



青島農業大學

学士学位论文

题 目	除臭微生物的筛选
姓 名	徐中芊
学 号	20180203008
学 院	生命科学学院
专 业	生物技术（食用菌）
班 级	201801
指导教师	郭立忠老师

二〇二二年五月

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是在导师的指导下进行研究工作所取得的原创性成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中标明。

本声明的法律后果由本人承担。

论文作者（签名）：

年 月 日

学位论文版权使用授权书

本论文作者完全了解青岛农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权青岛农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

论文作者（签名）：

年 月 日

指导教师（签名）：

年 月 日

除臭微生物的筛选

摘要：我国养殖业目前飞速发展，众多养殖场所产生的排泄物对于环境自然降解的压力很大，需要人为地对排泄物中产生的过多的氨气和硫化氢进行处理，以保护环境，实现可持续发展。本文通过筛选培养基对除臭菌株进行初筛和复筛，并进行菌剂复配和猪场污水除臭实验。实验结果表明：除氨菌株中，地衣芽孢杆菌在培养 24h 时达到 67.51% 的去氨率，甲基营养菌 72h 时达到 67.58%，巨大芽孢杆菌 60h 时氨去除率达到 65.04%；三株菌株复配的氨去除率没有单独去除率高。地衣芽孢杆菌(根)、枯草芽孢杆菌(根)、胶质芽孢杆菌在酸性和中性条件下具有利用硫代硫酸钠的能力。本次实验结果为后续除臭菌剂的研发和利用奠定基础 and 提供参考。

关键词：除臭；氨气；硫化氢

Screening of deodorant microorganisms

Abstract: Livestock breeding is developing rapidly in our country now, and the faeces and waste water from livestock farm has great pressure on their natural degradation, which led to artificially dispose excessive ammonia gas and hydrogen sulfide from waste water to protect the environment and realize sustainable development. In this work, deodorization strains were gained on screening medium after preliminary and secondary examination and deodorization effect of their bacterial compound and disposing piggery waste water was tested. The experimental result showed that the removal efficiency of ammonia nitrogen for *Bacillus licheniformis*, *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus megaterium* could achieved 67.51% in 24h, 67.58% in 72h and 65.04% in 60h, respectively. And the removal of the compound of these three strains was lower than that of single strain. *Bacillus licheniformis*(Gen), *Bacillus subtilis*(Gen) and *Bacillus mucilaginosus* could utilize sodium thiosulfate as energy in the acid and neutrality condition. The above experimental results laid the foundation and provide the reference for the research and development and utilization of further microbial deodorization compound.

Key words: Deodorization; Ammonia gas; Hydrogen sulfide

目 录

1 文献综述	1
1.1 现状与危害	1
1.2 物理除臭法	1
1.3 化学除臭法	2
1.4 生物除臭法	2
1.5 其他除臭技术	2
1.5.1 主要清粪技术	2
1.5.2 养殖场改造除臭技术	2
1.6 本文研究的内容和意义	3
2 材料与方法	3
2.1 药品与仪器	3
2.1.1 实验材料	3
2.1.2 实验药品	4
2.1.3 实验仪器	4
2.2 培养基组成与配置	4
2.3 菌株活化	4
2.4 标准曲线的制作	5
2.4.1 实验原理	5
2.4.2 实验试剂的制备	5
2.4.3 标准曲线的制作	5
2.5 除氨菌株初筛实验	6
2.6 除氨菌株复筛实验	6
2.7 菌株复配除氨实验	7
2.8 猪场污水除臭实验	7
2.9 除硫化氢菌株初筛实验	8
3 结果	9
3.1 除氨菌株初筛实验	9
3.2 除氨菌株复筛实验	9
3.3 菌株复配除氨实验	12

3.4 猪场污水除臭实验	13
3.5 除硫化氢菌株初筛实验	14
4 分析与讨论	15
5 结论	16
参考文献	18
致谢	19

1 文献综述

1.1 现状与危害

随着科学技术的不断进步,人们逐渐从吃得饱转向吃得好,对于高质蛋白质的需求量也逐渐增高,随之而来的就是一座座养殖场拔地而起,在给人们源源不断输送肉蛋奶的同时,因为养殖量增大,产生的排泄物就会超过自然分解量,所产生的恶臭物质常年累月的堆积就会造成环境恶化,也会影响牲畜的健康及产出量,还会对养殖场工作人员的身心健康造成影响。牲畜排泄物中可以闻嗅到的恶臭物质大部分为含硫化合物、卤素及其衍生物、含氮的化合物和含氧的有机物,其中危害性较大的有硫化氢和氨气,因其沸点低挥发性强,易散发到大气中。硫化氢和氨气都对人体有毒害作用,长期处于这些气体影响下的工作人员不仅对眼、呼吸系统和中枢神经造成影响,会感到头晕、恶心,严重的还会发生虚脱和休克,严重影响工作效率。而含硫化合物和卤素及其衍生物对人的危害也是巨大,因为在食品中,含有大量的烷基苯磺酸会破坏人体肠道黏膜细胞。同时还会导致食物中毒、食欲不振等现象发生;另外还包括了甲基酰胺类物质如呋喃醋酮及醛固形物、酚光体以及其他一些具有致癌性气味和刺激性化合物等会对人类健康造成危害^[1]。目前牲畜排泄物的处理问题亟待解决。

目前现存对于牲畜排泄物的除臭方法主要有物理、化学、生物除臭法^[2]。

1.2 物理除臭法

物理除臭法主要依靠活性炭吸附和稀释法。活性炭具有高吸附性和稳定的化学性质,对环境无污染,是一种理想的除臭方法。但是在实际应用中发现:活性炭具有较大比表面积、良好稳定性且价格低廉等特点;但其缺点就是易吸水膨胀并产生有毒物质从而影响除臭效率。因此为了提高人们使用生活垃圾或废渣时对环境造成危害程度最小化而选择合适处理工艺和设备进行筛选成为一个重要课题,活性炭吸附法是使用活性炭对臭味物质进行吸附,优点是工艺成熟、吸附率高,缺点是单次吸附量小且易堵塞孔隙造成二次污染。稀释法是将臭气从高浓度地区排向低浓度地区如排入高空,优点是成本低,缺点是没有从根本上解决臭气,还是会造成环境污染^[3]。

