

两株乳酸菌的分离及其除臭性能*

邱艳君¹ 龙炳清¹ 闫志英^{2**} 刘晓风² 袁月祥² 廖银章² 许力山² 李志东² 贺蓉娜²

(¹四川师范大学化学与材料科学学院 成都 610068)

(²中国科学院成都生物研究所, 中国科学院环境与应用微生物重点实验室 成都 610041)

摘要 从泡菜厂污水和污水处理厂厌氧污泥中分离到两株有除臭作用的乳酸菌LP、ST, 经过形态观察及16S rDNA序列同源性分析, 将LP菌株和ST菌株分别鉴定为植物乳酸菌 (*Lactobacillus plantatum*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。对两株菌进行除臭试验, 结果表明, 植物乳酸菌对氨气 (NH₃) 和硫化氢 (H₂S) 的最大去除率分别为54.87%和37.35%, 嗜热链球菌对氨气和硫化氢的最大去除率分别为41%和22.47%。两株菌的拮抗和共生实验结果表明其无拮抗性, 能良好共生。将两株菌的混合发酵液进行除臭试验, 对氨气和硫化氢的最大去除率分别达到90.74%和63.58%。图6 表1 参12

关键词 植物乳酸菌; 嗜热链球菌; 除臭; 氨气; 硫化氢

CLC Q93-331 : X172

Isolation and Deodorization Characteristics of Two Strains of Lactic Acid Bacteria*

QIU Yanjun¹, LONG Bingqing¹, YAN Zhiying^{2**}, LIU Xiaofeng², YUAN Yuexiang², XU Lishan², LIAO Yinzhang², LI Zhidong² & HE Rongna²

(¹College of Chemistry and Material Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China)

(²Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Environmental and Applied Microbiology of Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract Two strains of lactic acid bacteria, named as LP and ST, were isolated from kimchi wastewater and anaerobic sludge. According to its morphological and the analysis of 16S rDNA gene sequence, strains LP and ST were identified as *Lactobacillus plantatum* and *Streptococcus thermophilus*, respectively. The highest removal rates of NH₃ and H₂S by *L. plantatum* were 54.87% and 37.35%, respectively. The highest removal rates of NH₃ and H₂S by *S. thermophilus* were 40.99% and 22.47%, respectively. For the mixture of the two strains, the highest removal rates of NH₃ and H₂S reached 90.74% and 63.58%, respectively. The antagonist and symbiosis experiments showed no antagonistic inhibition between the two strains, but remarkable synergistic effect on deodorization. Fig 6, Tab 1, Ref 12

Keywords *Lactobacillus plantatum*; *Streptococcus thermophilus*; deodorization; NH₃; H₂S

CLC Q93-331 : X172

近年来我国规模化养殖业迅速发展, 产生大量畜禽粪便, 畜禽粪便污染已成为我国环境污染控制的重点, 其中由畜禽粪便引起的恶臭气体不仅对畜禽本身的危害很大, 而且对周边环境及人体健康也将造成严重伤害, 因此如何有效控制畜禽粪便恶臭污染是目前环境污染治理的又一重点, 开展脱除恶臭气体的研究具有重要的现实意义。

利用微生物的降解或抑制作用来达到除臭的效果是一个廉价且无二次污染的有效方法, 成为恶臭控制的研究热点。乳酸菌作为最常用的益生菌, 在生长繁殖时会产生大量的乳酸, 能够调节环境的pH值, 抑制有害菌的生长, 并能与

其他有益微生物共生, 对未腐熟的有机物质进行发酵, 转化为对动植物可利用的有效养分, 抑制腐败类微生物、病原菌微生物的繁殖和活动^[1], 从而达到降低恶臭气体的释放程度。目前多采用的是利用复合菌剂来达到脱除恶臭气体, 对畜禽粪便中氨气 (NH₃) 的去除率可达到80%以上, 对硫化氢 (H₂S) 的去除率可达到65%以上^[2]。而利用单一菌株来脱除恶臭气体的报道则比较少见, 如利用细黄链霉菌5406来去除家禽粪臭, 处理后的禽粪无臭味, 略带冰片香, 其处理后的臭味物质浓度比对照降低了70%^[3]。我们从泡菜厂污水和污水处理厂厌氧污泥中分离到两株有除臭作用的乳酸菌LP和ST, 对其进行了生理生化、形态学特征试验及16S rDNA序列同源性分析; 并对单一菌株及其混合菌株的除臭效果进行了初步研究, 以期微生物除臭提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

