

# 好氧反硝化细菌的筛选及其在鸡粪发酵氮素转化中的作用

王立群, 肖维伟, 曹立群, 喻其林, 孙 文, 顾文杰

(东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**在以秸秆为调理剂的鸡粪好氧发酵环境,按温度阶段取样、分离好氧反硝化细菌,进一步通过反硝化活性测定实验筛选其中优势好氧反硝化细菌。将其回接到发酵堆垛中,并测定堆肥的硝态氮、铵态氮及全氮等指标的含量变化。结果表明,在鸡粪发酵中存在着好氧反硝化细菌菌群;通过活性测定实验,筛选出了 3 株优势好氧反硝化的菌株 SF35-1、JF45-2 和 JF35-1,经鉴定分别归为芽孢杆菌属、德克斯氏菌属和克雷伯氏菌属。该 3 株细菌均来自于发酵中温段,说明反硝化作用受温度影响,中温段强于其他温段。另外芽孢杆菌属的 SF35-1 菌株和德克斯氏菌属的 JF45-2 菌株同时还具有硝化作用,但在所试环境中强度不及反硝化作用。回接发酵试验证实,接种的优势好氧反硝化细菌使鸡粪堆制发酵中的硝态氮及全氮含量降低,而铵态氮含量变化不明显,说明这些反硝化细菌在实际的鸡粪发酵环境中同样具有反硝化作用,并造成了堆肥的氮素损失。

**关键词:**好氧反硝化细菌;鸡粪发酵;硝态氮

**中图分类号:**X172   **文献标识码:**A   **文章编号:**1672-2043(2008)06-2494-05

## Screening of Aerobic Denitrifiers and Their Function in Nitrogen Transformation of Aerobic Composting of Chicken Manure

WANG Li-qun, XIAO Wei-wei, CAO Li-qun, YU Qi-lin, SUN Wen, GU Wen-jie  
(College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Haerbin 150030, China)

**Abstract:** Aerobic denitrifying bacteria were isolated at different temperature stages in composting of chicken feces with straw as conditioner. The dominant strains were screened by measuring de-nitrification ability. Then the dominant strains were re-cultured into the composting of chicken feces and the contents of ammonia nitrogen, nitrate nitrogen and total nitrogen were measured. The results were as follows: there were aerobic de-nitrifiers in the composting of chicken feces. Three dominant strains, named SF35-1, SF45-2 and JF35-1, were screened by determining activity of nitrogen removal, and identified as *Bacillus* sp., *Derxia* sp. and *Klebsiella* sp. respectively. The three strains were all isolated from mid-temperature stage. It showed that de-nitrification was affected remarkably by temperature and was stronger in mid-temperature stage than other stages. The SF35-1 (*Bacillus* sp.) and JF45-2 (*Derxia* sp.) also had the ability of nitrification, which was weaker than the ability of de-nitrification. The dominant aerobic denitrifying bacteria inoculated into compost resulted in reduction of nitrate nitrogen and total nitrogen contents, and suggested that denitrifying bacteria had de-nitrification in chicken feces fermentation. It would reduce the nitrogen loss and air pollution by effectively regulating the activity of this group of bacteria.

**Keywords:** aerobic denitrifiers; composting of chicken manure; nitrate

好氧发酵作为粪便无害化处理的有效措施,已得到了普遍的推广和应用。但粪便等废弃物好氧发酵过程中存在着严重的氮素损失,这不仅污染环境,还在

很大程度上降低了肥效。除 pH 升高和堆肥温度增加会造成氨态氮的挥发外,硝态氮反硝化(硝态氮最终转化为 N<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>O)所致的气态氮挥发也是氮素损失的主要途径<sup>[1-2]</sup>。在发酵过程中硝态氮的反硝化是由反硝化细菌完成的,传统理论认为它们都是兼性厌氧的<sup>[3]</sup>,即在有氧条件下进行有氧呼吸,只有在厌氧时才以硝酸盐为电子受体进行硝酸盐呼吸<sup>[4]</sup>。近年来,好氧反硝化细菌已为人所重视,并证明它们是在有氧条件下,

收稿日期:2008-03-07

基金项目:国家自然科学基金(C020305)

