

一株二甲基二硫醚降解菌的筛选、鉴定与降解性能

丁军, 吴洪生, 孙倩, 王娜, 程诚, 石陶然, Muhammad Faheem, 倪妮, 田伟, 吴云成, 单正军

引用本文:

丁军, 吴洪生, 孙倩, 王娜, 程诚, 石陶然, Muhammad Faheem, 倪妮, 田伟, 吴云成, 单正军. 一株二甲基二硫醚降解菌的筛选、鉴定与降解性能[J]. *农业环境科学学报*, 2022, 41(3): 622-630.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0876>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

花生化感物质降解菌的筛选、鉴定与降解特性研究

钱娜, 王小兵, 汪晓丽, 封克, 陈盾, 苏金成, 崔梦涵

农业环境科学学报. 2019, 38(6): 1288-1295 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1358>

一株DMP降解菌的分离鉴定及特性研究

徐伟慧, 刘帅, 王志刚

农业环境科学学报. 2018, 37(8): 1724-1732 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0089>

毒死蜱降解菌降解特性及其降解条件优化

杜晓敏, 王金花, 朱鲁生, 王军, 杨莉莉, 林琳

农业环境科学学报. 2020, 39(10): 2437-2445 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0212>

一株草甘膦高效降解菌的筛选和表征研究

王天廓, 温玉娟, 杨悦锁, 路莹, 张茜, 曹楠, 孙东

农业环境科学学报. 2021, 40(3): 591-599 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1404>

邻苯二甲酸酯降解菌的筛选、降解特性及土壤修复研究

杨婧, 郭楚玲, 刘沙沙, 党志, 卢桂宁

农业环境科学学报. 2018, 37(5): 933-940 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1689>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

丁军, 吴洪生, 孙倩, 等. 一株二甲基二硫醚降解菌的筛选、鉴定与降解性能[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(3): 622–630.

DING J, WU H S, SUN Q, et al. Screening, identification, and degradation performance of a dimethyl disulfide degrading strain[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(3): 622–630.



开放科学 OSID

一株二甲基二硫醚降解菌的筛选、鉴定与降解性能

丁军¹, 吴洪生^{1*}, 孙倩¹, 王娜^{2*}, 程诚¹, 石陶然¹, MuhammadFaheem¹, 倪妮², 田伟², 吴云成², 单正军²

(1. 南京信息工程大学应用气象学院农业资源与环境系, 南京 210044; 2. 生态环境部南京环境科学研究所, 南京 210012)

摘要: 为了能够得到高效降解二甲基二硫醚(Dimethyl disulfide, DMDS)的菌种资源, 降低其残留在环境中带来的不利影响, 从苏州某废弃农药厂附近的土壤中分离、纯化出一株能够降解DMDS的细菌, 并对该细菌进行分子生物学和生理生化鉴定, 研究其在不同的初始浓度、转速、pH、温度及外加碳氮源条件下的降解性能。结果表明: 将分离纯化得到的DMDS降解菌命名为SZT-1, 经过表型分析及16S rDNA基因序列同源性比对鉴定, 该菌株序列与芽孢杆菌属(*Bacillus* Cohn)有98%以上的同源性。SZT-1菌株可以在以DMDS为唯一碳源的无机盐培养基中生长, 56 h后进入生长稳定期。经摇床接种培养和一级动力学分析, 接种SZT-1可以有效提高DMDS的降解速率, 使其半衰期由346.5 h缩短至86.6 h; 通过单因素环境条件分析, 该菌株在DMDS初始浓度为250 mg·L⁻¹, 转速为130 r·min⁻¹, pH为5, 温度为30 ℃, 外加碳源为淀粉, 外加氮源为蛋白胨时, 对DMDS的降解效果最佳, 降解率达50%。试验首次提出了SZT-1对DMDS具有一定的降解效果, 在进行相关技术完善后, 有望用于治理土壤、地下水中DMDS带来的危害。

关键词: 二甲基二硫醚; 降解菌; 16S rDNA; 分离; 鉴定; 降解特性

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2022)03-0622-09 doi:10.11654/jaes.2021-0876

Screening, identification, and degradation performance of a dimethyl disulfide degrading strain

DING Jun¹, WU Hongsheng^{1*}, SUN Qian¹, WANG Na^{2*}, CHENG Cheng¹, SHI Taoran¹, MuhammadFaheem¹, NI Ni², TIAN Wei², WU Yuncheng², SHAN Zhengjun²

(1. Department of Agricultural Resources and Environment, College of Applied Meteorology, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China; 2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of National Ecology and Environment of China, Nanjing 210012, China)

Abstract: To obtain dimethyl disulfide (DMDS) strain resources efficiently and reduce the adverse effects of its residues in the environment, this study isolated and purified a bacterium capable of degrading DMDS in the soil near an abandoned agricultural pharmaceutical factory in Suzhou. The molecular biology, physiological, and biochemical identification of bacteria were performed to study their degradation performance under different initial concentrations, rotational speeds, pH, temperature, and added carbon and nitrogen sources. The bacterium was named SZT-1, and the bacterial gene sequence had a 98% homology with *Bacillus* sp. based on phenotypic analysis and homology comparison using BLAST and 16S rDNA identification. The SZT-1 strain grew on a mineral medium with a sole carbon source of DMDS and reached a stable growth stage after 56 h. The strain effectively degraded DMDS based on flask-shaking culture and order 1 dynamic analysis where the halftime of DMDS degradation was decreased from 346.5 h to 86.6 h. The maximal DMDS degrading rate (approximately 50%) was measured using environmental condition single factor analysis at an initial concentration of 250

收稿日期: 2021-08-04 录用日期: 2021-10-08

作者简介: 丁军(1997—), 男, 江苏海安人, 硕士研究生, 从事土壤及地下水污染生态修复研究。E-mail: 1249092669@qq.com

*通信作者: 吴洪生 E-mail: wuhsluck@163.com; 王娜 E-mail: wangna@nies.org

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1806100)

Project supported: The National Key Research and Development Program of China(2019YFC1806100)

mg · L⁻¹ DMDS, rotation speed of 130 r · min⁻¹, pH of 5, temperature of 30 °C, exogenously addition of starch as the carbon source and peptone. To date, little is known regarding DMDS biodegradation, with the findings from this study of SZT-1 degrading DMDS the first reported. This study provides a reference for the biodegradation of VOC odor pollutants that could be used to control and decrease the harm by DMDS in the soil and groundwater environment in the future.

