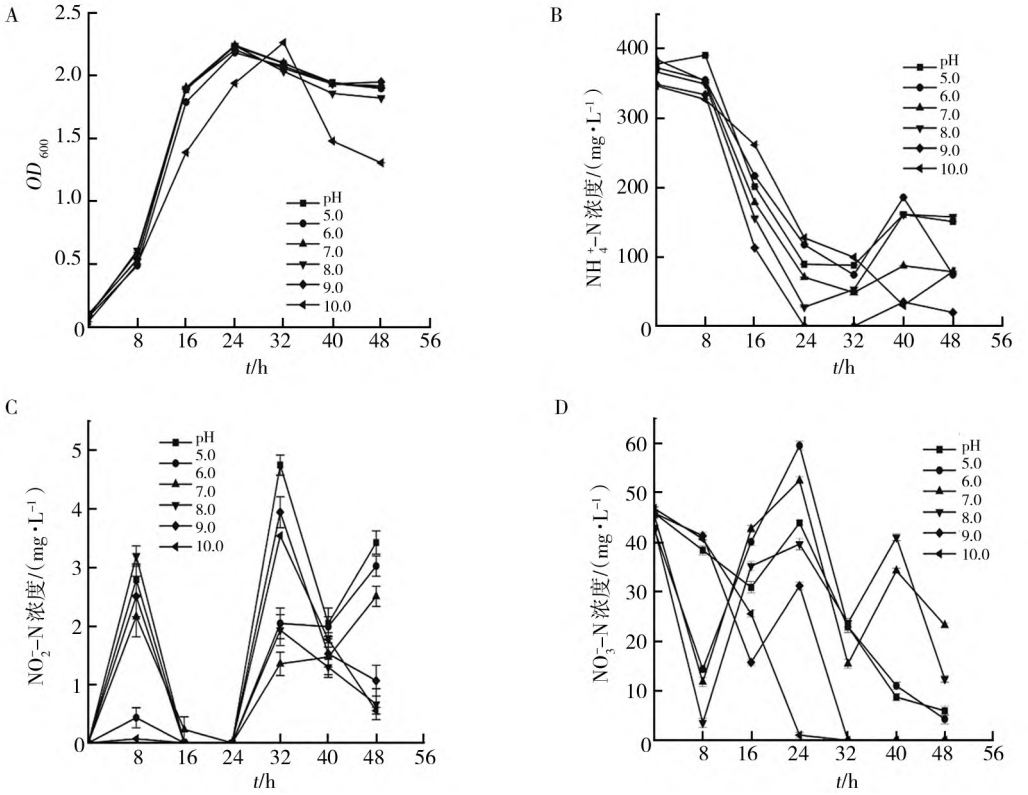


图 7 pH 对菌株 NB-2 的 OD_{600}(A)及 NH_4^+-N(B)、NO_2^--N(C)、NO_3^--N(D)浓度的影响

Fig.7 Effects of pH on OD_{600}(A) and the concentrations of NH_4^+-N(B), NO_2^--N(C), NO_3^--N(D) of strain NB-2

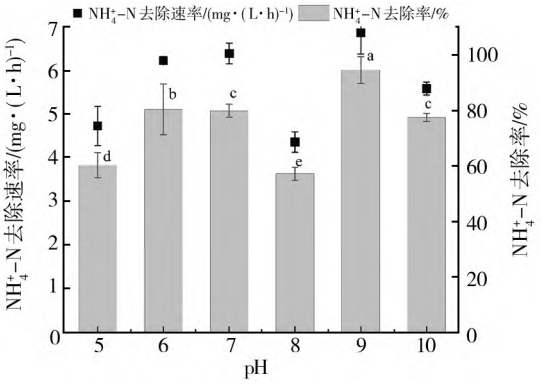


图 8　菌株 NB-2 在不同 pH 条件下 NH_4^+-N 去除速率和去除率

Fig.8　NH_4^+-N removal rates and NH_4^+-N removal efficiency of strain NB-2 under different pH