作者简介:王立群(1956—),男,教授,主要研究方向为禽粪便好氧发酵技术及污水处理效应微生物研究。

E-mail: wangliqun2@163.com

利用好氧反硝化酶进行反硝化的一类细菌。国内外学者如 Patureau<sup>[5]</sup>、翟茜<sup>[6]</sup>及周立祥等<sup>[7]</sup>从氮素污染废水、活性污泥及长期施用无机氮肥的土壤等环境分离出了好氧反硝化细菌,研究了它们的好氧反硝化作用效果、最适作用条件及分类地位。但就畜禽粪便有氧发酵环境中的好氧反硝化细菌分离及其对该环境氮素的转化等内容未见报道。本文旨在筛选出鸡粪发酵中的好氧反硝化细菌,研究它们对鸡粪发酵过程氮素的转化作用,并明确其生物属别,为揭示好氧反硝化细菌的生物特性,以及从调控反硝化细菌的生物角度防止发酵过程氮素损失提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 好氧反硝化细菌培养基<sup>[8]</sup>

分离及计数用固体的培养基,反硝化活性测定实验用液体的培养基。

1.1.2 堆肥物料

鸡粪取自哈尔滨市香坊区幸福种鸡场,其中鸡粪:秸秆:水为 1:1.6:2.1,使堆垛中的 C/N 为 25,水分含量为 65%。

1.1.3 仪器设备

发酵罐(自制,可定时自动测温 and 通风)、凯氏定氮仪(FOSS 2100)、气动恒温摇床(ZHWY211B)等。

1.2 方法

1.2.1 发酵及取样

采取密闭高温静态强制通风式发酵,氧浓度不低于 8 mg·L<sup>-1</sup>,65 ℃时强制通风散热。堆肥全程按温度每变化 10 ℃于堆体代表性部位取样一次,分离反硝化细菌,具体为升温期的 25、35 和 45 ℃,高温期的 55 和 65 ℃,降温期的 45 和 35 ℃,共计 7 次。

1.2.2 反硝化细菌的分离

样品以相应取样温度做菌落分类计数,同时分离数量优势的反硝化菌株。

1.2.3 分离菌株反硝化活性测定

将各分离的反硝化菌株按 4%接种量分别接种于 50 mL(放于 250 mL 三角瓶中)反硝化细菌液体培养基中,每株 3 次重复,以取样温度、130 r·min<sup>-1</sup> 的恒温摇床培养。定期取样,以磺基水杨酸消化法测定硝酸盐氮量<sup>[9]</sup>、α-萘胺分光光度法测定亚硝酸盐氮量<sup>[10]</sup>,最终以还原硝酸盐氮能力的高低筛选优势好氧反硝化细菌。

1.2.4 反硝化细菌对鸡粪好氧发酵氮素转化的影响

将筛选出的各优势反硝化菌株以 1:1 的比例制

成混菌液,按堆肥总重的 2%接种于堆肥物料,好氧发酵,同时设立不加菌液的对照。发酵过程定时取样、测定硝态氮、铵态氮及全氮的变化。其中全氮测定用凯氏定氮法<sup>[11]</sup>;铵态氮测定用氯化钾浸提-氧化镁蒸馏法<sup>[11]</sup>;硝态氮测定用氯化钾浸提-还原蒸馏法<sup>[11]</sup>。

1.3 高效菌株的鉴定

依据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版),通过微生物学经典鉴定的生理生化方法<sup>[12]</sup>,对筛选出的优势反硝化菌株进行属别鉴定。其主要项目为:糖发酵实验、抗酸染色、接触酶、氧化酶实验、固氮能力检测、分解纤维素实验和好氧性实验等。

