

文章编号:1673-1689(2008)05-0113-04

一株硫化物氧化细菌的分离、鉴定和 脱硫效果初步验证

闫旭¹, 马忠良², 严群^{1,3}, 阮文权^{*1,3}

(1. 江南大学 环境与土木工程学院, 江苏无锡 214122; 2. 上海大学 生命科学学院, 上海 200085;
3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 从无锡市某硫酸厂采集的土样中分离到一株具有硫化物氧化能力的细菌, 对该细菌的 16S rDNA 序列进行测定, 并根据 16S rDNA 构建了系统发育树。结果表明, TL-1 与硫杆菌属有较高的同源性, 与那不勒斯硫杆菌(*Thiobacillus neapolitanus*) 同源性为 95.3%, 结合菌落、细菌形态鉴定菌株为硫杆菌属(*Thiobacillus*), 并命名为 TL-1。同时, 对 TL-1 的脱硫效率进行了初步研究。结果表明, 在硫化物为唯一硫源且其质量浓度分别为 60, 120, 180, 240 mg/L 时, 4 h 时硫化物去除率分别达到 87.92%、71.25%、63.45% 和 13.31%。

关键词: 硫化物氧化菌; 鉴定; 16S rDNA; 脱硫能力

中图分类号: X 172

文献标识码: A

Screening, Identification and Sulfur Removal Ability Validating of a Sulfide-Oxidizing Strain

YAN Xu¹, MA Zhong-liang², YAN Qun^{1,3}, RUAN Wen-quan^{*1,3}

(1. School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200085, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A sulfide-oxidizing strain TL-1 was screened and further identified. It was found that the 16S rDNA sequence of the strain was most closely to that of the *Thiobacillus neapolitanus* with the similarity of 95.3%. Moreover a phylogenetic tree was constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of the relative bacteria species which was selected based on the colony and cell morphology observation. The screened strain was identified to belong to the species of *Thiobacillus*. Furthermore, when 60, 120, 180, 240 mg/L of sodium sulfide were used as the sole sulfur source, the removal efficiency reached at 87.92%, 71.25%, 63.45%, 13.31% after 4 h of desulfurization process, respectively.

Key words: sulfide-oxidizing microorganism; identification; 16S rDNA; removal efficiency

收稿日期: 2008-07-25.

基金项目: 江苏省高技术研究项目(DG 2006044); 江苏省自然科学基金项目(BK 2006023).

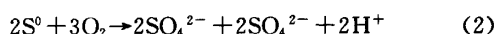
作者简介: 闫旭(1984-), 男, 河南新乡人, 环境工程硕士研究生.

*通讯作者: 阮文权(1966-), 男, 上海人, 工学博士, 教授, 博士生导师. 主要从事环境生物技术方面的研究.

Email: wqruan@jiangnan.edu.cn

含硫废水主要来源于制革、造纸、石化、印染、制药、炼焦等行业。由于该类废水中含硫化物浓度高,涉及行业广,废水排放量大,污染负荷高,毒性大,且会对废水构筑物的正常运转产生很大影响,因此生产、生活中的含硫废水处理尤为必要和紧迫^[1]。目前针对含硫废水处理的常用方法是物理化学法,如空气催化氧化法、化学沉淀法等,这些方法不仅处理费用高,而且容易造成二次污染。采用生物处理废水中的硫化物可以避免上述缺点,还可以回收单质硫,产生较好的经济效益^[2]。

自然界中可以氧化硫化物的微生物主要为:丝状硫细菌、光合硫细菌和无色硫细菌^[3]。硫杆菌的共同特点是能够氧化还原态硫化物并从中获得生长和活动所需的能量,其主要反应为^[4]:



由于硫细菌能将自然界的还原性硫化物氧化成单质硫,生成的硫可经沉淀分离出来,从而实现资源化,因而在处理废水中的硫化物方面有重要作用。菌种是生物脱硫技术的关键,获得脱硫效率高、环境条件适应性强的优质菌株是开发高效生物脱硫工艺的基础。目前,国内外已经从酶学和遗传学角度对生物脱硫过程进行研究,已证明在菌株中存在特定的酶催化基因,它们已被克隆和测序,并获得了纯化的表达产物^[4],但已报道的脱硫菌株效率不高。