2.2.4　温度对菌株 NB-2 的影响　在不同温度条件下，菌株 NB-2 在培养结束时 35 ℃条件下的 OD_{600}最高为 1.97，表明菌株 NB-2 的最适生长温度为 35 ℃（图 9A）。菌株 NB-2 对 NH_4^+-N 的利用能力也有不同变化，35 ℃时对 NH_4^+-N 的利用率最高，NH_4^+-N 浓度从 377.39 mg/L 下降至 0 mg/L，在 45 ℃条件下，对 NH_4^+-N 的利用能力最弱（图 9B）。结果显示，在 48 h 时，NO_2^--N 和 NO_3^--N 在该过程中积累，尤其高温条件对 NO_2^--N 和 NO_3^--N 转化的影响较大（图 9C、9D）。菌株NB-2在培养结束时各处理差异显著（$P<0.05$），在 35 ℃时菌株 NB-2 的 NH_4^+-N 去除率和去除速率最高，48 h 时 NH_4^+-N 去除率为 100%，去除速率为 7.86 mg/(L · h)，其他温度条件下菌株NB-2的 NH_4^+-N 去除率降低，45 ℃时 NH_4^+-N 去除率仅为 9.3%（图 10）。

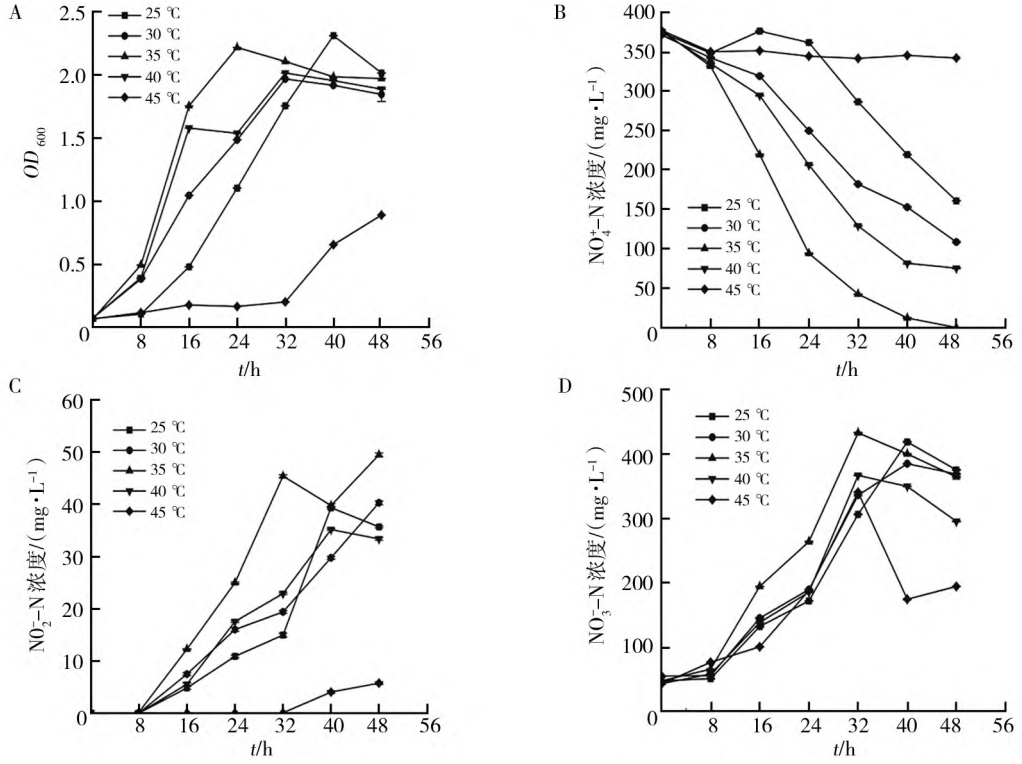


图 9　温度对菌株 NB-2 的 OD_{600}(A)及 NH_4^+-N(B)、NO_2^--N(C)、NO_3^--N(D)浓度的影响

Fig.9　Effects of temperatures on OD_{600}(A) and the concentrations of NH_4^+-N(B), NO_2^--N(C), NO_3^--N(D) of strain NB-2

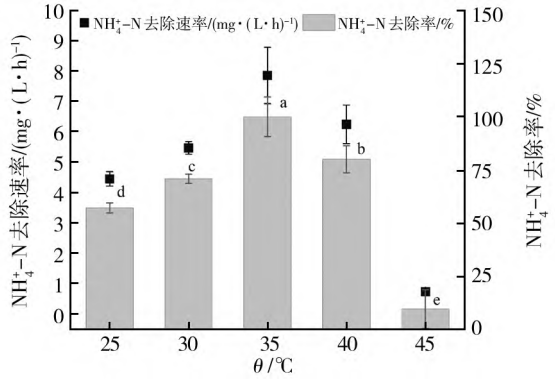


图 10 菌株 NB-2 在不同温度条件下 NH_4^+-N 去除速率和去除率

Fig.10 Graph of NH_4^+-N removal rates and NH_4^+-N removal efficiency of strain NB-2 under different different temperatures