1.3 化学除臭法

化学除臭法在处理大分子量的恶臭物质时,由于其反应条件温和,且可以将对环境无害,同时还能有效去除有毒有机物。化学除臭法主要是催化燃烧法和化学试剂吸收法。催化燃烧法是选用合适的催化剂辅助将臭气燃烧消除,优点是能耗低且操作简便,缺点是催化剂的选择较困难且除臭设备复杂。化学试剂吸收法是依靠化学反应对臭味物质进行吸收,优点是能处理大分子量的恶臭物质,缺点是部分不溶于水的臭味物质无法被处理且存在二次污染问题^[4]。

1.4 生物除臭法

生物除臭法是以臭味物质作为底物驯化适宜的微生物菌群,使臭味物质在微生物同化、异化的过程中被去除掉^[5]。生物除臭法主要是以微生物除臭为主,常温即可反应,且能耗低,维护成本低,适用范围广,将合适的菌剂放入反应体系中即可作用消除臭味物质,不污染环境,是目前最优秀且最具潜力的除臭方法^[6]。

微生物除臭是利用微生物的硝化、反硝化、氧化还原等生理活动将有毒害作用的臭气作为营养物质分解利用,最终生成 CO_2 、 H_2O 、 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等无毒无害无臭味的终产物^[7]。

1.5 其他除臭技术

1.5.1 主要清粪技术

规模化养殖场的处理粪便方法主要有干清粪、水冲粪和水泡粪 3 种,不同的处理方法对于空气质量、污水总体积和粪便肥力的影响都不同^[8]。干清粪工艺分为人工干清粪和机械自动干清粪,人工干清粪劳动强度大、成本高且工作效率低;机械自动干清粪通过机械自动化控制,减少人与牲畜的接触和疾病传播,但机械本体和后期维护成本高,因此需要研究更加简单有效的工艺。水冲粪工艺能及时地清除粪便,但冲洗圈舍的水量极大,增加了污水的总体积,粪便肥力下降严重,污染范围更广,这种方式几乎已被淘汰。水泡粪工艺是基于水冲粪工艺的改良版,减少用水量,但粪尿在圈舍内停留时间长,产生的恶臭物质会影响牲畜和员工的健康,且污染物浓度增加,后期处理难度也更高^[9]。

1.5.2 养殖场改造除臭技术

对排泄物及时地进行排污处理可以避免环境污染、保护员工身心健康、提高养分回收率和提高养殖场经济效益。不仅可以优化清粪工艺,也可以改造圈舍周

围环境来达到降低臭味的效果^[10]。综合优化圈舍墙体地面、机械装制、饲养方式和自动控制等方面,提高墙体透气性、优化机械清粪的系统结构、降低机械维护成本、训练牲畜定点排泄,便于排泄物集中处理和提高清粪效率;改进堆肥技术,防止粪便肥力流失和降低环境污染;建议在圈舍内添加活性污泥,提高粪肥利用率,减少粪便中的有机物、氮素和氨浓度;可以优化堆肥技术,采用循环曝气系统对堆放料进行处理。同时加强养分管理措施和防渗漏控制措施,在饲料中加入一些生物制剂或微生物制取物等物质可有效降低其降解速度并增加猪营养成分及抗性,提高畜禽免疫力,减少环境污染事件发生的概率;可以提高饲养管理技术,在圈舍内增加曝气设备和自动控制装置等,减少人为干扰的发生,降低养殖成本^[11]。养殖场粪便中的有机污染物主要是各种含菌物质,在我们生活过程中会产生大量难降解有机物和氨气,这些都对环境造成严重污染。因此有必要探索合适于养殖场的生物技术方法来减少对环境的影响及保护员工身心健康、提高经济效益以及促进农业可持续发展;也可以为今后该领域在除臭菌筛选过程中提供一定参考,为以后的研究打下一定基础。

1.6 本文研究的内容和意义

本文主要是通过筛选培养基对不同菌株进行初筛和复筛,通过纳氏试剂分光光度法测量不同培养时间下所含氨含量和生物量,确定去除率高的菌株,并进行复配和猪场污水除臭实验,筛选出去除氨氮效果好的菌株;配置 Waksman 培养基和硫代硫酸盐培养基筛选出能利用硫元素的菌株,为后续继续研究更好的菌剂研发提供参考,以实现保护环境的目的。

2 材料与方法

2.1 药品与仪器

2.1.1 实验材料

实验菌株:地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)、甲基营养菌(*Bacillus methylotrophicus*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、地衣芽孢杆菌(根)、枯草芽孢杆菌(根)、侧孢芽孢杆菌(根)。

材料准备：比色皿、试管、接种环、不同型号锥形瓶、封口膜、皮筋、牛皮纸、马克笔、离心管、药匙、称量纸、冰露纯净水。

2.1.2 实验药品

LB 肉汤、葡萄糖、蒸馏水、氯化钠、无水碳酸钠、磷酸氢二钾、硫酸铵、七水合硫酸镁、硫酸亚铁、纳氏试剂、无氨水、酒石酸钾钠、硝酸钾、氯化镁、氯化铵、氯化亚铁、无氨水、98%浓硫酸、硫化铁。

2.1.3 实验仪器

分光光度计、精密移液枪、酒精灯、离心机、恒温振荡培养箱、超净工作台、分析天平。

2.2 培养基组成与配置

脱氨细菌筛选培养基：葡萄糖 5g，NaCl 0.5g，Na₂CO₃ 1g，K₂HPO₄ 0.5g，(NH₄)₂SO₄ 0.8g，MgSO₄·7H₂O 0.5g，FeSO₄·7H₂O 0.01g，蒸馏水 1000mL，pH 自然。

脱硫细菌筛选培养基：葡萄糖 5g，K₂HPO₄ 0.5g，KNO₃ 1g，MgCl₂ 0.5g，NaCl 0.5g，NH₄Cl 0.5g，Na₂CO₃ 1g，FeCl₂ 0.01g，蒸馏水 1000mL，pH 自然^[12]。

