

# 一株脱硫自养菌的鉴定和脱硫特性研究

闫旭<sup>1</sup> 吴晓雨<sup>1</sup> 陆新<sup>1,2</sup> 严群<sup>1,2</sup> 阮文权<sup>1,2\*</sup>

(1. 江南大学环境与土木工程学院 江苏 无锡 214122)

(2. 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脱硫性能的自养菌, 对该细菌的 16S rDNA 序列进行了测定, 并根据 16S rDNA 构建了系统发育树, 结合菌落、细菌形态鉴定菌株为那不勒斯硫杆菌(*Thiobacillus neapolitanus*), 命名为 TL-1。同时, 考察了 TL-1 菌株在不同温度和 pH 条件下的脱硫效率, 并在反应器中以氧化还原电位(ORP)为控制条件, 对菌株的脱硫效果和生成的单质硫颗粒特性进行了研究, 结果表明, 摇瓶实验中, 30°C、pH 7.5 为脱硫最佳条件。反应器运行时, ORP 控制在-370 mV 条件下运行效果最佳, 系统能够维持 95%以上的硫化物去除率和 85%以上的单质硫回收率, 随着 ORP 的增大, 生成的单质硫颗粒粒径有逐渐增大的趋势。

**关键词:** 脱硫, 鉴定, 影响因素, ORP, 单质硫颗粒

## Identification and Sulfide Removal Characteristics of a Desulfurizing Strain

YAN Xu<sup>1</sup> WU Xiao-Yu<sup>1</sup> LU Xin<sup>1,2</sup> YAN Qun<sup>1,2</sup> RUAN Wen-Quan<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Environment and Civil Engineering Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** A desulfurizing chemoautotroph strain TL-1 was isolated and further identified in this study. Moreover a phylogenetic tree was constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of the relative bacteria species. Based on the colony and cell morphology, this strain was identified to be the strain of *Thiobacillus neapolitanus*. The effect of different temperature and pH on the strain was studied in shake flask. In the airlift reactor, the desulfurizing efficiency and the characteristics of the sulfur particles were investigated using Oxidation Reduction Potential (ORP) as the control factor. The results indicated that the optimal condition for desulfurizing in shake flask was 30°C and initial pH of 7.5. In the airlift reactor, the optimal ORP was at -370 mv, under this condition, sulfide removal rate was over 95% and over 85% sulfide was transferred into sulfur. Moreover the sulfur particles size was enlarged with the increase of ORP.

**Keywords:** Desulfurization, Identification, Influencing factors, ORP, Sulfur particles

含硫化物废水主要来源于制革、造纸、石化、印染、制药、炼焦等行业, 同时也是含硫酸盐和亚

硫酸盐废水厌氧处理时伴随的主要问题, 由于硫化物具有的毒性、腐蚀性、恶臭和高耗氧等问题, 必

须采取有效的措施控制其向环境中排放<sup>[1]</sup>。目前采用的直接气提、氧化和化学沉淀等常规物化工艺最大的弊端在于能耗、化学药剂和运行费用相对较高<sup>[2]</sup>。而近几年发展起来的生物脱硫工艺可以有效地弥补传统脱硫工艺的缺陷,并且能够产生具有附加值的单质硫,实现了废物资源化。因此,尽管生物脱硫工艺起步较晚,但已经逐渐成为研究热点。

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<sup>[2]</sup>。硫杆菌的共同特点是能够氧化还原硫化物并从中获得生长和活动所需的能量,其主要反应为<sup>[3]</sup>:



从上面的反应式可以看出,硫杆菌氧化硫化物的过程分2步:第1步反应较快,硫化物为电子供体,释放两个电子,生成单质硫, $\text{O}_2$ 为电子受体;第2步,这些生成的单质硫又作为电子供体,被继续氧化成亚硫酸盐和硫酸盐。

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。近年来国内已经有利用*Thiobacillus ferrooxidans*的间接氧化作用脱除硫化物的报道<sup>[4]</sup>。已经有研究人员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<sup>[5]</sup>。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,但已报道的脱硫菌株效率不高。国内关于硫化物氧化细菌的研究,大多停留在细菌外部形态,脱硫条件的摸索,并未对细菌在系统分类学方面进行深入的探讨,与高效脱硫反应器的开发和实际工业应用还存在着较大的距离。

