

## 研究报告

## 耐盐硫氧化菌的筛选、鉴定及脱硫性能研究

陈金才 冯守帅 高凯 计云鹤 罗斌 杨海麟\*

(教育部工业微生物技术重点实验室 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

**摘要:**【目的】从典型自然环境中筛选耐盐高效硫氧化菌, 研究其生长特性, 并进行初步脱硫实验。【方法】以硫代硫酸钠为唯一能源底物的培养基富集脱硫菌, 经过 3 次平板划线培养、纯种分离后得到纯种培养。经过革兰氏染色、平板菌落形态观察及形态学特征研究, 并结合 16S rRNA 基因序列分析及分子系统发育树的构建结果, 确定菌株的种类。【结果】从上海外高桥某发电厂冷却水池中筛选分离出一株硫代硫酸盐去除率高、耐盐性较强的细菌, 命名为 CYJN-1。该菌为革兰氏阴性菌, 短杆状, 鉴定为那不勒斯菌(*Halothiobacillus neapolitanus*)。 *H. neapolitanus* CYJN-1 具有较强适应盐度变化的能力, 菌株生长的盐度范围为 0–5% (NaCl, 质量体积比)。菌株最适生长条件为: 温度 30 °C、pH 7.0、底物浓度为 20 g/L。在此条件下, 该菌对硫代硫酸钠的去除率可达 98%。【结论】 *H. neapolitanus* CYJN-1 耐盐性较强, 硫代硫酸盐去除率高, 在生物脱硫、生物冶金等领域都具有潜在的应用前景。

**关键词:** 那不勒斯菌, 耐盐特性, 生理与分子鉴定, 生物脱硫

## Isolation, identification and biodesulfurization performance research of salt-tolerant sulfur oxidizing bacteria

CHEN Jin-Cai FENG Shou-Shuai GAO Kai JI Yun-He LUO Bin YANG Hai-Lin\*

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

**Abstract:** [Objective] Screening the typical, efficient desulfurization bacteria from the natural environment, exploring the growth characterization of the bacteria and conducting the preliminary desulfurization experiments. [Methods] The medium with sodium thiosulfate as the sole energy substrate was used to enrich desulfurization bacteria, and the pure strain was obtained after being streak plate culture and pure strain isolation for three times. Identifying the species of the strain by a variety of methods of Gram staining, plate colony morphologic observation, morphological characteristics research, 16S rRNA gene sequence analysis and the constructed molecular phylogenetic tree. [Results] Isolating a strain of efficient removal of thiosulphate bacteria, named CYJN-1 from the cooling water pool of Shanghai Waigaoqiao power station. The strain was Gram-negative bacteria, short rod and identified as *Halothiobacillus neapolitanus* (*H. neapolitanus*) bacteria. *H. neapolitanus* CYJN-1 had a

基金项目: 江苏省创新计划项目(No. CXZZ11\_0481); 江南大学博士研究生科学研究基金项目(No. JUDCF11013); 国家 863 计划项目(No. 2012AA021302)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918119; 19891996@sina.com, bioprocessor@aliyun.com

收稿日期: 2014-10-19; 接受日期: 2014-11-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-26

strong adaptability to the changes of salinity, the salinity range for the growth of this bacteria was 0–5% (NaCl, *W/V*). Determine the optimum culture conditions strains: temperature 30 °C, pH 7.0, substrate concentration of 20 g/L. Under these conditions, the strain of sodium thiosulfate removal up to 98%. **[Conclusion]** Based on the high haloduric ability and the high ability of removal rate of the sodium thiosulfate, the CYJN-1 strain is of potential in the fields of biological desulfurization and biological metallurgy.