LB 细菌基础培养基：胰蛋白胨 10.0g，酵母提取物 5.0g，NaCl 11.0g，蒸馏水 1000mL，pH 7-7.5。

Waksman 培养基：Na₂S₂O₃·5H₂O 8g，KH₂PO₄ 3g，NH₄Cl 0.1g，MgSO₄·7H₂O 0.5g，FeSO₄·7H₂O 0.01g，CaCl₂ 0.3g，蒸馏水 1000mL，pH 4。

硫代硫酸盐培养基：Na₂S₂O₃·5H₂O 8g，K₂HPO₄ 2g，KH₂PO₄ 2g，NH₄Cl 0.4g，MgSO₄·7H₂O 0.2g，FeSO₄·7H₂O 0.01g，蒸馏水 1000mL，pH 7。

非嗜酸性硫细菌和嗜酸性硫细菌采用的培养基分别为硫代硫酸盐培养基和 Waksman 培养基。

在配置脱氨细菌筛选培养基和脱硫筛选培养基时，磷酸氢二钾要与培养基其他成分分开灭菌，需单独配置高浓度的磷酸氢二钾，待灭菌后加入培养基中，因为溶液中的磷酸氢根离子会与溶液中游离的镁离子反应生成微溶于水的磷酸氢镁沉淀，影响后续使用。

2.3 菌株活化

因实验选用菌株均为细菌，故采用 LB 培养基进行菌株的活化。

活化菌株的具体操作步骤是用接种环在一级菌种的试管斜面上挑取菌体，接种到 LB 液体培养基中，以 37℃ 的温度、120r/min 在恒温振荡培养箱中振荡培养适宜时间后，即得到活化好的菌液，全程注意无菌操作。

2.4 标准曲线的制作

2.4.1 实验原理

除氨菌株复筛是使用纳氏试剂分光光度法测量菌液上清液中的吸光度，带入标准曲线中得出氨含量。纳氏试剂与溶液中以游离态的铵离子形式存在的氨氮反应生成黄棕色络合物，该络合物的吸光度与氨氮含量成正比，于 420nm 处测量吸光度^[13]。

2.4.2 实验试剂的制备

氨标准贮备液(1mg/mL)：称量 0.1571g 经 105℃ 干燥 1 h 的 GR 级氯化铵，少量无氨水溶解后移入 50mL 容量瓶中，用无氨水稀释至刻度后摇匀。

氨标准溶液(20μg/mL)：吸取 5.00mL 氨标准贮备液于 250mL 容量瓶中，用无氨水稀释至刻度后摇匀，本试剂需现用现配。

硫酸吸收液：密度为 1.84g/mL，物质的量浓度为 0.005mol/mL^[14]。

2.4.3 标准曲线的制作

取 7 支试管，分别加入 0.00mL、0.10mL、0.25mL、0.50mL、1.00mL、1.5mL、2.00mL 的氨标准溶液，其对应的氨含量分别为 0.0μg、2.0μg、5.0μg、10.0μg、20.0μg、30.0μg、40.0μg，分别加无氨水稀释至 10mL，再加入 0.5mL 纳氏试剂后充分摇匀，室温下放置 10min 后，在 420nm 波长下，以水作参比，测量并吸光值，以空白校正后的吸光度为横坐标，以其对应的氨含量为纵坐标，即可绘制校准曲线。

表 2 标准曲线数据

管号	标准溶液 (mL)	水 (mL)	氨含量 (μg)	吸光值
0	0.00	10.00	0	0.026
1	0.10	9.90	2	0.081
2	0.25	9.75	5	0.224
3	0.50	9.50	10	0.243
4	1.00	9.00	20	0.350
5	1.50	8.50	30	0.585

6	2.00	8.00	40	0.628
---	------	------	----	-------

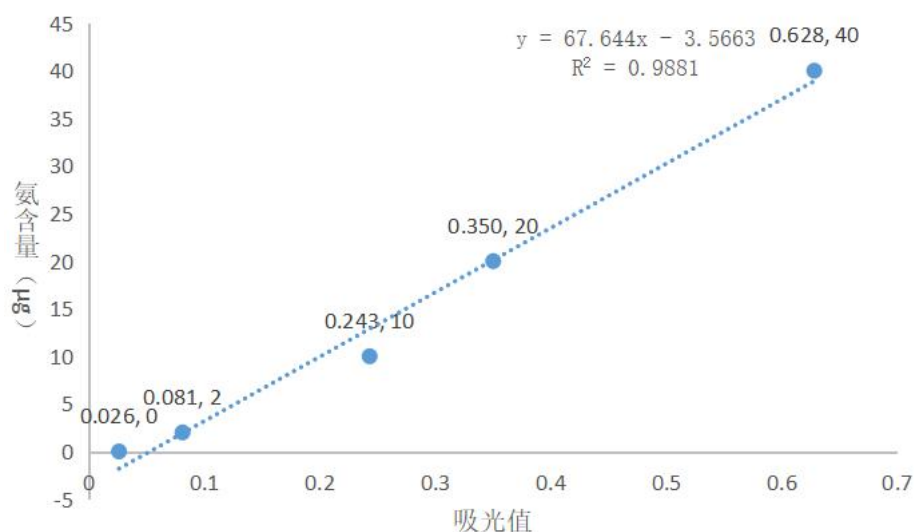


图 1 标准曲线

该标准曲线的线性回归方程为 $y=67.644x-3.5663$ ，拟合优度为 0.9881， x 为测得的吸光值， y 为溶液氨含量。

2.5 除氨菌株初筛实验

除氨菌株初筛是通过设计对照实验将同一种菌株分别接种在含有铵根离子和不含铵根离子的培养基中，通过测量不同生长时间的吸光值对比得出菌株是否能在含有铵根离子的培养基中存活生长，以便进行后续实验继续研究不同菌株的具体除氨效果如何。

