

硫氧化细菌的分离鉴定及降解特性*

王惠祥 姜理英** 吴晓薇 陈建孟

(浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310032)

摘要 从浙江华海药业污水处理系统中分离得到一株硫氧化细菌T3, 基于形态特征、生理生化、16S rRNA基因序列系统学分析和Biolog鉴定系统分析, 鉴定该菌株为根瘤菌属。摇瓶实验结果表明, T3生物降解最适生长温度为30 ℃, 最适pH值为8.0, 外加氯化铵、碳源对菌株生长及硫化钠降解有促进作用, 驯化后的硫氧化细菌对硫化钠有很强的耐受能力, 最优生长条件下, 2 d内菌株T3能将400 mg/L以下浓度的硫化钠降解彻底, 是一株有应用前景的硫氧化细菌。通过测定代谢过程中各种物质的含量, 确定该菌株对硫化钠的去除机理为 $S^{2-} \rightarrow S_2O_3^{2-}/S^0 \rightarrow SO_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$ 。图8 表1 参18

关键字 硫氧化细菌; 根瘤菌属; 硫化钠; 生物降解; 污水处理

CLC X172

Isolation, Identification and Degradation Characteristics of a Sulfide-oxidizing Bacterium*

WANG Huixiang, JIANG Liying**, WU Xiaowei & CHEN Jianmeng

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Abstract A sulfide-oxidizing bacterium T3 was isolated from the wastewater treatment system in Zhejiang Huahai Pharmaceutical Factory of China. The strain was identified as *Rhizobium* sp. based on the morphological, physiological-biochemical characteristics, sequence analysis of 16S rRNA and the Biolog Identification System. The optimal temperature and pH for T3 biodegradation in the shaking flasks were 30 ℃ and 8.0, respectively. With the additional ammonium chloride and carbon sources, the degradation ability was enhanced. The acclimated bacteria had strong tolerance to sodium sulfide, and could completely degrade sodium sulfide (below 400 mg/L) within two days under the optimal growth condition, which showed their great application prospect. During the course of sodium sulfide oxidation by the strain, various intermediate metabolites were analyzed. The results indicated that the removal mechanism was followed by $S^{2-} \rightarrow S_2O_3^{2-}/S^0 \rightarrow SO_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$. Fig 8, Tab 1, Ref 18

Keywords sulfide-oxidizing bacterium; *Rhizobium*; sodium sulfide; biodegradation; wastewater treatment

CLC X172

工农业废水中的硫化物是造成水体发黑发臭的重要因素, 由于其毒性、腐蚀性、恶臭和高耗氧量等问题, 从水中以 H_2S 的形式逸出后, 不但会引起人的神经中毒, 而且能与大气层的臭氧反应生成硫酸, 形成酸雨^[1], 因此, 严格控制硫化物的排放以及研究去除硫化物的处理工艺显得尤为迫切。与传统物理化学方法^[2-3]比较, 生物脱硫可使污染物得到充分的降解和转化, 且工艺设备简单, 管理维护方便, 能耗少, 运行费用低, 二次污染小^[4], 近几年来备受青睐^[5]。

国内外研究者对微生物技术处理硫化物等恶臭物质做了大量工作, 左剑恶对无色硫细菌氧化废水中硫化物的研究发现, 在不同的硫化物负荷下, 反应器内都存在一个最佳的溶解氧值, 此时反应器对硫化物的去除率较高, 绝大部分 S^{2-} 转化为 S^0 , 基本不生成 SO_4^{2-} ^[6]。姚传忠等根据生物强化的原理筛选出一株高效脱硫的排硫硫杆菌, 并利用上流式填料床反应进行了挂膜试验, 研究了特性菌种的筛选以及溶解氧、进水浓度、水力负荷和进水pH值等因素对于废水中硫化物去除的影响规律^[7]; Cho KS等人的研究表明, 硫杆菌属生成单

