

养鸡发酵床垫料中氨氮降解菌的分离及鉴定

徐庆贤¹, 刘 芸², 罗晓建^{2,3}, 阮传清^{2*}

(1. 福建省农业科学院农业工程技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003; 3. 福州理工学院, 福建 连江 350504)

摘要: 氨气主要来源于鸡粪, 是养鸡场最常见和危害最大的恶臭气体之一, 危害鸡的生长与发育, 给养殖生产带来损失。使用氨氮降解菌可减少氨气的产生。以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源, 从养鸡场发酵床垫料分离得到 4 株氨氮降解菌。通过 16S rDNA 序列分析, 菌株 FJAT-FJAT-56390 和 FJAT-56388 属于纤维微细菌属 (*Cellulosimicrobium*), 与纤维微水合菌 *Cellulosimicrobium aquatile* strain 3bp (NR146008) 同处于系统发育树最小分枝。菌株 FJAT-56389 则与蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* ATCC 1459 (NR074540) 最相似。与菌株 FJAT-56387 最相似的是解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (MK182997)。采用水杨酸分光光度法测定培养基氨氮浓度变化, 结果表明, 接菌 96 h 后, 菌株 FJAT-54390 对氨氮去除率达 84%, 与 FJAT-56387 的去除率 (79%) 无显著差异 ($p = 0.1631$), 显著 ($p = 0.001$) 高于其它 2 株菌对氨氮的去除率 (57% 和 76%), 显示菌株 FJAT-54390 具有较高的氨气减排潜力, 值得深入研究。

关键词: 发酵床; 氨氮降解; 纤维微细菌属; 芽孢杆菌属

中图分类号: TS275; X713 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1166(2024)01-0042-05

DOI: 10.20022/j.cnki.1000-1166.2024010042

Isolation and Identification Bacteria for Efficient Removal of Amine Nitrogen from Fermentation Mattress Material / XU Qingxian¹, LIU Yun², LUO Xiaojian^{2,3}, RUAN Chuanqing^{2*} / (1. Agricultural Engineering Technology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 2. Agricultural Bioresources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 3. Fuzhou Institute of Technology, Lianjiang 350504, China)

Abstract: Ammonia emissions is one of the most common and harmful odors produced by poultry manure in chicken farms, causing losses to production. Using bacteria with function of degrading ammonia nitrogen can inhibit the ammonia emissions. In this study, 4 bacterial strains were isolated from chicken-raising fermentation material using culture medium with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the sole nitrogen source. Based on phylogenetic analysis of 16SrDNA sequences, strains FJAT-56390 and FJAT-56388 belong to the genus *Cellulosimicrobium*, and they are grouped together with *C. aquatile* strain 3bp (NR146008) at a same basal clade of the phylogenetic tree. The strain FJAT-56389 is the most similar to *Bacillus cereus* ATCC 1459 (NR074540), with FJAT-56387 to *Bacillus amyloliquefaciens* (MK182997) in the phylogenetic tree. The concentration changes of ammonia nitrogen of media were measured by the method of salicylic acid spectrophotometry. The removal rate of ammonia nitrogen was 84% by FJAT-54390 in 96 hours, nonsignificantly higher than 79% of removal rate by FJAT-56387 ($p = 0.1631$), and significantly higher than that by the other two strains with removal rates of 57% and 79%. This study indicates that FJAT-54390 is a promising microbial agent to mitigate ammonia emissions and it is worthy of further research.

Key words: fermentation mattress; removal of ammonia; *Cellulosimicrobium*; *Bacillus*

氨气是最常见和危害最大的畜禽粪便恶臭气体之一。它会诱发动物呼吸道疾病和应激反应, 甚至

引起动物中毒死亡^[1]。在畜禽养殖过程中, 提高粪污管理水平, 可以大幅降低氨气等恶臭气体的产生

收稿日期: 2023-07-06 修回日期: 2023-07-19

项目来源: 福建省农业科学院科技创新平台专项 (CXPT202104); 福建省科技厅公益类科研院所专项 (2020R1034009; 2021R1032003)。

作者简介: 徐庆贤 (1979-), 男, 福建周宁人, 副研究员, 主要从事畜禽粪污处理及农业废弃物资源化利用方面的研究与推广工作, E-mail: xqx591@126.com