本研究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、系统发育学、脱硫的影响因素和产生的单质硫颗粒特性进行了研究,为后续高效脱硫反应器的实际应用奠定了基础。

## 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、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.0、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4.0、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.8、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  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三角瓶中,加入50 mL培养基,初始pH调节至中性,于30°C、170 r/min条件下在摇床上培养。待菌液pH下降至3左右时取5 mL菌液于装有50 mL培养基的250 mL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1000倍光学显微镜下观察革兰氏染色菌体形态、鞭毛形态<sup>[6]</sup>。

### 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比对均参照文献<sup>[7]</sup>。

### 1.3 温度对TL-1脱硫效果的影响

温度条件分别调节为24°C、27°C、30°C、33°C、36°C、39°C、42°C和45°C,取50 mL以 $\text{S}^{2-}$ 为唯一硫源的液体培养基于250 mL锥形瓶中,培养基成分见表1,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为7、170 r/min恒温气浴摇床中培养,反应2 h后测定硫化物含量。

### 1.4 pH对TL-1脱硫效果的影响

取50 mL以 $\text{S}^{2-}$ 为唯一硫源的液体培养基于250 mL锥形瓶中,培养基成分见表1,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。初始pH分别调节为6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5和10,在30°C、170 r/min恒温气浴摇床中培养,反应2 h后测定硫化物含量。

### 1.5 反应器中不同ORP条件下硫化物转化率和单质硫颗粒粒径

**1.5.1 实验装置:**采用升流式好氧反应器为试验的主体反应器,有效体积6.28 L,底部直径为10 cm,总高80 cm,玻璃制作。沉淀罐有效体积5 L,总高100 cm,玻璃制作,顶部设有三相分离器。试验装置流程见图1所示。

**1.5.2 试验方法:**本实验控制进水pH为 $7.0 \pm 0.2$ ,反应器中的pH为7.2~7.8,温度为 $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ,水力停

表 1 培养基成分  
Table 1 Medium composition

成分 Constituents	浓度 Concentration (mg/L)	微量元素 Trace elements	浓度 Concentration (mg/L)
S <sup>2-</sup>	120	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.44
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200	CaCl <sub>2</sub>	0.11
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1
NH <sub>4</sub> Cl	60	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.022
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.031
		CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.032

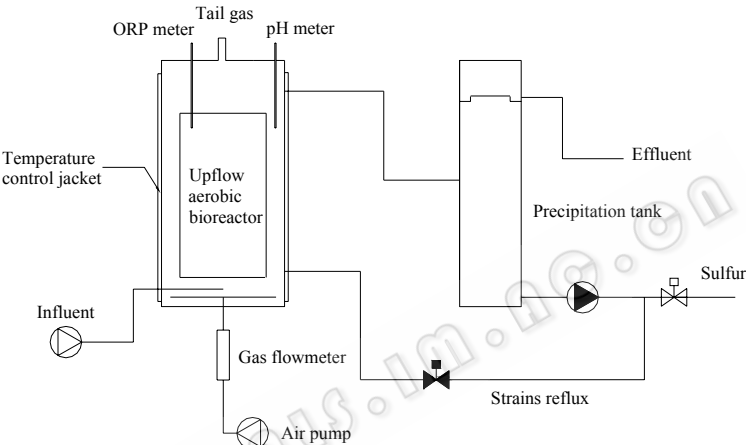


图 1 试验装置流程示意图  
Fig. 1 Flow diagram of experimental apparatus

留时间 3 h。人工配制S<sup>2-</sup>浓度为 350 mg/L废水(其它成分及浓度同表 1), 通过调节曝气量来控制反应器系统内的ORP(−420 mV、−370 mV、−320 mV), 考察硫化物的去除情况及生成单质硫的特性。

