

郭彦钊, 付瑞敏, 薛婷婷, 等. 二甲基硫醚氧化菌的分离鉴定及其对猪粪堆肥的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(2):372–379.

GUO Yan-zhao, FU Rui-min, XUE Ting-ting, et al. Isolation and identification of a DMS-oxidizing bacterium and its impacts on swine manure composting[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2016, 35(2):372–379.

二甲基硫醚氧化菌的分离鉴定及其对猪粪堆肥的影响

郭彦钊¹, 付瑞敏^{1,2}, 薛婷婷¹, 谷亚楠¹, 马玮超¹, 陈五岭^{1*}

(1.西北大学生命科学学院, 西安 710069; 2.河南教育学院生命科学系, 郑州 450046)

摘要:从污水处理厂活性污泥中分离得到一株二甲基硫醚(DMS)氧化菌 AM2, 经 16S rDNA 检测鉴定其为那不勒斯硫杆菌(*Thiobacillus neapolitanus*)。AM2 的最适生长温度为 30 ℃, 最适 pH 为 7.0。以猪粪和秸秆粉为原料进行肥料堆肥试验, 通过检验菌株 AM2 对堆肥过程中 DMS 排放量、堆肥温度、可培养微生物和酶活性的影响, 来探究菌株 AM2 对堆肥的影响。结果表明: 接入菌株 AM2 的实验组 DMS 排放量显著($P<0.05$)少于对照组, 在 30 d 的实验中有 20 d 减少 60% 以上; 显著提高了($P<0.05$)可培养微生物数量, 同时将物料温度高于 50 ℃ 的天数延长至 13 d; 实验各组的脲酶、脱氢酶、过氧化氢酶、蛋白酶和纤维素酶酶活都显著高于对照组。综合判断, 菌株 AM2 能够有效降低堆肥过程中 DMS 的排放量并促进肥料腐熟。

关键词:二甲基硫醚; 那不勒斯硫杆菌; 16S rDNA; 猪粪堆肥; 酶活

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2016)02-0372-08 doi:10.11654/jaes.2016.02.023

Isolation and identification of a DMS-oxidizing bacterium and its impacts on swine manure composting

GUO Yan-zhao¹, FU Rui-min^{1,2}, XUE Ting-ting¹, GU Ya-nan¹, MA Wei-chao¹, CHEN Wu-Ling^{1*}

(1.The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2.Department of Life Science, Henan Institute of Education, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: A DMS-oxidizing bacterial strain AM2 was isolated from activated sludge by using streak plate method, and was identified as *Thiobacillus neapolitanus*. Its optimum temperature and pH were respectively 30 ℃ and 7.0. Impact of the strain AM2 on swine and straw mixture composting was examined by monitoring DMS outputs, temperature, culturable microorganism population and enzyme activity in the compost. Compared with control, inoculation with AM2 not only significantly ($P<0.05$) decreased DMS outputs with over 60% reduction for 20 days during 30-day experimental period, but also significantly ($P<0.05$) promoted culturable microbe population. Compost temperature maintained above 50 ℃ for 13 days during the experimental period. Activities of dehydrogenase, urease, catalase, protease and cellulose were significantly ($P<0.05$) higher in DMS-inoculated than in control groups. To sum up, the strain AM2 can effectively reduce DMS emissions during composting process and promote compost maturity.

Keywords: dimethyl sulfide; *Thiobacillus neapolitanus*; 16S rDNA; swine manure composting; enzyme activity

堆肥是处理有机废弃物的一种理想方法, 但堆肥过程会释放大量的恶臭物质污染大气, 影响周围居民的正常生活甚至导致疾病。Dai 等^[1]分析了猪粪堆肥

过程中释放的气体中主要的致臭物质, 二甲基硫醚(DMS)是其中之一。

二甲基硫醚是典型的有机硫恶臭气体, 它在空气中的含量达到十亿分之一便可产生臭味^[2], 并且它的产生会抑制堆肥过程中微生物的生长^[3], 对肥料的发酵产生不利的影响。目前 DMS 的生物消除法大都需要装有活性污泥的气体吸收设备, 这些方法的局限性是没有在根源上抑制 DMS 的产生, 并且需要气体收

收稿日期: 2015-07-28

基金项目: 农业部科技成果与转化项目(2012GB2 G000451.); 陕西省重大科技创新项目(2009ZKC04-16)

作者简介: 郭彦钊(1989—), 男, 陕西西安人, 在读硕士, 从事农业及环境微生物学研究。E-mail: guoyanzhao1204@163.com

* 通信作者: 陈五岭 E-mail: wulingchen@yeah.net

集和吸收设备而增加生产成本,不利于有机肥料产业的发展。相比于现有的方法在堆肥过程中加入特殊微生物,利用微生物的新陈代谢过程将堆肥过程中产生的DMS分解或转化为其他无臭物质不失为一种新的思路。Wang等^[3]从活性污泥中分离得到的一株化能自养硫杆菌(*Chemolithotrophic Thiobacilli*),对通入滴滤塔中的DMS气体在24 h内可以完全净化。

本实验的主要目的是选育出一种能够在堆肥物料中生存并且能够氧化利用DMS的菌株。因为微生物和酶是分解有机物的主体^[4],并且物料温度能够反映生物活性,所以通过监测堆肥实验过程中释放的废气中DMS的含量、堆体温度、微生物量和酶活性,可验证筛选出的菌株能否应用在实际的堆肥中。

