

畜禽粪便堆肥高温保氮菌 *Aliibacillus thermotolerans* BM62 的筛选及复壮

高君峰, 徐杰*, 王泽懿, 刘文越, 狄鲁滨, 张胜美, 陈舒, 常可鑫

(东北农业大学资源与环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 氨氧化细菌可以将 NH_3 氧化成 NO_2^- , 从而减少堆肥过程中的氨挥发, 是畜禽粪便堆肥中的理想保氮微生物。本实验在堆肥高温期样品中分离得到一株高温微好氧氨氧化细菌, 经鉴定此菌株为芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 的一个新属, 命名为 *Aliibacillus thermotolerans* BM62。在后续研究中由于反复迭代等原因, 发现其氨氧化能力有所衰退。菌株 BM62 可适应堆肥高温阶段微好氧环境进行氨氧化作用, 该特性使其在堆肥保氮中具有较高的理论研究价值和实际生产意义, 因此对该菌株氨氧化能力的复壮研究十分必要。本实验以 *Aliibacillus thermotolerans* BM62 为研究对象, 以来源环境堆肥为基础, 添加不同营养因子 (牛肉膏、蛋白胨) 作为复壮培养基, 考察不同复壮载体对菌株复壮效果的影响。实验结果表明, 菌株 BM62 在不加任何外源有机物的堆肥原环境复壮培养基的复壮效果最佳, 经复壮培养后, 该菌株氨氧化活性为 34.7 ~ 36.5 mg/L, 与其退化前氨氧化能力 (35.0 mg/L) 相当。

关键词: 畜禽粪便; 堆肥; 高温保氮菌; 筛选; *Aliibacillus thermotolerans* BM62; 复壮

畜禽粪便堆肥高温期氨挥发严重, 导致堆肥中氮损失并造成环境污染^[1-3]。将 NH_3 转化为 NO_2^- 控制氨挥发一直是堆肥研究的热点。氨氧化细菌是堆肥中将 NH_3 转化为 NO_2^- 的关键微生物, 但其大多数为中温菌, 只能在降温期发挥作用。而且, 其难培养特性导致很少纯种被分离纯化, 限制了其个体生理代谢的研究。针对此问题, 本实验筛选到一株高温微好氧氨氧化细菌, 经鉴定此菌株为芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 的一个新属, 命名为 *Aliibacillus thermotolerans* BM62。

菌种在长期的保藏过程中必然会受外界因素或自发突变的影响, 导致其某些优良性能不同程度的衰退^[4]。不可避免的菌种退化会严重影响菌种的特性和质量, 从而对相关的理论研究和实际生产应用带来严重阻碍或经济损失。因此合适有效的复壮措施研究一直是菌种资源保藏和利用过程中的必要工作^[5]。相关研究表明, 氨氧化细菌由于反复迭代等原因, 其氨氧化能力衰退明显^[6]。而且, 由于氨氧化细菌自身具有生长速率低、世代周期长、其培养

物易受异养菌感染而不易分离纯化等原因, 目前为止获得的氨氧化细菌纯培养种类极少^[7-9], 导致有关氨氧化细菌, 尤其是高温异养氨氧化细菌的菌种复壮技术鲜有报道。针对于此, 本实验同时提供此株高温微好氧氨氧化细菌 *Aliibacillus thermotolerans* BM62 的复壮方法, 为畜禽粪便堆肥的保氮处理提供持续的微生物源。

1 材料与方法

1.1 筛菌堆肥实施及筛菌过程

1.1.1 筛菌样品堆肥实施

堆肥原料为牛粪和水稻秸秆, 分别取自哈尔滨香坊区幸福乡和香坊农场。干燥的水稻秸秆剪成 1 ~ 2 cm 长的小段, 与牛粪按照 1:3.5 的质量比 (干重) 混合均匀。堆肥中总 C/N 质量比约为 30:1, 水分含量约为 65%。堆肥发酵堆规格为 1.5 m (长) × 1.5 m (宽) × 1.2 m (高)。在不同堆肥 (温度) 时期取样, 4℃ 保存备用。

1.1.2 氨氧化菌 BM62 的筛选过程

从 4 个不同温度 (45、50、58、65℃) 的堆肥样品中分别称取 5 g 样品, 分别置于装有 45 mL 的无菌水 100 mL 的锥形瓶中振荡 30 min 制成菌悬液。将菌悬液分别抽取 10 mL 分别置于装有 150 mL 富集培养基的锥形瓶中 50℃ 恒温振荡培养, 转速为

收稿日期: 2019-05-28; 录用日期: 2019-06-23

基金项目: 国家自然科学基金 (31372351)。

作者简介: 高君峰 (1982-), 男, 黑龙江省宁安市人, 硕士研究生, 实验师, 主要从事土地整治研究。E-mail: gaojunfeng@neau.edu.cn。

