

# 分离、筛选和鉴定猪场污水污染物降解微生物及应用效果分析

巩彧玄<sup>1,2</sup>, 高星爱<sup>2</sup>, 王鑫<sup>2</sup>, 解娇<sup>2</sup>, 凤鹏<sup>2</sup>, 王飞虎<sup>2</sup>, 马玉芹<sup>1\*</sup>, 李忠和<sup>2\*</sup>  
(1. 长春理工大学化学与环境工程学院, 长春 130022; 2. 吉林省农业科学院农村能源与生态研究所, 长春 130033)

**摘要:**本研究利用分离、筛选获得降解猪场污水菌种,以分泌高酶活性的纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、产酸微生物为指标,利用16S rDNA分析,通过NCBI系统比对,构建系统进化树,确定所属的种属鉴定菌为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。以养猪场污水为例,评估了分离、筛选获得的菌株处理对污水化学需氧量(COD)、生物需氧量(BOD<sub>5</sub>)、总磷(TP)、总氮(TN)、悬浮颗粒物(SS)去除污染物的效果,以及曝气增氧方式对污染物去除的影响。示范结果各项指标降解率分别为COD降解率为52.9%, BOD<sub>5</sub>降解率为60.5%, TP降解率为44%, TN降解率为35%, SS降解率为62%。证实添加筛选菌株、曝气增氧方式能有效降低水体污染物,为进一步开展应用奠定了基础。

**关键词:**降解率;污水;微生物菌剂;应用效果

中图分类号:X713

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2020)01-0099-05

## Construction and Application of Compound Microbial Agent for Degrading Pollutants in Piggery Sewage

GONG Yuxuan<sup>1,2</sup>, GAO Xing'ai<sup>2</sup>, WANG Xin<sup>2</sup>, XIE Jiao<sup>2</sup>, FENG Peng<sup>2</sup>, WANG Feihu<sup>2</sup>, MA Yuqin<sup>1\*</sup>, LI Zhonghe<sup>2\*</sup>

(1. School of Chemistry and Environmental Engineering, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022; 2. Institute of Rural Energy and Ecology Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** In this study, bacteria strains of sewage in pig farm were isolated and screened from rotten manure, straw and other decomposed areas. Cellulase, protease, lipase, amylase and acid-producing microorganisms with high enzyme activity were used as indicators to identify bacteria as *Bacillus thuringiensis* by 16S rDNA analysis. Through NCBI system comparison, the phylogenetic tree was constructed to determine the species. Taking pig farm sewage as an example, the effects of isolated and screened strains on COD, BOD<sub>5</sub>, TP, TN and SS were evaluated. The demonstration results show that the aerated aeration method can effectively reduce water pollutants. The degradation rate of each index is COD 52.9%, BOD<sub>5</sub> 60.5%, TP 44%, TN 35% and SS 62% respectively. It was proved that adding screening strains and aeration with oxygen could effectively reduce water pollutants, which laid a foundation for further application.

**Key words:** Degradation rate; Sewage; Microbial agent; Application effect

随着畜牧业的发展,畜禽污水排放量日益增加。据有关部门测算,1头猪日排泄粪尿按6 kg计,

年产粪尿达2.5 t<sup>[1]</sup>。养猪场污水主要特征是有机物浓度高、悬浮物多、色度深,并且有大量的细菌<sup>[2]</sup>。猪场污水中的有机污染物主要以固态、溶解态碳水化合物形式存在,使污水表现出很高的BOD<sub>5</sub>、COD、和SS等,其中BOD<sub>5</sub>介于600~7 000 mg/L,化学需氧量COD浓度可达13 000~17 000 mg/L。

处理这些高浓度猪场有机污染物的方法中,生物降解法是从自然环境中通过人工培养的方法,分离、筛选获得功能菌种,利用微生物代谢产生的蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶等多种益生因子及微生物分泌的抑制效能的细菌素,降解