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

活性污泥取自西安第四污水处理厂;猪粪取自西安鑫源种猪厂。物料性状如表1所示。

表1 物料性状

Table 1 Basic properties of composting materials

项目	含水率/ g·kg ⁻¹	pH	TOC/ g·kg ⁻¹	TN/ g·kg ⁻¹	C/N
新鲜猪粪	767.3	7.46	226.1	10.3	21.95
加秸秆粉	689.3	7.58	269.1	9.5	28.33

Na₂S₂O₃ 无机盐培养基^[5]:KH₂PO₄ 2 g, K₂HPO₄ 2 g, NH₄Cl 0.4 g, MgCl₂·6H₂O 0.2 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, Na₂S₂O₃·5H₂O 8 g, 琼脂 20 g, 水 1000 mL。

牛肉膏培养基:牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 15 g, 水 1000 mL。

马丁氏培养基:KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 蛋白胨 5 g; 葡萄糖 10 g, 1%孟加拉红水溶液 3.3 mL, 1%链霉素溶液 3 mL, 琼脂 15 g, 水 1000 mL。

高氏一号培养基:可溶性淀粉 20 g, KNO₃ 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, 霉菌素 0.03 g, K₂Cr₂O₇ 0.02 g, 奈啉酮酸 0.01 g, 琼脂 15 g, 水 1000 mL。

1.2 菌种分离与鉴定

取活性污泥 1 g 接入 200 mL Na₂S₂O₃ 无机盐液体培养基中, 31 ℃、180 r·min⁻¹ 培养 24 h, 再吸取 10 mL 培养液转接入新的 Na₂S₂O₃ 无机盐液体培养基中, 重复 3 次; 利用第 3 次的培养液在 Na₂S₂O₃ 无机盐平板培养基上涂平板, 31 ℃恒温培养 72 h 后挑取得到的

单菌落做纯化培养。再利用 Na₂S₂O₃ 无机盐液体培养基对初筛出的菌株进行复筛, 在 31 ℃、180 r·min⁻¹ 的恒温摇床培养箱中培养 48 h, 利用铬酸钡分光光度法测定培养基内 SO₄²⁻ 浓度^[6], 选出氧化能力最高的一株菌株进行后续研究。

显微镜观察菌体形态, 参照微生物学试验、《常见细菌系统鉴定手册》^[7]和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[8]对筛选菌株进行初步的形态学鉴定。提取菌株的总基因组 DNA 作为模板, 使用细菌 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGTTACCTTGTTACGAC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 25 μL, 热循环参数如下: 94 ℃预变性 3 min, 再以 94 ℃变性 1 min、55 ℃退火 1 min、72 ℃延伸 2 min 为循环, 循环 30 次后, 72 ℃延伸 10 min。通过琼脂糖凝胶电泳回收目的条带, 并与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 的感受态细胞, 菌落 PCR 验证后, 将其送至上海生工进行测序, 所得序列提交 NCBI, 并和相关种属进行比对分析, 构建系统进化树 (Mega 5.0)^[9]。

1.3 堆肥实验方案

实验设计为单因素 4 水平 3 重复。将猪粪与秸秆粉按 10:3 混合^[10], 分别装入各组通气发酵桶中, 发酵桶示意图如图 1。向其中三组桶中分别加入 100、200、300 mL 菌株 AM2 培养 3 d 的培养液, 剩下一组加入 200 mL 的无菌 Na₂S₂O₃ 无机盐培养基作为对照, 每 5 d 彻底翻堆一次, 堆肥实验进行 30 d。将温度传感器放入距堆肥反应器底 15 cm 处, 设定每天记录一次堆肥温度。固体样品采样在堆肥实验开始以及每次翻堆后一天, 按照五点采样法在堆体深约 15 cm 处采样, 分别在牛肉膏培养基、马丁氏培养基和高氏一号培养基上通过平板计数法^[11]测量细菌、真菌和放线菌数量。

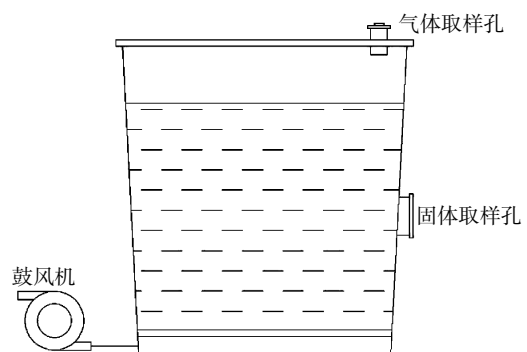


图1 发酵桶示意图

Figure 1 Composting reactor

1.4 样品分析方法

气体样品使用 0.5 L 铝塑复合膜气体采样袋(大连海得科技有限公司),开启鼓风机在取样口充放气 3 次再取样。用装有火焰光度检测器(FPD)的气相色谱(Agilent 7890A 气相色谱仪,毛细管色谱柱 Agilent CP-Sil 5 CB for Sulfur Column 30 m×0.32 mm)检验样品中 DMS 含量,按照文献[12]操作。DMS 减排率=(对照平均值-实验平均值)/对照平均值。