乳酸菌LP和ST分别取自成都某泡菜厂污水和成都三瓦窑污水处理厂厌氧污泥。

收稿日期 Received: 2012-04-23 接受日期 Accepted: 2012-05-07

*中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-EW-G-15-02, KSCX2-EW-G-15-01) 和中国科学院环境与应用微生物重点实验室基金 (KLCAS-2011-05) 资助 Supported by the Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (Nos. KSCX2-EW-G-15-02, KSCX2-EW-G-15-01) and the Fund of Key Laboratory of Environmental and Applied Microbiology of Chinese Academy of Sciences (No. KLCAS-2011-05)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: Yanzhy@cib.ac.cn)

1.2 培养基

MRS培养基^[4]: 蛋白胨10.0 g, 牛肉膏10.0 g, 酵母提取物5.0 g, 葡萄糖20.0 g, 乙酸钠5.0 g, 柠檬酸二胺2.0 g, 吐温80 1.0 g, K_2HPO_4 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 g, $CaCO_3$ 20.0 g, 琼脂20.0 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 6.3-6.8, 121 °C灭菌15 min.

1.3 菌株的分离与除臭性能判定

1.3.1 菌株的分离 将样品进行稀释, 从 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 稀释度下吸取0.1 mL于平板上涂布, 30 °C恒温培养. 经多次分离后获得的单菌株采用斜面培养并保存于4 °C冰箱中备用.

1.3.2 除臭菌株的筛选 为了较快筛选出除臭效果较好的菌株, 方法是接种5%的菌液于装有200 g猪粪和30 g玉米秸秆混合物的1 000 mL广口瓶中并用胶塞密封, 于30 °C恒温培养. 同时用不接种菌液的作为对照组. 每组实验设置3个重复, 在d 3、d 6、d 9、d 12、d 15用感官法评定臭味等级, 臭味等级分为Ms0、Ms1、Ms2、Ms3、Ms4和Ms5.

1.4 除臭菌株的鉴定

1.4.1 菌株形态与生理生化特性 参考文献[6], 对菌株LP、ST进行形态特征观察和生理生化测定.

1.4.2 16S rDNA序列测定及系统发育树构建 菌株16S rDNA序列测定方法参考《分子生物学试验指南》. 提取菌株的总DNA作为模板, PCR扩增其16S rDNA序列, 扩增引物为7f (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和1540r (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'), 反应条件: 预变性98 °C 5 min, 循环 95 °C 35 s, 55 °C 35 s, 72 °C 1 min 30 s, 35个循环, 延伸 8 min. 经电泳、切胶纯化后的PCR产物连接到PMD18-T载体上, 转化进入大肠杆菌感受态细胞 (DH5a), 检测到载体已连接目的片段之后交由上海生工生物工程技术服务有限公司完成测序. 将菌株的16S rDNA测序结果提交GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) 核酸序列数据库进行BLAST, 使用Bioedit将其与同源性较高的菌株的ITS序列进行CLUSTALW比对, 通过MEGA软件采用邻位相邻法绘出系统发育树并进行bootstape稳定性检验 (1 000次).

1.5 菌株间的拮抗与共生检测

拮抗实验参照牛津杯方法^[7]采用MRS培养基进行测试; 同时将两菌株接种于液体MRS培养基中, 测定混合培养生长曲线并通过PCR-DGGE检测其共生性.

1.6 PCR-DGGE分析

总DNA的提取使用细菌基因组DNA提取试剂盒方法. PCR扩增引物: 341FGC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'), 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')

PCR采用25 μ L反应体系: 12.5 μ L mix, 2 μ L primer341FGC, 2 μ L primer518R, 1 μ L DNA, ddH₂O 7.5 μ L.

细菌16S rDNA-PCR扩增条件: 降落PCR: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min; 94 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 10 min, 10 °C 30 min.