Keywords: dimethyl disulfide(DMDS); degrading microbe; 16S rDNA; isolation; identification; degrading characters

伴随着现代工业、农业、畜牧业、烟草业、纺织业、家具业、汽车业以及电子电气等行业的快速发展,在生产过程中产生了大量的含非甲烷烃类(烷烃、烯烃、炔烃、芳香烃)、含氯有机物、含氮有机物、含氧有机物、含硫有机物等挥发性有机污染物(VOCs)^[1-4]。这些污染物未经过系统化的处理,直接排放到环境中,使得土壤、地下水以及农作物受到严重的污染,同时也不利于人体身心健康。人体通过饮用含污染物的水,或者呼吸吸入一定浓度的VOC气体后,会出现不同程度的头痛、呕吐、乏力等症状,严重时会出现抽搐和休克,并且会伤害人的肾脏、肝脏、大脑和一些神经系统中枢,造成行动迟缓、记忆力衰退等不良后果^[5-6]。

二甲基二硫醚(Dimethyl disulfide,缩写为DMDS,分子式CH₃S₂CH₃)是一种典型的挥发性含硫有机物,是农药生产过程中的一种中间体,具有烂菜叶的腐臭味。DMDS也被列为我国《恶臭污染物排放标准》(GB 14554—1993)中限制排放的几种恶臭污染物之一。DMDS严重污染生存环境,威胁人体健康,研究其在土壤及地下水中的滞留浓度,以及自然降解的时间和动态变化,可以有效控制其污染环境的程度。环境因素如温度、水分、土壤类型、含氧量等都会对DMDS在土壤中的分布残留有显著的影响^[7-9]。针对DMDS大量排放,滞留在环境中的浓度超过限制标准问题,很多科研工作者开始寻找一种有效的降解方式。目前的降解方式主要有物理吸附、化学吸附、光催化、生物联合技术、生物过滤、臭氧降解、生物降解等^[10-14]。

生物降解具有绿色高效的特点,是通过污染环境中的土壤、水体筛选纯化出一种或者多种具有降解污染物能力的菌株,利用生物技术手段,可以改变菌株生存的环境,在最佳的生长环境下,高效降解菌可以将环境中复杂的有机污染物转化为简单的无机物,使环境中的各种元素得到循环,复杂的有机物得到降解,保持生态系统的良性循环。微生物主要是通过代谢作用降解环境中的污染物,使污染物浓度下降、毒性减轻^[15]。代谢降解过程存在两种方式:一种是微生物以污染物为唯一碳源,通过利用污染物达到降解的

效果;另一种是人为施加碳氮源,通过增加微生物的生物量,增加其对于碳氮源的需求量,使环境污染物得到一定的利用^[16-20]。

DMDS可以作为某种菌的碳源及营养来源,通过菌自身的能量消耗,达到降解DMDS的效果。但DMDS的挥发性极强,且恶臭气味十分明显,所以在室内试验时需要一定的技术手段,同时探寻一种高效的色谱条件测定DMDS的含量也极其重要。目前,生物滤塔和生物联合工艺的发展极为迅速,二者均可以利用最佳的降解环境条件,使微生物污染物降解,并可达到持续循环降解的效果^[21-23]。

本试验从苏州某农药厂附近采集土壤及地下水样品,并于室内分离纯化出能降解DMDS的微生物,研究该微生物的降解性能和环境因子对其的影响,为农田土壤及地下水中残留的异味有机污染物DMDS治理提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料样品及试剂

从苏州某废弃农药厂厂房四周选取4个点,于2 m深处取一定量的土壤样品和地下水样品进行混合,混合样放置于4 °C的冰柜中冷藏保存,作为本试验的降解菌筛选来源样品。DMDS标准品(化学式C₂H₆S₂,纯度99.3%)选购于阿尔塔科技有限公司。乙醇选用色谱级,所有使用的纯水均为艾肯水精灵制造的RO超纯水机制备。细菌总DNA提取采用索莱宝细菌基因组DNA提取试剂盒。

1.1.2 仪器与设备

试验过程中DMDS生物降解产物采用顶空-气相色谱-质谱联用仪测定,型号78908B15977A, Agilent Technologies GC System, 色谱柱: HP-5 ms-(60~325 °C): 30 m×250 μm×0.25 μm;微生物分离培养采用微电脑智能化控制隔水式恒温培养箱(GNP-9160型);微生物液体药瓶培养采用全温摇瓶柜(HYG-A型);微生物DNA扩增和检测采用PCR分析仪(上海培清科技有限公司,型号:JS-680D)。

1.1.3 培养基

无机盐培养基(MSM): 0.630 g NH_4Cl , 1.965 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g KH_2PO_4 , 1 g NaCl , 0.1 g MgSO_4 , 1 g EDTA, 超纯水 1 000 mL。用 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液或 HCl 溶液调节 pH 至 7.0。

牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 0.5 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, 超纯水 100 mL。用 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液或 HCl 溶液调节 pH 至 7.2。固体培养基加入 1.5 g 左右的琼脂。

LB 培养基: 胰化蛋白胨 1 g, 酵母提取物 0.5 g, NaCl 1 g, 超纯水 100 mL。用 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液或 HCl 溶液调节 pH 至 7.0。固体培养基加入 1.5 g 左右的琼脂。

高氏合成一号培养基: 2 g 可溶性淀粉, 0.1 g KNO_3 , 0.05 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g NaCl , 0.05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 超纯水 100 mL。用 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液或 HCl 溶液调节 pH 至 7.4。固体状态需要加入 1.5 g 的琼脂。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离纯化特征及鉴定

取 25 g 试验土样于 250 mL 锥形瓶中, 并加入 100 mL 超纯水, 放几粒玻璃珠, 在 120 r·min⁻¹、30 ℃ 的恒温摇床上振荡混匀。24 h 后, 取出锥形瓶, 静置 10 min, 吸取 0.5 mL 上清液置于提前配制好的 LB 固体培养基上, 并用涂抹玻璃棒进行四周旋转涂抹, 将所有的土样进行相同操作后, 置于恒温培养箱, 30 ℃ 倒置培养 48 h。观察平板上的菌落形态, 并且从平板上挑取不同的菌落进行单菌落分离, 涂布平板, 培养 48 h。经过连续 3 次单菌落分离纯化后, 挑取单菌落在 LB 液体培养基中培养 48 h, 待菌液浑浊, 如菌液不浑浊需再进行一轮液体富集培养直至菌液浑浊。使用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 提取后进行 PCR 扩增、凝胶电泳检测, 并将其送至基因测序公司进行 16S rDNA 基因测序, 将所得到的 16S rDNA 序列于 NCBI 数据库进行 98% 同源性比对, 确定菌名。

