

## 响应面分析法优化耐高温假黄色单胞菌硫氧化性能

顾文杰\* 赵冬梅 卢钰升 徐培智 解开治 李夏 孙丽丽

(农业部南方植物营养与肥料重点实验室 广东省养分资源循环利用与耕地保育重点实验室

广东省农业科学院农业资源与环境研究所 广东 广州 510640)

**摘要:**【目的】采用响应面分析法对耐高温假黄色单胞菌的硫氧化性能进行优化。【方法】利用 Plackett-Burman 试验筛选影响菌株硫氧化性能的关键因子。通过最陡爬坡试验逼近最佳值区域,确定响应面试验中心轴,利用 Box-Behnken 设计和响应面分析法获得关键因素的最佳浓度。采用经典的改良硫酸钡比浊法测定硫酸根含量。【结果】牛肉膏、麦芽糖、镁离子( $Mg^{2+}$ ) 3 个因素是影响菌株硫氧化性能的关键因素。响应面分析表明牛肉膏和镁离子的交互作用对硫酸根转化率的影响最大,优化后的结果为:麦芽糖(%)=0.07,牛肉膏(%)=0.11,  $Mg^{2+}$  (%)=0.04 时,模型有最大值。模型的  $F$  值为 52.60 ( $P<0.0001$ ),相关系数  $R^2=0.9802$ ,说明该二次方程是显著的,该模型在整个回归区域内的拟合较好。经模拟堆肥试验验证该菌株可以有效增加堆肥中硫酸根含量。【结论】该模型可用于分析和预测耐高温假黄色单胞菌优化培养基配方,经优化后该菌株硫氧化性能大幅提升,硫酸根转化率由 36.89%提高到 80%以上,加入堆肥后与基础发酵条件下菌液相比更加有效增加了堆肥中  $SO_4^{2-}$  的含量,具有较好的应用前景。

**关键词:** 耐高温,假黄色单胞菌,硫酸根转化率,响应面分析法

Optimization of oxidation by a thermotolerant *Pseudoxanthomonas* through response surface methodologyGU Wen-Jie\* ZHAO Dong-Mei LU Yu-Sheng XU Pei-Zhi XIE Kai-Zhi  
LI Xia SUN Li-Li

(Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer in South Region, Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Nutrient Cycling and Farmland Conservation, Institute of Agricultural Resources and Environment, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

**Abstract:** [Objective] The response surface methodology was used to optimize thermotolerant *Pseudoxanthomonas* oxidation effect. [Methods] We use Plackett-Burman method to select key

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31400434); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2015B020237007, 2014B090904068); Services Platform Construction and New Type Fertilizer Technological Innovation in Guangdong Province

\*Corresponding author: Tel: 86-20-85161411; E-mail: guwenjie0818@163.com

Received: May 26, 2016; Accepted: September 20, 2016; Published online (www.cnki.net): September 29, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31400434); 广东省科技计划项目(No. 2015B020237007, 2014B090904068); 广东省新型肥料科技创新与服务平台建设

\*通讯作者: Tel: 86-20-85161411; E-mail: guwenjie0818@163.com

收稿日期: 2016-05-26; 接受日期: 2016-09-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-29

factors for the sulfur oxidation. The steepest ascent method has been used to determine the optimal range of values and confirm the central axis. Box-Behnken experimental design was used to confirm the optimal concentration of the key factors. The concentration of sulfur was determined by classic barium sulfate turbidity method. **[Results]** Beef extract, malt sugar and  $\text{Mg}^{2+}$  were the key factors affecting the sulfur oxidation performance. The results of the response surface methodology showed that the interaction effect between beef extract and  $\text{Mg}^{2+}$  had the most effects on sulfate conversion rate. The optimization results were: malt sugar (%)=0.07, beef extract (%)=0.11,  $\text{Mg}^{2+}$ =0.04, the sulfate conversion rate reached peak value. The  $F$ -value of the model was 52.60 ( $P<0.0001$ ) and correlation coefficient ( $R^2$ )=0.9802 which indicated the model terms were significant and showed good degree of fitting. The simulation composting experiments results showed that the concentration of sulfate in compost increased with *Pseudoxanthomonas* addition. **[Conclusion]** This model could be used to analyze and calculate the optimal formula of thermotolerant *Pseudoxanthomonas* culture medium. The sulfur conversion rate increased from 36.89% to over 80% after optimization. Addition of *Pseudoxanthomonas* in compost could increase sulfate concentration, compared with the suspension culture under basic fermentation conditions, which was of good application prospects.

