

猪场粪水抑菌毒性的消除研究

李长秀, 韦明肯*, 刘国标 (广东石油化工学院生物与食品工程学院, 广东茂名 525000)

摘要 [目的]研究猪场粪水抑菌毒性的消除。[方法]采集发生严重发酵抑制的猪场集粪池粪水,以大肠杆菌作为指示菌,用平板培养计数法检测粪水对大肠杆菌的抑制作用,并观察添加硫代硫酸钠和硫酸镁对缓解粪水抑菌毒性的效果。[结果]猪场粪水悬浮的大肠杆菌存活率仅为 $1.35\% \pm 0.02\%$,添加硫代硫酸钠至终浓度为 0.4% ,可将悬液中大肠杆菌存活率提高到 $17.4\% \pm 0.14\%$;悬液中 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终浓度超过 1.2% 时大肠杆菌存活率反而只有 $0.14\% \pm 0.01\%$,而同时添加终浓度为 $0.2\% \text{MgSO}_4$ 和 $2\% \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$,则悬液中仍然有 $17.4\% \pm 0.85\%$ 的大肠杆菌存活,说明 MgSO_4 有利于降低 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 毒性;猪场粪水在存放2个月后基本失去抑菌毒性。[结论]该研究对解决因消毒剂残留引起的沼气发酵抑制有积极意义。

关键词 猪场;消毒剂;沼液;硫代硫酸钠

中图分类号 S216.4 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)02-0202-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.02.062



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effect of Sodium Thiosulfate on Alleviating Biogas Fermentation Inhibitory of Swine Manure

LI Chang-xiu, WEI Ming-ken, LIU Guo-biao (College of Biological and Food Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming, Guangdong 525000)

Abstract [Objective] The aim was to study the elimination of bacteriostasis toxicity of liquid manure in pig farms. [Method] The fecal slurry collected from pig farms that could not ferment normally was investigated. After sterilization, it was used to suspend and dilute *Escherichia coli* suspension and checked by method of plate counting. The effects of sodium thiosulfate and Magnesium Sulfate as neutralizer on alleviating the toxin were investigated as well. [Result] Survival rate of *Escherichia coli* in liquid manure was only $1.35\% \pm 0.02\%$, survival rate increased to $17.4\% \pm 0.14\%$ when the concentration of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ was 0.4% after adding $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Survival rate of *Escherichia coli* was $0.14\% \pm 0.01\%$ when the concentration of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ was over 1.2% . Survival rate was $17.4\% \pm 0.85\%$ after adding $0.2\% \text{MgSO}_4$ and $2\% \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; MgSO_4 was beneficial to reduce toxicity; after laying up for more than 2 months, fecal slurry almost completely lost the antibacterial effect. [Conclusion] The study has positive meaning for solving biogas fermentation inhibition caused by the residue of disinfectant.

Key words Digesters; Disinfectants; Biogas slurry; Sodium thiosulfate

在大中型养殖场沼气发酵方式对畜禽粪便进行无害化、资源化处理减少粪便对环境污染的重要方式^[1-2]。沼气发酵是一种厌氧发酵(anaerobic digestion),是厌氧微生物在没有溶解氧气、并且完全封闭的条件下,将人类或者牲畜活动产生的粪便、农民农作产生的农作物秸秆等有机物转化为 CH_4 、 CO_2 和其他营养物质的过程^[1]。在产乙酸菌、甲烷菌等多种厌氧微生物的协同作用下,将富含营养的有机物质不断分解转化为甲烷,并储存能量,只有小部分的有机碳被彻底氧化生成二氧化碳,释放能量维持微生物自身的生命活动^[2-3]。虽然沼气工程在养猪场中被普遍应用,但在大型养殖场中,定期消毒是必不可少的技术操作,消毒剂最后也随着冲洗水滞留在粪水混合物中,对后续的沼气发酵造成不同程度的抑制^[4-7]。目前,关于消毒剂滞留对沼气发酵的抑制研究并不多,能提出有效解决办法的更是鲜见报道。该研究主要观察硫代硫酸钠、硫酸镁等添加物对降低猪场粪水中消毒剂沼气发酵抑制的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验用菌。试验所用菌株为大肠杆菌 ATCC8099 菌株,为本实验室保存。