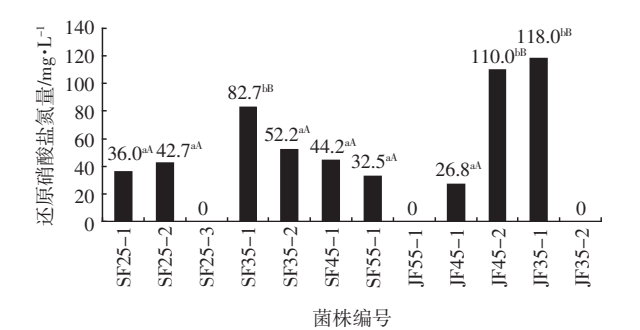
2 结果与分析

2.1 好氧反硝化细菌的筛选

依据群体及个体形态,从发酵过程分离到 12 株数量优势菌,它们 96 h 还原硝酸盐氮量及其方差分析和多重比较结果见图 1。从中可见菌株 SF35-1、JF45-2 及 JF35-1 还原硝酸盐氮量均达 82 mg·L<sup>-1</sup> 以上,与其他菌株差异极显著( $P<0.01$ ),由此定为优势好氧反硝化细菌。菌株 SF25-3、JF55-1、JF35-2 并未还原硝酸盐氮,同时三株菌所在环境中的亚硝酸盐氮经测定也未发生变化,说明他们只利用培养基中的铵态氮,无反硝化作用。另外,从温度上看,中温 35、45 ℃筛选的菌株反硝化作用较强,高温的较弱,仅 55 ℃一株 SF55-1,还原硝酸盐氮为 32.5 mg·L<sup>-1</sup>,65 ℃未筛选到好氧反硝化细菌。说明该发酵环境的好氧反硝化细菌不耐高温,反硝化能力受温度影响,中温是适宜的反硝化温度。

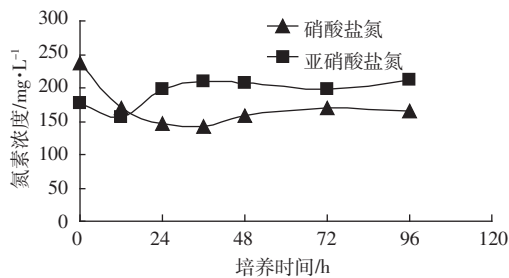
2.2 优势好氧反硝化菌株活性测定结果

由图 2 可知,菌株 SF35-1 在 0~24 h 硝酸盐氮含

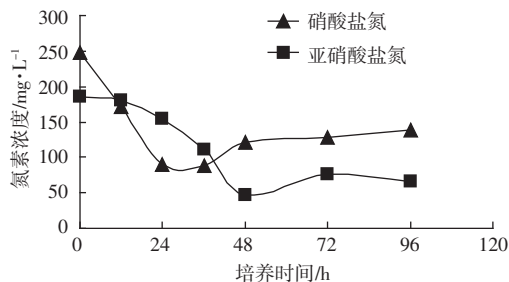


图中菌株编号的 F 为反硝化、S 为升温、J 为降温、“-”前数字为温度

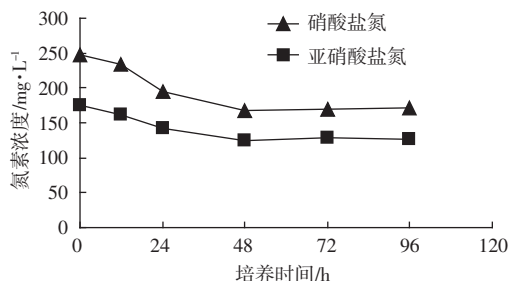
图 1 好氧反硝化细菌还原硝酸盐氮的量  
Figure 1 Content of nitrate nitrogen reduced by aerobic denitrifying bacteria



(1)SF35-1



(2)JF45-2



(3)JF35-1

图 2 3 株优势反硝化细菌氮素转化

Figure 2 Nitrogen removal of the three dominant denitrifying bacteria

量明显下降,还原量可达  $105.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,之后略有回升,72 h 后趋于平稳,96 h 硝酸盐氮的损失率达 33.5%;亚硝酸盐氮量先下降后升高,48 h 以后趋于平稳。菌株 JF45-2 在 0~24 h 硝酸盐氮量的变化同菌株 SF35-1,还原硝酸盐氮达  $160.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,之后也有所回升,48 h 后趋于平稳,96 h 硝酸盐氮的损失率达 44.4%;亚硝酸盐氮量在 0~48 h 下降,之后表现回升。菌株 JF35-1 的硝酸盐氮和亚硝酸盐氮量在 0~48 h 均呈下降趋势,之后保持平稳,96 h 硝酸盐氮的损失率达 30.6%。上述结果说明 3 株优势好氧反硝化细菌都能利用硝酸盐氮和亚硝酸盐氮进行反硝化作用。菌株 SF35-1、JF45-2 在 24 h 之后亚硝酸盐氮和硝酸盐氮含量均出现升高的现象,原因是:①24 h 后反硝化作用减弱甚至停止;②培养基中有铵离子,这两个菌株能将其氧化成亚硝酸盐氮乃至硝酸盐氮的硝化作