**Keywords:** High temperature resistant, *Pseudoxanthomonas*, Sulfur conversion rate, Response surface methodology

我国每年畜禽粪便、作物秸秆等农业有机固体废物产生量巨大,利用高温好氧堆肥技术进行处理是实现这些有机固体废物无害化、减量化和资源化利用的主要途径<sup>[1-3]</sup>。然而,堆肥一直存在着臭气释放这个重要问题不能解决<sup>[4]</sup>。堆肥臭气主要成分是氨气、硫化氢以及挥发性有机硫化物。相对于堆肥中氮素转化和氨气释放的研究,对堆肥硫素的研究相对较少。通常在好氧或厌氧光照条件下,硫氧化细菌(Sulfur oxidizing bacteria, SOB)将硫化物、单质硫和硫代硫酸盐等氧化为硫酸盐等;硫(S)是植物必需的营养元素之一,它主要以  $\text{SO}_4^{2-}$  的形式被植物吸收,参与氨基酸、脂肪和碳水化合物合成<sup>[5]</sup>,因此堆肥过程中将  $\text{H}_2\text{S}$  等含硫物质转化成硫酸盐不仅有利于减少臭气释放,也有利于作物对硫元素的吸收利用<sup>[6]</sup>。

目前筛选出的硫氧化细菌主要有硫杆菌属、假单胞菌属、红球菌属、棒杆菌属、短杆菌属、土壤杆菌属、分枝杆菌属、戈登氏菌属、克雷伯氏杆菌属、诺卡氏菌属、不动杆菌属、节杆菌属、拜叶克林氏菌属、硫化叶菌属、根瘤菌属、芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属等<sup>[7-9]</sup>。过去对于 SOB 的应用主要集中在污水处理和生物过滤等,除臭效果良好。近年来人们开始研究堆肥中的硫转化和 SOB。Asano 等

从牛粪堆肥中分离了一株 SOB,经鉴定为盐硫杆菌(*Halothiobacillus neapolitanus*)<sup>[10]</sup>。作者利用 S 和 *Thiobacillus thioparus* 联合控制堆肥氮素损失,有效地增加了堆肥中  $\text{SO}_4^{2-}$  含量,效果良好<sup>[11]</sup>。堆肥过程中臭气的释放主要集中在高温期,然而,目前所获得的 SOB 大多都是自养型<sup>[12]</sup>,往往不耐受高温,在堆肥的高温期受到抑制,影响其效果的发挥。本实验室在前期研究中筛选获得一株具有硫氧化作用的菌株,并且可以耐受高温,经鉴定为假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas byssovorax*),目前少见有关该属可利用硫化物的报道,该菌在 50 °C 条件下可将  $\text{S}^{2-}$  转化为  $\text{SO}_4^{2-}$ <sup>[13]</sup>。本试验利用响应面分析方法优化假黄色单胞菌的培养条件,增强其氧化性能,提高  $\text{SO}_4^{2-}$  转化率,为其今后的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 假黄色单胞菌 *Pseudoxanthomonas byssovorax* HB3 由本实验室筛选并保藏,优化前硫酸根转化率为 36.89%<sup>[13]</sup>。

**1.1.2 培养基:** 基础发酵培养基(g/L)<sup>[14-15]</sup>:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.4,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.4,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{Na}_2\text{S}$  0.5, pH 7.0。活化培养基(NB)<sup>[14]</sup>。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 牛肉膏购于上海中科昆

虫生物技术开发有限公司; 酵母膏购自广东环凯生物科技有限公司; 麦芽糖、乳糖、氯化铵、氯化镁、硫酸锰均购于广州化学试剂厂。恒温培养摇床 THZ-300C、生化培养箱 LRH-250, 上海一恒科学仪器有限公司; 超净工作台 SW-JC-IFD, 苏州净化设备有限公司。

### 1.2 培养方法

菌株经斜面活化后, 从斜面培养基上取一环菌体接入到 200 mL 活化培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 36 h, 以 5% (体积比) 接种量接入基础发酵培养基中, 装液量为 100 mL (250 mL 三角瓶), 30 °C、150 r/min 培养 72 h。

### 1.3 分析方法

取培养液 4 500 r/min 离心 25 min, 取上清液测定硫酸根含量,  $\text{SO}_4^{2-}$  测定采用经典的改良硫酸钡比浊法<sup>[16]</sup>。

$$\text{硫酸根转化率} = \frac{\text{SO}_4^{2-}}{\text{S}^{2-}} \times 100\%。$$

### 1.4 优化结果验证试验

根据响应面分析方法优化获得的最佳参数条件进行 *Pseudoxanthomonas byssovorax* HB3 的发酵试验, 测定硫酸根转化率, 设置 3 个重复试验, 验证响应面分析模型的准确性和可行性。