收稿日期:2019-06-04

基金项目:吉林省科技厅重点项目(20170204011SF、20190303062SF、20180201017SF);吉林省农业科学院创新工程项目(CXGC2017ZY022);吉林省农业科学院人才项目(c7208000312)

作者简介:巩彧玄(1993-),男,在读硕士,研究方向:水处理技术与资源化。

通讯作者:马玉芹,女,博士,教授,E-mail: myq9393@sina.com

李忠和,男,博士,副研究员,E-mail: lizhonghe6@126.com

污水中高分子有机污染物为小分子物质<sup>[3]</sup>。在降解猪场有机污染物的诸多微生物中,芽孢杆菌本身具有种类繁多,对培养条件不是很苛刻,产酶丰富等优点,作为畜禽粪便处理过程中的优势菌群存在,目前已经被广泛应用于农牧业固体废物处理及污水治理领域<sup>[4-5]</sup>。

本试验从秸秆、树叶等已腐烂的环境中,通过自然的优胜劣汰法则,进行富集培养、分离,最终筛选出能够处理污染物的微生物,对猪场污水进行示范研究。通过优势菌种的投加,达到降低猪场污水中的COD和BOD<sub>5</sub>含量等指标,净化污染水体环境的效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验菌株来源

选取腐熟好的秸秆、粪便、沼气发酵池等废弃物腐烂周边土壤,采集的土壤样品放入塑料袋中,封口,置于4℃冰箱保存。

### 1.2 筛选菌株

取土样1g,制备1%的悬液,在200mL液体三角瓶,震荡培养30min,吸取0.1mL直接涂布于细菌固体培养皿上,在30℃培养箱中培养,待菌落长出后挑单菌落。

### 1.3 培养基的制备

制备产酸培养基<sup>[6]</sup>、蛋白质分解培养基<sup>[6]</sup>、淀粉分解培养基<sup>[7]</sup>、脂肪分解培养基<sup>[8]</sup>、CMC-Na(羧甲基纤维素钠)分解培养基<sup>[9]</sup>。

### 1.4 16S rDNA 序列测定与系统学分析

反应体系采用上海生物工程公司PCR扩增试剂盒。菌种鉴定引物为7F1540R(5'-CAGAGTTT-GATCCTGGCT AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'),PCR长度为1500bp。对PCR产物的要求:纯度为OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>=1.6~2.0,用量为每反应10~100ng。方法如下:1.每20μL PCR产物中加入2μL 3M NaAc、50μL 100%酒精。2.台式离心机12000xg 4℃离心30min,马上用枪吸尽上清液。3.加入70μL 70%酒精,12000xg 4℃离心15min,马上用枪吸尽上清液。4.让酒精在室温挥发干净,加入10μL去离子水溶解DNA。PCR产物的测序PCR反应:标准反应体系中纯化的PCR产物(10ng/μL)1μL, BigDye(2.5x) 8μL,引物(3.2pmol/μL)1μL,灭菌去离子水10μL,总体积为20μL。

### 1.5 菌株示范

#### 1.5.1 示范地点

公主岭国家农业科技园飞马斯牧业有限公

司。

#### 1.5.2 示范所用材料及设备

固液分离后的猪场污水1722kg左右,玻璃钢集污箱两个(200cm×100cm×45cm),曝气泵1台,温度计2个,控温电暖风1台,量筒2个,大型塑料桶4个,示范菌株量5L。

#### 1.5.3 投菌方法

根据2mL菌液配比1头成年猪1d产生的粪尿液体(10kg),污水示范箱体积得出污水量,进而算出每次应投入340mL菌液。2mL菌液用500mL以上不含消毒液的地下水稀释,在就地进行2d扩大化培养之后,投入装有污水的加厚中型塑料集污箱并进行曝气。

#### 1.5.4 示范程序

示范分7次投菌,每次间隔3d,21d示范结束。同时使用两个示范箱,一个具有曝气装置,每天早晚各曝气1h,利于提高菌的活性;另一个示范箱为非曝气箱,观察自然状态下投菌后的污水降解效果。示范结束后根据测试水样中各类污染物指标进行对比,得出结论。