通信作者: 阮传清, E-mail: ruanchuanqing@163.com

和病菌传播。微生物发酵床养殖技术是一种畜禽粪污管理模式,它将稻壳、锯末、秸秆等作物废弃物粉碎,做成垫料层铺设于养殖舍地面,再将动物养殖于垫料层上^[2]。动物排放的粪便被垫料吸附、掩盖,并在微生物的作用下消解,避免粪便污染环境^[2]。采用发酵床法养鸡,在养殖过程中不需要对鸡粪进行人工清扫和贮存,也不用建沼气池、污水池和粪场,运行良好时可大幅降低氨气等恶臭气体,减小氨气对鸡健康的影响,已在鸡的养殖中得到推广应用^[3-4]。

微生物是发酵床良好运行的关键,人工加入微生物可以调节菌群结构、缩短发酵周期、提高发酵床运行质量,降低有害气体的产生^[5]。刘志云^[1]等以硫酸铵为唯一氮源,从鸡粪中分离的克柔假丝酵母(*Candida Krusei*),再回接到鸡粪中,最高可降低22.3%的氨氮含量和减少15.92%的氨气挥发量。张宏才^[6]等从鸡粪中筛选氨氮降解菌,发现红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*) 在30℃、pH值7.0、接种量为12%时,氨气减排率可达66.73%。因此,添加氨氮降解菌可有效降低氨气排放,且不同的菌株对氨气的减排效果不同。

由于鸡的消化道短,粪尿合一的排泄方式使得鸡粪更易产生氨气。有研究表明,鸡粪中的氨态氮是牛粪中的1.5倍,猪粪中的4倍^[7]。此外,在我国南方地区,夏季温度高,鸡发酵床垫料不宜铺设太厚,这使得养殖过程中氨气的控制更加困难。因此,筛选高效氨氮降解菌对鸡粪氨气减排具有重要意义,为制备理想的发酵床复合菌剂,抑制鸡舍氨气的产生提供菌种资源。由于发酵床垫料不仅是微生物分解鸡粪的场所,同时也为微生物提供碳源,从鸡粪发酵床垫料中分离的氨氮降解菌除了有氨氮降解功能以外,可能还会分泌纤维素、木质素水解酶。所以,本研究从养鸡发酵床采集垫料,通过富集、分离和氨氮降解效果测定,获得氨氮降解菌,为进一步研发发酵床复合菌剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 垫料样品

2022年11月14日在福建省顺昌县某发酵床养鸡场采集垫料样品。养鸡大棚面积1000 m²,发酵床垫料厚度40 cm,鸡品种为“优公”,26日龄。按5点采样法,在发酵床表面采集垫料,混合均匀,

装入干净的自封袋,标记,用实验冰袋冷藏带回实验室,保存冰箱4℃冷藏备用。

1.1.2 主要培养基及试剂

氨氮降解菌富集培养基^[1]: 葡萄糖5 g、硫酸铵2.5 g、氯化钠2 g、七水硫酸亚铁0.4 g、磷酸氢二钾1 g、七水硫酸镁0.5 g,调节pH值至7.2~7.4,加入蒸馏水至1 L,分装至500 mL三角瓶,121℃灭菌20 min,备用。

氨氮降解菌分离平板: 在氨氮降解菌富集培养基配方的基础上,按17 g·L⁻¹浓度加入琼脂,121℃灭菌20 min,冷却至50℃倒平板备用。

主要试剂: Biospin 细菌基因组DNA提取试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司); PCR扩增试剂(上海生工生物工程服务有限公司); 16S rDNA扩增引物(正向引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3',上海生物工程有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株富集、分离、纯化

取垫料样品10 g,加入装有90 mL灭菌水的三角瓶(灭菌前瓶中装入玻璃珠),涡漩混合,再将三角瓶置于25℃,150 r·min⁻¹震荡30 min,取出静置20 min,移取上清液5 mL至装有100 mL富集培养基的三角瓶中,放置于30℃,150 r·min⁻¹摇床培养2 d。从培养液吸取5 mL,转移到新鲜富集培养基继续培养2 d,如此连续转移培养5代。处理设3个重复。

吸取最后一次培养液1 mL,用无菌水稀释10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷倍后,取0.1 mL涂布于分离平板上,在30℃培养箱中培养48 h。取出平板,观察菌落大小、形状、颜色,挑取不同特征的菌落,标记菌株号,采用三线法在新鲜的分离平板上纯化。将获得的纯化菌株分别采用斜面法和甘油法保存。

