

4株降解低温粪污水芽孢杆菌的分离·鉴定及其降解效率研究

高星爱, 李忠和, 王鑫, 赵新颖, 解娇, 祝延立*, 张永锋* (吉林省农业科学院, 吉林长春 130033)

摘要 [目的]获得可在低温环境下高效降解粪污水的芽孢杆菌。[方法]从大型养殖场及活性污泥、下水道等低温环境下采集样品, 分离并筛选耐冷菌株, 通过扫描电镜观察获得菌株的形态特征, 分析其 16S rRNA 基因测序, 构建系统发育树, 初步确定菌株的菌属; 对其进行鉴定后将其添加到污水生物反应器中对猪场粪污水进行净化, 分析粪污水中化学需氧量(COD)、生物需氧量(BOD)及溶解氧(DO)变化情况。[结果]这4株菌均为蜡样芽孢杆菌; 在粪污水里添加这4株菌的复合菌液后, 粪污水的COD值从5 585.40 mg/L降至1 093.97 mg/L, 去除率达80.40%; BOD值从680.00 mg/L降至600.00 mg/L, 去除率为11.76%; DO值大幅度上升, 增加率为75.00%。[结论]复合菌在粪污水处理方面表现出了较高的降解能力, 可为污染物生物修复提供优良的菌种资源, 具有广阔的应用前景。

关键词 蜡样芽孢杆菌; 分离; 鉴定; 污水净化

中图分类号 S181 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)17-083-03

Isolation and Identification of Four Bacillus Species with Degradation of Fecal Sewage at Low Temperature and Their Degradation Efficiency

GAO Xing-ai, LI Zhong-he, ZHU Yan-li*, ZHANG Yong-feng* et al (Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130033)

Abstract [Objective] To obtain Bacillus which could efficiently degrade fecal sewage at low temperature. [Method] Samples were collected from the large farms, activated sludge, sewer and other low temperature environment. Cold resistant strains were isolated and screened. Observation of scanning electron microscope could obtain the morphological characteristics of strains. The 16S rRNA gene sequence was analyzed. Phylogenetic tree was constructed. And the bacterial genus were preliminarily detected. After identified, they were added into wastewater biological reactors to purify fecal sewage in pig farm. chemical oxygen demand(COD), biological oxygen demand (BOD) and dissolved oxygen (DO) were analyzed in the fecal sewage. [Result] The four strains all belonged to *Bacillus cereus*. After adding the composite solution of four strains into fecal sewage, COD value declined from 5 585.40 to 1 093.97 mg/L with the removal rate of 80.40%; BOD value reduced from 680.00 to 600.00 mg/L, with the removal rate of 11.76%. DO value enhanced greatly with the increasing rate reaching 75.00%. [Conclusion] The compound bacteria shows relatively high degradation ability, provides high-quality strain resources for the bio-remediation of pollutants, and has broad application prospect.

Key words *Bacillus cereus*; Isolation; Identification; Sewage purification

随着工业化水平的提高及养猪业的快速发展, 养殖场产生大量的粪便、粪水, 其对环境造成严重的污染。有研究表明, 每生产1头肥猪(180 d, 体重100 kg)就会产生约4 t的粪便污水, 约含120~150 kg的总固体(TS)^[1]。猪场废水主要包括猪场粪尿及冲洗废水, 属于高浓度的有机废水, 氨氮和固体悬浮物(SS)的含量均很高, 排放废水中生物需氧量(BOD)高达2 000~8 000 mg/L, 化学需氧量(COD)高达5 000~20 000 mg/L, 且SS浓度超过排放标准的10倍^[2]。利用微生物菌剂治理水环境既不会消耗外界能量, 又不会产生二次污染。投加的微生物制剂中的有益菌类可将水体的污染物作为生长繁殖的营养物质, 将其分解成水、二氧化碳、氮气等无害的物质归还至环境中, 达到增加溶解氧(DO)、降低磷酸盐及抑制有害微生物繁殖的效果^[3]。大量研究表明, 污染物的降解单靠纯菌株的作用难以彻底进行, 它们的降解过程是复杂的生物化学过程, 需要多种微生物的共同作用才能完成^[4]。邹文娟等^[5]在常温下利用光合细菌和枯草芽孢杆菌的混合菌处理污水, 结果显示COD去除率为58.73%; DO增加率为87.75%。梁雷等^[6]在水温为15~20℃时利用