通讯作者: 徐杰, E-mail: xujie_neau@126.com。

150 r/min。

从培养 4 d 后的锥形瓶中分别吸取 0.5 mL 培养菌液采用涂布法分别接种于平皿（划线分离培养基）中，置于 50℃ 培养箱中微好氧倒置培养 7 d。挑取单菌落，采取平板划线法纯化单菌落。

将纯化的单菌落接种于装有 10 mL 氨氧化细菌检测培养基的试管中振荡微好氧培养 2 d，培养温度为 50℃，转速为 150 r/min。采用格里斯试剂法进行检测，阳性结果呈浅粉至深玫瑰紫色变化，表明该菌株具有氨氧化能力；阴性结果无颜色变化，表明该菌株无氨氧化能力。据此筛选出高温微好氧氨氧化细菌株，将菌种接入斜面培养后，移入冰箱 4℃ 条件下保藏。

菌株 *Aliibacillus thermotolerans* BM62 分离自 58℃ 堆肥样品。

1.1.3 本实验所需复壮氨氧化菌种 *Aliibacillus thermotolerans* BM62 代系为子五代。

1.2 培养基配方

氨氧化菌富集培养基：(NH₄)₂SO₄ 5 g, KCl 4 g, MgSO₄ 2.5 g, CaCl₂ 1.85 g, NaCl 3 g, NaHCO₃ 42 g, 蛋白胨 30 g, 牛肉膏 20 g, pH 值 =8, 蒸馏水 1 000 mL；

氨氧化菌划线分离培养基（C-2 培养基）^[6]：(NH₄)₂SO₄ 5 g, KCl 4 g, MgSO₄ 2.5 g, CaCl₂ 1.85 g, NaCl 3 g, NaHCO₃ 42 g, 蛋白胨 60 g, 牛肉膏 40 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL；

氨氧化细菌检测培养基：(NH₄)₂SO₄ 5 g, KCl 4 g, MgSO₄ 2.5 g, CaCl₂ 1.85 g, NaCl 3 g, NaHCO₃ 7.5 g, 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 1 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL；

复壮驯化培养基 I：称取堆肥样品 5 g，置于 250 mL 锥形瓶中加入 150 mL 蒸馏水制成培养悬液，调节 pH 值 =8，3 个平行样，瓶身分别标记 A1、A2、A3；

复壮驯化培养基 II：称取堆肥样品 5 g，另加入 4 g 牛肉膏和 6 g 蛋白胨，置于 250 mL 锥形瓶中加入 150 mL 蒸馏水制成培养悬液，3 个平行样，瓶身分别标记 6A1、6A2、6A3；

复壮驯化培养基 III：称取堆肥样品 5 g，另加入 8 g 牛肉膏和 12 g 蛋白胨，置于 250 mL 锥形瓶中加入 150 mL 蒸馏水制成培养悬液，3 个平行样，瓶身分别标记 12A1、12A2、12A3；

氨氧化细菌种子培养基^[6]：(NH₄)₂SO₄ 5

g, KCl 4 g, MgSO₄ 2.5 g, CaCl₂ 1.85 g, NaCl 3 g, NaHCO₃ 42 g, 蛋白胨 60 g, 牛肉膏 40 g, pH 值 =8, 蒸馏水 1 000 mL；

氨氧化细菌检测培养基^[6]：(NH₄)₂SO₄ 5 g, KCl 4 g, MgSO₄ 2.5 g, CaCl₂ 1.85 g, NaCl 3 g, NaHCO₃ 7.5 g, 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 1 g, pH 值 =8, 蒸馏水 1 000 mL。

1.3 检测试剂（格里斯试剂^[10]）

A 液：对氨基苯磺酸溶液：称取 4 g 对氨基苯磺酸溶于 700 mL 水和 300 mL 冰乙酸中，混匀置于棕色瓶，室温保存。B 液：N-1-萘基乙二胺盐酸盐溶液：称取 N-1-萘基乙二胺盐酸盐加入 1 L 的 60% 的乙酸溶液中混匀，置于棕色瓶中，4℃ 保存，保质期为 7 d。

检测时加入样液（培养液）5 mL，格里斯试剂先加 A 液 2 mL 充分混匀，再加 B 液 1 mL 充分混匀。待测样品变为玫紫色或玫红色说明样液中菌种的氨氧化能力强；待测样品变为浅粉色说明样液中菌种的氨氧化能力较强；待测样品变为淡黄色说明样液中菌种的氨氧化能力较弱；待测样品无颜色变化说明样液中菌种近乎无氨氧化能力。

1.4 氨氧化细菌菌种复壮

1.4.1 菌株驯化培养

将待复壮的菌株 *Aliibacillus thermotolerans* BM62（子二代）接种于氨氧化细菌种子培养基，50℃、100 r/min 培养，培养到浓度为 D₆₀₀=0.1 ~ 0.15 得到种子液，种子液按体积比种子液：复壮驯化培养基 1：10 接入复壮驯化培养基中，50℃、100 r/min 条件下恒温振荡培养到浓度为 D₆₀₀=0.1 ~ 0.15 后，取上清菌液按体积比上清菌液：氨氧化细菌检测培养基 1：10 接入氨氧化细菌检测培养基，50℃、100 r/min 条件下恒温振荡培养 3 d。利用格里斯试剂显色法进行氨氧化能力检测。

