

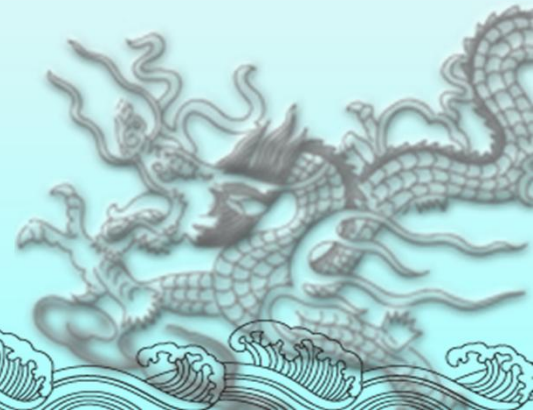
第九章 微生物资源开发与利用

- ◆ 第一节 微生物菌种资源（2学时）
 - ◆ 1. 微生物的菌种资源
 - ◆ 2. 微生物菌种的开发与保藏
- ◆ 第二节 微生物与环境保护（环境类专业）



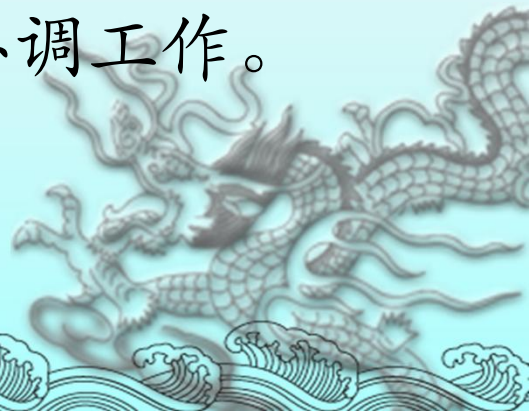
第一节 微生物菌种资源

- ◆ 一. 微生物的菌种资源
- ◆ 二. 微生物菌种保藏



一. 微生物的菌种资源

- ◆ 生物资源是指对人类具有实际或潜在用途或价值的遗传资源、生物体或其部分、生物群体或生态系统中任何其他生物组成部分。最好在遗传资源原产国建立和维持移地保护及研究植物、动物和微生物的设施。 (1992年联合国环发大会通过的《生物多样性公约》)
- ◆ 中国是“生物多样性公约”的缔约国之一，1993年我国成立了中国环境与发展国际合作委员会生物多样性工作组，负责生物多样性的协调工作。



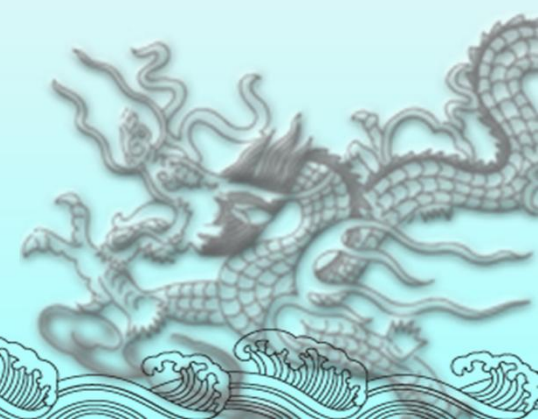
一. 微生物的菌种资源

- ◆ (一) 微生物资源的特殊性
- ◆ (二) 微生物资源开发利用一般程序
- ◆ (三) 微生物资源的保护



(一) 微生物资源的特殊性

- ◆ 第一，人类发现微生物很晚，认识不足。
- ◆ 第二，微生物的形体极小，代谢类型极其多样化，生长繁殖速度惊人。在最适条件下，有的细菌20min就能繁殖一代。根瘤菌---异养需氧型、硝化细菌---自养需氧型、反硝化细菌----异养厌氧型。
- ◆ 第三，微生物的变异性大。



(一) 微生物资源的特殊性

- ◆ 第四，种源丰富，未知者众多。有人认为，全世界被描述的微生物种类不到实有数的2%；根据Omura的估计，目前所知道的放线菌（约3000种）仅占实有数的10%—20%。
- ◆ 第五，对微生物资源的研究与开发比动植物晚许多，但取得了极其辉煌的成就。



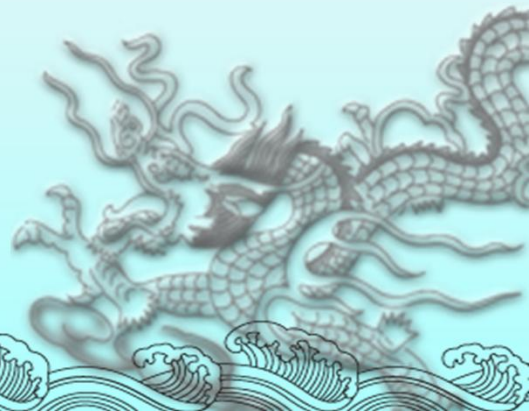
表1-1

生物资源的种类

类群	已知种	估计种	已知种占的比例%	类群	已知种	估计种	已知种占的比例%
病毒	5000	130000	4	甲壳虫	38000		
细菌	4760	40000	12	昆虫	800000	1000000	80
真菌	69000	1500000	5	其他节肢动物	132460		
藻类	40000	60000	67	软体动物	50000		
Pryophytes	17000	25000	68	棘皮动物	6100		
裸子植物	750			两栖动物	4184		
被子植物	250000	270000	93	爬行动物	6380		
原生动物	30800	100000	31	鱼类	19000	21000	90
多孔动物	5000			鸟类	9198	10000	~100
腔肠动物	9000			哺乳动物	4170	4300	~100
线虫	15000	500000	3				

(二) 微生物资源开发利用一般程序

- 微生物资源开发利用涉及农业、轻工、环保、矿石、医药等国民经济各部门。由于开发目的的不同，工作基础的差别，开发利用的战略和策略会有很大的差别。
- **微生物资源开发利用一般程序：**
 - 通常由总体设计、找到目的菌、效果试验、申请专利、菌种改良及发酵工艺研究、报批、生产、市场等相互关联的过程所组成。

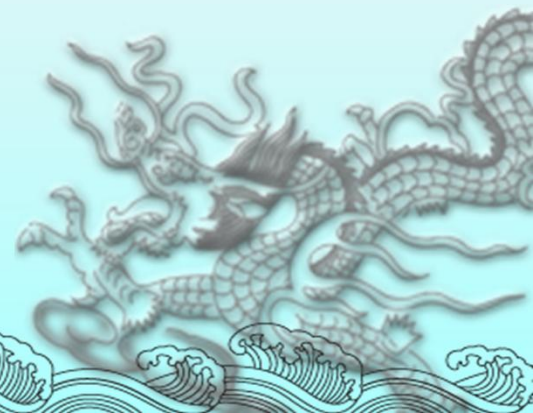


1.总体设计

- 总体设计是微生物资源开发利用的首要任务，核心是市场。
 - 总体设计包括开发的策略，自己的工作基础，已具备的条件，自己的优势和劣势，合作伙伴的力量及诚信度、投资大小、投资周期及风险等。
- 创新是微生物资源开发的灵魂。一方面社会的新需求日益增加，新领域不断出现，随着科学技术的不断进步，开发资源的能力也增加。另一方面，开发的难度也大大增加。



- ◆ 总体设计一旦确定，明确开发意图并贯彻始终，是微生物资源开发最基本、时刻不离的原则，核心问题就是千方百计尽早找到所需的菌。这是开发成败的关键，所有的策略、路线、方法都要为这个中心服务，而不要有所偏离。



2、找到目的菌

2.1. 菌种来源及菌种分离

- 世界微生物资料中心（World Data Center for Microorganisms）的资料显示，目前至少有58个国家共建立了484个菌种保藏中心，已保藏菌种80多万株，很多是典型菌株。这可以作为菌种的重要来源。
- 如果自己分离菌种，就要根据开发目标，选择取样地域、取样环境，取样方法。

土壤、海洋、极端环境、新种等

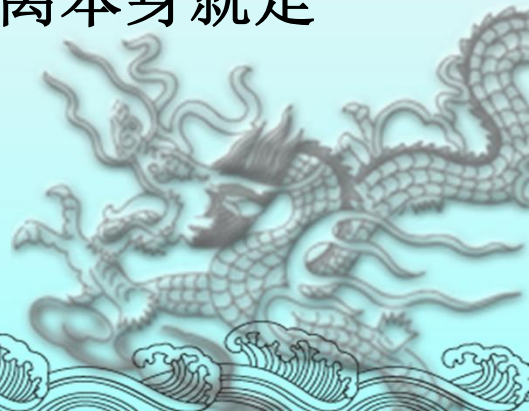


- ✓ 土壤是微生物种类最丰富的场所，是取之不尽的微生物产地。
- ✓ 海洋微生物是特别值得开发的资源。在某种意义上讲，海洋微生物还可以算是处女地，是大有开发潜力的微生物资源。



✓ 同样，地球上广泛分布着所谓“极端环境”，如高温温泉、盐湖、盐碱地、雪山、冰川及南北极、火山口、荒漠、放射性地区等等。极端环境微生物也是重要的微生物资源。

✓ 我们所知道的微生物不到10%，而利用的不到1%！这90%以上未知微生物大体上都可以叫做“新种”。新种就意味着存在新的基因，有新的基因就有新的产物，有新产物就可能有新用途。因此，未知微生物是最值得开发的资源。菌种分离，尤其是未知菌的分离本身就是微生物资源开发利用的重大课题。



✓混合菌：在微生物学发展的历程中，分离纯培养曾经是一个巨大的进步，现代工业微生物发酵几乎都是用纯种。在一些情况下，分离资源微生物不一定需要纯培养物。近些年来，越来越多的事实表明，一些微生物的生长繁殖需要另一种微生物的参与，它们存在依存关系。



2.2. 模型设计

微生物资源开发的目的是千差万别，但都必须建立准确、微量、快速、简便的筛选模型，尽早淘汰非目的菌，加速筛选进程。

模型设计可根据作用机制、代谢途径的靶位、酶反应机制、基因操作过程的各种调控因子、目的化合物的类型等来设计初选模型。



2.3. 一菌多筛

一菌多筛，不但增加了菌种的利用率和入选率，更重要的是有可能找到用途更大的非目的菌，比如具有某种活性的菌等。只用一个模型往往找不到目的菌，造成浪费。



2.4. 高通量筛选和组合生化相结合

高通量筛选： 将许多模型固定在各自不同的载体上，用机器人加样、培养后，用计算机记录结果，并进行分析，使筛选从繁重的劳动中解脱出来，实现了快速、准确、微量。



2.4. 高通量筛选和组合生化相结合

组合生化：用已知有用化合物或已知骨架的化合物分别与不同的微生物共培养，然后分析不同培养时间化合物的结构及其活性的变化，从而极大地增加了化合物的多样性，相应增加了获得理想化合物的可能性。



3、申请专利

- 保护劳动成果，保护知识产权，及时申请专利是绝对必要的。
 - 第一、申请专利的时机一般应在确定某种新活性、新用途或新化合物时立即申请。
 - 第二、研究人员往往对法律程序不熟悉，而又无法去“精通”它，最好的办法是聘请法律顾问或专利申请代理人。



4、菌种改良及基因工程

改良必要性：通常获得的菌株目的物的产率会比较低，或者菌株的工艺性状有缺陷，如生长慢、斜面菌种的孢子化程度低等等。

第一、理化诱变 容易施行，易见成效。

第二、**基因工程** 研究目的物的基因结构及基因调控、表达的方式，进行基因重组、转化，使之高效表达。

微生物资源开发利用的重大课题？

微生物资源开发利用的潜力巨大，前景十分宽广，任务也十分艰巨。

- (1) 微生物资源的种类究竟有多少？如何检测、分离未知微生物？极端环境存在什么样的微生物？它们有何开发利用价值？
- (2) 无公害肥源、农药等。
- (3) 从微生物开发药物仍然是当今的重大任务。

随着开发进程的不断深入，开发领域的不断扩大，随着新技术的发展和渗透，微生物资源开发利用将会日新月异，新思维、新产品、新用途、新领域将层出不穷。我们相信，微生物资源将更好地为人类造福。

（三）微生物资源的保护

微生物对人类的意义：

- 微生物作为生态系统的积极参与者，对于维持生态系统的平衡起着不可替代的重要作用；
- 微生物也是人类所需的各种物质的生产者。
- 随着科学技术的进步，微生物的用途越来越广，用处越来越大。
- 天然微生物对人类既是现实资源，也是潜在资源。

(三) 微生物资源的保护

1、保护微生物资源的必要性

- 社会对保护天然微生物资源的必要性和紧迫性缺乏认识。自然界的微生物受环境的影响，处在生生死死和不停的变化之中，大量未知微生物消亡。
- 许多极端微生物所栖息的环境正不断遭到破坏，所以这种特定下的特殊微生物也不断在减少。天然的极端环境（高温、高盐、高碱、高酸、高压、太空、高辐射等）
- 由于工农业、交通运输业的大规模现代化、国际化，一些国家和地区（尤其是一些发展中国家），对自然资源的过度开发和不合理开发，已经带来严重的环境问题，大量的生物种急剧减少。

- 有学者考察云南省**22**个地区不同植被的土壤放线菌，发现原始森林的放线菌最多（**9**个属），而后随着砍伐、耕种和旱地程度增加，放线菌种类不断减少。
 - 原因：**自然环境破坏造成的微生物种类减少。**
- 天然湖泊水生环境暂时变干带来微生物群落单调化、微生物种类减少的一个明显的实证。



表1--2 云南不同植被土壤放线菌的种类

植被	研究地区数	平均数量 /(×1000/g 干土)	平均属数	植被	研究地区数	平均数量 /(×1000/ g干土)	平均属数
原始林	8	482.8	9.0	旱地	7	1359.4	5.4
次生林	16	1199.6	6.7	蔬菜地	8	5963.1	6.5
荒地	11	893.2	5.9				



2、保护微生物资源的措施

2.1. 生产菌种和专利菌种的保护。

2.2. 天然微生物资源的保护。

天然微生物对人类既是现实资源，也是潜在资源。天然微生物资源也应该保护。**保护具有代表性的原始环境**如原始森林；高山湖泊、冰川、盐湖等。



2.2.天然微生物资源的保护

- ◆ (1) 原始森林是微生物最主要的基因库、种源库。
- ◆ (2) 就总体而言，我们并不清楚微生物的分布、种类和用途（或许100年后也难以完全清楚），比较保险的办法是根据不同的气候类型、地质条件、不同的生态类型、不同的植被类型，选择具有代表性的原始环境和绝无仅有的原始环境并把它们保护起来，使之尽量不受现代社会的影响。

2.2. 天然微生物资源的保护

- ◆ (3) 统一规划，选择典型地区，分期分批组织多学科，利用先进手段，进行微生物资源本底调查，分离、鉴定、保存菌种资源。
- ◆ (4) 保护的目的在于利用，加大对微生物资源的利用。
- ◆ (5) 宣传保护原始生态环境的重要性，将保护微生物资源看的和保护动植物资源一样重要。

二. 微生物菌种保藏

- ◆ 菌种保藏的重要意义：
 - ◆ 尽可能保持其原有性状和活力的稳定，确保菌种**不死亡、不变异、不被污染**，以达到便于研究、交换和使用等诸方面的需要。

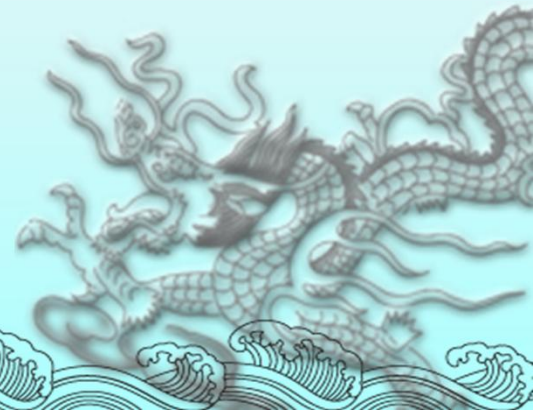
菌种保藏基本原则：

- 挑选典型菌种的优良纯种来进行保藏。
- 保藏它们的休眠体，如分生孢子、芽孢等。
- 应人为地创造环境条件（如：干燥、低温和缺氧），使微生物长期处于代谢不活泼、生长繁殖受抑制的休眠状态。
- 尽可能多的采用不同的手段保藏一些比较重要的微生物菌株。



菌種保藏具體方法

- ◆ 斜面低溫保藏法
- ◆ 石蠟油封藏法
- ◆ 砂土管保藏法
- ◆ 麸皮保藏法
- ◆ 甘油懸液保藏法
- ◆ 冷凍真空干燥保藏法
- ◆ 液氮超低溫保藏法
- ◆ 宿主保藏法

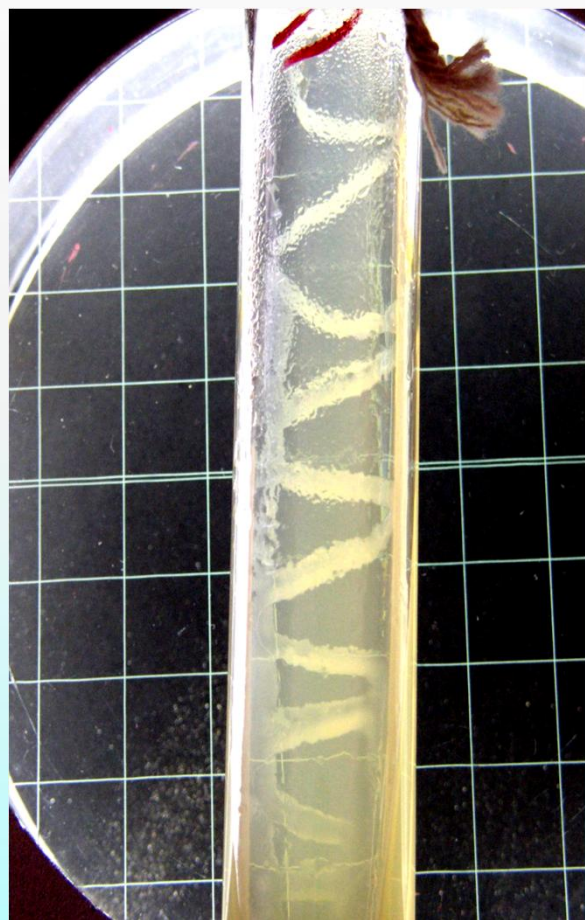


(一) 斜面低温保藏法——常用保藏法

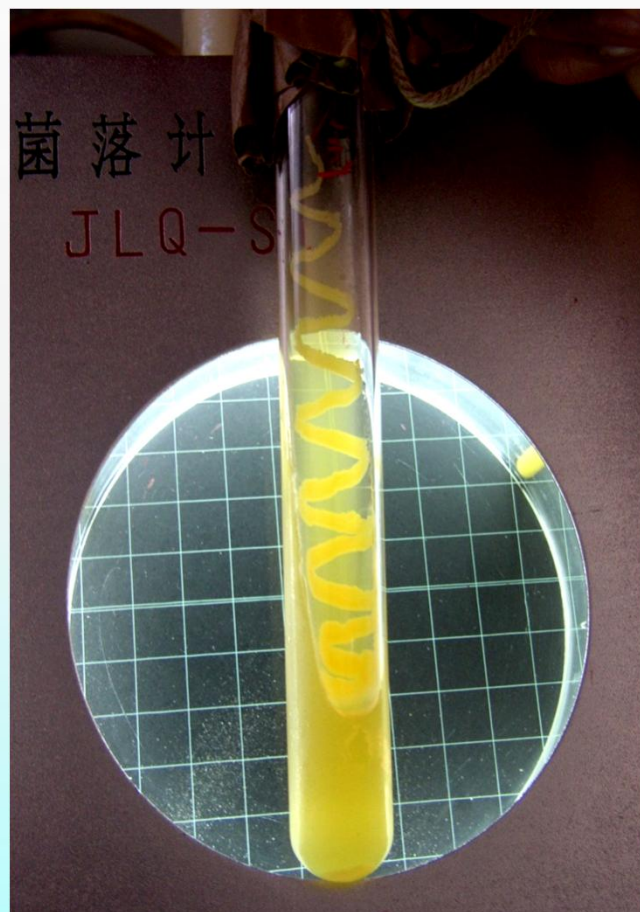
将菌种接种在适宜的斜面培养基上，待菌种生长完全后，置于4℃左右的冰箱中保藏，每隔一定时间（保藏期）再转接至新的斜面培养基上，生长后继续保藏，如此连续不断。

- 此法广泛适用于各大类微生物菌种的短期保藏；
- 此法的主要保藏措施是低温。一般可保存1~6个月左右。
- **优点**是简便易行，容易推广，存活率高；**缺点**是菌株仍有一定程度的代谢活动能力，保藏期短，传代次数多，菌种较容易发生变异和被污染。

大肠杆菌斜面



金黄色葡萄球菌斜面





生孢梭菌

需气菌、厌气菌培养基



白色念珠菌

真菌培养基





各类菌种保藏条件及时间

菌种	培养基	保存温度	传种时间
细菌	一般多用于营养琼脂或根据菌种规定选用培养基	4~6℃	芽孢杆菌3~6个月，其它细菌每个月
酵母菌	一般用麦芽汁琼脂或麦芽汁酵母膏琼脂	4~6℃	一般4~6个月
丝状真菌	一般用PDA琼脂、蔡氏琼脂或麦芽汁琼脂等	4~6℃	每4个月移植一次（每2个月移植一次）



特点:

优点:简便,易于推广;一般不需要另选择保藏用培养基;对大多数微生物都适用。

缺点:保藏期太短;传代次数多,易发生变异及污染。

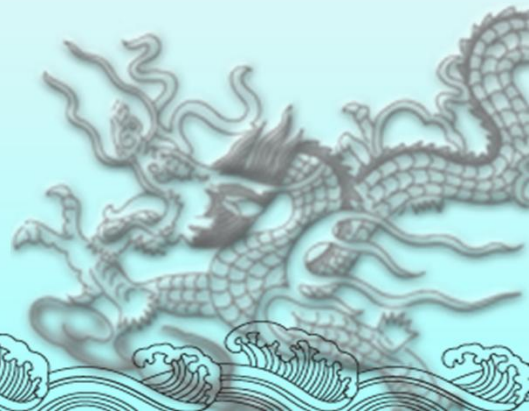
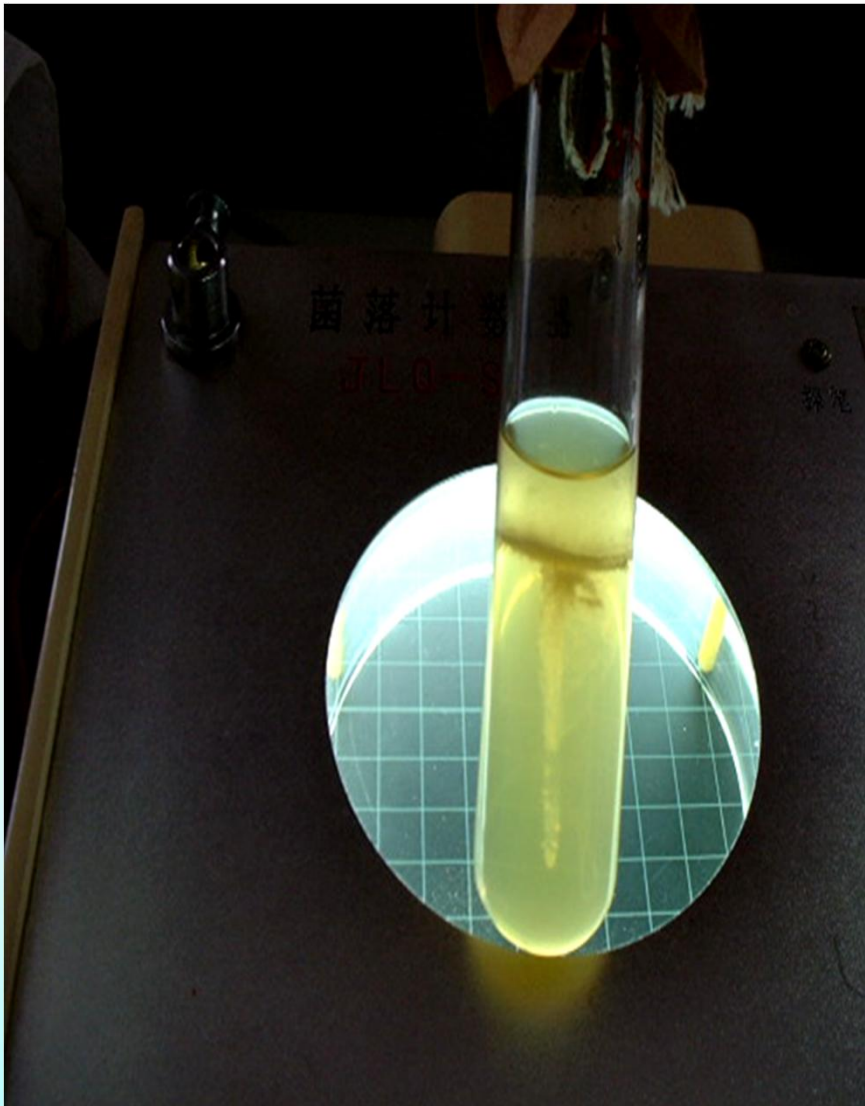


(二) 石蜡油封藏法

- 本法是用石蜡将培养物与空气隔绝，以降低菌种的生理生化水平，并可防止水分蒸发，从而延长菌种的保藏期。
 - 在无菌条件下，将灭过菌并已蒸发掉水分的液体石蜡倒入培养成熟的菌种斜面（或半固体穿刺培养物）上，石蜡油层高出斜面顶端1cm，使培养物与空气隔绝，加胶塞并用固体石蜡封口后，垂直放在室温或4℃冰箱内保藏。
- 此法广泛适用于各大类微生物菌种的中期保藏，**不适用于**保藏某些能分解烃类的菌种。
 - 此法的主要保藏措施是低温、阻氧。一般可保存1~2年左右。

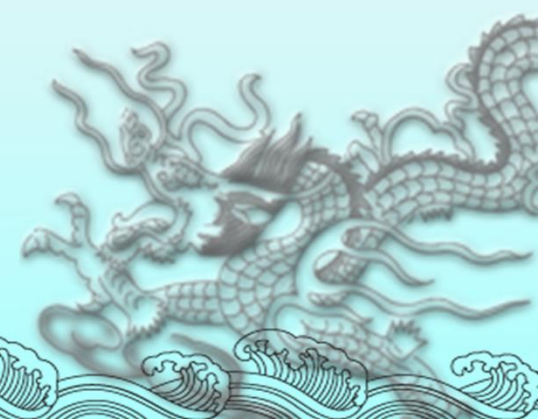


石蜡油封藏法



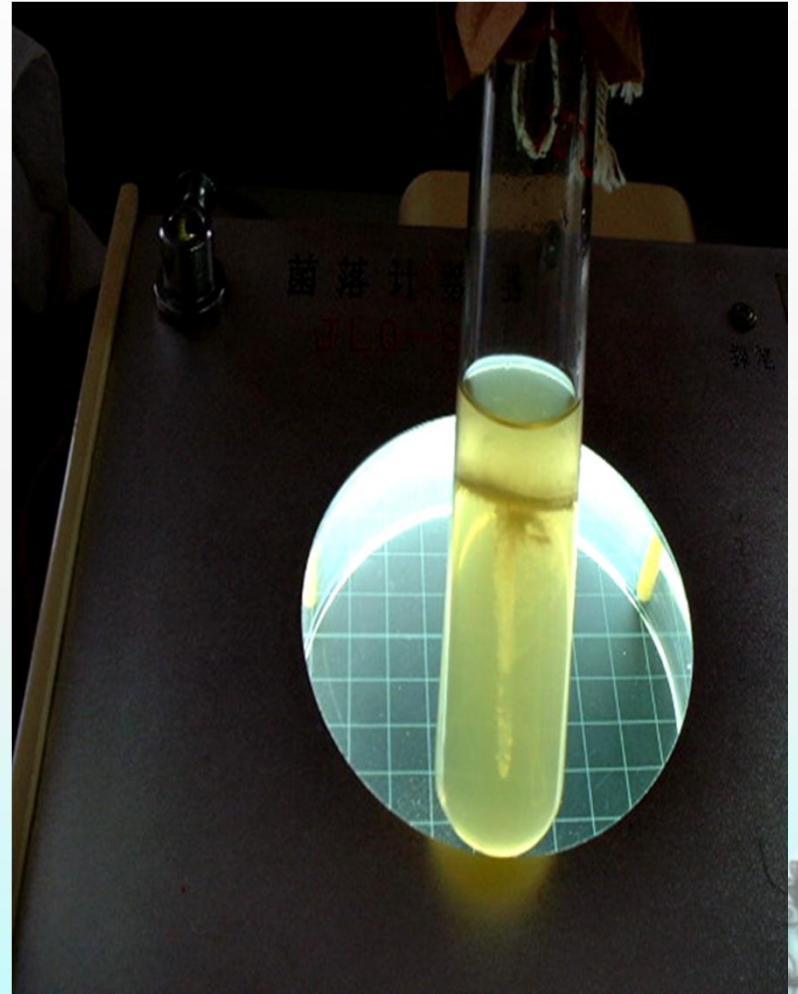
液体石蜡对各类菌种保藏效果

菌种	菌株数	保存时间 (年)	存活率 (%)
细菌	87	5	20.9
霉菌	586	5	83.6
酵母菌	400	2	88.9
放线菌	380	4	91.3





- ◆ 将上述液体石蜡加入培养好的菌种试管内，液体石蜡液面以高出培养基最上端 1 cm 为宜，将试管直立，放入 4℃ 冰箱中保藏。
- ◆ 适用范围：适用于保藏部分霉菌，酵母菌和放线菌，对细菌保藏效果较差。



(3) 特点

- ◆ 本方法简便易行，是实验室常用的一种保藏方法，该法主要使菌种与空气隔绝。



(4) 注意事项

- ① 保藏时，用新鲜培养物接种，应检查纯度和特征后，方可进行保藏。
- ② 保藏过程中，需经常观察斜面是否干燥，如干燥，需重新移种。
- ③ 使用菌种时，先将菌种管倾斜使液体石蜡流至一边，再用接种针挑取培养物接种到新鲜斜面上培养，待长出新培养物后，再移种一次到新斜面上即可使用。
- ④ 将沾有少量液体石蜡的接种针浸于95%酒精中片刻，再烧灼灭菌，以免直接在酒精灯下烧灼时，液体石蜡四溅，引起污染。
- ⑤ 液体石蜡在菌种管中高出培养基的高度要严格控制，如太多，会影响菌种交换气体，使保藏效果不好；如太少，斜面容易干燥，将缩短保藏期。一般以高出斜面1 cm为宜。
- ⑥ 制备无菌液体石蜡时，每管装量不能太多，否则分装到菌种培养基中易造成污染。



(三) 砂土管保藏法

该法是将砂与土分别洗净、烘干、过筛，按一定比例分装于小试管中，砂土的高度约1cm，121℃蒸汽灭菌1~1.5h，间歇灭菌3次。50℃烘干后经检查无误后备用。将待保藏的菌株制成菌悬液或孢子悬液滴入砂土管中，放线菌和霉菌也可直接刮下孢子与载体混匀，而后置于干燥器中抽真空约2~4h，用火焰熔封管口(或用石蜡封口)，置于干燥器中，在室温或4℃冰箱内保藏。

一种常用的长期保藏菌种的方法，适用于产孢子的微生物及形成芽孢的细菌，对于一些对干燥敏感的细菌及酵母则不适用。

砂土管法兼具低温、干燥、隔氧和无营养物等诸条件，故保藏期较长、效果较好，且微生物移接方便，经济简便。它的保藏期约1~10年。

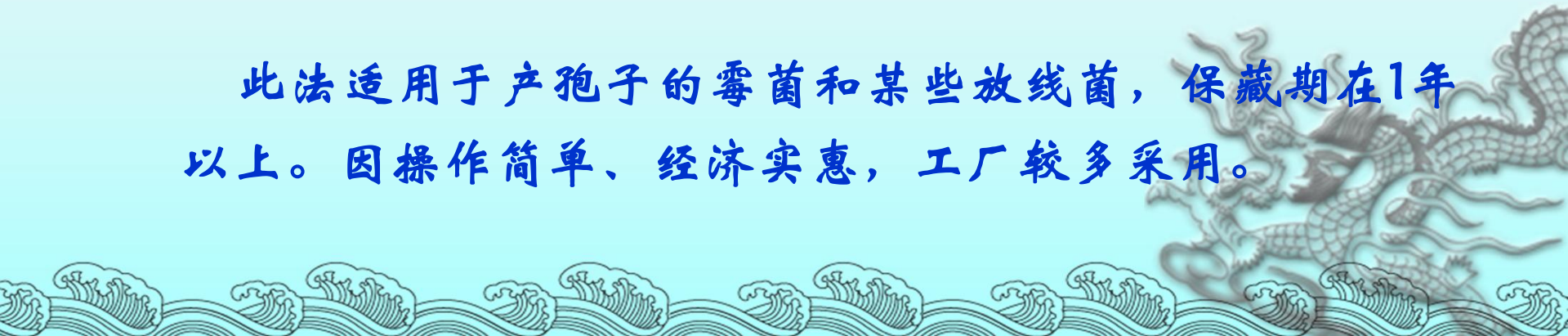
砂土管保藏菌种



(四) 麸皮保藏法

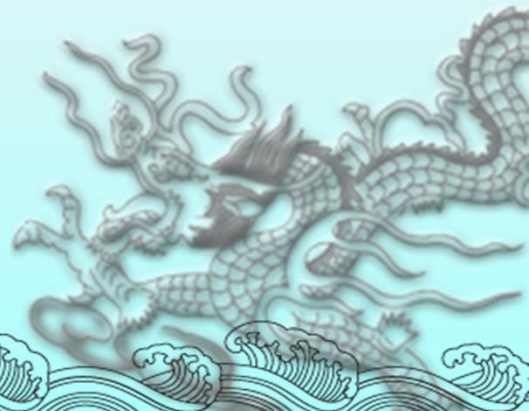
- ◆ 麸皮保藏法又称曲法保藏。即以麸皮为载体，吸附接入的孢子，然后在低温干燥条件下保存。
- ◆ 其制作方法是，将麸皮与水以一定的比例拌匀，装量为试管体积 $2/5$ ，湿热灭菌后经冷却，接入新鲜培养的菌种，适温培养至孢子长成。将试管置于盛有氯化钙等干燥剂的干燥器中，于室温下干燥数日后移入低温下保藏；干燥后也可将试管用火焰熔封，再保藏，则效果更好。

此法适用于产孢子的霉菌和某些放线菌，保藏期在1年以上。因操作简单、经济实惠，工厂较多采用。



(五) 甘油悬液保藏法

- ◆ 甘油悬液保藏法是将菌种悬浮在甘油蒸馏水中，置于低温下保藏，本法较简便，但需置备低温冰箱。保藏温度若采用 -20°C ，保藏期约为0.5~1年，而采用 -70°C ，保藏期可达10年。
 - 将拟保藏菌种对数期的培养液直接与经 121°C 蒸汽灭菌20min的甘油混合，并使甘油的终浓度在10%~15%，再分装于小离心管中，置低温冰箱中保藏。
 - 基因工程菌常采用本法保藏。



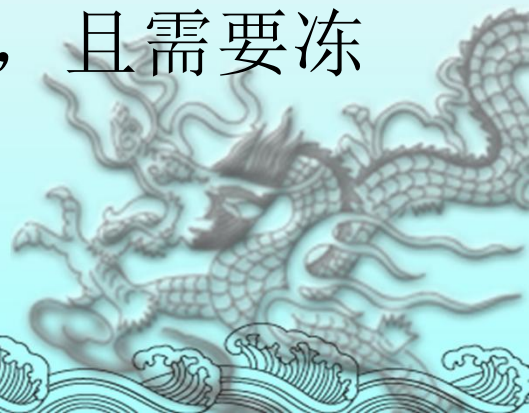


(六) 冷冻真空干燥保藏法

- ◆ 冷冻真空干燥保藏法又称冷冻干燥保藏法，简称冻干法。
- ◆ 通常是用保护剂制备拟保藏菌种的细胞悬液或孢子悬液于安瓿管中，再在低温下快速将含菌样冻结，并减压抽真空，使水升华将样品脱水干燥，形成完全干燥的固体菌块。并在真空条件下立即熔封，造成无氧真空环境，最后置于低温下，使微生物处于休眠状态，而得以长期保藏。

冻干保藏

- ◆ 冷冻干燥过程中必须使用冷冻保护剂，目前国内常用脱脂乳和蔗糖，国外尚有运用动物血清等的。
- ◆ **此法适用于各大类微生物。**
- ◆ 此法的主要保藏措施是低温、干燥、缺氧、有保护剂，保藏期一般长达5~15年，存活率高。
- ◆ 该法操作比较烦琐，技术要求较高，且需要冻干机等设备。