### 1.5 模拟堆肥效果验证试验

采用恒温培养箱进行好氧堆肥模拟试验。将鸡粪和蘑菇渣 1:1 (质量比, 干重) 混合均匀后装入 3 000 mL 容器中。试验设置 3 个处理: 添加优化前的 HB3 发酵液处理(T1)、添加优化后的 HB3 发酵液处理(T2)和对照处理(CK)。分别按照基础发酵培养基和培养方法以及优化后的培养基和培养方法进行 *Pseudoxanthomonas byssovorax* HB3 发酵, 发酵液离心后用无菌水调整有效活菌数为  $10^8$  CFU/mL, T1 和 T2 处理按原料干重接种 2.5% 的菌悬液, 同时分别添加 5.0% 的基础发酵培养基和优化后的培养基。堆肥温度模拟实际堆肥温度变化规律进行设定: 第 1 天 30 °C; 第 2 天 40 °C; 第 3 天 45 °C; 第 4–5 天 50 °C; 第 6–8 天 55 °C; 第

9–10 天 60 °C; 第 11 天 55 °C; 第 12 天 50 °C; 第 13 天 45 °C; 第 14 天 40 °C; 第 15 天 30 °C; 结束堆肥。每隔一天采集堆肥样品, 采用重量法测定模拟堆肥过程中 T1、T2 和 CK 的  $\text{SO}_4^{2-}$  含量<sup>[11]</sup>。

### 1.6 数据处理及分析

所得数据用软件 Design Expert 8.05 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 Plackett-Burman 试验设计与主要因素筛选

Plackett-Burman 设计法是一种适用于从众多考察因素中快速有效筛选出最为重要因素的方法。根据之前单因素实验的结果, Plackett-Burman 选用试验次数  $N=12$  的 PB 设计表, 对碳酸钠、麦芽糖、乳糖、酵母膏、氯化铵、牛肉膏、镁离子( $\text{Mg}^{2+}$ )、锰离子( $\text{Mn}^{2+}$ )、pH 等 9 个因素进行考察, 设置两个虚拟列( $X, Y$ ), 以考察实验误差<sup>[17-18]</sup>。设置两个水平, 响应值为硫酸根转化率(%), 见表 1。通过 Plackett-Burman 试验筛选对硫酸根转化率影响显著的因素, 表 2 分析结果显示, 牛肉膏、镁离子( $\text{Mg}^{2+}$ )、麦芽糖对硫酸根的转化率具有极显著影响( $P<0.01$ )。其中麦芽糖为负效应, 牛肉膏和镁离子( $\text{Mg}^{2+}$ )为正效应。

### 2.2 最陡爬坡试验

根据 Plackett-Burman 试验确定的显著因素, 设计最陡爬坡试验分析它们对硫酸根转化率的影响(表 3)。响应面拟合方程只有在考察的邻近区域里才充分近似真实情形。因此, 要先逼近最佳值区域后才能建立有效的响应面拟合方程<sup>[19]</sup>。最陡爬坡法以试验因素的正、负效应为爬坡方向, 根据各因素效应值的大小确定变化步长, 能快速、经济地逼近最佳值区域。由 Plackett-Burman 试验结果设计主要因素的最陡爬坡路径, 其中麦芽糖为负效应, 应减小; 牛肉膏和镁离子( $\text{Mg}^{2+}$ )为正效应, 应增加。由试验结果可知(表 3), 在第 4 组试验附近麦芽糖为 0.075%、牛肉膏为 0.105%、镁离子( $\text{Mg}^{2+}$ )为 0.042 5%时硫酸根转化率最高, 因此被确定为响应面试验的中心轴。

表 1 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 1 Plackett-Burman experiment designs and results

No.	<i>X</i>	Sodium carbonate (%)	Malt sugar (%)	Lactase (%)	Yeast extract (%)	Ammonium chloride (%)	Beef extract (%)	Mg <sup>2+</sup> (%)	Mn <sup>2+</sup> (%)	pH	<i>Y</i>	Sulfate conversion rate (%)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	9.12
2	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	19.25
3	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	13.93
4	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1.44
5	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	30.56
6	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	28.37
7	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	14.07
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	81.26
9	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	16.73
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	33.93
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	72.03
12	1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	31.65

Note: *X*, *Y*: Dummy variable.