基金项目 广东省自然科学基金项目(2014A030313776);广东高层次人才引进项目,广东高校高层次人才项目,广东石油化工学院人才引进项目。

作者简介 李长秀(1974—),女,广西北海人,实验师,在读硕士,从事环境微生物学研究。*通信作者,教授,博士,从事环境微生物方面研究。

收稿日期 2018-08-01; **修回日期** 2018-08-09

1.1.2 猪场粪水混合物。猪场粪水混合物采自茂名市某万头猪场的集粪池,该猪场的沼气池产气量很低,不能正常发酵。粪水储存于塑料桶中,在阴凉处存放。

1.1.3 主要试剂、药品和培养基。硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$):按需要配制不同浓度(m/V);硫酸镁(MgSO_4):按需要配制不同的浓度(m/V);LB培养基:蛋白胨(10 g)、酵母膏(5 g)、氯化钠(10 g)、蒸馏水(1 000 mL)、pH 7.0;牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏(3 g)、蛋白胨(10 g)、氯化钠(5 g)、琼脂(15~20 g)、蒸馏水(1 000 mL)、pH 7.0~7.2。

1.1.4 主要仪器与设备。不锈钢手提式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司);数显式电热恒温干燥箱(上海沪越实验仪器有限公司);电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 方法

1.2.1 粪水上清液的制备。猪场采集的粪水混合物用漩涡振荡器充分震荡,然后转入50 mL离心管,10 000 r/min离心5 min,收集上清液并转入三角瓶中灭菌保存,此为粪水上清液,供后续的试验使用。

1.2.2 大肠杆菌悬液的制备。摇瓶培养24 h的大肠杆菌菌液于5 mL离心管中4 000 r/min离心5 min,弃上清液,加0.9%生理盐水打散洗涤,再离心,弃上清液,如此洗涤3次,最后用生理盐水把菌体重悬,调整浓度,使其 $\text{OD}_{600} = 0.5$,并用平板培养法确定此菌液的浓度。菌液于4℃冰箱中保藏,3 d内使用。

1.2.3 硫酸镁和硫代硫酸钠溶液的配制。称量一定量的固体硫酸镁和硫代硫酸钠,用灭菌的粪水上清液溶解至所需要

的浓度。

1.2.4 硫代硫酸钠和硫酸镁对粪水上清液的毒性中和作用。用灭菌的沼液上清液对 4 ℃ 保存的菌悬液进行系列 10 倍浓度梯度稀释,每个梯度稀释均保持孵育 20 min,然后加入 1/50 体积不同浓度的硫代硫酸钠母液进行中和,使硫代硫酸钠的终浓度分别达到 0.15%、0.25%、0.30%、0.32%、0.40%、1.20%、1.40% 和 1.80%。阳性对照不加硫代硫酸钠,阴性对照用生理盐水代替灭菌沼液上清液。

中和作用 1 h 后,取 10^{-5} ~ 10^{-8} 稀释度,每个梯度涂 3 个平板,每个平板的取样量为 0.1 mL。置于 37 ℃ 下培养 24 h,即可进行试验结果的菌落计数,平板计数的结果换算成每毫升溶液的菌体存活数 (CFU/mL),进而把各试验组的菌体存活数换算成与生理盐水对照组的相对存活率。

2 结果与分析

2.1 硫代硫酸钠浓度对解除沼液抑菌作用的影响 由图 1 可知,以生理盐水悬浮稀释的大肠杆菌成活率为参照 (100%),用灭菌的粪水上清液悬浮稀释后,大肠杆菌的存活率仅为 $1.35\% \pm 0.02\%$,可见此间猪场的粪水中残留有高浓度的抑菌物质,由此推测他对其他的沼气发酵微生物也具有强烈的抑制作用,这也可以解释为什么这家猪场的沼气池产量很低,不能正常发酵。加入一定浓度的硫代硫酸钠可明显提高大肠杆菌在粪水悬液中的存活率:在 0.15% ~ 0.40% 的范围内,硫代硫酸钠的浓度越高,成活率提高的越明显;在硫代硫酸钠的浓度为 0.40% 时,大肠杆菌的成活率达到 $17.4\% \pm 0.14\%$ 。但是当硫代硫酸钠浓度太高时,对悬液中的细菌则产生强烈的抑制作用,如图 1 所示,硫代硫酸钠终浓度达到 1.2% 上时,仅有 $0.14\% \pm 0.01\%$ 的大肠杆菌存活,由此可见,硫代硫酸钠作为一种还原性化合物,仅在一个比较窄的浓度范围内用于中和粪水混合物中的残留毒性物质。