1.2.2 单菌体对 DMDS 的降解分析

在超净工作台上将分离纯化后的菌株, 按照 5% 的接种量接种于以 200 mg·L⁻¹ DMDS 为唯一碳源的无机盐培养基中, 用胶塞封口并裹上封口膜, 在 25 ℃、120 r·min⁻¹ 的恒温摇床上培养 72 h 后, 吸取 2 mL 待测液置于灭菌后的顶空瓶子中, 使用顶空-气相色谱-质谱联用仪进行 DMDS 扫描, 测定含量。色谱条件: 单扫描系统设置, 柱箱温度 35 ℃, 色谱柱-1 计算流量

为 1.5 mL·min⁻¹, 离子源温度为 230 ℃, MS-四极杆温度为 150 ℃, 前进样口设定值加热器 180 ℃, 压力 6.777 76 Pa, 隔垫扫吹流量为 3 mL·min⁻¹, 后进样口设定值加热器 250 ℃, 压力 11.604 Pa, 隔垫扫吹流量 3 mL·min⁻¹, 恒定流量后运行 2 mL·min⁻¹, 平衡时间为 30 min, GC 循环 15 min, 样品持续进样 0.2 min。根据降解率=(对照样品的残余含量-试验样品的残余含量)/对照样品的残余含量×100%, 确定各个单一菌体的降解率, 选择降解效果最明显的菌株作为试验菌。

1.2.3 生长曲线

将分离纯化后的菌株接种于含有 200 mg·L⁻¹ DMDS 的无机盐液体培养基中, 25 ℃、120 r·min⁻¹ 条件下摇床培养, 每个处理 3 次重复, 在不同的时间(0、2、8、16、24、32、40、48、56、64、72、80 h) 取样, 用分光光度计在 600 nm 波长下测定菌液的 OD 值, 由此确定菌株的生长曲线。

1.2.4 环境因子对菌体生长的影响

采用单因素进行有关环境因子试验, 将分离纯化后的菌株, 按照接种量为 5% 规格接种于含有 DMDS 的无机盐培养基中, 测定其同一时间的 OD₆₀₀ 和 DMDS 的浓度, 计算降解率, 比较环境因子对该菌降解 DMDS 的影响。

环境因子如下:

(1) DMDS 初始浓度: 接种 5% 体积分数的菌液于含有 50、100、150、200、250、300 mg·L⁻¹ DMDS 的无机盐培养基中, 在温度为 30 ℃、pH 为 7、转速为 120 r·min⁻¹ 的条件下培养 72 h, 设不加菌为对照, 每个处理重复 3 次。

(2) pH: 接种 5% 体积分数的菌液于含有 50 mg·L⁻¹ DMDS 的无机盐培养基中, 以 DMDS 为唯一碳源, 温度为 30 ℃, 转速为 120 r·min⁻¹, 调节 pH 为 5、7、9, 振荡培养 72 h。设不加菌为对照, 每个处理重复 3 次。

(3) 温度: 接种 5% 体积分数的菌液于含有 50 mg·L⁻¹ DMDS 的无机盐培养基中, DMDS 为唯一碳源, 在 pH 为 7, 转速为 120 r·min⁻¹ 时, 设置温度分别为 10、20、30 ℃, 振荡培养 72 h。设不加菌为对照, 每个处理重复 3 次。

(4) 转速: 接种 5% 体积分数的菌液于含有 50 mg·L⁻¹ DMDS 的无机盐培养基中, DMDS 为唯一碳源, 在 pH 为 7, 温度为 30 ℃ 时, 调节转速分别为 65、130、200 r·min⁻¹, 振荡培养 72 h。设不加菌为对照, 每个处理重复 3 次。

(5) 外加碳源: 接种 5% 体积分数的菌液于含有

50 mg·L⁻¹ DMDS的无机盐培养基中,另外同时向培养基中分别加入2 g的淀粉、葡萄糖或蔗糖,在pH为7、温度为30 ℃、转速为120 r·min⁻¹条件下,振荡培养72 h。设不加碳源为对照,每个处理重复3次。

(6)外加氮源:接种5%体积分数的菌液于含有50 mg·L⁻¹ DMDS的无机盐培养基中,外加0.1 g的蛋白胨、尿素或明胶,在pH为7、温度为30 ℃、转速为120 r·min⁻¹的条件下,振荡培养72 h。设不加氮源为对照,每个处理重复3次。

1.3 数据处理与分析

采用Excel 2010进行数据处理和图表绘制,结果表示为3个重复的平均值±标准误差。采用Mega 7.0进行细菌进化树绘制,使用SPSS 22.0进行单因素方差分析(ANOVA),置信限为95%。

2 结果与分析

2.1 菌株的鉴定

经过多次的培养纯化富集、初筛、复筛,得到一株降解能力较好的菌株SZT-1,该菌能以DMDS为唯一碳源在平板上生长(图1),平板上的菌落形态粗糙,不透明,白色微黄,隆起褶皱。在光学显微镜上进行观察(图2),SZT-1周生鞭毛,可活动,革兰氏染色为阳性。与16S rDNA测序结果在NCBI上比对的结果

表明,该菌株的序列与多种芽孢杆菌属菌株具有高度相似性,菌株系统发育进化树如图3所示。

2.2 SZT-1的生长曲线

由图4c SZT-1的生长曲线可以看出,波长为600 nm时,该菌株在32 h之前的OD值均比较低,说明菌株生长较为缓慢,一般情况下,24 h前菌株生长应该比较旺盛,生长较为缓慢可能是因为DMDS作为唯一碳源导致的。32~56 h,OD值具有迅速上升的趋势,并且在56 h达到最高值2.087,说明该菌株在经过生长迟缓期后,可以迅速进入对数生长期,如图4a和图4b所示,菌液的颜色由清亮变为黄白色。在56 h后,菌株的OD值呈现一定的下降再略上升的趋势,说明这段时间内,在DMDS被菌株降解的过程中,可能产生了某种抑制菌株生长的中间产物。