1.6 测试项目与方法

- pH 值：METTLER TOLEDO 在线 pH 仪;
- ORP 值：METTLER TOLEDO 在线 ORP 仪;
- 可溶性硫化物：碘量法<sup>[8]</sup>;
- 硫酸盐：铬酸钡分光光度法<sup>[9]</sup>(752 分光光度计);
- 硫化氢：T40 RATTLER 英思科硫化氢检测仪;
- 硫颗粒粒度：马尔文激光粒度仪 Mastersizer 2000。

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并以CO<sub>2</sub>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后长出针尖大小浅黄色菌落, 4 d后菌落生长至直径 1 mm左右的圆形淡黄色菌落, 菌落形态见图 2, 长期培养后菌落色泽逐渐变暗, 呈浅黄褐色。

在 1000 倍光学显微镜下观察可知TL-1 菌体形态, 见图 3, 长 0.5 μm~1.0 μm。细菌革兰氏染色呈阳性, 不产生芽孢, 单极生鞭毛见图 4, 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<sup>[10]</sup>。

所测菌株TL-1 的 16S rDNA核苷酸序列为 1456 bp。将所测序列从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(图 5), 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》<sup>[10]</sup>



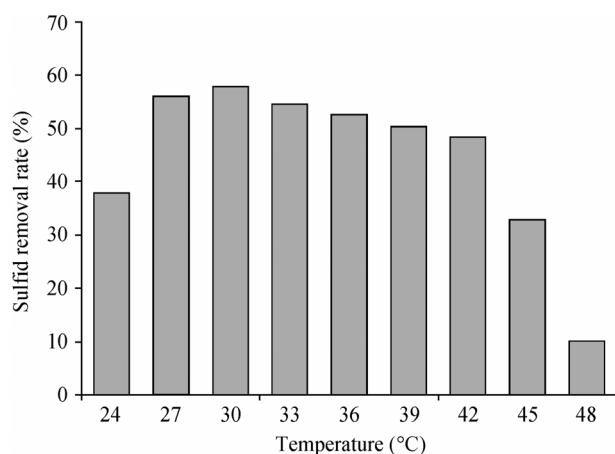


图6 温度对硫化物去除率的影响

Fig. 6 Effect of temperature on sulfide removal rate

产生这种现象的原因主要可能是由于 TL-1 菌株中硫化物氧化酶对温度条件的适应性所致, 当温度高于 42°C 时导致硫化物氧化酶变性, 酶活降低, 温度越高, 对该酶的影响越大, 48°C 时酶的活性已经基本丧失。

### 2.3 pH 对 TL-1 脱硫效果的影响

图 7 为 TL-1 菌株初始 pH 分别为 6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5 和 10, 硫化物浓度为 120 mg/L 时, 反应 2 h 后硫化物的去除情况。由图可知, TL-1 菌株在初始 pH 为中性 and 偏弱碱性时具有较强的硫化物氧化能力, 在初始 pH 为 7.5 时, TL-1 菌株对硫化物的去除效率最高, 达到了 62.11%。在 pH 高于 8 的碱性环境下, 硫化物去除率发生明显下降, 说明菌株对偏碱性环境适应性较差。在 pH 低于 7 的条件下, 硫化物去除率也出现了明显的降低, 但降低幅度低于 pH 大于 8 的偏碱性环境。