1.4.2 驯化培养后细菌的分离纯化

(a) 平皿涂布培养：取氨氧化能力显色试验结果呈玫红色和玫紫色的复壮培养菌液，进行平皿涂布培养，平皿涂布培养基为氨氧化细菌固体培养基，50℃ 恒温静止倒置培养 5 d；

(b) 平皿划线培养：选取步骤 (a) 所得平皿涂布培养中菌落长势良好的平皿，挑取独立菌落在氨氧化细菌固体培养基上进行平皿划线培养，50℃ 恒温静止倒置培养 5 d；

(c) 单菌落检测: 单菌落划线平皿中挑选出长势良好的平皿, 挑取独立菌落接入氨氧化细菌种子培养基, 50℃、100 r/min 条件下恒温振荡培养 2 d 得种子液, 调整种子液浓度为 $D_{600}=0.1 \sim 0.15$, 按体积比种子液: 氨氧化细菌检测培养基为 1:10 接种至氨氧化细菌检测培养基, 50℃、100 r/min 条件下恒温振荡培养 3 d, 利用格里斯试剂显色法进行单菌落氨氧化能力显色检测。

1.4.3 复壮有效菌种的氨氧化活性测定

取单菌落氨氧化能力显色检测结果呈玫红色即氨氧化能力强的菌落, 将其在步骤 1.4.2 中 (c) 得到的种子液按体积比种子液: 氨氧化细菌种子培养基为 1:10 接种至氨氧化细菌种子培养基, 50℃、100 r/min 条件下恒温振荡培养 2 d 后, 调整到浓度为 $D_{600}=0.1 \sim 0.15$, 按照体积比培养液: 氨氧化细菌检测培养基为 1:10 接种至氨氧化细菌检测培养基, 50℃、100 r/min 条件下恒温振荡培养 3 d, 测定亚硝酸盐含量, 评估其氨氧化活性。

氨氧化活性的计算方法:

亚硝酸钠标准曲线绘制: 用分光光度计在波长 540 nm 处比色。以光密度 (OD) 为横坐标, 亚硝酸根浓度为纵坐标, 绘制标准曲线。测定复壮有效菌株在氨氧化细菌检测培养基培养 3 d 后 540 nm 处的吸光度值, 根据亚硝酸钠的标准曲线方程得出其亚硝酸钠浓度, 用亚硝酸钠浓度值代表相应菌株的氨氧化活性值。

1.5 菌株 BM62 的鉴定

1.5.1 菌落形态观察

将菌株 BM62 划线接种于 C-2 培养基, 50℃ 培养 5 d, 观察菌落形态。

1.5.2 菌体形态观察

利用电子扫描显微镜 (model CX31-2; Olympus) 观察菌株 BM62 菌体形态。

1.5.3 化学分类分析

菌株 BM62 的细胞化学分析, 包括: G+C% 含量、脂肪酸成分、极脂组成、呼吸醌类型和肽聚糖的特征氨基酸, 以上指标均由德国菌种保藏中心 (DSMZ) 测定。

1.5.4 分子鉴定及同源性比较分析

将菌株 BM62 保藏斜面送至上海生工测定其 16S rDNA 序列。将测得的该菌株的 16S rDNA 序列利用 Blast 软件中的 nucleotide blast 与 GenBank、EMBL 及 DDBJ 等数据库中的已知序列进行比对,

得出菌株 BM62 与其它相关的菌株的 16S rDNA 序列相似性。再用 ClustalW2 软件包 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) 进行多序列匹配排列。采用 MEGA version 6.0 软件构建系统发育树^[11]。选择最大似然法 (maximum-likelihood)^[12] 对系统进化树进行估算, 通过 1 000 次取样确定其 Bootstrap 值。

2 结果与分析

2.1 菌株 BM62 的筛选过程

从不同温度的堆肥样品中共分离纯化获得 45 株异养氨氧化细菌, 其中 12 株分离自 45℃ 堆肥样品, 9 株分离自 50℃ 堆肥样品, 16 株分离自 58℃ 堆肥样品, 8 株分离自 65℃ 堆肥样品。其中分离自 58℃ 堆肥样品的菌株 BM62 的氨氧化能力显色实验的颜色变化最为明显, 呈深紫色 (图 1)。随后对菌株 BM62 进行氨氧化能力的定量检测, 其在氨氧化细菌检测培养基中培养 18 h 后 NO_2^- 浓度为 3.81 mg/L, 与 Mével 等^[13] 在深海热泉口分离的一株异养嗜热氨氧化菌的氨氧化能力相当。因此, 本实验对此株嗜热异养氨氧化细菌 BM62 进行进一步的鉴定研究。