2.3 DMDS的降解动力学结果

对比自然条件下和试验条件下,200 mg·L⁻¹ DMDS在无机盐培养基中的降解效果。如表1所示,同等环境条件下,在试验终点72 h时,自然降解后的DMDS浓度为167.8 mg·L⁻¹,而加入SZT-1后,DMDS浓度仅剩109.4 mg·L⁻¹,说明SZT-1对DMDS有明显的降解效果。自然条件下,DMDS的降解比较缓慢,降解率比较低,且在72 h内降解率仅有13%左右;而在试验条件下,SZT-1对DMDS的降解率随着时间的



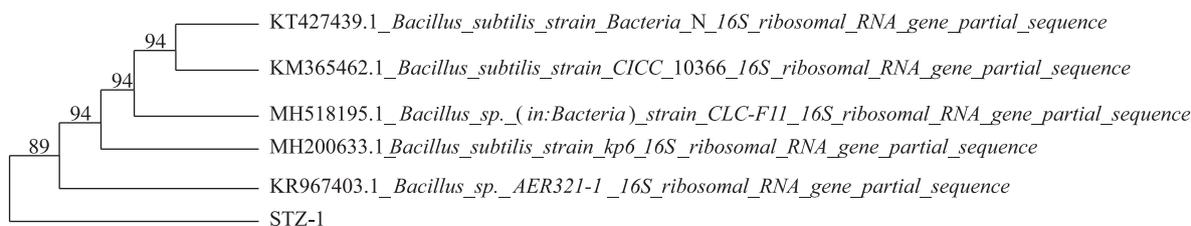
图1 SZT-1 平板菌落形态

Figure 1 SZT-1 plate colony morphology



图2 SZT-1 镜检形态(×100倍)

Figure 2 Microscopic examination of SZT-1 morphology (×100 times)



0.10

图3 SZT-1 系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of SZT-1

延长不断增加,其降解动力学曲线如图5所示,在0~42 h间,某一时刻的DMDS浓度与初始浓度之比(C_t/C_0)不断下降,在42 h时降解率达到55.7%,42~72 h趋于平稳。菌株在32 h之前的生长比较迟缓,而降解率却在平稳升高,32~56 h菌株生长进入对数生长期,而降解率增加幅度较小,综合考虑原因主要是SZT-1降解DMDS过程存在饱和临界机制,时间延长,缓慢达到饱和的降解临界,整体趋于平稳,同时也与DMDS的初始浓度相关。采用一级动力学模型进行DMDS降解过程拟合,自然条件的对照组和SZT-1的试验组的 R^2 都在0.9以上,说明拟合程度较好,符合一级动力学的发展模式,从表2可以明显看出,接种SZT-1后,DMDS的半衰期缩短至86.6 h,说明接种SZT-1可以有效提高DMDS的降解效率。

2.4 环境因子对SZT-1降解DMDS的影响

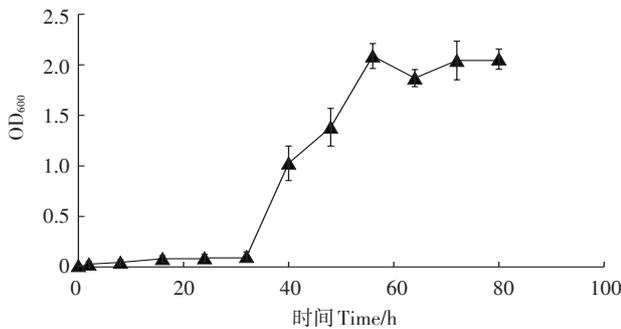
2.4.1 DMDS的初始浓度

如图6所示,在低浓度($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)DMDS时,降解



(a) 培养初期
Initial culture stage

(b) 培养后期
Late culture period



(c) 生长曲线
Growth curve

图4 SZT-1生长动态

Figure 4 Growth dynamic of SZT-1

表2 SZT-1对二甲基二硫醚降解的一级动力学曲线拟合性
Table 2 The fitness of grade 1 dynamics equation with DMDS degradation curve by SZT-1

组别 Group	一级反应模型 First order reaction model	降解速率常数 Degradation rate constant	R^2	半衰期 Half-life/h
对照CK	$y=0.960 1e^{-0.002x}$	0.002	0.901 6	346.5
SZT-1	$y=0.895 4e^{-0.008x}$	0.008	0.901 8	86.6

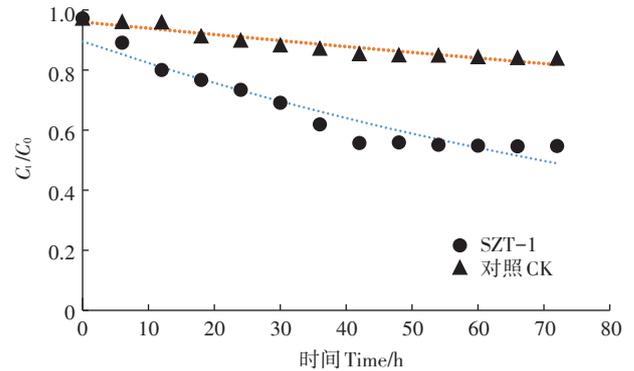


图5 二甲基二硫醚的降解动力学曲线

Figure 5 Dynamic curve of DMDS degrading

率仅为10.69%;高浓度($250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)DMDS时,降解率为60.97%,说明DMDS的初始浓度明显影响菌株对其的降解率;而在最高浓度($300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)DMDS时,出现小幅下降,此时吸光度值也有一定的下降,可能是DMDS浓度过高抑制了菌株的生长,导致降解率下降。

2.4.2 pH

如图7所示,随着pH升高,降解率降低,在pH为5的弱酸性条件下,降解率可以达到23.58%,此时的吸光度也最高,达到0.613,说明菌落生长旺盛,增强了对DMDS的降解;在pH为9的碱性条件下,降解率大幅度下降,此时吸光度值也比较小,说明菌落在碱性条件下,生长会受到抑制,不利于其对DMDS的降解。

2.4.3 温度

如图8所示,降解率和吸光度值均随着温度的升高而升高,10℃时,吸光度值为0.301,此时降解率仅有7.47%,说明低温不利于菌株的生长,导致DMDS的降解率较低;在30℃时,吸光度值和降解率较20℃时大幅度增加,说明在试验温度范围内,当温度为