2.2.5 优化环境因子对菌株 NB-2 硝化能力的影响 菌株 NB-2 在最优培养条件下的 OD_{600} 以及 NH_4^+-N、NO_2^--N 和 NO_3^--N 的浓度随培养时间的变化见图 11。在最佳条件下，菌株 NB-2 在 40 h 的 OD_{600} 值最高为 1.956(图 11A)，在 32 h 完全去除 NH_4^+-N 的总量为 1 068.35 mg/L，去除速率为 33.38 mg/(L·h)，去除率达到 100%(图 11B)，菌株 NB-2 的 NO_3^--N 和 NO_2^--N 的最高产生量分别为 364.39 mg/L 和 43.08 mg/L(图 11C、11D)。其 NH_4^+-N 去除率和去除速率显著高于目前研究的大多数异养硝化细菌。

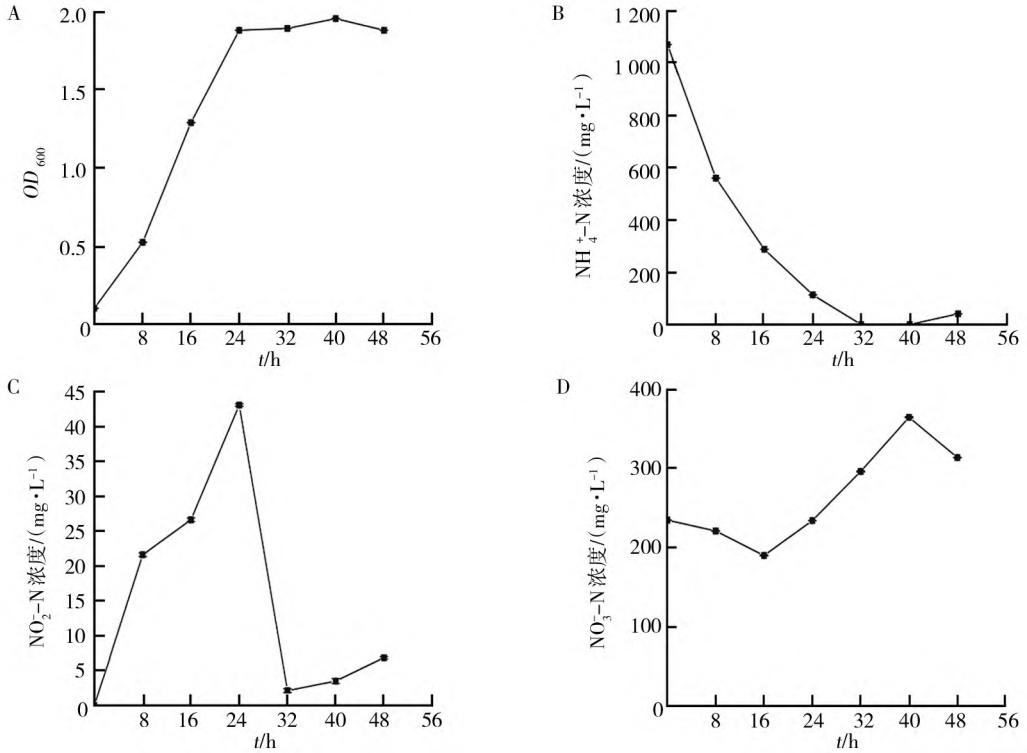


图 11 优化环境因子对菌株 NB-2 的 OD_{600}(A)及 NH_4^+-N(B)、NO_2^--N(C)、NO_3^--N(D)浓度的影响

Fig.11 Effects of the optimal condition on OD_{600}(A) and the concentrations of NH_4^+-N(B), NO_2^--N(C), NO_3^--N(D) of strain NB-2

3 讨 论

碳源是维持细菌正常生长发育的最基本物质，不同细菌对碳源的利用也有差异。大部分异养硝化细菌更容易利用小分子碳源。陈青云等[21]发现当以丁二酸钠和柠檬酸三钠作为碳源时，粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)Ni3-1 的 NH_4^+-N 去除率为 97%，显著高于其他碳源。虽然大多