## 2 结果与分析

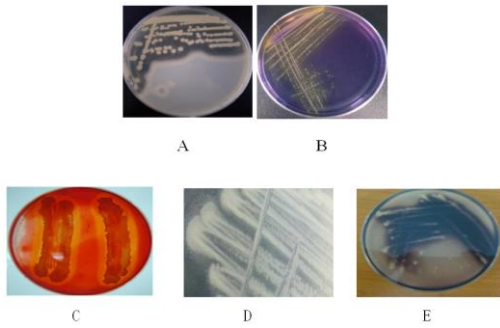
### 2.1 分析各种功能菌在不同培养基上产生的菌落特征

经过初筛、富集培养,从100多份腐烂地获得的样品中,挑选LB固体培养基上清晰产生透明圈的菌落LZ77。经平板稀释测定方法,该菌株的有效活菌数CFU为 $2.7 \times 10^8$ /mL, pH 6.5,属于中性菌株。在30℃培养温度下,对菌株LZ77进行生理生化特征分析,观察培养基上分别含有脱脂奶粉、溴甲酚紫、羧甲基纤维素钠、吐温-20及可溶性淀粉等不同培养成分的情况下,培养基周围产生透明圈与否及培养基颜色变化(图1)。

根据细菌产生的酪蛋白酶分解蛋白质的原理<sup>[10]</sup>,添加脱脂奶粉的培养基上,菌株周围形成了清晰的透明圈,说明该菌株含有蛋白质分解功能酶(图1-A)。

乳酸菌本身是杀菌剂,在代谢过程中产生细菌素(Bacteriocins)、有机酸、抗菌肽等各种抑制活性物质,通过生物膜信号分子阻碍病原菌入侵微生物群落,可以杀灭某些病原菌<sup>[11]</sup>。为了验证筛选获得的LZ77菌株是否分泌有机酸分解酶,在固体培养基里添加了溴甲酚紫,观察培养基颜色变化。随着菌株培养天数的增加,刚开始的紫色培养基2~3d变为黄色(图1-B),说明该菌株带有

乳酸菌分解功能酶。



A: 产蛋白质培养基; B: 产酸培养基; C: 纤维素降解培养基; D: 脂肪分解培养基; E: 淀粉分解培养基

图1 菌株在不同培养基上产生透明圈与否与培养基颜色变化图

在培养基上添加羧甲基纤维素钠为碳源培养菌株时,受纤维素分解酶的影响,水解后的多糖同刚果红在培养基周围形成颜色浓郁的红色透明图<sup>[12]</sup>。在羧甲基纤维素钠存在的培养基上,菌株在刚果红周围产生了明显的透明圈(图1-C)。因此初步推断该菌株具有纤维素分解功能酶。

菌株在添加吐温-20的培养基上生长时,微生物所分泌的脂肪酶能把甘油三酯最终降解为甘油和脂肪酸,菌株培养第三天时,周围表现出明显的透明圈(图1-D),表明菌株具有降解脂肪酶特性。

菌株在可溶性淀粉存在的培养基上培养2~3

d,在菌株周围形成了明显菌落,在平板上滴加碘溶液,平板呈蓝色的同时菌落周围产生了不变色的透明圈,说明该菌株分泌降解淀粉的功能菌(图1-E)。

分离筛选获得的菌株,从代谢过程中产生的透明圈及颜色变化,能初步推断该微生物具有蛋白质、产酸、纤维素、脂肪、淀粉等分解酶功能。

### 2.2 16S rRNA 序列分析及构建系统进化树

菌株 LZ77 用 PCR 引物直接测序,经过 16S rDNA 序列分析,检测到明显的蛋白条带(图2),将测序结果提交到 GenBank,用 BLAST 进行相似性搜索比对并构建系统进化树。图3结果显示,菌株 LZ77 与苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)等芽孢杆菌都有 100%的相似性。因此命名 LZ77 菌株为芽孢杆菌属的 *Bacillus sp.* LZ77<sup>[13]</sup>。