冷冻真空干燥操作流程

配制保护剂

菌种

安培瓶

培养

洗净烘干

灭菌

制备菌悬液

装标签

分装安培瓶

加棉塞

预冻

真空干燥

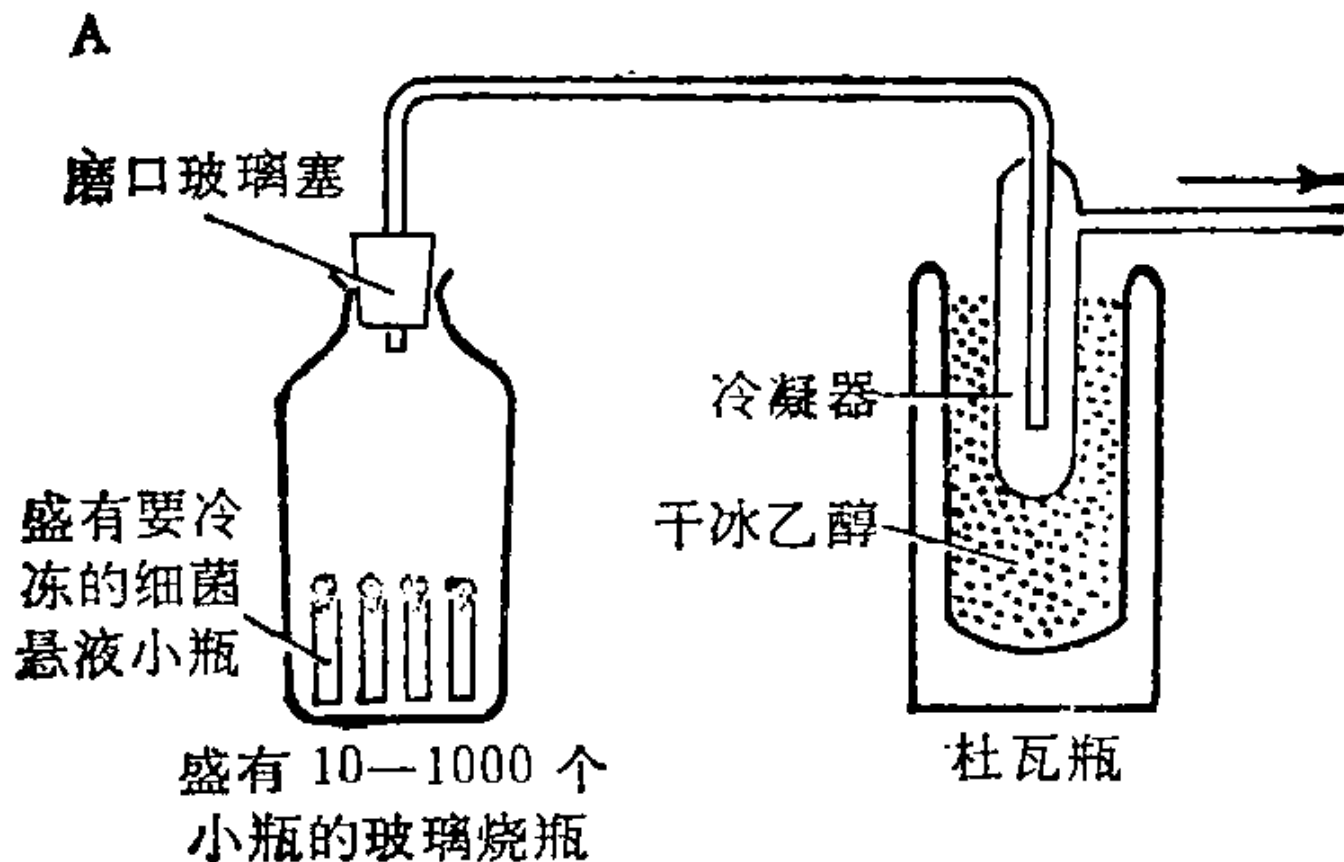
测定水分

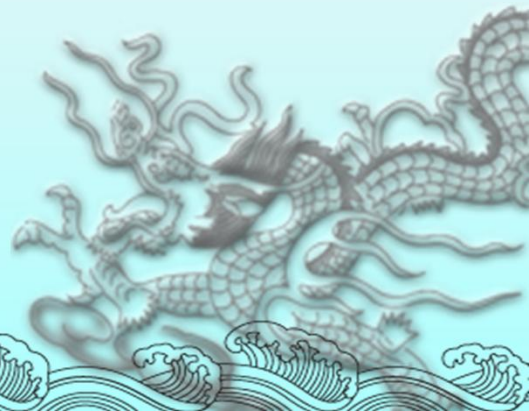
熔封管口

检查真空度

包藏

培养物的冻干过程





（七）液氮超低温保藏法

- ◆ 简称液氮保藏法或液氮法。它是以甘油、二甲基亚砷等作为保护剂（最终使用浓度一般为甘油10%、二甲亚砷5%。所使用的甘油一般用高压蒸汽灭菌，而二甲亚砷最好为过滤灭菌。），在液氮超低温（ -196°C ）下保藏的方法。
- ◆ 其主要原理是菌种细胞从常温过渡到低温，并在降到低温之前，使细胞内的自由水通过细胞膜外渗出来，以免膜内因自由水凝结成冰晶而使细胞损伤。

■ 此法适用于各种微生物菌种的保藏。

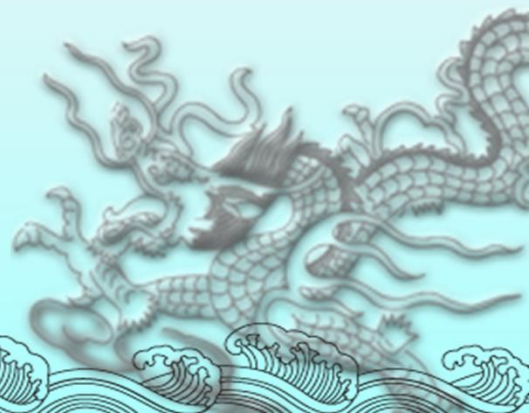
液氮冷冻保藏微生物菌种的步骤:

1. 待冷冻保藏菌种悬液的制备

- (1) 从生长斜面制备菌悬液：每一斜面加入5ml含10%甘油的营养液体培养；用巴氏吸管吹吸斜面制成孢子及菌体细胞悬液；0.5~1ml分装玻璃安瓿或液氮冷藏专用塑料瓶。
- (2) 从浸没培养物制备菌悬液：在浸没培养液中加入等体积20%无菌甘油；轻轻振荡混匀培养液，如果菌体絮凝较紧，则需先用玻璃珠打散；0.5-1ml分装玻璃安瓿或液氮冷藏专用塑料瓶，玻璃安瓿用酒精喷灯封口；将所有封好的安瓿置于5℃冰箱中3min，以使细胞和悬浮培养基之间达到平衡。

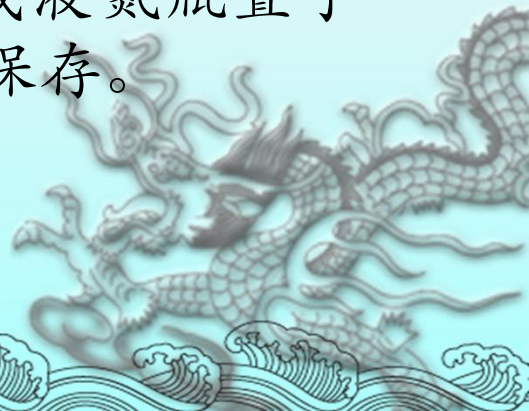
2. 控速冷冻

- (1) 将安瓿或液氮瓶置于铝盒或布袋中，然后置于一较大的金属容器中；
- (2) 将此金属容器置于控速冷冻机的冷冻室中；
- (3) 以 $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的致冷速度降温，直到温度达到相对温度之上几度的细胞冻结点(通常为 -30°C)；



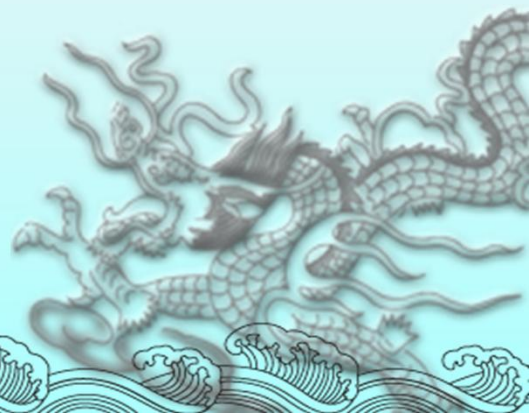
- (4) 补加一定量的液氮至系统中，使细胞在冻结点时尽可能地发生相变；
- (5) 细胞冻结后，将致冷速度降为 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，直到温度达 -50°C ；
- (6) 将安瓿迅速移入液氮罐中于液相(-196°C)或气相(-156°C)中保存。

如果无控速冷冻机，则一般可将安瓿或液氮瓶置于一 70°C 冰箱中冷冻4h，然后迅速移入液氮罐中保存。



复苏

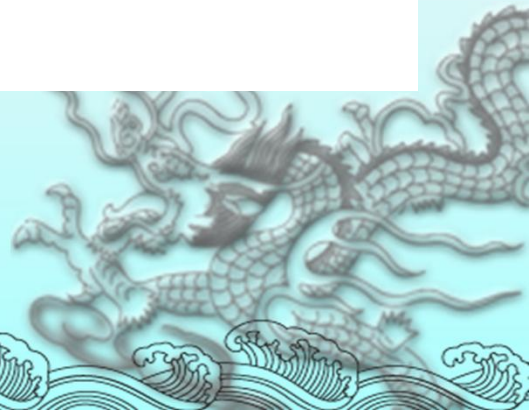
- 1. 从液氮罐中取出所需的安瓿，立即置于冰浴中；
- 2. 迅速将安瓿置于37-40℃水浴中，并轻轻摇动以加速解；
- 3. 用巴氏吸管将安瓿中贮存培养物移接入含有2ml无菌液体培养基的试管中，用同一支吸管反复抽吸数次，然后取0.1-0.2ml (约4、8滴)转接入琼脂斜面上。



(八) 宿主保藏法

◆ 此法适用于专性活细胞寄生微生物（如病毒、立克次氏体等）。

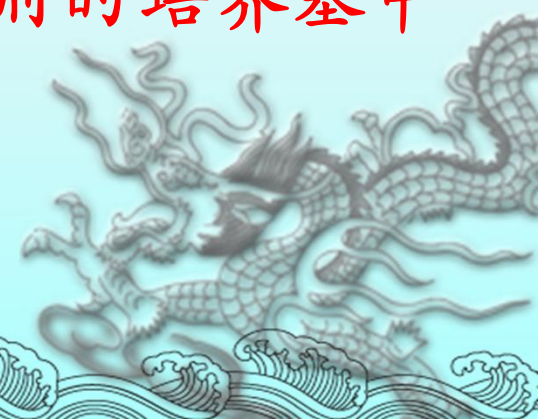
- 植物病毒可用植物幼叶的汁液与病毒混合，冷冻或干燥保存。
- 噬菌体可以经过细菌培养扩大后，与培养基混合直接保存。
- 动物病毒可直接用病毒感染适宜的脏器或体液，然后分装于试管中密封，低温保存。



(九) 基因工程菌的保藏

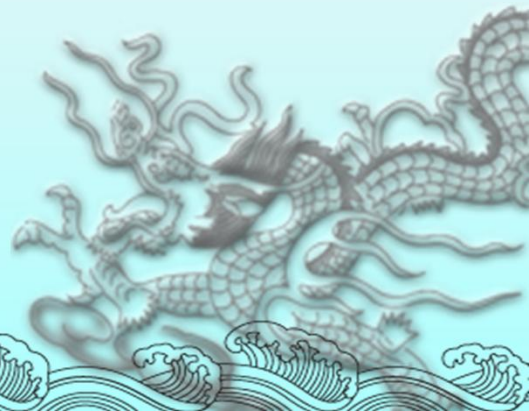
- ◆ 当培养基中加入抗生素时，抗生素提供了一有利于携带质粒的细胞群体的极有用的生长选择压。而且在运用基因工程菌进行发酵时，抗生素的加入可帮助维持质粒复制与染色体复制的协调。
- ◆ **基因工程菌应保藏在含低浓度选择剂的培养基中**

。



(九) 基因工程菌的保藏

- ◆ 由载体质粒等携带的外源DNA片段通常是遗传不稳定的、且很易丢失其外源质粒复制子。质粒基因通常为宿主细胞生长非必需。
- ◆ 一般情况下当细胞丢失这些质粒时，生长速度会加快。



各种保藏方法比较评价

- ◆ 在上述的菌种保藏方法中，以斜面低温保藏法、石蜡油封藏法、宿主保藏法最为简便；砂土管保藏法、麸皮保藏法和甘油悬液保藏法次之；以冷冻真空干燥保藏法和液氮超低温保藏法最为复杂，但其保藏效果最好。应用时，可根据实际需要选用。

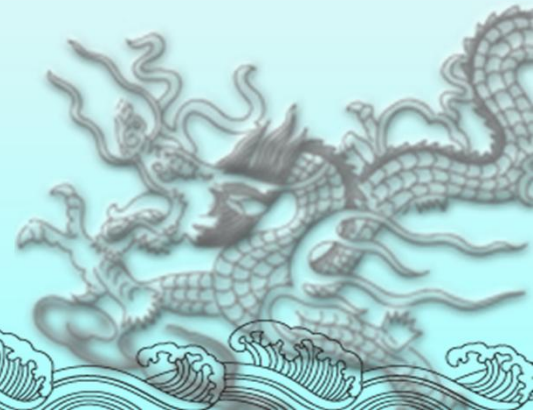


表 8 - 13 几种常用菌种保藏方法的比较

方法名称	主要措施	适宜菌种	保藏期	评价
冰箱保藏法 (斜面)	低温	各大类	3~6月	简便
冰箱保藏法 (半固体)	低温	细菌, 酵母菌	6~12月	简便
石蜡油封藏法*	低温, 缺氧	各大类**	1~2年	简便
砂土保藏法	干燥, 无营养	产孢子的微生物	1~10年	简便有效
冷冻干燥保藏法	干燥, 无氧, 低温 有保护剂	各大类	5~15年以上	烦而高效


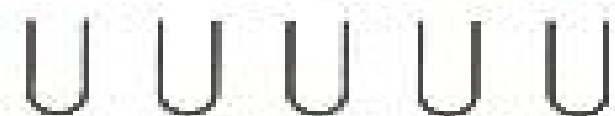

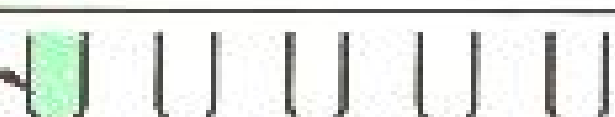

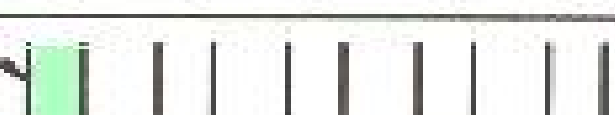




* 用斜面或半固体穿刺培养物均可, 也放在 4℃ 冰箱保藏。

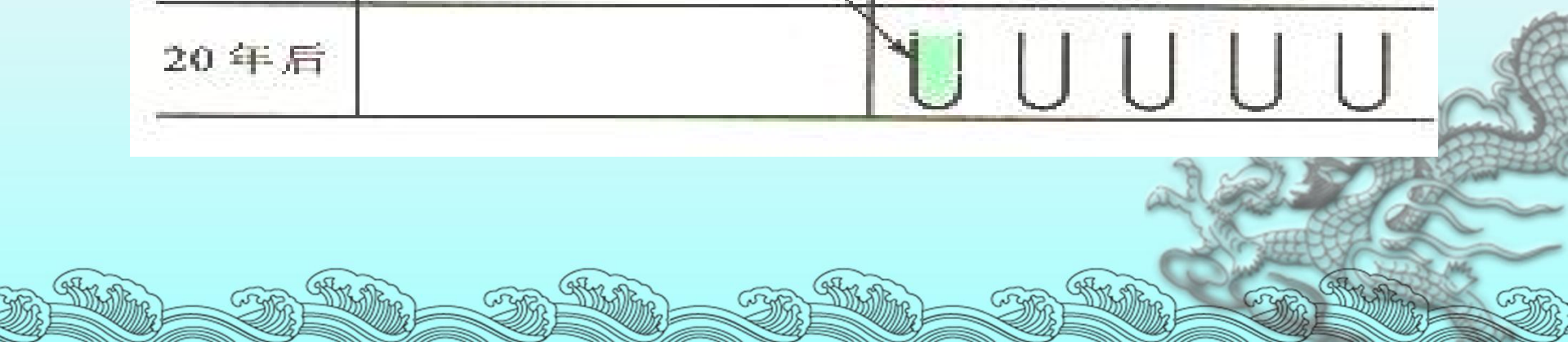
** 对石油发酵微生物不适宜。

表 7-13 7 种常用菌种保藏方法的比较

方 法	主 要 措 施	适 宜 菌 种	保 藏 期	评 价
冰箱保藏法(斜面)	低温(4℃)	各大类	约 1~6 月	简便
冰箱保藏法(半固体)	低温(4℃), 避氧	细菌, 酵母菌	约 6~12 月	简便
石蜡油封藏法	低温(4℃), 阻氧	各大类**	约 1~2 年	简便
甘油悬液保藏法	低温(-70℃), 保护剂 (15%~50% 甘油)	细菌, 酵母菌	约 10 年	较简便
砂土保藏法	干燥, 无营养	产孢子的微生物	约 1~10 年	简便有效
冷冻干燥保藏法	干燥, 低温, 无氧, 有保护剂	各大类	>5~15 年	繁而高效
液氮保藏法	超低温(-196℃), 有保护剂	各大类	>15 年	繁而高效

ATCC采用的两种保藏方法的优点示意图

保藏年数	液氮保藏(原种保藏)	冷冻干燥保藏(分发用)
当年		
5年后		
10年后		
15年后		
20年后		



国际著名微生物菌种保藏机构

- ◆ **ATCC:** 美国典型培养物保藏中心
- ◆ **NRRL:** 美国农业部北方地区研究实验室
- ◆ **NCTC:** 英国国家典型培养物保藏所
- ◆ **CBS:** 荷兰真菌中心保藏所
- ◆ **IFO:** 日本大阪发酵研究所





中国微生物菌种保藏机构

缩写	名称	缩写	名称
ACCC	中国农业微生物菌种保藏管理中心	ISF	中国农业科学院土壤肥料研究所
SH	上海市农业科学院食用菌研究所	CACC	抗菌素菌种保藏管理中心
IA	中国医学科学院抗菌素研究所	SIA	四川抗菌素工业研究所
CCGMC	普通微生物菌种保藏管理中心	AS	中国科学院微生物研究所
AS-IV	中国科学院武汉病毒研究所	CFCC	林业微生物菌种保藏管理中心
CAF	中国林业科学院菌种保藏管理中心	CICC	工业微生物菌种保藏管理中心
IFFI	轻工业部食品发酵工业科学研究所	CMCC	医学微生物菌种保藏管理中心
ID	中国医学科学院皮肤病研究所	NICPB	卫生部药品生物制品监察所
IV	中国医学科学院病毒研究所	CVCC	兽医微生物菌种保藏管理中心
CIVBP	中国兽医药品监察所	YM	云南省微生物研究所
CCTCC	中国典型培养物保藏中心		

第二节 微生物资源的应用

- ◆ 微生物在农业领域中的应用（农学专业）
- ◆ 微生物与环境保护（环境专业）

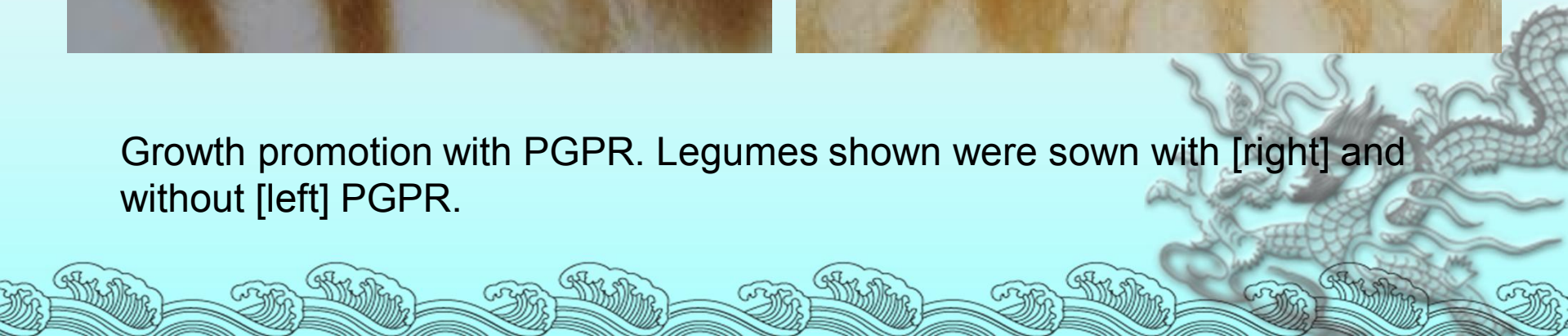


第二节 微生物在农业领域中的应用

一、微生物肥料



Growth promotion with PGPR. Legumes shown were sown with [right] and without [left] PGPR.





未施用微生物肥料
的豆科牧草



施用微生物肥料
的豆科牧草



1. 微生物肥料的含义

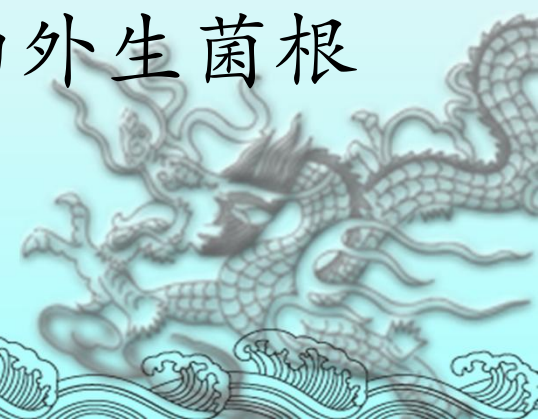
- ◆ 某些有益微生物经大量人工培养制成的生物肥料，又称菌肥、菌剂、**接种剂**。
- ◆ **原理**：利用微生物的生命活动增加土壤中的氮素或有效磷、钾的含量，或将土壤中一些作物不能直接利用的物质，转换成可被吸收利用的营养物质，或提高作物的生长刺激物质，或抑制植物病原菌的活动，从而提高土壤肥力，改善作物的营养条件，提高作物产量。



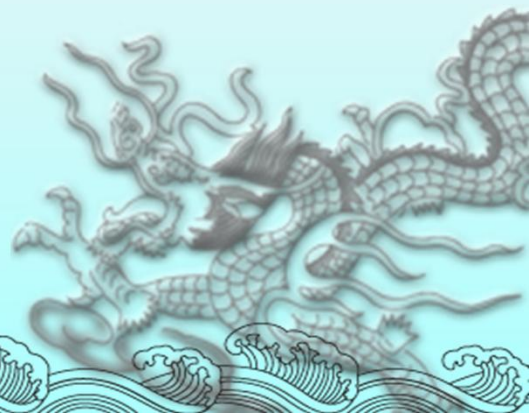
2. 微生物肥料的种类

- ◆ 能将空气中的惰性氮素转化为作物可直接吸收的离子态氮素。属于这一类的有**根瘤菌肥料、固氮菌肥料、固氮蓝细菌肥料**等
- ◆ 能分解土壤中的有机质，释放出其中的营养物质供植物吸收的微生物制品。
- ◆ 能分解土壤中难溶性的矿物，并把它们转化成易溶性的矿质化合物，从而帮助植物吸收各种矿质元素的微生物制品。其中主要的是**硅酸盐细菌肥料和磷细菌肥料**

- ◆ 对某些植物的病原菌具有拮抗作用，能防治植物病害，从而促进植物生长发育的微生物制品，如某些**芽孢杆菌制剂和抗生素肥料**等
- ◆ 菌根菌肥料。使用的菌种主要是内囊菌科的一些种类形成的丛枝状菌根，此外还有部分担子菌和少数子囊菌形成的外生菌根
- ◆ 复合生物肥料：

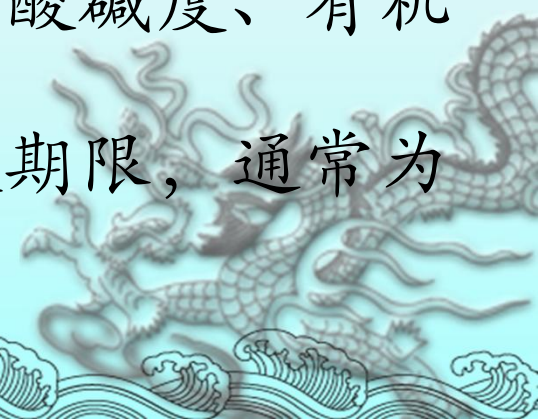


- ① 微生物—微量元素复合肥料
- ② 联合固氮菌复合肥料
- ③ 固氮菌、根瘤菌、磷细菌和钾细菌复合生物肥料
- ④ 有机—无机生物复合肥料
- ⑤ 多菌株、多营养生物复合肥料



3. 微生物肥料的特点

- ▶ 微生物肥料主要是提供有益的微生物群落，而不是提供矿质营养
- ▶ 人们无法用肉眼观察微生物，所以微生物肥料的质量人眼不能判定，只能通过分析测定
- ▶ 合格的微生物肥料对环境污染少
- ▶ 微生物肥料用量少，每亩通常使用500~1000克微生物菌剂
- ▶ 微生物肥料作用的大小，容易受到微生物生存环境的影响，例如：光照、温度、水分、酸碱度、有机质等；
- ◆ 细菌有期限、微生物肥料有它的有效期限，通常为半年至一年



4. 微生物肥料的作用

◆ 增加作物营养

固氮细菌、解磷细菌、腐解细菌

◆ 改良土壤

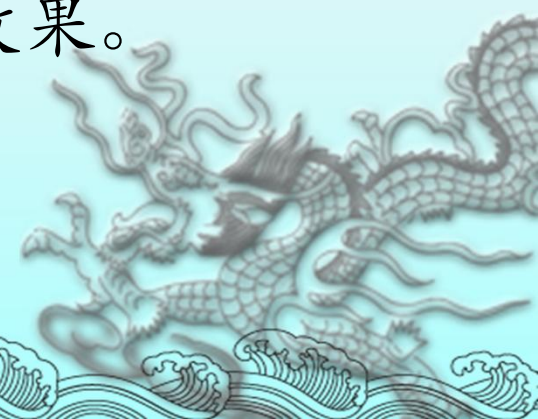
有益微生物能产生糖类物质，占土壤有机质的0.1%，与植物粘液，矿物胚体和有机胶体结合在一起，可以改善土壤团粒结构，增强土壤的物理性能和减少土壤颗粒的损失，在一定的条件下，还能参与腐殖质形成



◆ 减少资源和环境的污染

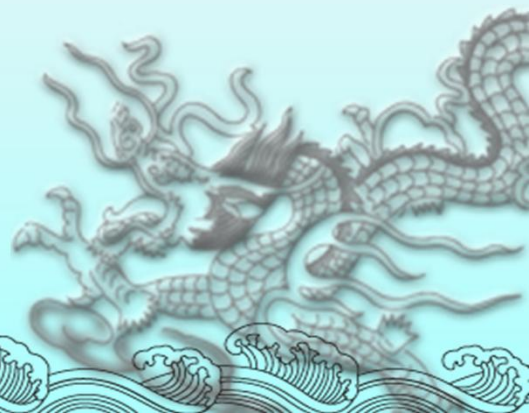
可以减少不合理使用化肥造成的水体污染，有利于发展生态农业和保护环境

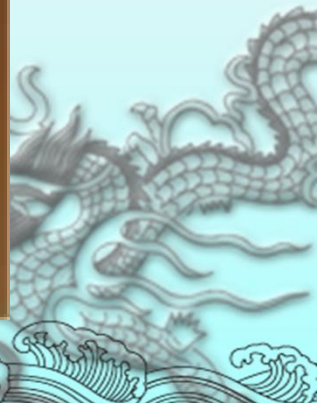
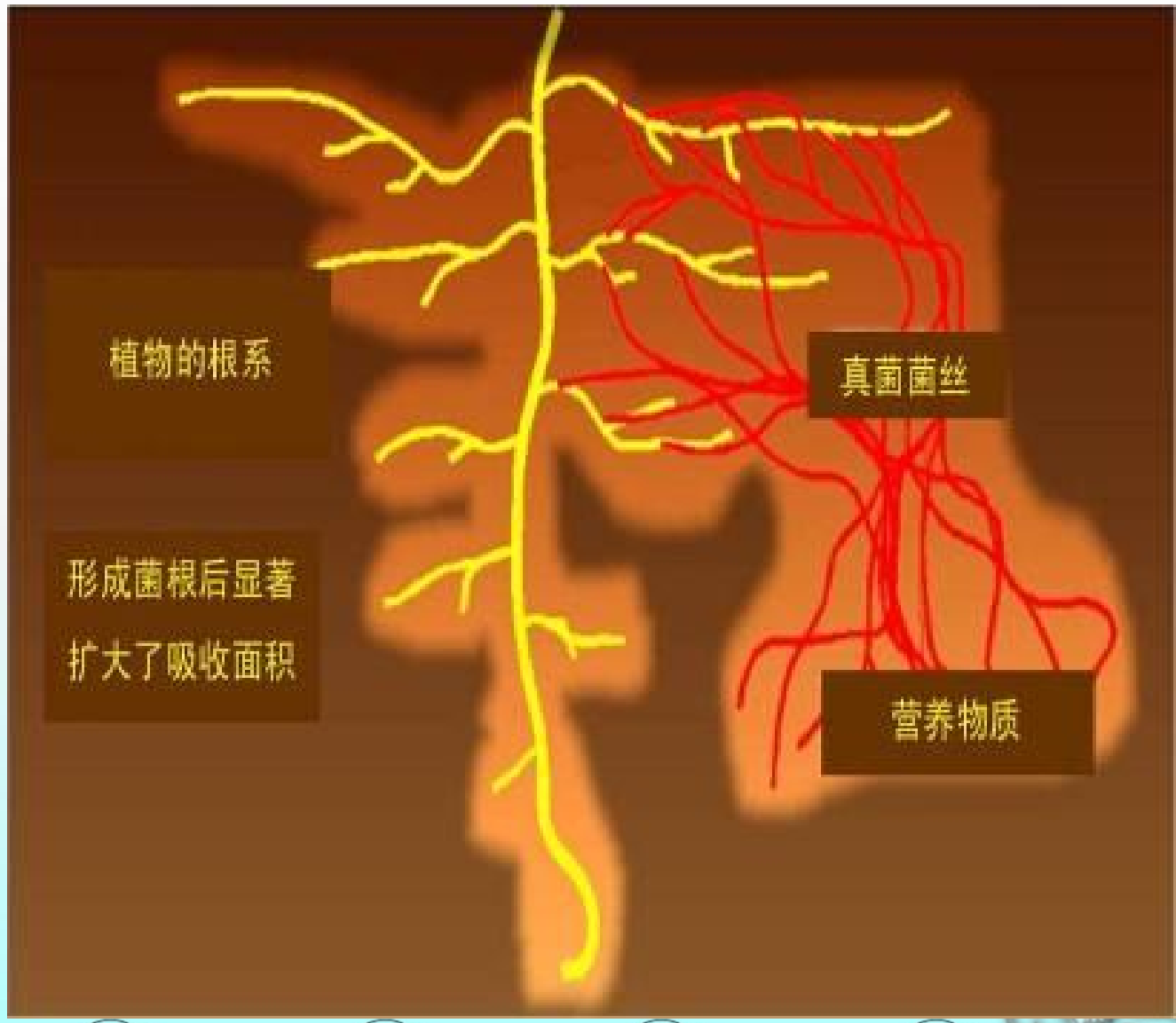
- ◆ 使用微生物肥料可以提高农产品品质，如蛋白质、糖、维生素等含量的提高。许多微生物种类在生长繁殖过程中产生对植物有益的代谢产物，如生长素，吲哚乙酸，赤霉素，多种维生素，氨基酸等等，能够刺激和调节作物生长，使植物生长健壮，营养良好，进而达到增产的效果。



▶ 增强植物抗病虫和抗旱能力

- ▶ 多种微生物可以诱导植物的过氧化物酶，多酚氧化酶，苯甲氨酸解氨酶，脂氧合酶，几丁质酶等参与植物防御反应，利于防病抗病，有的微生物种类还能产生抗菌素类物质，有的则是形成了优势种群，降低了作物病虫害的发生。菌根真菌由于在植物根部的大量生长，其菌丝除可为植物提供营养元素外，还可增加水分吸收，有利于提高植物的抗旱能力。







未施用微生物肥料的
豆科牧草

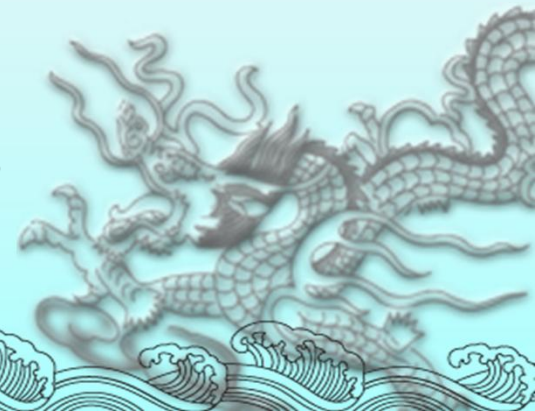


施用微生物肥料
的豆科牧草



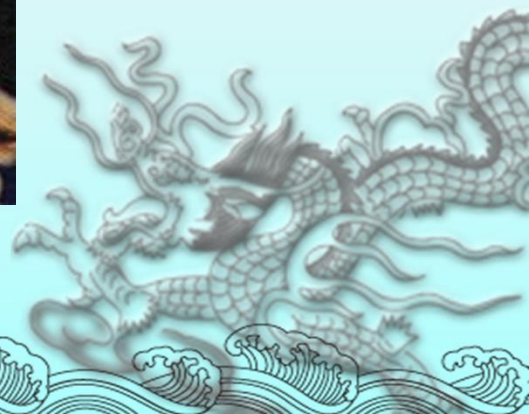


Scanning electron micrograph of wheat root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* OE 28.3



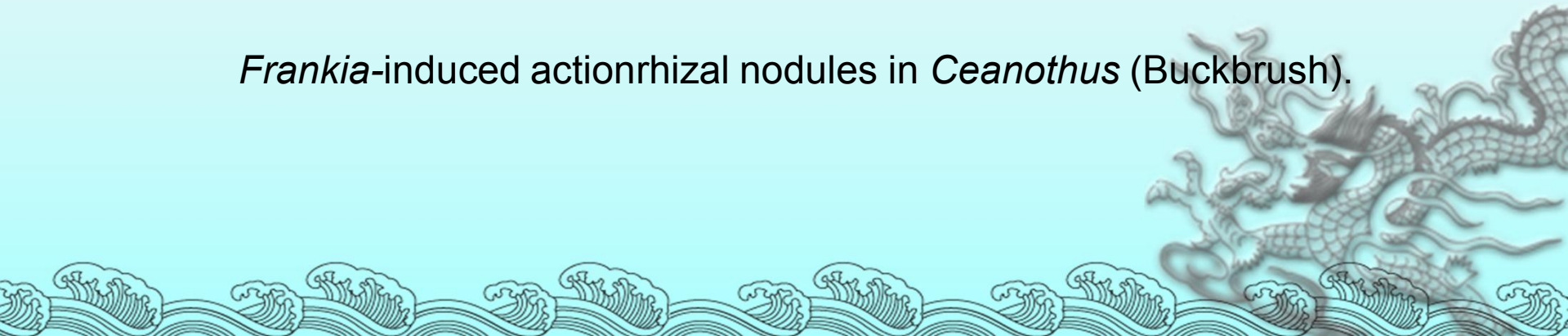


大豆根瘤





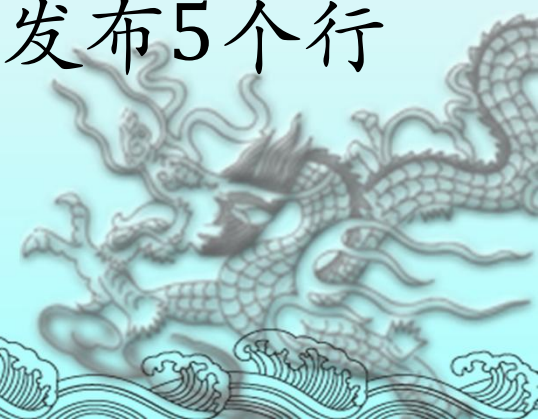
Frankia-induced actinorhizal nodules in *Ceanothus* (Buckbrush).



5. 我国微生物肥料现状

- ◆ **初步形成了微生物肥料产业**，具有一定的规模 and 水平。目前，我国已有几百家企业生产各种微生物肥料，年产量超过100万t。但是，就总体而言，无论是生产设备，还是生产工艺都与国外先进水平存在较大的差距
- ◆ **产品种类繁多**。我国生产的微生物肥料不仅有传统的根瘤菌，而且有联合固氮菌、芽孢杆菌、光合细菌、解磷解钾细菌等。剂型主要有液体、固体、颗粒剂型以及冻干剂型等

- ◆ **使用范围不断扩大，产品稳定性逐步提高。**
经过多年的推广，各种微生物肥料已经在绝大多数作物上得到应用，使用效果初步得到了广大农民的认可，有些微生物肥料还出现了供不应求的局面
- ◆ **行业管理初步形成**，质量意识逐渐深入人心。目前，微生物肥料已经纳入农业部“一肥两剂”检验登记管理范围，已经发布5个行业标准



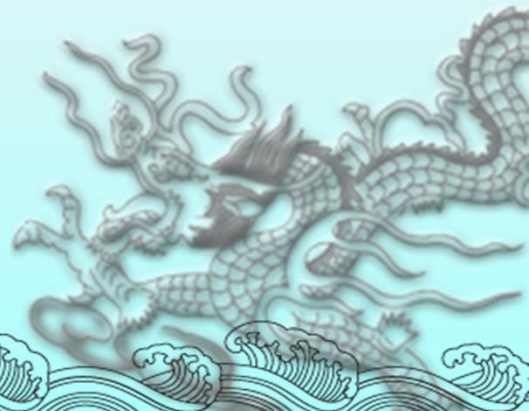
6. 我国微生物肥料的研制应用中存在的问题

- ◆ 基础研究力度不够，科研人员相对不足
- ◆ 菌株目标效能不稳定，配伍不尽合理，抗逆性差
- ◆ 生产工艺落后，产品质量不稳
- ◆ 微生物肥料产品质量标准有待进一步完善



7. 我国微生物肥料研制的发展趋势

- ▶ 由豆科作物接种剂向非豆科用肥方面发展
- ▶ 由单一菌种向复合菌种方面发展
- ▶ 由单功能向多功能方面发展
- ▶ 由无芽孢菌转向芽孢菌种

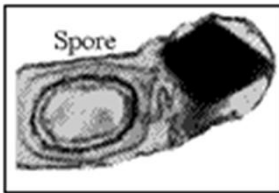


二、微生物农药

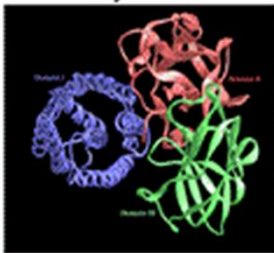
Bacillus thuringiensis



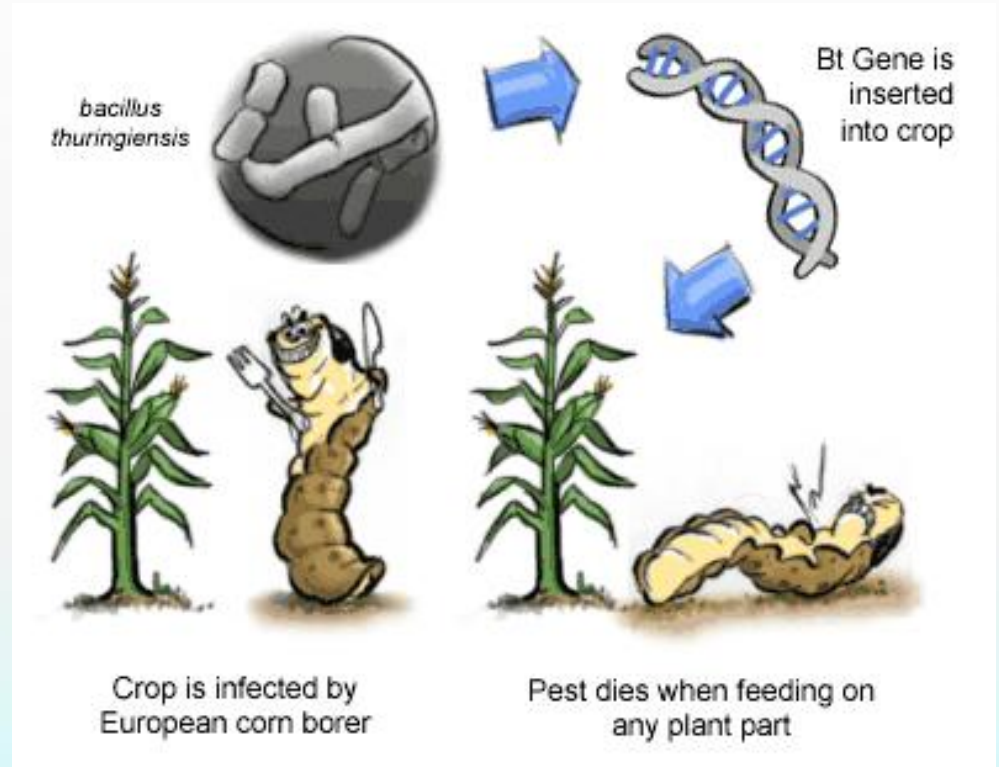
Gram-positive, spore-forming soil bacterium



Produce insecticidal crystal proteins (δ -endotoxins) during sporulation



Most *Bt* strains can synthesise more than one crystal, which may be formed by different Cry toxins



Engineering resistant corn. Following the insertion of a gene from the bacteria *Bacillus thuringiensis*, corn becomes resistant to corn borer infection. This allows farmers to use less insecticides.