变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 使用8%的聚丙烯酰胺凝胶, 16S的变性剂浓度适合的范围为40%-60%. DGGE用Bio-

Rad公司DcodeTM基因突变检测系统对PCR产物进行分离. 16S的电泳运行条件: 1×TAE电泳缓冲液, 100 V的电压, 60 °C恒温、恒压电泳12 h. 本实验采用EB染料染色15 min, 将染色后的凝胶用基因有限公司生产的GDS凝胶成像分析系统拍照, 获得DGGE条带谱图.

1.7 测定方法

NH₃采用纳氏试剂分光光度法测定; H₂S采用亚甲基蓝比色法测定.

1.8 菌株的除臭效果试验

1.8.1 单菌株除臭 选择除臭效果好的菌株进行除臭试验. 每株菌设两组, 一组将盛有20 mL 0.01 mol/L硫酸溶液的25 mL小烧杯放入装有200 g猪粪和30 g玉米秸秆混合物并接种有5%菌液的1 000 mL广口瓶中, 用胶塞密封, 用以吸收NH₃; 另一组盛有20 mL乙酸锌-乙酸钠溶液的25 mL小烧杯, 用以吸收H₂S^[5]. 以不接种菌的作对照. 每组设3个重复, 分别在d 5、d 10、d 15进行检测, 通过对释放量的检测评定乳酸菌对NH₃和H₂S的去除率 (去除率=试验组与对照组释放量的差/对照组释放量×100%).

1.8.2 两菌株混合除臭 取混合发酵液进行混合菌株除臭实验, 方法同1.8.1步骤.

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选及鉴定

共分离出6株菌, 用感官法初步判定菌株的除臭性能. 按臭味等级判定标准, 臭味分为Ms0-Ms5. 6株菌的除臭效果如表1所示. 由表1可知, 菌株LP和ST在d 3和d 6的除臭等级为Ms2; d 9菌株LP和ST的除臭等级均为Ms1, 其他菌株的除臭等级为Ms2和Ms3. 因此菌株LP和ST 均具有较好的除臭效果.

表1 菌株的除臭结果

Table1 Results of deodorization by bacterial strains

菌株 Strain	处理天数 Processing days (t/d)				
	3	6	9	12	15
MR	Ms4	Ms3	Ms2	Ms2	Ms1
LP	Ms2	Ms2	Ms1	Ms1	Ms1
SN	Ms4	Ms3	Ms3	Ms2	Ms1
DF	Ms3	Ms2	Ms2	Ms1	Ms1
ST	Ms2	Ms2	Ms1	Ms1	Ms1
PC	Ms3	Ms3	Ms2	Ms1	Ms1

Ms0: 基本无臭; Ms1: 轻微臭味; Ms2: 臭味明显; Ms3: 较强臭味; Ms4: 强烈臭味; Ms5: 极强臭味

Ms0: odourless; Ms1: slight odour; Ms2: obvious odour; Ms3: intense odour; Ms4: more intense odour; Ms5: extremely intense odour

2.2 菌株的形态学特征

两株菌的形态如图1所示. 菌株ST个体形态为球状或呈链球状, 革兰氏阳性; 菌落表面凸起, 乳白色, 边缘平整. 菌株LP个体形态为短杆状、成对或链状排列, 革兰氏阳性; 菌落表面凸起, 乳白色, 表面粗糙, 边缘不整齐, 随着培养时间的增加菌落变为黄色.

2.3 菌株的生理生化特征

菌株ST能利用乳糖发酵产酸, 在10 °C下不能生长, 在45 °C下能生长, 不能在6.5% NaCl中生长; 菌株LP能利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖发酵产酸, 且能在15 °C下生长. 乳酸定性实验结果表明ST和LP均有乳酸生成.

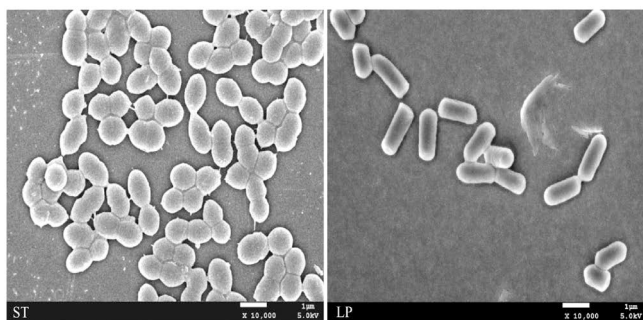


图1 菌株ST和LP的扫描电镜

Fig. 1 Scanning electron microscope of strains ST and LP

2.4 菌株的系统发育分析

将菌株的16S rDNA测序结果在NCBI中进行基因比对,系统发育树如图2所示,菌株ST的序列与嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)同源性达到99%;菌株LP的序列与植物乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*)同源性达到99%。