取活化好的菌株以 1% 的接种量接种在不同培养基中，实验组为接种在脱氨细菌筛选培养基中，对照组为脱氨细菌培养基中不加入硫酸铵外均一致的培养基中。接种后，观察 5d~7d，于 600nm 处测量吸光度，记录并对比数据，看能否生长，如果能够生长，说明该菌株具有脱氨作用；如果不能生长，说明该菌株不具有脱氨作用。

2.6 除氨菌株复筛实验

将活化好的初筛菌株以 1% 的接种量接种在脱氨细菌筛选培养基中，每 12h 取部分菌液离心后的上清液稀释以纳氏试剂分光光度法测量菌液中的氨含量，连续测量 3d。

制备酒石酸钾钠溶液：称取 50g 酒石酸钾钠，溶于 100mL 水中加热煮沸以驱除氨，冷却后补充至 100mL。

菌液预处理：因培养基中有三价铁离子影响，故提前加入 0.5mL 酒石酸钾钠溶液进行预处理。

将活化好的初筛菌株以 1% 的接种量接种在脱氨细菌筛选培养基中，每 12h 取出菌液离心，取上清液按不同菌株不同的生长状况进行不同倍数的稀释以确保数据在标准曲线量程之内，但要确保最终稀释后的体积为 10mL，再加入 0.5mL 纳氏试剂后充分摇匀，室温下放置 10min，在 420nm 下，测量吸光值，所测得的数据为每毫升培养液中所含有的氨氮值，带入标准曲线方程可得溶液中氨含量，连续测量 3d，同时在 600nm 波长下测量菌株生物量。

2.7 菌株复配除氨实验

通过上述实验得出的四种优质除氨菌株分别为地衣芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、甲基营养菌、巨大芽孢杆菌。地衣芽孢杆菌在 24h 时除氨效果最佳，但后续乏力；甲基营养菌、胶质芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌在 48h 时效果不错。将这四种优质菌株进行不同组合，同时加入脱氨细菌筛选培养基中，观测除氨效果^[15]。

地衣芽孢杆菌按 3% 的接菌量加入培养基中，标号为 A。

胶质芽孢杆菌按 3% 的接菌量加入培养基中，标号为 B。

甲基营养菌按 3% 的接菌量加入培养基中，标号为 C。

巨大芽孢杆菌按 3% 的接菌量加入培养基中，标号为 D。

地衣芽孢杆菌和胶质芽孢杆菌分别按 1.5% 的接菌量加入培养基中，标号为 A+B。

地衣芽孢杆菌和甲基营养菌分别按 1.5% 的接菌量加入培养基中，标号为 A+C。

地衣芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌分别按 1% 的接菌量加入培养基中，标号为 A+B+D。

地衣芽孢杆菌、甲基营养菌和巨大芽孢杆菌分别按 1% 的接菌量加入培养基中，标号为 A+C+D。

以上八种不同组合的菌株再次进行 2.6 的步骤测量吸光值与生物量，记录数据。

2.8 猪场污水除臭实验

通过除氨菌株复筛与复配实验得出的四种除氨效果最好的菌株有巨大芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌和甲基营养菌。现将这四种菌株接入猪场污水中观察具体除氨效果，看是否能达到去除污水臭味的作用。

取灭菌好的 500mL 厌氧瓶，在通风橱中每瓶按照 50mL 分装臭水，分装时注意先摇匀再分装。分装后将活化好的四种菌株按照 1%接菌量接入厌氧瓶中，接菌后取出部分菌液备用。因臭水在-20℃下冷冻除菌后仍有部分细菌芽孢无法全部杀死，于是加入三组不接菌液的只有臭水的空白对照。接菌完毕后，将全部厌氧瓶放入 37℃恒温振荡培养箱振荡培养，每 24h 同 2.6 中方法测量并记录一次吸光值，计算出氨含量后对比每种菌株的去除率，观察不同菌株在臭水中的实际应用效果如何。

吸光值具体测量方法异同点：本次实验对于吸光值的测量方法本质上也是纳氏试剂分光光度法，但区别于 2.6 中的测量方法的不同点是：待测样品不用加入酒石酸钾钠溶液消除铁离子的影响；在对菌液进行稀释时，因臭水的初始氨含量很大，稀释倍数也大于氨气筛选培养基很多；采用纳氏试剂分光光度法测量臭水在 420nm 下的吸光度以计算待测菌液中的氨含量，2.6 中也进行了 600nm 下生物量吸光度的测定，由于臭水颜色过深，分光光度计无法测量，所以不对臭水中菌株生物量进行测量。

2.9 除硫化氢菌株初筛实验

（1）初筛方法一

将 98%的浓硫酸稀释至 25%备用，在超净工作台中，把提前准备好的硫化氢筛选培养基分装好，每瓶以 1%接菌量接入活化好的菌液。将提前放在菌袋中整管灭菌好的试管拿出，放置在以灭菌培养皿作的工作台上，加入 0.8 g 硫化铁后，再用精密移液枪吸取 2.4mL 浓度为 25%的硫酸迅速加入试管中，迅速把试管装入瓶中封口。放入 37℃恒温振荡培养箱培养，观察 5d 后硫化氢筛选培养基是否变混浊，如培养基变混浊，证明该菌株具有脱硫作用；如培养基未变混浊，则证明该菌株不具有脱硫作用^[16]。

（2）初筛方法二

硫化氢初筛实验是通过配置硫代硫酸盐培养基和 Waksman 培养基进行实验。这两种培养基可以通过观察不同 pH 下每种菌株能否生长来判断菌株能否利用硫代硫酸钠。

分别在灭好菌的两种培养基中按 1%接种量接入十种菌株，取部分菌液于 600nm 下测量吸光值，放入 37℃恒温振荡培养箱中培养 5d 后，再次测量吸光值，即可对比出能利用硫代硫酸钠的菌株^[17]。