脲酶活性:苯酚-次氯酸钠比色法^[13],以 1 g 土壤中脲酶在 37 ℃环境下 24 h 内分解尿素所产生的 NH₃-N 的质量表示,单位为 mg NH₃-N·g⁻¹·h⁻¹。脱氢酶^[14]:TTC 法,在 1 g 土壤悬浊液中加入氯化三苯基四氮唑(TTC),24 h 后测量所生成的三苯基甲臜(TF)的含量,单位为 μg TF·g⁻¹·h⁻¹。过氧化氢酶^[15]:紫外分光光度法,以 1 g 土壤在 20 min 内所分解的 H₂O₂ 质量表示,单位为 mg H₂O₂·g⁻¹·20 min⁻¹。蛋白酶:利用 1 g 土壤在 1 min 内水解酪蛋白所生成的酪氨酸质量表示蛋白酶的活力,生成 1 μg 酪氨酸为一个酶活单位, U·g⁻¹^[13]。纤维素酶^[13]:在 1 g 土壤悬浊液中加入过量的羧甲基纤维素钠,50 ℃培养 24 h,测量所生成的葡萄糖质量来表征纤维素酶酶活,单位为 mg Glu·g⁻¹·d⁻¹。

利用 SPSS20.0 软件在 95%的置信区间下对各组进行方差分析,检验各组数据间的差异性。数据整理与作图利用 Excel 软件。

2 结果与分析

2.1 菌种分离与鉴定

从活性污泥中筛选出 5 株菌能够在 Na₂S₂O₃ 无机盐培养基上生长,分别标记为 AM1、AM2、AM3、AM4 和 AM5。经单因素方差分析得出,菌株 AM2 的发酵液中 SO₄²⁻含量平均值最大、标准差最小且与其他各菌差异明显($P<0.05$),如表 2 所示,表明 AM2 的氧化硫能力最强且稳定。将其选出进行后续研究,其最适生

表 2 培养 3 d 后 SO₄²⁻含量

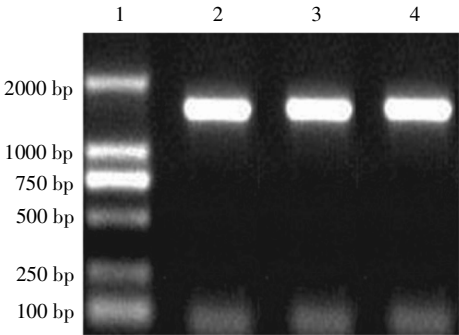
Table 2 SO₄²⁻ concentrations in compost after 3 days of culture

菌种	AM1	AM2	AM3	AM4	AM5
SO ₄ ²⁻ /g·L ⁻¹	3.7±0.11c	4.6±0.07d	2.7±0.15a	3.3±0.17bc	3.1±0.23ab

注:英文字母相同者表示在 0.05 水平上无显著差异。

长条件为 30 ℃、pH 7.0。

提取菌株 AM2 总基因组进行 PCR 扩增,PCR 电泳结果如图 2 所示。凝胶电泳回收扩增序列,得到一段 1468 bp 长度的 16S rDNA,所获序列提交 Genbank 进行 BLAST。对 BLAST 结果进行分析,通过 Mega 5.0 软件构建系统发育树如图 3,发现菌株 AM2 与 *Thiobacillus* 属中的模式种 *Thiobacillus neapolitanus* CIP 104769(JN175334)同源率为 100%。结合形态特征鉴定结果,最终将菌株 AM2 鉴定为那不勒斯硫杆菌(*Thiobacillus neapolitanus*)。



1.marker; 2.3.4 为 3 个平行样

图 2 菌株 AM2 的 16S rDNA PCR 扩增结果

Figure 2 PCR amplification results of 16S rDNA in strain AM2

2.2 菌株 AM2 对 DMS 排放量的影响

DMS 排放情况如图 4 所示。对照组与加菌各组的 DMS 排放量差异显著($P<0.05$)。在第 5 d 对照组 DMS 排放量开始大幅上升,说明在堆肥前 5 d DMS 就已经开始在堆体中大量积累,至第 10 d 对照组达到最大值 16.3 mg·m⁻³。而接菌各组 DMS 的排放量在