数细菌能在葡萄糖和蔗糖中良好生长,但菌株 NB-2 在葡萄糖和蔗糖中几乎不生长,这可能与菌体缺乏分解葡萄糖和蔗糖的相关酶有关[25-26],而菌株能够有效利用柠檬酸三钠和丁二酸钠的原因与生物体内的三羧酸循环有关[27-28],Wang 等[29]发现假单胞菌(*Pseudomonas reactans*)WL20-3 对有机酸的利用率高于糖类,这与本研究结果一致。在本研究中,NO_3^--N 在初始(0 h)具有较高浓度,这一结果与先前的研究结果一致[30]。研究表明,此类现象可能与柠檬酸三钠和培养基中痕量金属离子生成的络合物有关,因其在 220 nm 处具备吸光特性,可能导致 NO_3^--N 检测结果偏高。在好氧条件下粪产碱杆菌不仅可以利 NH_4^+-N,还能利用 NO_3^--N[31],说明菌株 NB-2 同时具有反硝化能力。

综上所述,在以柠檬酸三钠作为唯一碳源的条件下,菌株 NB-2 在 48 h 时实现了 100% 的 NH_4^+-N 去除率,表现出较好的氨氧化能力。C/N 作为一个重要因素,对其硝化能力有很大影响。提高 C/N 对硝化能力有促进作用[32],但在本研究中当 C/N 达到 15 时,即使将 C/N 提高至 20、25,其 NH_4^+-N 去除能力基本保持不变,这一结果与陈青云等[21]的研究结果一致。一般情况下,处理废水时应设置较低的 C/N,例如恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)AD-21、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LAD9 的最适 C/N 分别为 8、13[33],过高的 C/N 会导致化学需氧量(COD)、NO_3^--N 和 NO_2^--N 浓度增加,从而使水质恶化。因此,在实际废水处理过程中,选择适当的 C/N 非常重要。处理废水时应选择最适 C/N 为 5,因为当 C/N 为 5 时,NH_4^+-N 去除率在 48 h 内能达到 85.22%,此时 NO_3^--N、NO_2^--N 的累积量不高,具有较好的脱氮效果。而本研究筛选菌株 NB-2 的最初目的是将其用于微生物好氧堆肥,降低 NH_3 减排,减少堆肥中的氮损失,所以最终选择的最适 C/N 为 15。微生物的活动对 pH 和温度非常敏感。研究表明产碱杆菌属(*Alcaligenes*)的微生物大多数偏好 pH 为 7.0 或 7.5 的中性偏碱性环境,可能是因为较高浓度的游离氨有助于氨氮加氧酶(AMO)的氧化反应[34-36]。酸性条件下(pH 值为 5)NH_4^+-N 去除率降低可能是细胞生长受限[37]。菌株 NB-2 在偏酸性条件下 NO_2^--N 浓度增加,NO_2^--N 的产生量很大,表明菌株 NB-2 在酸性环境下有利于 NO_2^--N 的积累,刘玉香[38]的研究结果也表明当 pH 值为 6 时,粪产碱杆菌 C16 更容易积累 NO_2^--N。也有研究表明,部分菌株能够耐受酸性环境并进行高效异养硝化,如不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)JR1 (pH 4.5)[39]等。本研究中,当 pH 值为 10 时,菌株 NB-2 的 NH_4^+-N 去除效率低于 pH 值为 9 时,说明过强的碱性环境可能抑制细菌生长,从而导致 NH_4^+-N 去除效率下降[40],菌株 NB-2 在偏碱性条件下,NO_2^--N 浓度开始下降,而 NO_3^--N 浓度在偏酸与偏碱条件下均下降,但就除氨能力来说,pH 值为 9 更符合本研究的要求。本研究中菌株 NB-2 在 35 ℃下具有良好的硝化能力,这与肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumo-niae*)CF-S9[41]、粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)NR[42]和海滨芽孢杆菌(*Bacillus litoralis*)N31 等菌株相似[43]。低温条件下,细胞生长及氮代谢相关酶的催化活性受到限制,而高温会影响酶和核酸的合成,阻碍细胞代谢,最终导致菌体死亡。因此,温度越高,酶的反应速度越快,但只有在酶活性能承受的温度范围内才能达到[41]。许多研究表明,多数异养硝化菌株为中温菌(28~37 ℃)[44],而菌株 NB-2 的最适生长温度为35 ℃。