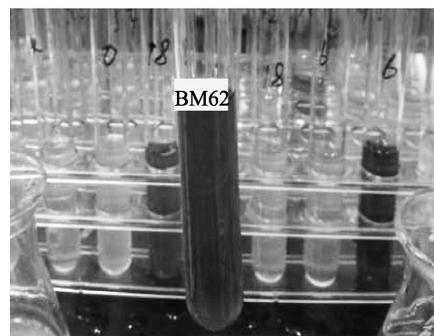


图 1 菌株 BM62 的氨氧化能力检测显色
注: 紫色: 阳性; 无色: 阴性。

2.2 菌株 BM62 的鉴别特征

菌株 BM62 具芽孢, 革兰氏染色阴性, 菌体细胞呈杆状, 长约 2 ~ 2.5 μm , 宽约 0.3 ~ 0.6 μm , 具鞭毛 (图 2)。微好氧, 接触酶阳性和氧化酶阴性。该菌株在 50℃ 的生长和氨氧化能力最强。在 C-2 培养基上培养 5 d, 菌落直径扩展约为 2 mm, 菌落呈边缘整齐的圆形, 菌落质地湿润、光滑 (图 3)。

16S rRNA 分子鉴定结果显示, 该菌株的 16S rRNA 序列 (登记号 KT999394) 与其最近的菌株

Alteribacillus persepolensis HS136^T 的 16S rRNA 序列相似性仅有 94.53%^[14], 根据现有界定新种属的规定, 16S rRNA 序列相似性在 90% ~ 95% 为新属^[15], 这就表明菌株 BM62^T 很有可能是具有氨氧化能力的新属细菌。因此, 本实验室继续对该菌株做了更加系统详尽的菌株鉴定试验, 主要鉴定结果如下: G+C (36.5%); 主要脂肪酸为 iso-C_{16:0}; 主要极脂组成为双磷脂酰甘油 (diphosphatidylglycerol)、磷脂 (phospholipid) 和磷脂酰甘油 (phosphatidylglycerol); 呼吸醌为 MK-7 (100%); 二氨基庚二酸 (*meso*-diaminopimelic acid) 为肽聚糖的特征氨基酸, 这些主要的生理生化指标均显示菌株 BM62^T 与其最相近的其他菌株有明显差异。菌株 BM62^T 与其遗传关系最近的 3 株细菌的主要性状比较见表 1 和表 2, BM62^T 的系统进化树见图 4。据此, 拟将菌株 BM62 划分为芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 的新属, 命名为 *Aliibacillus thermotolerans*。该菌株现已保存在 DSMZ (德国) 和 CGMCC (中国), 保藏号分别为 DSM 101851^T 和 CGMCC 1.15790^T。

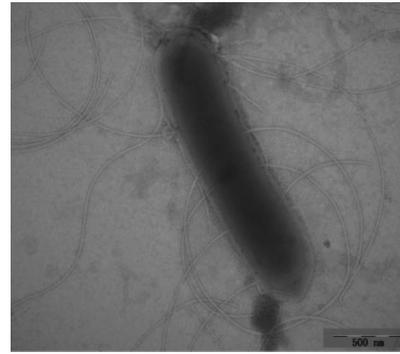


图 2 菌株 BM62T 菌体透射电镜照片

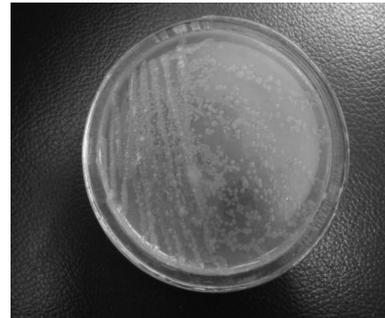


图 3 菌株 BM62 培养 5 d 后的菌落

表 1 菌株 BM62 与其遗传关系最近的 3 株细菌的主要性状比较

比较特征	1	2	3	4
细胞大小 (μm)	(0.3 ~ 0.6) × (2 ~ 2.5)	(0.5 ~ 0.9) × (1.2 ~ 2.5)	(1.0 ~ 1.5) × (2.5 ~ 3.0)	(0.8 ~ 0.96) × (1.8 ~ 3.5)
运动性	+	+	+	-
盐度 (最适) (% , w/v)	0 ~ 4 (2 ~ 3)	2.5 ~ 15 (5 ~ 7.5)	5 ~ 20 (10)	0.5 ~ 12.5 (5 ~ 7.5)
温度 (最适) (°C)	35 ~ 65 (50)	25 ~ 45 (40)	25 ~ 45 (40)	25 ~ 40 (35)
pH (最适)	7 ~ 10 (7)	7 ~ 10 (7.5)	7 ~ 10 (8.0 ~ 8.5)	6.5 ~ 10 (7)
硝酸盐还原	-	+	-	+
		水解实验		
吐温 80	-	-	+	-
酪蛋白	-	-	+	+
七叶苷	+	-	-	-
		产酸实验		
D- 葡萄糖	+	-	+	-
D- 半乳糖	+	-	-	-
D- 果糖	+	-	-	-
乳糖	-	-	-	-
麦芽糖	+	-	-	-
D- 甘露醇	+	+	-	+
呼吸醌	MK-7	MK-7, MK-6, MK-5	MK-7	MK-7, MK-8 (88:2)
DNA G+C 含量 (%)	36.5	42.4	37.1	38.9