质硫的能力较强, 且溶解氧浓度和硫化物浓度是影响最终产物形式的关键因素^[8]。

生物脱硫关键在于优势脱硫菌株的筛选, 本研究从浙江华海药业污水处理系统中筛选得到一株具有较强硫化物氧化能力的菌株, 采用传统与现代分子生物学相结合的手段对其进行鉴定, 优化其生长条件, 考察了最优条件下菌株降解硫化钠特性, 研究将为开发高效脱硫工艺提供高效的降解菌株, 并可能为菌株基因功能改造提供多样性的基因来源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

水样取自浙江华海药业污水处理系统

无机盐培养基^[9] ($\rho/g L^{-1}$): $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 8.0, KH_2PO_4 1.2, K_2HPO_4 1.2, NH_4Cl 0.4, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, pH 7.0~7.5。

加入底物硫化钠的分批和连续实验所采用的选择性培养基^[10] ($\rho/g L^{-1}$): 葡萄糖0.2, KH_2PO_4 1.2, K_2HPO_4 1.2, NH_4Cl 0.4, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2, 柠檬酸铁 0.01, pH 7.0。

菌株保存的LB培养基 ($\rho/g L^{-1}$): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨10.0, 氯化钠10.0, 琼脂15.0, 将琼脂以外其他成分加热溶解, 调节pH至7.0~7.2, 加入琼脂煮沸至溶。

收稿日期: 2010-10-11 接受日期: 2010-11-30

*国家“863”计划项目 (No. 2009AA062603) 资助 Supported by the National High-tech R & D Program of China (“863” Program, No. 2009AA062603)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: jiangly@zjut.edu.cn)

1.2 菌株的富集与分离筛选

水样以10%接种量接到无机盐培养基中, 30 ℃、160 r/min的摇床下振荡培养, 待细菌生长活跃, 以呈浓度梯度的硫化钠溶液进行驯化, 选择经数次驯化, pH和硫酸根变化效果明显的培养液, 稀释涂布到固体平板上, 待长出菌落, 挑取单菌落进行画平板划线分离, 挑取生长较好的菌落, 进一步分离纯化7~8次, 得到纯化降解菌株. 将纯化好的降解菌株回接于以硫代硫酸根为底物的无机盐基础培养液中, 验证其是否有降解能力, 若出现混浊, 则将其分离, 接种于LB斜面培养基上, 培养24 h后, 置于4 ℃冰箱保存备用.

1.3 菌株的Biolog系统鉴定

菌株的Biolog实验参考文献[11]方法进行, 采用GN2碳源板鉴定.

1.4 菌株对硫化钠的降解特性

接种保存在固体LB斜面上的T3菌株至含硫化钠的选择性培养基中, 硫化钠初始浓度为120 mg/L, 30 ℃, 160 r/min摇床培养48 h, 进入对数生长期, 作为种子液备用. 将种子液以5%的接种量接入50 mL选择性培养基中, 分别进行以下几组处理测定生长量和降解率的变化, 每种处理设置3个平行样, 并做空白对照.

温度分别设置为20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃作为最佳温度试验组.

用NaOH或HCl调节初始pH值分别至1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0作为最佳pH试验组.

选择培养基中分别添加0.2 g葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、酵母粉、乙酸钠作为最佳碳源试验组, 添加0.4 g氯化铵、硫酸铵、硝酸钠、硝酸钾、草酸铵、醋酸铵作为最佳氮源试验组.

将菌株的pH、温度、碳源、氮源都设置为优化后的最佳条件, 硫化钠初始浓度分别设置为100 mg/L、160 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L作为最佳降解浓度试验组.

1.5 硫化钠氧化过程中中间代谢物分析

为了解硫离子在微生物作用下的转化情况^[12], 在盛有50 mL选择性培养基的厌氧瓶中, 接入5 mL种子液, 置于30 ℃、160 r/min摇床培养, 初始硫化钠浓度为120 mg/L, 在培养过程中定时取样, 分别测定液相中硫化钠及中间代谢产物(硫单质、硫酸根、亚硫酸根、硫代硫酸根)的浓度随时间的变化情况.