表 2 Plackett-Burman 试验设计的因素水平及效应分析

Table 2 Actual level of variables tested with the Plackett-Burman design and their effect on sulfate conversion rate

Factor	Level		Regression coefficient	<i>F</i> value	<i>P</i> value	Significance order
	-1	1				
Sodium carbonate (%)	0.02	1.00	4.86	6.87	0.119 9	6
Malt sugar (%)	0.05	0.15	-217.57	142.90	0.006 9	3
Lactase (%)	0.02	1.00	-0.90	0.24	0.675 4	8
Yeast extract (%)	0.02	0.05	501.11	68.23	0.014 3	4
Ammonium chloride (%)	0.02	0.05	-174.22	8.25	0.102 9	5
Beef extract (%)	0.06	0.12	453.50	223.51	0.004 4	1
Mg <sup>2+</sup> (%)	0.02	0.05	844.67	193.85	0.005 1	2
Mn <sup>2+</sup> (%)	0.01	0.10	7.44	0.14	0.748 1	9
pH	5.50	9.01	-1.12	4.66	0.163 4	7

表 3 最陡爬坡试验设计及其试验结果  
Table 3 The designs and results of the steepest ascent test

No.	Malt sugar (%)	Beef extract (%)	Mg <sup>2+</sup> (%)	Sulfate conversion rate (%)
1	0.150	0.060	0.020 0	19.25
2	0.125	0.075	0.027 5	54.60
3	0.100	0.090	0.035 0	68.35
4	0.075	0.105	0.042 5	81.29
5	0.050	0.120	0.050 0	74.25

## 2.3 响应面法(Response surface methodology) 发酵优化试验设计

根据最陡爬坡试验确定出响应面中心点及各个显著因素的变化步长。根据 Box-Behnken 中心组合设计原理设计了以麦芽糖添加量 *A*、牛肉膏添加量 *B*、Mg<sup>2+</sup>添加量 *C* 为自变量, 每个因素取 3 个水平, 以(-1、0、1)编码试验。响应面分析方法试验因素编码和水平见表 4。根据表 5 中 Box-Behnken 设计的试验结果, 利用 Design-Experts 8.05 软件对

结果进行二次回归分析, 各试验因子对响应值的影响可用下列函数表示: 硫酸根转化率(%)= $-557.41+2\ 339.47\times A+6\ 068.93\times B+11\ 022.51\times C-2\ 506.67\times A\times B-106.67\times B\times C-15\ 200\times A\times C-14\ 785.6\times A^2-24\ 782.22\times B^2-109\ 618\times C^2$  (表 6)。对该模型进行方差分析和显著性检验, 该二次回归模型的  $F$  值为 52.60 ( $P<0.000\ 1$ ), 模型仅有 0.01% 的机会是由误差导致的。相关系数  $R^2=0.980\ 2$ , 说明模型能解释 98.02% 硫酸根转化率。因此, 回归方程为优化培养基的配方提供了一个合适的模型。

表 4 Box-Behnken 试验因素水平  
Table 4 Box-Behnken experiment factors and levels

Factors	Level		
	-1	0	1
A: Malt sugar (%)	0.050	0.075 0	0.100
B: Beef extract (%)	0.090	0.105 0	0.120
C: $\text{Mg}^{2+}$ (%)	0.035	0.042 5	0.050

表 5 Box-Behnken 试验设计和结果  
Table 5 Box-Behnken experiment designs and results

No.	A	B	C	Sulfate conversion rate (%)
1	0	-1	-1	65.48
2	0	0	0	81.28
3	-1	0	1	69.26
4	1	0	-1	62.85
5	0	-1	1	73.26
6	-1	-1	0	68.53
7	1	1	0	62.84
8	-1	1	0	71.59
9	0	1	1	70.50
10	1	0	1	61.48
11	0	0	0	80.95
12	0	0	0	81.66
13	0	0	0	81.52
14	1	-1	0	63.54
15	-1	0	-1	70.55
16	0	0	0	81.80
17	0	1	-1	69.56

表 6 回归方差分析表  
Table 6 ANOVA for selected Box-Behnken design for sulfate conversion rate

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value	Prob>F
Model	849.87	9	94.43	38.54	< 0.000 1	Significant
A: Malt sugar	106.73	1	106.73	43.56	0.000 3	
B: Beef extract	1.69	1	1.69	0.69	0.433 3	
C: $\text{Mg}^{2+}$	4.59	1	4.59	1.87	0.213 4	
AB	3.53	1	3.53	1.44	0.268 8	
AC	1.60E-003	1	1.60E-003	6.53E-004	0.980 3	
BC	11.70	1	11.70	4.77	0.065 2	
$A^2$	359.56	1	359.56	146.74	< 0.000 1	
$B^2$	130.91	1	130.91	53.43	0.000 2	
$C^2$	160.08	1	160.08	65.33	< 0.000 1	
Residual	17.15	7	2.45			
Lack of fit	16.70	3	5.57	49.48	0.001 3	Significant
Pure error	0.45	4	0.11			
Cor total	867.02	16				

Note: s: 1.57; R-Squared: 0.980 2;  $\bar{x}$ : 71.57; Adj R-Squared: 0.954 8; C.V. %: 2.19; Pred R-Squared: 0.691 0.