微生物处理污水中的污染物, 结果显示COD平均去除率为64.2%。国外已研制出多种可应用于污水处理的微生物菌剂, 如美国的Clear-Flo系列、利蒙LLMO系列微生物制剂以及日本研制的EM制剂等^[7-9]。蜡样芽孢杆菌是普遍存在于自然界的一类革兰氏阳性菌, 其可产生抗菌物质, 抑制有害微生物的繁殖, 能分泌蛋白酶、产酸酶、淀粉酶和半纤维素酶等胞外酶; 另外, 它还能有效分解水体高分子的多糖、蛋白质等污染物, 在水环境中能形成优势菌群, 加速有机物降解, 改善生态环境^[10]。目前, 蜡样芽孢杆菌降解粪污水的研究较少, 尤其是以蜡样芽孢杆菌复合菌液降解粪污水尚无报道。鉴于此, 笔者从大型养殖场及活性污泥、下水道等低温环境下采集样品, 分离并筛选耐冷菌株, 对其进行鉴定后将其添加到污水生物反应器中对猪场粪污水进行净化, 研究其对低温粪污水的降解效率, 旨在构建出适合低温条件的、专一高效的污水降解微生物复合菌剂, 并为该菌剂的实际应用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品。样品采集于低温环境下的大型养殖场及活性污泥、下水道等。

1.1.2 培养基。LB培养基: 酵母粉5 g/L, 蛋白胨10 g/L, NaCl 10 g/L, 琼脂粉15 g/L, 去离子水1 000 mL, pH 7.0。液体培养基不加琼脂。

1.1.3 污水。污水为大型养殖场提供的新鲜粪污水。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株分离。将采集的样品置于浓度为0.9%的生理

基金项目 2013年吉林省重点科技攻关项目(20130206108SF, 20130206053NY); 吉林省科技发展计划产业技术创新战略联盟项目(20130305041NY); 国家科技支撑计划项目(2012BAD14B05)。

作者简介 高星爱(1978-), 女, 吉林延吉人, 副研究员, 博士, 从事能源微生物与生物质资源综合利用研究。*通讯作者, 祝延立, 研究员, 硕士, 从事生物质资源综合利用研究; 张永锋, 研究员, 博士, 从事农村生态与循环农业研究。

收稿日期 2016-05-11

盐水中振荡 30 min, 沉淀后取上清液, 利用稀释法涂布于 LB 基础培养基上^[11], 在低温 10 ℃ 条件下培养并筛选单菌落。

1.2.2 菌株筛选。利用平板分离法筛选获得特征菌株。将这些功能菌分别置于不同的低温环境中进行培养, 观察各菌株生长情况, 并测定培养液的细胞生物量。在 20 ℃ 温度下挑选出细胞生长量 $OD_{660\text{ nm}} > 1.2$ 的菌株。细菌细胞生长曲线测定参照高星爱等^[12]的方法。细菌总数计数采用平板计数法, 按 5% 比例将菌株接入培养液中, 在 30 ℃ 下培养 1~2 d, 取菌液 0.1 ml, 加入 0.9 ml 灭菌水, 振荡混匀, 即为 10^{-1} 倍稀释液, 依次稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 和 10^{-10} 倍菌液, 最后分别取 10^{-8} 、 10^{-9} 和 10^{-10} 这 3 个稀释梯度的菌液 0.1 mL, 用无菌玻璃涂布器均匀涂布于固体 LB 培养基上, 重复 3 次, 置 30 ℃ 恒温培养箱中培养 5 d, 观察并记录每天的菌数 (CFU/mL)。