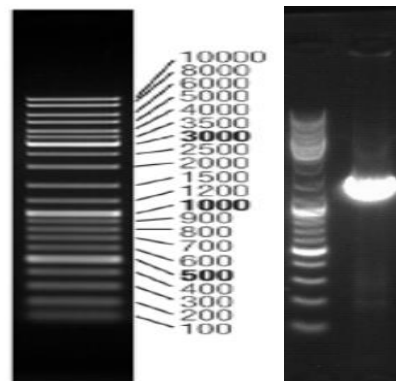


图2 产物用 PCR 引物测序 16S rDNA 序列

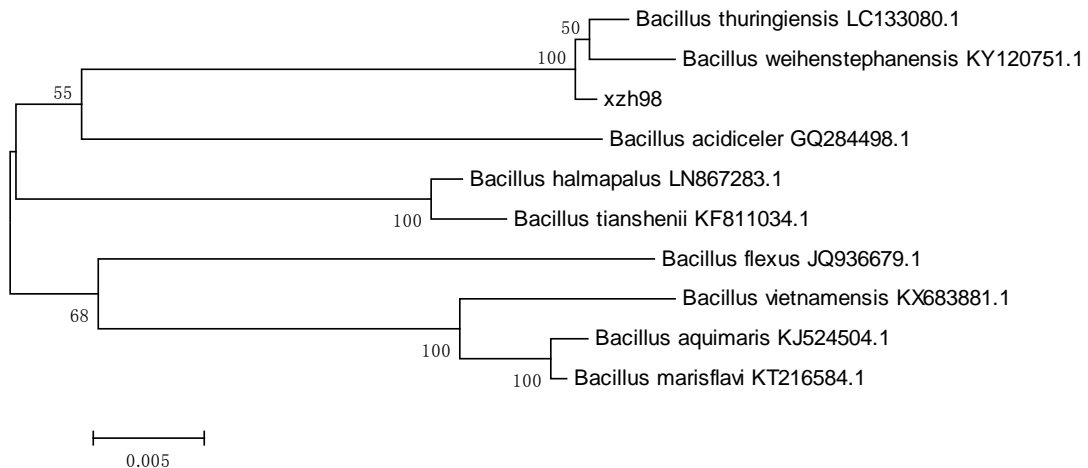


图3 基于 16S rRNA 序列同源性的系统进化树

### 2.3 分析微生物分泌酶的生化特征

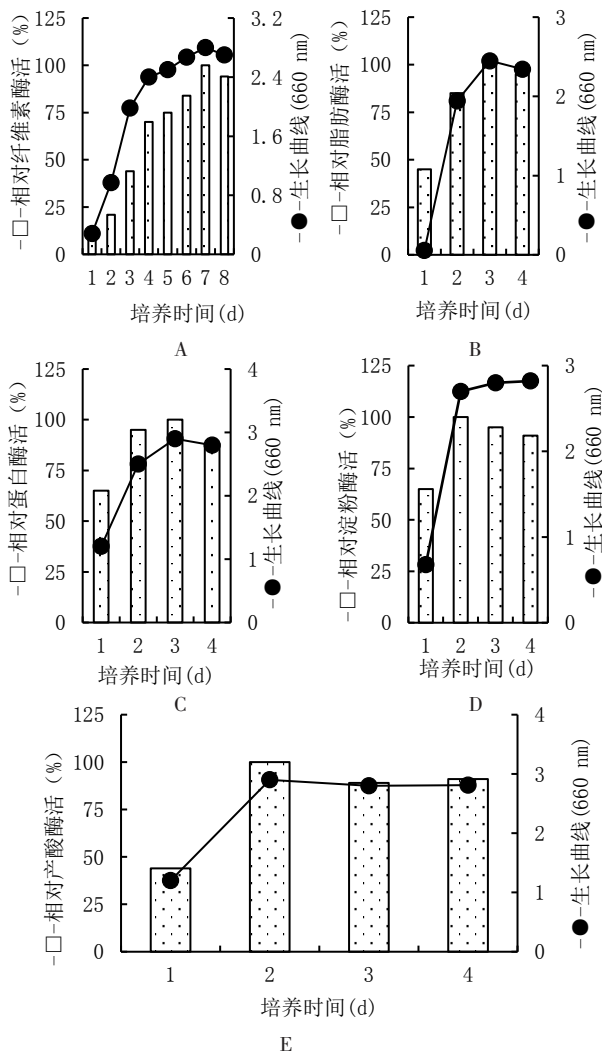
从图4-A看出,芽孢杆菌 LZ77 随着培养时间的增长,纤维素酶活呈抛物线变化趋势,7 d 酶活达到最高,8 d 酶活力表现出下降的趋势,但是整体上持续产酶时间表现出较长。