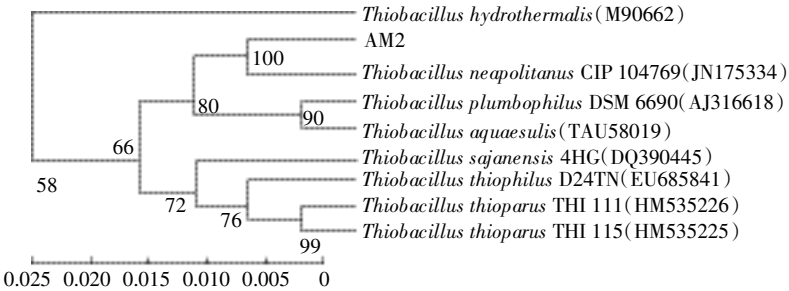


图 3 菌株 AM2 系统进化树

Figure 3 Neighbor-joining tree based on 16S rDNA sequences of strain AM2

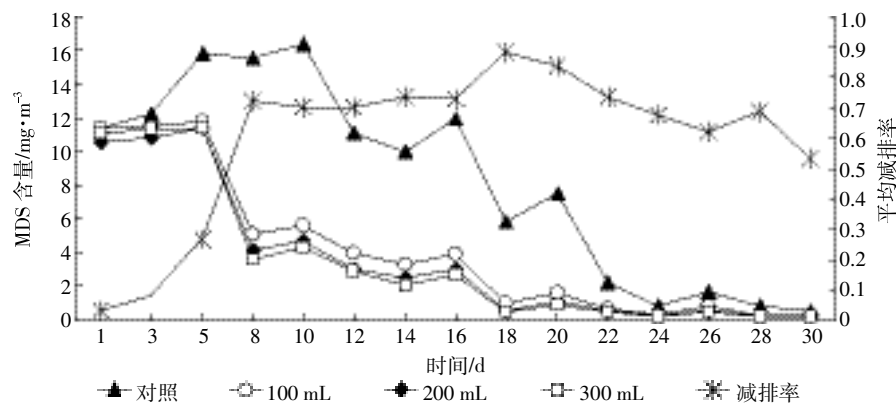


图 4 菌株 AM2 对堆肥过程中 DMS 排放量的影响

Figure 4 Effect of strain AM2 on DMS emissions during composting process

前5 d 没有明显波动并在第 5 d 之后开始下降。在第 8~15 d 期间, 100 mL 组 DMS 释放量显著高于($P<0.05$)200 mL 和 300 mL 组, 但仍显著低于($P<0.05$)对照组; 200 mL 和 300 mL 组之间差异不明显($P>0.05$), 但是 300 mL 组平均值更小。说明菌株 AM2 的添加对减少 DMS 的释放有明显的作用, 就本实验而言, 各接菌量之间差异并不明显, 因此取接菌各组减排率的平均值。从堆肥反应的第 8 d 开始到第 28 d, 接菌各组的 DMS 气体平均减排率一直保持在 60% 以上。

2.3 菌株 AM2 对可培养微生物数量的影响

可培养微生物数量变化见表 3。细菌多为单细胞存在^[16]、比表面积大、繁殖快, 所以细菌在整个堆肥过程数量始终占有绝对优势。有研究认为真菌对高温耐性较低^[17], 所以其数量最少。接菌各组的细菌数和真菌数的高峰期均提前了 5 d, 且保持时间较对照组也有所延长。嗜热放线菌在高温肥堆中活性较高^[18], 所

以数量高于真菌。接菌各组和对照组放线菌数量都在第 16 d 达到最大值。接菌各组可培养微生物数量之间差异不显著($P>0.05$), 但均显著高于对照组($P<0.05$)。

2.4 菌株 AM2 对堆肥温度的影响

图 5 为接菌各组与对照组在堆肥反应器中的温度及环境温度变化情况。在每次翻堆之后温度都有一次明显的上升, 且接菌各组能达到更高的最大值。接菌各组之间差异不显著($P>0.05$), 但整个堆肥过程中对照组堆体温度明显小于($P<0.05$)接菌的三组。堆体温度主要来自于微生物新陈代谢的生物热, 较高的堆体温度表明生物的活性较高^[19], 说明 AM2 能够提高堆体的生物活性。

2.5 菌株 AM2 对堆肥酶活性的影响

2.5.1 脱氢酶

各组脱氢酶酶活随发酵时间变化趋势如图 6 所示。接菌的三组和对照组变化趋势有明显的差异($P<0.05$), 但接菌各组之间差异不显著($P>0.05$), 100、

表 3 可培养微生物数量变化

Table 3 Changes in population of culturable microbes

微生物	接种量/mL	第 0 d	第 6 d	第 11 d	第 16 d	第 21 d	第 26 d	第 30 d
细菌 $\times 10^9$ cfu $\cdot g^{-1}$	100	3.2 $\pm$ 0.17	8.1 $\pm$ 0.28	7.1 $\pm$ 0.14	4.5 $\pm$ 0.12	3.2 $\pm$ 0.15	2.9 $\pm$ 0.15	2.5 $\pm$ 0.13
	200	3.1 $\pm$ 0.11	8.5 $\pm$ 0.23	7.3 $\pm$ 0.17	4.5 $\pm$ 0.26	3.3 $\pm$ 0.18	2.8 $\pm$ 0.28	2.5 $\pm$ 0.03
	300	3.2 $\pm$ 0.13	8.8 $\pm$ 0.16	7.9 $\pm$ 0.23	4.6 $\pm$ 0.21	3.3 $\pm$ 0.23	3.1 $\pm$ 0.14	2.5 $\pm$ 0.17
	对照	3.1 $\pm$ 0.15	5.9 $\pm$ 0.21	6.3 $\pm$ 0.19	3.3 $\pm$ 0.28	2.7 $\pm$ 0.12	2.5 $\pm$ 0.23	2.3 $\pm$ 0.18
真菌 $\times 10^3$ cfu $\cdot g^{-1}$	100	3.8 $\pm$ 0.18	3.3 $\pm$ 0.21	6.2 $\pm$ 0.29	5.6 $\pm$ 0.32	3.1 $\pm$ 0.28	2.8 $\pm$ 0.13	2.2 $\pm$ 0.12
	200	3.8 $\pm$ 0.13	3.2 $\pm$ 0.17	6.3 $\pm$ 0.21	5.7 $\pm$ 0.29	3.1 $\pm$ 0.21	2.8 $\pm$ 0.16	2.2 $\pm$ 0.26
	300	3.8 $\pm$ 0.19	3.5 $\pm$ 0.17	6.3 $\pm$ 0.19	5.7 $\pm$ 0.18	3.1 $\pm$ 0.17	2.8 $\pm$ 0.21	2.2 $\pm$ 0.23
	对照	3.8 $\pm$ 0.11	2.5 $\pm$ 0.28	3.9 $\pm$ 0.25	4.8 $\pm$ 0.23	2.5 $\pm$ 0.16	2.2 $\pm$ 0.11	2.1 $\pm$ 0.18
放线菌 $\times 10^5$ cfu $\cdot g^{-1}$	100	3.1 $\pm$ 0.19	3.4 $\pm$ 0.12	5.7 $\pm$ 0.13	7.6 $\pm$ 0.20	5.5 $\pm$ 0.16	5.1 $\pm$ 0.13	4.6 $\pm$ 0.17
	200	3.2 $\pm$ 0.21	3.3 $\pm$ 0.18	5.8 $\pm$ 0.10	7.7 $\pm$ 0.17	5.5 $\pm$ 0.13	5.1 $\pm$ 0.12	4.6 $\pm$ 0.13
	300	3.2 $\pm$ 0.11	3.3 $\pm$ 0.14	5.8 $\pm$ 0.11	7.7 $\pm$ 0.14	5.6 $\pm$ 0.11	5.2 $\pm$ 0.10	4.6 $\pm$ 0.17
	对照	3.2 $\pm$ 0.20	3.1 $\pm$ 0.12	5.5 $\pm$ 0.15	7.5 $\pm$ 0.12	5.3 $\pm$ 0.16	5.1 $\pm$ 0.08	4.6 $\pm$ 0.11