1.2.2 菌株的16s DNA序列分析

16SrDNA序列PCR扩增: 取纯化菌株的培养物,采用Biospin细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌基因组DNA,作为PCR扩增的模板,利用16SrDNA引物进行PCR扩增。PCR反应体系(25 μL): ddH₂O 18.7 μL、10×Taq Reaction Buffer 2.5 μL、10 mmol·L⁻¹/each dNTP 0.5 μL、引物各1 μL、Taq DNA Polymerase 0.3 μL、Template 1 μL。PCR扩增程序: 94℃预变性5 min,94℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸90 s,35个循环,最后72℃延伸10 min。用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增

结果,用凝胶图像分析系统观察并保存。

PCR 产物测序及序列对比分析: 将扩增成功的 PCR 产物送交福州铂尚生物技术有限公司测序。将测序结果通过网站 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行序列对比分析,选择相关的参考菌株序列,再经 Clustal X^[8] 对齐后,用软件 Mega 5.0^[9] 进行聚类分析(方法为: Neighbor-Joining, Nucleotide: Jukes-Cantor),构建聚类树^[10-12]。

1.2.3 菌株氨氮降解效果测定

将获得的氨氮降解菌菌株在分离平板上纯化培养 48 h,再将纯化好的菌株接种到氨氮降解菌富集培养基中,并以添加无菌水的培养基为对照,于 30 °C 和 180 r·min⁻¹ 摇床培养 48 h。然后将培养的菌液取 5% 重新接入新的氨氮液体培养基中,对照组也取 5% 重新接入新培养基中,继续做空白对照,30 °C、180 r·min⁻¹ 摇床培养。在培养的过程中依据《水质 铵的测定 水杨酸分光光度法》(HJ 536—2009),检测并记录 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 的液体培养基的氨氮含量,并计算氨氮降解率。处理设 3 个重复。

1.2.4 数据分析

在 DPS 数据处理系统中^[13],采用 Tukey 多重比较方差分析方法对不同处理的活菌数、pH 值和酸度进行比较。

2 结果与分析

2.1 菌株分离的结果分析

经 16S rDNA 测序和 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 序列对比分析,并以软件 NJ 法 (Neighbor-Joining, Nucleotide: Jukes-Cantor),结合 Bootstrap method 检验(检验次数为 1000 次),构建系统发育树(见图 1)。从系统发育树可以看出,菌株 FJAT-56390 和 FJAT-56388 处于同一最小分枝,紧邻的上一节点与纤维素微水合菌 *Cellulosimicrobium aquatile* strain 3bp (NR146008) 相同,且 Bootstrap method 检验值为 90%。菌株 FJAT-56389 与蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* ATCC 1459 (NR074540) 同处于最小分枝,且 Bootstrap 值达 68%。菌株 FJAT-56387 与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (MK182997) 最相似。综合系统发育树分析结果,所获得的菌株分别属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和纤维微细菌 (*Cellulosimicrobium*) (见表 1)。