1.6 检测与分析方法

pH: 使用DOCU-pH计(Sartorius)测定.

硫化钠浓度: 碘量法^[13].

菌株形态观察: Nikon普通光学显微镜、JEOL JEM-1230-TEM透射电镜.

菌株生理生化实验: 参考文献[14]方法进行.

菌株生长浓度: 使用722型紫外分光光度计测定 $D_{420\text{ nm}}$ 值以及测菌株干重法, 做出 $D_{420\text{ nm}}$ 值与干重的标准曲线, 根据所做标线得出.

硫酸根、亚硫酸根、硫代硫酸根离子: 采用离子色谱仪测定(ICS-2000, DIONEX), 分离柱型号: AS19 (4.0 × 250 mm); 电导检测器35 ℃; 淋洗液: KOH (浓度梯度10~40

mmol/L); 流速1.00 mL/min; 进样量25 μL.

硫单质分析: 样品溶解于氯仿, 经离心机离心, 过滤, 采用高效液相色谱HPLC (Agilent Technologies 1200Series)分析^[15]. 检测条件: Eclipse XDB-C18反相柱 (5 μm, 4.6 × 150 mm); 检测波长254 nm; 流动相为水: 甲醇= 5: 95; 流速0.8 mL/min; 进样量5 μL; 柱温30 ℃, 出峰时间为8.9 min左右.

菌株16S rRNA鉴定与分析: 细菌DNA提取和纯化采用3S柱离心环境样品DNA回收试剂盒(V2.2, 上海申能博彩生物科技有限公司), 将细菌基因组DNA进行全序列PCR扩增, 选用细菌通用引物BSF8/20和BSR1541/20, 引物合成由大连宝生物工程有限公司完成, 序列分别为BSF8/20: 5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3'; BSR1541/20: 5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3'. PCR产物由上海英骏生物技术有限公司完成测序, 测序结果提交GenBank核酸序列数据库进行BLAST, 使用Bioedit将与之同源性较高的16S rRNA序列进行Clustalw比对, 通过MEGA4.0软件采用NJ法构建系统发育树, 大致确定菌株种属情况.

2 结果与讨论

2.1 降解菌的形态特征与生理生化分析

通过初筛与复筛, 选育到一株能高效降解硫化物的菌株, 编号为T3, 对该菌株进行革兰氏染色和氧化酶反应实验. 结果表明, 菌株革兰氏染色显阴性, 氧化酶阳性.

菌株的菌落形态为圆形, 以硫代硫酸钠为底物的LB固体培养基中呈淡乳白色, 边缘整齐, 光滑湿润. 在透射电镜下观察, 细胞呈短杆状, 大小为0.5~0.8 μm × 1.2~3.0 μm, 极生鞭毛, 菌株生理生化实验结果如表1所示.

2.2 菌株16S rRNA序列分析及其系统发育树建立

菌株T3的16S rRNA基因在经过扩增和测序后, 同GenBank中的基因序列进行同源比对, 再通过系统发育树的建立从而确定其在系统发育学上的地位. 结合菌株生理生化实验, 对菌株的1 386 bp大小的16S rRNA基因序列的分析结果显示该菌株属于*Rhizobium* sp. (根瘤菌属), 两者相似性为99%. 查阅相关文献, 未发现利用该菌株降解硫化物的报道, 由此可见, 菌株T3 (Accession No. HQ201924)可能是新发现的能降解硫化物的菌株.