作者从无锡某硫酸厂土壤中筛选出一株具有较强硫化物氧化能力的菌株,并对其形态、生长特性、系统发育学和硫化物氧化能力进行了研究。

1 材料与方法

1.1 硫化物氧化细菌的筛选和形态观察

1.1.1 土样 无锡市硫酸厂地面下深 10 cm 左右、pH 3~4 的土壤。

1.1.2 培养基 (g/L) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 8.0, KH_2PO_4 4.0, K_2HPO_4 4.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8, NH_4Cl 0.2; pH 调节至 7.0。

1.1.3 菌株分离步骤 取 5 g 土样于 250 mL 的三角瓶中,加入 50 mL 培养基,初始 pH 值调节至中性,于 30 ℃、170 r/min 条件下在摇床上培养。待菌液 pH 值下降至 3 左右时,取 5 mL 菌液于装有 50 mL 培养基的 250 mL 的三角瓶中,反复培养 4 次后梯度稀释平板涂布,挑取生长较好单菌落反复划线培养,获得纯菌。

1.1.4 形态学观察 将分离得到的菌株在固体培

养基上培养,观察菌落形态,在光学显微镜下观察革兰氏染色菌体形态、鞭毛形态、芽孢形态^[5]。

1.2 分子生物学鉴定

染色体 DNA 的提取,菌株 16S rDNA 的扩增、16S rDNA 序列的测定以及 BLAST 比对参考文献^[6]。

1.3 生长曲线的测定

1.3.1 生长曲线的测定方法 取 50 mL 液体培养基于 250 mL 的锥形瓶中,接种 5 mL 生长至最大值状态的 TL-1 菌液,调节初始 pH 值为 7,在 30 ℃、170 r/min 恒温气浴摇床中培养,每隔一定时间测定菌体干重和培养基的 pH 值。

1.3.2 菌体干重的测定 采用直接干燥法^[7]。

1.4 脱硫效果的初步验证

取 50 mL 以硫化钠作为惟一硫源的液体培养基于 250 mL 的锥形瓶中,接种 5 mL 生长至最大值状态的菌液,以没有接种菌液的培养基作为空白。调节初始 pH 值为 7,在 30 ℃、170 r/min 恒温气浴摇床中培养,每隔一定时间测定硫化物质量浓度。硫化物的测定采用碘量法^[8]。

$$\mu = \frac{w_1 - w_0}{w_2} \times 100\%$$

μ : 硫化物去除率; w_1 培养基硫化物质量浓度; w_0 : 空白; w_2 初始硫化物质量浓度

2 结果与讨论

2.1 硫化物氧化细菌的分离和鉴定

采集得到的土样经反复平板划线分离后得到一株具有硫化物氧化能力的以 CO_2 为碳源的自养菌株,命名为 TL-1。在固体培养基上划线,恒温 30 ℃培养 2 d,至长出针尖大小浅黄色菌落,4 d 后菌落生长至直径为 1 mm 左右的圆形淡黄色菌落,中间稍有隆起,边缘整齐,不透明,质地松软,表面光滑有光泽,长期培养后菌落色泽逐渐变暗,呈浅黄褐色。

在 1 000 倍光学显微镜下观察可知,TL-1 菌体为短杆状,两端钝圆,长 0.5~1.0 μm 。细菌革兰氏染色呈阴性,不产生芽孢,单极生鞭毛,能运动。菌落和菌体形态与《伯杰氏细菌鉴定手册》描述的硫杆菌属(*Thiobacillus*)相似^[9],与王玮筛选的一株自养型脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)菌落、菌体形态近似^[10]。

所测菌株 TL-1 的 16S rDNA 核苷酸序列为 1 456 bp。将所测序列与 GenBank 数据库中相关菌种进行比较,构建以 16S rDNA 全序列为基础的