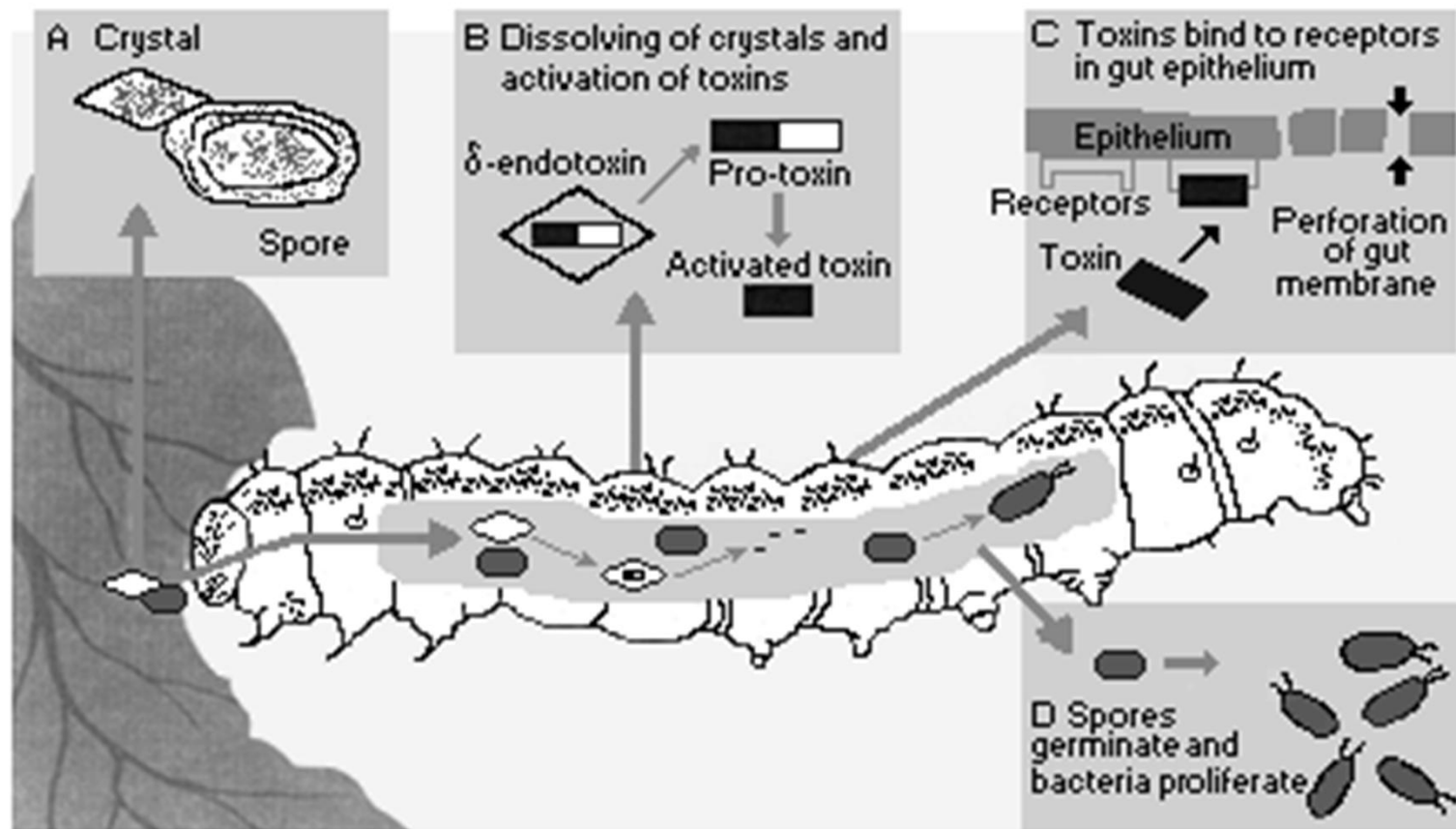
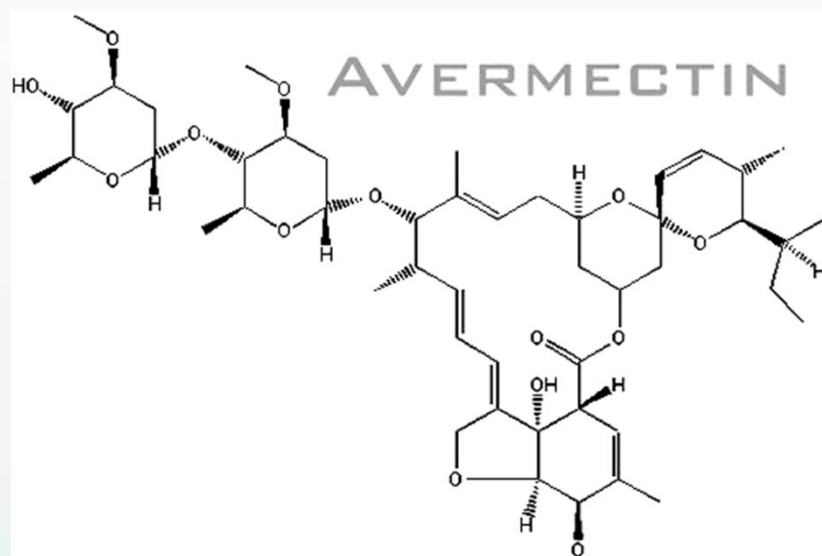


Fig. 1. Mechanism of toxicity of Bt



Streptomyces avermitilis

阿维菌素(ivermectin)是杀线虫和节肢动物(特别是螨类)的抗生素。它能增加虫体内的 γ -氨基丁酸,后者对神经有抑制作用。



球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)
的菌丝长出金龟甲尸体表面



松毛虫



球孢白僵菌杀死松毛虫、蝗虫和家蚕



僵蚕

(家蚕幼虫感染白僵菌而致死的干燥带菌虫体)

性味和功用 辛、咸，平。归肺、肝、胃经。祛风解痉，化痰散结。用于肝风头痛眩晕，惊风抽搐，咽喉肿痛，中风失音，喉痹，痰热结核，齿痛，瘰疬，风疮丹毒作痒。常用量5~10克。





棉铃虫幼虫的环节处被核型多角体病毒感染。

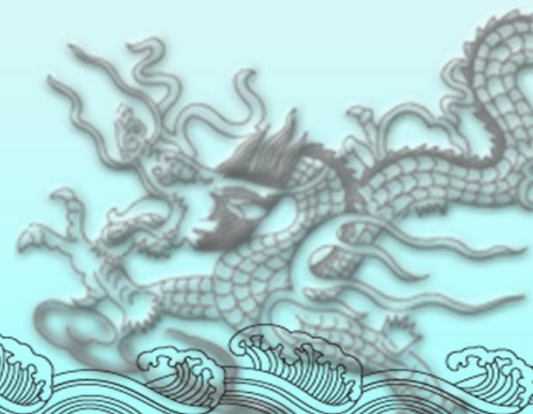
80%的昆虫病毒都是农林业中常见的鳞翅目害虫的病原体，因此是害虫生物防治的巨大资源库。

近20年来，利用昆虫病毒防治农作物害虫已成为国内外生物防治的一个重要发展方向。**HaSNPV**是棉铃虫特异性病原病毒，由武汉病毒所分离，自70年代起被用于棉铃虫的防治。在武汉病毒所和兄弟单位的协助之下，该病毒在1993年被登记注册为我国的第一个病毒杀虫剂，目前年产200~400吨，年应用面积达200万亩次，在国际上具有较大的影响。我国许多地方都开展了不同规模的田间治虫试验，其中面积较大的有赤松毛虫质型多角体病毒（**CPV**），棉铃虫和油桐尺蠖核型多角体病毒（**NPV**）和菜粉蝶颗粒体病毒（**GV**）等病毒杀虫剂，而且取得了较好的防治效果。

1. 微生物农药的特点

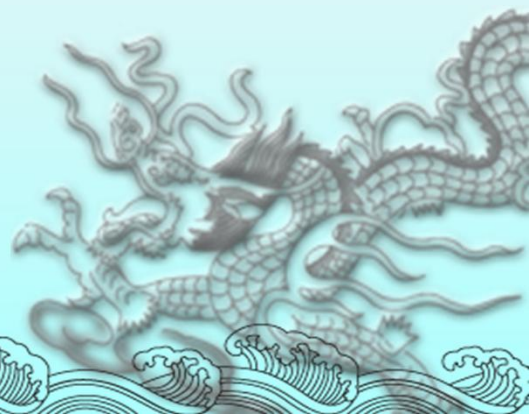
- ◆ 研发的选择余地大，开发利用途径多
- ◆ 无公害、无残留，安全环保
- ◆ 特异性强，不杀伤害虫天敌及有益生物，维持生态平衡
- ◆ 不易产生抗药性
- ◆ 环境相容性好
- ◆ 生产工艺简单

见效慢、稳定性差



2. 微生物农药的种类

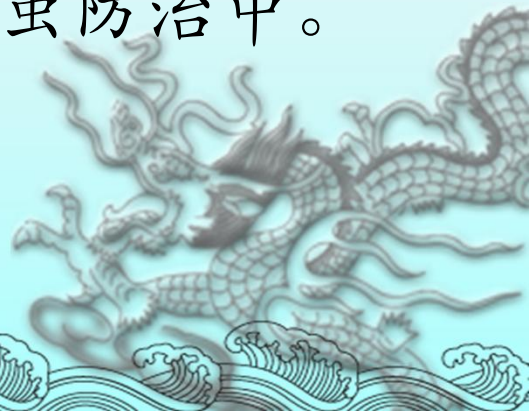
- ◆ 微生物杀虫剂
- ◆ 微生物杀菌剂
- ◆ 微生物除草剂
- ◆ 微生物杀鼠剂
- ◆ 微生物植物生长调节剂



微生物杀虫剂

——细菌杀虫剂 (bacterial insecticide)

- ◆ 细菌杀虫剂是利用对某些昆虫有致病或致死作用的杀虫细菌，及其所含有的活性成分制成，用于防治和杀死目标害虫的生物杀虫剂。作用机制是胃毒作用，通过肠细胞吸收，进入体腔和血液，使之得败血症导致全身中毒死亡。
- ◆ 全世界约有30多个国家100多家公司生产细菌杀虫剂，品种可达150多个，并已逐渐应用于蔬菜、林业、园艺、卫生害虫等领域的害虫防治中。



1) 苏云金杆菌 (Bt)

- ◆ 用途最广、开发时间最长、产量最大、应用最成功。
- ◆ 占生物防治剂总量的95%以上，已有60多个国家登记了120多个品种。
- ◆ 美国用以防治蔬菜害虫和玉米害虫的面积分别占总面积的80%和50%，销售额从80年代末的4000万美元上升到90年代的5亿多美元。



- ◆ 我国于1959年引进Bt杀虫剂，1965年在武汉建成国内第一家Bt杀虫剂生产企业。
- ◆ 我国目前已登记的Bt杀虫剂粉剂有16种，液剂12种，生产厂家达76家，年产量达 $2.0 \times 10^8 \text{kg}$ - $3.0 \times 10^8 \text{kg}$ 。
- ◆ 由我国构建的高效杀虫重组苏云金杆菌，已于2000年底通过了安全评价，并获准进行商品化生产。



Bt应用的剂型：

◇ 油悬剂

是指一类用经过试验可以作为菌剂助剂且不污染作物的油类作为载体的一种剂型。油类包括植物油或矿物油。作为稀释剂，要求油类本身具有良好的帖着性和展着性。容易附于蜡质或光滑的叶面。所以油悬剂具有粘着性和展着性好、抗雨冲刷能力强等优点。

湖北省农业科学院生物农药工程研究中心

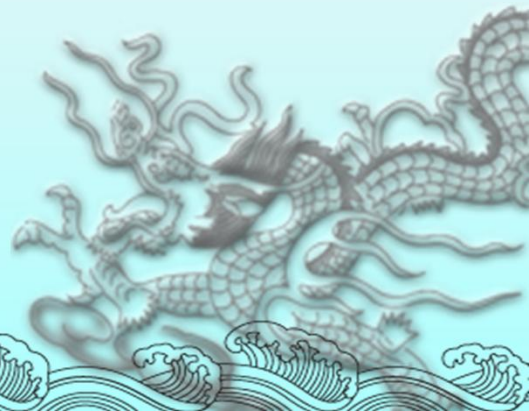
对棉铃虫的田间防效达85.3% 96.0%



◆ 微囊剂

是指将有效成分包在囊壁物质中制成几微米至几百微米的微小球体。靠改变囊壁厚度和孔径大小控制药物释放速度。

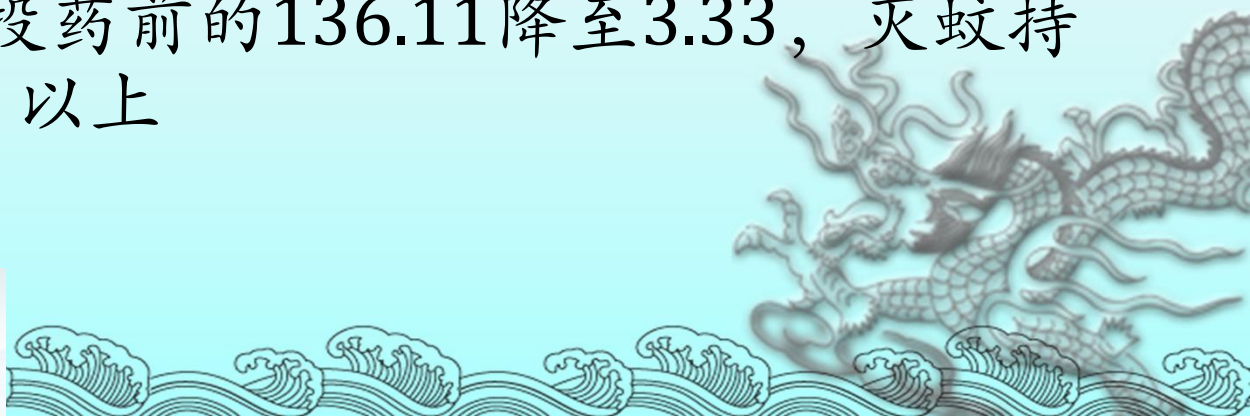
苏云金芽胞杆菌微胶囊制剂已开发了3种类型，一种是**可喷洒性制剂**，加水后形成的悬液可以直接用常规喷雾器喷洒；另一种是传统的**颗粒饵剂**，经过干、湿过程后颗粒之间仍保持相互分离；第三种是**粘着性颗粒剂**，与水接触后会发生部分膨胀，干燥后仍可粘着在作物叶片上。



◆ 漂浮块剂

是缓释剂的一种类型。主要用于蚊虫幼虫的防治。苏善强等用粘合剂、凝结剂和松散剂按一定比例混合，加热溶解、搅拌、冷却后按所需剂量加入苏云金杆菌H14粉剂，压缩成边长1.5cm的正立方体块状缓释剂。

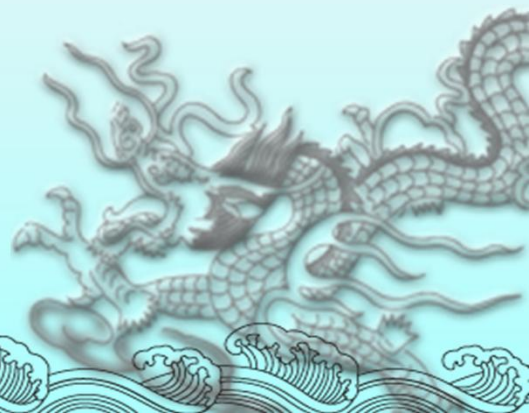
现场毒杀埃及伊蚊幼虫的实际效果显示，按剂量0.0005%投药后1个月，室内幼虫密度布雷图指数从投药前的123.26降至2.56；投药后3个月，室外布雷图指数从投药前的136.11降至3.33，灭蚊持效时间达3个月以上



◆ 油烟雾剂

烟雾载药技术防治植物病虫害具有工效高、用药经济、使用方便、收效快等优点，尤其适用于交通不便、水源困难、山坡陡峭、林木高大的林区病虫害防治。

能直接对家蚕致死



◆ 火箭抛撒剂型

将苏云金芽胞杆菌工业菌粉进行复配后，装入火箭弹头，装菌量700g~50g。弹头将菌粉带到空中爆炸抛撒落粉，分布在防治目标的叶面上。弹头射高100~150m。射距200~300m，抛撒散落直径大于30m，抛撒环境温度低于65℃。经检测，抛撒后菌粉对马尾松毛虫的毒力效价不但没有下降，而且还因复配改良的原因有所上升。结果表明。这一抛撒方式有利于保护苏云金芽胞杆菌的生物活性，爆炸抛撒对菌粉芽胞也无不良影响。



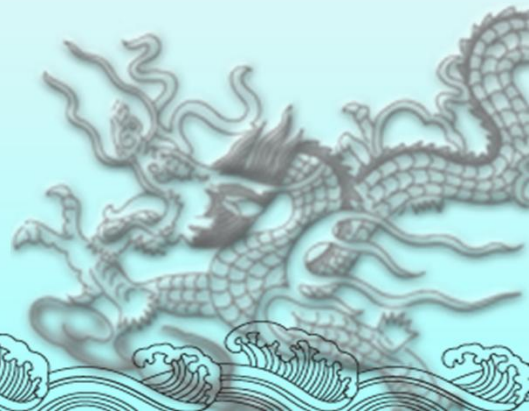
◆ 紫外线防护剂型

- ▶ 苏云金芽胞杆菌制剂直接与适量化学紫外线吸收剂混合，即可取得防护效果。
- ▶ 苏云金杆菌制剂中加入木质素及蔗糖溶液，可以防止紫外线的伤害，提高残效期。



2) 其他细菌

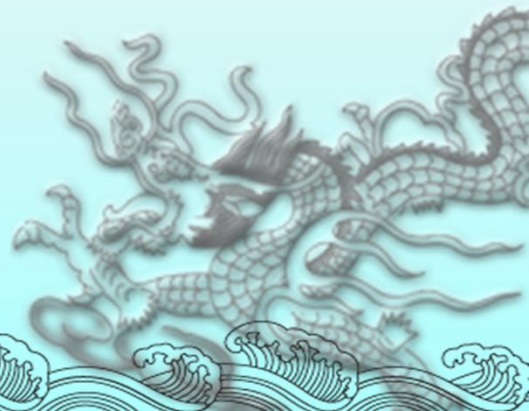
- ◆ 青虫菌、乳状芽胞杆菌、球形芽胞杆菌、金龟子芽胞杆菌、蜡状芽胞杆菌、幼虫芽胞杆菌、枯草杆菌、放射形土壤杆菌、洋葱球茎病假单胞菌、荧光假单胞菌、丁香假单胞菌、灰绿链霉菌。



微生物杀虫剂

——真菌杀虫剂

- ◆ 世界上已记载的杀虫真菌约有100属，800多种。各国应用研究最多的是白僵菌，其次是绿僵菌。此外，还有赤僵菌、虫生藻菌等。



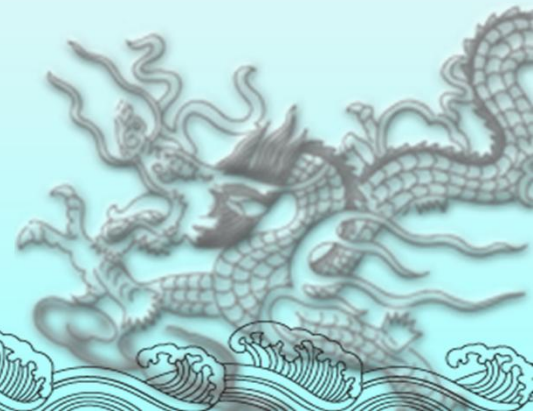
1) 白僵菌 (*Beauverria bassiana*)

研制较早，普及面积大、应用最广。美国已经产业化的两种白僵菌制剂，即：B. bassiano Strain TBI，Bb147和CHA，以及B. brongniar。菌株Bb-147是从被感染的玉米螟幼虫体上分离得到，其生产工艺由INRA研制而成。菌株TBI由美国的一家研究中心从墨西哥棉铃虫体内获得



2) 绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*)

- ▶ 被用于防治螫草等地下害虫、天牛等蛀干害虫以及苹果食心虫，并且对蚊子幼虫也有效…。最近，由我国研制的绿僵菌农药，虽速效性较低，但7-9天可使蝗虫集中大量死亡，能有效控制蝗虫种群数量。药后持效期15天以上。



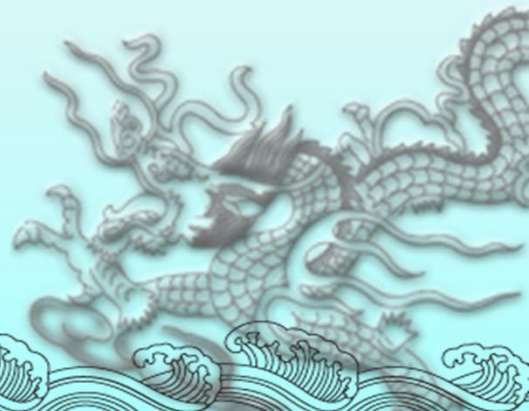


微生物杀虫剂

——昆虫病毒杀虫剂

- ◆ 目前，已有30多个国家和地区，开展病毒防治害虫工作，20多个国家的30多种病毒杀虫剂已进行登记、注册、生产应用。病毒杀虫剂宿主特异性强，能在害虫群内传播形成流行病。也能潜伏于虫卵，传播给后代，持效作用长。**缺点是施用效果受环境影响大，宿主范围窄。**
- ◆ 已知的昆虫病毒有1600多种，其中60%为杆状病毒，可引起1100种昆虫和螨类发病，可控制近30%的粮食和纤维作物上的主要害虫。在昆虫病毒研究领域，我国已发现报道的昆虫病毒近220种，约250株，其中，110株为我国首次分离得到。目前，已有20多种昆虫病毒进入大田试验推广，针对农牧业害虫的有12株。

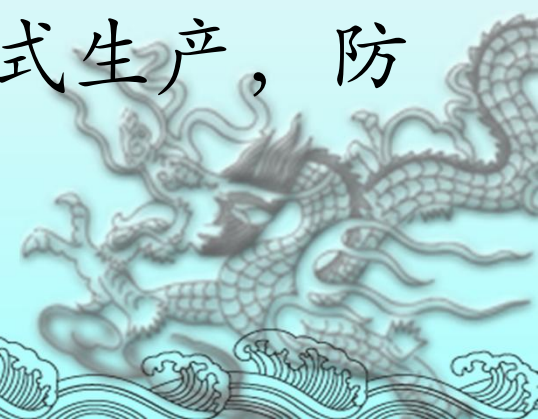
- ◆ 1993年。国内第一个昆虫病毒杀虫剂—棉铃虫核型多角体病毒(HaNPV)完成了产品注册登记，标志着我国昆虫病毒杀虫剂的研究开始从实验室走向实用化。
- ◆ 斜纹夜蛾NPV(虫瘟一号)、茶尺蠖NPV、茶毛虫NPV、黄地老虎GV及菜青虫GV杀虫剂已商品化。



微生物杀虫剂

——线虫杀虫剂

- ◆ 20世纪80年代，我国引进昆虫病原线虫优良品种，并通过固体培养进行大量生产，90年代进行液体发酵生产昆虫病原线虫，也获得成功。
- ◆ 斯氏线虫：已在田间用于防治小菜蛾、桃小食心虫、地老虎、蝇蛆、天牛等害虫
- ◆ 异小杆线虫“泰山1号”：已正式生产，防治蜡螟等害虫，效果良好。





微生物杀虫剂

——微孢子杀虫剂

- ◆ 微孢子杀虫剂：是原生动物，它是经宿主口或卵或皮肤感染，并在其中增殖，使宿主死亡。当前用于农林防治的微孢子杀虫剂有3种，即：行军虫、云杉卷叶蛾和蝗虫微孢子虫。
- ◆ 1986年，从美国引进的蝗虫微孢子虫(*Nosema locustae*)在防治草原蝗虫方面取得了显著效果，在短时间内迅速降低虫口密度，引起虫病流行，达到长期防治的目的。并通过研究建立大盆增殖微孢子虫的生产技术，年产制剂可供防治 3×10^4 hm² 草原蝗虫。1994年，防治面积超过 1×10^4 hm²，虫1=1减退率在55%以上，并可有效降低蝗虫第二代种群密度。

微生物杀菌剂

- ◆ 微生物杀菌剂是一类控制植物病原菌的制剂，主要有农用抗生素、细菌杀菌剂、真菌杀菌剂和病毒杀菌剂等类型。微生物杀菌剂主要抑制病原菌能量产生、干扰生物合成和破坏细胞结构。内吸性强、毒性低，有的兼有刺激植物生长的作用。
- ◆ 目前，生产上应用的微生物杀菌剂，包括有井冈霉素、公主岭霉素、赤霉索、春雷霉素、农抗120、农抗5102、中生菌素、武夷菌素、浏阳霉素等。



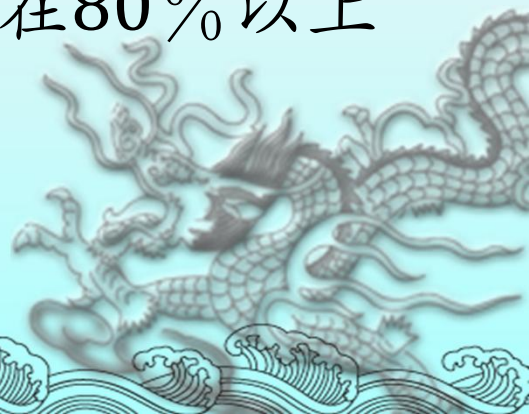
微生物除草剂

◆ 除草剂双丙胺磷

具有强烈的广谱杀草活性，能防治一年生和多年生的杂草，同时具有很高的杀螨活性

- ◆ 1963年，我国首次将真菌用于杂草的生物防治，利用炭疽病“鲁保一号”防治大豆菟丝子。1966年以后，生物除草剂“鲁保一号”推广到全国20多个省、市、自治区，防治效果稳定在80%以上。

。



微生物植物生长调节剂

- ◆ 植物生长调节剂中的品种有细胞分裂素、赤霉素、脱落酸、多聚寡糖（oligosaccharins）和超敏蛋白（Harpinprotein）
- ◆ 中国农业科学院，于20世纪50年代发现“5406”，其活性有效成分为玉米素和激动素，在浙江嘉善微生物农药厂实现产业化生产，现已广泛用于蔬菜、柑桔、茶叶、烟草、人参等多种植物上。
- ◆ 国内植物生长调节剂发酵罐单罐生产最大吨位已达到50t，最小吨位也达20t。

赤霉素



3. 微生物农药的使用方法

◆ 科学保管

必须保存于闭光、低温、通风、干燥的地方。

◆ 看天用药

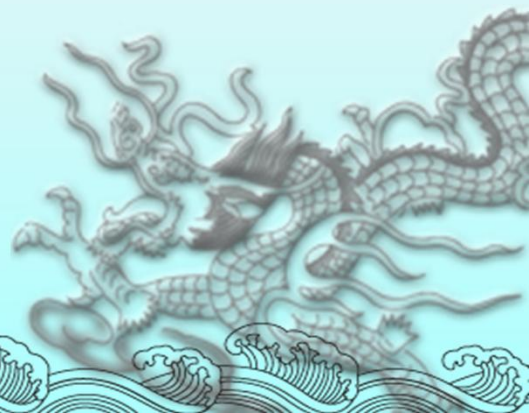
气温在 $10\sim 27^{\circ}\text{C}$ 在5~9月的阴天或晴天下午。

◆ 对症选用农药

应用范围相对较窄。

◆ 适当提前用药

提前3~5天。



◆ 浓度适宜，科学间隔

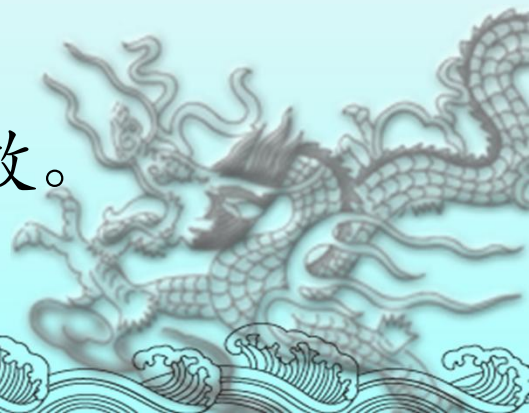
细菌性杀虫剂一般每hm²用活孢子数在100亿/克上的菌粉2200~2500g。虫口量大、世代重叠、虫龄不齐、单位面积一次用药量大，间隔期短；苏云金杆菌防治小菜蛾、大菜粉蝶间隔10~15天；防治三化螟间隔5~6天。

◆ 喷洒均匀

一般以胃毒为主，均匀喷施可提高防效。

◆ 正确配方，混合使用

农药混配可扩大应用范围，提高药效。



4. 微生物农药面临的问题

◆ 技术落后

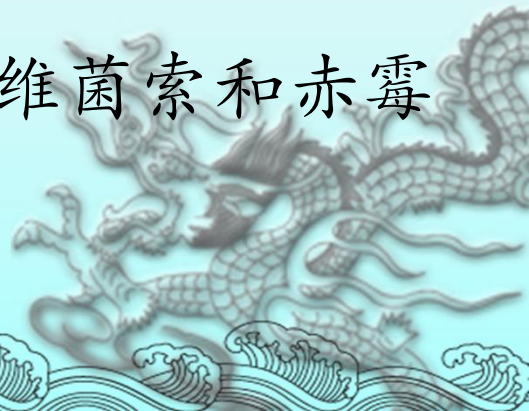
多为发酵制作，生产工艺停留在自然筛选上，导致成本偏高。

◆ 价格偏高

生产企业规模小、设备差、缺乏资金和技术落后。

◆ 科研成果转化率底

广泛推广应用的主要是井冈霉素、阿维菌素和赤霉素3种。



◆ 农药市场比较混乱

假冒伪劣农药充斥市场。

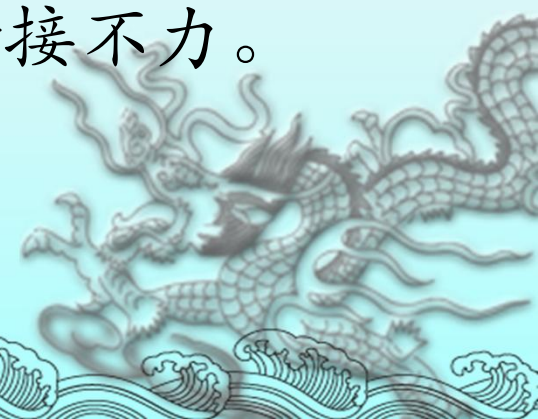
◆ 发展速度缓慢

推广周期长，至少要六、七年时间；品种也不齐全，在农药中所占比例不到10%。

◆ 产品质量不稳定

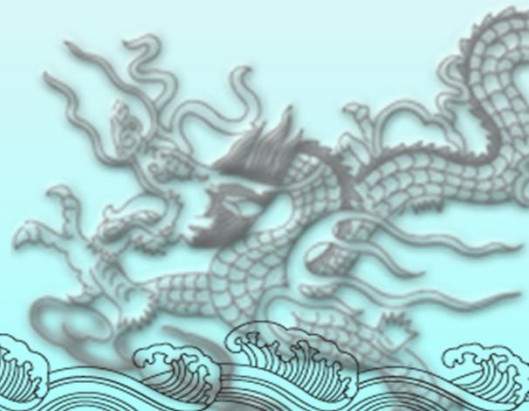
◆ 开发力度小

投资太少，导致新产品开发的后劲不足，上市的微生物农药品种也不够齐全；生产结构不合理、企业生产规模小、研究开发与生产衔接不力。



第二节 微生物与环境保护

- ◆ 1. 废水的好氧生物处理
- ◆ 2. 废水的厌氧生物处理
- ◆ 3. 废水的微生物脱氮除磷
- ◆ 4. 固体废弃物的微生物处理
- ◆ 5. 大气污染物的微生物处理



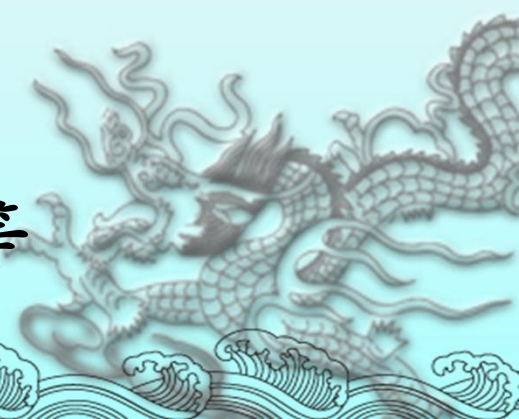
微生物在环境污染治理中的作用

- ◆ 有机废弃物的“清道夫”
- ◆ 难降解物和人工合成物分解
- ◆ 有机废水、废物的装置性处理
- ◆ 石油污染的大面积清除
- ◆ 重金属污染物的清除
- ◆ 含氮化合物的清除
- ◆ 贫矿金属的回收
- ◆ ——等等



微生物在环境污染治理中的热点及难点

- ◇ 城市有机垃圾的处理
- ◇ 养殖场粪便废弃物的处理
- ◇ 大面积海洋赤潮
- ◇ 人工合成物的快速降解
- ◇ 除草剂、农药的微生物降解
- ◇ 水稻田 CH_4 的排放问题
- ◇ 旱地 N_2O 的排放问题
- ◇ 污染土地的生物修复——等等

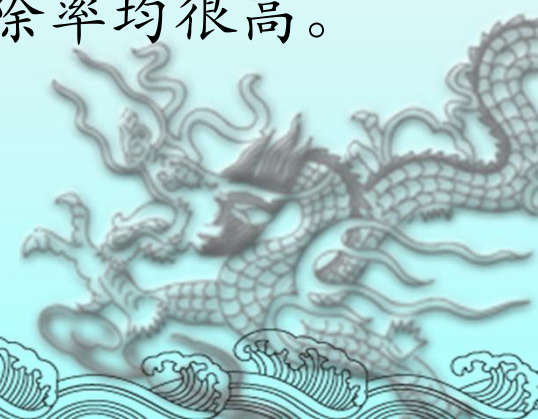


1. 废水的好氧生物处理

1.1 活性污泥法

◇ 活性污泥法的原理

- ◇ 活性污泥法是利用悬浮生长的微生物絮体处理有机废水的一类好氧生物处理方法。
- ◇ 注：微生物絮体由好气性微生物（细菌、真菌、原生动物和后生动物）及其代谢和吸附的有机物、无机物组成。
- ◇ 活性污泥去除污水的能力是极高的，它对生活污水的 BOD_5 去除率可达95%左右，悬浮固体去除率也达95%左右，对污水中的病原细菌和病毒的去除率均很高。

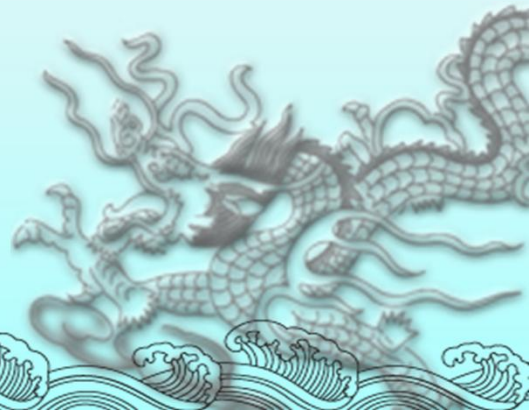


1. 废水的好氧生物处理

1.1 活性污泥法

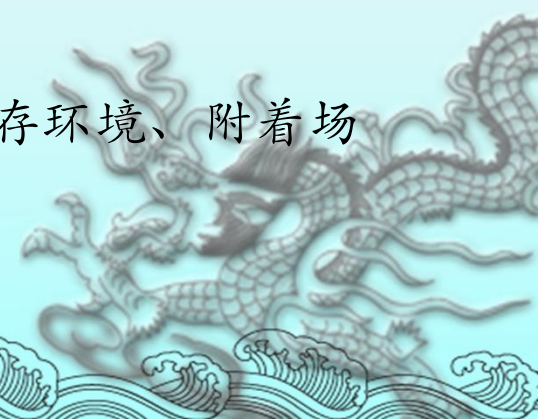
◆ 活性污泥的净化反应过程

- ◆ 活性污泥系统对有机底物的降解是通过几个阶段和一系列作用完成的。包括以下阶段：
 - ◆ ①絮凝和吸附阶段
 - ◆ ②活性污泥中微生物的代谢和增殖
 - ◆ ③活性污泥的凝聚、沉淀和浓缩