表1 菌株T3生理生化特性

生理生化特征		生理生化特征	
Physiological-biochemical characteristics	结果 Result	Physiological-biochemical characteristics	结果 Result
氧化酶试验 Oxidase test	+	葡萄糖产酸 Acid production using glucose	-
接触酶试验 Catalase reaction	+	葡萄糖产气 Gas production using glucose	-
淀粉水解 Amylohydrolysis	+	明胶液化 Gelatin liquefaction	-
M.R 试验 M.R test	-	石蕊牛奶 Litmus milk	+
V.P 试验 V.P test	-	产硫化氢 Production of H ₂ S	+
吲哚试验 Indole reaction	-	柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+

+: 阳性; -: 阴性 +: Positive; -: Negative

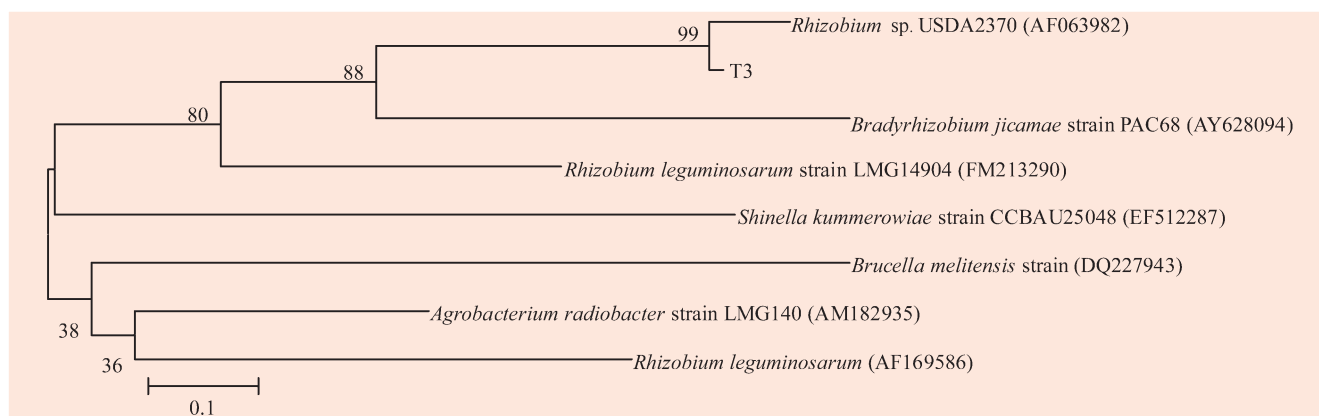


图1 菌株T3的系统发育树图
Fig. 1 Phylogenetic tree of strain T3

2.3 菌株Biolog鉴定

本研究运用Biolog技术分析菌株对95种碳源的代谢指纹图, 从而进一步确定其种属特征, 提高菌株鉴定的可靠性. 反应结果与Biolog系统数据库MicroLog software (Release Version 4.20.04) 资料进行比对, 菌株T3属于*Rhizobium radiobacter* (放射型根瘤菌) 培养24 h 系统显示结果为PROB (可能性) = 93%, SIM (相似性) = 0.55, DIS (位距) = 6.37. SIM和DIS表示测试结果与相应数据的匹配程度, 结合16S rRNA序列分析, 进一步确定菌株属于根瘤菌属.

2.4 菌株T3对硫化钠的降解特性

2.4.1 温度对菌株T3生长和降解硫化钠的影响 由图2可知, 菌株T3在温度范围30 ℃左右降解效率较高, 30 h内对初始浓度为120 mg/L的硫化钠溶液去除率接近90%, 温度高于或者低于此温度都会抑制菌株的生长, 降解率也随之降低.

2.4.2 pH对菌株T3生长和降解硫化钠的影响 由图3可知, 不同初始pH条件, 菌株T3以硫化钠为底物, 生长速率和降解速率表现出明显不同. 30 h后, pH偏酸性时, 菌株生长受抑制, 硫化钠主要以硫化氢形式发生逃逸, 所以检测出的硫化钠出现相同程度的降低. 菌株在中性条件或弱碱性条件下生长良好而且能高效的降解硫化钠, pH = 8.0时菌株对硫化钠的降解效果最高, 达90%以上.