表1 72 h内自然和试验条件下二甲基二硫醚的剩余浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Table 1 Residual concentration of dimethyl disulfide with and without bacteria within 72 h ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别 Group	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	42 h	48 h	54 h	60 h	66 h	72 h
对照CK	194.4	192.2.0	192	182.6	179.8	176.6	174.4	170.8	170.0	169.8	168.8	168.2	167.8
SZT-1	194.4	178.2.0	160	153.4	146.8	138.2	123.8	111.4	111.8	110.2	109.6	109.2	109.4

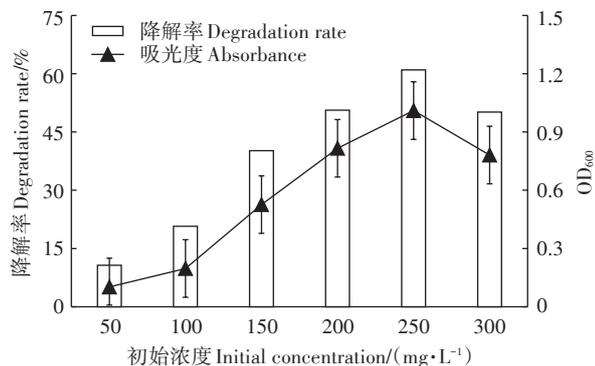


图6 DMDS初始浓度对SZT-1降解效率的影响

Figure 6 Effects of initial DMDS concentrations on the degrading of DMDS by SZT-1

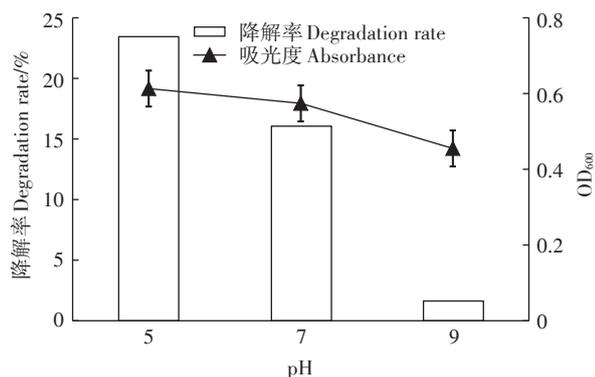


图7 pH对SZT-1降解DMDS的影响

Figure 7 Effects of pH on DMDS degrading by SZT-1

30 ℃时,菌株生长最旺盛,温度差异对降解率的影响较大。

2.4.4 转速

如图9所示,菌株对DMDS的降解率趋势与其吸光度所体现的生长曲线趋势相同。转速高低对液体摇瓶通气量有很大影响,转速不同即通气量不同会影响菌株的生长,SZT-1是好氧菌,需要充足的氧气,因此转速会影响菌株对DMDS的降解。当转速为130 r·min⁻¹时,吸光度值最大,降解率最大达到15.3%。但是极高转速条件不利于菌株生长,同时也不利于菌株对DMDS的降解。

2.4.5 外加碳源

如图10所示,对照组中,以DMDS为唯一碳源时,降解率仅4.62%,外加任何碳源后,降解率都会有一定的增加,说明外加碳源对降解率的影响较大,其中外加淀粉时菌株生长最好,降解率达到68.54%,为最优碳源。外加蔗糖时的吸光度值下降,此时菌落生长较差,但对应的降解率却达到54.96%,说明蔗糖对DMDS的降解与其菌落生长的关系影响较小,可能某

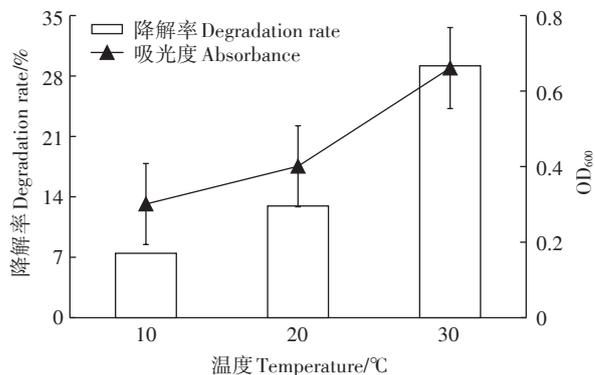


图8 温度对SZT-1降解DMDS的影响

Figure 8 Effects of temperature on DMDS degrading by SZT-1

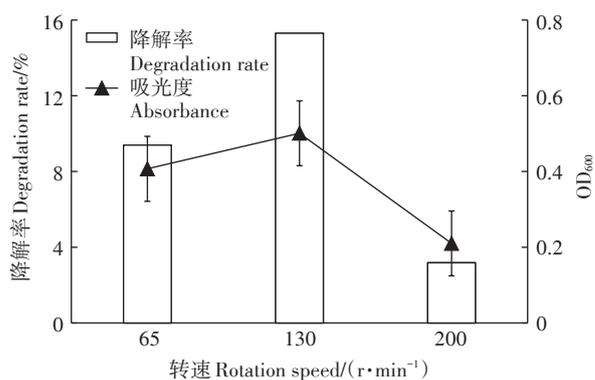


图9 转速(通气量)对SZT-1降解DMDS的影响

Figure 9 Effects of rotation per minute(aeration) on DMDS degrading by SZT-1

个降解产物抑制了菌落生长。

2.4.6 外加氮源

如图11所示,外加氮源后,菌株对DMDS的降解率都有增加,其中添加蛋白胨后,降解率为78.41%,为最佳的氮源选择。添加明胶时,吸光度明显高于其他处理,但其降解率却低于其他处理,可能是菌落快速生长,对氮源的需求量较大,明胶的添加量不足以

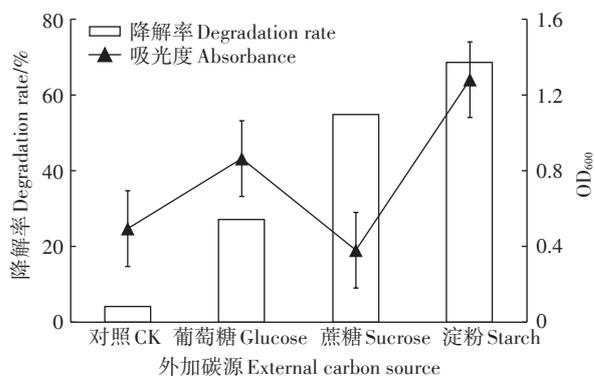


图10 外加碳源对SZT-1降解DMDS的影响

Figure 10 Effects of exogenously addition of carbon sources on DMDS degrading by SZT-1