脂肪酶活性和蛋白酶活性。性在菌株培养 3 d 达到最高值(图4-B和图4-C),说明菌株在前2

d 生长迅速,此后 2~3 d 保持相对稳定,进入生长对数期,培养第 4 d 进入酶活力下降阶段。

菌株只培养第 2 d,淀粉酶活性和产酸酶活性都达到最高(图4-D和图4-E),且达到最高酶活性的时间也最短,之后细胞生长也趋于稳定状况。

图4结果表明,LZ77 菌同时能分泌纤维素酶、



A: 相对纤维素酶活及生长曲线; B: 相对蛋白酶活及生长曲线;  
C: 相对淀粉酶活及生长曲线;  
D: 相对脂肪酶活及生长曲线; E: 相对产酸酶活及生长曲线

图4 菌株培养时间对各项酶活与生长曲线变化

蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶及产酸酶等多种功能酶,但是达到最佳酶活性的培养时间不同。利用羧甲基纤维素钠为碳源的培养基,培养菌株7 d能得到纤维素酶活最强的微生物培养液。在培养基里分别添加吐温-20和脱脂奶粉的脂肪培养基和蛋白质培养基里培养菌株3 d就得到脂肪酶和蛋白酶活最高的微生物培养液。菌株分别在淀粉培养基和产酸培养基里培养2 d就能得到淀粉酶和产酸酶活性最高的微生物培养液<sup>[14-17]</sup>。

### 2.4 菌株示范

在污水箱分三次投加微生物,经过21 d,对比分析既不投加微生物也不曝气的污水箱(T0)、投加微生物且不曝气的污水箱(T1)和投加微生物且曝气的污水箱(T2)中各项有机污染物含量变化,结果见图5。T1污水中的COD从6 900 mg/L降

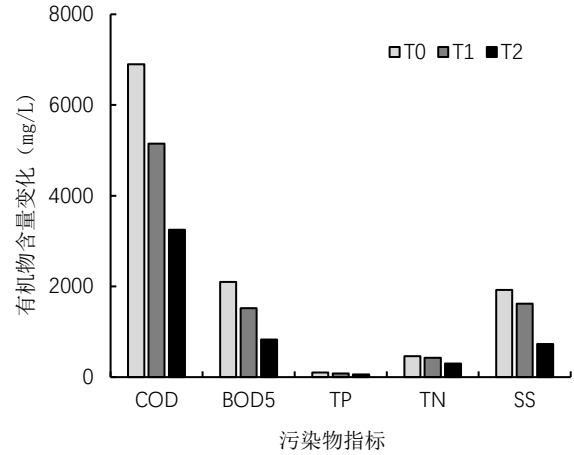


图5 各项有机污染物含量变化

到5 150 mg/L,降解率仅为25%, BOD5降解率为27.6%, SS降解率为16%,非曝气污水SS浓度变化少。但是T2污水中的COD值从原来的6 900 mg/L降到3 250 mg/L,降解率达到了52.9%, BOD5从2 100 mg/L降到829 mg/L,降解率为60.5%, TP降解率为44%, TN降解率为35%, SS降解率为62%。说明在投加微生物且曝气的条件下能加快污水中有机物的降解速度,降解率明显提高。