2.4.3 不同碳源、氮源对菌株T3生长和降解硫化钠的影响 由图4、5可知, 在培养基中添加不同的碳源、氮源对T3菌株降

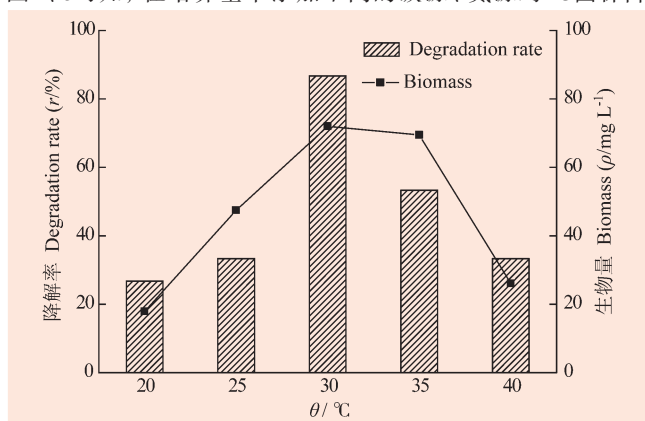


图2 温度对菌株T3生物量及硫化钠降解率的影响
Fig. 2 Effect of temperature on biomass of strain T3 and degradation of sodium sulfide

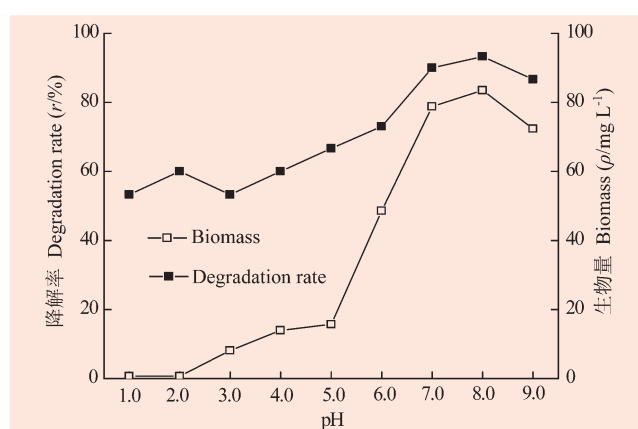


图3 pH对菌株T3生物量及硫化钠降解率的影响
Fig. 3 Effect of pH on biomass of strain T3 and degradation of sodium sulfide
解硫化钠有不同的影响, 菌株对碳源表现出广泛的适应性, 都能很好地利用, 而葡萄糖为最佳碳源. 氮源则有所不同, 其中添加氯化铵对菌株生长和降解硫化钠表现出较高的促进作用, 其他氮源利用效果较差, 降解效果也较差.

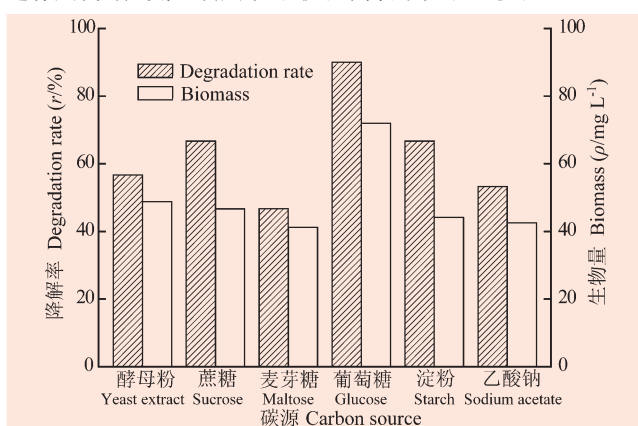


图4 碳源对菌株T3生物量及硫化钠降解率的影响
Fig. 4 Effect of carbon sources on biomass of strain T3 and degradation of sodium sulfide