1.2.3 菌株鉴定。

1.2.3.1 扫描电子显微镜 (SEM) 分析。挑取在培养基上长出的菌株于灭菌的载玻片上, 用灭菌的盖玻片盖住一小部分, 用前固定液 (浓度 0.025 mol/L、pH 6.8 磷酸缓冲液配置的 4% 浓度的戊二醛) 于 4 ℃ 下固定 2 h, 用浓度为 0.025 mol/L、pH 为 6.8 的磷酸缓冲液洗 1 h, 共洗 4 次, 间隔时间为 15 min, 1% 锇酸固定 2 h, 水洗 5 min, 依次用浓度为 50%、60%、70%、80%、90% 的酒精脱水 10 min, 再分别用浓度为 95%、100% 的丙酮干燥 10 min 后再以乙酸戊酯干燥 15 min, 喷金, 采用 GSM-5600 型号的扫描电子显微镜进行扫描, 样品大小显示 $2\text{ }\mu\text{m}$ ^[12]。

1.2.3.2 分离筛选获得的菌株 16S rRNA 同源性比较。利用细菌 RNA 进行 PCR 扩增, 正向和反向引物分别为 5'-ACGGCTACCT TGTACGACT-3' 和 5'-CCCACTGCCTC-CCGTAAGGAGT-3'。PCR 产物克隆利用 pGEM-T Easy 载体 (Pro-mega, USA), 进一步确定发育地位, 将 16S rRNA 基因的核苷酸序列输入 NCBI 网站, 下载同源性较高的序列进行测序。

1.3 菌株降解低温粪污水能力测定 将筛选得到的菌种培养扩繁, 等份混合成复合菌液接种于新鲜粪污水中, 在 20 ℃ 下处理 20 d, 以不接种菌液的粪污水为对照, 测定污水中 COD 值、BOD 值及 DO 值的变化, 得出复合菌液降解粪污水

的能力。COD 与 BOD 的数据由中国科学院东北地理与农业生态研究所提供, DO 的测定采用 JPB-607A 便捷式溶解氧仪进行测定。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与筛选结果 利用平板分离法筛选获得 20 多种特征菌株, 分别置于不同的低温环境下培养, 观察各菌株生长情况, 并测定培养液的细胞生物量。在 20 ℃ 温度下细胞生长量 $OD_{660\text{ nm}} > 1.2$ 的菌株有 4 株, 分别为 NKY-16、YCH-10、GZ-41、FJT-84。

2.2 低温条件下菌株细胞生长的分析结果 由图 1 可以看出这 4 种菌株在 4~25 ℃ 的不同反应温度下的细胞生长量, 随着温度的升高, 其生长量均表现为上升趋势, 在 20 ℃ 温度条件下 $OD_{660\text{ nm}}$ 值表现为 1.2~1.6, 比其他温度条件下的生长量高。但在超过 20 ℃ 之后, 其生长量随之减少。因此选择 20 ℃ 为这 4 种菌株的最适生长温度。在菌株生长的对数期, 菌株 NKY-16、YCH-10、GZ-41、FJT-84 的细胞生长菌体密度分别为 $(5.6 \pm 0.1) \times 10^8$ 、 $(2.9 \pm 0.8) \times 10^9$ 、 $(8.2 \pm 0.6) \times 10^9$ 、 $(9.1 \pm 0.4) \times 10^9$ CFU/mL。