注: 菌株编号: 1, BM62; 2, *Alteribacillus iranensis* X5B^T[16-17]; 3, *Alteribacillus persepolensis* HS136^T[14]; 4, *Alteribacillus bidgolensis* P4B^T[18]; + 为阳性; - 为阴性。

表2 菌株 BM62 与其遗传关系最近的 3 株细菌的主要脂肪酸组分和含量 (%)

脂肪酸组分	1	2	3	4
iso-C _{14:0}	6.0	0.5	0.9	1.7
C _{14:0}	0.6	1.2	1.0	0.3
iso-C _{15:0}	12.9	21.8	62.2	24.4
anteiso-C _{15:0}	11.1	43.4	21.0	24.3
iso-C _{16:0}	45.4	1.6	1.4	6.2
C _{16:0}	8.7	7.9	3.6	6.7
iso-C _{17:0}	3.3	10.2	3.9	12.5
anteiso-C _{17:0}	6.2	9.4	3.5	16.1
C _{16:1ω11c}	—	0.8	2.0	—
C _{18:1ω9c}	0.3	8.0	—	3.1

注：菌株编号同表 1；“—”表示未检出。

由于对菌株 BM62 的研究过程中需要不断地反复迭代，在此过程中发现其氨氧化能力衰退明显。鉴于该菌株具有难得的高温氨氧化特性，保持其稳

定的氨氧化能力意义重大。目前有关氨氧化细菌，尤其是高温异养氨氧化细菌的菌种复壮技术鲜有报道，因此本实验同时对菌株 BM62 氨氧化能力的复壮技术进行探讨。

2.3 驯化复壮后菌株的显色情况

将菌株 BM62 制成种子液，接种到不同处理的复壮培养基中，驯化培养后进行氨氧化能力显色检测，结果见表 3。

结果显示，未经复壮的 BM62 的氨氧化能力显色实验呈浅红色，经复壮驯化后的菌株中呈玫红色和玫紫色的复壮培养菌液共有 3 瓶，瓶身标记分别为 A1、A2、A3，均为未添加外源营养的复壮驯化培养基 I 培养，其余添加不同含量有机质的 6 瓶复壮培养液（瓶身标记分别为 6A1、6A2、6A3、12A1、12A2、12A3）显色检测结果较淡或几乎不显色，说明添加外源有机营养（牛肉膏、蛋白胨）并不利于此株氨氧化细菌的氨氧化能力复壮，因此这 6 瓶复壮培养液不进行后续实验。