系统发育树,见图1。结果表明:TL-1与硫杆菌属具有较高的同源性,并且与那不勒斯硫杆菌(*Thiobacillus neapolitanus*)同源性最高,为95.3%。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》^[9],结合菌落、细胞形态可以鉴定TL-1属于硫杆菌属(*Thiobacillus*)。

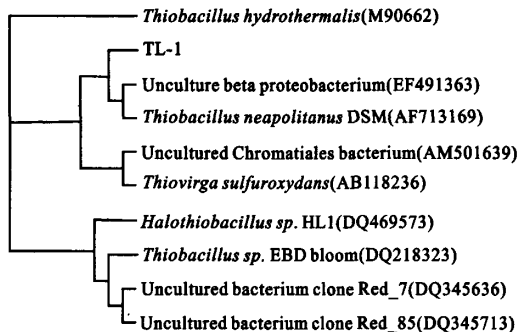


图1 根据16S rDNA序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

2.2 菌株TL-1的生长曲线及生长过程中pH的变化

由图2可知,在0~12 h脱硫细菌TL-1处于延滞期,此阶段细菌生长缓慢;在12~18 h细菌处于对数期,此阶段细胞呈几何级数增长,pH值迅速下降;在18~30 h细菌处于稳定期,pH值下降到2.7左右并保持稳定,28 h时细菌的数量达到最大值,为800 mg/L;在30 h后细菌处于衰亡期,pH值仍保持在2.7左右。

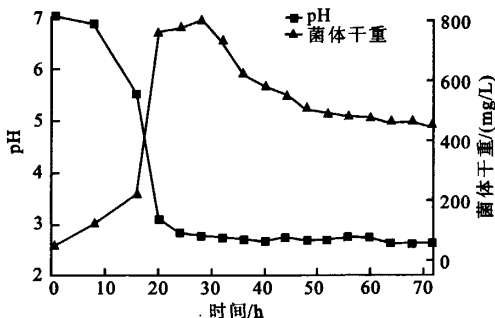


图2 生长曲线及生长过程中的pH值变化

Fig. 2 Time-courses of DCW and pH during cell growth

从图2可以看出,细菌的生长过程与pH值的下降过程相对应,pH值在菌种的对数生长期降速最大。在对数生长期,细菌生长活跃,大量繁殖,硫代硫酸钠被迅速氧化,导致代谢酸性产物积累,介质pH值迅速下降。细菌生长过程中硫源的迅速消耗,pH值的下降改变了细菌的最佳生长环境,细菌进入衰亡期,逐渐死亡。硫杆菌以硫化物为硫源

时,氧化反应分为两步^[4]。因此,过量氧的输入会导致反应中生成的单质硫转化为硫酸根,在生物脱硫反应器中适当控制溶解氧、水力停留时间和容积负荷等条件就能使硫化物大量转化为单质硫^[11]。

2.3 TH-1脱硫效果的初步研究

图3为TL-1菌株在硫化物质量浓度为60、120、180、240 mg/L时的脱硫能力。由图3可知,在脱硫反应过程进行的4 h中,前半个小时去除率增幅最快,第30分钟各反应批次去除率已分别达到52.13%、43.32%、34.33%和4.21%;而在脱硫反应进行到4 h左右时,去除率已基本没有变化,此时,各反应批次去除率分别为87.92%、71.25%、63.45%和13.31%。

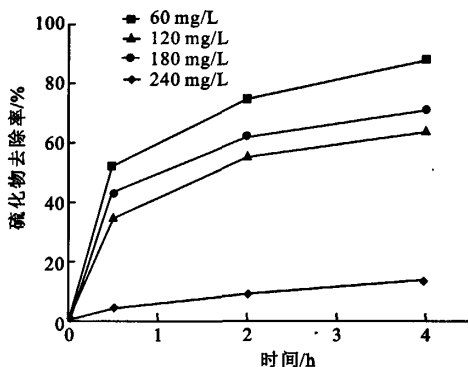


图3 不同质量浓度硫化物的去除率

Fig. 3 Removal rate of different sulfur concentration

此外,随着硫化物质量浓度的增加,TL-1菌株的脱硫效果逐渐下降,其中当硫化物质量浓度为240 mg/L时,去除率最高,仅为13.31%。这可能是由于摇床中充氧条件较差,空气中的氧较难溶解到培养基中,高浓度硫化物培养基中没有足够的氧作为电子受体,因而表现出较低的去除率。而在生物脱硫反应器中采用曝气装置能够大幅度提高水体中的溶解氧含量,使硫化物容积负荷达到更大值。李亚新等人利用填料式生物膜反应器容积负荷 $5.0 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 时,硫化物去除率98.2%,单质硫生成率84.5%;容积负荷 $10.5 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 时硫化物去除率达到70.9%^[11]。