活性污泥中的微生物

- ◆ 形成活性污泥絮状体的细菌——菌胶团细菌
 - ◆ 菌胶团：狭义指动胶菌属（Zoogloea）形成的细菌团块，广义指所有具有荚膜或粘液或明胶质的絮凝性细菌互相絮凝聚集形成的菌胶团块。
 - ◆ 菌胶团细菌是活性污泥的主体，它的作用：
 - ◆ 具有很强的吸附、氧化分解有机物的能力。菌胶团的形成可使细菌避免被微型动物所吞噬，并且与污泥的沉降性能和二沉池能否有效泥水分离密切相关；
 - ◆ 为原生动物、微型后生动物提供了良好的生存环境、附着场所。



◆ 丝状细菌

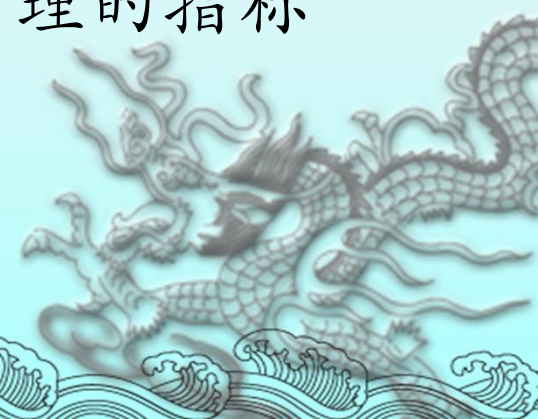
◆ 它的作用有两方面：

- ◆ 一方面：是活性污泥的重要组分，交叉穿织与菌胶团内，或附着生长于絮状体表面，具有强氧化分解有机物能力，起到一定的净化作用。
- ◆ 另一方面：当丝状菌的数量超过菌胶团细菌时，可使絮状体沉降性能下降，严重时可引发污泥膨胀（bulking）现象。



活性污泥中的微生物

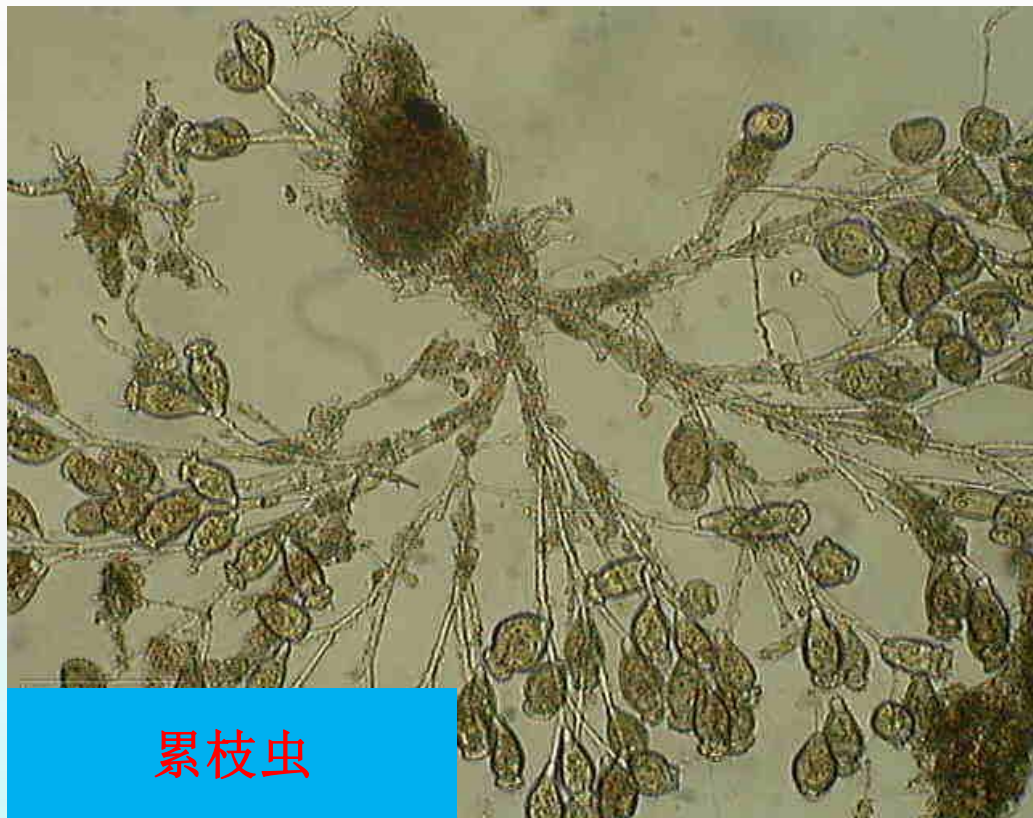
- ◆ 原生动物及微型后生动物
 - ◆ 净化作用：腐生性营养的原生动物可吸收溶解性有机物，动物性营养的原生动物可吞食有机颗粒、游离细菌及其它微小生物
 - ◆ 促进絮凝和沉淀作用
 - ◆ 指示作用：可作为处理系统运转管理的指标
- ◆ 真菌



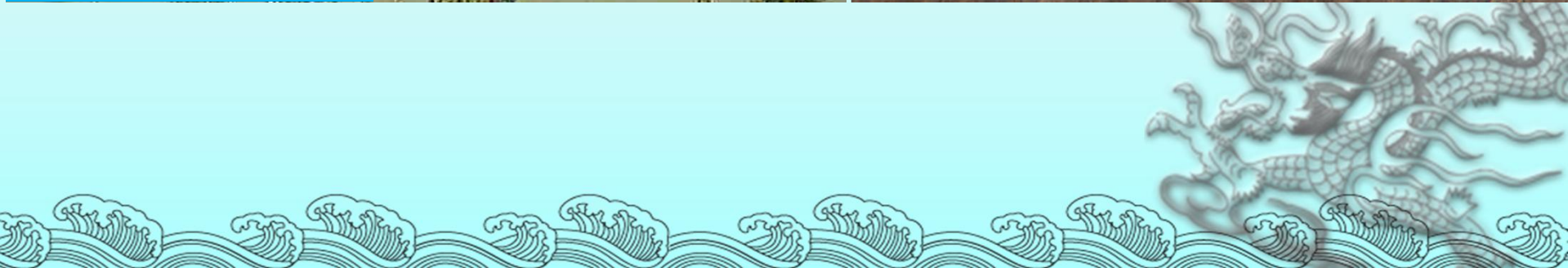
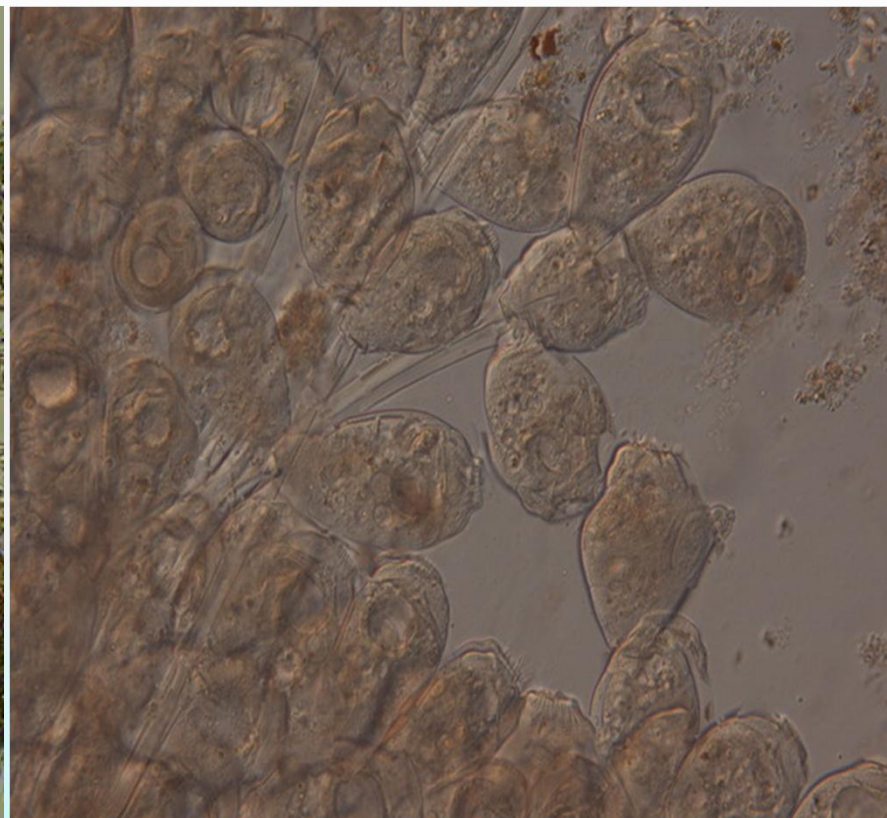


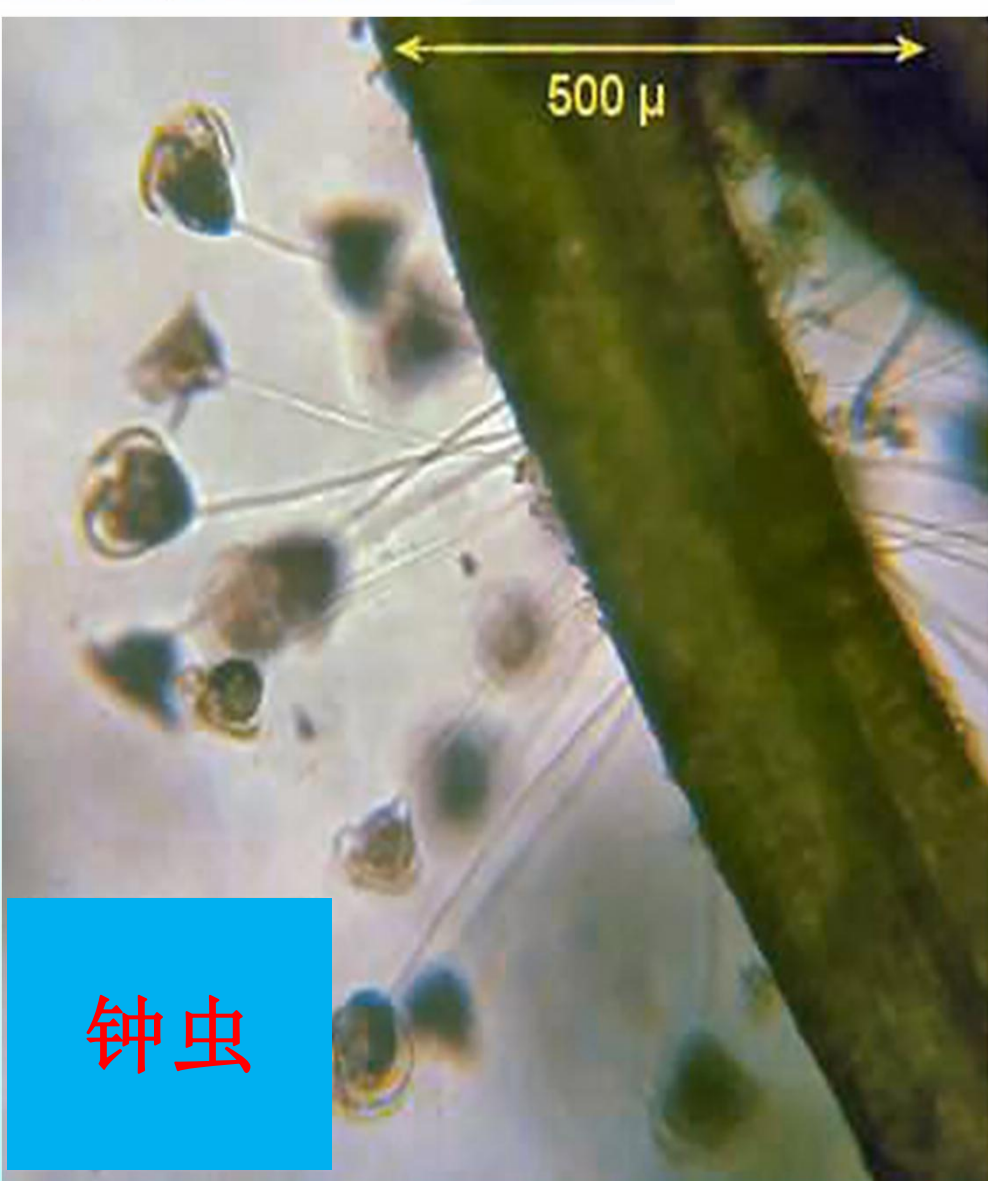
游泳型纤毛虫



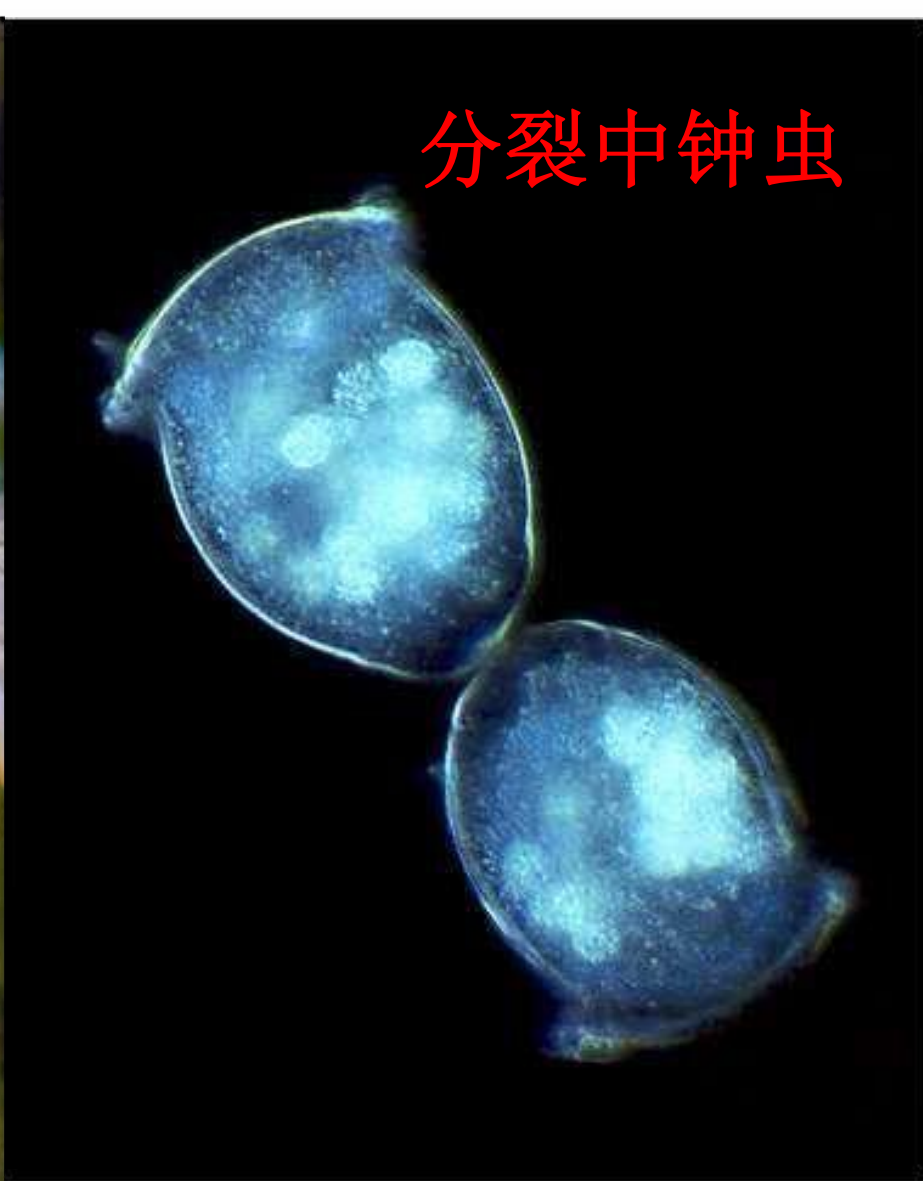


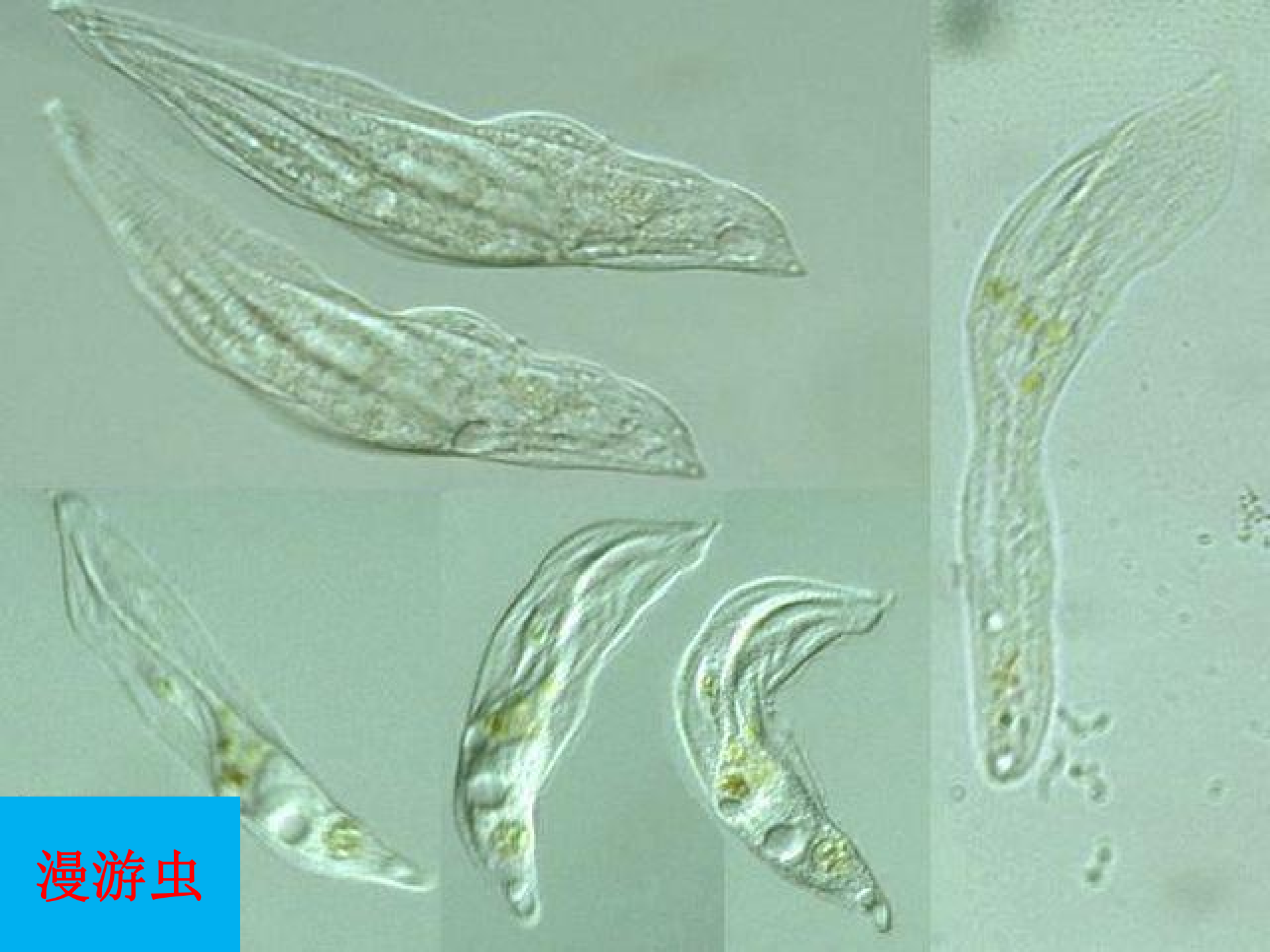
累枝虫





钟虫





漫游虫

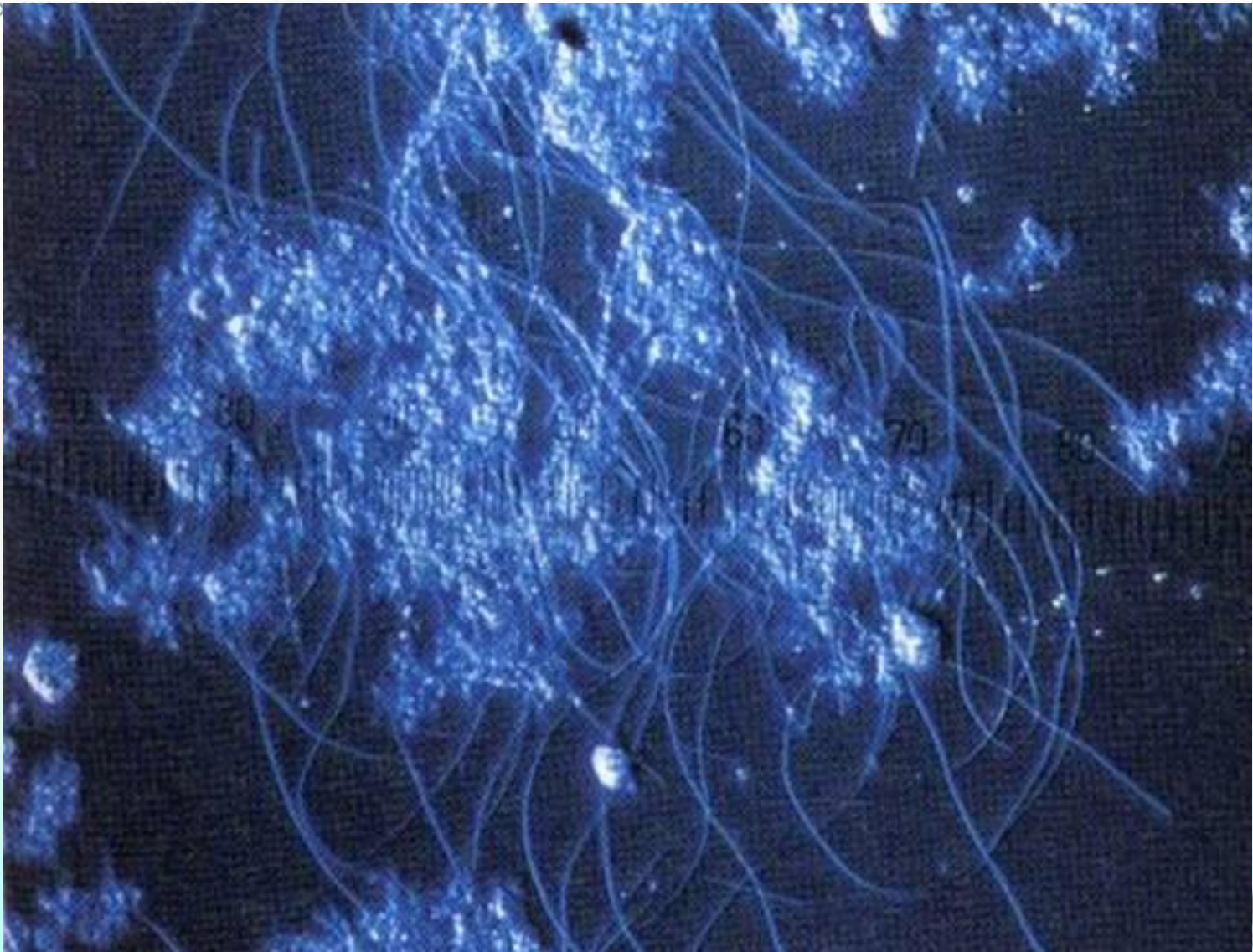


漫游虫



轮虫





菌胶团细菌和丝状细菌的复合体显微照片[引自Lansing
M.Prescott et al Microbiology(fifth edition)]

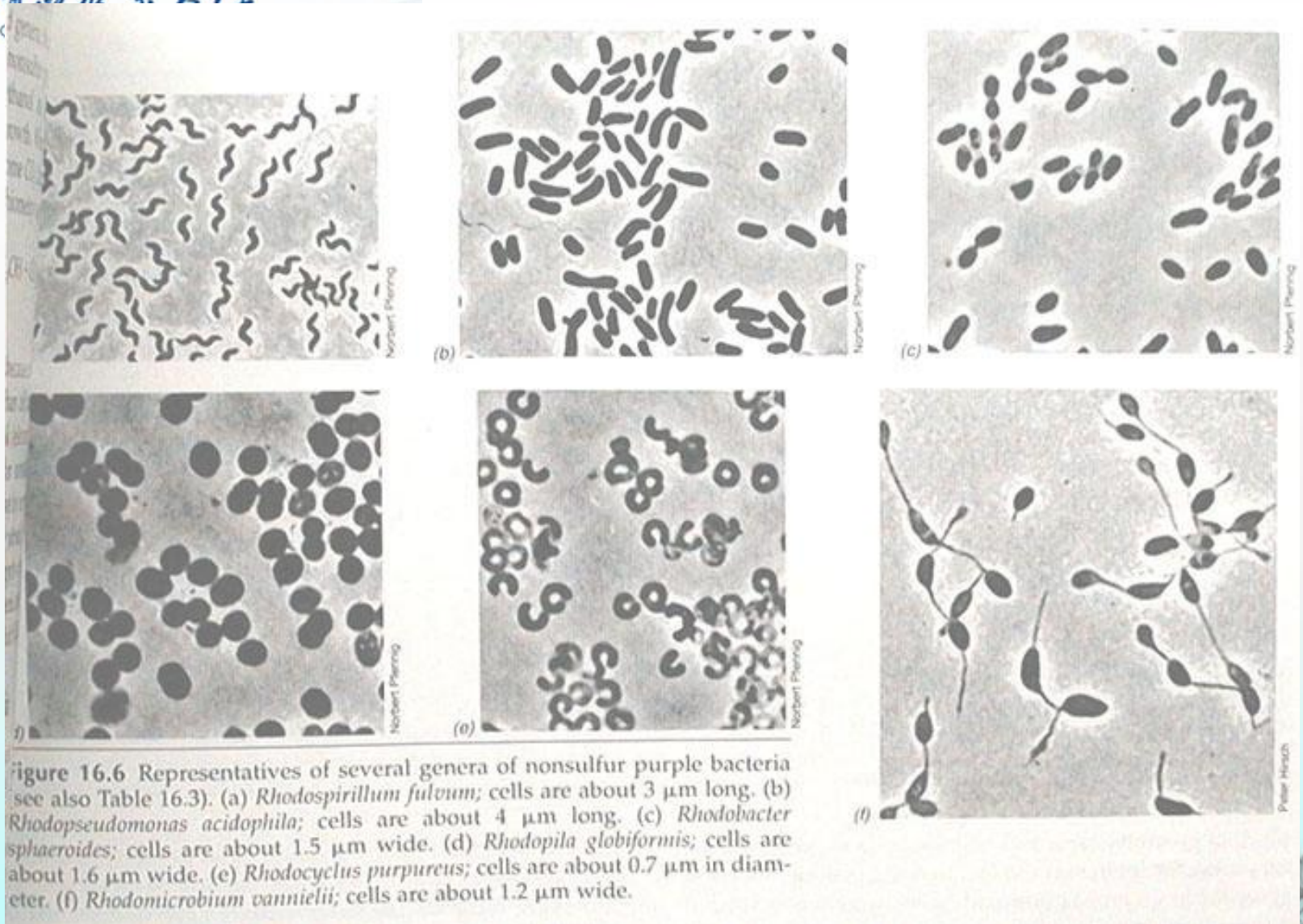


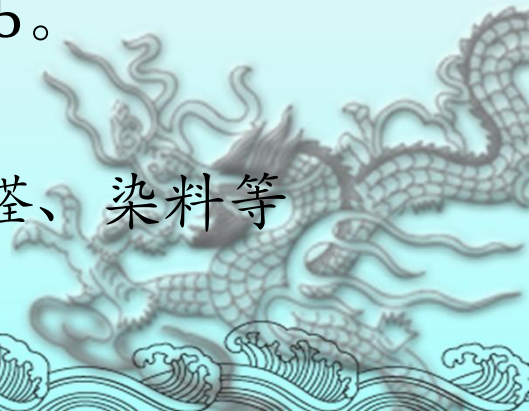
Figure 16.6 Representatives of several genera of nonsulfur purple bacteria (see also Table 16.3). (a) *Rhodospirillum fulvum*; cells are about 3 μm long. (b) *Rhodopseudomonas acidophila*; cells are about 4 μm long. (c) *Rhodobacter sphaeroides*; cells are about 1.5 μm wide. (d) *Rhodospila globiformis*; cells are about 1.6 μm wide. (e) *Rhodocyclus purpureus*; cells are about 0.7 μm in diameter. (f) *Rhodomicrobium vannielii*; cells are about 1.2 μm wide.

图1 各种形态的细菌



活性污泥净化反应的影响因素

- ◆ 溶解氧 (DO)
 - ◆ 曝气池出口处的混合液的DO浓度保持在2mg/L左右, 可使活性污泥保持良好的净化功能。
- ◆ 水温
 - ◆ 活性污泥微生物的最适温度范围: 15~30℃。
- ◆ 营养物质
 - ◆ 微生物对氮和磷的需要量可按BOD: N: P=100: 5: 1来考虑。
- ◆ pH
 - ◆ 活性污泥微生物的最适pH范围: 6.5~8.5。
- ◆ 有毒和有抑制物质
 - ◆ 如重金属、氰化物、硫化氢、酚、醇、醛、染料等



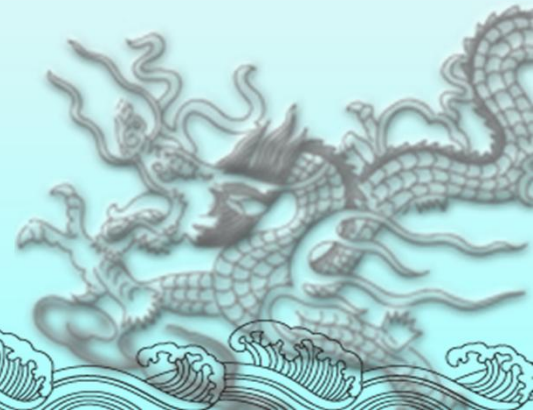
活性污泥法的基本特征

- ◆ 利用生物絮状体为生化反应的主体物。
- ◆ 利用曝气设备向生化反应系统分散空气或氧气，为微生物提供氧源。
- ◆ 对体系进行混合搅拌以增加接触和加速生化反应传质过程。
- ◆ 采样沉淀方式去除有机物，降低出水中的微生物的固体含量。
- ◆ 通过回流使沉淀池浓缩的微生物絮凝体返回到反应系统。
- ◆ 为保证系统内生物细胞平均停留的时间的稳定，经常排出一部分生物固体。

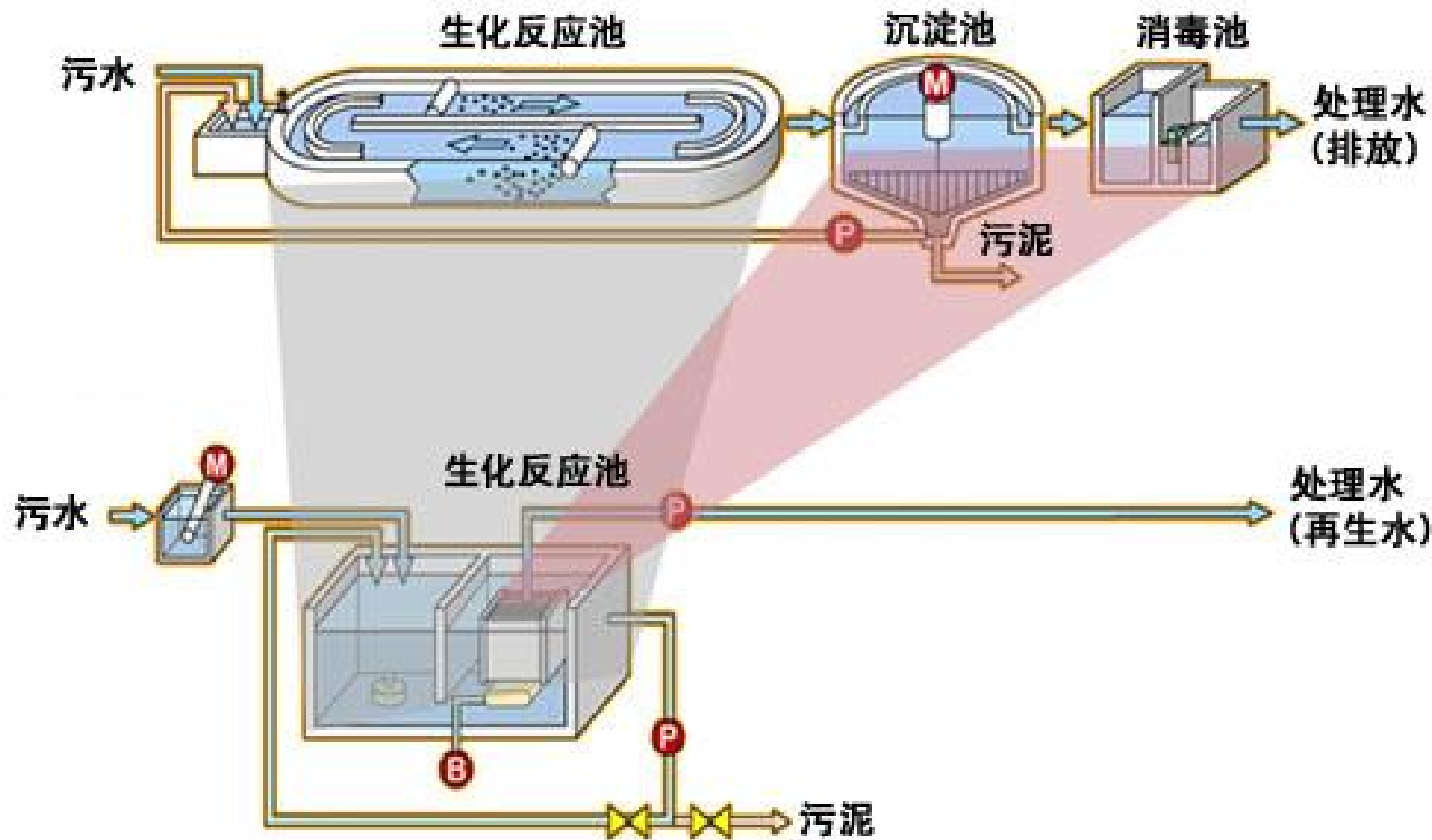
活性污泥法的基本工艺流程



图2 活性污泥法的基本流程



标准活性污泥处理系统



活性污泥法的主要运行方式：

按废水和回流污泥的进入方式及其在曝气池中的混合方式活性污泥法主要有两大运行方式：

◆ 推流式

◆ 完全混合式



活性污泥法的主要运行方式-推流式

- ◆ 推流式活性污泥曝气池有若干个狭长的流槽，废水从一端进入，另一端流出。随水流的过程，微生物增长，底物降解。
- ◆ 特点：在曝气池的任何断面上都存在有机基质的浓度梯度，因此存在基质降解动力。
- ◆ **BOD**降解菌为优势菌，可避免发生污泥膨胀现象、运行可采用多种方式，能够增加净化功能如脱氮、除磷等。