2.4.4 菌株T3降解不同初始浓度的硫化钠 图6、7分别为菌株T3在最佳条件下对不同浓度硫化钠的生长曲线和降解曲线. 结果表明硫化钠浓度低于300 mg/L时, 菌株T3生长良好并可高效地降解硫化钠, 2 d内可降解彻底, 比报道过的无色硫细

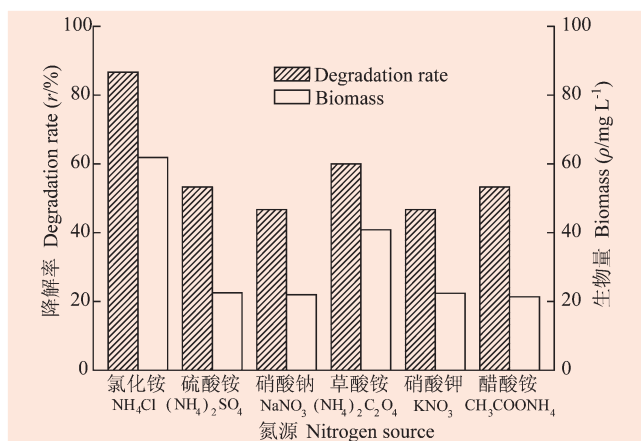


图5 氮源对菌株T3生物量及硫化钠降解率的影响

Fig. 5 Effect of nitrogen sources on biomass of strain T3 and degradation of sodium sulfide

菌^[6]和排硫硫杆菌^[7]具有更高的耐受浓度和降解率. 浓度为400~500 mg/L时, 菌株生长缓慢, 降解速率也出现下降, 当浓度高达500 mg/L时, 菌株降解率显著降低, 说明在该浓度下菌株降解过程中产生有毒物质, 抑制了菌株的生长及降解性能.

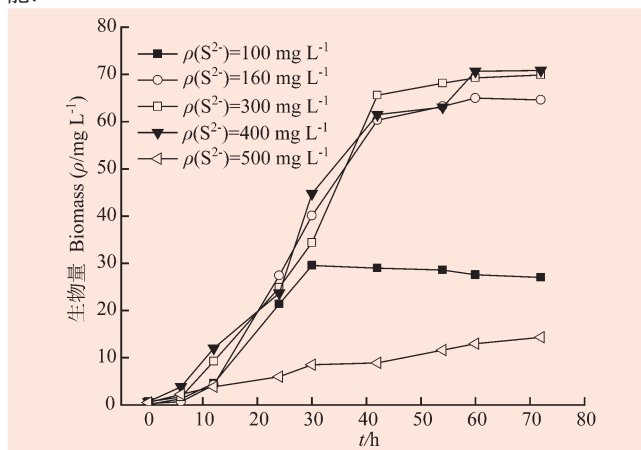


图6 不同浓度硫化钠对菌株T3的生长影响

Fig. 6 Growth curves of strain T3 at different concentrations of sodium sulfide

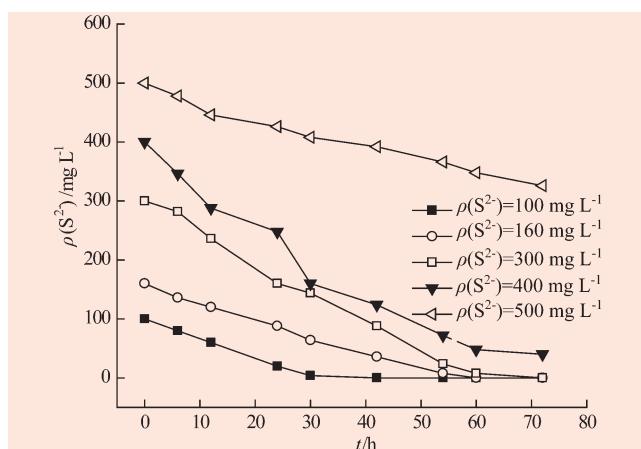


图7 菌株T3对不同浓度硫化钠的降解曲线

Fig. 7 Degradation curves of sodium sulfide with different concentrations by strain T3