## 2.4 响应 3D 曲面分析

响应面是各个因素对应的响应值所描述的三维曲面图,从响应面上可以看出各个因素之间的相互作用关系。本试验经 RSM 分析得到二次模型的特征值有正有负,响应曲面为马鞍曲面<sup>[20]</sup>。由图 1-3 可以看出,该模型的响应面有真实的最大

值。为了进一步验证最佳点的值,对回归方程取一阶偏导等于零,得到结果。当麦芽糖(%)=0.07,牛肉膏(%)=0.11,镁离子( $\text{Mg}^{2+}$ ,%)=0.04 时,硫酸根转化率有最大值:81.83%。由响应面、等高线的变化趋势分析,在 0.09%–0.105%之间时,硫酸根转化率呈上升的趋势,而 0.105%–0.12%硫酸

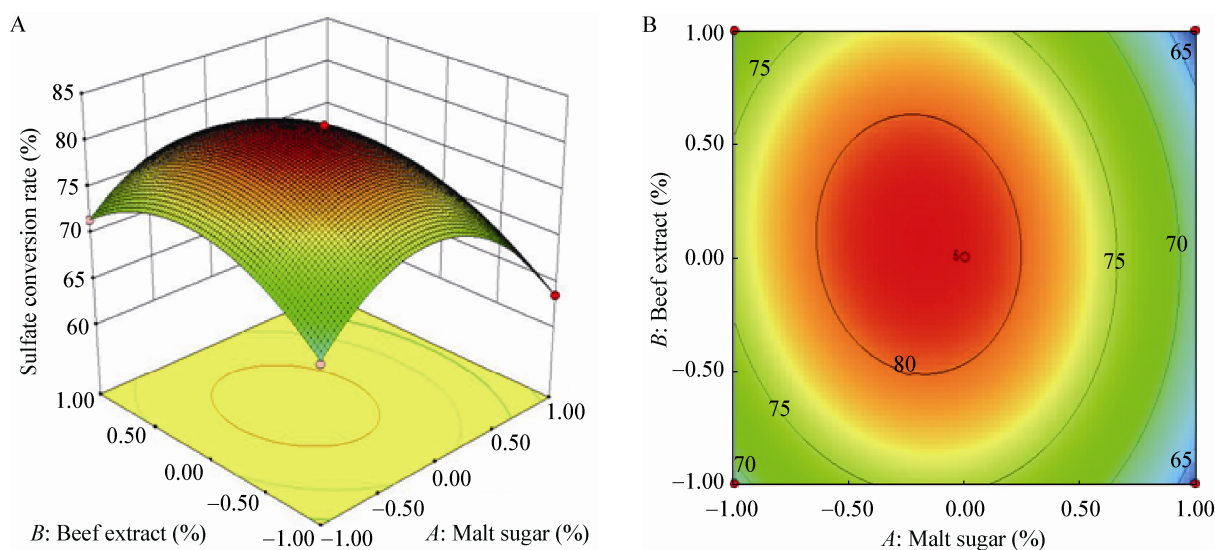


图 1 牛肉膏和麦芽糖交互作用下的响应曲面图(A)和等高线图(B)

Figure 1 Response surface plots (A) and contour plots (B) showing interactive effects of malt sugar and beef extract