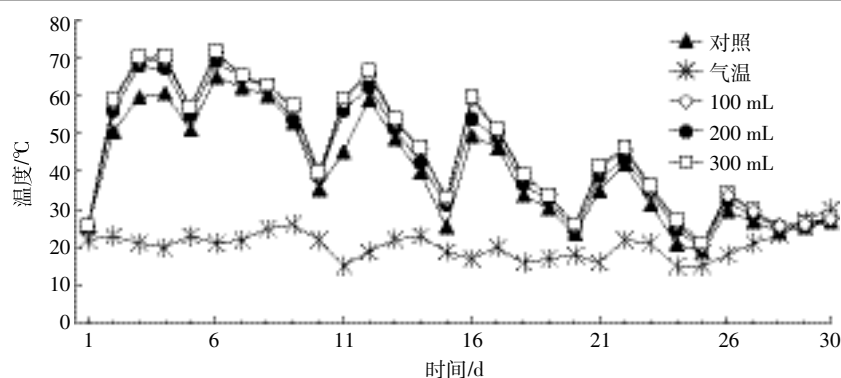


图5 菌株 AM2 对堆肥温度的影响

Figure 5 Effect of strain AM2 on temperature during composting process

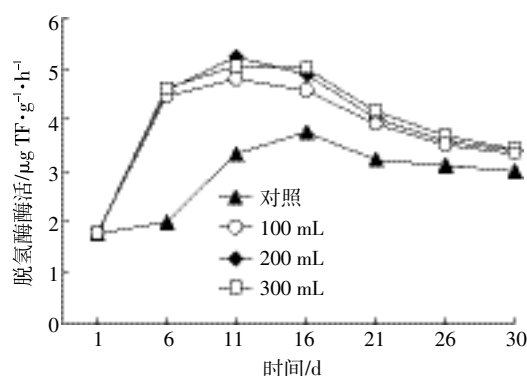


图6 脱氢酶酶活变化趋势

Figure 6 Changes of dehydrogenase activity during composting process

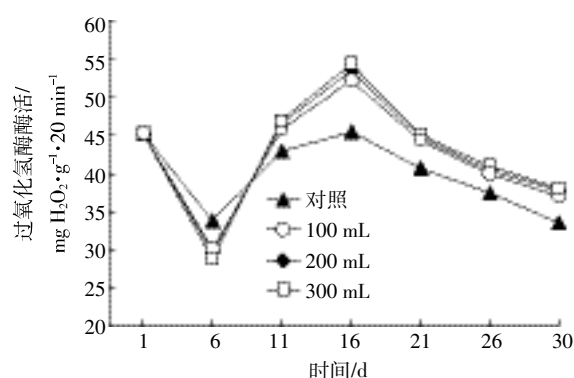


图7 过氧化氢酶酶活变化趋势

Figure 7 Changes of catalase activity during composting process

200、300 mL 组脱氢酶酶活第 6 d 时迅速上升并在第 11 d 达到最高值,分别是 4.798、5.229、5.053 $\mu\text{g TF}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。第 6 d 脱氢酶酶活的上升可能与第 5 d 翻堆使产脱氢酶的微生物数量回升有关,并且脱氢酶酶活的升高与 DMS 释放大量减少出现在同一时间点上,推测 AM2 氧化 DMS 时需要脱氢酶的参与。对照组脱氢酶酶活则在第 16 d 达到最大值 3.762 $\mu\text{g TF}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。在第 16 d 之后各组都开始缓慢下降。