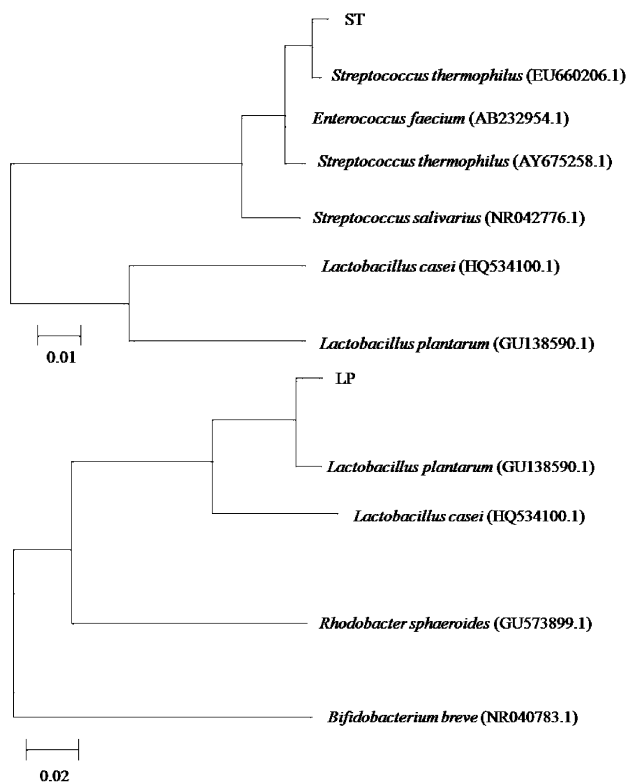


图2 菌株ST和LP的16S rDNA系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic trees of strains ST and LP based on their 16S rDNA sequences

2.5 菌株间的拮抗与共生特性

经牛津杯实验检测,两菌株ST和LP无拮抗性。两菌株在MRS中的混合培养生长曲线见图3,两菌株混合培养表现为典型单菌的一步生长曲线,说明两菌株可以很好地进行同步生长。

为进一步验证两菌株混合培养中各菌的数量情况,对其混合培养进行了PCR-DGGE检测,结果如图4所示,由图4可知,菌株ST和LP能很好地区分开来,条带的亮度代表了菌株在混合样品中的丰度。由混合菌株的图谱分析来看,经混