曝气池2

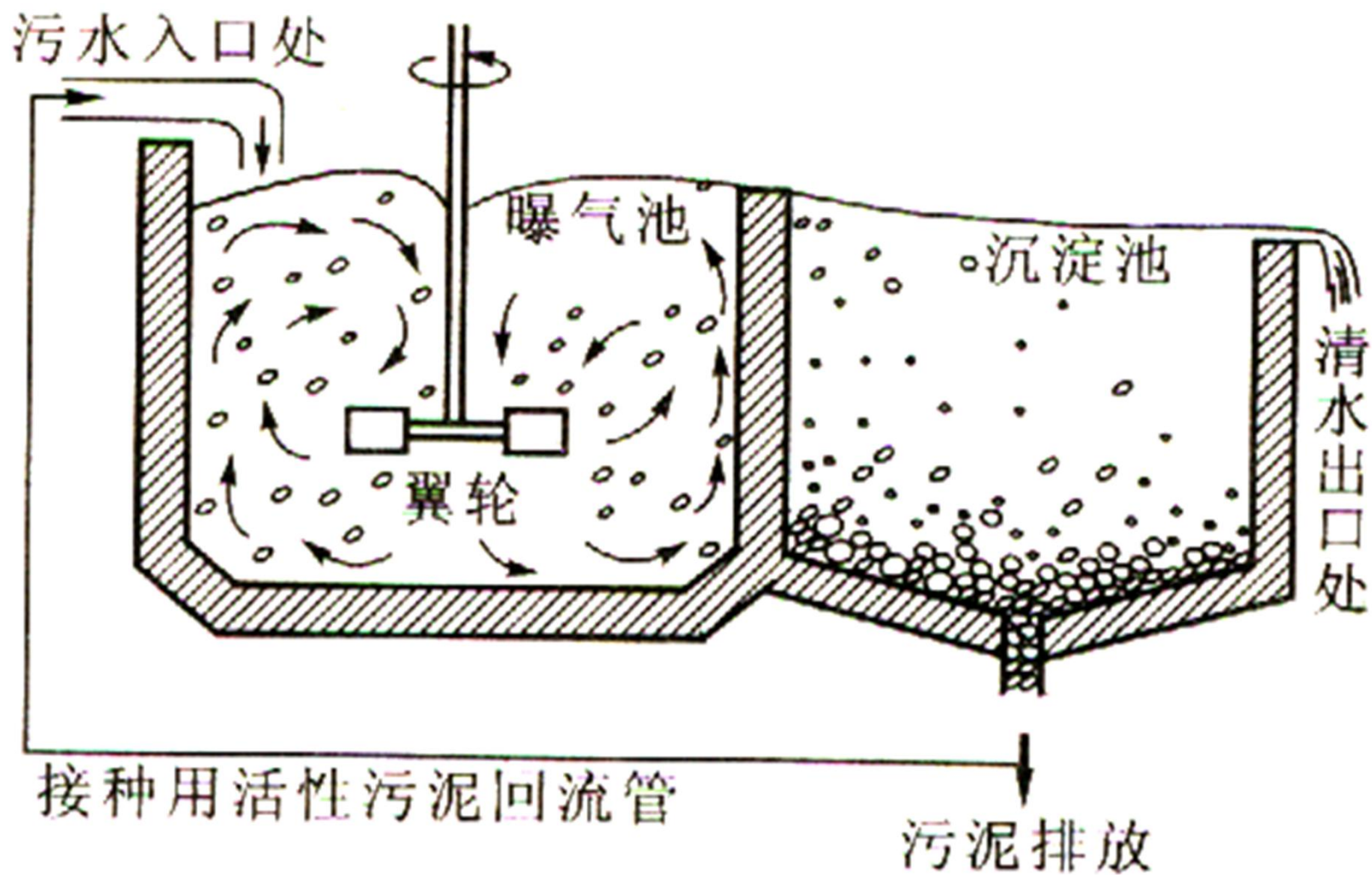
图3 推流式曝气池



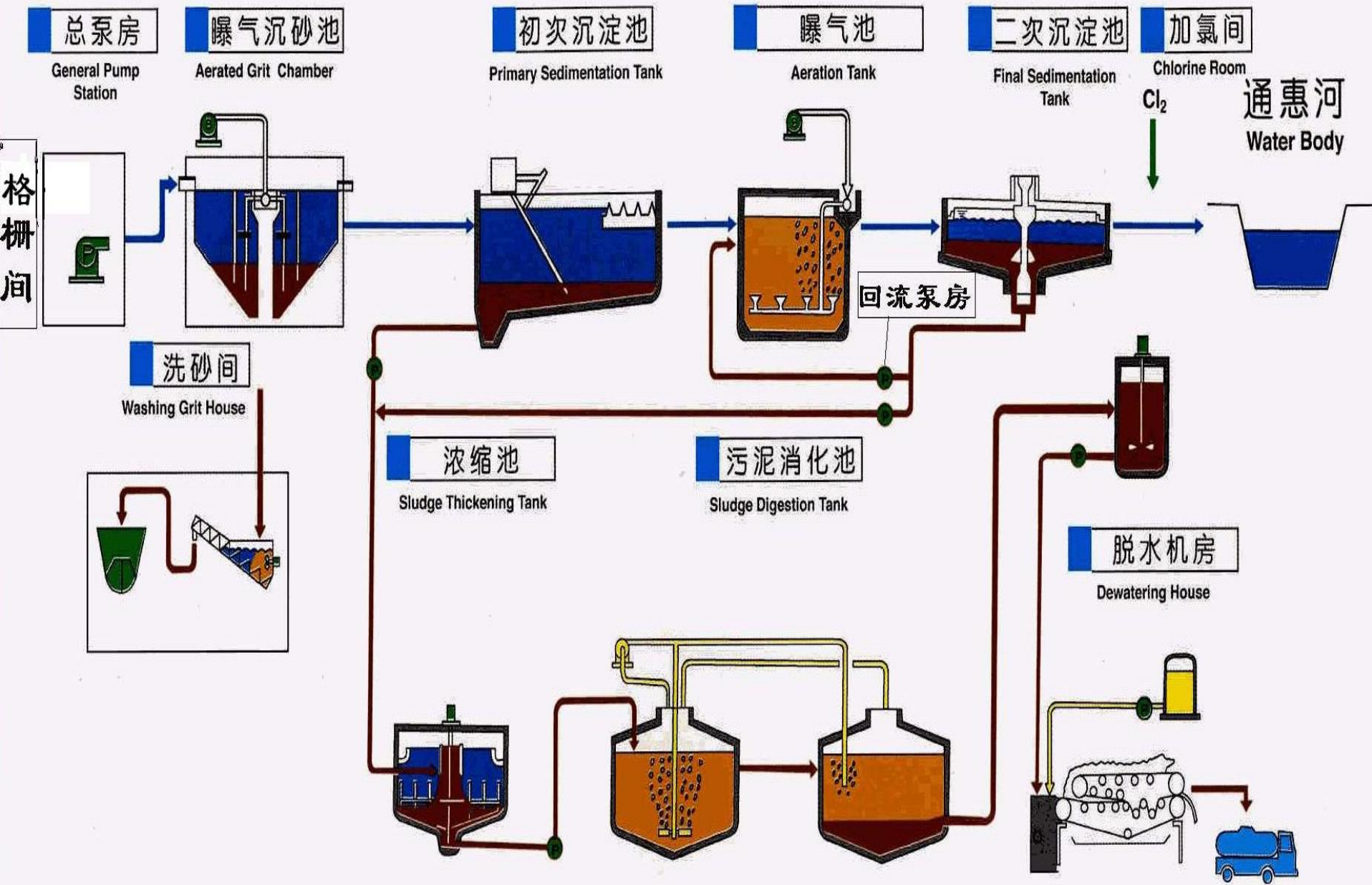
活性污泥法的主要运行方式-完全混合式

- ◆ 废水进入曝气池后在搅拌下立即与池内活性污泥混合液混合，从而使进水得到良好的稀释，污泥与废水得到充分混合，可以最大限度地承受废水水质变化的冲击。
- ◆ 特点：能够承受高浓度废水，对冲击负荷有一定的适应能力；需氧全池要求相同，能够节省动力；可使曝气池与沉淀池合建，无需单独设置污泥回流系统，易于运行管理。





完全混合曝气法处理污水的装置



工艺流程全图 (活性污泥法)



氧化沟 (局部)

图6 氧化沟





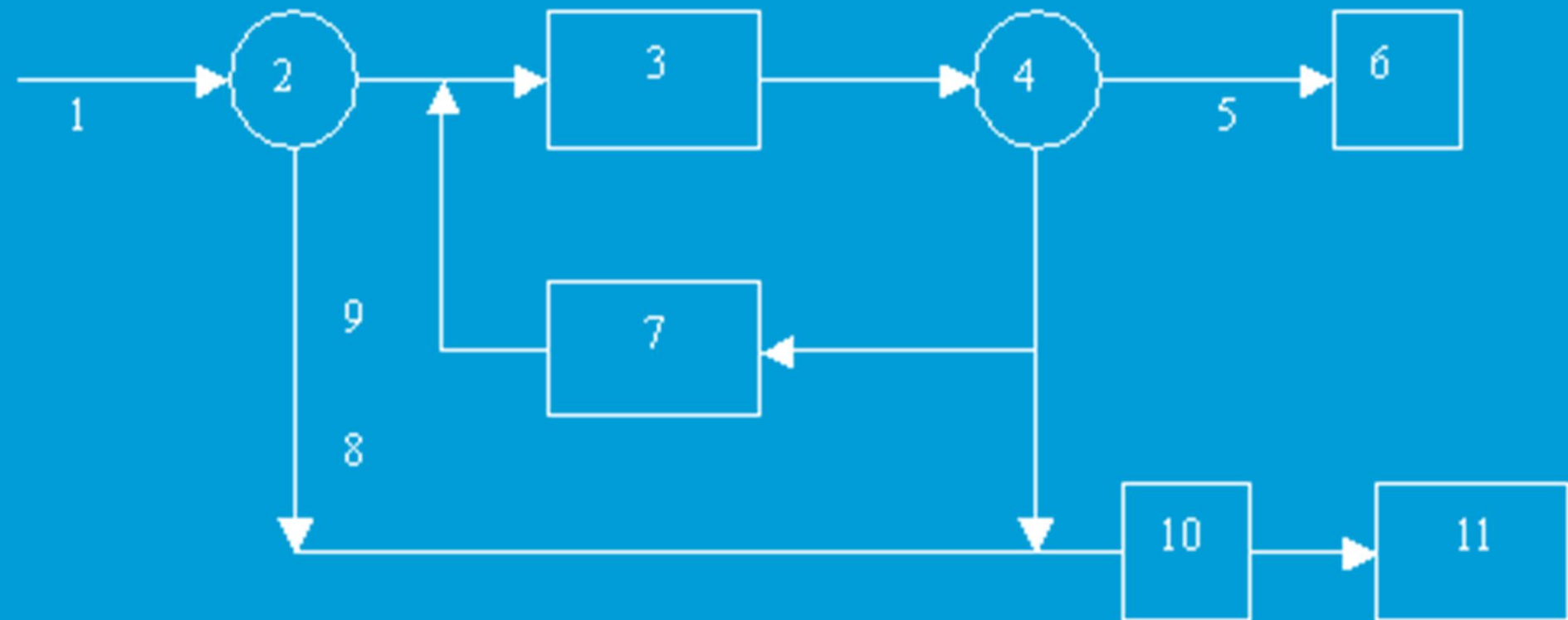
三沟道及曝气器布置



转碟曝气器工作状态 (细节)



正常运行状态下的混合液呈棕黄色



上图是活性污泥法流程示意图：1、原污水；2、初次沉淀池；3，曝气池；4、二次沉淀池；5、处理后污水；6、回流污泥；7、再生池；8、生污泥；9、剩余污泥；10、污泥浓缩池；11、脱水设备或污泥消化池等。



好氧池



沉淀池



二次沉淀池



污泥消化池

北京市高碑店污水处理厂使用的活性污泥法

1.2 生物膜法

- ◇ 生物膜法？
 - ◇ 利用微生物在固体表面的附着生长对废水进行生物处理的技术方法。
- ◇ 生物膜法的特征
 - ◇ 通过废水与生物膜的相对运动，使废水与生物膜接触，进行固液两相的物质交换，并在膜内进行有机物的生物氧化和降解，使废水得到净化，同时，生物膜内微生物不断得以生长和繁殖。

- ◆ 生物膜由污水与载体的接触而形成。由于污水通过载体时，污水中的有机污染物和微生物吸附到载体上，并发生微生物的增殖。经历一个初生、生长和成熟的过程，在载体表面形成一层约2毫米厚的生物膜。
- ◆ 生物膜在污水处理过程中不断增厚，最后老化整块剥落，随废水流入沉淀池中。然后又开始新生物膜的形成过程，这是生物膜的正常更新。



生物膜的净化原理

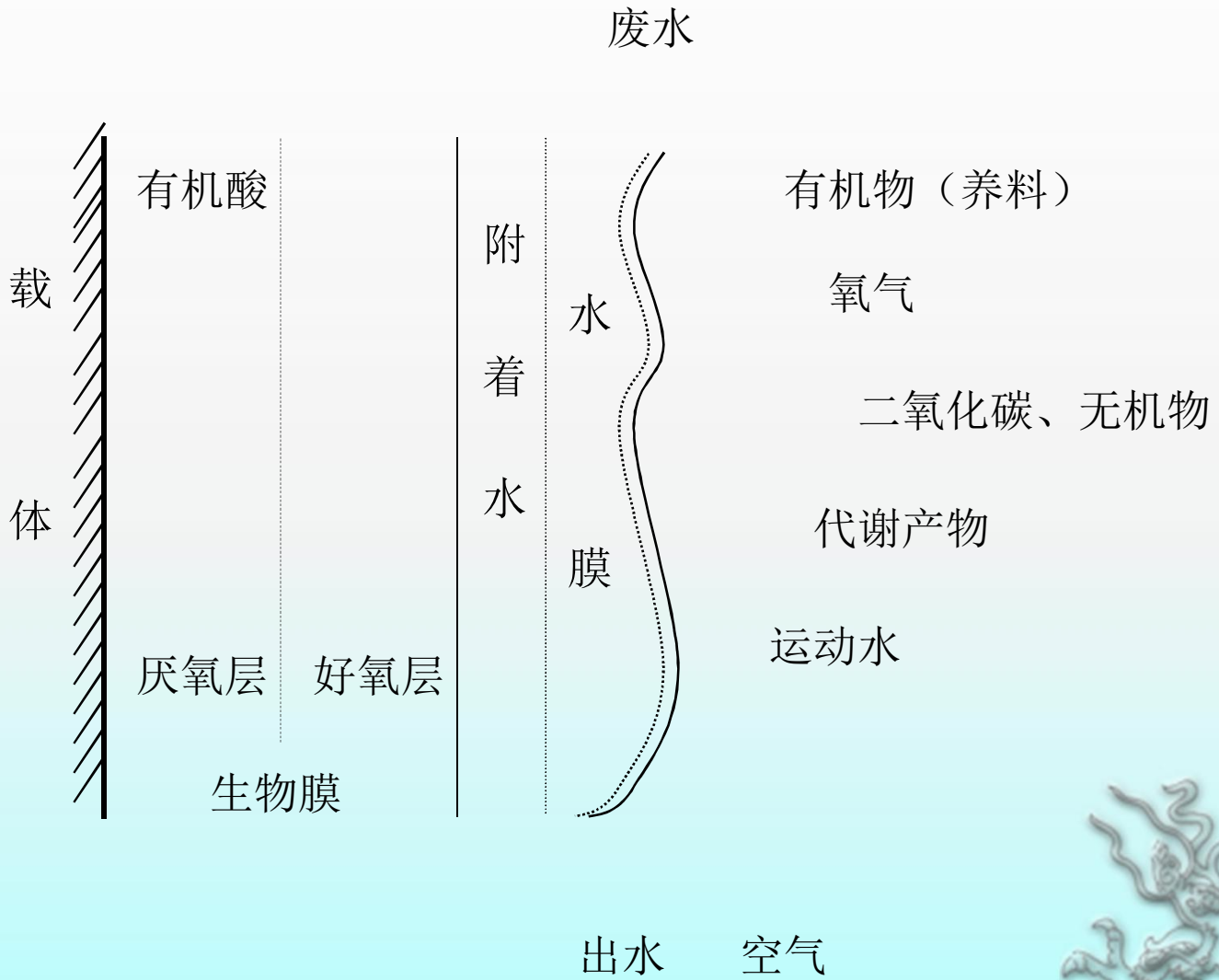
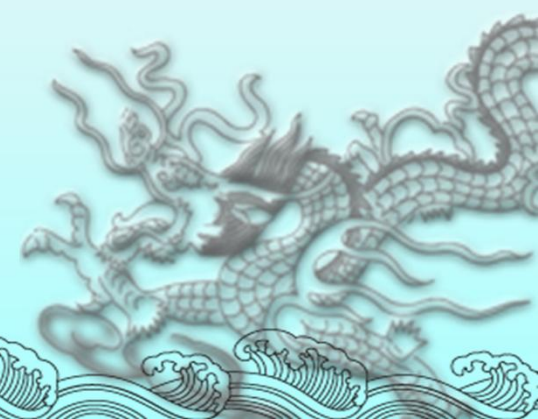


图8 生物膜去除有机物示意图



生物膜中的微生物组成

◇ 细菌和真菌

- ◇ 在生物膜的好气层专性好气的芽孢杆菌占优势；
- ◇ 在厌气层可见到反硫化弧菌属
- ◇ 数量最多的是兼性菌，如假单胞菌属等

◇ 原生动物

- ◇ 纤毛虫居多。

◇ 微型后生动物

- ◇ 如轮虫类、线虫类、昆虫类等，个体数较多。



生物膜法的特点（与活性污泥法相比较）

- ◆ 微生物多样性高
- ◆ 生物膜各段的微生物类群不同
- ◆ 生物膜中的食物链较长
- ◆ 具有较高的脱氮能力
- ◆ 单位处理能力大
- ◆ 系统维护方便
- ◆ 操作运行方便

固定床生物处理的主要类型

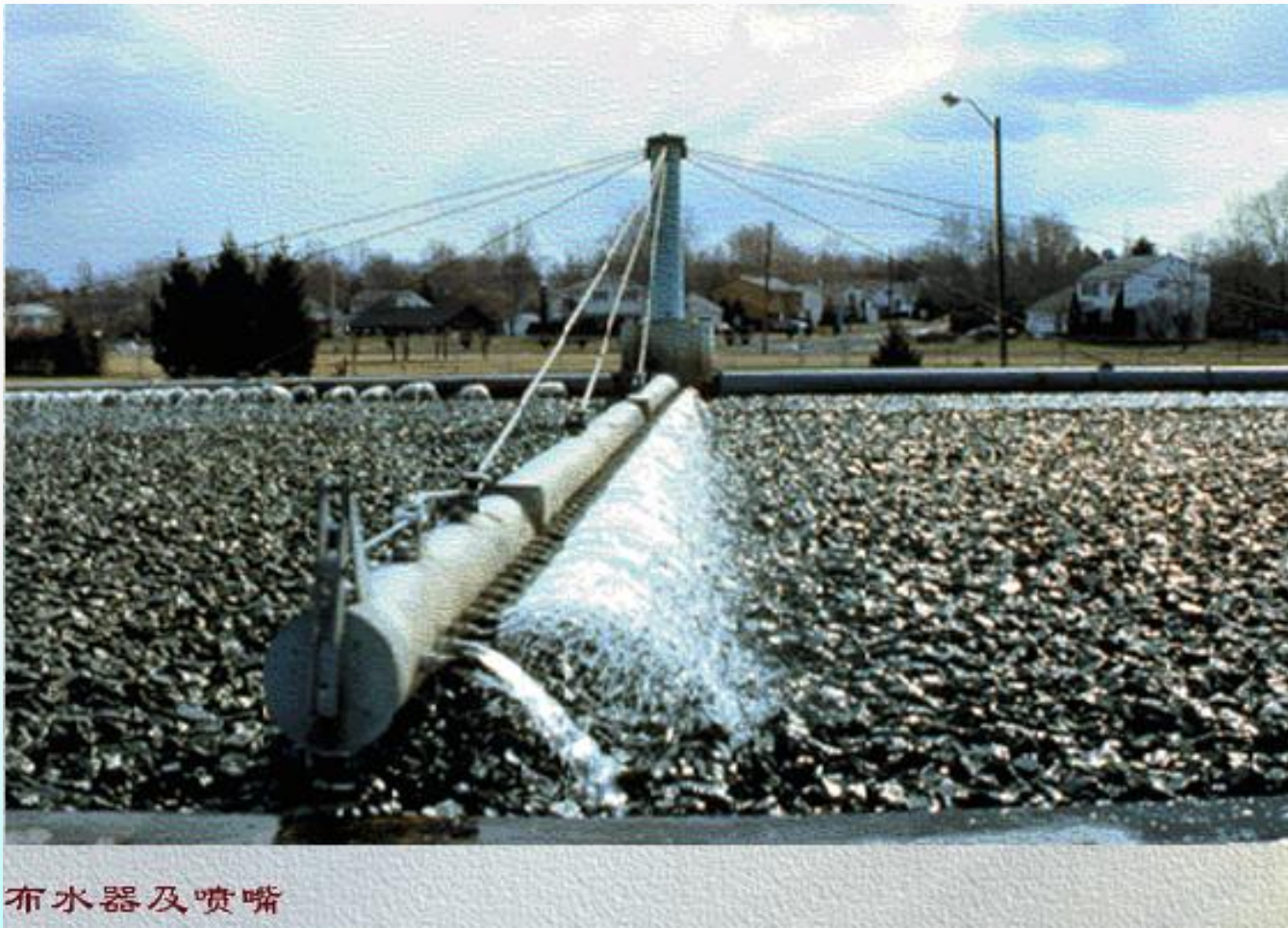
- ◆ 普通生物滤池
- ◆ 塔式生物滤池
- ◆ 生物转盘滤池



图 13.5 生物膜法的基本流程

生物滤池和填料

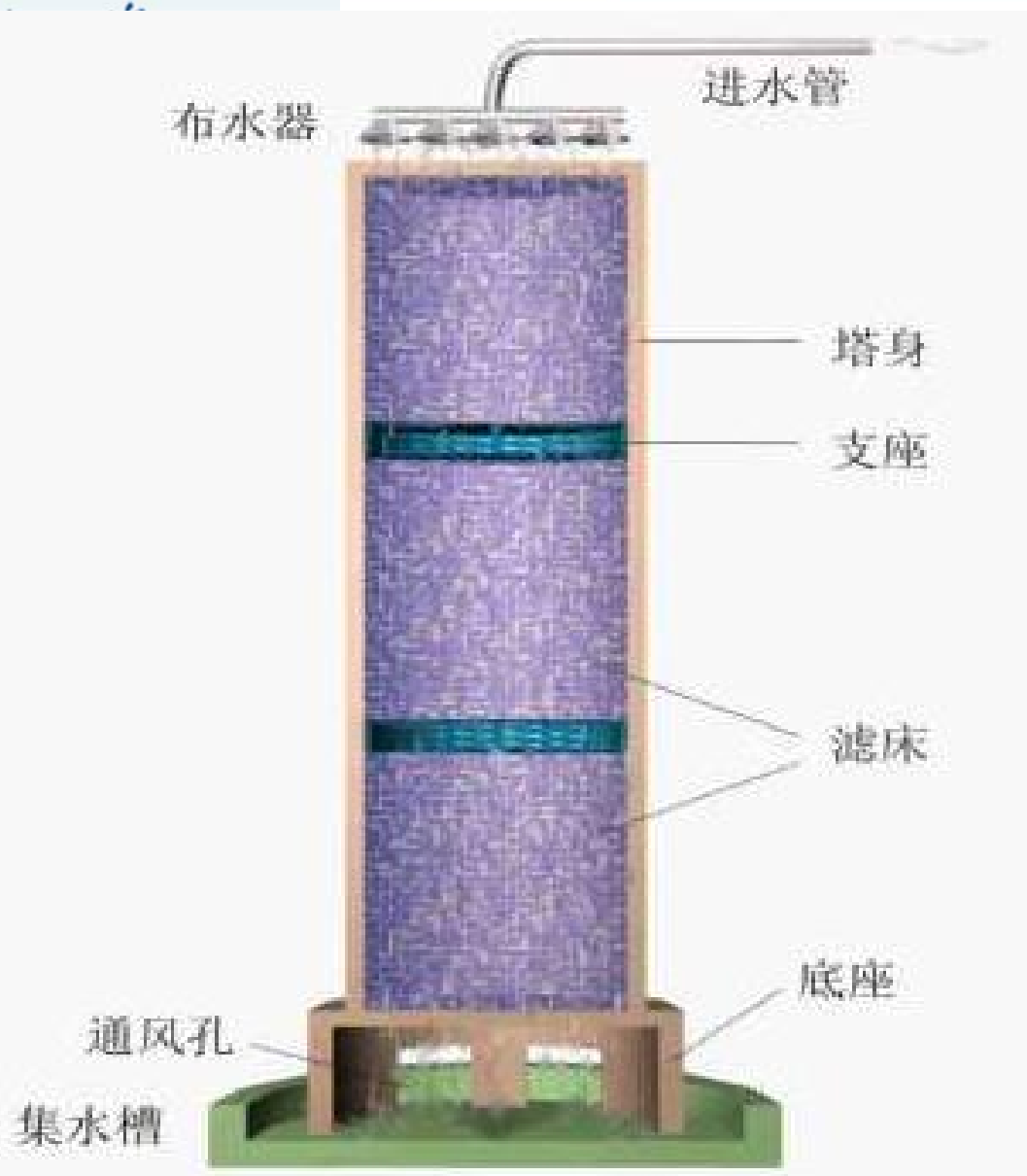




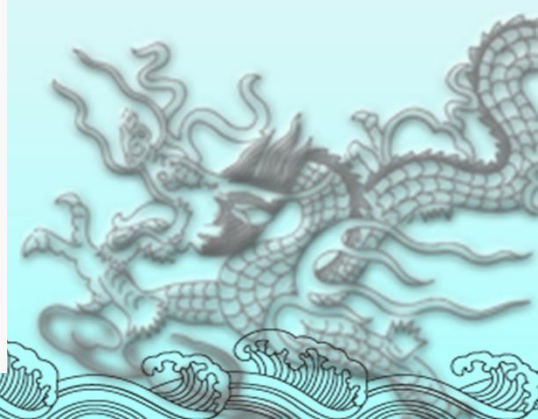
布水器及喷嘴

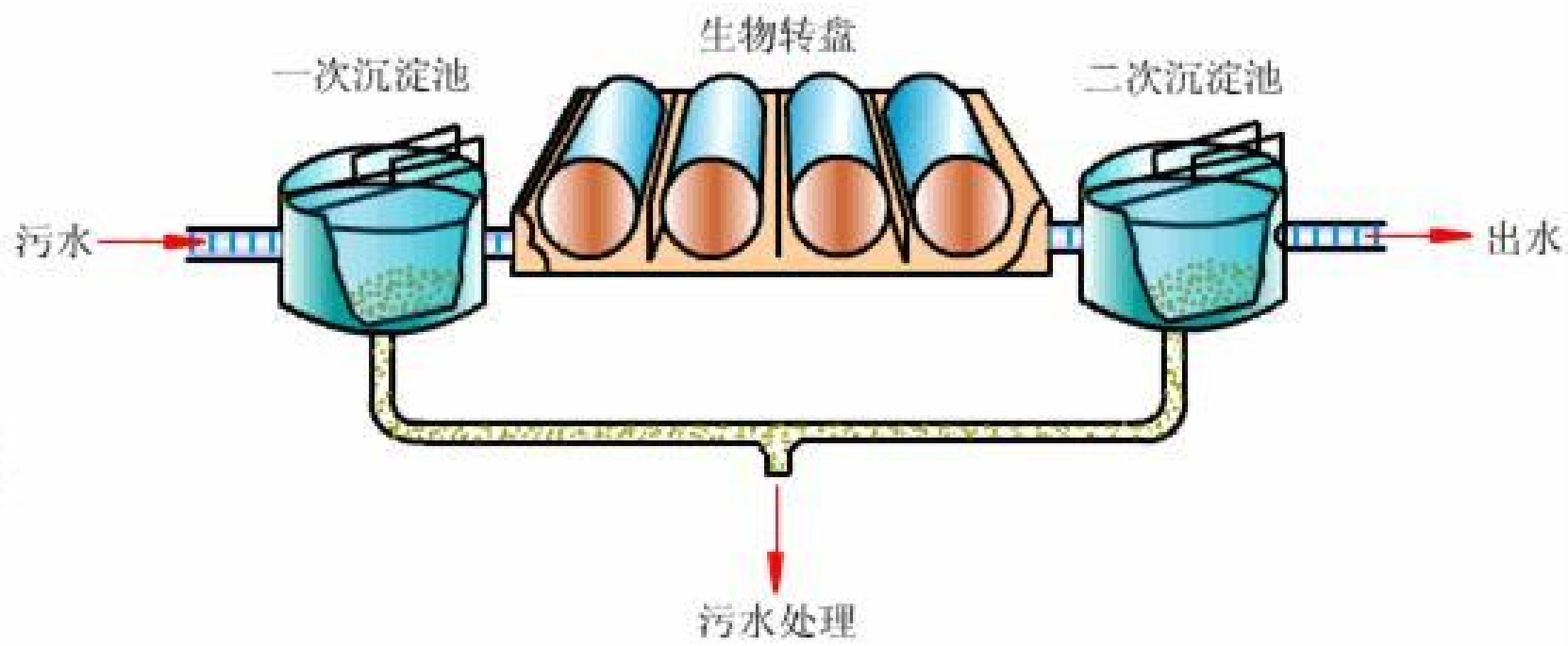
图10 普通生物滤池





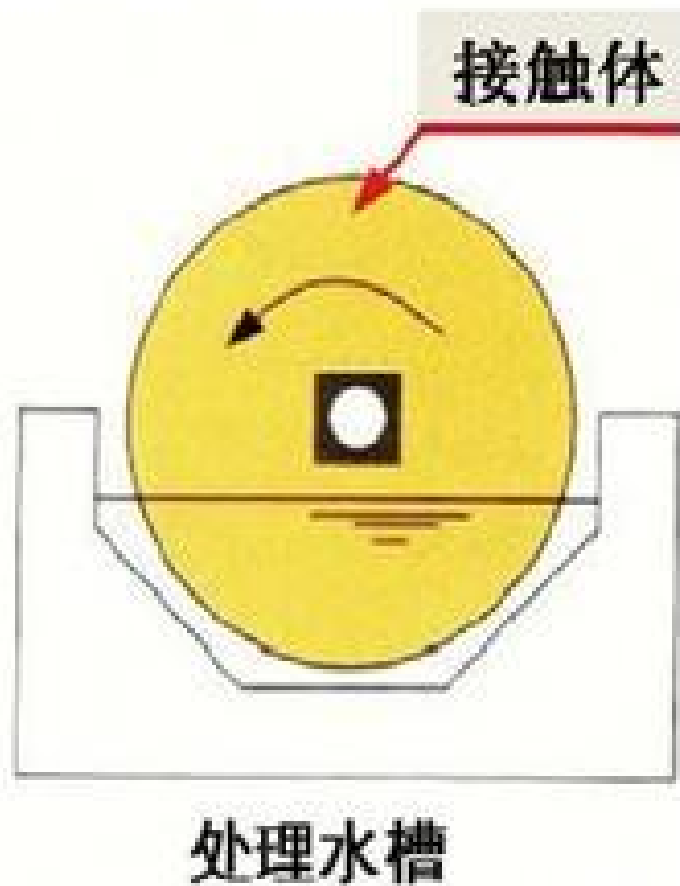
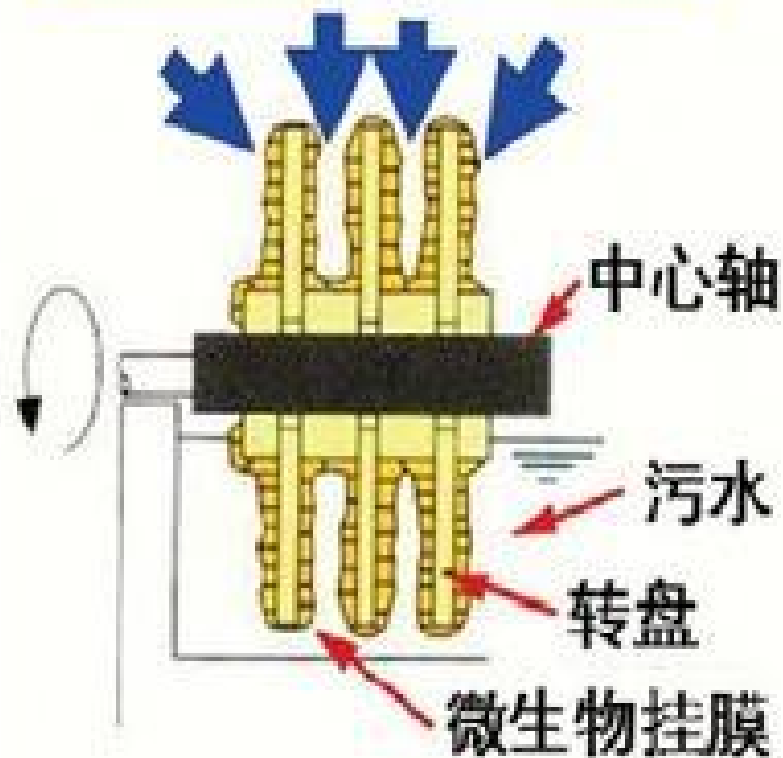
塔式生物滤池





生物转盘工艺流程

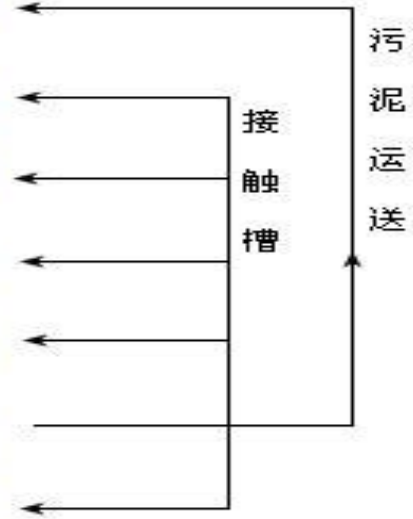
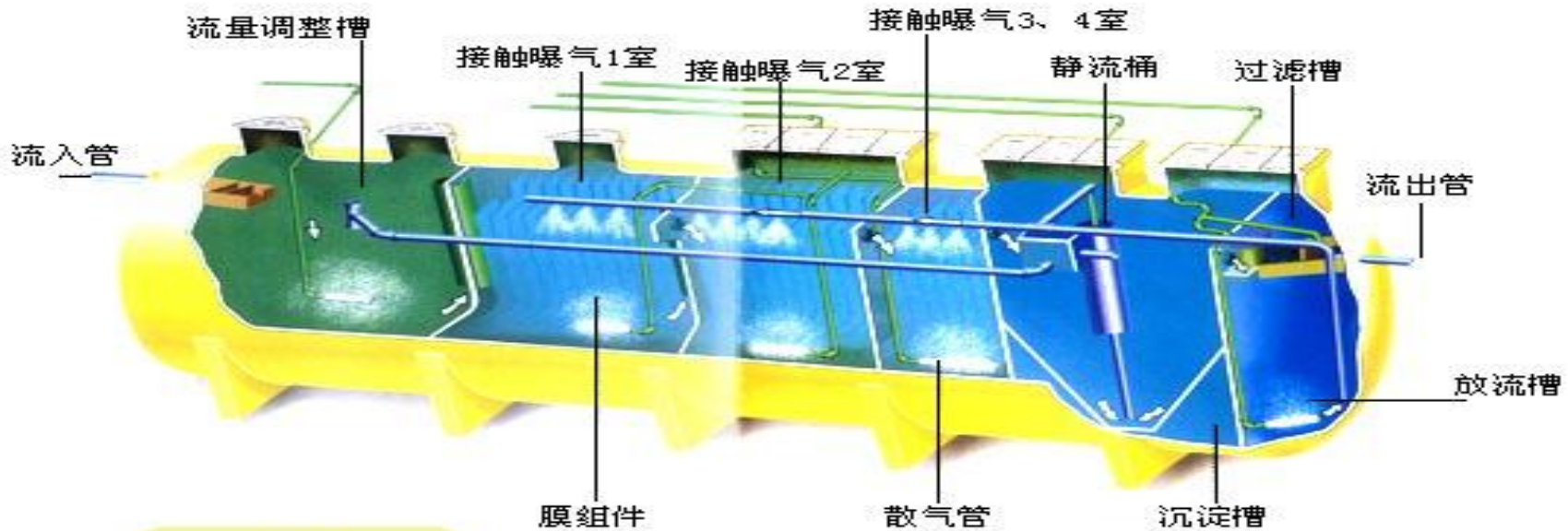
从大气中吸收氧气



◎原理



生物转盘法

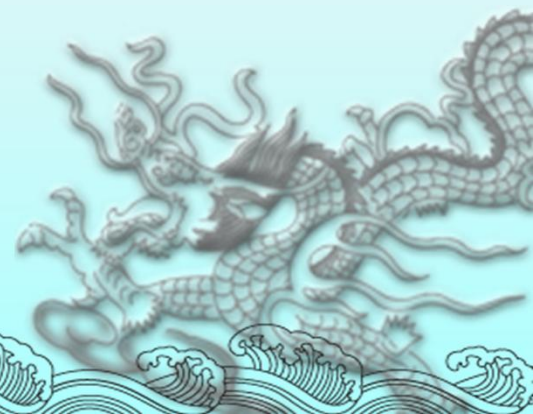


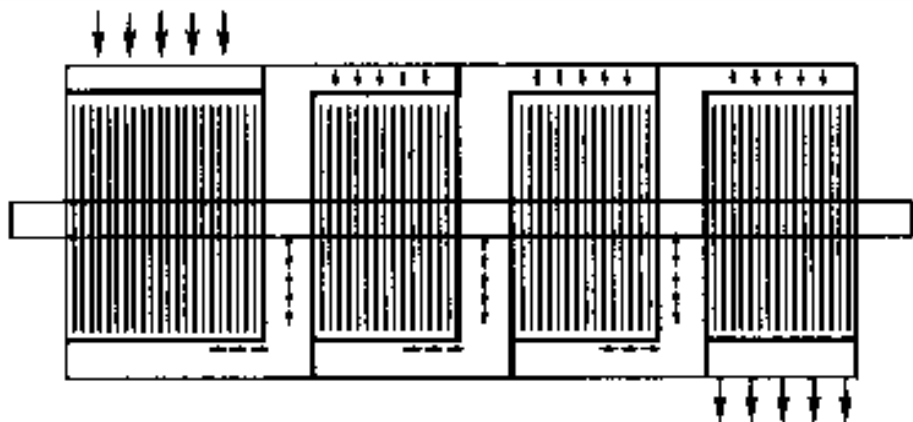
- 产品特点：
- 可发挥稳定的处理性能
 - 清理容易，垃圾产量小
 - 脱离的微生物少，可保证处理后
 - 的水清澈透明
 - 施工方便
 - 维持和管理费用少