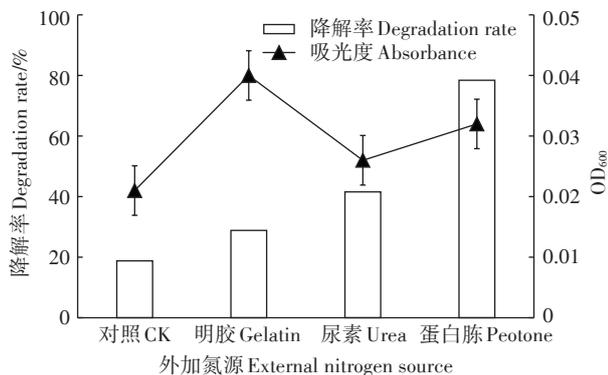


图11 外源氮源对SZT-1降解DMDS的影响

Figure 11 Effects of exogenously addition of nitrogen sources on DMDS degrading by SZT-1

支撑其凸显降解效果。

3 讨论

目前,国内外针对DMDS的生物降解研究比较少,相应的降解菌也较少。卢信等^[24]在研究有机基质诱发水体黑臭的机制时发现,添加硫酸还原菌可以使蛋氨酸快速分解DMDS,并且降解率高达95%。王集军^[25]从广州某垃圾场分离筛选出一株可同时降解乙硫醇和DMDS的高效降解菌,该菌株属于纺锤形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus*),其可在68 h对DMDS达到100%的降解效果。本研究从苏州某农药厂土壤中筛选出一株具有降解DMDS的降解菌,在试验设计的最优环境下降解率可达50%,将其命名为SZT-1,属于芽孢杆菌属(*Bacillus* Cohn)。

对于VOCs污染物的降解性,目前已有不少突破性的研究。於建明等^[26]从活性淤泥中成功筛选出一株苯乙烯高效降解菌——恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),其在温度为30℃时的降解率较高。门娟等^[27]的研究同样发现在30℃时,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)对苯乙烯的降解率较高。陈艺洋^[28]筛选出一株具有高效降解邻苯二甲酸二丁酯的菌株DNB-S1,其在pH为7、温度为30℃时降解率显著提高。以上结果与本试验的最佳降解温度一致,可以推测,对VOCs污染物的降解可以在30℃时体现出明显的优势。

樊军浩等^[29]发现枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的最适生长pH为弱酸性,本试验中的单因素分析,同样体现了在pH为5时,菌落生长较好,且此条件下的降解率也较高。宋君等^[30]在研究碳氮源对短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)的无机氮降解试验中,对比了多种碳源,发现葡萄糖作为碳源时的降解率较高。本试

验中发现,淀粉作为外加碳源时降解率比较高,这是因为降解对象不同,且微生物生长环境有所差异。王姊威等^[31]发现在无机盐培养基中加入淀粉作为唯一碳源,尿素为氮源时可以高效降解邻苯二甲酸二甲酯,这与本试验中的淀粉作为外加碳源可以提高降解率的结果相吻合,说明淀粉可以为微生物提供足够的碳源进行降解。刘娜等^[32]发现单一碳氮源的微生物培养效果远不如复合碳氮源的培养,而本试验只针对单因素分析,后期还将完善复合碳氮源的对比降解研究。

张园园等^[33]在对9种氮源对微生物生长的影响进行对比后发现,蛋白胨为唯一氮源的时候,朱红硫磺菌[*Laetiporus sulphureus* (Fr.) Murrill var. *miniatus* (Jung.) Imaz.]菌丝生长比较好,生长速度显著提高,这与本试验中以蛋白胨为唯一氮源可以提高SZT-1对DMDS的降解效果相符合。何媛媛等^[34]发现以淀粉为碳源、蛋白胨为氮源的碳氮源组合,可以使得菌活性更高、生长更旺盛。李月月等^[35]优化枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)发酵液的试验中,发现环境为弱酸性、温度为30℃、转速为150 r·min⁻¹时,发酵液中的活菌数最高,芽孢率达到84%,与本试验的转速120 r·min⁻¹、温度30℃、pH为5时,降解效果最好的结果相符合。刘韶娜等^[36]对芽孢杆菌(*Bacillus*)进行筛选试验时,同样发现温度为30℃、弱酸性条件、碳源为淀粉、氮源为蛋白胨时菌株生长最快。

孙洁等^[37]观察不同环境条件下枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的活菌数时发现,pH在3~7、温度在20~40℃时,活菌数最高,这个最适区间与本试验的最佳条件相吻合。在汤瑜婧等^[38]对枯草芽孢杆菌生长培养优化后,同样将环境设置成弱酸性、氮源设置为淀粉。在对枯草芽孢杆菌的应用降解研究中,孙玲玉^[39]则发现枯草芽孢杆菌对黄曲霉素具有一定的降解效果,枯草芽孢杆菌作为国际公认的安全饲料添加菌种,在以后的生物降解研究中也将会发挥巨大的作用。

本研究采用多重筛选、纯化的方法,从苏州某废弃农药厂的土壤中筛选出一株能够有效降解DMDS的降解菌SZT-1。该菌为芽孢杆菌属的一种,已经在市政和工业污水处理、工业循环污水处理、化粪池、畜牧养殖动物废料、臭味的处理等方面有一定的应用,是一种具有多功能的微生物。而对于SZT-1降解DMDS的研究尚未见文献报道,本试验是首次在污染土壤中分离筛选出SZT-1,单因素试验结果表明,在最佳降解条件(初始浓度为250 mg·L⁻¹、pH 5、温度30℃、转速130 r·min⁻¹、外加碳源为淀粉、氮源为蛋白

豚)下,综合评估其降解率可达到50%。根据GC-MS测定结果,STZ-1降解DMDS的最终目标产物主要为CO₂、SO₂、H₂O,可能分泌某些酶类切断C—S键,推测其中间产物含有三硫化二甲基和一些含硫基团、甲基团,由于本试验条件的限制和不足,各个单因素没有继续扩展试验,以及具体的降解中间产物研究还在进一步完善,将补充金属离子试验、Eh试验等,随着试验环境条件的继续优化,降解机制的深入研究,降解率会不断提升。综上所述,本研究结果丰富了芽孢杆菌属的生物降解应用范围,且有望应用于DMDS污染的水和土壤环境治理当中。但是目前本项工作只进行了部分环境单因子试验,没有进行广泛的多因子试验,有关该菌的最佳降解性能、野外实际降解效果和降解环境条件、环境中其他微生物的影响、降解产物的二次污染性、降解机理等还需要进一步研究。