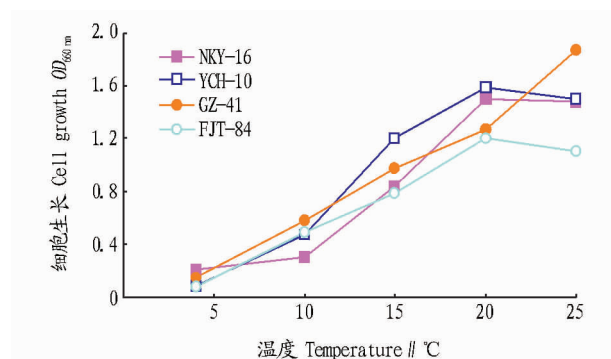


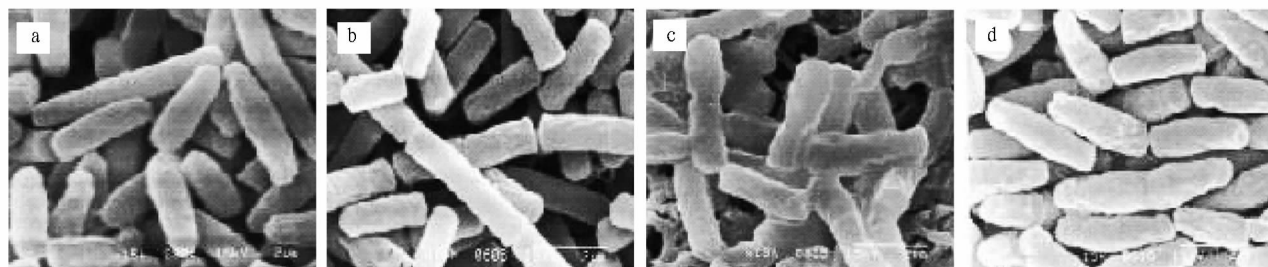
图 1 反应温度对细胞生长曲线的影响

Fig.1 Effects of reaction temperature on the growth curve of cells

2.3 菌株的鉴定结果

2.3.1 形态学观察。分离筛选得到的 4 种耐冷芽孢杆菌的菌落在 LB 培养基呈白色, 菌落大, 表面粗糙, 扁平, 不规则。革兰氏染色呈阳性。

2.3.2 扫描电子显微镜分析结果。扫描电子显微镜照片见图 2。观察结果显示, 菌体细胞为杆状, 产芽孢, 芽孢圆形或柱形, 包囊无明显膨大。



注: a. 菌株 NKY-16; b. 菌株 YCH-10; c. 菌株 GZ-41; d. 菌株 FJT-84。

Note: a. Strain NKY-16; b. Strain YCH-10; c. Strain GZ-41; d. Strain FJT-84.

图 2 4 种耐冷芽孢杆菌电子显微镜扫描结果

Fig.2 Scanning results of four cold-resistant *Bacillus* species under electron microscope

2.3.3 分离菌株的 16S rRNA 鉴定结果。利用 16S rRNA 对菌株进行测序后,构建系统发育树(图 3)。从比对结果来看,分离筛选得到的菌株 GZ-41 与模式种 *Bacillus cereus*. SH 01(属于蜡样芽孢杆菌)的相似性达 99%,菌株 NKY-16、YCH-10、FJT-84 均与 *Bacillus cereus*. G9667(属于蜡样

芽孢杆菌)的相似性达 99%,说明获得的 4 种菌株与蜡样芽孢杆菌有很高的相似性。结合扫描电子显微镜结果与《常见细菌系统鉴定手册》^[13] 分析,将 4 种菌株鉴定为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* 种属)。

2.4 菌株降解粪污水的效果 结果表明,添加菌液的粪污水的 COD 值从 5 585.40 mg/L 降至 1 093.97 mg/L,去除率达 80.40%;BOD 值从 680.00 mg/L 降至 600.00 mg/L,去除率为 11.76%,DO 增加率为 75.00%;对照的 COD 值从 5 585.40 mg/L 降至 2 831.80 mg/L,去除率为 49.30%;BOD 值从 680.00 mg/L 降到 633.00 mg/L,去除率为 6.90%,DO 增加率为 47.00%。与对照比较,复合菌表现出了较高的降解能力,同时也表现出较强的生物修复能力,其处理低温粪污水效果明显。

3 结论

该研究从低温环境中筛选获得 4 种菌株并利用菌株之间的协同作用构建微生物复合菌,通过扫描电子显微镜分析及 16S rRNA 的系统发育树的构建,可以鉴定 4 种菌株为蜡样芽孢杆菌。复合菌在粪污水处理方面表现出了较高的降解能力,可为污染物生物修复提供优良的菌种资源,但其作用机理、生化特征等方面的研究还存在一些不足,需深入研究复合菌之间的最佳配比及优化条件等,构建出适合低温污水降解的专一有效微生物复合菌剂,同时结合粪污水厌氧消化技术,最终将其应用于粪污水低温处理系统。

参考文献

[1] 赵恒斗. 规模化养猪的污水产生、治理与综合利用[J]. 中国沼气,1996,14(3):30-32.

[2] 李淑兰,吴晓美,刘英,等. 猪场废水处理技术[J]. 中南林业学院学报,2005,25(5):133-138.

[3] 黄婧,吴若菁,陈彪,等. 畜禽养殖污水中高效氨氮降解菌的筛选、鉴定及生长条件研究[J]. 环境工程学报,2011(8):1779-1784.