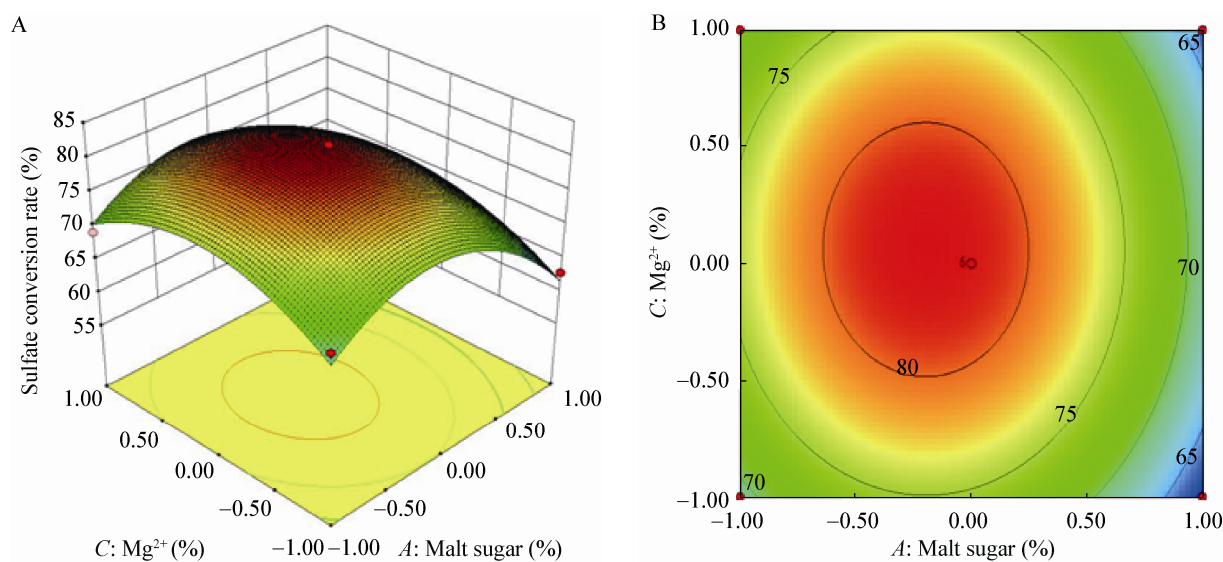


图 2 镁离子( $\text{Mg}^{2+}$ )和麦芽糖交互作用下的响应面图(A)和等高线图(B)

Figure 2 Response surface plots (A) and contour plots (B) showing interactive effects of malt sugar and  $\text{Mg}^{2+}$

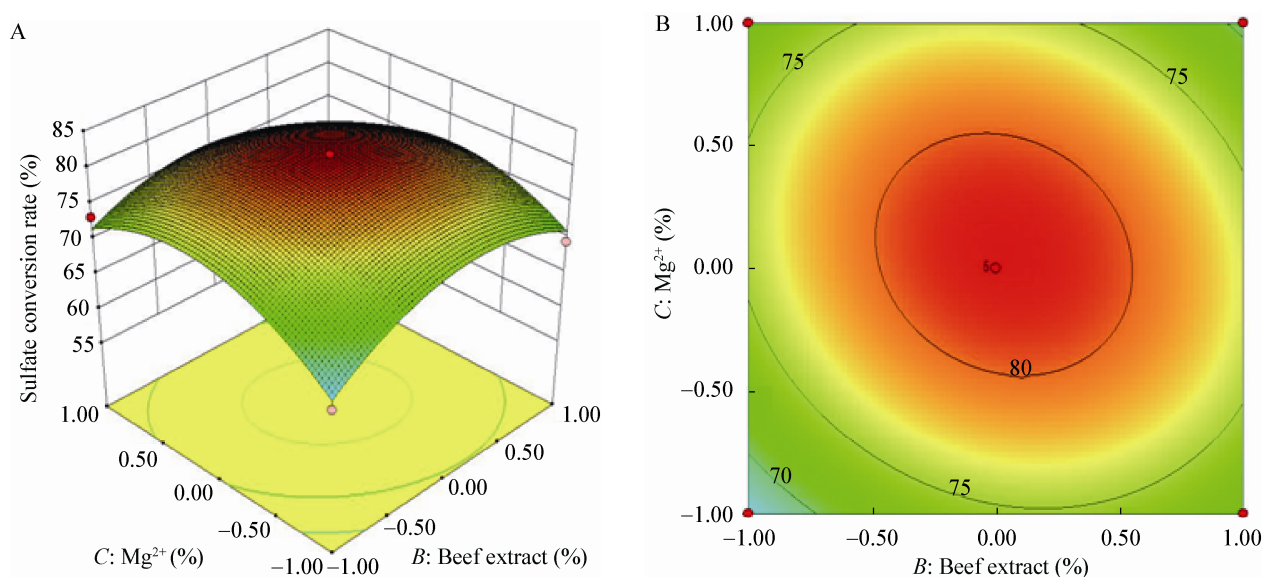


图3 镁离子( $\text{Mg}^{2+}$ )和牛肉膏交互作用下的响应面曲图(A)和等高线图(B)

Figure 3 Response surface plots (A) and contour plots (B) showing interactive effects of beef extract and  $\text{Mg}^{2+}$

根转化率又逐渐下降；麦芽糖含量在 0.05%–0.075%之间时，硫酸根转化率呈上升的趋势，0.075%–0.1%之间时，硫酸根转化率下降；镁离子含量在 0.035%–0.042 5%时，硫酸根转化率上升，0.042 5%–0.05%时硫酸根转化率呈下降趋势。牛肉膏和镁离子( $\text{Mg}^{2+}$ )的交互作用对硫酸根转化率的影响最大。

## 2.5 优化结果验证

为了验证优化结果的可靠性,按照响应面分析法预测的最佳培养基组成进行 3 次培养验证试验,硫酸根转化率平均可达 82.17%,试验值非常接近理论最大值,模型与实际值拟合良好,说明该模型比较真实地反应出各个筛选因素对硫酸根转化率的影响,能够较好地预测实际培养条件。