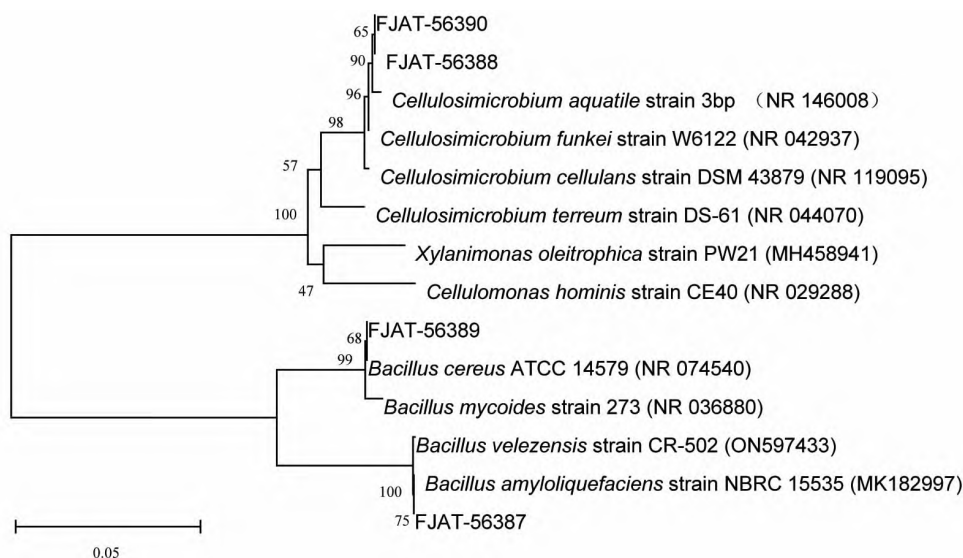


图 1 分离菌株基于 16S rDNA 序列构建的分子系统发育树

表 1 菌株样品序列对比结果

| 菌株号 | 菌株种名 | 菌株中文名 | 相似度/% | 入藏号 |
|------------|------------------------------------|---------|-------|-----------|
| FJAT-56387 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 解淀粉芽孢杆菌 | 99.79 | MK182997 |
| FJAT-56388 | <i>Cellulosimicrobium aquatile</i> | 纤维素微水合菌 | 99.57 | NR_146008 |
| FJAT-56389 | <i>Bacillus cereus</i> | 蜡样芽孢杆菌 | 99.72 | NR_074540 |
| FJAT-56390 | <i>Cellulosimicrobium aquatile</i> | 纤维素微水合菌 | 99.57 | NR_146008 |

2.2 菌株氨氮降解效果测定

如表2所示,4株菌株对氨氮均有一定的去除能力,在菌株刚接入时各培养液的氨氮起始浓度为 $2.97 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,相互间无显著差异($p = 0.9571$);24 h后,接菌处理组的氨氮含量显著低于

对照组($p = 0.001$);接菌96 h后,接菌处理组的氨氮含量下降 $57\% \sim 84\%$,其中FJAT-56390接菌组的氨氮下降最多,而对照组只下降 2% ,与其起始浓度无显著差异。

表2 不同菌株的氨氮降解率

| 菌株 | 0 h ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 24 h ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 48 h ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 72 h ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 96 h ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | 降解率/% |
|------------|--|---|---|---|---|------------------------|
| FJAT-56387 | 2.98 ± 0.03 | 1.60 ± 0.05 | 0.62 ± 0.01 | 0.75 ± 0.03 | $0.63 \pm 0.06\text{b}$ | $79 \pm 2.13\text{ab}$ |
| FJAT-56388 | 3.00 ± 0.00 | 1.38 ± 0.06 | 0.93 ± 0.09 | 0.83 ± 0.18 | $0.71 \pm 0.06\text{bc}$ | $76 \pm 1.89\text{b}$ |
| FJAT-56389 | 2.97 ± 0.05 | 1.32 ± 0.02 | 0.96 ± 0.02 | 2.10 ± 0.08 | $1.27 \pm 0.04\text{d}$ | $57 \pm 1.05\text{c}$ |
| FJAT-56390 | 2.98 ± 0.03 | 1.70 ± 0.09 | 1.11 ± 0.03 | 0.43 ± 0.04 | $0.48 \pm 0.01\text{a}$ | $84 \pm 1.02\text{a}$ |
| CK | 2.99 ± 0.01 | 2.88 ± 0.02 | 2.9 ± 0.03 | 2.94 ± 0.01 | $2.93 \pm 0.01\text{e}$ | $2 \pm 0.01\text{d}$ |

3 结论与讨论

本试验通过富集、分离纯化和16SrDNA序列分析,从鸡垫料分离获得4株具有氨氮降解功能的菌株,其中纤维菌属(*Cellulosimicrobium*)2株,芽孢杆菌属(*Bacillus*)2株。已报道的氨氮降解菌,很多也属于芽孢杆菌属,与本文研究结果相似。李玥^[14]等从鸡粪堆肥中分离到5株具有较好除臭效果的菌株均属于芽孢杆菌属:*Bacillus* sp.、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)、耐寒短杆菌(*Brevibacterium frigiditolerans*)、木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosum*)、变异棒杆菌(*Corynebacterium variabile*)。沈琦^[15]等从猪粪中分离到的氨氮同化细菌为弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*)。雷阳^[16]等从对虾养殖废水中分离到的25个芽孢杆菌菌株中,有4株对氨氮降解效果较为理想,降解率最高可达 76.92% 。