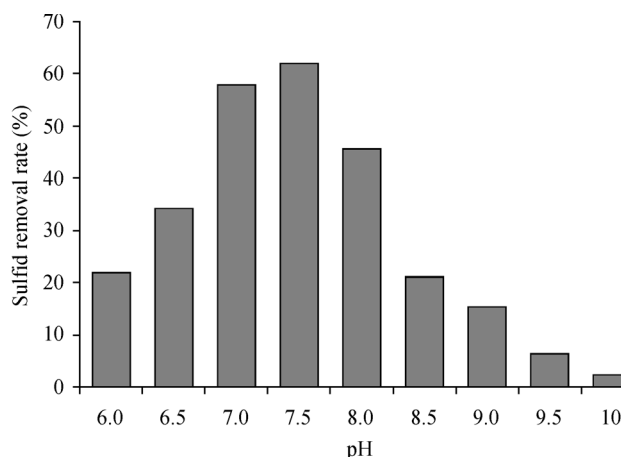


图7 不同 pH 下硫化物的去除率

Fig. 7 Effect of pH on sulfide removal rate

### 2.4 反应器中不同 ORP 条件下的硫化物转化率

系统的氧化还原电位是多种氧化物与还原物进行氧化还原反应的综合结果, 对生物处理系统而言, ORP 是反映整个系统氧化还原状态的综合指标<sup>[11]</sup>。氧化还原反应的本质是电子的转移。物质接受电子的倾向越大, 其氧化性就越强, 反之越弱, 通过测定 ORP 数值均可以得到反映<sup>[9]</sup>。已有较多以 ORP 作为控制条件的废水处理研究的报道。马勇等<sup>[12]</sup>以 ORP 作为缺氧-好氧法工艺反硝化反应模糊控制的参数。Wareham 等<sup>[13]</sup>以 ORP 作为废水处理过程中实时控制的参数。

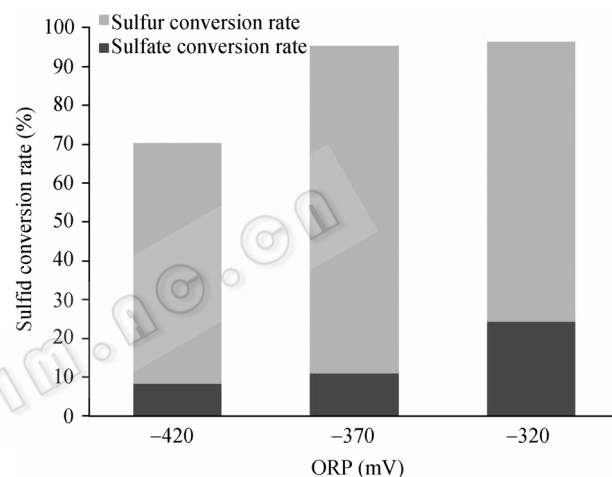


图8 不同 ORP 条件下硫化物转化率

Fig. 8 Sulfide conversion rate on different ORP

图 8 为反应器中含 350 mg/L 硫化物废水在不同 ORP 控制条件下硫化物去除率以及硫化物的单质硫和硫酸盐转化率情况, 硫化物经过微生物氧化转化为单质硫和硫酸盐, 同时, 少量硫化物以硫化氢气体形式通过反应器尾气排气管排出, 经检测浓度保持在 7 mg/m<sup>3</sup>~15 mg/m<sup>3</sup>, 相对于水体中硫化物的含量可以忽略不计。如图 8 所示, 硫化物的去除率随 ORP 的升高而升高, 在 ORP 保持在 -370 mV 和 -320 mV 条件下, 硫化物去除率均高于 95%, 分别达到了 97% 和 98.2%。在硫化物的去除率都保持在较高水平的情况下, ORP 的升高明显提高了硫酸盐的生成率, 反应器 ORP 保持在 -320 mV 时硫酸盐转化率达到 24.1%, 明显高于 ORP 在 -370 mV 时的 10.8%。这说明反应器 ORP 在 -370 mV 时, 系统中保持了较高水平的氧化还原反应强度, 作为电子受体的 O<sub>2</sub> 含量充足, 废水中的硫化物大部分通过第一阶段反应被氧化转化为单质硫, 只有少部分单质硫

通过第二阶段反应转化为硫酸盐。ORP保持在 $-320\text{ mV}$ 时, 反应系统中的氧化还原反应达到了更大的强度,  $\text{O}_2$ 含量较 $-370\text{ mV}$ 时更高, 所以通过第二阶段反应转化为硫酸盐的量更大。ORP保持在 $-420\text{ mV}$ 的较低值时, 硫化物转化率和硫酸盐转化率都处于较低水平, 分别只有 $61.8\%$ 和 $8.3\%$ 。说明系统中没有足够的电子受体 $\text{O}_2$ , 氧化还原反应强度较低, 没有充分氧化废水中的硫化物, 导致去除率较低。