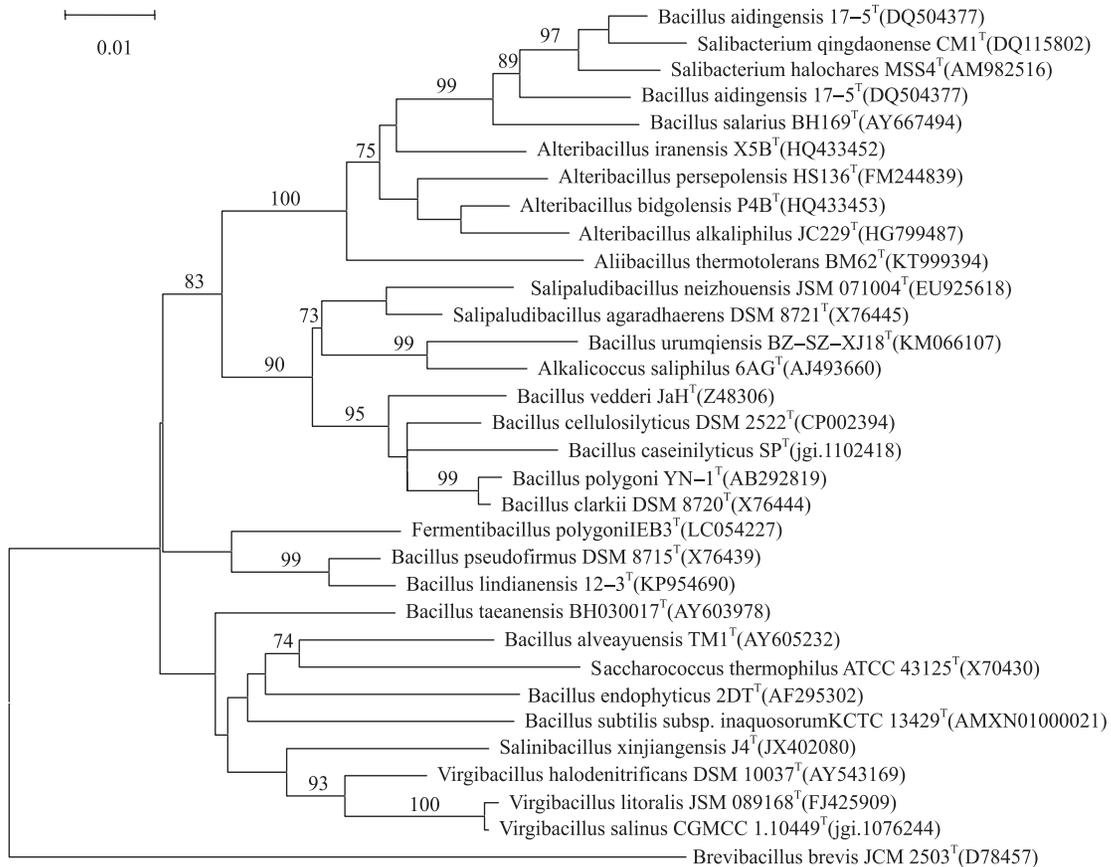


图 4 菌株 BM62 与其进化关系相近种属的系统进化树（最大似然法）

表3 菌株 BM62 驯化复壮后氨氧化能力检测显色

复壮培养基编号	显色情况
A1	玫紫色
A2	玫红色
A3	玫紫色
6A1	浅红色
6A2	淡黄色
6A3	淡黄色
12A1	未显色
12A2	淡黄色
12A3	未显色
未经复壮的 BM62	浅红色

2.4 驯化复壮后的分离纯化

将氨氧化能力显色实验呈玫红色和玫紫色编号为 A1、A2、A3 的培养液分别进行平皿涂布培养及平皿划线培养，其培养情况见表 4。经平皿涂布培养后，选择其中 15 个大而独立的菌落，编号分别为 A1-1-1、A1-1-2、A1-1-3、A1-2-1、A1-2-2、A1-2-3、A2-2-1、A2-2-2、A2-2-3、A2-3-1、A2-3-2、A2-3-3、A3-1-1、A3-1-2、A3-1-3，进一步进行划线培养纯化。

表4 菌株 BM62 驯化复壮后的分离纯化情况

平皿涂布培养基编号	长势情况	平皿划线培养菌落编号 (挑取长势好的涂布培养基，每个平皿选 3 个大而独立菌落划线培养)	
		平皿划线培养基编号	长势情况
A1 (3 次重复)	A1-1	好	A1-1-1、A1-1-2、A1-1-3
	A1-2	好	A1-2-1、A1-2-2、A1-2-3
	A1-3	一般	—
A2 (3 次重复)	A2-1	一般	—
	A2-2	好	A2-2-1、A2-2-2、A2-2-3
	A2-3	好	A2-3-1、A2-3-2、A2-3-3
A3 (3 次重复)	A3-1	好	A3-1-1、A3-1-2、A3-1-3
	A3-2	一般	—
	A3-3	一般	—

2.5 驯化复壮后的单菌落氨氧化能力检测

从 15 个单菌落划线平皿中挑选出 6 个菌落长势良好的平皿，编号分别为 A1-1-1、A2-2-1、A2-2-2、A2-3-3、A3-1-1、A3-1-2，每个平皿分别挑取 2 个大而独立的菌落接入氨氧化细菌种子培养基，共得到 12 瓶复壮后的种子液，分别编号为 AF1、AF2、AF3、AF4、AF5、AF6、AF7、AF8、AF9、AF10、AF11、AF12，调整种子液浓度为 $D_{600}=0.1 \sim 0.15$ ，接种至氨氧化细菌检测培养基，振荡培养 3 d 后进行氨氧化能力显色检测，结果见表 5。单菌落氨氧化能力显色检测结果呈玫红(紫)色的即氨氧化能力强的菌落共 6 个，编号分别为 AF1、AF2、AF6、AF7、AF8、AF10。

2.6 复壮有效菌种的氨氧化活性测定

分别测定该 6 株优选菌株在氨氧化细菌检测培养基培养 3 d 后在 540 nm 处的吸光值，根据亚硝酸钠的标准曲线方程得出其亚硝酸钠浓度，用亚硝酸钠浓度值代表相应菌株的氨氧化活性值，结果见表 6。

表5 单菌落氨氧化能力检测显色

平皿划线培养基编号	检测菌落编号	显色检测结果
A1-1-1	AF1	玫红色
	AF2	玫紫色
A2-2-1	AF3	淡红色
	AF4	淡黄色
A2-2-2	AF5	淡紫色
	AF6	玫红色
A2-3-3	AF7	玫紫色
	AF8	玫紫色
A3-1-1	AF9	淡黄色
	AF10	玫红色
A3-1-2	AF11	淡红色
	AF12	淡紫色

表6 复壮优选 6 菌株培养 3 d 后的氨氧化活性 (mg/L)