4 结论

从苏州某废弃农药厂土壤分离纯化的芽孢杆菌SZT-1能够有效降解水中的二甲基二硫醚异味污染物,经过表型分析及16S rDNA基因序列同源性比对鉴定,该菌株序列与芽孢杆菌属有98%以上的相似性,能以二甲基二硫醚作为唯一碳源生长,在添加适当的外源碳源(淀粉)和氮源(蛋白胨),pH为5、温度30℃、转速为130 r·min⁻¹的条件下,可以大幅提高SZT-1的降解效果,最高降解效果达到50%。

致谢:本项研究得到科技部国家重点研发计划《农药行业场地异味清除材料与控制技术》(2019YFC1806100)的支持,南京信息工程大学农业资源与环境系2017级本科生刘斌文、2018级本科生张磊参与了部分试验。

参考文献:

- [1] 李小逸. 新形势下工业VOCs治理工艺选型对策[J]. 资源节约与环保, 2020(7):140-141. LI X Y. New situation of industrial VOCs management process selection countermeasures[J]. *Resource Conservation and Environmental Protection*, 2020(7):140-141.
- [2] 莫梓伟, 邵敏, 陆思华. 中国挥发性有机物(VOCs)排放源成分谱研究进展[J]. 环境科学学报, 2014, 34(9):2179-2189. MO Z W, SHAO M, LU S H. Review on volatile organic compounds (VOCs) source profiles measured in China[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(9):2179-2189.
- [3] 石磊, 边炳鑫, 赵由才, 等. 城市生活垃圾卫生填埋场恶臭的防治技术进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2005(2):6-9. SHI L, BIAN B X, ZHAO Y C, et al. Technical progress of odor pollution prevention and control in municipal solid waste sanitary landfill[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2005(2):6-9.
- [4] 丁佩. 挥发性有机物定义、监测方法等相关问题的探讨[J]. 广州化工, 2020, 48(21):32-33, 62. DING P. Discussion on definition, monitoring method and other related issues of volatile organic compounds[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2020, 48(21):32-33, 62.
- [5] 朱颖茹. VOCs挥发性有机物治理技术的应用[J]. 资源节约与环保, 2021(2):109-110. ZHU Y R. Application of VOCs treatment technology[J]. *Resource Conservation and Environmental Protection*, 2021(2):109-110.
- [6] 佟玲. VOCs治理技术概述及发展趋势[J]. 资源节约与环保, 2016(9):210-211. TONG L. VOCs governance technology overview and development trend[J]. *Resource Conservation and Environmental Protection*, 2016(9):210-211.
- [7] WANG X L, ZHANG Y, CAO A C, et al. Effects of soil type, moisture content and organic amendment rate on dimethyl disulfide distribution and persistency in soil[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 285:117198.
- [8] WANG Y, ZHOU Q R, YANG W, et al. Validation of the sample preservation and analysis of dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide in tap water and source water[J]. *Chromatographia*, 2021, 84(3):219-231.
- [9] YUN S-I, OHTA Y. Some physiological properties of microorganisms capable of deodorizing farm animal feces[J]. *Bioresource Technology*, 1997, 60(1):21-26.
- [10] 方楠, 刘晓旭, 王博, 等. GC-MS测定番茄及土壤中二甲基二硫醚残留含量的分析方法[J]. 农药, 2017, 56(3):197-199. FANG N, LIU X X, WANG B, et al. Analytical method for determination of dimethyl disulfide residues in tomato and soil by GC-MS[J]. *Agrochemicals*, 2017, 56(3):197-199.
- [11] BHADRA S, BEBARTA V S, HENDRY-HOFER T B, et al. Analysis of the soil fumigant, dimethyl disulfide, in swine blood by dynamic headspace gas chromatography-mass spectroscopy[J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1638:461856.
- [12] RAPPERT S, MULLER R. Microbial degradation of selected odorous substances[J]. *Waste Management*, 2005, 25(9):940-954.
- [13] SHAREEFDEEN Z, HERNER B, SINGH A. Biotechnology for odor and air pollution control[M]. Springer: Berlin, Heidelberg, 2005.
- [14] ANET B, COURIOL C, LENDORMI T, et al. Characterization and selection of packing materials for biofiltration of rendering odorous emissions[J]. *Water, Air & Soil Pollution*, 2013, 224(7):1-13.
- [15] LIU J W, YUE P, ZANG N N, et al. Removal of odors and VOCs in municipal solid waste comprehensive treatment plants using a novel three-stage integrated biofilter: Performance and bioaerosol emissions [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2021, 15(3):48.
- [16] LIU H J, WANG L S, ZHANG J, et al. Mechanistic insights into and modeling the effects of relative humidity on low-concentration VOCs adsorption on hyper-cross-linked polymeric resin by inverse gas chromatography[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 418:126335.
- [17] SHI Y J, LI Z M, WANG J L, et al. Synergistic effect of Pt/Ce and USY zeolite in Pt-based catalysts with high activity for VOCs degradation[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2021, 286:119936.
- [18] 杜佳辉, 刘佳, 杨菊平, 等. 生物法联合工艺治理VOCs的研究进展[J]. 化工进展, 2021, 40(5):2802-2812. DU J H, LIU J, YANG J P, et al. Recent advances in biological combined technology for VOCs