### 3 结论

本文从自然环境中分离、筛选获得具有分泌产纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶及产酸酶等能力的菌株。菌株在功能培养基上产生的透明圈结果中,判断菌株具有降解功能酶特性。通过16S rRNA的分析,构建系统进化树结果显示, LZ77菌属于芽孢杆菌属类(*Bacillus sp.*)。

示范结果表明,通过人为供氧曝气的方法,在污水箱中直接投加微生物,为大量微生物生长提供氧气,扩繁优势菌群,功能微生物把污水中有机高分子污染物降解为小分子物质。示范结束后测试有机物的分解率,证明了曝气增氧方式能有效降低水体污染物,各项指标降解率分别为COD降解率为52.9%, BOD<sub>5</sub>降解率为60.5%, TP降解率为44%, TN降解率为35%, SS降解率为62%。曝气池降解率明显优于非曝气池,说明曝气能加快有机物的降解速度。但是微生物一般受温度、酸碱度、湿度等环境因素的制约,因此功能微生物降解高浓度猪场有机污水须结合配套工艺技术才能达到有机污水达标排放目的。

### 参考文献:

- [ 1 ] 熊忙利,黄汉军,赵战峰.对咸阳市畜禽粪便污染环境问题的初探[J].家禽生态学报,2008,29(6):144-146.
- [ 2 ] 敖子强,卜妹红,彭桂群,等.规模养猪废弃物资源化关键技术研究进展[J].家禽生态学报,2018,39(3):81-83.
- [ 3 ] 李 刚,杨 克,许方程,等.微生物菌剂处理规模化养猪场粪污水的研究进展[J].浙江农业科学,2018,59(11):2115-2121.
- [ 4 ] 郭 鹏,郝向举,魏文侠,等.芽孢杆菌在畜禽废弃物污染治理中的研究进展[J].饲料研究,2016(23):25-28,33.
- [ 5 ] 杨小龙.复合菌剂的研制及其对水产养殖污水的净化作用[D].南昌:南昌大学,2012.
- [ 6 ] 高星爱,李 莉,赵新颖,等.纤维素分解微生物复合菌剂降解固态物料特性研究[J].东北农业大学学报,2014,45(12):71-76.
- [ 7 ] 杨国俊,黄日波.产淀粉酶和蛋白酶中度嗜热细菌的分离、筛选及培养[J].广西农业大学学报,1995,14(3):243-247.
- [ 8 ] 麻琼丽.产脂肪酶菌株的筛选、鉴定及产酶条件优化[D].海口:海南大学,2010.
- [ 9 ] 高星爱,李忠和,王 鑫,等.4株降解低温污水芽孢杆菌的分离、鉴定及其降解效率研究[J].安徽农业科学,2016,44(17):83-85.
- [ 10 ] 欧阳华勇,李冰峰,权 静,等.耐有机溶剂蛋白酶生产菌的筛选[J].安徽农业科学,2009,37(28):13606-13609.
- [ 11 ] 张吉鹏.乳酸菌及其在养猪生产中的应用[J].猪业科学,2018,35(11):86-90.
- [ 12 ] 张 盼,刘婉瑜,李晓秀,等.高效纤维素优势分解菌的筛选和鉴定[J].中国土壤与肥料,2017(2):149-156.
- [ 13 ] 金荣德,范作伟,高星爱,等.高效溶磷微生物菌株的筛选、鉴定及其对磷素效率的影响[J].吉林农业科学,2011,36(1):13-16.
- [ 14 ] 蒋宝军,王飞虎,李忠和,等.微生物絮凝剂的特征及研究现状[J].东北农业科学,2019,44(5):107-110.
- [ 15 ] 凤 鹏,赵新宇,郝登宝,等.玉米秸秆分解微生物复合菌剂群落组成及提高沼气产量的研究[J].吉林农业科学,2015,40(1):109-112.
- [ 16 ] 李 丹,张 波,李 玉.高产漆酶菌株的筛选及其对秸秆降解初探[J].吉林农业科学,2013,38(6):90-94.
- [ 17 ] 许 超,曲勤凤,顾文佳,等.新型可降解高效氯氰菊酯微生物菌株的筛选、鉴定及条件优化[J].东北农业科学,2016,41(2):70-73.