菌株编号	AF1	AF2	AF6	AF7	AF8	AF10
氨氧化活性	36.5 ± 1.42	32.1 ± 0.86	30.6 ± 1.13	31.5 ± 0.94	34.7 ± 0.76	30.8 ± 1.47

其中菌株 AF1 和 AF8 的氨氧化活性分别为 36.5 和 34.7 mg/L, 与菌株 BM62 退化前的氨氧化能力 (用同样的方法检测计算得 35.0 mg/L) 相当, AF1 和 AF8 为此方法筛选所得复壮有效菌种。

3 讨论

高温堆肥是实现畜禽粪便减量化、无害化和资源化的有效措施^[19-20]。然而, NH₃ 挥发为主的氮素严重损失是目前畜禽粪便高温堆肥技术面临的瓶颈问题。NH₃ 快速转化为 NO₂⁻ 是目前公认的降低堆肥中氮素损失的技术途径之一, 氨氧化细菌可以将 NH₃ 氧化成 NO₂⁻, 从而减少堆肥过程中的氨挥发, 是畜禽粪便堆肥中的理想保氮微生物^[6]。*Aliibacillus thermotolerans* BM62 是本实验室在牛粪水稻秸秆堆肥高温期分离得到的一株耐高温异养氨氧化细菌, 经鉴定此菌株为芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 的一个新属。该菌株在 50℃ 生长活力和氨氧化能力最强, 最重要的是, 该菌株具有微好氧特性, 可以完全适应堆肥高温阶段的低溶氧环境。许多相关报道表明, NH₃ 挥发主要发生在堆肥的高温期, 在此阶段的释放量可占到总挥发量的 60% ~ 70%^[21-22], 然而绝大多数的氨氧化细菌均为中温好氧菌, 它们只能在堆肥降温期发挥作用。由此可见, 菌株 *Aliibacillus thermotolerans* BM62 适应堆肥高温阶段的氨氧化能力使其具有极高的理论研究价值和实际生产意义。

然而, 研究过程中发现, *Aliibacillus thermotolerans* BM62 在传代过程中的氨氧化能力退化较为明显, 因此对其功能复壮工作也显得尤为必要和紧迫。常用的菌种复壮方法有菌种纯化、更换适宜的培养基、控制菌种的传代次数、采用适宜的保藏方法等^[4]。由于菌株 BM62 具有氨氧化菌不易培养的特性^[8, 23], 其对培养基成分要求相对较高, 因此, 相对于其他的复壮措施, 更换适宜培养基的方法更加有利于提高菌株 BM62 的复壮效果。菌株 BM62 在传代中的功能退化, 除了菌株自身遗传学和细胞学原因以外, 人工培养基成分与堆肥原环境营养的差异也是重要影响因素。本实验的复壮结果也表明, 菌株 BM62 在不加任何外源有机物的堆肥原环境复壮培养基的复壮效果最佳, 而添加外源有机物的堆肥原环境营养对该菌株的复壮并没有明显的促进作用。由此可以推测, 堆肥原环境的样品中含有促进菌株 BM62 生长和维持氨氧化能力的必需营养

物质, 而这些营养物质的具体成分还有待于进一步检查验证。

4 结论

本实验在堆肥高温期样品中筛选得到一株高温异养氨氧化细菌 BM62, 经鉴定该菌株为厚壁菌门 (*Firmicutes*) 芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 的一个新属细菌, 暂命名为 *Aliibacillus thermotolerans* BM62。

本研究同时提供了该株氨氧化细菌 BM62 的简单易行的氨氧化能力复壮方法。

菌株 BM62 在不加任何外源有机物的堆肥原环境复壮培养基的复壮效果最佳, 经复壮培养后, 该菌株氨氧化活性为 34.7 ~ 36.5 mg/L, 与其退化前氨氧化能力 (35.0 mg/L) 相当。

参考文献:

- [1] Kithome M, Paul J W, Bomke A A. Reducing nitrogen losses during simulated composting of poultry manure using adsorbents or chemical amendments [J]. *Journal of Environmental Quality*, 1999, 28: 194-201.
- [2] Liang Y, Leonard J J, Feddes J J R, et al. Influence of carbon and buffer amendment on ammonia volatilization in composting [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 748-761.
- [3] Zhao Q, Zhang MY, Liu Y, et al. Study on the nitrogen transforming regulation during the pig dung compost. [J] *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2008, (2): 58-60.
- [4] 钟杰, 左泽彦. 菌种保藏方法研究 [J]. *山东化工*, 2018, 47 (7): 60-61.
- [5] 张千, 徐晓晨, 王超, 等. Anammox 菌干粉菌剂制备与保藏技术 [J]. *中国环境科学*, 2017, 37 (12): 4630-4636.
- [6] Shimaya C, Hashimoto T. Improvement of media for thermophilic ammonia-oxidizing bacteria in compost [J]. *Soil Sci Plant Nutr*, 2008, 54 (4): 529-533.
- [7] Daum M, Zimmer W, Papen H, et al. Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida* [J]. *Current Microbiology*, 1998, 37 (4): 281-288.
- [8] 于少兰, 乔延路, 韩彦琼, 等. 好氧氨氧化微生物系统发育及生理生态学差异 [J]. *微生物学通报*, 2015, 42 (12): 2457-2465.
- [9] Geneviève M, Daniel P. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions [D]. *Can. J. Microbiol*, 2000.
- [10] 耿丽娜. 格里斯试剂比色法测定亚硝酸盐的改进 [J]. *数理医药学杂志*, 2001, 14 (1): 65.
- [11] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30: 2725-2729.