## 2.6 菌株硫氧化效果验证

利用室内模拟堆肥试验验证不同培养条件下耐高温假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas byssovorax* HB3)在堆肥应用中氧化硫的能力。由图 4 可知,菌株 *Pseudoxanthomonas byssovorax* HB3 在堆肥中可以有效提高  $\text{SO}_4^{2-}$  的含量。尤其是经过

发酵条件的优化后其氧化硫的能力大幅提升。在堆肥 1–3 d 菌株需适应堆肥的高温环境,氧化能力较弱,T1 和 T2 处理  $\text{SO}_4^{2-}$  的含量略高于 CK 处理,第 5 天后经 T2 处理菌株氧化能力开始提升,T2 处理  $\text{SO}_4^{2-}$  的含量迅速增加,T1 处理的  $\text{SO}_4^{2-}$  含量也始终高于 CK 处理,最终堆肥结束时 T2 处理  $\text{SO}_4^{2-}$  的含量为 3.95 g/kg,比 CK 和 T1 处理分别高了高 78.7%和 34.3%,差异显著( $P<0.05$ )。

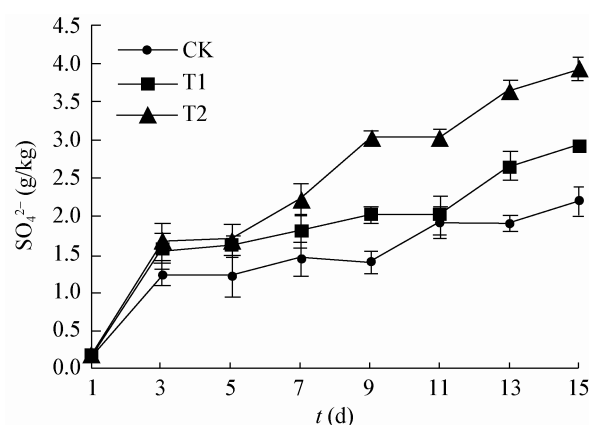


图4 堆肥过程中各处理硫酸根含量变化

Figure 4 Changes of the  $\text{SO}_4^{2-}$  concentration during 15 d composting



### 3 结论

采用响应面分析法对影响耐高温假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas byssovorax*) HB3 的培养基配方进行优化, 从而得到硫酸根最高的转化率: 当麦芽糖为 0.07%, 牛肉膏为 0.11%, 镁离子( $Mg^{2+}$ )为 0.04% 时结果最优为 81.83%。经回归方差分析得出试验模型的  $F$  值为 52.60 ( $P < 0.0001$ ), 相关系数  $R^2 = 0.9802$ , 说明该二次方程是显著的, 该模型在整个回归区域内的拟合较好, 可以用于分析和预测耐高温假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas byssovorax*) 最优化培养基配方。从响应面、等高线的变化趋势分析, 牛肉膏和镁离子( $Mg^{2+}$ )的交互作用对硫酸根转化率的影响最大。该菌株可耐受较高温度, 经优化后该菌株硫氧化性能大幅提升,  $SO_4^{2-}$  转化率达 80% 以上。经室内模拟堆肥试验验证优化前后的发酵菌液在堆肥中的硫氧化能力, 经发酵条件优化后的 *Pseudoxanthomonas byssovorax* HB3 与基础发酵条件下菌液相比更加有效增加了堆肥中  $SO_4^{2-}$  的含量, 尤其在高温期效果显著, 进一步说明经过发酵条件的优化该菌具有较好的产业化应用前景。