2.5 菌株T3氧化硫化钠的代谢途径分析

目前已知硫化物的生物氧化途径有2条, 一条称为多硫酸盐途径, 存在于化能无机自养型硫杆菌中, 其特征是积累连多硫酸根和单质硫并最终氧化成硫酸^[16-17]; 另一条称为副球菌硫氧化途径, 其特点是将硫代硫酸盐直接氧化成硫酸, 无中间代谢物积累^[18]. 由图8可以推断, 菌株T3利用氧气将硫化钠迅速氧化成硫代硫酸根, 在酸性条件下部分化学分解为单质硫, 出现单质硫的积累, 并在40 h时达到峰值, 随着时间的延长, 硫代硫酸根浓度, 硫单质浓度再被转化为亚硫酸根, 硫代硫酸根浓度, 硫单质浓度逐渐降低, 而亚硫酸根不稳定, 很快被氧化成硫酸根, 最终氧化产物为硫酸, 即硫化钠的氧化代谢途径可表示为 $\text{S}^{2-} \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-}/\text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$. 由此可见, 菌株T3是通过类似多硫酸盐途径进行硫化钠的氧化代谢.

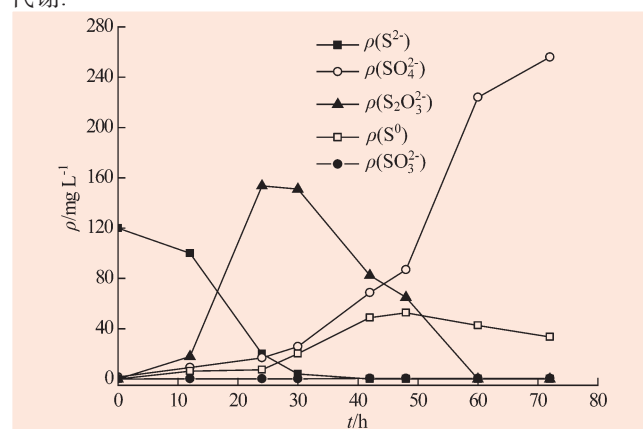


图8 硫化钠降解过程中各种中间代谢物的动态变化

Fig. 8 Dynamic changes of various intermediate metabolites during the degradation of sodium sulfide

3 结论

本研究从浙江华海药业污水处理系统中选育得到一株能高效硫氧化菌株T3, 基于菌株形态、生理生化特征、16S rRNA基因序列分析及其系统发育树和Biolog系统鉴定, 确定菌株T3为根瘤菌属, 为新型的降解硫化物的菌株.

菌株T3的最佳生长和降解温度为30℃, 最佳pH为8.0. 菌株可利用多种碳源, 而以氯化铵为最佳氮源生长. 最佳生长条件下菌株对硫化钠耐受浓度达400 mg/L, 降解率高达90%以上, 对比报道过的无色硫细菌和排硫硫杆菌在硫化钠浓度低于200 mg/L的降解特性, 充分体现了T3菌株的优越性和应用价值.

菌株T3降解硫化钠过程中出现产物硫代硫酸根、硫单质, 并最终转化为硫酸根, 该菌株主要通过类似多硫酸盐途径进行硫化钠的生物氧化.