3 结果

3.1 除氨菌株初筛实验

除氨菌株初筛的目的是看菌株是否能在培养基是生长，培养 5d 后吸光值 OD₆₀₀ 实验数据如表 3.1 所示。

表 3.1 除氨菌株初筛实验

菌株	枯草芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌(根)	枯草芽孢杆菌(根)	解淀粉芽孢杆菌	胶质芽孢杆菌	甲基营养菌	凝结芽孢杆菌	侧孢芽孢杆菌(根)
对照组平均值	0.408 ± 0.013	0.393 ± 0.016	0.395 ± 0.023	0.403 ± 0.029	0.399 ± 0.019	0.444 ± 0.017	0.507 ± 0.015	0.441 ± 0.025	0.416 ± 0.019	0.434 ± 0.013
实验组平均值	1.44 ± 0.024	1.354 ± 0.031	1.503 ± 0.013	1.398 ± 0.043	1.343 ± 0.028	0.910 ± 0.018	1.843 ± 0.026	0.915 ± 0.023	1.028 ± 0.017	0.913 ± 0.016

除氨菌株初筛的实验目的就在于筛选具有脱氨作用的菌株，通过培养发现十种菌株都能够生长，OD 值都比对照高，说明均具有脱氨作用，需要进行复筛实验，进一步确定各个菌株的除氨能力。

3.2 除氨菌株复筛实验

表 3.2 枯草芽孢杆菌不同培养时间除氨效果

菌株	枯草芽孢杆菌						
测量时间	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
平均氨含量(μg)	269.460 ±0.013	246.732 ±0.012	257.284 ±0.029	215.074 ±0.028	230.497 ±0.003	282.042 ±0.044	201.884 ±0.023
平均生物量	0.308 ±0.011	0.303 ±0.004	0.263 ±0.006	0.285 ±0.006	0.282 ±0.012	0.292 ±0.015	0.300 ±0.015
氨去除率(%)	0	8.43	4.52	20.18	14.46	-4.67	25.08

表 3.3 解淀粉芽孢杆菌不同培养时间除氨效果

菌株	解淀粉芽孢杆菌						
测量时间	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h

平均氨含量 (μg)	297.262 ± 0.020	259.314 ± 0.029	267.228 ± 0.021	265.807 ± 0.024	303.553 ± 0.019	274.774 ± 0.012	220.952 ± 0.022
平均生物量	0.333 ± 0.008	0.723 ± 0.033	0.925 ± 0.023	1.117 ± 0.056	1.169 ± 0.044	1.261 ± 0.036	1.281 ± 0.033
氨去除率 (%)	0	12.77	10.10	10.58	-2.12	7.56	25.67

表 3.4 凝结芽孢杆菌不同培养时间除氨效果

菌株	凝结芽孢杆菌						
测量时间	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
平均氨含量 (μg)	322.426 ± 0.016	315.120 ± 0.010	233.135 ± 0.016	264.793 ± 0.030	207.160 ± 0.017	197.216 ± 0.006	204.928 ± 0.013
平均生物量	0.121 ± 0.008	0.181 ± 0.023	0.805 ± 0.034	0.768 ± 0.020	0.433 ± 0.071	0.642 ± 0.042	0.449 ± 0.034
氨去除率 (%)	0	2.27	27.69	17.87	35.75	38.83	36.44

表 3.5 地衣芽孢杆菌（根）不同培养时间除氨效果

菌株	地衣芽孢杆菌（根）						
测量时间	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
平均氨含量 (μg)	316.743 ± 0.019	305.988 ± 0.011	218.321 ± 0.019	230.730 ± 0.028	210.685 ± 0.030	186.536 ± 0.021	197.900 ± 0.011
平均生物量	0.131 ± 0.008	0.869 ± 0.037	1.383 ± 0.031	1.234 ± 0.042	0.921 ± 0.014	0.991 ± 0.053	1.828 ± 0.060
氨去除率 (%)	0	3.40	31.07	27.16	33.48	41.11	37.52

表 3.6 枯草芽孢杆菌（根）不同培养时间除氨效果

菌株	枯草芽孢杆菌（根）						
测量时间	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
平均氨含量 (μg)	309.032 ± 0.018	305.582 ± 0.016	152.571 ± 0.022	176.923 ± 0.011	155.007 ± 0.025	174.856 ± 0.017	166.017 ± 0.009
平均生物量	0.137 ± 0.008	0.502 ± 0.115	1.244 ± 0.034	1.369 ± 0.023	1.407 ± 0.034	1.408 ± 0.045	1.372 ± 0.006
氨去除率 (%)	0	1.12	50.63	42.75	49.84	43.42	46.28

表 3.7 侧孢芽孢杆菌（根）不同培养时间除氨效果

菌株	侧孢芽孢杆菌（根）						
测量时间	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
平均氨含量 (μg)	329.731 ± 0.005	321.208 ± 0.011	336.834 ± 0.006	327.905 ± 0.013	322.020 ± 0.007	295.841 ± 0.012	323.440 ± 0.009
平均生物量	0.118 ± 0.010	0.112 ± 0.012	0.098 ± 0.008	0.089 ± 0.007	0.076 ± 0.007	0.073 ± 0.007	0.064 ± 0.006
氨去除率 (%)	0	2.58	-2.15	0.55	2.34	10.28	1.91

表 3.8 地衣芽孢杆菌不同培养时间除氨效果

菌株	地衣芽孢杆菌						
测量时间	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
平均氨含量 (μg)	265.199 ± 0.009	177.126 ± 0.022	86.152 ± 0.002	96.374 ± 0.026	72.368 ± 0.036	85.761 ± 0.036	81.432 ± 0.014
平均生物量	0.325 ± 0.008	0.549 ± 0.035	0.809 ± 0.029	1.225 ± 0.078	1.577 ± 0.051	1.285 ± 0.015	1.304 ± 0.021
氨去除率 (%)	0	33.21	67.51	63.66	72.71	67.66	69.29

表 3.9 胶质芽孢杆菌不同培养时间除氨效果

菌株	胶质芽孢杆菌						
测量时间	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
平均氨含量 (μg)	287.318 ± 0.012	307.003 ± 0.010	242.094 ± 0.020	198.532 ± 0.031	143.920 ± 0.029	123.360 ± 0.021	124.108 ± 0.023
平均生物量	0.326 ± 0.002	0.307 ± 0.009	0.549 ± 0.012	1.013 ± 0.077	1.311 ± 0.015	1.269 ± 0.019	1.114 ± 0.029
氨去除率 (%)	0	-6.85	15.74	30.90	49.91	57.06	56.80