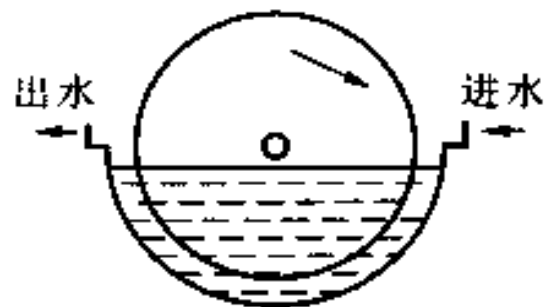
生物转盘

生物转盘

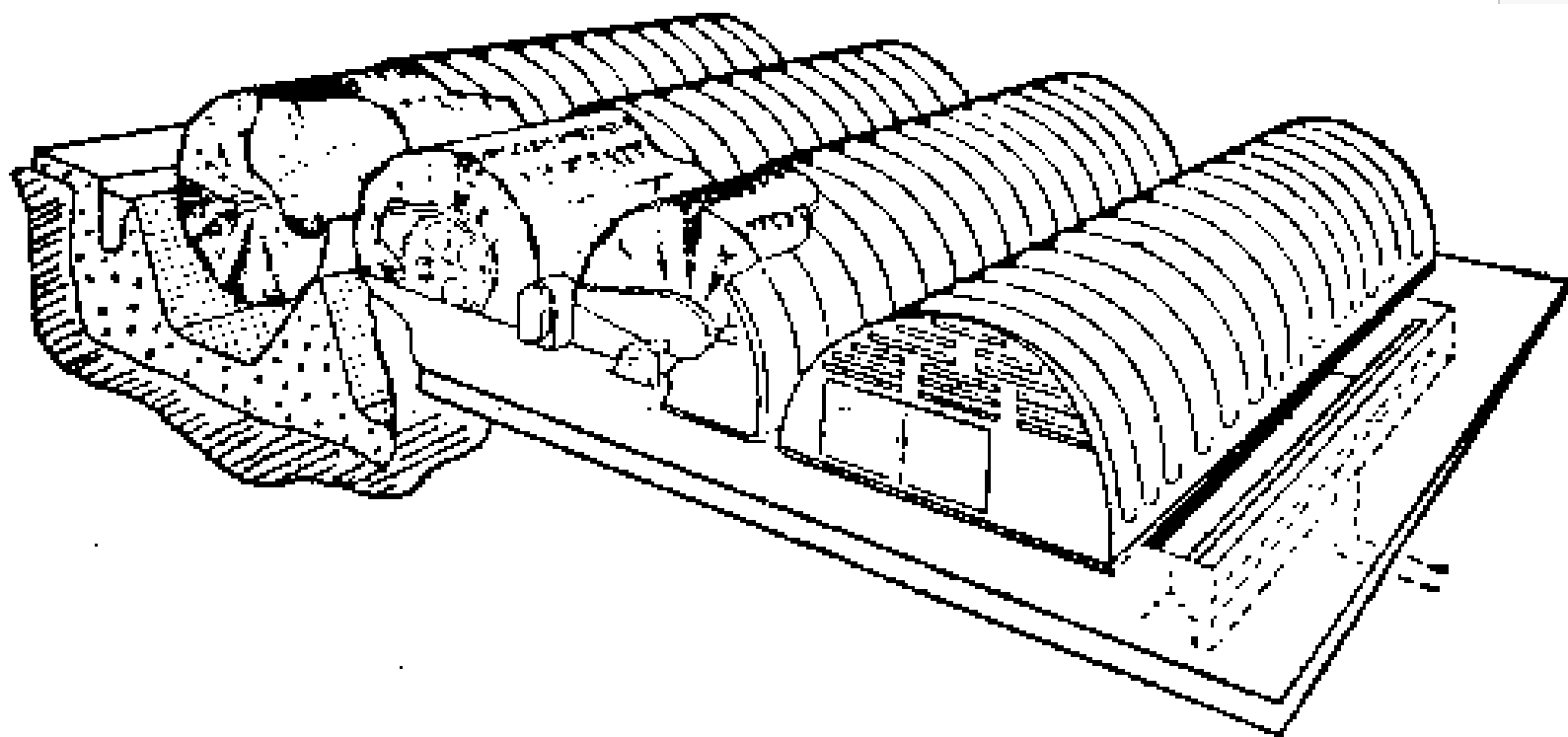




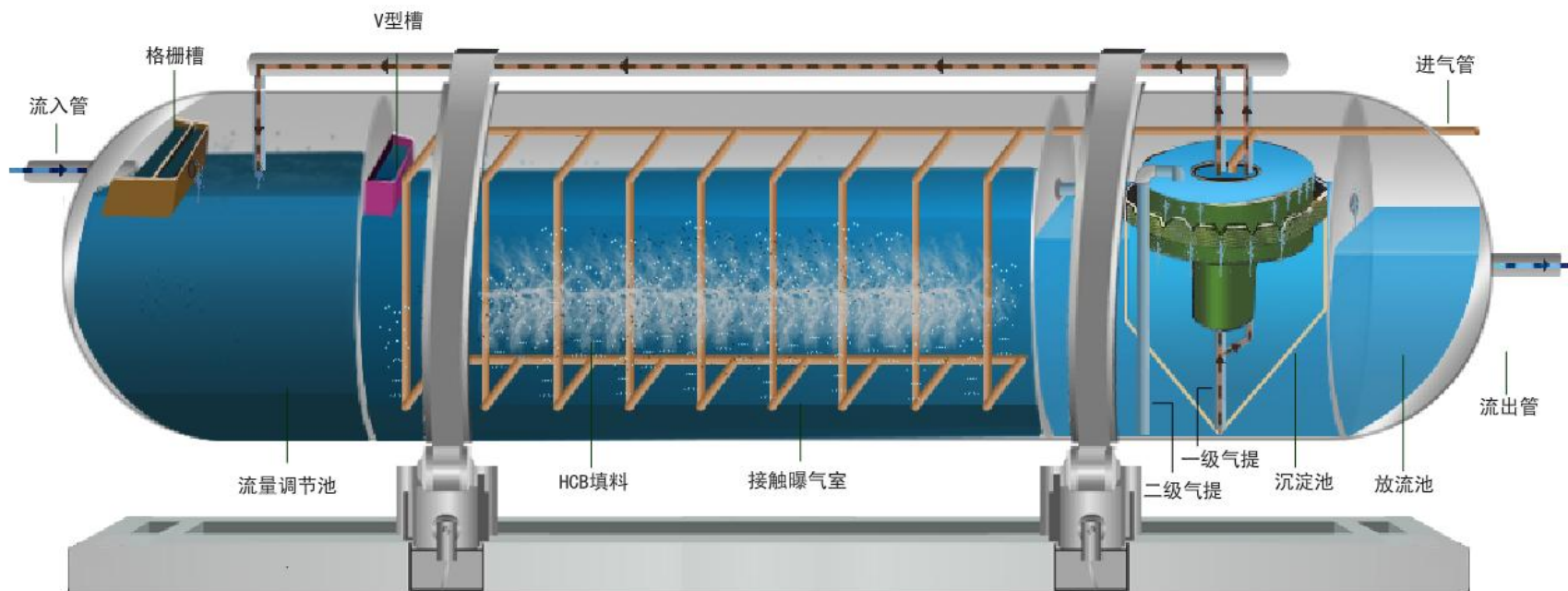
顶面观

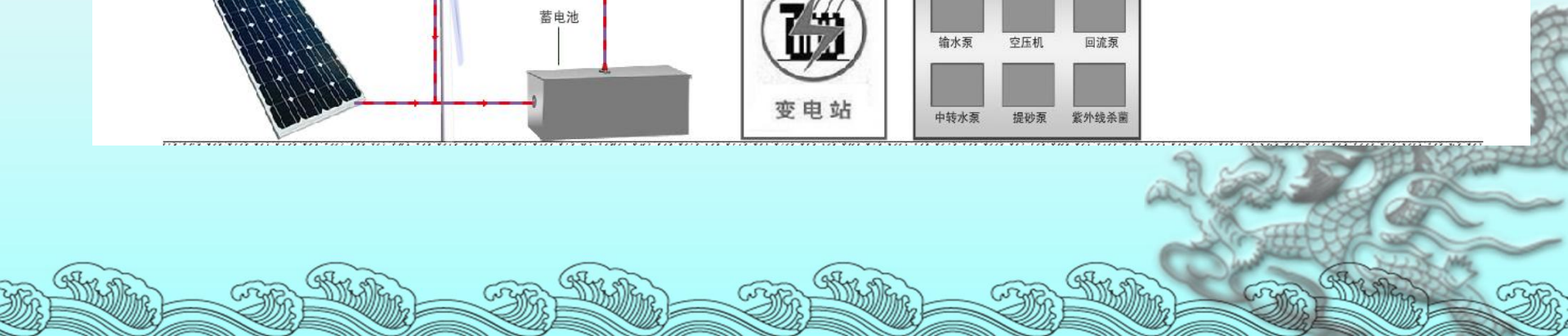
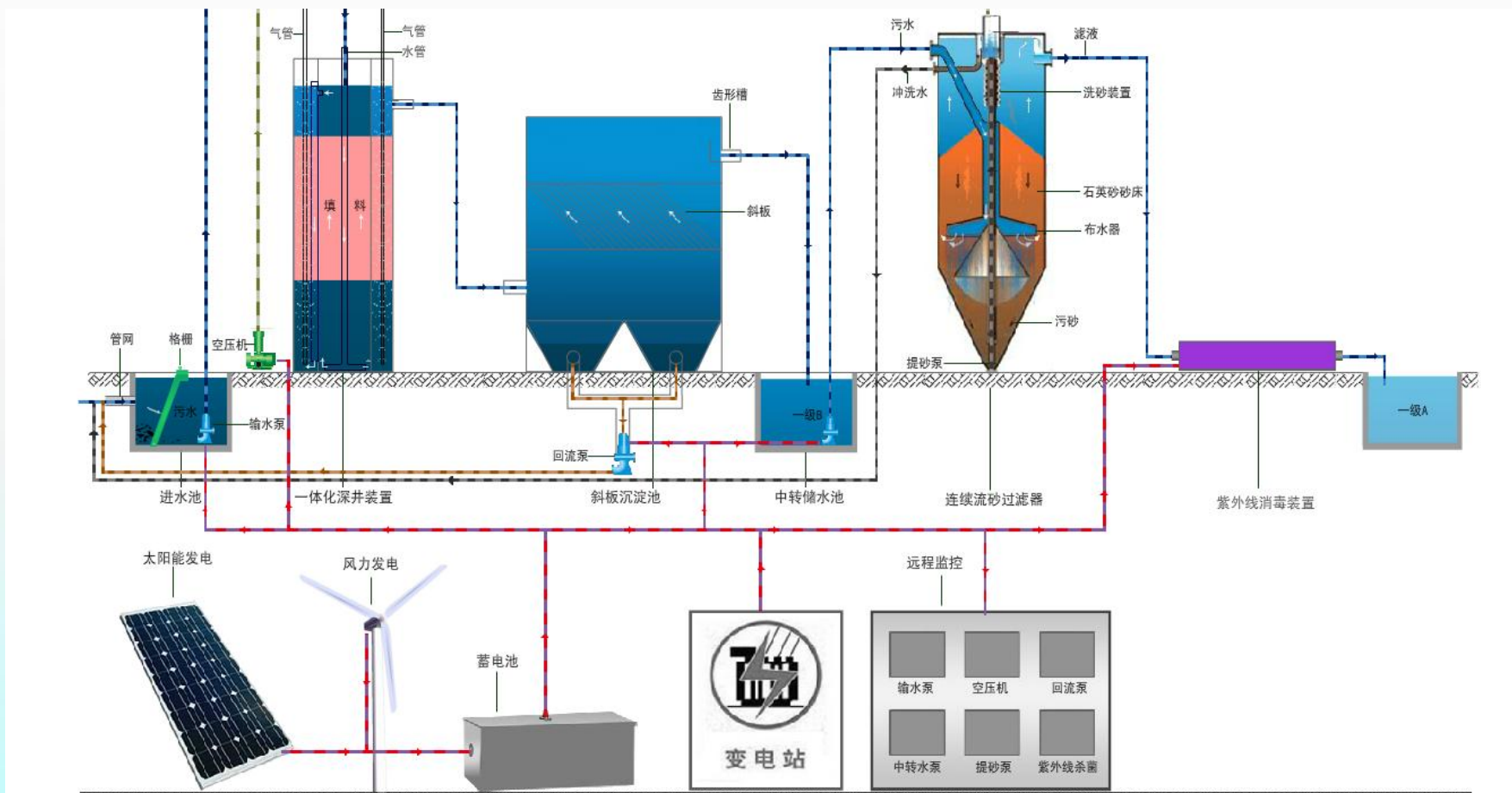


剖部面



生物转盘法的基本装置





2. 废水的厌氧生物处理

2.1 厌氧生物处理的原理与过程

◆ 厌氧生物处理?

- ◆ 在厌氧条件下，利用厌氧微生物分解废水中的有机物并产生甲烷、二氧化碳的过程，又称厌氧发酵。
- ◆ 与好氧生物处理的区别：不以分子氧为受氢体（最终电子受体），以无机物、化合态盐、碳、硫、氮为受氢体，如CO、CO₂、SO₄²⁻、NO₃⁻等。

◆ 厌氧生物处理的优缺点

- ◆ 优点：耐有机负荷高；可生成甲烷；剩余污泥量少；无需充氧，能耗低；
- ◆ 缺点：污泥量增长慢，工艺过程启动时间长；对负荷变化、毒物敏感；故厌氧处理一般只用于预处理，要使废水达标排放，还需要进一步处理

厌氧生物处理的过程（三个阶段）

◆ 水解阶段：复杂有机物 ← 水解和发酵性细菌



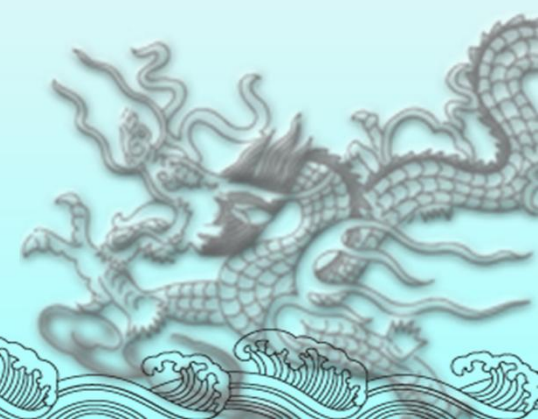
◆ 酸化阶段：简单有机物（可溶态） ← 产氢、产乙酸细菌



◆ 甲烷化阶段：简单有机酸类、醇类 ← 产甲烷菌



CH_4 、 CO_2



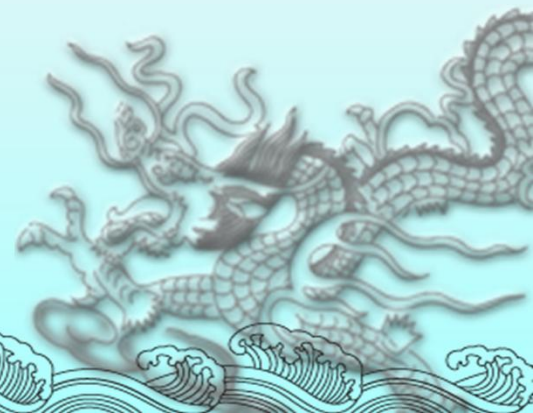
厌氧反应器内的微生物

◆ 不产甲烷菌

- ◆ 细菌（以厌氧菌、兼性菌为主）、真菌，参与产甲烷阶段以前所有分解有机物过程，并产生小分子有机酸

◆ 产甲烷菌

- ◆ 其形态有八叠球状、杆状、球状、螺旋状
- ◆ 其特点：严格厌氧，代谢活动所需最佳pH值为6.7~7.2，只能利用少数的几种简单化合物



厌氧生物处理的影响因素

◆ 温度

◆ 中温发酵 $35^{\circ}\text{C} \sim 38^{\circ}\text{C}$ ，高温发酵 $52^{\circ}\text{C} \sim 55^{\circ}\text{C}$

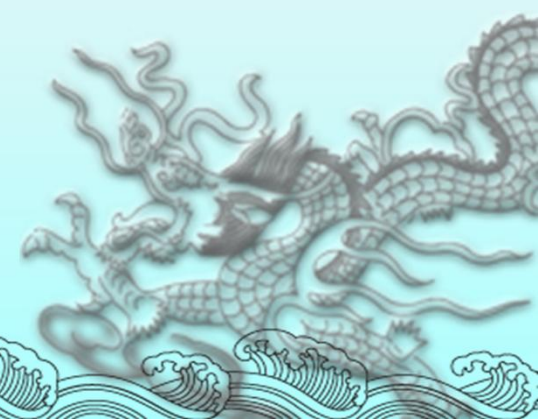
◆ pH值

◆ 中性环境，甲烷化阶段 $7.0 \sim 7.5$

◆ 营养成分

◆ $\text{BOD}_5 : \text{N} : \text{P}$

◆ 有机负荷



厌氧生物滤池工艺(Anaerobi filter)

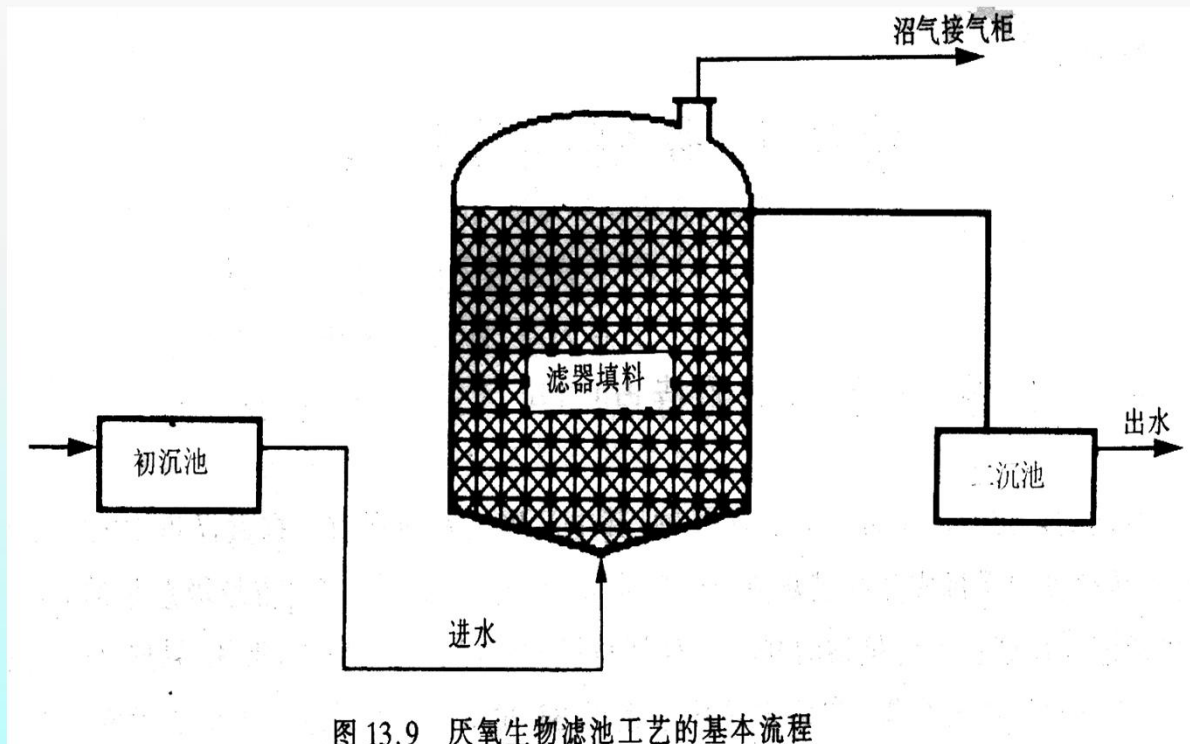
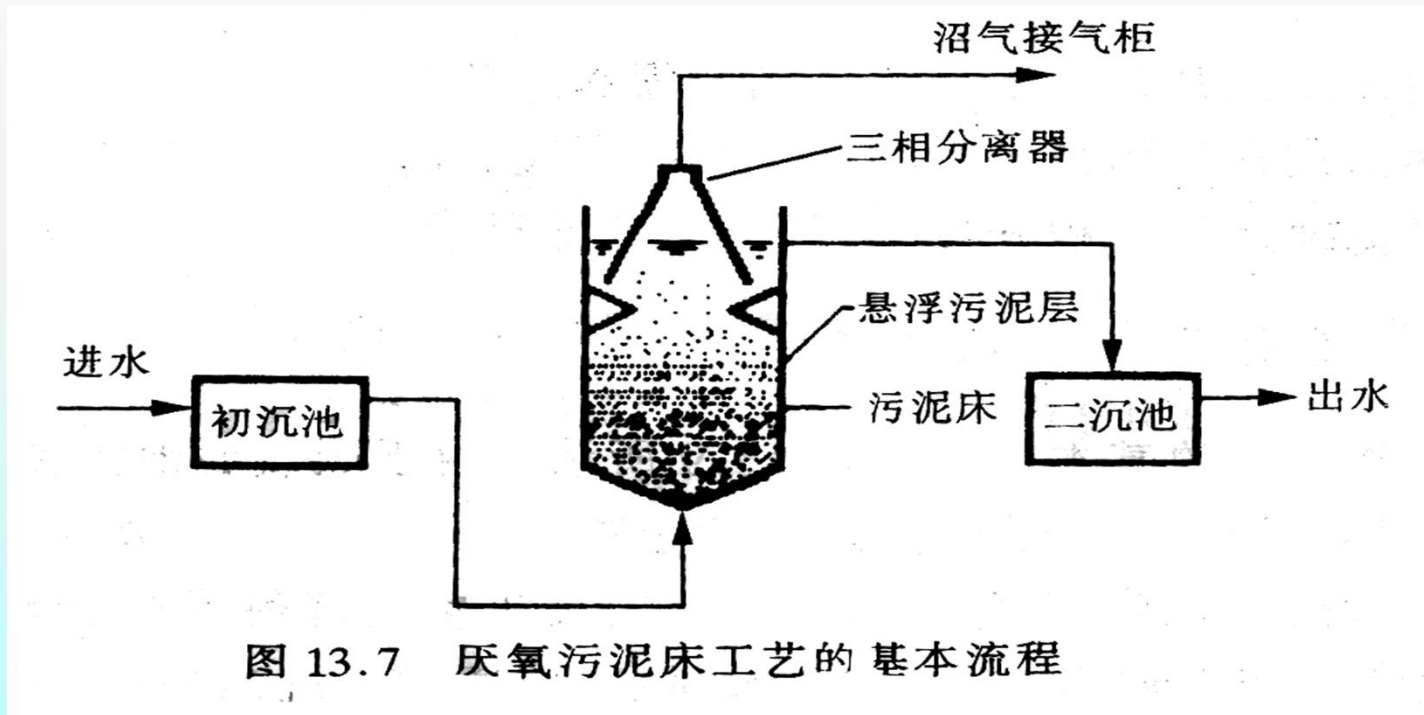


图 13.9 厌氧生物滤池工艺的基本流程

上流式厌氧污泥床工艺的基本流程

Up-flow Anaerobic Sludge bed ,UASB





上流式厌氧池三相分离器

图11 上流式厌氧池



上流式厌氧池



3. 废水的微生物脱氮除磷

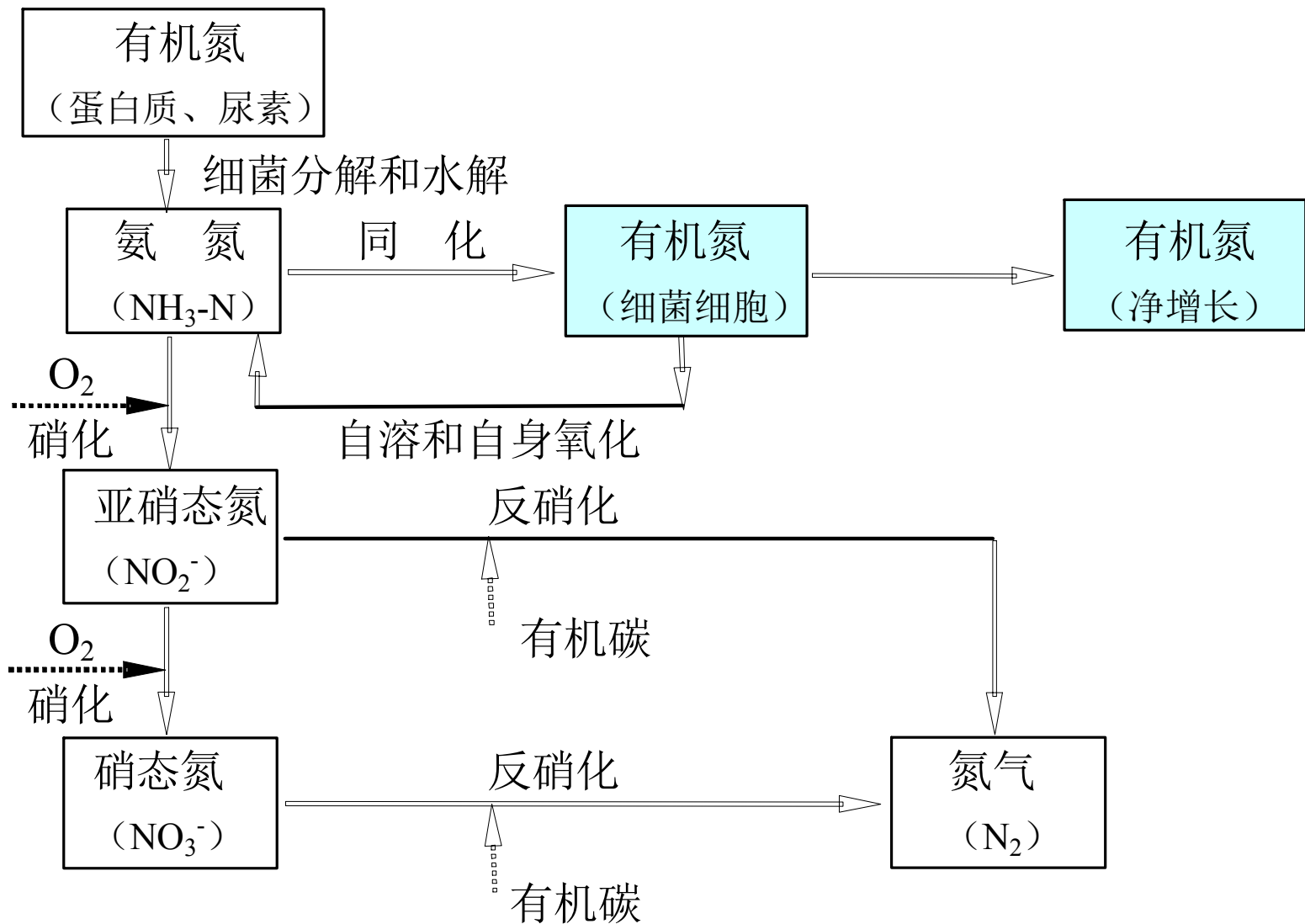
3.1 微生物脱氮

3.1.1 微生物脱氮基本原理

- ◆ 生物脱氮主要通过硝化作用和反硝化作用来完成。
- ◆ 首先利用好氧段，由亚硝化细菌、硝化细菌的硝化作用，将 NH_3 转化为 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ ，再利用缺氧段，由反硝化细菌将 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 反硝化还原为 N_2 ，溢出水面释放到大气。

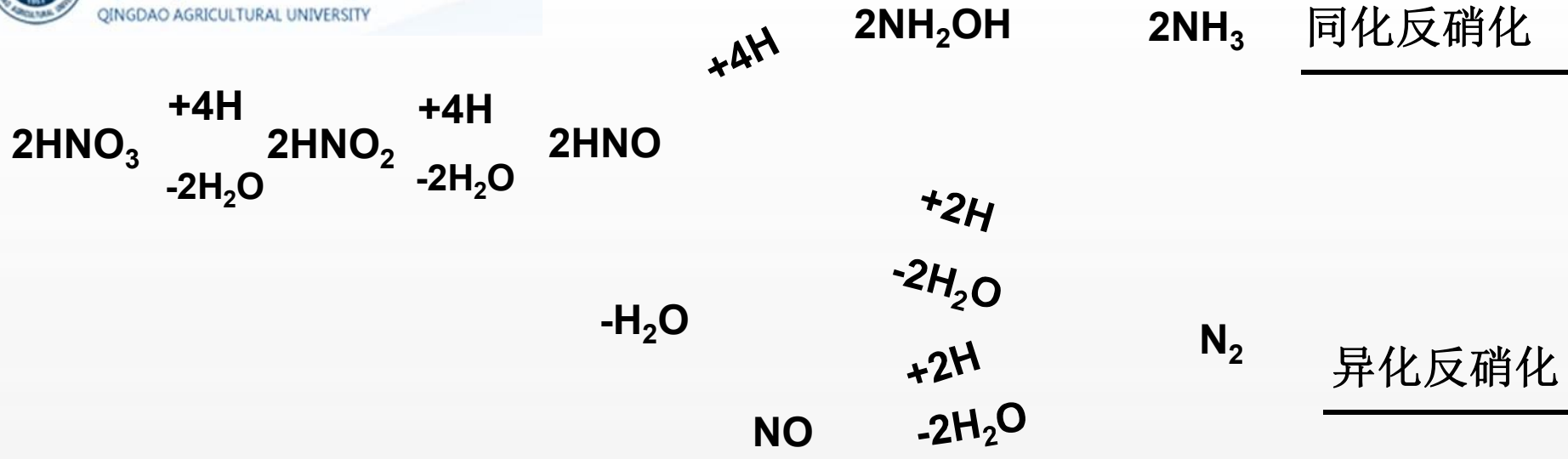
亚硝化细菌和硝化细菌，两者为化能自养菌，专性好氧，要求中性、弱碱性环境，以 CO_2 为唯一碳源，最适温度 $25\text{ }^\circ\text{C} \sim 30\text{ }^\circ\text{C}$ ，pH值范围 $7.5 \sim 8.0$ 。

生物法脱氮原理

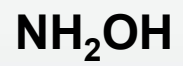
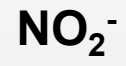
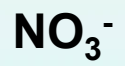


硝化过程的影响因素

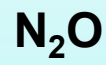
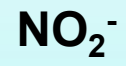
- (a) 好氧环境：硝化菌氧化 NH_3 和 NO_2^- 获得能量，溶解氧含量的高低，影响硝化反应进程，硝化反应**DO不低于2mg/L**。
- (b) 碱度：硝化反应使pH下降，硝化菌对pH十分敏感，为保持适宜的pH，污水中应有足够碱度以调节pH的变化，**1g氨氮完全硝化需碱度（ CaCO_3 计）7.14g**。硝化菌适宜的pH为8.0~8.4。
- (c) 混合液有机物含量不应过高：**硝化菌是自养菌**，若BOD过高，将使异养型细菌迅速增殖，使硝化菌不能成为优势种属。**BOD最好低于15-20mg/l**。C/N高，微生物对氨氮的降解以同化代谢为主；当 $\text{BOD}_5/\text{N} > 3$ 时开始进行硝化反应。
- (d) 硝化**适宜温度**是20~30℃，15℃以下硝化速度下降，5℃时停止。
- (e) 污泥龄至少大于硝化菌世代时间（3.3d）。**污泥龄 $\theta_c \geq (10-15) \text{ d}$** 。 θ_c 与温度相关，温度低 θ_c 高。
- (f) 水力停留时间（HRT）：3.5~6h



反硝化过程简化式

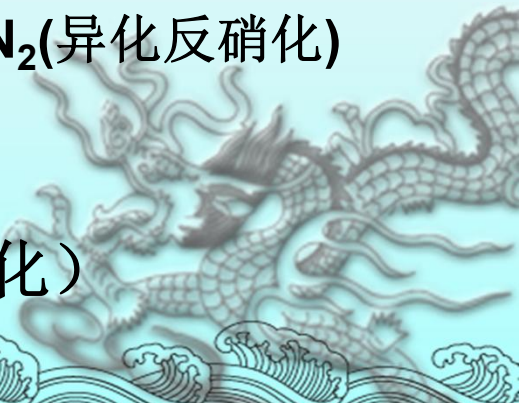


有机体(同化反硝化)



N_2 (异化反硝化)

反硝化反应过程（同化反硝化、异化反硝化）



反硝化过程的影响因素

(a) 碳源：能为反硝化菌所利用的碳源较多，从污水生物脱氮考虑，可有下列三类：一是原污水中所含碳源，污水 $BOD_5/TKN > 3 \sim 5$ 时，即可认为碳源充足；二是外加碳源；三是利用微生物组织进行内源反硝化。

(b) pH：对反硝化反应，最适宜的pH是6.5~7.5。pH高于8或低于6，反硝化速率将大为下降。

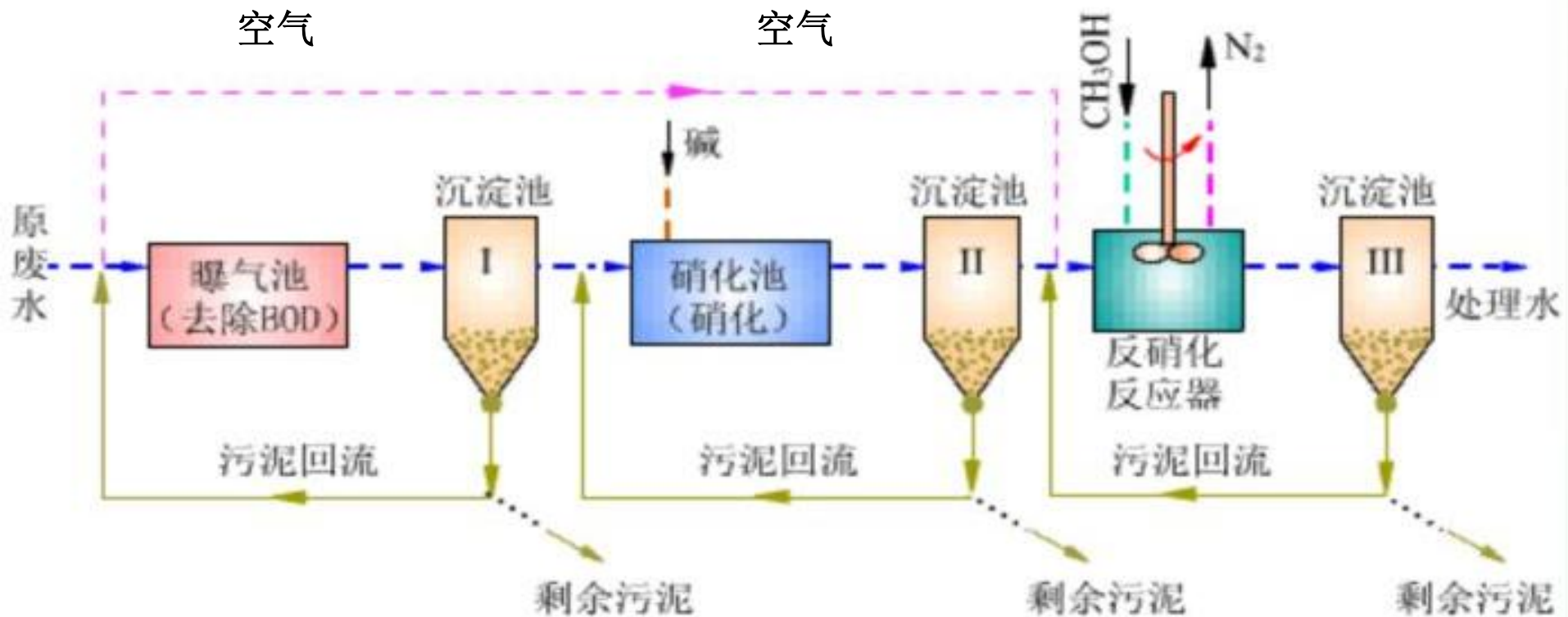
(c) DO：反硝化菌在无分子氧同时存在硝酸根和亚硝酸根时，利用酸根中的氧进行呼吸。另一方面，反硝化菌的某些酶只有在有氧条件下才能合成。反硝化细菌宜在缺氧、好氧交替的条件下生存。缺氧池DO应控制在0.5 mg/L以下。

(d) 温度：反硝化反应的最适宜温度是20~38℃，低于15℃反硝化反应速率最低。在冬季，可采用如下措施：提高生物固体平均停留时间；降低负荷率；提高污水的水力停留时间。

(e) HRT：由于反硝化速度快，5-10min基本完成，30min能达到85-90%左右。故缺氧段或反硝化段HRT = 1 - 1.5h。

3.1.2、生物脱氮工艺

(1) 三段生物脱氮工艺



传统活性污泥法脱氮工艺
(三级活性污泥流程)

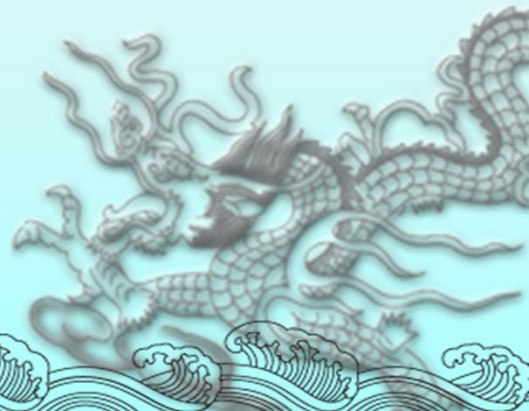
1) 流程说明

有机物氧化、硝化及反硝化独立，都有自己的沉淀池和污泥回流系统

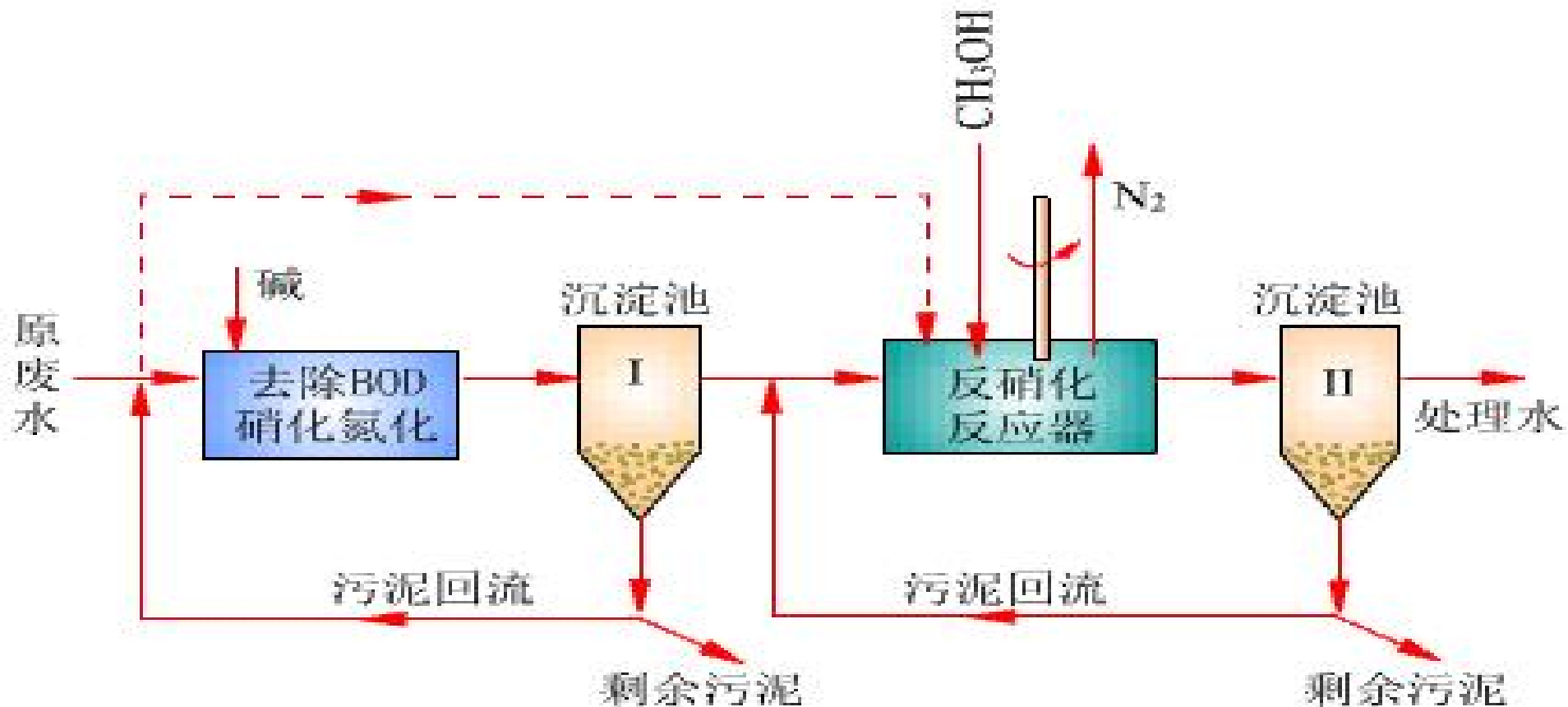
- “一级”曝气池：去除 COD、BOD， $BOD < 15-20\text{mg/l}$
有机氮转化为 NH_3 、 NH_4^+ ；
- “二级”硝化曝气池， NH_3 、 NH_4^+ 生成 NO_3^- —N，碱度下降；
- “三级”反硝化池—— NO_3^- —N转化为氮气。