合培养后,两菌株表现出良好的共生性,拮抗和共生实验结果为混合菌共发酵制备菌液除臭提供了依据。

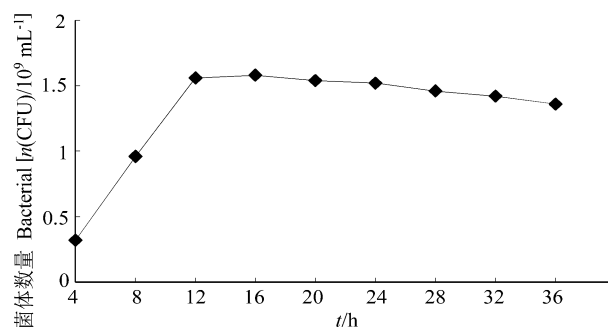


图3 两菌株混合培养的生长情况

Fig. 3 Growth curve for the mixed culture of the two strains

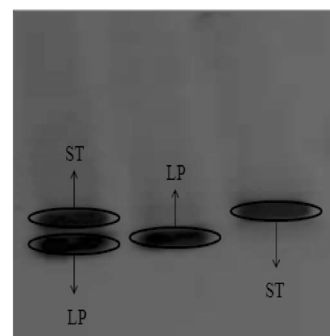


图4 单菌和混合菌株16S rDNA基因的DGGE图谱

Fig. 4 DGGE profile of 16S rDNA genes from a pure culture and the mixed culture

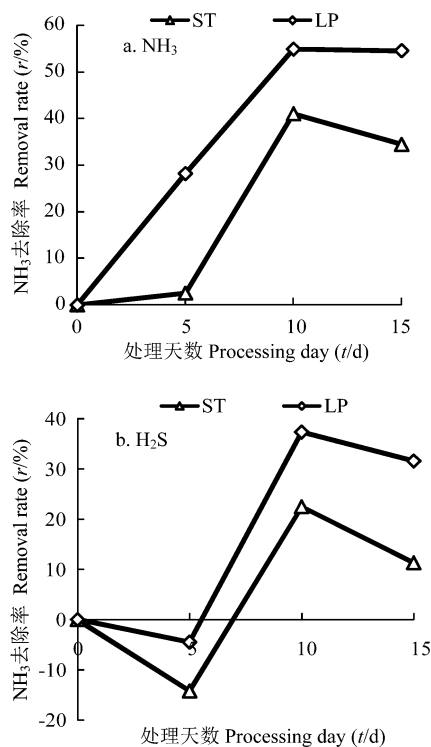
2.6 菌株LP、ST的除臭效果

2.6.1 单菌株除臭效果 对初筛出的菌株LP、ST,通过测定对NH₃和H₂S的去除率进行除臭效果试验,结果见图5所示。

由图5可知,菌株LP对NH₃和H₂S的去除率都高于菌株ST,两菌株对NH₃的去除率优于对H₂S的去除率,将两菌株对NH₃和H₂S的去除率进行方差分析,由图a得出, $P = 0.00938 < 0.05$,说明两菌株对NH₃去除率的区别是显著的,由图b得出, $P = 0.018 < 0.05$,说明两菌株对H₂S的去除率有显著区别。由图a可以看出,两菌株对NH₃的去除率从菌剂投加之初即有一定的作用,之后呈现出上升趋势。在d 10时菌株ST和LP对NH₃的最大去除率分别为41%和54.87%,10 d后两菌株对NH₃的去除效果则开始下降。由图b可以看出,两菌株对H₂S的去除率在菌剂投加之初时有负作用,其原因可能是菌剂投加初始,溶氧量较大,NH₃产生量占主要部分,而H₂S是在厌氧条件下产生,所以刚开始时对NH₃有去除效果。5 d后,菌株ST和LP对H₂S的去除率急剧增加,到d 10时达到最大去除率,分别为22.47%和37.35%,10 d后对H₂S的去除效果也呈下降趋势。因此,菌株LP和ST对NH₃和H₂S的去除效果较好,是具有除臭潜力的菌株。

2.6.2 菌株ST和LP混合除臭效果 两株乳酸菌按1:1的比例混合,对NH₃、H₂S的去除率如图6所示。

由图6可知,混合菌株对NH₃和H₂S的去除效果趋势是先上升,然后缓慢下降。混合菌株对NH₃和H₂S的去除率都明显高于单菌株,在d 5时对NH₃和H₂S的最大去除率分别为

图5 单一菌株对NH₃和H₂S去除率的影响Fig. 5 Effect of single lactic acid bacteria on NH₃ and H₂S removal efficiency

90.74%和63.58%，分别较菌株ST的最大去除率提高了49.74%和41.11%，较菌株LP的最大去除率提高了35.87%和26.23%。因此，混合菌株的除臭效果明显优于单一菌株。

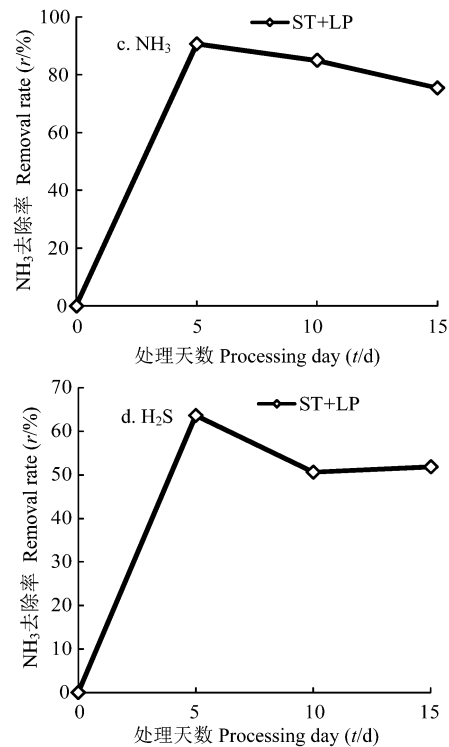
3 结论

分离到两株具有除臭作用的乳酸菌LP、ST。经过形态观察、生理生化测定及16S rDNA序列同源性分析，将菌株LP和ST分别鉴定为植物乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)，两株菌的拮抗试验结果均为无拮抗性，生长曲线和PCR-DGGE表明两株菌能很好地共生，为混合发酵制备除臭菌液提供了依据。