表 3.10 甲基营养菌不同培养时间除氨效果

菌株	甲基营养菌						
测量时间	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
平均氨含量 (μg)	282.448 ± 0.038	275.142 ± 0.056	253.632 ± 0.042	265.402 ± 0.027	181.388 ± 0.017	146.761 ± 0.075	91.568 ± 0.026
平均生物量	0.322 ± 0.018	0.337 ± 0.036	0.305 ± 0.027	0.261 ± 0.010	0.265 ± 0.017	0.254 ± 0.008	0.313 ± 0.027
氨去除率 (%)	0	2.59	10.20	6.04	35.78	48.04	67.58

表 3.11 巨大芽孢杆菌不同培养时间除氨效果

菌株	巨大芽孢杆菌						
测量时间	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
平均氨含量 (μg)	280.216 ± 0.026	315.120 ± 0.005	297.668 ± 0.018	332.369 ± 0.015	155.210 ± 0.082	97.952 ± 0.013	94.014 ± 0.029
平均生物量	0.321 ± 0.006	0.307 ± 0.009	0.329 ± 0.011	0.310 ± 0.013	0.936 ± 0.053	1.149 ± 0.030	1.062 ± 0.026
氨去除率 (%)	0	-12.46	-6.23	-18.61	44.61	65.04	66.45

除氨效果较好的菌株有地衣芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、甲基营养菌。地衣芽孢杆菌在 24h 时已经达到较高的氨去除率 67.51%，在 48h 时达到了最高氨去除率 72.71%；胶质芽孢杆菌在 48h 时已经达到较高的氨去除率 49.91%，在 60h 达到了最高氨去除率 57.06%；甲基营养菌 60h 时已经达到较高的氨去除率 48.04%，在 72h 达到了最高氨去除率 67.58%；巨大芽孢杆菌在 48h 时已经达到较高的氨去除率 44.61%，在 72h 达到了最高氨去除率 66.45%。地衣芽孢杆菌在 24h 时非常不错的除氨能力已经体现了出来，但后续乏力；甲基营养菌、胶质芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌在 48h 时开始发力，逐渐达到较好去除效果。于是进行除氨菌株的复配实验，探究不同菌株组合能否达到更好的除氨效果。

3.3 菌株复配除氨实验

表 3.12 菌株复配除氨实验

标号	0 h 氨含量 (μg)	24 h 氨含量 (μg)	48 h 氨含量 (μg)	72 h 氨含量 (μg)	0 h 生物量	24 h 生物量	48 h 生物量	72 h 生物量
A	291.144 ± 0.003	172.459 ± 0.006	120.561 ± 0.010	137.765 ± 0.011	0.157 ± 0.007	0.934 ± 0.002	1.625 ± 0.009	1.310 ± 0.026
B	314.211 ± 0.022	264.184 ± 0.025	199.043 ± 0.012	178.344 ± 0.020	0.143 ± 0.008	1.057 ± 0.004	0.894 ± 0.026	0.740 ± 0.034
C	342.982 ± 0.014	235.976 ± 0.027	110.970 ± 0.025	129.873 ± 0.017	0.092 ± 0.007	0.605 ± 0.055	1.065 ± 0.049	1.365 ± 0.007
D	323.636 ± 0.012	132.278 ± 0.007	130.031 ± 0.013	120.719 ± 0.013	0.143 ± 0.014	1.295 ± 0.007	1.115 ± 0.031	1.060 ± 0.027
A+B	324.628 ± 0.005	210.813 ± 0.018	154.601 ± 0.002	128.926 ± 0.031	0.107 ± 0.016	0.965 ± 0.002	1.629 ± 0.023	1.305 ± 0.008
A+C	317.435 ± 0.005	218.930 ± 0.019	149.730 ± 0.015	147.393 ± 0.053	0.098 ± 0.006	0.243 ± 0.016	0.342 ± 0.021	0.372 ± 0.032

A+B	320.907	124.364	166.491	123.560	0.118	1.549	1.320	1.153
+D	±0.007	±0.009	±0.002	±0.042	±0.006	±0.029	±0.019	±0.004
A+C	325.124	143.439	158.915	115.036	0.103	1.531	1.407	1.116
+D	±0.012	±0.005	±0.001	±0.015	±0.011	±0.003	±0.038	±0.011

表 3.13 菌株复配实验氨去除率

标号	0 h 氨去除率 (%)	24 h 氨去除率 (%)	48 h 氨去除率 (%)	72 h 氨去除率 (%)
A	0	40.77	58.59	52.68
B	0	15.92	36.65	43.24
C	0	31.20	67.65	62.13
D	0	59.13	59.82	62.70
A+B	0	35.06	52.38	60.28
A+C	0	31.03	52.83	53.57
A+B +D	0	61.25	48.12	61.50
A+C +D	0	55.88	51.12	64.62

单菌株 A 在 48 h 达到最高氨去除率 58.59%，B 在 72h 达到最高氨去除率 43.24%，这两种菌株没有因接种量的增加导致氨的去除率增加；C 在 48h 达到最高氨去除率 67.65%，D 在 48h 达到最高氨去除率 59.82%，这两种菌株因接种量的增加导致氨的去除率提高，并且去除效率提高；但是四种复配菌株均不如四种菌株单独作用的效果好。接下来进行单独菌株去除污水中氨的实验效果研究。

3.4 猪场污水除臭实验

表 3.14 猪场污水除臭实验

标号	0 h 氨含量 (μg)	24 h 氨含量 (μg)	48 h 氨含量 (μg)	72 h 氨含量 (μg)	0 h 氨 去除率 (%)	24 h 氨 去除率 (%)	48 h 氨 去除率 (%)	72 h 氨 去除率 (%)
空白 对照	792.511 ±0.007	740.335 ±0.013	862.353 ±0.007	645.362 ±0.021	0	6.58	-8.81	18.57
胶质芽 孢杆菌	852.308 ±0.015	982.496 ±0.013	776.096 ±0.020	776.682 ±0.024	0	-15.27	8.94	8.87
巨大芽 孢杆菌	910.347 ±0.023	886.310 ±0.028	783.131 ±0.013	745.611 ±0.018	0	2.64	13.97	18.10
甲基 营养菌	861.102 ±0.003	519.905 ±0.015	745.148 ±0.031	839.534 ±0.024	0	39.62	13.47	2.50