### 参考文献

- [1] Maeda K, Morioka R, Hanajima D, et al. The impact of using mature compost on nitrous oxide emission and the denitrifier community in the cattle manure composting process[J]. Microbial Ecology, 2010, 59(1): 25-36
- [2] Maeda K, Hanajima D, Toyoda S, et al. Microbiology of nitrogen cycle in animal manure compost[J]. Microbial Biotechnology, 2011, 4(6): 700-709
- [3] Zeng Y, de Guardia A, Daumoin M, et al. Characterizing the transformation and transfer of nitrogen during the aerobic treatment of organic wastes and digestates[J]. Waste Management, 2012, 32(12): 2239-2247
- [4] Eghball B, Power JF, Gilley JE, et al. Nutrient, carbon, and mass loss during composting of beef cattle feedlot manure[J]. Journal of Environmental Quality, 1997, 26(1): 189-193
- [5] Anandham R, Sridhar R, Nalayini P, et al. Potential for plant growth promotion in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cv. ALR-2 by co-inoculation of sulfur-oxidizing bacteria and *Rhizobium*[J]. Microbiological Research, 2007, 162(2): 139-153
- [6] Gu WJ, Zhang FB, Xu PZ, et al. Nitrogen conservation by adding sulfur to dairy manure in compost bioreactors[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2011, 17(1): 224-230 (in Chinese)  
顾文杰, 张发宝, 徐培智, 等. 堆肥反应器中硫磺对牛粪好氧堆肥的保氮效果研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(1): 224-230
- [7] Mei J, Tao XX, Liu JY. Study on culture conditions of desulfurizing bacteria and desulfurization[J]. Metal Mine, 2007, 37(11): 106-110 (in Chinese)  
梅健, 陶秀祥, 刘金艳. 脱硫菌培养条件及脱硫研究[J]. 金属矿山, 2007, 37(11): 106-110
- [8] Buisman CJN, Driessen W, Meijer H, et al. Effect of organic substrates on biological sulphide oxidation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 33(4): 459-462
- [9] Lin WC, Chen YP, Tseng CP. Pilot-scale chemical-biological system for efficient  $H_2S$  removal from biogas[J]. Bioresource Technology, 2013, 135: 283-291
- [10] Asano R, Sasaki T, Nakai Y. Isolation and characterization of sulfur oxidizing bacteria from cattle manure compost[J]. Animal Science Journal, 2007, 78(3): 330-333
- [11] Gu WJ, Zhang FB, Xu PZ, et al. Effects of sulphur and *Thiobacillus thioparus* on cow manure aerobic composting[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(11): 6529-6535
- [12] Feng SS, Ji YH, Yang HL. Optimization of restrictive factors during process of removing sulfide into elemental sulfur by sulfur oxidizer[J]. Microbiology China, 2016, 43(1): 36-43 (in Chinese)  
冯守帅, 计云鹤, 杨海麟. 硫氧化菌种脱除硫化物生成单质硫限制性因素优化[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1): 36-43
- [13] Zhao DM, Gu WJ, Zhang FB, et al. Isolation, identification and growth characteristics of a thermophilic bacterium for  $H_2S$  deodorization during aerobic composting[J]. Journal of Microbiology, 2012, 32(6): 47-52 (in Chinese)  
赵冬梅, 顾文杰, 张发宝, 等. 1 株好氧堆肥高温  $H_2S$  脱臭菌的筛选、鉴定及生长特性[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(6): 47-52
- [14] Ryu JW, Yoo SK, Choi JM, et al. Thermophilic biofiltration of  $H_2S$  and isolation of a thermophilic and heterotrophic  $H_2S$ -degrading bacterium, *Bacillus* sp. TSO3[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 168(1): 501-506
- [15] Lu HS, Chen Y, Wang HW, et al. Isolation, characterization and identification of thiosulfate-oxidizing strain MU2A-22 isolated from volcanic deposits in Miyake-jima island, Japan[J]. Microbiology China, 2012, 39(4): 448-457 (in Chinese)  
陆洪省, 陈勇, 王厚伟, 等. 日本三宅岛火山土壤中硫代硫酸盐氧化菌的分离、生物学特性及鉴定[J]. 微生物学通报, 2012, 39(4): 448-457
- [16] Namgung HK, Ahn HY, Song JH. Development of a two-phase bioreactor for the biological removal of hydrogen sulfide from biogas[J]. Energy Procedia, 2012, 14: 1143-1148
- [17] Zhang C, Zhang KF, Hou SG, et al. Medium optimization of  $\epsilon$ -polylysine production by response surface analysis[J]. Microbiology China, 2011, 38(5): 641-646 (in Chinese)  
张超, 张克峰, 侯书国, 等. 利用响应面法优化  $\epsilon$ -聚赖氨酸发酵培养基[J]. 微生物学通报, 2011, 38(5): 641-646
- [18] Xu CP, Kim SW, Hwang HJ, et al. Application of statistically based experimental designs for the optimization of exo-polysaccharide production by *Cordyceps militaris* NG3[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2002, 36(2): 127-131
- [19] Qi XZ, Wang LQ, Meng P, et al. Medium optimization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors production by response surface analysis[J]. Microbiology China, 2012, 39(2): 203-210 (in Chinese)  
齐西珍, 王利强, 孟鹏, 等. 利用响应面法优化  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂发酵培养基[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 203-210
- [20] Zhu F, Li LW, Cheng C, et al. Optimization of electro-Fenton process for landfill leachate by Box-Behnken response surface methodological analysis[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(4): 1749-1754 (in Chinese)  
祝方, 李璐玮, 程畅, 等. Box-Behnken 响应面分析法对双阳极电 Fenton 法处理垃圾渗滤液工艺的优化[J]. 环境工程学报, 2016, 10(4): 1749-1754