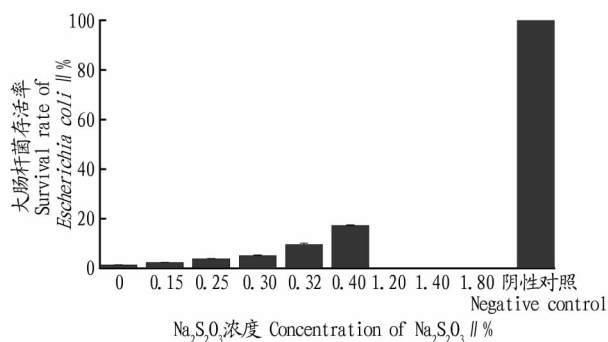


图 1 硫代硫酸钠浓度对沼液抑菌作用的影响

Fig.1 Effect of concentration of Na₂S₂O₃ on bacteriostasis of biogas slurry

2.2 硫酸镁对硫代硫酸钠减毒的辅助作用 镁是一种参与生物体正常生命活动及新陈代谢过程必不可少的元素。镁离子在细胞中具有多种生物功能,如影响钾离子和钙离子的转运、调控信号的传递、参与能量代谢、蛋白质和核酸的合成等,因此镁离子的存在可以提高细胞的生命活力。该试验中,虽然硫代硫酸钠可以在一定程度缓解粪水中残留消毒剂的毒性,但是过高的硫代硫酸钠浓度反过来会完全抑制大肠

杆菌的生长。但是,加入一定量硫酸镁却可以使悬液中的大肠杆菌恢复生长。如图 2 所示,当悬液为 1.2% 硫代硫酸钠 + 0.2% 硫酸镁时,有 $17.4\% \pm 0.85\%$ 的大肠杆菌可以恢复生长,如果没有硫酸镁存在,则仅有 $0.14\% \pm 0.01\%$ 的大肠杆菌存活 (图 1)。原因在于 MgSO₄ 对沼液中的抑菌物质可能有一定的中和作用。

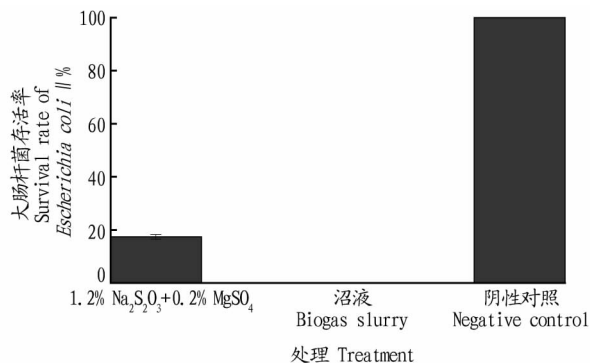


图 2 硫酸镁对粪水上清液抑菌作用的影响

Fig.2 Effect of MgSO₄ on bacteriostasis of liquid manure supernatant

2.3 水样放置时间对抑菌作用的影响 由于该猪场使用的消毒剂是氧化型的消毒剂聚维酮碘,该消毒剂在与粪便的接触过程中慢慢被还原,毒性也逐渐减弱。如图 3 所示,在新鲜的粪水上清液中,大肠杆菌的存活率几乎为 0,而存放 2 个月,粪水上清液中大肠杆菌的存活率提高到 $7.95\% \pm 1.06\%$ 。说明水样放置超过 2 个月,其中的消毒剂残留毒性也会慢慢减弱。