## 2.5 反应器中不同 ORP 条件下的单质硫颗粒粒径变化

图 9~11 为反应器系统 ORP 分别保持在 $-420\text{ mV}$ 、 $-370\text{ mV}$ 、 $-320\text{ mV}$ 时生成的单质硫粒径分布图, 从图中可以看出, 3 种运行条件下产生的单

质硫颗粒均出现了两个粒径分布比较集中的峰, ORP 控制在 $-420\text{ mV}$ 、 $-370\text{ mV}$ 条件下产生的单质硫粒径主要集中在 $0.05\text{ }\mu\text{m}$ ~ $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 和 $2\text{ }\mu\text{m}$ ~ $11\text{ }\mu\text{m}$ 两个粒径范围内。 $-420\text{ mV}$ 条件下硫颗粒在两个粒径范围内分别占到了 $64.43\%$ 和 $35.57\%$ ;  $-370\text{ mV}$ 条件下硫颗粒在两个粒径范围内分别占到了 $48.22\%$ 和 $51.78\%$ 。ORP 保持在 $-320\text{ mV}$ 时, 粒径分布较前两个运行条件发生了很大变化, 主要分布在 $2\text{ }\mu\text{m}$ ~ $13\text{ }\mu\text{m}$ 和 $100\text{ }\mu\text{m}$ ~ $700\text{ }\mu\text{m}$ 两个粒径范围内, 颗粒较前两个运行条件明显增大。

这说明系统中的单质硫颗粒产生初期粒径较小, 然后在系统中通过某种方式聚集后形成粒径较大的颗粒。硫杆菌将硫化物氧化后, 形成附着在细胞外的硫颗粒, 这种硫颗粒表面包裹着一层类似蛋白质

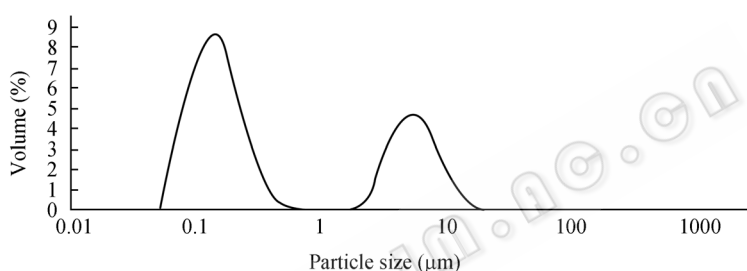


图 9 ORP  $-420\text{ mV}$  条件下生成的单质硫颗粒粒径  
Fig. 9 Sulfur particles size at  $-420\text{ mV}$  ORP

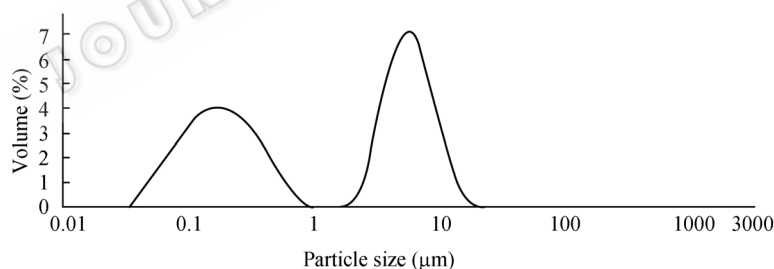


图 10 ORP  $-370\text{ mV}$  条件下生成的单质硫颗粒粒径  
Fig. 10 Sulfur particles size at  $-370\text{ mV}$  ORP

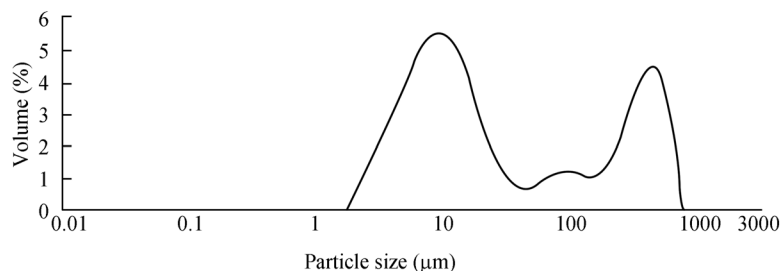


图 11 ORP  $-320\text{ mV}$  条件下生成的单质硫颗粒粒径  
Fig. 11 Sulfur particles size at  $-320\text{ mV}$  ORP