2) 优缺点

- 去除效果好
- 各类菌类环境条件好
- 设备多，造价高，能耗大



(2) 二段生物脫氮工藝（後置反硝化）



兩級生物脫氮工藝

(3) 缺氧—好氧生物脱氮工艺 (A₁O工艺, 前置反硝化)

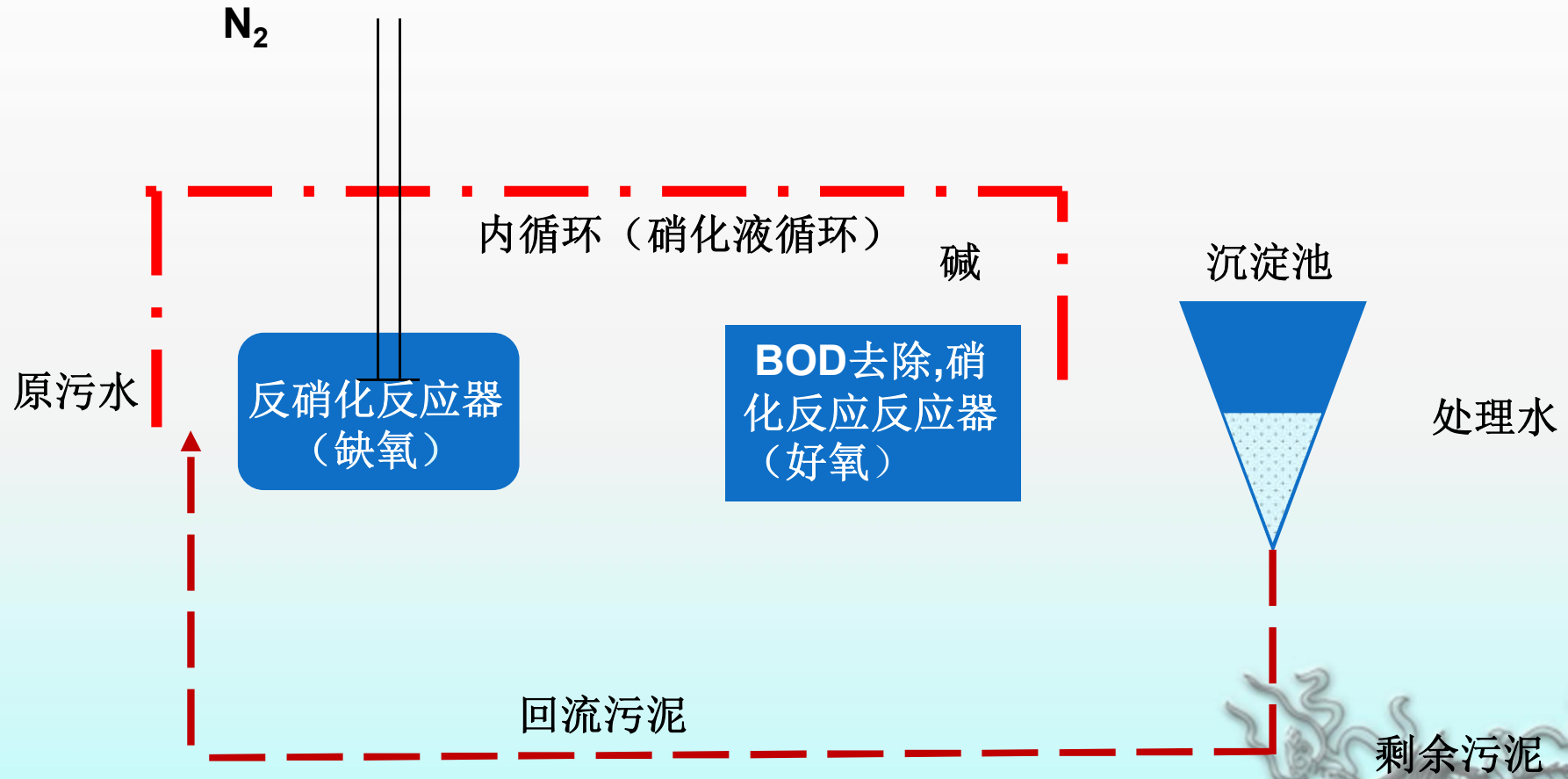
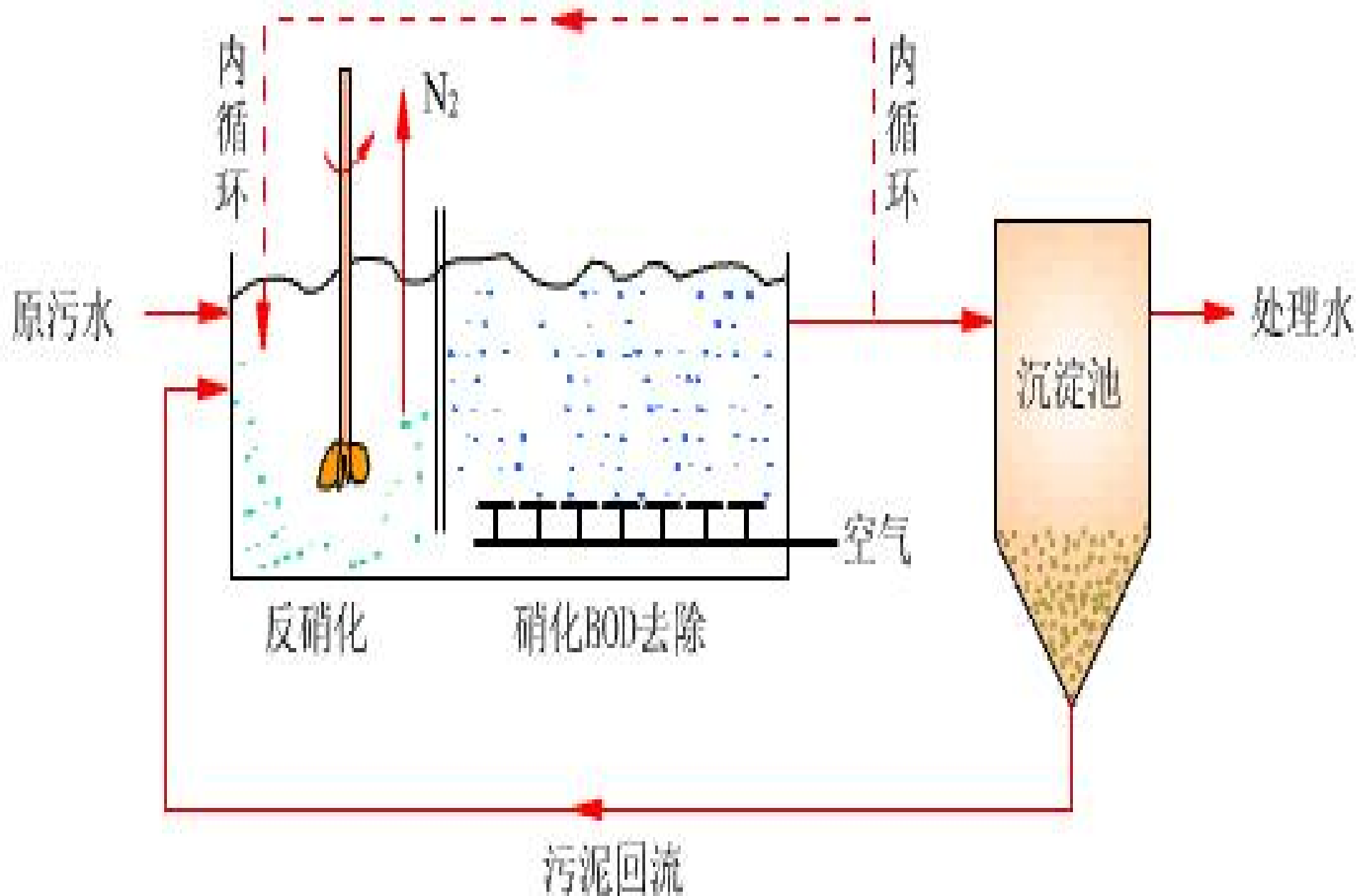


图7-17 分建式缺氧-好氧活性污泥脱氮系统



合建式缺氧-好氧活性污泥法脱氮工艺

A₁/O工艺的优缺点

◆ 优点

流程简单，构筑物少，只有一个污泥回流系统和混合液回流系统，节省基建费用。

反硝化缺氧池不需外加有机碳源，降低了运行费用。

。

因为好氧池在缺氧池后，可使反硝化残留的有机物得到进一步去除，提高了出水水质。

缺氧池中污水的有机物被反硝化菌所利用，减轻了其它好氧池的有机物负荷，同时缺氧池中反硝化产生的碱度可弥补好氧池中硝化需要碱度的一半。

◆ 缺点

脱氮效率不高，一般 $\eta_N = (70 \sim 80) \%$

好氧池出水含有一定浓度的硝酸盐，如二沉池运行不当，则会发生反硝化反应，造成污泥上浮，使处理水水质恶化。

A₁/O工艺的影响因素

1. 水力停留时间t

$t_{\text{反硝化}} \leq 2\text{h}$, $t_{\text{硝化}} \geq 6\text{h}$, $t_{\text{硝化}} : t_{\text{反硝化}} = 3 : 1$,
 ηN 达到 (70-80) %, 否则 $\eta\text{N} \downarrow$

2. 进入硝化好氧池中 $\text{BOD}_5 \leq 80\text{mg/L}$

3. 硝化好氧池中 $\text{DO} = 2\text{mg/L}$

4. 反硝化缺氧池污水中溶解氧性 $\text{BOD}_5/\text{NO}_3\text{—N}$ 的比值应大于4, 保证反硝化过程中有充足的有机碳源。

5. 混合液回流比RN: RN不仅影响脱氮效率, 而且影响动力消耗。

6. $MLSS \geq 3000 \text{mg/L}$ ，否則 $\eta_N \downarrow$ 。

7. 污泥齡 θ_C 應為30d。

8. 硝化段的污泥負荷率：

BOD負荷 $< 0.18 \text{kgBOD}_5 / (\text{kgMLSS} \cdot \text{d})$ ；

TKN負荷 $< 0.05 \text{kgTKN} / \text{KgMLSS} \cdot \text{d}$ 。

9. 溫度：硝化最適宜的溫度 $20 \sim 30^\circ\text{C}$ 。

反硝化最適宜的溫度 $20 \sim 40^\circ\text{C}$ 。

10. PH值：硝化最佳PH=8~8.4。

反硝化最佳PH=6.5~7.5。

11. 原污水總氮濃度 $TN < 30 \text{mg/L}$ 。



3.2 微生物除磷

- ◆ 原理：磷在自然界以2种状态存在：可溶态或颗粒态。
- ◆ 所谓的除磷就是把水中溶解性磷转化为颗粒性磷，达到磷水分离。



3.2 微生物除磷

厌氧放磷:

厌氧条件下, 积磷菌将体内的聚磷分解产生能量

一部分能量用于吸收外界可溶性脂肪酸, 形成**PHB**

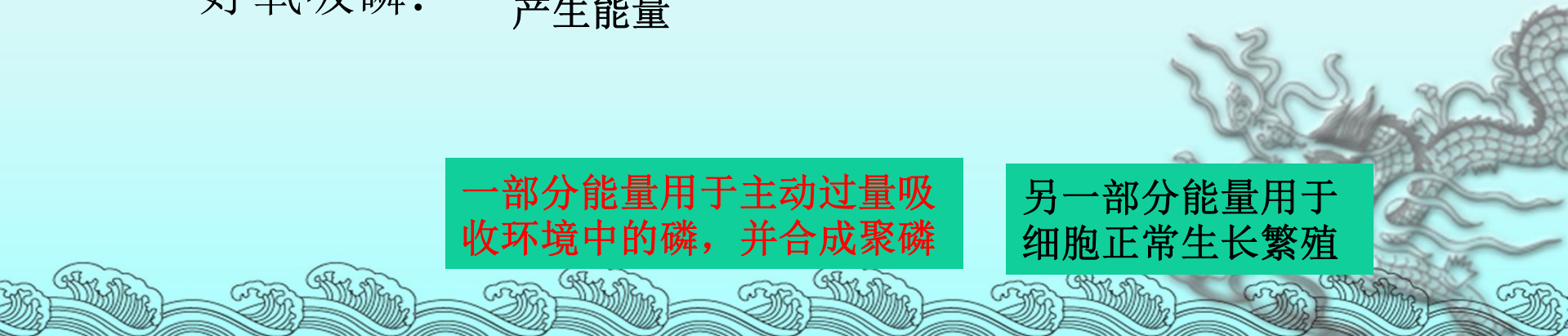
另一部分能量用于生理活动需要

好氧吸磷:

好氧条件下, **PHB**分解产生能量

一部分能量用于主动过量吸收环境中的磷, 并合成聚磷

另一部分能量用于细胞正常生长繁殖



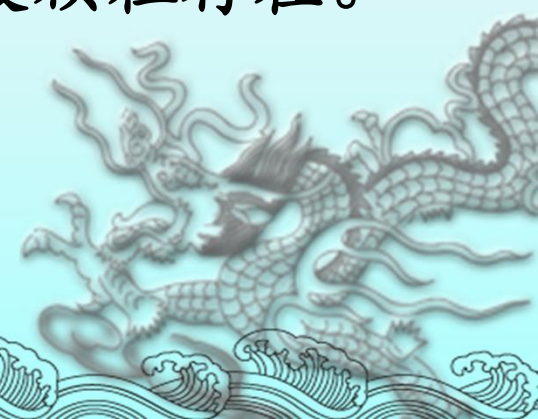
微生物除磷

- ◆ 高含磷废水的活性污泥中存在一类“聚磷菌”，这类聚磷菌在好氧条件下能够吸收超过自己本身生理所需的过量磷，含磷量可达细胞干重的6%~8%，但在厌氧条件下又可释放出这部分过量吸收的磷。
- ◆ 微生物除磷处理的微生物学原理和技术就是利用聚磷菌能在好氧和厌氧条件下吸收磷和释放磷的特点，人为控制好氧和厌氧条件去除废水中磷的过程。



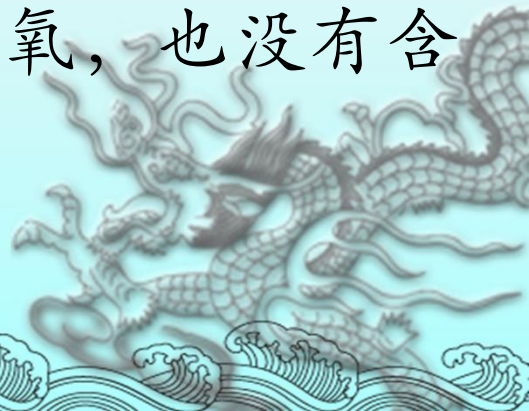
除磷微生物

- ◆ 具有聚磷和放磷的微生物
- ◆ 不动杆菌属 (*Acinotobacter*)，假单胞菌属，气单胞菌属 (*Aeromonas*)，深红螺菌 (*Rhodospirillum ruber*)，色杆菌属 (*Chromobacterium*) 等。
- ◆ 由于聚磷菌在释放磷的过程中能将伴随释放的能量用于合成聚- β -羟丁酸 (PHB)，因此在这些聚磷菌细胞内往往有明显的聚- β -羟丁酸颗粒存在。



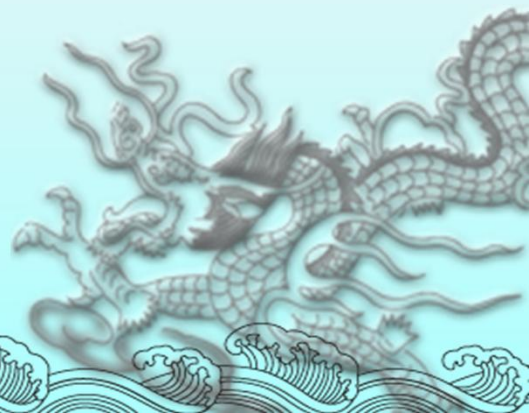
微生物除磷工艺

- ◆ 微生物除磷的工艺与生物脱氮的工艺大致相似，同样需要将流程分隔为厌氧反应器和好氧反应器，使聚磷菌在厌氧条件释放磷，再使聚磷菌在好氧条件下最大程度地吸收磷，形成大量的活性污泥，然后排除活性污泥，达到除磷的目的。
- ◆ 但是在脱氮工艺中的缺氧反应器内有 NO_3^- 等含结合态氧的化合物，氧化还原电位在 -100mV 以上，而除磷工艺中的厌氧反应器内氧化还原电位相对较低，在 $-200\sim-300\text{mV}$ 之间，没有溶解氧，也没有含氮化合物。



4. 固体废弃物的微生物处理

- ◆ 固体废弃物的分类
- ◆ 固体废弃物的微生物处理的主要方法：
 - ◆ 堆肥法
 - ◆ 厌氧发酵法
 - ◆ 卫生填埋法



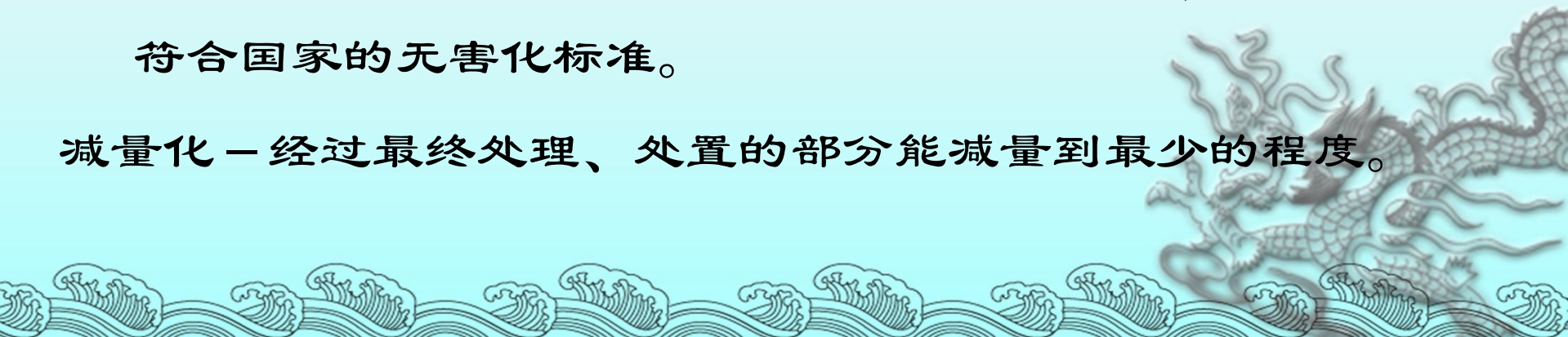
固体有机废物的处理和处置原则

◆ 资源化、无害化和减量化

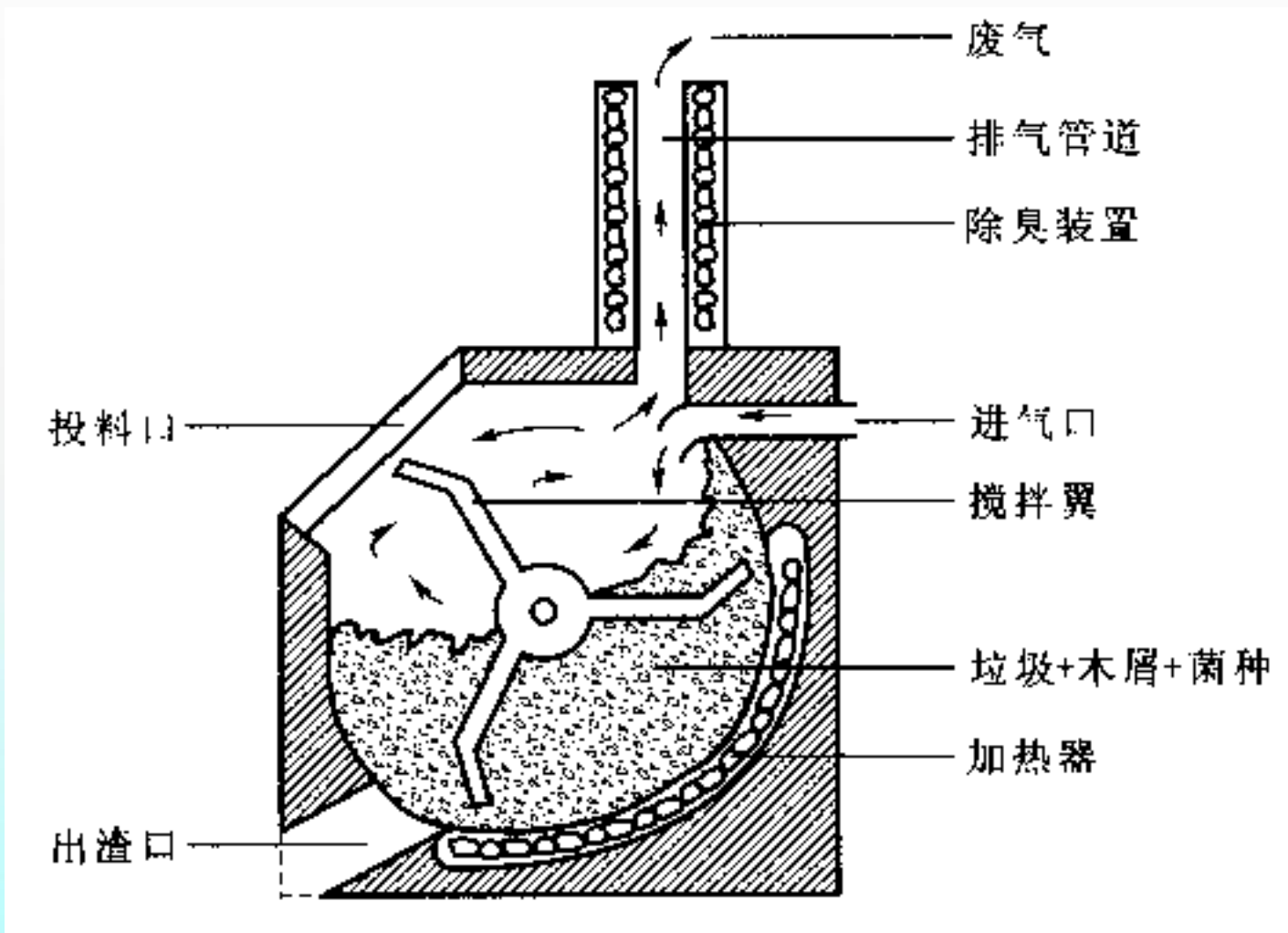
资源化—有机固体废物被称为“放错地点的原料”，为“二次资源”或“再生资源”，可用于生产生物能源、生物肥料和饲料。

无害化—杀灭或去除固体废弃物中的病原菌、害虫和寄生虫（害虫和寄生虫卵）、杂草种子和有害化学物质，处置过程需符合国家的无害化标准。

减量化—经过最终处理、处置的部分能减量到最少的程度。



固体有机垃圾的微生物处理



有机垃圾好氧处理反应器剖面图



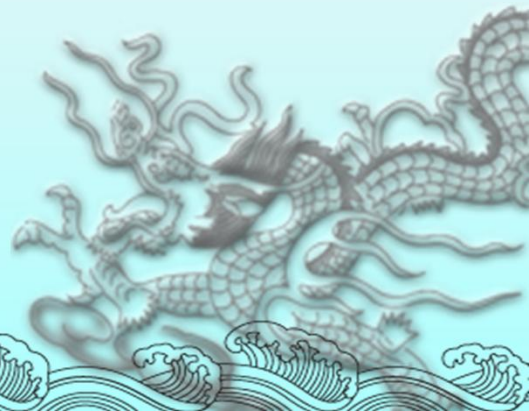
40

餐厨垃圾处理设备



堆肥法 (Compost)

- ◆ 堆肥法：指依靠自然界广泛分布的细菌、放线菌、真菌等微生物有控制地促进可被生物降解的有机物向稳定的腐殖质转化的生物化学过程。
- ◆ 堆肥：堆肥化的产物。
- ◆ 根据处理过程中起作用的微生物对氧气要求的不同，堆肥法可分为：
 - ◆ 好氧堆肥法
 - ◆ 厌氧堆肥法



好氧堆肥法的微生物学过程

◆ 发热阶段

◆ 初期，主要由中温好氧的细菌和真菌利用堆肥中的易分解有机物，释放热量，使温度不断上升。

◆ 高温阶段

◆ 堆肥温度升至 50°C 以上进入高温阶段，好热性的微生物逐渐代替了中温微生物，一些复杂的有机物开始分解，腐殖质逐渐形成。病原性微生物逐渐被高温杀死。

◆ 降温和腐熟保肥阶段

◆ 当易分解有机物大部分被分解以后，剩下的是木质素等难分解有机物和新形成的腐殖质，好热性微生物的活动减弱，产热量下降，温度逐渐下降，中温性微生物又成为优势菌群，残余物进一步分解，腐殖质逐渐积累，堆肥进入腐熟阶段。

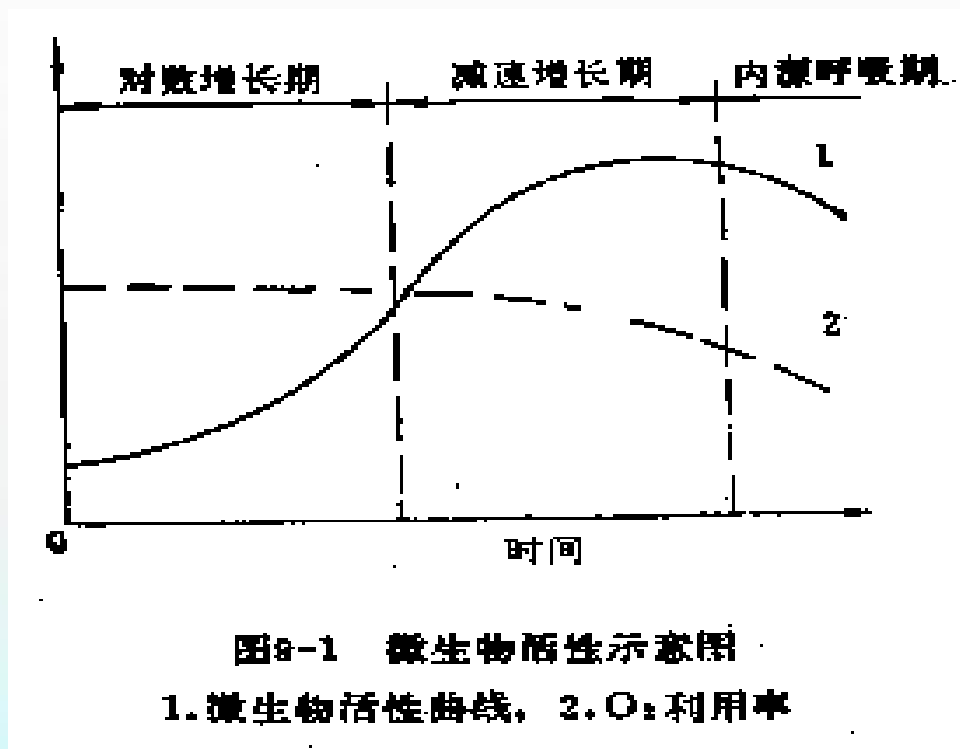
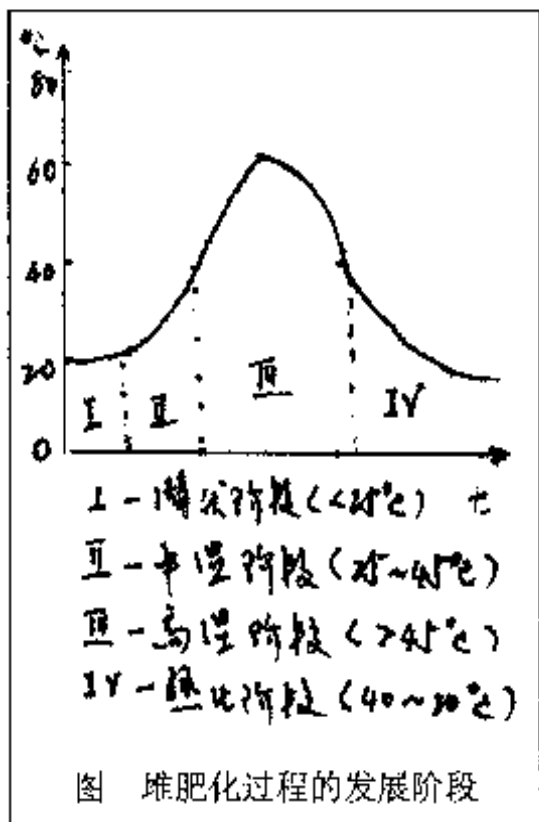
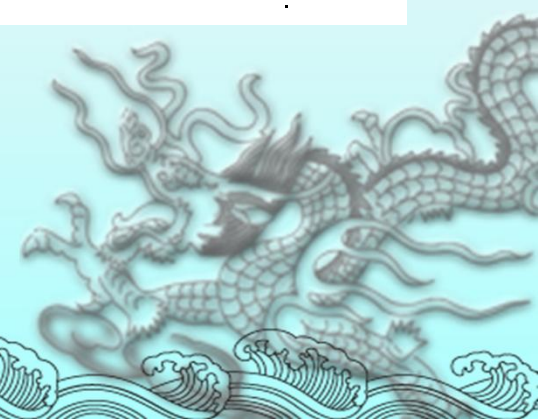


图17 堆肥化过程的发展阶段



好氧堆肥的影响因素

◇ 有机质含量

- ◇ 有机质含量含量过低，产生的热量不足以维持堆肥所需温度；
- ◇ 有机质含量含量过高不利于通风供氧从而产生厌氧和发臭。

◇ 水分

- ◇ 水分过高不利于升温 and 通风；
- ◇ 水分过低，不能满足微生物生长需要，有机物也不能分解。

◇ 温度

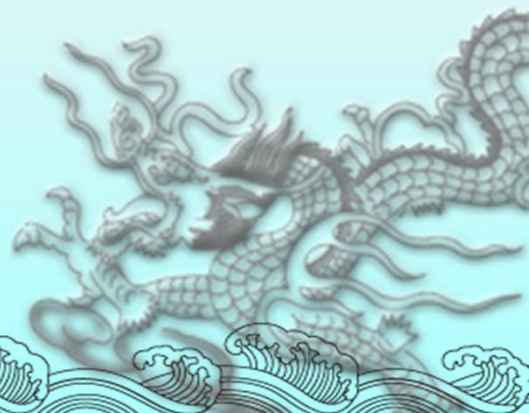
- ◇ 温度过低将大大延长堆肥时间；
- ◇ 温度过高对微生物产生不利影响。

◇ 碳氮比

- ◇ 碳氮比小，升温快，但最高温度较低；
- ◇ 碳氮比大，升温慢，但最高温度较高。

◇ 氮磷比

- ◇ 堆肥原料的氮磷比一般在75~150之间。



厌氧堆肥法

◆ 厌氧堆肥法

◆ 指在不通气的条件下，将有机废弃物进行厌氧发酵，制成有机肥料，使固体废弃物无害化的过程。

◆ 厌氧堆肥过程的两个阶段

◆ 酸性发酵阶段：产酸细菌分解有机物，产生有机酸、醇、二氧化碳、氨、硫化氢等，使pH下降；

◆ 产气发酵阶段：主要由产甲烷细菌分解有机酸和醇，产生甲烷和二氧化碳，随着有机酸的下降，pH迅速上升。

◆ 厌氧堆肥法特点（与好氧堆肥相比较）

◆ 堆内不设通气系统，堆温低，腐熟及无害化所需时间较长，但方法简便、省工，在不急需用肥或劳力紧张的情况下可以采用。

5、农药的微生物 降解与修复技术 (微生物对化学农药的降解)



农药作为农业丰收的重要保障，在世界各地范围内广泛使用

(2002 数据)

世界年使用量为140万吨（纯品）

北美占30.3% (美国28%)

欧洲占22.7%

亚洲占25.8%

南美占12.3%

其它占9%

全球市场达277 亿美元;

除草剂占48%

杀虫剂占28%

杀真菌剂占19%

其它占5%



世界各地的农药使用情况

农药的污染现状

世界各地的土壤污染问题！

- 世界上超过1亿公顷的土壤受到污染
- 美国3.2千万公顷
- 欧盟超过1亿处地方受污染

其中 3万处急需处理，超过10亿m³的土壤

European Topic Centre Soil, 1998



除草剂的药害问题



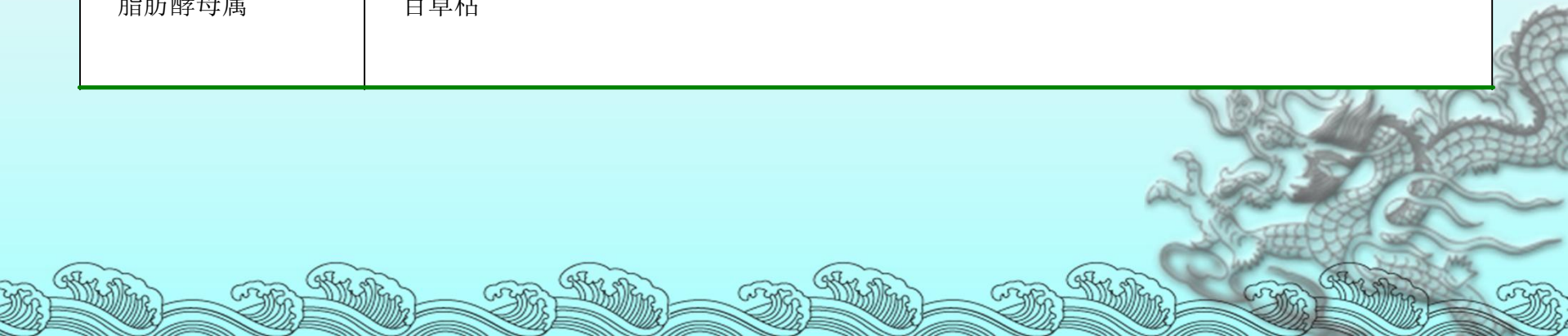
磺酰脲类除草剂在土壤中降解缓慢，残效期长，土壤中的累积残留往往对下茬作物产生药害。
2005年内蒙古呼伦贝尔市1300万亩大豆田因除草剂药害减产30%；
黑龙江省5000万亩大豆田因除草剂药害，减产25亿公斤。



降解农药的微生物种类

微生物	农药
细菌 假单胞菌属 芽胞杆菌属 节杆菌属 气杆菌属 土壤杆菌属 产碱杆菌属 无色杆菌属 枝动杆菌属 变形杆菌属 丝核菌属 拟杆菌属 棒状杆菌属 链球菌属 八叠球菌属 梭状芽胞杆菌属 黄杆菌属 硫杆菌属 不动杆菌属 沙雷氏菌属 欧氏植病杆菌属 毛螺菌属 农杆菌属 莫拉氏菌属 克氏杆菌属 肠细菌属 生孢纤维粘菌属 漆斑菌属 微球菌属 邻单胞菌属	丙烯醇、三氯乙酸、敌敌畏、甲胺磷、二嗪农、2, 4-D、DDT、地乐酚、二硝甲酚、五氯酚钡、氯苯胺灵、敌稗、3911、茅草枯、灭草隆、狄氏剂、异狄氏剂、西马津、林丹、对硫磷 乐果、甲胺磷、敌敌畏、对硫磷、甲基对硫磷、杀螟松、C-6989、MMDD、DDT、三氯甲酸、茅草枯、狄氏剂、利谷隆、毒莠定、灭草隆、苯硫磷、七氯 二嗪农、草藻灭、三氯乙酸、茅草枯、毒莠定、西马津、 2, 4-D、PCB DDT、甲氧DDT、2, 4-D、狄氏剂、异狄氏剂 三氯乙酸、茅草枯、毒莠定、DDT、氯苯胺灵 三氯乙酸、茅草枯、2, 4-D、3-CBA、MCPA 2, 4-D、2, 4, 5-T、氯苯胺灵、茅草枯、PCB 2, 4, 5-T DDT N-甲酰基-L-犬尿素、地茂散 氟乐灵 2, 4-D、DDT、地乐酚、二硝甲酚、百草枯、茅草枯 DDT 灭草隆 DDT、百草枯 三氯乙酸、茅草枯、毒莠定、氯苯胺灵、2, 4-D、马来酰肼、灭草隆、甲胺磷、对硫磷 甲拌磷、对硫磷 PCB、对硫磷、甲胺磷、乐果、敌敌畏 DDT DDT 氟乐灵 茅草枯 2, 4-D、3-CBA、MCPA PCB 林丹 2, 4-D 五氯硝基苯、三氯乙酸、对硫磷、甲基对硫磷、辛硫磷、氯苯