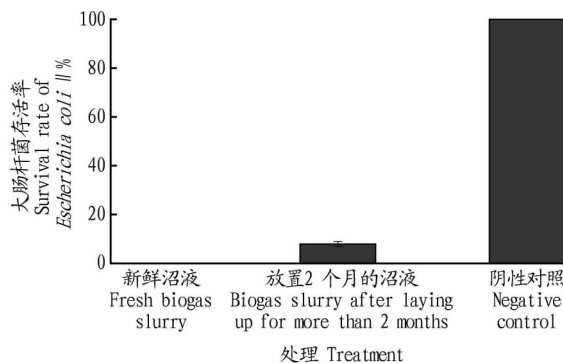


图 3 存放时间对粪水上清液抑菌作用的影响

Fig.3 Effect of resting time on bacteriostasis of liquid manure supernatant

3 讨论

在大型养殖场中,抗生素和消毒剂是控制疾病必须使用的药物。抗生素使用后在粪便中残留及其对沼气发酵的影响已引起人们的注意^[8-10]。

试验中的粪水混合物是养猪场日常消毒冲洗用水和猪粪尿的混合物。虽然粪水中本来就含有很多微生物,但是由于其种类和数量都没法确定,因此,将粪水经灭菌后重新添加已知浓度的大肠杆菌作为消毒剂毒性的指示菌,以平板培养时大肠杆菌的菌落数量来表征粪水的抑菌程度,菌落数量越多,表明毒性越小,抑制越弱。

研究发现沼液对大肠杆菌具有强烈的抑菌效果,而将具有还原性的硫代硫酸钠加入沼液后,平板培养的菌落数明显增加,说明沼液中可能含有氧化型消毒剂,这与我们对猪场的调查结果可以互相印证。硫代硫酸钠具有很强的还原性,是许多氧化型消毒剂的中和剂,可以中和残留的消毒剂^[11-12]。该研究所用的沼液取自一个不能正常发酵产气的猪场沼气池,经调查得知该猪场日常所用的消毒剂是聚维酮碘,因此我们推测沼气不能正常发酵的原因是聚维酮碘的残留抑制了沼气微生物的活性,并试探性加入硫代硫酸钠来中和消毒剂的毒性。试验结果与我们的预期相符,证明该猪场沼气池不能正常发酵的原因是消毒剂残留。另外有人发现硫酸镁能中和四环素、土霉素、新霉素、多粘菌素、链霉素等抗生素^[13],我们在加入硫代硫酸钠后再加入硫酸镁,能明显降低沼液对大肠杆菌的抑制。这种现象有2种可能性,一是硫酸镁对硫代硫酸钠的中和作用具有协同性,二是沼液中还存在来自于饲料的抗生素残留。

由于消毒剂和抗生素等对各种微生物的毒性具有广谱性,因此只要证明猪粪水对大肠杆菌具有毒性,那么就说明这种药物残留对沼气发酵过程中与发酵相关的其他微生物也具有毒性。沼气发酵是一个复杂的生态体系,沼液对细菌的抑制作用与多种因素有关,除了有毒有害物质之外,沼液的pH也是重要的影响因素^[14-16],该试验只研究猪粪水对大肠杆菌的抑制及其消除办法,对于大型猪场的沼气发酵抑制,添加硫代硫酸钠有一定的消除作用,但很难完全中和沼液中的抑菌毒性,可能沼液中还存在其他的非氧化型的消毒剂以及抗生素的影响^[17-19]。但该研究表明硫代硫酸钠对沼液的毒性有缓解作用,可为猪场的沼气池非正常的产气量下降提供应急解决方案。另外,还可以在此基础上,进一步探讨用硫酸镁等作为助剂提高处理效果的可能性。

参考文献

[1] ROUBIK H, MAZANCOVÁ J, PHUNG L D, et al. Current approach to ma-

nure management for small-scale Southeast Asian farmers-Using Vietnamese biogas and non-biogas farms as an example [J]. *Renewable energy*, 2018, 115:362-370.