2.5.2 过氧化氢酶

各组过氧化氢酶酶活随时间的变化如图 7 所示。在第 6 d 下降到最低点,100、200、300 mL 组和对照组分别为 30.0、29.6、28.7、33.8 $\text{mg H}_2\text{O}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot 20\text{ min}^{-1}$ 。在堆体高温期时实验各组有更高的温度,所以过氧化氢酶酶活要小于对照组,在第 16 d 各组的过氧化氢酶酶活均达到最大值,100、200、300 mL 组和对照组分别为 52.1、53.4、54.3、45.5 $\text{mg H}_2\text{O}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot 20\text{ min}^{-1}$ 。除在第 6 d 对照组要明显高于($P<0.05$)接菌的三组之外,其余时间接菌组都要明显高于($P<0.05$)对照组,而接菌各组之间没有明显的差异($P>0.05$)。

2.5.3 脲酶

各组脲酶酶活整体趋势如图 8 所示,呈现先下降后上升最后下降并趋于平稳。脲酶酶活的最小值和最大值分别出现在第 6 d 和第 16 d,100、200、300 mL 组和对照组的最小值分别是 0.351、0.362、0.332、0.412 $\text{mg NH}_3\text{-N}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,最大值分别是 0.683、0.718、0.701、0.573 $\text{mg NH}_3\text{-N}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。至第 11 d 时接菌的三组脲酶酶活已经反超对照组,并在之后的过程中一直明显高

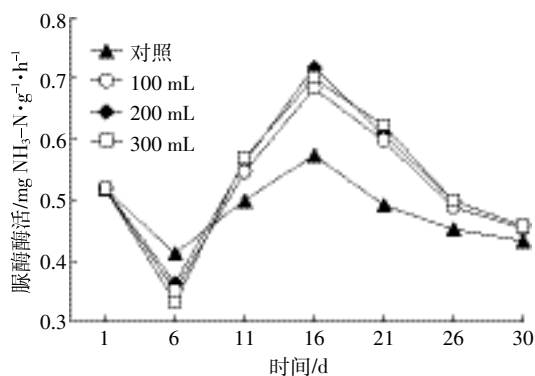


图8 脲酶酶活变化趋势

Figure 8 Changes of urease activity during composting process

于($P<0.05$)对照组,接菌各组之间没有明显的差异($P>0.05$)。

2.5.4 蛋白酶

各组蛋白酶酶活的变化趋势如图9所示。第6d是各组蛋白酶酶活的最低点,各组之间没有明显差异($P>0.05$)。第11d之后接菌的三组开始显著高于($P<0.05$)对照组,但接菌各组之间差异不显著($P>0.05$)。酶活最大值出现在第16d,100、200、300 mL组和对照组分别是23.8、24.3、23.6、18.8 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

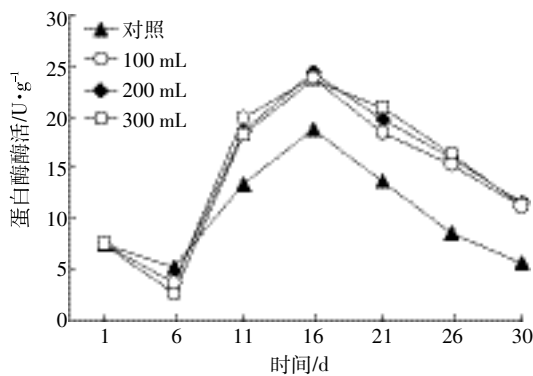


图9 蛋白酶酶活变化趋势

Figure 9 Changes of protease activity during composting process

2.5.5 纤维素酶

各组纤维素酶酶活的变化趋势如图10所示。在第6d各组均下降至最小值,但对照组显著高于接菌各组。在第16d各组均达到最大值,100、200、300 mL组和对照组分别为7.6、7.9、8.1、6.9 $\text{mg Glu}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,接菌各组之间没有差异($P>0.05$),但均显著高于($P<0.05$)对照组。在第21d之后接菌各组与对照组之间差异不显著($P>0.05$)。

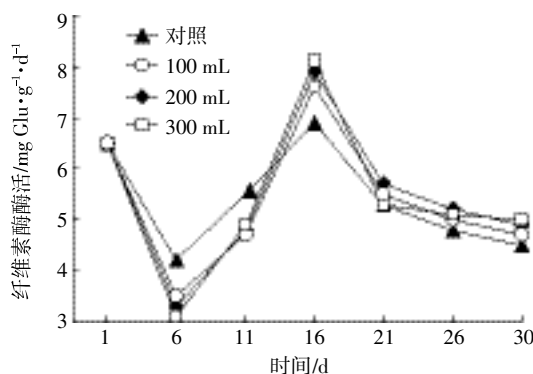


图10 纤维素酶酶活变化趋势

Figure 10 Changes of cellulase activity during composting process

3 讨论

二甲基硫醚(DMS)的释放与蛋白质的分解密切相关^[20],不添加外源微生物的对照组会在第一次翻堆后达到DMS的释放高峰,而添加AM2的三个实验组在翻堆之后DMS的释放量只有小幅的增加。这说明DMS气体主要积累于堆体内部,翻堆使之大量外泄,与Dai等^[1]的实验结果相符。因为堆体小且添加了秸秆粉使物料堆的通气性能满足AM2的生长需求,DMS在添加AM2的各组堆体中被氧化,所以在翻堆时没有大量的DMS外泄。在第6d时实验各组的脱氢酶酶活要显著高于对照组($P<0.05$),同时实验各组的DMS释放量也要显著低于对照组($P<0.05$)。脱氢酶是氧化酶类,而那那勒斯硫杆菌的硫代谢特性是将低价硫氧化成硫单质或 SO_4^{2-} ^[21],据此推测脱氢酶有可能参与到DMS的转化利用中。