[4] 乔培培,陈丕茂,秦传新,等. 利用微生物净水研究进展[J]. 广东农业科学,2014(1):149-153.

[5] 邹文娟,许晓慧,王国武,等. 光合细菌和枯草芽孢杆菌在污水处理中的应用[J]. 广东农业科学,2010(9):199-201.

[6] 梁雷,何丽,汤淳,等. DL 微生物菌剂对小流域水质处理效果[J]. 辽宁工程技术大学学报,2011,30(5):747-750.

[7] 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.

[8] DEVILLER G, ALIAUM E C, FRANCONAVA M A, et al. High rate algal pond treatment for water reuse in an integrated marine fish recirculating system; Effect on water quality and sea bass growth[J]. Aquaculture, 2004,235(1/2/3/4):331-344.

[9] MAYER J, SCHEID S, WIDMER F, et al. How effective are ‘effective microorganisms® (EM)’? Results from a field study in temperate climate[J]. Applied soil ecology, 2010,46(2):230-239.

[10] 宋协法,潘玉兰,马真. 主要微生物生态菌在水质净化技术中的研究进展[J]. 渔业现代化,2014,41(3):36-42.

[11] 高星爱,赵新颖,凤鹏,等. 分离筛选低温发酵功能菌及促进沼气产量的研究[J]. 中国沼气,2014,32(3):14-17.

[12] 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.

[13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:43-65.

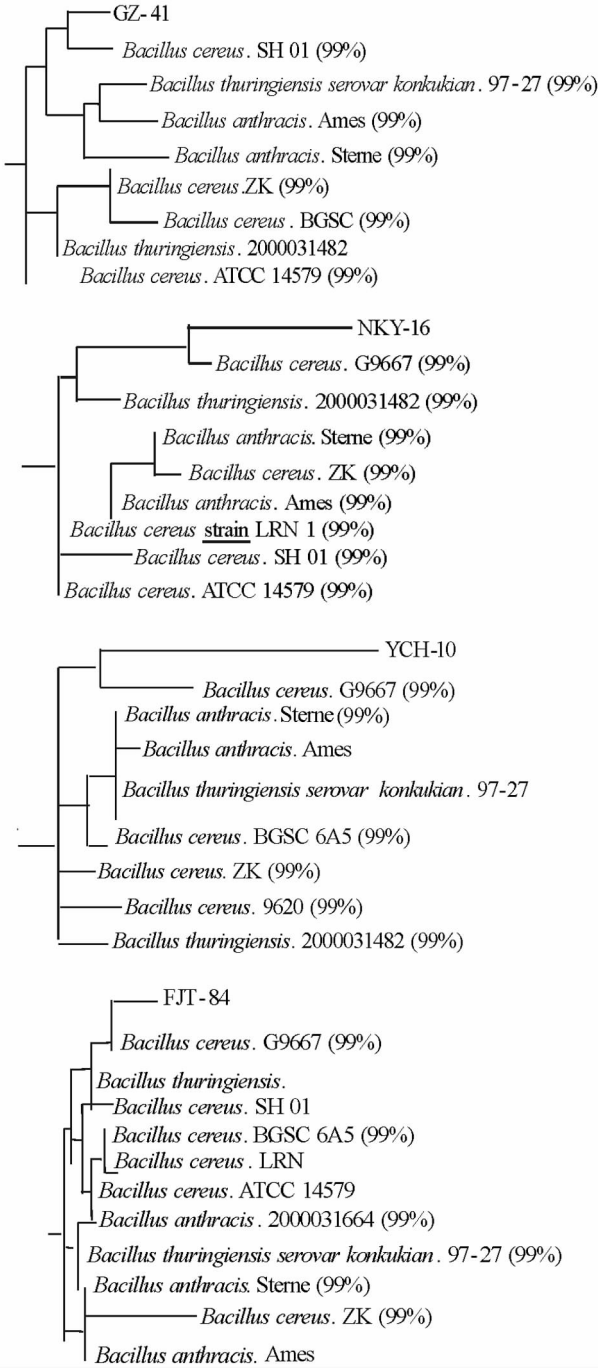


图 3 4 种菌株的 16S rRNA 序列与系统发育树的构建
Fig. 3 Construction of 16S rRNA sequence and phylogenetic tree of four strains