从牛粪样品中筛选出一株高效异养硝化细菌粪产碱杆菌 NB-2,其最佳生长条件:碳源为柠檬酸三钠,C/N 比为 15,pH 值为 9,培养温度为 35 ℃。在此条件下,菌株 NB-2 在 32 h NH_4^+-N 去除总量为 1 068.35 mg/L,NH_4^+-N 去除率达到 100%,去除速率为 33.38 mg/(L·h)。本研究中 NO_3^--N 和 NO_2^--N 浓度变化表明菌株 NB-2 不仅具有异养硝化能力,还具有较强的反硝化能力。且这种能力远大于目前研究的大部分异养硝化细菌,这种高效的硝化能力对于解决堆肥过程中氮素损失以及空气污染问题,具有重要作用。菌株 NB-2 可用于好氧堆肥过程中保氮微生物菌剂的研制,后续可以进一步从分子层面对该菌株特性进行研究和优化,加强其硝化的速度和效率,同时对其反硝化能力进行研究,探究其氮转化的具体路径。

参考文献:

[1] 孙梦,许祯莹,王晨轩,等.低碳养殖技术在畜牧业中的应用[J].四川畜牧兽医,2025,52(8):4-5.

[2] 胡曾曾,于法稳,赵志龙.畜禽养殖废弃物资源化利用研究进展[J].生态经济,2019,35(8):186-193.

[3] Zhang C, Liu S, Wu S, et al. Rebuilding the linkage between livestock and cropland to mitigate agricultural pollution in China[J]. Resources Conservation and Recycling, 2019, 144(5): 65-73.

[4] Qian Y, Song K, Hu T, et al. Environmental status of livestock and poultry sectors in China under current transformation stage [J]. Science of the Total Environment, 2018, 622(5):702-709.

[5] Hu Y, Cheng H, Tao S. Environmental and human health challenges of industrial livestock and poultry farming in china and their mitigation[J]. Environment International, 2017, 107(11): 111-130.

[6] Chen L, Chen Y, Li Y, et al. Improving the humification by additives during composting: A review[J]. Waste Management, 2023,158(1):93-106.

[7] 朱可针,周文武,孟德安,等. 农村厕所粪污好氧堆肥技术研究进展[J]. 中国沼气,2024, 42(1): 3-9.

[8] Kong Z, Wang X, Liu Q, et al. Evolution of various fractions during the windrow composting of chicken manure with rice chaff[J]. Journal of Environmental Management, 2018, 207(2): 366-377.

[9] Zhu P, Shen Y, Pan X, et al. Reducing odor emissions from feces aerobic composting: Additives[J]. RSC Advances, 2021,11(26):15977-15988.

[10] Liu Z, Awasthi MK, Zhao J, et al. Unraveling impacts of inoculating novel microbial agents on nitrogen conversion during cattle manure composting: Core microorganisms and functional genes[J]. Bioresource Technology, 2023, 390(12): 129887.

[11] Zhao Y, Li W, Chen L, et al. Isolation and application of a thermotolerant nitrifying bacterium *Gordonia paraffinivorans* N52 in sewage sludge composting for reducing nitrogen loss[J]. Bioresource Technology, 2022,363(9):127959.

[12] Wang F, Xie L, Gao W, et al. The role of microbiota during chicken manure and pig manure co-composting[J]. Bioresource Technology, 2023,384(6):129360.

[13] Yang Q, Yang Q, Zhang S Q, et al. Effects of microbial inoculant and additives on pile composting of cow manure[J]. Frontiers in Microbiology, 2023,13(1):1084171.

[14] Gou C, Wang Y, Zhang X, et al. Inoculation with a psychrotrophic-thermophilic complex microbial agent accelerates onset and promotes maturity of dairy manure-rice straw composting under cold climate conditions[J]. Bioresource Technology, 2017, 243(6): 339-346.

[15] Li S, Li J, Yuan J, et al. The influences of inoculants from municipal sludge and solid waste on compost stability, maturity and enzyme activities during chicken manure composting[J]. Environmental Technology, 2017, 38(13): 1770-1778.

[16] Guo HH, Gu J, Wang, XJ, et al. Negative effects of oxytetracycline and copper on nitrogen metabolism in an aerobic fermentation system: Characteristics and mechanisms[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 403(7): 123890.

[17] 古才荣. 高效硝化菌 *Alcaligenes faecalis* CL-8 降解特性及其应用研究[J]. 现代化工,2022, 42(8): 193-198, 203.

[18] He X, Sun Q, Xu T, et al. 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.

[19] Rout PR, Bhunia P, Dash RR. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereu* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal[J]. Bioresource Technology, 2017,244(1):484-495.

[20] Huang Q, Alengebawy A, Zhu X, et al. Performance of *Paracoccus pantotrophus* MA3 in heterotrophic nitrification-anaerobic denitrification using formic acid as a carbon source[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2022,45(10):1661-1672.