(责任编辑:王 昱)

(上接第12页)水分胁迫处理后,电子传递速率(ETR)和PS II实际量子产率 $Y(II)$ 降低,该结果类似于增加的qP可以以光化学利用为代价耗散一些激发能量的研究结论<sup>[7]</sup>。此外,本研究发现光化学猝灭(qP)在水分胁迫下显著下降,该结论与“水分胁迫下水稻和大麦叶片中的实际量子效率( $\Phi_{PS II}$ )、qP和光合电子传递速率(ETR)显著降低”的结论相吻合。

综上所述,本研究初步解释了水分亏缺和水分过量胁迫下糯玉米幼苗通过光合、荧光系统的调节增强抵御水分逆境的初步方式,但具体生理代谢机理尚不明晰,有待深入研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 路振广,邱新强,张明智,等.干旱胁迫对夏玉米叶片光合特性及产量的影响[J].节水灌溉,2019(2):34-42.
- [ 2 ] 孙丽娟,赵志宏,贺 娟,等.我国鲜食玉米相关标准问题分析及对策[J].作物杂志,2019(2):1-4.
- [ 3 ] 姚 斌,徐 晨,王俊鹏,等.不同父本血缘玉米杂交种对光、CO<sub>2</sub>响应特性[J/OL].分子植物育种,2019:1-11.
- [ 4 ] 郭艳阳,刘 佳,朱亚利,等.玉米叶片光合和抗氧化酶活性对干旱胁迫的响应[J].植物生理学报,2018,54(12):1839-1846.
- [ 5 ] 燕 辉,胡笑涛,姚付启.限量灌溉对冬小麦光合与叶绿素荧光的影响[J].农业机械学报,2011,42(11):49-54.
- [ 6 ] 任永福,陈国鹏,蒲 甜,等.玉米-大豆带状种植中套作高光效玉米窄行穗位叶光合特性对弱光胁迫的响应[J].作物学报,2019,45(5):728-739.
- [ 7 ] 祁娟霞,刘 馨,赵小兵,等.不同灌水量和灌水频率对番茄植株生长、光合与荧光特性的影响[J].节水灌溉,2017(4):50-56.
- [ 8 ] 郑加兴,覃嘉明,覃永媛,等.广西鲜食糯玉米品种在越南的适应性分析[J].种子,2019,38(2):89-92,97.
- [ 9 ] 张宪政.作物生理研究法[M].北京:农业出版社,1992:119-120.
- [ 10 ] Downie A, Miyazaki S, Bohnert H. et al. Expression profiling of the response of Arabidopsis thaliana to methanol stimulation[J]. Phytochemistry, 2004, 65(16): 2305-2316.
- [ 11 ] Gao YP, Young L, Bonham-Smith P, et al. Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of Brassica napus during germination under stress conditions[J]. Plant molecular biology, 1999, 40(4): 635-644.
- [ 12 ] 李建查,孙 毅,赵 广,等.干热河谷不同土壤水分下甜玉米灌浆期光合作用光响应特征[J].热带作物学报,2018,39(11):2169-2175.
- [ 13 ] Bai J, Xu D H, Kang H M, et al. Photoprotective function of photorespiration in Reaumuria soongorica during different levels of drought stress in natural high irradiance[J]. Photosynthetica, 2008, 46(2): 232-237.
- [ 14 ] 宋 贺,蒋延玲,许振柱,等.玉米光合生理参数对全生育期干旱与拔节后干旱过程的响应[J].生态学报,2019(7):1-10.
- [ 15 ] 李冬旺,张永江,刘连涛,等.干旱胁迫对棉花冠层光合、光谱和荧光的影响[J].棉花学报,2018,30(3):242-251.

(责任编辑:王丝语)