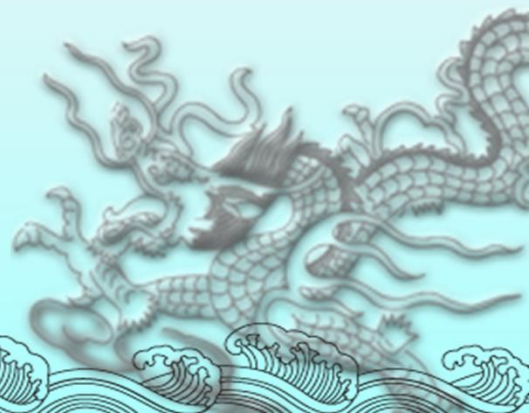
放线菌	三氯乙酸、七氯
小单孢菌属	2, 4-D、DDT、三氯乙酸、茅草枯、七氯、五氯硝基苯、毒莠定
诺卡氏菌属	2, 4-D、2, 4, 5-T、茅草枯、五氯硝基苯、西马津、二嗪农、DDT
链霉菌属	茅草枯、七氯、五氯硝基苯、毒莠定、西马津、艾氏剂、灭草隆、灭草尔、除草醚、敌稗、碳
真菌	氯灵、扑草净、莠去津、敌百虫、氯黄隆
青霉属	2, 4-D、七氯、五氯硝基苯、毒莠定、西马津、艾氏剂、灭草隆、灭草尔、除草醚、敌百虫
曲霉属	、莠去津、草乃敌、异艾氏剂、利谷隆
链孢属	茅草枯
小从壳属	五氯硝基苯、福美双
葡萄孢霉属	毒莠定
枝孢霉属	莠去津、扑草净
链孢霉属	地茂散
毛霉属	DDT、五氯硝基苯
镰孢霉属	艾氏剂、莠去津、DDT
根霉属	七氯、莠去津、地可松
葡萄状穗霉菌属	西马津
长孺孢属	五氯硝基苯、毒莠定
头孢霉属	莠去津、扑草净
木霉属	DDT、对硫磷
酵母属	克菌丹、毒莠定、PCB、苯酚
脂肪酵母属	百草枯



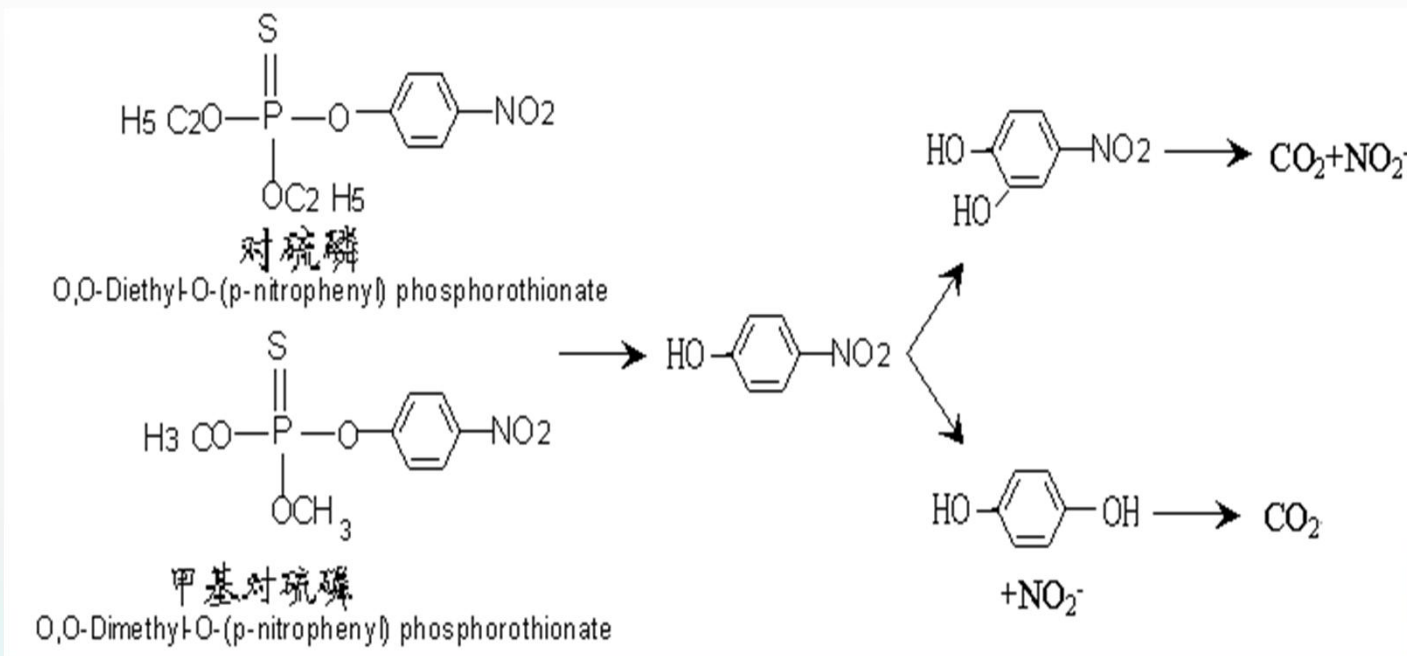
◆ 降解方式：

- ① 以农药作为唯一碳源、能源或唯一的氮源物质，如氟乐灵(一种除草剂)可作为曲霉的唯一碳源；
- ② 微生物通过共代谢作用降解农药。

◆ 一些难以降解的有机物，虽然不能作为微生物的唯一碳源被降解，但可通过微生物利用其它有机物作为能源或碳源的同时被降解的现象，如直肠梭菌降解六六六粉，需提供蛋白胨给作为能量才能进行。



对硫磷、甲基对硫磷降解途径



假单胞菌属和枯草芽孢杆菌等都能通过硝基还原作用或磷酸键上酶促水解作用，最终产物可能生成CO₂和NO₂⁻。

农药污染土壤的微生物修复研究

- ◆ 一方面在许多研究中，通过添加营养元素等外在条件刺激土著降解性微生物的作用来达到修复效果。
- ◆ Fulthorpe (1996) 等从巴基斯坦土壤中分离的微生物都能矿化2,4-D，并发现添加硝酸盐、钾离子和磷酸盐能增加降解率。加拿大的Stauffer Management 公司数年来发展了一些农药污染土壤的生物修复技术，他们在特定环境中通过激发降解性土著微生物群落的功能达到修复目的，并且在美国专利局获得了3项专利。



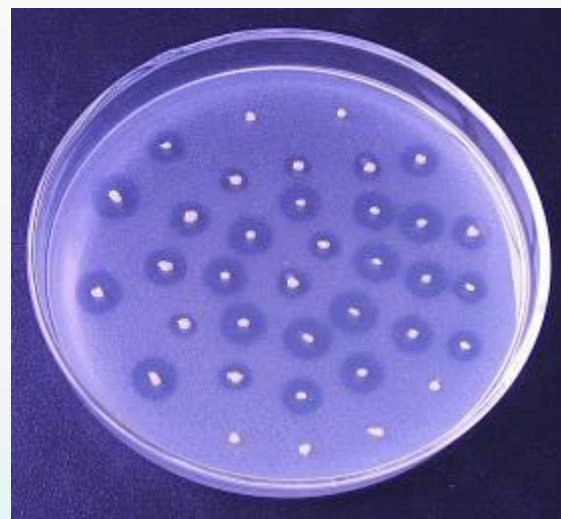
利用微生物分离筛选技术，从环境中获得有研究意义或实用价值的微生物资源一直是研究重点。

目前南京农业大学分离筛选到农药和有毒有机污染物降解的微生物菌种资源500株以上，农药降解效率国际领先的菌株30余株，建立了种类齐全的我国最大的农药降解菌种库，能降解的农药有有机磷、有机氮、有机氯、菊酯类、氨基甲酸酯、磺酰脲类等农药。

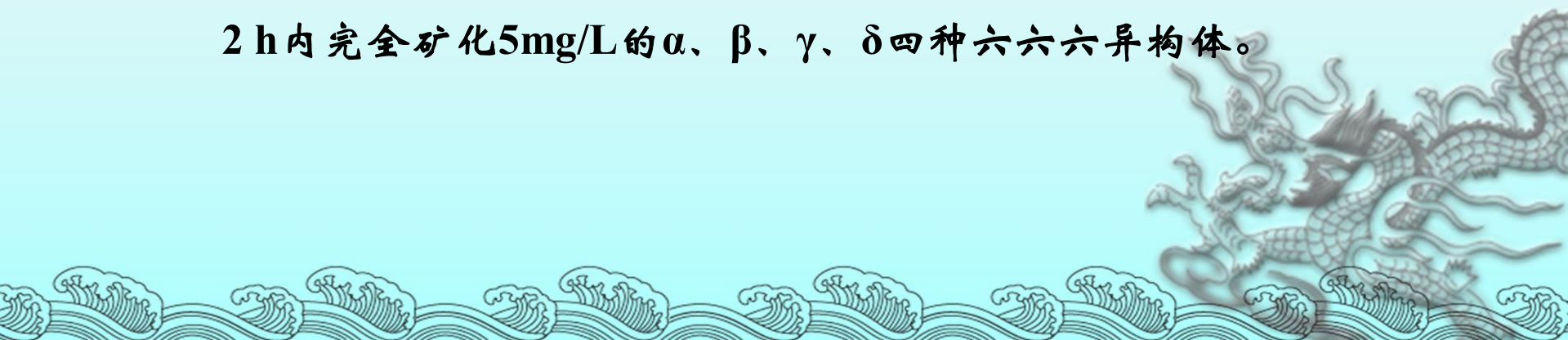


部分高效菌株

六六六降解菌BHC-A (*Sphingomonas* sp.)



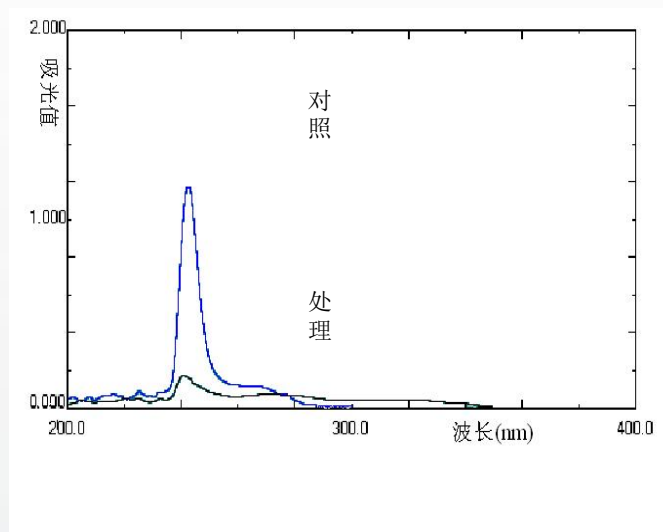
2 h内完全矿化5mg/L的 α 、 β 、 γ 、 δ 四种六六六异构体。



DDT降解菌株 DB-1 (Sphingomonas sp.)

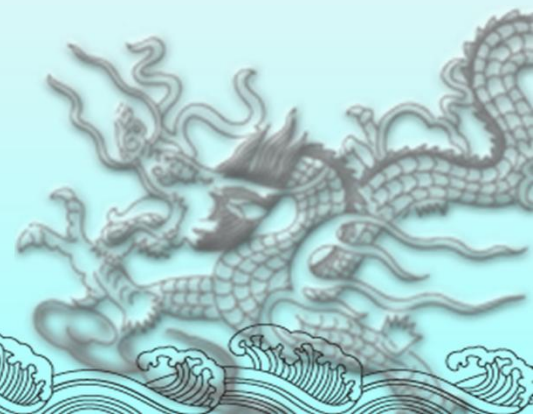


菌株DB-1的电镜照片

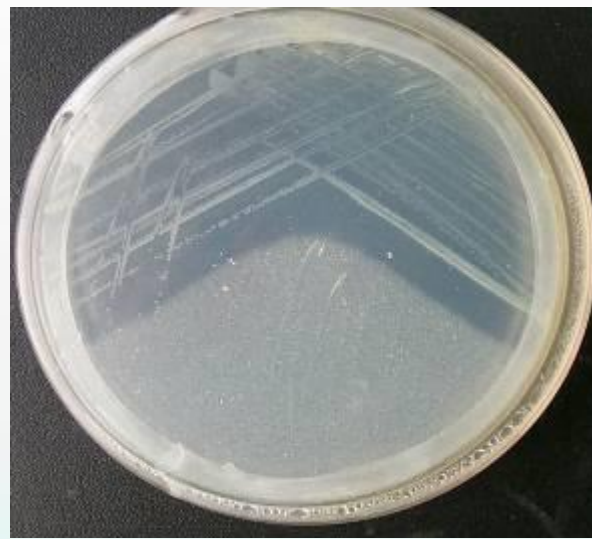


DDT降解的紫外扫描图谱

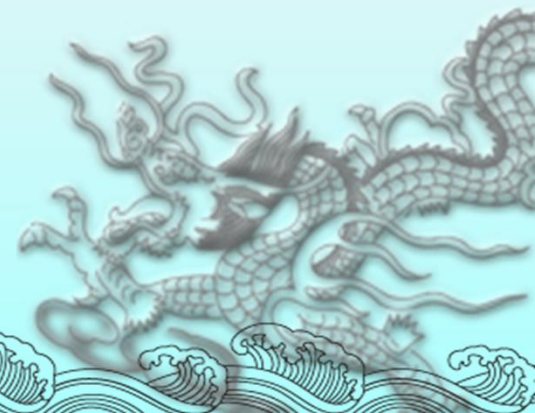
10d中对DDT的降解率在75.7-83.6%之间。



阿特拉津降解菌ADP-1 (*Micrococcus* sp.)



24 h内完全矿化100 mg/kg的阿特拉津

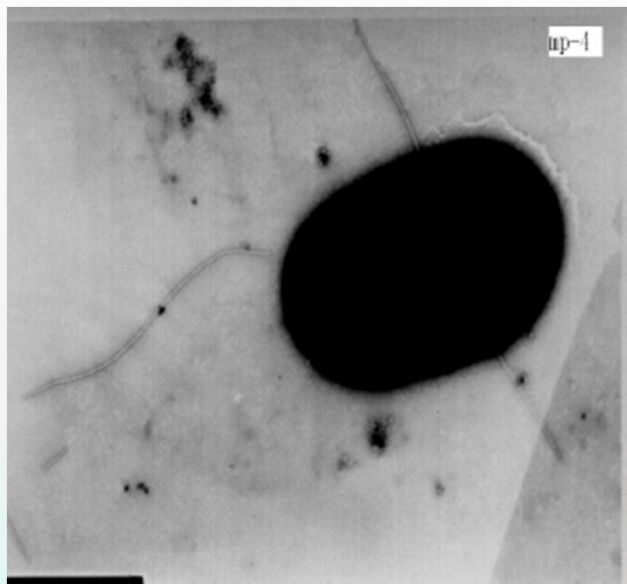


甲基对硫磷降解菌DLL-1 (*Pseudomonas putida*)



24h内完全矿化500mg/kg的甲基对硫磷，效果稳定，降解谱广，能降解对硫磷、辛硫磷、马拉硫磷、敌敌畏、乐斯本等有机磷农药。

三唑磷降解菌mp-4 (*Ochrobactrum* sp.)



能降解三唑磷的高效菌株，大田水稻上的三唑磷农药降解效果90%以上（国际首次报道）。



➤ 降解菌株的盆钵试验



处理 (农药+降解菌)

对照 (农药)

发现使用六六六降解菌可以在15d内将30 mg/kg的 α 、 β 、 γ 、 δ 四种六六六异构体降解低到0.33 mg/kg

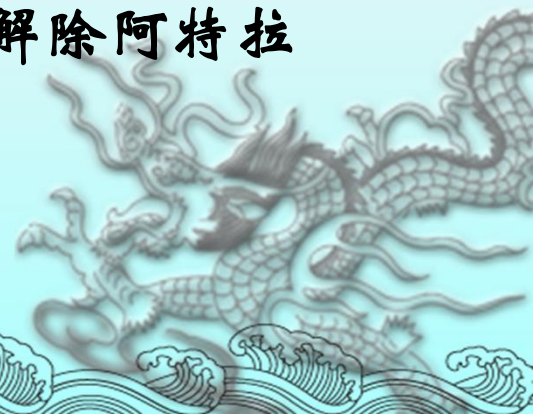


空白

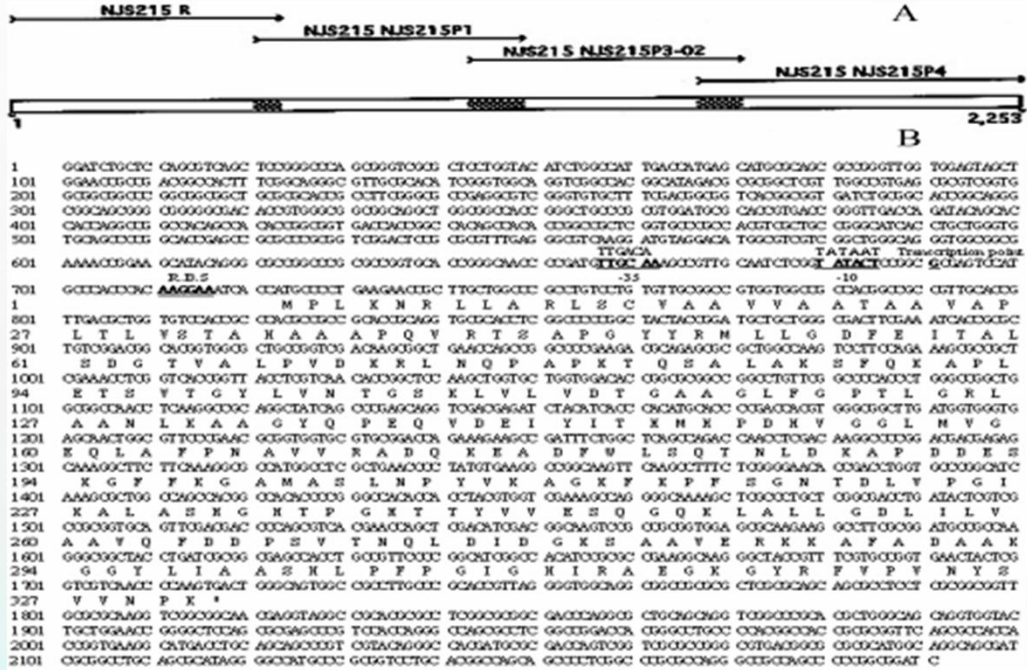
阿特拉津 (1.5mg/kg土)

阿特拉津+菌剂
(1亿个/g 土)

发现使用阿特拉津降解菌可以明显解除阿特拉津除草剂对小麦生长的抑制



农药降解关键酶基因的克隆 (18个降解基因)



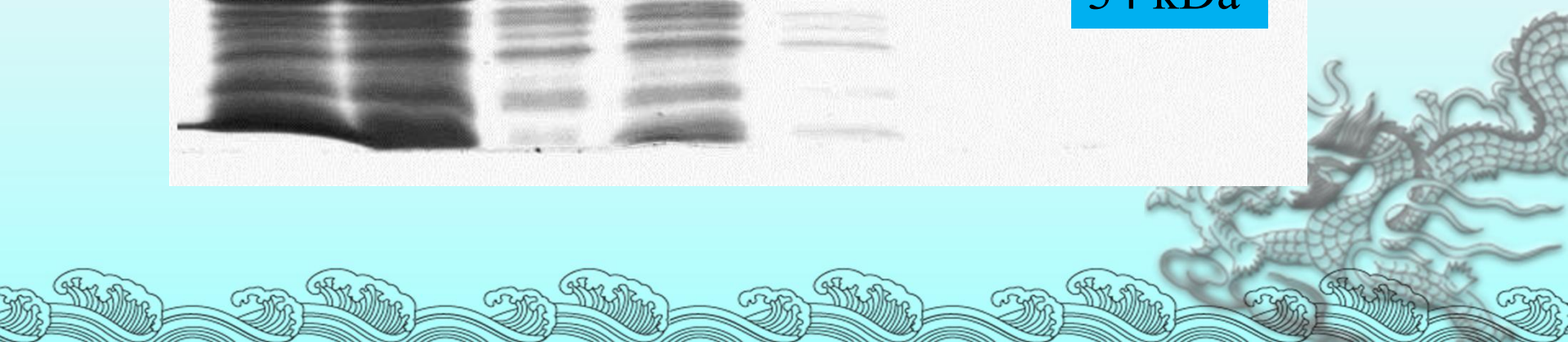
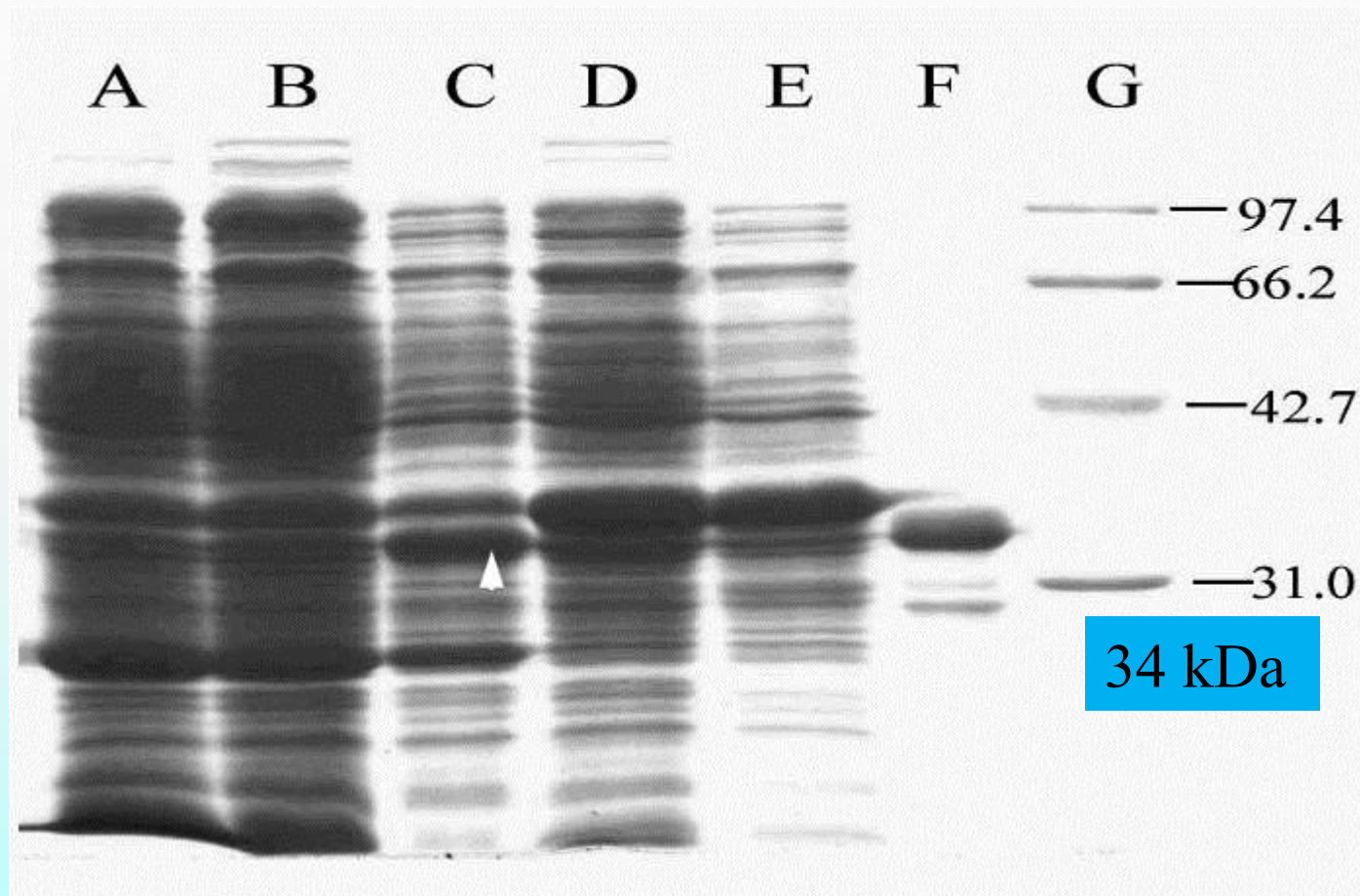
新的甲基对硫磷水解酶基因 *mpd*

从甲基对硫磷降解菌M6中克隆到一个新的甲基对硫磷水解酶基因 *mpd*(AF338729);

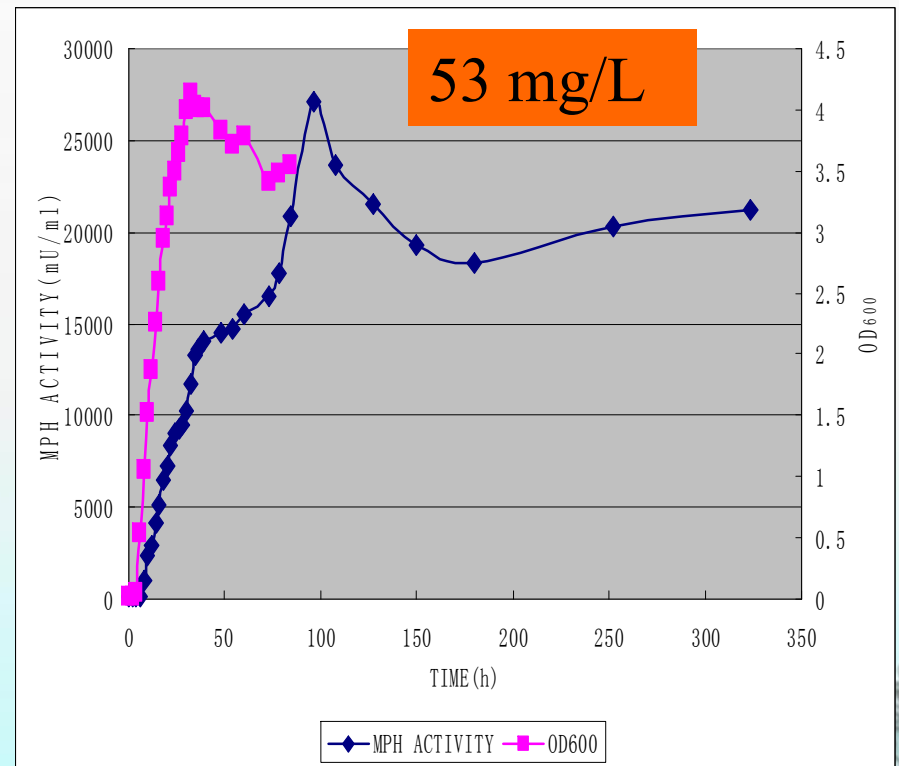
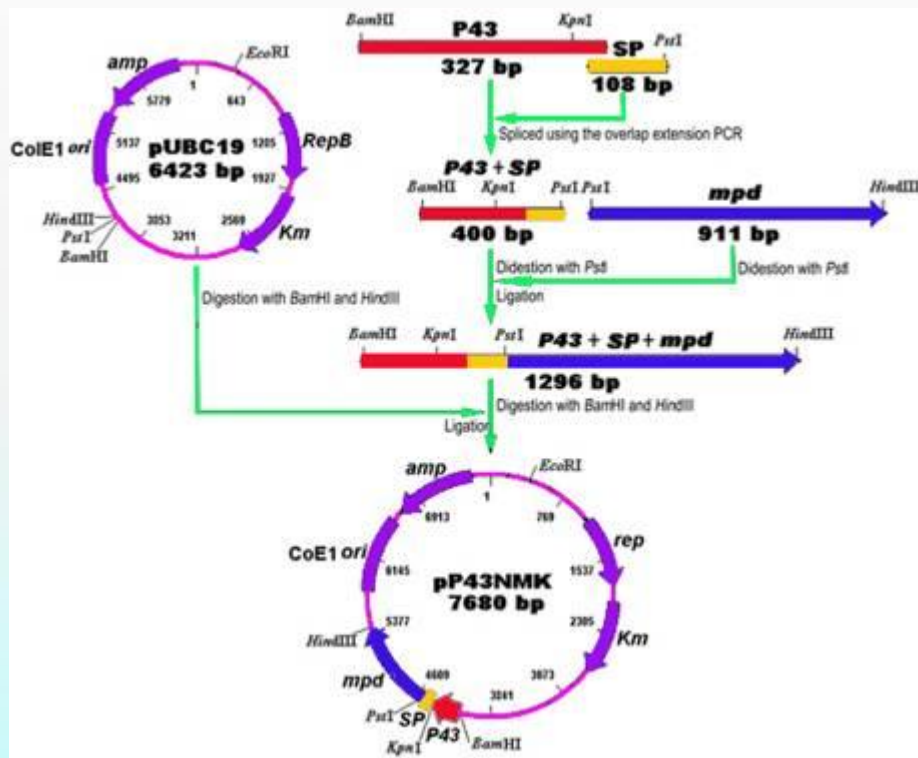
从三唑磷降解菌mp-4中克隆到一个三唑磷水解酶 *tpd*基因 (AY627036)。



*mpd*基因在*E.coli*中高效表达



mpd基因在*Bacillus subtilis* WB800中的高效分泌表达



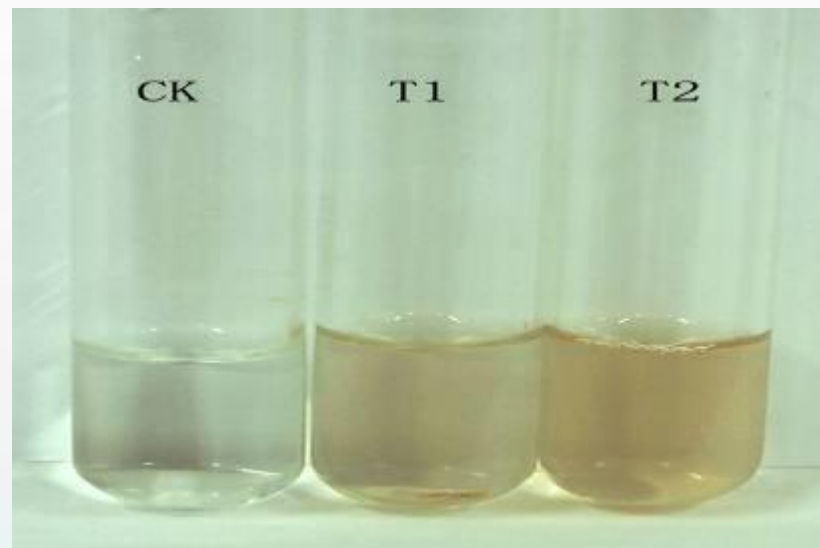
酶活提高了28倍，简化了酶的后续纯化步骤，延长了菌剂货架期

基因工程菌的构建：

同时降解呋喃丹和MP的遗传稳定符合环境释放要求的基因工程菌



工程菌降解MP出现的水解圈



12h出现呋喃丹降解中间红色产物
(2, 4-二叔丁基苯醌)

*mpd*基因通过同源重组插入到呋喃丹降解菌的染色体上，遗传稳定，没有带入其它抗性，已获批准进行环境释放。



中华人民共和国 肥料正式登记证

登记证号：微生物肥(2006)准字(0296)号

经农业部肥料登记评审委员会审定，该产品
准予正式登记，特此发证。

中华人民共和国农业部制

生产企业：南京农业大学环境能源
工程研究中心

产品通用名：生物修复菌剂

商品名：土壤生物修复制剂

产品形态：液体

主要技术指标：有效活菌数 ≥ 3.0 亿/mL

适用于：有机磷农药、拟除虫菊酯类
杀虫剂和阿特拉津、吡喃
丹、六六六农药残留的降解
☆☆☆

发证日期：2006年11月2日

有效期至：2011年11月2日



获农业部肥料正式登记证

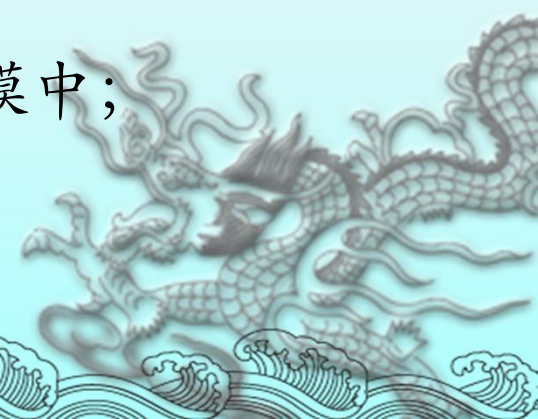
农药残留生物修复技术应用：

- ◆ 土壤中残留的六六六、DDT、呋喃丹等农药的修复及除草剂药害的消除。
- ◆ 大宗农作物（水稻、小麦、玉米等）、经济附加值高的蔬菜、茶叶、早竹笋、芦笋、金丝小枣、冬枣等当季使用有机磷、菊酯等农药残留的去除。



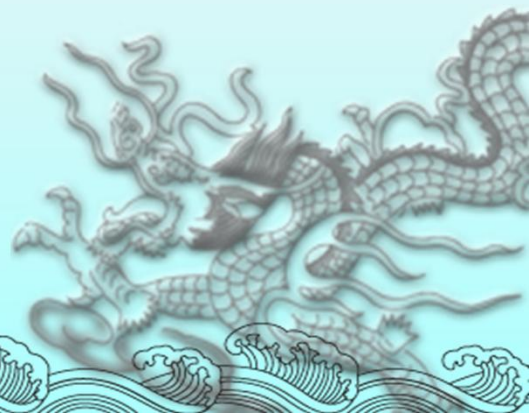
6. 大气污染物的微生物处理

- ◇ 什么是大气污染物的微生物处理？
 - ◇ 指利用微生物的生物化学作用，使大气污染物分解。转化为无害或少害物质。目前主要用来净化有机污染物特别是脱除臭味。
- ◇ 废气微生物处理的特点
 - ◇ 设备简单、能耗低、不消耗有用的原料、安全可靠、无二次污染等。
- ◇ 废气生物处理的两个阶段
 - ◇ 污染物由气相转入液相或固相表面的液膜中；
 - ◇ 污染物在液相或固相表面被微生物降解。



微生物对无机废气的处理

- ◆ 微生物对无机废气的处理主要利用一些化能自养菌如硝化细菌、硫化细菌和氢细菌等。
- ◆ 适合于微生物处理的无机废气污染组分主要有：
氨和硫化氢。
- ◆ 例如：硫化氢的生物处理



微生物对有机废气的处理

- ◆ 微生物吸收法 (Microorganism Absorption)
 - ◆ 原理：利用微生物、营养物和水组成的吸收液处理废气，适合于处理可溶性的气态污染物。
 - ◆ 装置：由吸收器（物理溶解过程）和废水反应器（生物处理过程）两部分组成。
- ◆ 微生物洗涤法 (Microorganism Wash)
 - ◆ 利用污水厂剩余污泥配制混合液作为吸收剂处理废气，对脱除复合型臭气效果较好。
- ◆ 微生物过滤法 (Microorganism Adsorption)
 - ◆ 利用含有微生物的固体颗粒吸收废气中的污染物。
 - ◆ 包括以下类型：堆肥滤池、土壤滤池、微生物过滤箱

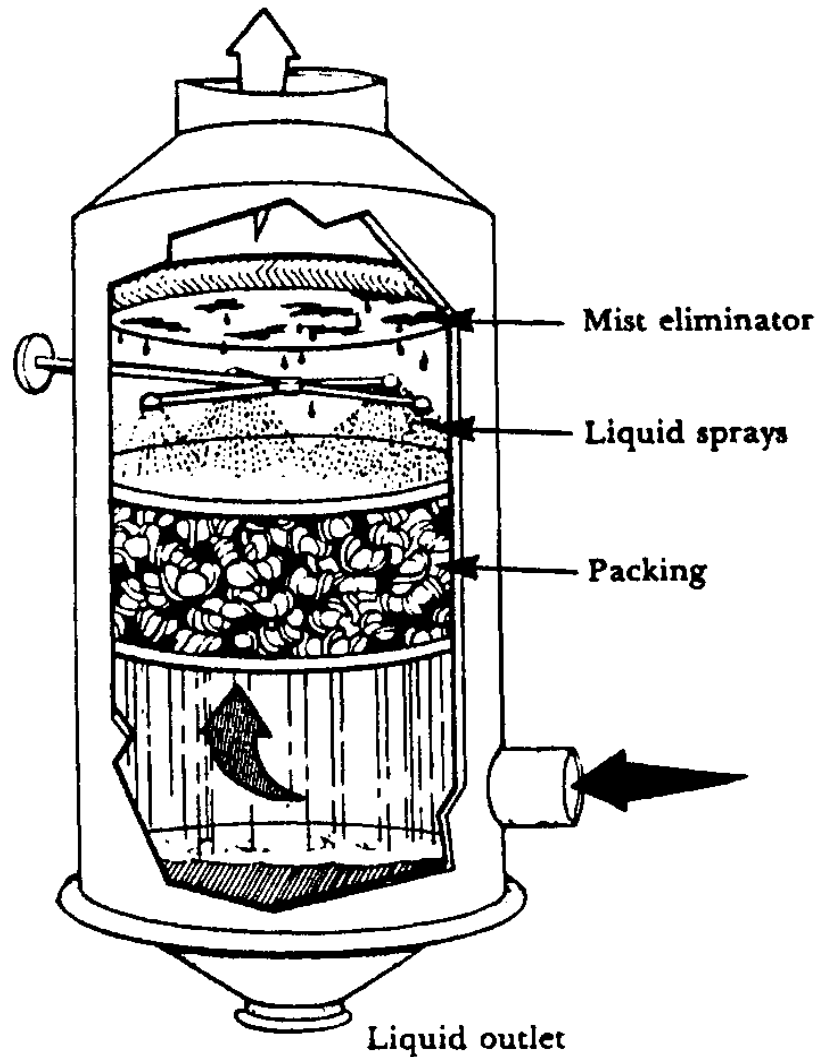
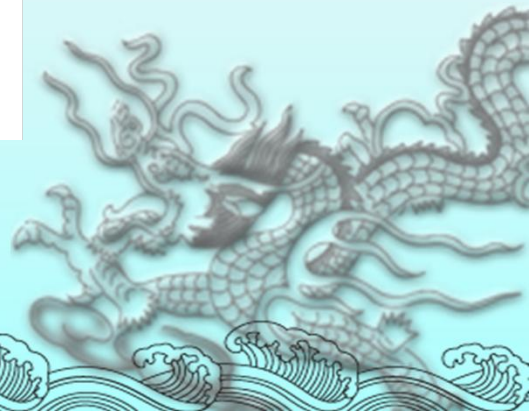


图21 吸收设备—填料塔



思考题：

- ◆ 1. 发酵生产所使用的菌种有哪些基本要求？
- ◆ 2. 微生物菌种保藏原理和常见方法？
- ◆ 3. 微生物在农业领域的应用前景？