的多聚物<sup>[14]</sup>。这些多聚物都是一些大分子物质,具有很大的表面积,加上表面的各种极性和非极性基团,具有吸附絮凝的能力,这些多聚物能够使微小颗粒的单质硫聚集形成粒径较大的硫颗粒。从ORP在-420 mV和-370 mV运行条件下产生单质硫的粒径分布情况可以看出,ORP的提高,即反应系统中氧化还原反应强度的增加有利于硫颗粒的聚集,这可能是由于系统中O<sub>2</sub>含量的增加有利于菌体代谢产生多聚物中絮凝能力较强的成分,有利于硫颗粒在系统内聚集,使硫颗粒的粒径在2 μm~11 μm范围内的量显著提高。ORP控制在-320 mV运行条件时,粒径显著增大,这可能是由于在-320 mV条件下菌体代谢产生的胞外聚合物发生了显著变化,有利于絮凝作用的成分大量增加,使硫颗粒的聚集效果增强,聚集后产生的颗粒粒径明显增大。

### 3 结语

本研究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,结合菌落、细胞形态的观察,鉴定该菌为那不勒斯硫杆菌(*Thiobacillus neapolitanus*),并命名为TL-1。摇瓶脱硫实验证明,30°C、pH为7.5条件下菌株去除硫化物效率最高。在反应器中接种该菌株,在不同ORP条件运行后结果表明,ORP保持在-370 mV,系统运行效果最佳,随着ORP的增大,生成的单质硫颗粒粒径有明显的增大趋势。对于产生单质硫颗粒的机理以及如何对单质硫进行有效的回收有待进一步研究。

### 参 考 文 献

[1] Buisman CJ. Biotechnological sulfide removal in three

polyurethane carrier reactors: stirred, bio-rotor reactor and up flow reactor. *Water Research*, 1990, **24**(2): 245–251.

[2] Kuenen JG, Robertson LA. The use of natural bacterial population for treatment of sulfur containing wastewater. *Biodegradation*, 1992, **3**: 239–254.

[3] 任南琪, 王爱杰, 李建政, 等. 硫化物氧化及新工艺. 哈尔滨工业大学学报, 2003, **35**(3): 265–268.

[4] 马艳玲, 赵景联, 杨伯伦. 固定化脱氮硫杆菌净化硫化氢气体的研究. 现代化工, 2004, **24**(2): 30–34.

[5] Denome SA, Olson ES, Young KD. *Appl environ Microbial*, 1994, **59**(9): 2837–2843.

[6] 诸葛键, 王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工出版社, 1994, pp.57–87.

[7] 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. 微生物学通报, 2006, **33**(5): 84–88.

[8] 宋仁元等译. 水和废水标准检验手册. 北京: 中国建筑工业出版社, 1985, pp.404–415.

[9] David G, Jeff M. ORP Measurements in water and wastewater. *Ultrapure Water Journal*, 1993, **25**(5): 26–31.

[10] John G, Holtt. Bergey's manual of determinative bacteriology 9th ed. 1994, pp.427–455.

[11] 邓 婷, 刘 威, 李小明, 等. pH、ORP 监控在亚硝酸盐生物脱氮过程中的应用. 环境科学与技术. 2007, **30**(3): 97–99.

[12] 马 勇, 彭永臻, 王淑莹, 等. 以氧化还原电位作为缺氧-好氧法工艺反硝化反应模糊控制的参数. 现代化工, 2004, **24**(2): 39–43.

[13] Wareham G, Hall KJ, Mavinic DS. Real-time control of wastewater treatment systems using ORP. *Wat Sci Tech*, 1993, **28**(11-12): 273–282.

[14] AJH Janssen, G Lettinga, A de Keizer. Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1999, **151**(1-2): 389–397.

### 稿件书写规范

#### 论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前3个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H、*Msp*、*Sau*3A 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用3个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。