用所至。该结果与 Robertson 和 Scholten 等人从废水和垃圾中分离的细菌同时具有异养硝化和好氧反硝化作用的报道是一致的<sup>[13-14]</sup>,但本实验筛选的菌株反硝化作用要强于硝化作用,表现为硝酸盐氮量总体呈下降趋势。这类细菌在生物脱氮的实践方面应具有一定的应用价值。

### 2.3 优势好氧反硝化菌株对鸡粪发酵氮素转化的影响

从图 3 可以看出,经 16 d 的好氧发酵,加菌组堆体的硝态氮量总体上低于对照组,具体表现为 0~6 d 二者差别不大;此后至发酵结束,加菌组硝态氮量明显低于对照组,12 d 后尤为突出并呈下降趋势;发酵结束时,加菌组的硝态氮含量仅为  $0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,而对照组的为  $0.24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。这一结果说明筛选出的好氧反硝化细菌在鸡粪发酵过程中能利用硝态氮,使硝态氮量降低,且在发酵后期作用较强。

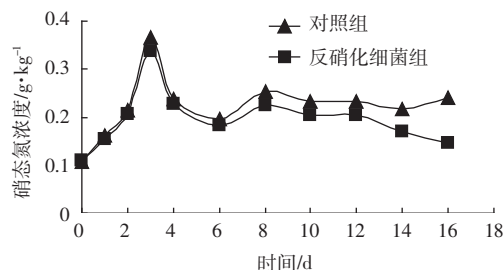


图 3 鸡粪好氧发酵接种反硝化菌株后硝态氮含量的变化

Figure 3 Change of contents of nitrate nitrogen in the aerobic composting of chicken manure inoculated with denitrifying bacteria

图 4 可见加菌组铵态氮量变化与对照组相近。发酵过程中硝态氮量的减少主要是由于反硝化作用生成气态氮的挥发,或异化性还原成铵所至。而在本实验的鸡粪好氧发酵中,各时段所测得的加菌组与对照组的铵态氮量是基本相同的,即接菌并未造成铵态氮的积累。因此说明,图 3 结果中加菌组硝态氮的减少并非是异化性还原成了铵,而只能是反硝化作用生成了气态氮挥发的结果。

从图 5 中的全氮含量变化看,加菌组在发酵 6 d 后开始比对照组低,在发酵结束时,比对照组低 0.11%,可见加菌组的反硝化也致使全氮量低于对照组,进一步证明了所试的优势好氧反硝化菌株在鸡粪好氧发酵中的反硝化作用。

发酵过程的氮素损失主要是氨气的挥发及硝态氮的反硝化,本研究证实好氧发酵中确实存在好氧反硝化细菌,他们的作用会导致发酵肥料的氮素损失和大气的污染。因此提示:在发酵过程中采取适当的措

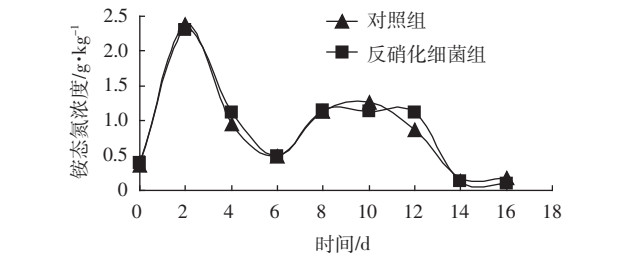


图 4 鸡粪好氧发酵接种反硝化菌株后铵态氮含量的变化

Figure 4 Change of contents of ammonium nitrogen in the aerobic composting of chicken manure inoculated with denitrifying bacteria

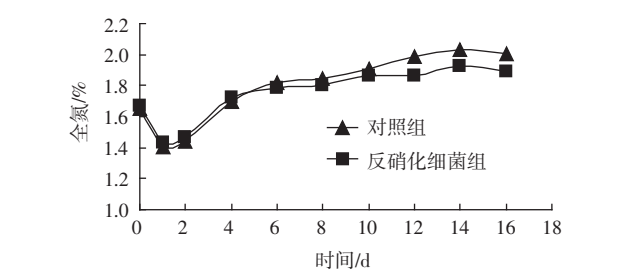


图 5 鸡粪好氧发酵接种反硝化菌株后全氮含量的变化

Figure 5 Change of contents of total nitrogen in the aerobic composting of chicken manure inoculated with denitrifying bacteria