地衣芽孢杆菌	895.690	616.636	795.972	749.816	0	31.16	11.13	16.29
	±0.026	±0.010	±0.024	±0.007				

地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和甲基营养菌均对猪场污水有一定的除臭作用。24h 时，胶质芽孢杆菌最高氨去除率 8.94%，效果很差；地衣芽孢杆菌和甲基营养菌都在 24h 达到的最高氨去除率分别为 31.16%和 39.63%；巨大芽孢杆菌在培养过程中一直在生长和去除氨，在 72h 达到最高氨去除率 18.10%，具有很大的除氨潜力。实验发现培养至 24h 时，同时猪场污水中的氨味已经消失，证明实验筛选出的菌株确实有除氨效果。

3.5 除硫化氢菌株初筛实验

(1) 初筛方法一

通过使用不同的密闭容器进行实验，发现硫化氢可以透过气球散溢出来，对实验室工作人员有毒害作用，且不能使用口径过细的试管，在硫化铁与硫酸反应中以小气泡形式放出的硫化氢将试管中的硫酸不断向上鼓出，导致未反应完的硫酸流入培养基中。因硫酸具有很强的腐蚀性，鼓出硫酸将接种的菌株烧死，会造成实验失败；使用密闭性能较好的冰露纯净水水瓶，将封口用的气球改为和冰露瓶身匹配的瓶盖，使用后将瓶身稍微捏扁后旋紧盖子，避免后续产气量过大会将瓶子涨破漏液和瓶身挤太扁导致瓶口变形漏气的问题。

通过实验发现脱硫细菌培养基中在筛选过程中，瓶子中过多的硫化氢与空气中氧气反应生成单质硫，导致包括空白对照在内的所以培养基均变浑浊，无法判断是否是菌株的原因使培养基变浑浊，因此改变筛选培养基。

(2) 初筛方法二

使用硫代硫酸盐培养基和 Waksman 培养基进行实验。这两种培养基可以探究不同 pH 下每种菌株能否利用硫代硫酸钠。

硫代硫酸盐培养基和 Waksman 培养基分别接种培养 5d 后吸光值 OD₆₀₀ 实验数据如表 3.15 和表 3.16 所示

表 3.15 Waksman 培养基初筛实验

菌株	地衣芽孢杆菌(根)	甲基营养菌	枯草芽孢杆菌(根)	侧孢芽孢杆菌(根)	巨大芽孢杆菌	凝结芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	胶质芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌	空白对照
0 d	0.027	0.036	0.040	0.037	0.017	0.107	0.055	0.022	0.024	0.036	0.013
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.013	0.018	0.023	0.031	0.032	0.017	0.016	0.016	0.015	0.023	0.017

	0.078	0.039	0.084	0.028	0.018	0.099	0.071	0.023	0.035	0.030	0.014
5 d	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.011	0.017	0.008	0.012	0.013	0.013	0.015	0.023	0.023	0.025	0.028

表 3.16 硫代硫酸盐培养基初筛实验

菌株	地衣芽孢杆菌(根)	甲基营养菌	枯草芽孢杆菌(根)	侧孢芽孢杆菌(根)	巨大芽孢杆菌	凝结芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	枯草芽孢杆菌	胶质芽孢杆菌	解淀粉芽孢杆菌	空白对照
	0.025	0.037	0.039	0.041	0.019	0.068	0.053	0.021	0.022	0.039	0.014
0 d	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.008	0.013	0.018	0.017	0.016	0.021	0.022	0.011	0.009	0.013	0.019
	0.125	0.098	0.093	0.081	0.109	0.021	0.091	0.011	0.153	0.129	0.013
5 d	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.018	0.025	0.007	0.033	0.012	0.017	0.015	0.016	0.026	0.024	0.023

在 Waksman 培养基中，地衣芽孢杆菌(根)、枯草芽孢杆菌(根)、胶质芽孢杆菌，OD 值高于对照；在硫代硫酸盐培养基中，地衣芽孢杆菌(根)、甲基营养菌、枯草芽孢杆菌(根)、侧孢芽孢杆菌(根)、巨大芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌都有生长迹象，其中 OD 值都比对照有较大提升，可见，在酸性和中性条件下，地衣芽孢杆菌(根)、枯草芽孢杆菌(根)、胶质芽孢杆菌都能够利用硫元素，在中性条件下的生长速度高于酸性条件下，各个菌株去除硫化氢的效果有待后续实验继续探究。

4 分析与讨论

除氨菌株初筛实验发现这十种均具有脱氨作用，于是进行复筛实验筛选出有较好除氨能力的有地衣芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和甲基营养菌。又将这四种菌株进行复配组合，发现复配效果不如单株菌株效果，分析造成这种现象的原因可能是加大接菌量但培养基中的碳源氮源量不变，限制了菌体生长，导致复配效果不好。进行猪场污水除臭实验筛选出能除氨的菌株有地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和甲基营养菌。其中巨大芽孢杆菌氨去除率呈上升趋势，地衣芽孢杆菌和甲基营养菌在 24h 氨去除率达到最高值，后续氨含量有回升，可能是猪场污水中缺乏适合菌体生长的营养物质，菌体死亡放出氨，导致氨含量上升。可后续继续进行实验探究在添加所需营养物质或加大接菌量后污水中的氨含量能否明显降低。

在除硫化氢菌株初筛实验中发现硫化氢会通过气球上的微小孔隙散溢出,但改用不能散溢出硫化氢的冰露纯净水水瓶进行实验时却发现脱硫细菌培养基中的磷酸根离子会促进硫化氢与氧气反应生成单质硫,导致所有的培养基都变浑浊,于是改变培养基配方进行下一步实验。通过配置硫代硫酸盐培养基和 Waksman 培养基筛选出在不同 pH 下能以硫为营养物质生长存活的菌株,在两种不同培养基中地衣芽孢杆菌(根)、枯草芽孢杆菌(根)、胶质芽孢杆菌都能够利用硫元素,在中性条件下的生长速度高于酸性条件下,可后续继续进行实验探究各个菌株去除硫化氢的效果。