- [2] DE BAERE L. Novel trends in anaerobic digestion of municipal solid waste [J]. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 2003, 68(2 PtA):117-124.
- [3] ABBASI T, TAUSEEF S M, ABBASI S A. A brief history of anaerobic digestion and "biogas" [C]// *Biogas energy*. New York: Springer, 2012: 11-23.
- [4] 张京景, 苏有勇, 孔琳, 等. 福尔马林消毒剂对养殖场粪污产沼气的影晌[J]. *农业工程学报*, 2011, 27(S1): 64-67.
- [5] 张京景, 苏有勇, 李昊, 等. 消毒剂对沼气发酵影响的实验研究[J]. *化学与生物工程*, 2011, 28(3): 78-80.
- [6] 管运涛, 蒋展鹏, 金鹏. 两相厌氧膜生物系统产气特性研究[J]. *中国沼气*, 1999, 17(4): 3-6.
- [7] 朱忠勇, 马立人, 王艾丽, 等. *实用医学检验学* [M]. 北京: 人民军医出版社, 1992: 500.
- [8] ALVAREZ J A, OTERO L, LEMA J M, et al. The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure [J]. *Bioresource technology*, 2010, 101(22): 8581-8586.
- [9] SHI J C, LIAO X D, WU Y B, et al. Effect of antibiotics on methane arising from anaerobic digestion of pig manure [J]. *Animal feed science and technology*, 2011, 166/167: 457-463.
- [10] 张敏, 张俊, 钱金秋, 等. 磺胺二甲嘧啶对沼气发酵过程中酶活性和微生物群落功能多样性的影响[J]. *生态与农村环境学报*, 2017, 33(7): 653-659.
- [11] 林锦炎, 袁朝森. 吐温 80 对硫代硫酸钠中和消毒剂效果的影响[J]. *中国消毒学杂志*, 1995, 12(4): 233-234.
- [12] 蒋兴祥, 章迎春, 张行燕. 复方硫代硫酸钠中和含氯复方消毒剂效果的试验观察[J]. *中国消毒学杂志*, 2001, 18(1): 49-50.
- [13] 张吕良, 黄忠强, 龙凤鸣, 等. 抗生素中和剂对提高细菌性培养阳性率的研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2008, 30(4): 630.
- [14] 马茹霞. 氮源对玉米秸秆沼气发酵过程及微生物群落的影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2017.
- [15] 董明华. 云南沼气发酵生态系统的原核生物群落时空动态研究[D]. 昆明: 云南大学, 2016.
- [16] 张加稳. 沼液抑制云南红豆杉叶斑病原菌的实验研究[D]. 昆明: 云南师范大学, 2016.
- [17] 张敏, 钱金秋, 李忠洲, 等. 恩诺沙星对厌氧发酵过程中水解酶活性及沼气产量的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2016, 24(11): 1539-1546.
- [18] 张凯煜, 谷洁, 赵昕, 等. 土霉素和磺胺二甲嘧啶对堆肥过程中酶活性及微生物群落功能多样性的影响[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(12): 3927-3936.
- [19] 李建昌, 孙可伟. 淀粉酶前处理应用于猪粪沼气发酵的研究[J]. *环境科学与技术*, 2010, 33(4): 117-121.

(上接第184页)

重金属污染风险低。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中铅的测定: GB/T 5009.12—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中总汞及有机汞的测定: GB/T 5009.17—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中总砷及有机砷的测定: GB/T 5009.11—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中铬的测定: GB/T 5009.123—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中镉的测定: GB/T 5009.15—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定: GB/T 22338—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 动物源性食品中硝基喹啉类药物代谢物残留量检测方法 高效液相色谱/串联质谱法: GB/T 21311—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 动物源性食品中多种β-受体激动剂残留量的测定 液相色谱串联质谱法: GB/T 22286—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 牛猪肝和肌肉组织中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚残留量的测定 液相色谱-串联质谱法: GB/T 20766—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 水果和蔬菜中450种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱-串联质谱法: GB/T 20769—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 牛肝和牛肉中阿维菌素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法: GB/T 20748—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [12] 牛春娥, 郭婷婷, 袁超, 等. 新丝路经济带西部地区羊肉中兽药残留风险分析[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(10): 153-154, 158.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中污染物限量: GB 2762—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [14] 中华人民共和国农业部. 无公害食品 肉牛饲养兽药使用准则: NY/T 5125—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [15] 中华人民共和国农业部. 无公害食品 畜禽饲养兽药使用准则: NY/T 5030—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [16] 中华人民共和国农业部. 无公害农产品 兽药使用准则: NY/T 5030—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 中华人民共和国农业部, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.