发酵时堆体温度能在一定程度上反映微生物活动状况,温度越高说明微生物活性越高。实验各组在试验中堆体温度均显著高于对照组($P<0.05$),同时实验各组的脱氢酶在实验前期就显著高于对照组,推测外源微生物AM2的加入使脱氢酶酶活升高,一方面参与DMS的转化,另一方面参与其他有机物的分解而产生更多生物热。实验各组均有13d温度达到 50°C 以上,而对照组只有9d,虽然都达到无害化标准^[22],但实验组的高温保持得更长,可将无害化进行得更彻底,而且其中有12d在 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 之间,这是大多数菌适宜的发酵温度^[23],所以实验组的高温发酵更有助于肥料腐熟。

微生物是肥料发酵的主体,在第3~4d堆体经历了第一次高温,在此期间有大部分非耐热微生物被杀死,从而选择出耐热菌,此时微生物总数迅速下降。在第5d时对堆体的充分翻堆使温度迅速下降,含氧量也迅速增加,此时为微生物数量的回升提供了一次短暂的机会,相应地细菌数量在第6d时较实验开始有所增加。因为AM2有效减少了有抑菌作用^[3]的DMS的产生,所以实验各组的细菌数一直显著高于对照组($P<0.05$),说明AM2的添加促进了细菌数量的增加。真菌的数量在第6d都有所下降,说明第5d的翻堆没有使真菌恢复至开始水平,同时对照组在第6d处于DMS释放的高峰期,其真菌数量受温度和DMS的双重制约,因而显著低于($P<0.05$)接菌的各组,直到度过高温期和DMS释放高峰期才在第16d达到数量的最高值,而且仍然低于同期的接菌各组。各组的

放线菌数量差异不显著($P>0.05$),说明放线菌对DMS有一定抗性。但是由于细菌和真菌的差异导致接菌的各组堆体温度、酶活性、菌体活性等理化生指标都优于对照组,致使放线菌数量在第6~21 d略高于对照组。

堆肥中的酶活性决定着微生物分解有机物的能力^[24],所以堆肥过程中酶活性的变化趋势可以作为堆肥进程的指向性指标。有机物的降解多为脱氢氧化过程,脱氢酶和过氧化氢酶都是氧化酶类,可以用来表征微生物降解有机物的活性^[25]。在堆肥初期脱氢酶酶活有所上升,而此时的DMS释放量下降明显,可能与添加的菌株AM2氧化DMS有关。过氧化氢酶的下降与堆体的高温有关,高温抑制了产过氧化氢酶微生物和酶本身的活性^[26]。脲酶活性先降后升,与谭小琴等^[27]的结果相符,脲酶酶活与微生物量呈正相关^[27],脲酶酶活在最低时微生物量也处于较低水平,而到第16 d左右,三大类微生物含量和脲酶酶活均在最高时期,并且接菌各组都要显著高于对照组,说明接入的AM2能够促进微生物生长。蛋白酶酶活在第11~21 d活性最大,可能与此时蛋白质快速分解有关。纤维素酶对堆体中C/N有很大的影响,可能由于实验各组有较高的堆体温度,在实验前期纤维素酶酶活要低于对照组,而只在第16 d时高于对照组,说明AM2对纤维素酶影响不大。

4 结论

从活性污泥中得到一株能够在 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 无机盐培养基上生长的菌株AM2,通过对其16S rDNA序列分析,确定为那不勒斯硫杆菌(*Thiobacillus neapolitanus*)。通过堆肥实验证实AM2能够有效减少DMS的释放量,增强有关酶活性,促进肥料的腐熟。

参考文献:

- [1] Dai H, Kazutaka, Koremoto M, et al. Key odor components responsible for the impact on olfactory sense during swine feces composting[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(7):2306-2310.
- [2] 龚元新. 二甲硫醚废气的综合处理技术[J]. 宁波化工, 2010(2):37-40.
GONG Yuan-xin. Comprehensive treatment technology for Dimethyl sulfide[J]. *Ningbo Chemical Industry*, 2010(2):37-40.
- [3] Wang X H, Zhang Y, Peng X R, et al. Isolation and characteristics of a bacterial strain for deodorization of dimethyl sulfide[J]. *Environmental Sciences*, 2011, 11:1189-1196.
- [4] Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 67(12):192-211.
- [5] Vikromvarasiri N, Pisutpaisal N. Potential application of halothiobacillusneapolitanus for hydrogen sulfide removal in biogas[J]. *Energy Procedia*, 2014, 61:1219-1223.
- [6] 国家环境保护总局. 水质硫酸盐的测定铬酸钡分光光度法(试行)[S]. 北京:中国环境科学出版社, 2007.
State Environmental Protection Administration. Water quality-determination of sulfate-barium chromate spectrophotometry[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2007.
- [7] 东绣珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 2001.
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Identification manual of common bacterial[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [8] Holt G J, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1994.
- [9] Prakasha B, Vidyasagara M, Madhukumar M S, et al. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerantthermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(2):210-215.
- [10] 汪珍川, 谢桂先, 刘强, 等. 猪粪添加稻草对高温堆肥腐熟进程及物质变化的影响[J]. 农业现代化研究, 2015, 36(2):309-314.
WANG Zhen-chuan, XIE Gui-xian, LIU Qiang, et al. Impacts of rice straw addition in pig manure on decomposition progress and nutrient change in thermophilic composting process[J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2015, 36(2):309-314.
- [11] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.2—2010 食品安全国家标准食品微生物学检验:菌落总数测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2010.
Ministry of Health of PRC. GB 4789.2—2010 National food safety standard food microbiological examination: Aerobic plate count[S]. Beijing: China Standards Press, 2010.
- [12] 黄昆, 曾立民, 于雪娜, 等. 大气中二甲基硫在线监测技术研发[J]. 环境化学, 2013, 32(11):2162-2169.
HUANG Kun, ZENG Li-min, YU Xue-na, et al. The online monitoring technology research of dimethyl sulfur in the atmosphere[J]. *Environmental Chemistry*, 2013, 32(11):2162-2169.
- [13] 胡红伟, 李吕木, 钱坤, 等. 发酵菌剂接种量对堆肥理化性质和有关酶活的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(6):1261-1270.
HU Hong-wei, LI Lü-mu, QIAN Kun, et al. Effect of doses of fermentation inoculum on physico-chemical properties and related enzymic activities during the composting process[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(6):1261-1270.
- [14] 戴濡伊, 吴季荣, 徐剑宏, 等. 小麦根际土壤脱氢酶活性测定方法的改进[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(4):772-776.
DAI Ru-yi, WU Ji-rong, XU Jian-hong, et al. Improvement of determination dehydrogenase activity in wheat rhizospheric soil[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(4):772-776.
- [15] 杨兰芳, 曾巧, 李海波, 等. 紫外分光光度法测定土壤过氧化氢酶活性[J]. 土壤通报, 2011, 42(1):207-210.
YANG Lan-fang, ZENG Qiao, LI Hai-bo, et al. The ultraviolet spectrophotometric method determination of soil catalase activity[J]. *China*

- nese *Journal of Soil Science*, 2011, 42(1):207-210.
- [16] 曾光明, 黄国和. 堆肥环境微生物与控制[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- ZENG Guang-ming, HUANG Guo-he. Composting environmental microbiology and control[M]. Beijing: Science Press, 2006.
- [17] 邓辉, 王成, 吕豪豪, 等. 堆肥过程放线菌演替及其木质纤维素降解研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(4):581-586.
- DENG Hui, WANG Cheng, LÜ Hao-hao, et al. Research progress in succession of actinomycetal communities and their capacity of degrading lignocellulose during composting process[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2013, 19(4):581-586.
- [18] Xiao Y, Zeng G M, Yang Z H, et al. Changes in the actinomycetal communities during continuous thermophilic composting as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative PCR[J]. *Biore-sour Technology*, 2011, 102(2):1383-1388.
- [19] 刘长莉, 李娜, 王宝鑫, 等. 添加菌剂制作堆肥的肥效及菌群多样性分析[J]. 中国农学通报, 2015, 31(8):145-153.
- LIU Chang-li, LI Na, WANG Bao-xin, et al. Analysis on fertilizer efficiency and microbial diversity of compost with bacterium agent[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(8):145-153.
- [20] Higgins M J, Adams G, Chen Y C, et al. Role of protein, amino acids, and enzyme activity on odor production from anaerobically digested and dewatered biosolids[J]. *Water Environment Research*, 2008, 80(2):127-135.
- [21] Solciaa R B, Ramírez M, Fernández M, et al. Hydrogen sulphide removal from air by biotrickling filter using open-pore polyurethane foam as a carrier[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 84:1-8.
- [22] 中华人民共和国卫生部. GB 7959—1987 粪便无害化卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1988.
- Ministry of Health of PRC. GB 7959—1987 Sanitary standard for the non-hazardous treatment of night soil[S]. Beijing: China Standards Press, 1988.
- [23] 李怨艳, 李吉进. 高温堆肥温度变化及无害化效果试验[J]. 蔬菜, 2013(2):52-56.
- LI Shu-yan, LI Ji-jin. The temperature change of high temperature compost and testing the effect of harmless[J]. *Vegetables*, 2013(2):52-56.
- [24] kaplan H, Ratering S, Hanauer T, et al. Impact of trace metal contamination and *in situ* remediation on microbial diversity and respiratory activity of heavily polluted kastanozems[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2014, 50(5):735-744.
- [25] 谭小琴, 邓良伟, 伍钧, 等. 猪场废水堆肥过程中生物及酶活性的变化[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(1):244-248.
- TAN Xiao-qin, DENG Liang-wei, WU Jun, et al. Variation of the amount of microbe and the activity of decomposing enzyme during composting[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(1):244-248.
- [26] Sonia M, Nahla L, Ons T. Ameliorative effect of municipal solid waste compost on the biological quality of mediterranean salt lake soil[J]. *Compost Science & Utilization*, 2010, 18(4):242-248.
- [27] Haritha D S, Vijayalakshmi K, Jyotsna K P, et al. Comparative assessment in enzyme activities and microbial populations during normal and vermicomposting[J]. *Journal of Environmental Biology*, 2009, 30(6):1013-1017.