而纤维菌属氨氮降解菌则鲜见报道。崔哲铭从鸡粪中分离到纤维化纤维微菌(*Cellulosimicrobium cellulans*),氨气最大减排率为 32.95% ,同时分离到的氨氮降解菌还有淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)^[17]。本文也在样品中同时分离到了属于淀粉芽孢杆菌的氨氮降解菌株。

通过氨氮水杨酸检测法检测液体培养基中氨氮的含量变化,结果表明4株氨氮降解菌对氨氮的去除率在 $57\% \sim 84\%$ 。沈琦^[18]等报道的菌株对氨气的减排率最高达到 71.0% ;雷阳^[16]等在筛选氨氮降解菌实验中,测得的氨氮降解率最高可达 76.92% ;张超^[18]等筛选出的菌株,氨氮降解率最高为 82.5% 。本文分离的菌株中*Cellulosimicrobium*

aquatile FJAT-54390除氨氮效果最强,去除率为 84% 。据文献报道,*Cellulosimicrobium*属微生物多个菌株能产生葡萄糖苷酶、蛋白酶、糖苷水解酶和几丁质酶等多种降解酶,被广泛应用于纤维素和木聚糖的生物降解和酒精发酵^[19]。氨氮降解菌的纤维素水解酶,有助于它从发酵垫料中获得碳源,促进菌体定殖。因此,FJAT-54390在发酵床上的应用潜力大,有必要进一步研究该菌株的纤维素水解能力及发酵床养殖上的应用效果。

参考文献:

- [1] 刘志云,刘国华,蔡辉益,等. 鸡粪中氨氮降解菌的分离鉴定及除氨适宜条件研究[J]. 中国农业科学, 2016,49(6): 1187-1195.
- [2] 李艳苓,耿兵,朱昌雄. 畜禽养殖业面源污染微生物发酵床控制技术应用与防治建议[J]. 中国猪业, 2017(7): 25-29.
- [3] 胡元庆,周玉刚,唐红,等. 家禽发酵床养殖环境对病原微生物的防控作用研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(26): 10671-10672, 10795.
- [4] 杜红,孙弟芬,易鑫,等. 益生菌配合发酵床养殖模式对巴中山地梅花鸡生长性能和屠宰性能、肠道菌群的影响[J]. 饲料工业, 2021,42(12): 06-10.
- [5] 张邑帆,卢茵,黄微,等. 发酵床垫料复合菌剂优化组合的研究[J]. 现代畜牧兽医, 2012,2: 51-53.
- [6] 张宏才,魏荷芬,汪顺丽,等. 鸡粪除臭菌的筛选、培养条件优化及其应用[J]. 安全与环境学报, 2017,17(01): 250-255.
- [7] 李裕荣,刘永霞,赵泽英,等. 畜禽粪便厌氧发酵的产气特点及其发酵物养分的变化动态[J]. 西南农业学

- 报,2012(6): 2305-2310.
- [8] THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876-4882.
- [9] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 5.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(24): 1596-1599.
- [10] JUKERS TH, CANTOR CR. Evolution of protein molecules in mammalian protein metabolism [M]. New York: Academic Press, 1969, 21-132.
- [11] FELSENTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.
- [12] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406-425.
- [13] 唐启义. DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [14] 李玥, 李成成, 李静, 等. 鸡粪除臭菌的分离筛选及除臭效果分析 [J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(5): 1103-1110.
- [15] 沈琦, 孙筱君, 吴逸飞, 等. 畜禽粪污除臭微生物的筛选与鉴定 [J]. *浙江农业科学*, 2019, 60(11): 2110-2113.
- [16] 雷阳, 张倩, 陈钰, 等. 对虾养殖高效降解氨氮微生物的筛选与鉴定 [J]. *福建农业科技*, 2019, 10: 16-20.
- [17] 崔哲铭. 鸡粪除臭菌剂的筛选及氨氮代谢途径研究 [D]. 天水: 甘肃省天水师范学院, 2023.
- [18] 张超, 尚润东, 王嘉晖. 一株氨氮降解菌的筛选鉴定及其降解特性研究 [J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(36): 53-56.
- [19] YUAN Y, HU Y B, HU C X, et al. Overexpression and characterization of a *glycoside hydrolase* family 1 enzyme from *Cellulosimicrobium cellulans* sp. 21 and its application for minor insenosides production [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2015, 120: 60-67.