- treatment[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2021, 40(5):2802-2812.
- [19] 谢凤莲, 徐乐中, 吴鹏. 吸附-生物降解法处理含挥发性有机废水[J]. *应用化工*, 2021, 50(1):39-44. XIE F L, XU L Z, WU P. Treatment of wastewater containing volatile organic compounds by adsorption-biodegradation[J]. *Applied Chemical Industry*, 2021, 50(1):39-44.
- [20] 赵连成. 生物法处理挥发性有机废气的研究进展[J]. *现代化工*, 2021, 41(1):72-76. ZHAO L C. Advances in biological treatment of volatile organic waste gas[J]. *Modern Chemical Industry*, 2021, 41(1):72-76.
- [21] 陈雪泉. 生物滴滤和过滤技术降解含硫恶臭有机废气的研究[D]. 广州:中国科学院研究生院(广州地球化学研究所), 2016. CHEN X Q. Purification of sulfur odorous organic waste gas by biotrickling filter and biofilter[D]. Guangzhou: Chinese Academy of Sciences, 2016.
- [22] 陆李超, 贾青, 成卓韦, 等. 真菌降解挥发性有机化合物的研究进展[J]. *环境污染与防治*, 2014, 36(8):78-83. LU L C, JIA Q, CHENG Z W, et al. Research progress of fungal degradation of volatile organic compounds[J]. *Environmental Pollution and Control*, 2014, 36(8):78-83.
- [23] 崔欢, 高维常, 刘艳霞, 等. 全二维气相色谱-飞行时间质谱测定PBAT生物降解膜中挥发性有机物[J]. *分析测试学报*, 2021, 40(7):1004-1010. CUI H, GAO W C, LIU Y X, et al. Determination of volatile organic compounds in PBAT biodegradable films by headspace solid-phase microextraction combined with GC×GC-TOF MS[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2021, 40(7):1004-1010.
- [24] 卢信, 冯紫艳, 商景阁, 等. 不同有机基质诱发的水体黑臭及主要致臭物(VOSCs)产生机制研究[J]. *环境科学*, 2012, 33(9):3152-3159. LU X, FENG Z Y, SHANG J G, et al. Black water bloom induced by different types of organic matters and forming mechanisms of major odorous compounds[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(9):3152-3159.
- [25] 王集军. 典型行业恶臭废气的污染特征及其生物降解研究[D]. 广州:广东工业大学, 2019. WANG J J. Pollution profiles and biodegradation of typical industry odor waste gas[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2019.
- [26] 於建明, 刘靓, 蔡文吉, 等. 一株苯乙烯高效降解菌的分离鉴定及降解特性研究[J]. *中国环境科学*, 2014, 34(6):1564-1571. YU J M, LIU L, CAI W J, et al. Identification and characteristics of a *Pseudomonas putida* strain with the capable of efficiently degrade styrene[J]. *China Environmental Science*, 2014, 34(6):1564-1571.
- [27] 门娟, 张朝正, 李舫, 等. 一株苯乙烯生物降解菌的分离、鉴定及其特性研究[J]. *河北工业大学学报*, 2010, 39(5):24-28. MENG J, ZHANG C Z, LI F, et al. Isolation, identification and characterization of a styrene-degrading strain[J]. *Journal of Hebei University of Technology*, 2010, 39(5):24-28.
- [28] 陈艺洋. 一株DBP降解菌DNB-S1的降解特性及其摄食行为的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2016. CHEN Y Y. The characteristics of DBP degradation strain DNB-S1 and feeding behavior research[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016.
- [29] 樊军浩, 梁新红, 孙俊良, 等. 不同氮源对枯草芽孢杆菌产 α -淀粉酶活力的影响[J]. *农业机械*, 2011(20):161-163. FAN J H, LIANG X H, SUN J L, et al. Effects of different nitrogen sources on α -amylase production by *Bacillus subtilis*[J]. *Farm Machinery*, 2011(20):161-163.
- [30] 宋君, 赵坤, 田相利, 等. 不同环境因子和碳氮源对短小芽孢杆菌BP-171无机氮降解特性的影响[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, 49(1):34-42. SONG J, ZHAO K, TIAN X L, et al. Effects of different environmental factors and carbon and nitrogen sources on the nitrogen removing performance of *Bacillus pumilus* BP-171[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, 49(1):34-42.
- [31] 王姊威, 刘虹, 王春龙, 等. 不同碳氮源对 *Paracoccus* sp. QD15-1降解邻苯二甲酸二甲酯的影响[J]. *农业资源与环境学报*, 2019, 36(4):541-545. WANG Z W, LIU H, WANG C L, et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on degradation of phthalate degrading bacteria[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2019, 36(4):541-545.
- [32] 刘娜, 谢学辉, 王钰, 等. 细菌利用不同碳、氮源共代谢降解脱色偶氮染料研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5):1185-1195. LIU N, XIE X H, WANG Y, et al. Carbon and nitrogen co-metabolism during bacterial degradation and decolorization of azo dyes[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5):1185-1195.
- [33] 张园园, 张百忍. 不同碳、氮源对朱红硫磺菌菌丝生长的影响[J]. *食用菌学报*, 2014, 21(4):20-22. ZHANG Y Y, ZHANG B R. *Lactiporus sulphureus* mycelial growth rates on different carbon and nitrogen sources[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2014, 21(4):20-22.
- [34] 何媛媛, 于哲, 王海英, 等. 不同碳氮源对苹果树腐烂病菌胞外果胶酶活性的影响[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(11):81-86. HE Y Y, YU Z, WANG H Y, et al. Effects of different carbon and nitrogen sources on activity of extracellular pectinase of *Valsa mali* var. *mali*[J]. *Journal of Northwest A&F University(Nat Sci Ed)*, 2014, 42(11):81-86.
- [35] 李月月, 李秀芬, 齐希光, 等. 好氧堆肥用枯草芽孢杆菌GX2产芽孢工艺优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(1):91-99. LI Y Y, LI X F, QI X G, et al. Optimization of sporulation parameters for aerobic composting *Bacillus subtilis* GX2 strains[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2021, 40(1):91-99.
- [36] 刘韶娜, 张斌, 相德才, 等. 芽孢杆菌B13的分离鉴定及其抑菌作用研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(2):573-581. LIU S N, ZHANG B, XIANG D C, et al. Isolation, identification and study of a *Bacillus* sp. B13 with high antibiotic character[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019, 46(2):573-581.
- [37] 孙洁, 刘菊莲, 王磊刚, 等. 不同条件对枯草芽孢杆菌菌剂有效活菌数的影响[J]. *吉林蔬菜*, 2020(1):45-46. SUN J, LIU J L, WANG L G, et al. Effect of different conditions on the colony-forming unit *Bacillus subtilis*[J]. *Jilin Vegetables*, 2020(1):45-46.
- [38] 汤瑜婧, 葛龙, 冯景泰, 等. 1株饲用枯草芽孢杆菌培养条件的优化[J]. *饲料研究*, 2015(21):52-54. TANG Y J, GE L, FENG J T, et al. Optimization of culture conditions for a forage *Bacillus subtilis* strain[J]. *Feed Research*, 2015(21):52-54.
- [39] 孙玲玉. 枯草芽孢杆菌泰山株的分离鉴定及其对黄曲霉毒素的降解作用研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2014. SUN L Y. Study on isolation and identification of Mountain Tai *Bacillus subtilis* and degradation of aflatoxin B1[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2014.