施抑制这类菌的反硝化作用,可以保证和提高好氧发酵的效果。

### 2.4 优势反硝化细菌的鉴定结果

根据菌株的群体与个体形态、染色及相应生理生化特征(见表 1),并参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)鉴定 3 株优势反硝化细菌 SF35-1、JF45-2、JF35-1 分别归为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、德克斯氏菌属 (*Derxia*)和克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)。

## 3 结论

(1)在以秸秆为调理剂的鸡粪好氧堆制发酵中分离、筛选出了 3 株优势好氧反硝化细菌 SF35-1、JF45-2 和 JF35-1, 经鉴定分别归为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、德克斯氏菌属 (*Derxia*)和克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)。其中芽孢杆菌属的 SF35-1 和德克斯氏菌属的 JF45-2 同时还具有微弱的硝化作用。

(2)所筛选的优势好氧反硝化菌株均来自于中温阶段,表明反硝化作用效果受温度的影响明显,中温阶段作用较强,其他温段均较弱。

(3)所筛选的优势好氧反硝化菌株能使堆肥中的硝态氮和全氮含量降低,铵态氮量变化不明显。因此,在该过程采取抑制这类菌的生物学方法,可以减少氮素损失和环境污染,提高肥效。

| 表 1 3 株反硝化菌的生理生化试验结果                                                                                      |        |        |        |           |        |        |        |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|--|
| Table 1 Results of physiological and biochemistry experiments of the three dominant denitrifying bacteria |        |        |        |           |        |        |        |  |
| 项目                                                                                                        | 菌株     |        |        | 项目        | 菌株     |        |        |  |
|                                                                                                           | SF35-1 | JF45-2 | JF35-1 |           | SF35-1 | JF45-2 | JF35-1 |  |
| 个体形态                                                                                                      | 杆状     | 短杆状    | 短杆状    | M.R.试验    | +      | +      | -      |  |
| 革兰氏染色                                                                                                     | +      | -      | -      | V.P. 试验   | +      | -      | +      |  |
| 芽孢                                                                                                        | +      | -      | -      | 0.5% NaCl | +      | +      | +      |  |
| 运动性                                                                                                       | -      | -      | +      | 2%NaCl    | +      | +      | +      |  |
| 抗酸性                                                                                                       | -      | -      | -      | 7%NaCl    | +      | -      | +      |  |
| 氧化酶                                                                                                       | -      | -      | -      | 10% NaCl  | -      | -      | -      |  |
| 接触酶                                                                                                       | -      | -      | +      | 糖发酵       |        |        |        |  |
| 葡萄糖产酸                                                                                                     | +      | +      | +      | 葡萄糖       | +      | +      | +      |  |
| 纤维素分解                                                                                                     | -      | -      | -      | 蔗糖        | +      | +      | +      |  |
| 淀粉水解                                                                                                      | -      | -      | +      | 甘露醇       | -      | -      | +      |  |
| 产乳酸                                                                                                       | -      | -      | -      | 麦芽糖       | +      | -      | +      |  |
| 硫酸盐还原                                                                                                     | -      | -      | -      | 阿拉伯糖      | -      | -      | +      |  |
| 自生固氮                                                                                                      | -      | +      | -      | 木糖        | -      | -      | +      |  |
| 吡啶                                                                                                        | -      | -      | -      | 脲酶        | -      | -      | +      |  |
|                                                                                                           |        |        |        | 需氧性       | 好氧     | 好氧     | 兼性     |  |

注:“+”表示试验结果为阳性,“-”表示试验结果为阴性。

### 参考文献:

[1] Tiquia S M, TamN F Y. Fate of nitrogen during composting of chicken litter[J]. *Environmental Pollution*, 2000, 110:535-541.

[2] Eklind Y, Kirchmann H. Composting and storage of organic household waste with different litter amendments II :Nitrogen turnover and loss-es[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 74: 125-133.

[3] Osliso A, Lewandowski Z. Inhibition of by selected organic compounds[J]. *Water Research*, 1985, 19:4230-4236.

[4] 张玉芹, 刘开启, 王 革. 反硝化细菌的筛选及培养条件的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(1): 165-168.

ZHANG Yu-qin, LIU Kai-qi, WANG Ge. Screening of denitrifying bac-teria and determination of the culture conditions[J]. *Journal of Agro-environmental Science*, 2005, 24(1): 165-168.