- [12] Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach [J]. *J Mol Evol* 1981, 17: 368–376.
- [13] Mével G, Prieur D. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions [J]. *Can J Microbiol*, 2000, 46: 465–473.
- [14] Amoozegar MA, Sánchez–Porro C, RohbaR, et al. *Bacillus persepolensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009, 59: 2352–2358.
- [15] Thuy T A, Flynn W. Picardal. *Desulfocarbo indianensis* gen. nov., sp.nov., a benzoate–oxidizing, sulfate–reducing bacterium isolated from water extracted from a coal bed [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014, 64: 2907–2914.
- [16] Bagheri M, Didari M, Amoozegar M A, et al. *Bacillus iranensis* sp.nov., a moderate halophile from a hypersaline lake [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012, 62: 811–816.
- [17] Azmatunnisa B M, Varshini V, Rahul K, et al. Description of *Alteribacillus alkaliphilus* sp. nov., reassignment of *Bacillus iranensis* (Bagheri et al. 2012) as *Alteribacillus iranensis* comb. nov. and emended description of the genus *Alteribacillus* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016, 66: 4772–4778.
- [18] Didari M, Amoozegar MA, Bagheri M, et al. *Alteribacillus bidgolensis* gen. nov., sp.nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake, and reclassification of *Bacillus persepolensis* as *Alteribacillus persepolensis* comb. nov [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012, 62: 2691–2697.
- [19] Zeng G M, Zhang L H, Dong H R, et al. Pathway and mechanism of nitrogen transformation during composting: Functional enzymes and genes under different concentrations of PVP–AgNPs [J]. *Bioresource Technology*. 2018, 253: 112–120.
- [20] Mayur S, Rohit J, Ajay S, et al. Biochar amendment for batch composting of nitrogen rich organic waste: Effect on degradation kinetics, composting physics and nutritional properties [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 253: 204–213.
- [21] 马丽红, 黄懿梅, 李学章, 等. 牛粪堆肥化中氮素形态与微生物生理群的动态变化和耦合关系 [J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28 (12): 2674–2679.
- [22] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展 [J]. *生态学报*, 2009, 29 (1): 406–415.
- [23] 陈岭. 氨单加氧酶基因 *amoA* 在氨氧化细菌菌种群分析和定量检测中的应用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.

Screening and rejuvenation of nitrogen-resistant thermophilic bacteria *Aliibacillus thermotolerans* BM62

GAO Jun-feng, XU Jie*, WANG Ze-yi, LIU Wen-yue, DI Lu-bin, ZHANG Sheng-mei, CHEN Shu, CHANG Ke-xin (College of Resources and Environmental Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: Ammonia-oxidizing bacteria (AOB) are of great importance as these nitrifiers oxidize NH_3 to NO_2^- and reduce the loss of NH_3 by volatilization in thermophilic phases during composting, making them ideal potential organisms for animal waste disposal. A thermophilic and micro-aerobic AOB was screened from the sample of high temperature composting. Data from this polyphasic taxonomy study suggested that strain BM62 should be classified as the type species of a new genus within the family *Bacillaceae* for which the name *Aliibacillus thermotolerans* is proposed. However, its ammonia oxidation capability declined significantly due to repeated iterations and other reasons. *Aliibacillus thermotolerans* BM62 can carry out ammonia oxidation in the micro-aerobic environment during the high-temperature stage of composting. This characteristic makes it highly theoretically valuable and practically meaningful for nitrogen conservation in compost, therefore, it is necessary to study the rejuvenation of the ammonia oxidizing ability of strain BM62. So, strain BM62 was selected as the research object, and different nutrient factors (beef extract, peptone) were added to the source environment compost medium as the rejuvenation medium. The purpose of this paper was to investigate the effects of different rejuvenation medium on ammoxidation ability rejuvenation of the strain. The results showed that strain BM62 had the best rejuvenation effect in composting environment rejuvenation medium without any exogenous organic matter. After rejuvenation culture, the ammoxidation activity of the strain BM62 was 34.7 ~ 36.5 mg/L, which was equivalent with the ammoxidation capacity (35.0 mg/L) before it was degraded.

Key words: livestock manure; compost; nitrogen-resistant thermophilic bacteria; screening; *Aliibacillus thermotolerans* BM62; rejuvenation method