

环境保护

脱氮硫杆菌生长特性及其对 SRB 生长的影响*

刘宏芳 汪梅芳 许立铭

(华中科技大学化学系 武汉 430074)

摘要: 由土壤中分离得到一株自养型的脱氮硫杆菌 (*Thiobacillus denitrificans*, 硫杆菌属, 硫杆菌科, 革兰氏阴性化能自养细菌), 该菌株的最佳生长 pH 为 7.0。将此菌株与硫酸盐还原菌 (Sulfate Reducing Bacteria, SRB, 脱硫弧菌属, 革兰氏阴性厌氧细菌) 混合培养, 测定 SRB 的菌量变化, 结果表明, 脱氮硫杆菌的生长抑制了硫酸盐还原菌的生长, 降低了 SRB 的腐蚀性的代谢产物硫化物的浓度, 腐蚀速率降低, 有利于防治 SRB 引起的微生物腐蚀。

关键词: 脱氮硫杆菌, 硫酸盐还原菌, 代谢过程

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 03-0046-04

CHARACTERISTICS OF *THIOBACILLUS DENITRIFICANS* AND THE EFFECT ON THE GROWTH OF SRB

LIU Hong-Fang WANG Mei-Fang XU Li-Ming

(The Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract: In this paper, a strain of *Thiobacillus denitrificans* was isolated from soil. The optimal pH for growth was 7.0. In mixed cultivation with SRB, the number of SRB was determined. The results show that *Thiobacillus denitrificans* can restrain the growth of SRB, and decrease the concentration of corrosive metabolic production caused by SRB. The corrosion rate reduces as a result. So it is propitious to prevent and cure the corrosion caused by SRB.

Key words: *Thiobacillus denitrificans*, Sulfate Reducing Bacteria, Metabolic process

在自然水环境中硫酸盐还原菌是引起微生物腐蚀最为普遍, 占腐蚀的 20% 左右^[1]。微生物的生命活动产生的硫化物和硫化氢等恶化了环境, 危害人类的健康, 同时也使得设备及埋地管线遭受破坏, 给工业生产带来损失。为此在不破坏环境条件下, 利用系统本身微生物的竞争生长机制, 防治细菌腐蚀具有重要的理论和经济意义。

脱氮硫杆菌^[2] (*Thiobacillus denitrificans*, 简称 *T. denitrificans*) 是一种严格自养和兼性厌氧型细菌, 广泛存在于运河水、各种矿水、海洋、污泥和土壤中。在好气条件下与一般硫杆菌相似, 能将元素 S 和硫酸盐氧化为 H₂SO₄^[3]。在厌气条件下, 利用硝酸盐为电子最终受体, 硝态氮还原成游离氮, 该菌能氧化多硫磺酸盐、硫化物, 但氧化元素硫作用缓慢。鉴于此菌有脱硫的性质, 近年来利用脱氮硫杆菌氧化二价硫, 从沼气或天然气中去除 H₂S 的研究活跃。Gevertz D 等^[4] 研究发现, 脱氮硫杆菌对 SRB 引起的腐蚀有明显抑制作用, 但对两种细菌的竞争生长规律研究未见报道。

本论文主要分离、提纯获得一株自养菌——脱氮硫杆菌, 并就其生长特性, 以及

* 湖北省自然科学基金资助项目 (No. 2000J013)

收稿日期: 2002-07-05, 修回日期: 2002-11-10

与SRB竞争生长规律进行初步探讨,为进一步开发生物方法防治SRB腐蚀提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株的富集、培养、分离及纯化

脱氮硫杆菌的土样采自酸性(pH为2~3左右)、潮湿土壤。自然状态下分批加入脱氮硫杆菌培养基,3周后取出培养土层进行分离培养,取样土层距地面15cm。参照文献[5]称土样0.5g,迅速倒入带玻璃珠的无菌水瓶中(玻璃珠用量以充满瓶底为最好),振荡5~10min使土样充分打散,即成为 10^2 的土壤悬液;用无菌移液管吸 10^2 的土壤悬液0.5mL,放入4.5mL无菌水中即成 10^3 稀释液,如此重复,可制成 $10^3 \sim 10^8$ 的稀释液;培养后,取最后一级变浑浊的菌液,按上述的逐级稀释法培养,反复多次,得到纯的细菌。SRB菌种由胜利油田注水中分离、提纯,并冷藏保存备用。

1.2 培养基及培养条件

脱氮硫杆菌的培养基成分参见文献[6],培养温度30℃。SRB采用APIRP-38推荐的培养基及培养条件^[7]。

1.3 TEM对细菌的形态鉴定

根据透射电镜分析细菌的方法^[8],取含细菌的培养基滴于红蜡片上,并覆盖上铜网,2min后取铜网于2%的磷钨酸钠溶液中染色,最后将此铜网置于日本HATACHI H-8100 Electron Microscope透射电镜的样品室,观察细菌形貌。