[5] Patureau D, Bernet N, et al. Effect of dissolved oxygen and carbon nitro-gen loads on denitrification by an aerobic consortium[J]. *Applied Micro-biology and Biotechnology*, 2000, 54:535-542.

[6] 翟 茜, 汪 苹, 李秀婷, 等. 活性污泥中好氧反硝化菌的富集筛选及鉴别[J]. *环境科学与技术*, 2007, 1: 11-13.

ZHAI Qian, WANG Ping, LI Xiu-ting, et al. Selection, enrichment and identification of aerobic denitrifiers in activated sludge system[J]. *Envi-ronmental Science & Technology*, 2007, 1: 11-13.

[7] Zhou Li-xiang, Huang Feng-yuan, Wang Shi-mei. Isolation of aerobic denitrifiers and their roles in soil nitrogen transformation[J]. *Acta Peda-logica Sinica*, 2006, 43(3): 430-435.

[8] 马 放, 王弘宇, 周丹丹. 活性污泥体系中好氧反硝化菌的选择与富集[J]. *湖南科技大学学报*, 2005, 20(2): 80-83.

MA Fang, WANG Hong-yu, ZHOU Dan-dan. Selection and enrichment

of aerobic denitrifier in activated sludge system[J]. *Journal of Hunan Science and Technology University*, 2005, 20(2):80-83.

- [9] 白 岚, 杜继煜. 蔬菜中硝态氮含量的测定[J]. *农业与技术*, 2002, 22(6):107-110.

BAI Lan, DU Ji-yu. Determination of nitrate nitrogen in vegetable[J]. *Agriculture & Technology*, 2002, 22(6):107-110.

- [10] 曹喜涛. 畜禽粪便堆制过程中氮素损失及接种异养亚硝化细菌的初步研究. 南京农业大学硕士论文[D]. 南京: 南京农业大学, 2004.

CAO Xi-tao. Nitrogen losses and inoculation with heterotrophic nitrifier during the compost of livestock and poultry manure. Masteral Dissertation of Nanjing University of Agriculture[D]. Nanjing: Nanjing University of Agriculture, 2004.

- [11] 许静安, 潘振玉. 分析测试方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.

XU Jing-an, PAN Zhen-yu. Analysis and measurement methods[M].

Beijing: Chemical Industry Press, 2000.

- [12] 中科院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.

Institute of the Chinese Academy of Sciences Microbial Bacteria Classification unit. The methods for normal bacteria [M]. Beijing: Science Press, 1978.

- [13] Robertson L A, Kuenen J G. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in thiosphaerapantotropha and other bacterial[J]. *An. Van Leeuwenhoek*, 1990, 56:289-299.

- [14] 李丛娜, 吕锡武, 等. 同步硝化反硝化脱氮研究[J]. *给水排水*, 2001, 27(1):22-24.

LI Cong-na, LV Xi-wu, et al. Study on nitrogen removal by simultaneous nitrification and denitrification [J]. *Water & Wastewater Engineering*, 2001, 27(1):22-24.



## 2009 年《农业环境科学学报》

《农业环境科学学报》是由农业部主管, 农业部环境保护科研监测所、中国农业生态环境保护协会主办的全国性学术期刊。本刊是中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊, 列于被引频次最高的中国科技期刊 500 名之内并入编《中国学术期刊(光盘版)》。本刊还被国外多家著名检索机构收录, 如美国《化学文摘》(CA) 和俄罗斯《文摘杂志》(AJ), 美国《剑桥科学文摘社网站: 水系统、水科学与渔业文摘、环境工程、水资源文摘及环境科学与污染管理》等 7 种国际检索系统列为来源期刊。本刊主要刊登农业生态环境科学领域具有创新性的研究成果, 包括新理论、新技术和新方法。读者对象为从事农业科学、环境科学、林业科学、生态学、医学和资源保护等领域的科技人员和院校师生。

《农业环境科学学报》为月刊, 大 16 开, 216 页, 每本定价 40.00 元, 全年定价 480.00 元。国内外公开发行, 全国各地邮局征订, 邮发代号 6-64。如读者在当地邮局漏订, 可通过邮局汇款至本刊编辑部补订。

编辑部地址: 300191 天津市南开区复康路 31 号

电话: (022) 23674336, 23006209 传真: (022) 23006209

电子信箱: caep@vip.163.com 网址: www.aes.org.cn