菌株LP对氨气 (NH₃) 和硫化氢 (H₂S) 的最大去除率分别为54.87%和37.35%，菌株ST对氨气和硫化氢的最大去除率分别为41%和22.47%；将两株菌等比例混合后对氨气和硫化氢的最大去除率分别达到90.74%和63.58%，两株菌混合后对氨气和硫化氢的去除率高于单株菌。

参考文献 [References]

- McCrory DF, Hobbs PJ. Additives to reduce ammonia and odor emissions from livestock wastes: a review [J]. *J Environ Qual*, 2001, **30**: 345-355
- 叶芬霞, 朱瑞芬, 叶央芳. 复合微生物吸附除臭剂的制备及其除臭应用[J]. 农业工程学报, 2008, **8**: 254-257 [Ye FX, Zhu RF, Ye YF. Preparation of complex microbial adsorbent for deodorization and its application to deodorization [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2008, **8**: 254-257]
- 胡佩. 家禽粪便的微生物除臭法[J]. 土壤肥料, 1996, **4**: 45-46
- 王夫杰, 鲁维, 渠岩, 张建, 纪凤娣. 酱醅中乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国酿造, 2010, **5**: 49-51 [Wang FJ, Lu F, Qu Y, Zhang J, Ji FD. Separation

图6 混合菌株ST+LP对NH₃和H₂S去除率的影响Fig. 6 Effect of the mixed lactic acid bacteria on NH₃ and H₂S removal efficiency

and identification of lactic acid bacteria isolated from soy sauce mash [J]. *China Brew*, 2010, **5**: 49-51]

- 赵晨曦, 兰时乐, 禹逸君, 肖波, 罗永兰. 鸡粪除臭微生物菌群的筛选和应用[J]. 湖南农业科学, 2005, **1**: 68-70 [Zhao CX, Lan SL, Yu YJ, Xiao B, Luo YL. Microorganisms screened from chicken manure and their applications [J]. *Hunan Agric Sci*, 2005, **1**: 68-70]
- 东秀珠, 蔡妙英等编著. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 科学出版社, 2001. 265
- 刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 梁世中. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, **3**: 110-111 [Liu DM, Li L, Yang XQ, Liang SZ. Determination of the antimicrobial activity of probiotic by Oxford plate assay system [J]. *Food Res Dev*, 2006, **3**: 110-111]
- 陈书安, 黄为一, 赵兵. 除臭微生物分离和筛选方法的改进与应用[J]. 生物技术通报, 2006, **5**: 126-129 [Chen SA, Huang WY, Zhao B. Modification and application of the method to isolate and screen deodorizing microorganism [J]. *Biotechnol Bulletin*, 2006, **5**: 126-129]
- Kim JD, Yoon JH, Park YH; Lee DW, Lee KS, Choi CH, Park WY, Kang KH. Isolation and identification of a lactic acid bacterial strain KJ-108 and its capability for deodorizing malodorous gases under anaerobic culture conditions [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2003, **13** (2): 207-216
- Park HD, Rhee CH. Antimutagenic activity of *Lactobacillus plantarum* KLAB21 isolated from kimchi Korean fermented vegetables [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, **23** (19): 1583-1589
- 李维炯, 倪永珍. 应用有效微生物对畜禽粪便除臭的研究[J]. 中国农业大学学报, 1996, **1** (5): 79-83 [Li WJ, Ni YZ. A study on the application of effective microorganisms to deodorize animal and poultry dung [J]. *J China Agric Univ*, 1996, **1** (5): 79-83]
- 唐鹏程, 焦士蓉, 闵甜, 唐远谋, 冯慧, 刘佳. 泡菜中植物乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 中国调味品, 2011, **3**: 52-55 [Tang PC, Jiao SR, Min Tian, Tang YM, Feng H, Liu J. Screening and identification for lactic acid bacteria of pickle [J]. *China Condiment*, 2011, **3**: 52-55]