References

- Chi YZ (池勇志), Lin YX (李亚新). Progress in harm and treatment of sulfide. *J Tianjin Inst Urban Construction* (天津城市建设学院学报), 2001, 7 (2): 105-108
- Hobson J, Yang G. The ability of selected chemicals for suppressing odour development in rising mains. *Water Sci Technol*, 2000, 41 (6): 165-173

- 3 Ma SB (马生柏), Wang B (汪斌). Research progress of removing odorous gas technology. *Poll Control Technol* (污染防治技术), 2008, **21** (5): 46~49
- 4 Ma YL (马艳玲), Zhao JL (赵景联), Yang BL (杨伯伦), Peng H (彭辉). 脱硫细菌的筛选及其对硫化氢降解性能研究. *Environ Prot Chem Ind* (化工环保), 2004, **24**: 8~11
- 5 Rattanapan C, Boonsawang P, Kantachote D. Removal of H₂S in down-flow GAC biofiltration using sulfide oxidizing bacteria from concentrated latex wastewater. *Bioresour Technol*, 2009, **100**: 125~130
- 6 Zuo JE (左剑杰), Yuan L (袁琳), Hu JC (胡纪萃), Gu XS (顾夏声). Biotechnological removal of sulfides in the effluent from sulfate reducing reactors. *Environ Sci* (环境科学), 1995, **16** (6): 7~11
- 7 Yao CZ (姚传忠), Zhang KQ (张克强), Ji M (季明), Yan HG (阎怀国), Lei YC (雷英春). 排硫硫杆菌生物强化处理含硫废水. *China Water & Wastewater* (中国给水排水), 2004, **20** (2): 57~59
- 8 Cho KS, Hirai M, Shoda M. Degradation of hydrogen sulfide by *Xanthomonas* sp. strain DY44 isolated from peat. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **4** (58): 1183~1189
- 9 Lee EY, Lee NY, Cho KS, Ryu HW. Removal of hydrogen sulfide by sulfate-resistant acidithiobacillus thiooxidans AZ11. *J Biosci Bioeng*, 2006, **101** (4): 309~314
- 10 Xu GQ (徐桂芹), Jiang AX (姜安玺), Zhang YM (张英民), Yan B (闫波). 假单胞菌固定化除硫化氢臭气的试验研究. *Water & Wastewater Engin* (给水排水), 2005, **2**: 41~43
- 11 Cheng C (程池), Yang M (杨梅), Li JX (李金霞), Yao L (姚露), Hu HR (胡海蓉). Biolog microbial identification system-study on the operating regulation of bacteria identification. *Food & Fermentation Ind* (食品与发酵工业), 2006, **32** (5): 50~54
- 12 Tang K, Baskaran V, Nemati M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochem Eng J*, 2009, **44**: 73~94
- 13 Ministry of Environmental Protection of China (国家环保局). 水和废水监测分析方法. 第4版. Beijing, China: Chinese Environmental Science Press (北京: 中国环境科学出版社), 2002
- 14 Dong XZ (东秀珠), Cai MY (蔡妙英). Identification manual of common bacteria system. Beijing, China: Science Press (北京: 科学出版社), 2001. 370~410
- 15 Molly M, Robert J. Extraction and quantitative analysis of elemental sulfur from sulfide mineral surfaces by High-Performance Liquid Chromatography. *Environ Sci Technol*, 2000, **34**: 4651~4655
- 16 Lin DQ (林栋青), Zhang YK (张彦科), Gu XY (顾向阳). Isolation, identification and characterization of thiosulfate-oxidizing bacterium TX. *Microbiology* (微生物学通报), 2009, **36** (11): 1638~1644
- 17 Hu Y (胡瑜), Bi YL (毕银丽), Zhao B (赵斌). Isolation and identification of a sulfur oxidizing bacterium and its desulphurization of coal wastes. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, **13** (1): 116~120
- 18 Anandham R, Indiragandhi P, Madhaiyan M, Ryu KY, Jee HJ, Sa TM. Chemolithoautotrophic oxidation of thiosulfate and phylogenetic distribution of sulfur oxidation gene (*soxB*) in rhizobacteria isolated from crop plants. *Res Microbiol*, 2008, **159** (9~10): 579~589