3 结语

作者筛选出一株具有较强硫化物氧化能力的细菌,通过16S rDNA的测定和系统发育树分析,并结合菌落、细胞形态的观察,初步鉴定该菌为硫杆菌属,并命名为TL-1。摇瓶脱硫实验证明,当硫化物质量浓度为180 mg/L时,TL-1的硫化物去除率

可达到 87.92%,表明该菌脱硫效果较好。但要将该菌株应用于硫化物转化单质硫生物反应器并实现规模化生物脱硫过程,还需在 TL-1 生长条件、生

物脱硫机制以及反应器最佳运行条件优化等方面进行深入的研究。

参考文献(References):

- [1] 郭昌梓, 薛少青, 高军锋. 无色硫细菌的培养及其生长环境条件研究[J]. 陕西科技大学学报, 2008, 26(1): 66-70.
GUO Chang-zi, XUE Shao-qing, GAO Jun-feng. Culture and growth conditions of colorless sulfur bacteria[J]. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2008, 26(1): 66-70. (in Chinese)
- [2] Buisman C J. Biotechnological sulfide removal in three polyurethane carrier reactors; stirred, bio-rotor reactor and up flow reactor[J]. *Water Research*, 1990, 24 (2): 245-251.
- [3] Kuenen J G, Robertson L A. The use of natural bacterial populations for treatment of sulfur containing wastewater[J]. *Biodegradation*, 1992(3): 239-254.
- [4] 任南琪, 王爱杰, 李建政, 等. 硫化物氧化及新工艺[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2003, 35 (3): 265-268.
REN Nan-qi, WANG Ai-jie, LI Jian-zheng, et al. Sulfide oxidation bacteria and innovative sulfide oxidation process[J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2003, 35 (3): 265-268. (in Chinese)
- [5] 诸葛键, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国食品出版社, 1994: 57-87.
- [6] 张晓洁, 查岭生, 陈小静, 等. 一株产重楼皂甙内生细菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2006, 33(5): 84-88.
ZHANG Xiao-jie, ZHA Ling-sheng, CHEN Xiao-jing, et al. Isolation and identification of an endophyte of *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch[J]. *Microbiology*, 2006, 33(5): 84-88. (in Chinese)
- [7] 张丽英, 沈微, 方慧英, 等. 一株腐乳生产菌的筛选、鉴定及其生理特性[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(5): 160-120.
ZHANG Li-ying, SHEN Wei, FANG Hui-ying, et al. Screening, identification and measurement of physiological characteristics of a sulfur production strain[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(5): 160-120. (in Chinese)
- [8] 宋仁元. 水和废水标准检验手册[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1985: 404-415.
- [9] 李亚新, 储江林, 池勇志. 无色硫细菌氧化 SRB 还原硫酸盐产物硫化氢生成单质硫[J]. 城市环境与城市生态, 2002, 15(5): 4-7.
LI Ya-xin, CHU Jiang-lin, CHI Yong-zhi. Removal of sulfide produced by sulfate-reducing bacteria from wastewater and conversion to elementary sulfur by colorless sulfur bacteria[J]. *Urban Environment & Urban Ecology*, 2002, 15(5): 4-7. (in Chinese)
- [10] 王伟. 一株脱硫自养菌的分离与特性研究[J]. 工业微生物, 1997, 27(4): 30-33.
WANG Wei. Isolation and characteristics of a strain of desulfurizing bacteria[J]. *Industrial Microbiology*, 1997, 27(4): 30-33. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)