[21] 陈青云,江林峰,陈建奇,等. 高效异养硝化细菌 *Alcaligenes faecalis* Ni3-1 的分离及其脱氨特性研究[J]. 环境工程, 2015, 33(5): 48-53.

[22] Honda N, Hirai M, Ano T, et al. Control of tomato damping-off caused by rhizoctonia solani by the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis* and its product, hydroxylamine[J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 2009, 65(2): 153-162.

[23] 王梓宇,王佳丽,唐德富,等.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.

[24] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》委会,水和废水监测分析方法-2002[M]. 北京:中国环境出版社,2002.

[25] Xu N, Liao M, Liang Y Q, et al. Biological nitrogen removal capability and pathways analysis of a novel low C/N ratio heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium (*Bacillus thuringiensis* strain WXN-23)[J]. Environmental Research, 2021, 195:110797.

[26] Chen MP, He TX, Wu QF,et al.Enhanced heterotrophic nitrification and aerobic denitrification performance of *Glutamicibacter arilaitensis* EM-H8 with different carbon sources[J]. Chemosphere, 2023,323:138266.

[27] Yang M, Lu DW, Yang JX,et al.Carbon and nitrogen metabolic pathways and interaction of cold-resistant heterotrophic nitrifying bacteria under aerobic and anaerobic conditions[J]. Chemosphere, 2019, 234:162-170.

[28] Lin ZY, Zhou J, He L,et al.High-temperature biofilm system based on heterotrophic nitrification and aerobic denitrification treating high-strength ammonia wastewater: Nitrogen removal performances and temperature-regulated metabolic pathways [J]. Bioresource Technology, 2022,344(Pt A):126184.

[29] Wang L, Chen C, Tang YQ, et al. Efficient nitrogen removal by a novel extreme strain, *Pseudomonas reactans* WL20-3 under

dual stresses of low temperature and high alkalinity: Characterization, mechanism, and application[J]. Bioresource Technology, 2023,385(10):1129465.

[30] Qiang A, Shuman D, Meng L, et al.Study on the aerobic remediation of Ni(II) by *Pseudomonas hibiscicola* strain L1 interaction with nitrate[J]. Journal of Environmental Management, 2021,299(8):113641.

[31] Harindintwali JD, Zhou J, Yu X, et al. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: A novel tool for environmental sustainability[J]. The Science of the Total Environment, 2020, 715(1):136912.

[32] 吴彦成,冷俊彤,张凯等. 异养硝化好氧反硝化菌的研究进展[J]. 中国给水排水,2023, 39(22): 37-45.

[33] Hu B, Quan J, Huang K, et al. Effects of C/N ratio and dissolved oxygen on aerobic denitrification process: A mathematical modeling study [J]. Chemosphere, 2021, 272 (1): 129521.

[34] Zhou XQ, Wang YL, Tan X, et al.Genomics and nitrogen metabolic characteristics of a novel heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter oleivorans* AHP123 [J]. Bioresource Technology, 2023,375(3):128822.

[35] Ye J, Zhao B, An Q, et al. Nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Environmental Technology, 2016, 37(17): 2206-2213.

[36] Xie FX, Thiri M, Wang H. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel isolated *Pseudomonas mendocina* X49[J]. Bioresource Technology, 2020, 319 (10):124198.

[37] 吴江涛. pH 对微生物絮团氨氮转化效率及细菌活性的影响[J]. 生物化工,2019, 5(5): 95-97, 100.

[38] 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,2012.

[39] 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(10):56-64.

[40] Zhang MX, Qin AZ, Yao QP, et al. Nitrogen removal characteristics of a versatile heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas bauzanensis* DN13-1, isolated from deep-sea sediment[J]. Bioresource Technology, 2019, 305(12): 122626.

[41] Padhi SK, Tripathy S, Sen R, et al. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 78: 67-73.

[42] Zhao B, Tian M, An Q, et al. Characteristics of a heterotrophic nitrogen removal bacterium and its potential application on treatment of ammonium-rich wastewater[J]. Bioresource Technology, 2016, 226(2): 46-54.

[43] Fei H, Pan L, Na L, et al. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2017, 124(5): 564-571.

[44] Wu Z,Xu F,Yan C,et al. Highly efficient nitrate removal in a heterotrophic denitrification system amended with redox-active biochar: A molecular and electrochemical mechanism [J]. Bioresource Technology, 2019, 275(3):297-306.