经过本次实验的操作过程与结果分析,可见进行科学实验得出结论的过程仍需要不断查阅文献,进行总结,找出适合的方法,完成实验得出结果。

猪场污水污染控制是一个复杂而艰巨的任务。目前我国对猪粪便污水处理方法都具有一定成效,但随着养殖业向深部发展过程中会暴露出一些问题与局限性,而综上所述,我们可以得出一个结论,那就是以微生物来去除养殖场中猪场污水臭味的菌株还有待筛选与优化组合,但无疑以微生物去除臭味是对环境污染最小、最具发展前景的方法。

5 结论

(1) 除氨菌株初筛实验发现十种菌株均具有脱氨作用。

(2) 除氨菌株复筛实验筛选出地衣芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌和甲基营养菌氨去除效果较好。地衣芽孢杆菌在 48h 达到最高氨去除率 72.71%; 胶质芽孢杆菌在 48h 时效率最高,在 60h 达到最高氨去除率 57.06%; 巨大芽孢杆菌在 48h 时开始大量生长,氨含量开始降低,在 72h 达到最高氨去除率 66.45%; 甲基营养菌在 72h 达到最高氨去除率 67.58%。

(3) 菌株复配除氨实验发现 A 在 48h 达到最高氨去除率 58.59%; B 在 72h 达到最高氨去除率 43.24%; C 在 48h 达到最高氨去除率 67.65%; D 在 48h 达到最高氨去除率 59.82%; 四种复配菌株均不如四种菌株单独作用的效果好。

(4) 猪场污水除臭实验发现胶质芽孢杆菌最高氨去除率 8.94%,效果很差;地衣芽孢杆菌和甲基营养菌都在 24h 达到的最高氨去除率分别为 31.16%和 39.63%; 巨大芽孢杆菌在培养过程中一直在生长和去除氨,在 72h 达到最高氨去除率 18.10%,具有很大的除氨潜力。

通过实验筛选出具有除氨能力的菌株有巨大芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和甲基营养菌。

(5) 通过除硫化氢初筛实验筛选出酸性和中性条件下能利用硫的菌株地衣芽孢杆菌(根)、枯草芽孢杆菌(根)、胶质芽孢杆菌。

参考文献

- [1] 纪树满.恶臭污染的防治[J].重庆环境科学,1999,21(2):27-28,41.
- [2] 袁爱平.猪粪除臭菌株的筛选、鉴定及复合菌制剂的初步应用[D].华南农业大学,2018.
- [3] 张彭义,余刚,蒋展鹏.挥发性有机物和臭味的生物过滤处理[J].环境污染治理技术与设备,2000(01):1-7.
- [4] 周春火,邱雪红,睦光华,彭艳玉.污水微生物除臭技术分析[J].安徽农业科学,2006(08):1658-1659.
- [5] 贾体沛,王灿,张亮,赵琪,彭永臻.城镇污水处理厂生物除臭技术的关键影响因素及案例分析[J].环境工程学报,2022,16(04):1074-1082.
- [6] 刘冰,刘丽丽.利用微生物对畜禽粪便除臭的研究进展[J].天津农林科技,2010(06):31-34.
- [7] 马石霞,摆倩文,周魏,马咸莹,田攀,蔡新东,范思思,王晓航,马忠仁,陈士恩,孙娜,丁功涛.微生物除臭剂应用于畜禽养殖场的研究现状[J].浙江农业学报,2021,33(08):1552-1564.
- [8] 涂敏.规模化养猪场粪污处理与综合利用综述[J].安徽农学通报,2019,25(15):139-143.
- [9] 黄惠红.规模化养猪场清粪技术现状及发展建议[J].畜禽业,2021,32(07):33+35.
- [10] 马晓宇.微生物除臭剂的应用现状与前景[J].畜牧兽医杂志,2019,38(03):37-39.
- [11] 刘安芳,阮蓉丹,李厅厅,等.猪舍内粪污废弃物和有害气体减量化工程技术研究[J].农业工程学报,2019,35(15):200-210.
- [12] 江晨.高效除臭微生物的筛选、特性研究及其鉴定[D].广东:汕头大学,2012.
- [13] HJ 535-2009,水质.氨氮的测定.纳氏试剂分光光度法[S].
- [14] HJ 533-2009,环境空气和废气.氨的测定.纳氏试剂分光光度法[S].
- [15] 杨岗.添加微生物联合植物复合除臭剂对粪便恶臭气体控制效果研究[D].重庆大学,2020.
- [16] 刘裕慧,赵萍,李林杰,赵祖莉,刘冰倩,杨恒,曹莹莹.微生物除臭剂发酵工艺条件优化及硫素转化的研究[J].生物资源,2020,42(04):397-403.
- [17] 刘建伟,刘俊新,李琳.复合式生物除臭反应器处理城市污水处理厂恶臭气体[J].环境工程学报,2007(07):78-82.

致谢

行文至此，意味着我的本科生生涯也即将结束。大学四年的时光里有喜悦、有沮丧、有意外的收获也有遗憾，这些都是生活的一部分，也将成为我二十来岁的青春的一部分。人们总说时光匆匆，确是如此，学生时代终是落下了帷幕，比预想之中来得快些。

在大学时光的最后一个学期，我们进行了毕业论文的实验与撰写，整个过程并不是一帆风顺的，如果没有我身边老师和朋友们的帮助，想必会更加艰难曲折，在此我要感谢我的老师，感谢他在我遇到困难时为我出谋划策、指明前路，让我没有在错误的街角徘徊太久；感谢我的朋友们在我我因为实验失败而踟蹰不前时一种鼓励安慰我，让我鼓起勇气再次尝试；感谢我的父母在背后默默支持我，为我提供坚强的后盾，让我可以在前方奋斗；感谢学校、学院提供的平台能够让我进行实验，完成毕业实习。

感谢所有相遇，聚散终有时，未来方可期。