根据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)进行鉴定^[2]。

1.4 生长特性的研究

将脱氮硫杆菌进行两次活化,然后测定其在培养基中的生长曲线,同时测定生长过程中培养基介质的pH变化。设定pH范围为4.0~8.0,pH梯度间隔为1.0。根据生长过程中培养基变浑浊特性,利用Unico 7200分光光度计间接检测脱氮硫杆菌培养后的OD(Optical Density)值代表生长情况($\lambda = 420\text{nm}$)。

1.5 微生物分析

采用MPN^[9]法测量介质中SRB的菌量。

1.6 H₂S的测定

参照GB1106.1-89测定H₂S的含量^[10]。

2 结果与讨论

2.1 菌株鉴定

脱氮硫杆菌培养7d后,在电镜下观察,可见菌细胞杆状,单个、成对或短链状排列,具有单根极生鞭毛,无芽孢,菌体大小为 $0.3\mu\text{m} \sim 0.5\mu\text{m} \times 1.0\mu\text{m} \sim 1.5\mu\text{m}$,见图1。革兰氏染色阴性。此菌株的主要特征与硫杆菌属的脱氮硫杆菌相同,专性无机化能自养型。

2.2 菌株生长特性

2.2.1 pH值对菌生长的影响:脱氮硫杆菌在不同pH的培养基中的生长情况(表1)。



图1 脱氮硫杆菌透射电镜照片($\times 13,000$)

表1 pH对菌生长的影响

初 pH	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
终 pH	4.7	5.9	5.5	6.3	7.7
OD 值	0.057	0.078	0.165	0.211	0.11

由表1可见菌株的最佳生长 pH 为 7.0。这与 SRB 的生长所要求的 pH 相近，为两者共存于同一生长环境提供可行性依据。

2.2.2 脱氮硫杆菌生长曲线：取一定量的细菌活化培养，测其 OD 值随时间的变化(图2)。脱氮硫杆菌生长过程中介质 pH 随时间的变化规律(图3)。由图2可知脱氮硫杆菌生长比较缓慢，与有关文献报道一致^[11]，而且其没有明显的稳定生长期，延滞期则较长，约 5.5d。5.5d 后细菌进入对数生长期，这一阶段持续时间较短，大约 1.5d，在此阶段，细菌生长活跃，大量繁殖，导致介质 pH 下降很快，图3的结果与此相符。之后由于营养物质的逐渐消耗，介质酸性增加，改变了细菌的最佳生长环境，细菌的生长进入衰亡期，逐渐死亡。

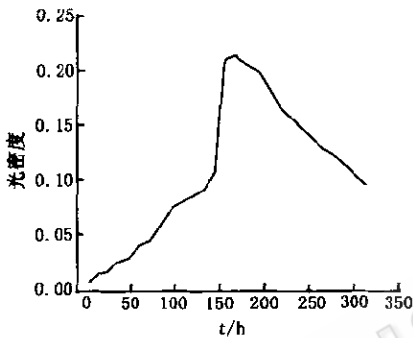


图2 *T. denitrificans* 生长曲线

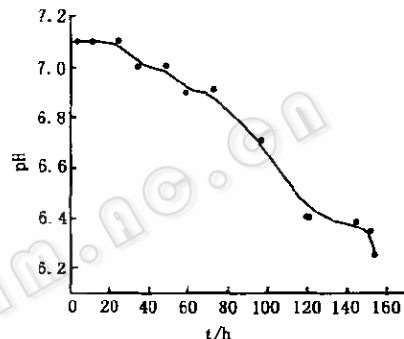
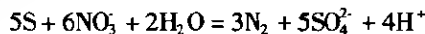


图3 pH 随时间变化图

从图3可以看出，随着细菌的生长繁殖，培养基介质的 pH 值下降，这与文献报道一致^[12]。这是因为在脱氮硫杆菌的生长代谢过程中将发生如下的化学反应：



从上式可以看出，脱氮硫杆菌在将硝酸盐还原成氮气的同时，将硫或其化合物氧化为硫酸盐，反应过程中有 H⁺ 产生，导致培养介质的 pH 下降。脱氮硫杆菌生长过程中 pH 值从 7.1 下降到 6.2 左右，培养 2~5d 后 pH 变化很快，然后趋向平缓。这与其生长曲线基本一致。

2.3 脱氮硫杆菌对 SRB 生长的影响

将 SRB 与脱氮硫杆菌共同培养，测定在此环境下 SRB 生长过程中的菌量变化。SRB

表2 脱氮硫杆菌对 SRB 生长的影响

培养时间 (d)	4	5	13	17
N ₀ (cells/mL)		3.0 × 10 ⁸		
N ₁ (cells/mL)	6.5 × 10 ⁹	4.0 × 10 ⁸	3.5 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸
N ₂ (cells/mL)	0.6 × 10 ⁷	3.5 × 10 ⁵	2.0 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁶

注：脱氮硫杆菌的菌量为 7.5 × 10⁹

的原始菌量记为 N₀；无脱氮硫杆菌时，测定 SRB 菌量记为 N₁；存在脱氮硫杆菌时，测定 SRB 菌量记为 N₂。实验结果见表 2。

结果表明：在有无脱氮硫杆菌两种情况下，SRB 的菌量最大

时相差 3 个数量级，说明脱氮硫杆菌的存在对 SRB 的生长有一定的抑制作用。

2.4 脱氮硫杆菌对 SRB 腐蚀性代谢的影响

从表2可以看出，两种条件下，SRB 菌量变化不明显，变化最大时，相差 3 个数量

级。说明脱氮硫杆菌的存在对 SRB 的菌量影响不大。在厌氧条件下, 脱氮硫杆菌能利用 NO_3^- 作为电子受体, 将还原型无机硫化物作能源, 将它们氧化成 SO_4^{2-} , 而 SO_4^{2-} 又可是 SRB 所利用, 由此可知脱氮硫杆菌的存在不是与 SRB 争夺营养源, 而是阻止 FeS 和 H_2S 产生, 也就是抑制 SRB 的还原产物硫化物的积累, 从而抑制硫化物所造成的腐蚀, 为此实验中检测了 SRB 代谢过程中腐蚀性 S^2 的含量。实验结果见表 3。

从表中结果可以看出, 随着生长时间的延长, 开始时 H_2S 含量差异不明显, 这可能与脱氮硫杆菌的活性有关, 从其生长曲线可以看出, 脱氮硫杆菌在 5.5d 后, 处于旺盛繁殖时期, 对硫化物的消耗增加, 介质中 H_2S 含量明显降低, 腐蚀速率降低 (表 4)。由此证明脱氮硫杆菌对 SRB 腐蚀的抑制是通过减少腐蚀性硫化物的积累实现的。

表 3 脱氮硫杆菌对 SRB 腐蚀性代谢的影响

生长时间 (d)	4	10	15
SRB 单独存在时 H_2S 含量 (mg/L)	480	1200	1245
两种细菌共存时 H_2S 含量 (mg/L)	380	450	420

表 4 碳钢在 SRB 及混菌中腐蚀实验

菌种	无	SRB	SRB 和 <i>T. denitrificans</i>
腐蚀速率 (mm/a)	0.0334	0.0558	0.0253

3 结论

本实验分离的脱氮硫杆菌呈杆状, 单个、成对或短链状排列, 具有单根极生鞭毛, 无芽孢, 菌体大小为 $0.3\mu\text{m} \sim 0.5\mu\text{m} \times 1.0\mu\text{m} \sim 1.5\mu\text{m}$ 。革兰氏染色阴性。

在培养基体系中, 脱氮硫杆菌生长缓慢, 没有明显的稳定生长期; 且随着脱氮硫杆菌的生长繁殖, 介质中 pH 下降。脱氮硫杆菌的最佳生长 pH 为 7.0, 而 SRB 在中性 pH 产生腐蚀, 两菌的生长环境相近, 当两者混合培养时, 脱氮硫杆菌对 SRB 的生长影响不大。

脱氮硫杆菌的存在不是与 SRB 争夺营养源, 而是阻止 FeS 和 H_2S 产生, 也就是抑制 SRB 的还原产物硫化物的积累, 从而抑制硫化物所造成的腐蚀。

参考文献

- [1] Flemming H C. in: Heitz E, Flemming H C, Sand W, Editors, Microbially Influenced Corrosion of Materials, 1st ed., Springer, Berlin, 1996, 5.
- [2] R E 布坎南, N E 古本斯. 伯杰细菌鉴定手册 (第八版), 北京: 科学出版社, 1984.
- [3] 陈华癸, 樊庆笙. 微生物学. 北京: 农业出版社, 1982.
- [4] Gevertz D, Jenneman G E, Zimmerman S. in: Bryand R ed. Proceeding of the Fifth International Conference on MEOR and Related Biotechnology for Solving Environmental Problems, US Dept of Energy, 1995, 295 ~ 307.
- [5] 黄秀梨, 微生物实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [6] Kerry L S, Nicholas D S. Biotechnology and Bioengineering, 1987, 29 (2): 249 ~ 257.
- [7] Boot C H, Eford L, Wakerloy D S. Brit Corrosion, 1998, 23 (3).
- [8] 刘鼎新, 吕证宝. 细菌生物学研究方法与技术 (第二版). 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1996.
- [9] American Public Health Association, Standard Methods for the Examinations of Water and Wastewater, 16th Edition, Washing. 1989.
- [10] 中国石油天然气总公司. 天然气中硫化氢含量测定. 碘量法. 中华人民共和国国家标准, GB, 11060. 1 ~ 89.
- [11] M T 马迪根, J M 马丁克, J 帕克. 微生物生物学 (第八版). 北京: 科学出版社, 2001.
- [12] 刘玲花. 环境工程, 1994, 3: 3 ~ 8.