**Keywords:** *Halothiobacillus neapolitanus*, Salt-tolerant features, Physiological and molecular identification, Biodesulfurization

随着经济的快速发展和人口的迅速增长,人类生存环境面临着巨大的挑战,其中水资源紧缺正在逐渐成为制约我国可持续发展战略的主要因素之一。目前在工业化进程中,未经处理而排放的高盐废水对人们生活用水、工农业生产用水及江河湖泊等水体造成极大的污染,如能淡化高盐废水、提高废水利用率可有效缓解当今的用水压力<sup>[1]</sup>。因此,高盐废水处理已成为目前的研究热点之一。

耐盐菌是生长在高盐环境中的微生物类群,根据它们对盐度需求和盐度耐受性的不同,可以将其分为轻度嗜盐菌、中度嗜盐菌和极端嗜盐菌<sup>[2]</sup>。中度嗜盐菌的最适生长盐浓度为 3%–5%,由于它有极强的环境适应能力,在自然界中分布又极为广泛<sup>[3–5]</sup>,因此近些年研究者对于中度嗜盐菌在生物技术方面的潜在应用充满了浓厚的兴趣。国外研究者通过筛选驯化耐盐菌和嗜盐菌来降解苯酚、去除硝态氮、含硫化合物等,如 Woolard 等<sup>[6]</sup>将一株从美国大盐湖中分离的中度嗜盐菌用于处理苯酚废水。国内也开展了这方面的研究,曲玲童<sup>[7]</sup>从锦州腌渍小黄瓜中筛选到嗜盐微生物,并对该菌的发酵特性进行研究,在含 7% NaCl 的 MRS 培养基中 32 °C 发酵培养 20 h 后,其产酸能力提高 16.78%。李耀东等<sup>[8]</sup>从青海湖中利用高效液相色谱技术获得 5 株具有四氢嘧啶高产潜力的野生菌株,其中中度嗜盐菌 QHL5 产四氢嘧啶最高产量达到 0.325 µg/L,为相溶性物质的开发利用提供了依据。嗜盐菌在生物脱硫领域也有着举足轻重的作用,李琳等<sup>[9]</sup>从胜利油田筛选分离出 6 株具有二苯并噻吩降解能力的中度嗜盐菌,其中 SL-4 菌株在 5% 的盐度条件下对二

丙苯噻吩的降解率可达 37.2%。崔小华等<sup>[10]</sup>从青岛东风盐场分离到一株嗜盐紫色硫细菌用于脱硫研究, Vallero 等<sup>[11]</sup>国外学者通过耐盐硫酸盐还原菌处理高盐含硫废水取得显著效果。因此利用嗜盐菌与新型生物工艺相结合处理高盐废水是国内外高盐废水处理领域的一个重要研究方向。

目前,国内外对嗜盐菌的研究主要集中在筛选分类、鉴定、耐盐机制、高盐有机废水处理等方面<sup>[12–13]</sup>,将耐盐菌应用于生物脱硫体系的报道较少。鉴于此,本研究从上海外高桥某发电厂冷却水池中分离到一株脱硫率高、耐盐特性较强的微生物,用于生物脱硫实验,为生物脱硫探求新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

从上海外高桥某发电厂冷却水池污泥取样,用于菌种分离。该水池水源来自长江与东海交融处,呈弱酸性、含盐量在 1.5% 左右。

### 1.2 培养基

富集培养基(g/L)<sup>[14]</sup>: Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 10.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.8, NH<sub>4</sub>Cl 0.4, NaCl 1.0, 微量元素溶液 10.0 mL。

固体培养基:在富集培养基上加入 1.8%–2.0% 的琼脂。

微量元素溶液成分(g/L): EDTA 二钠 50.0, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22.0, CaCl<sub>2</sub> 5.5, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 5.1, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.1, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 1.6, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.6。

### 1.3 耐盐硫氧化菌的分离与纯化

**1.3.1 稀释污泥富集培养:**取适量的污泥,倒入无

菌水中,振荡使土样充分打散。然后将其接入富集培养基中,接种量约 10%,在 30 °C 下振荡培养 4 d,以上述菌液为接种液富集 2-3 次。

**1.3.2 平板划线分离:**从待纯化分离的菌落中取少量菌样于培养皿中,用接种环在相应培养基平板中划线分离。在 30 °C 恒温培养 2-3 d,用于观察菌落特征,并转接入斜面保存,进行进一步的筛选实验。

**1.3.3 菌株筛选培养:**将分离获得的各菌株用接种环从斜面上挑取一环,接入装有相应培养基(100 mL)的三角瓶(250 mL)中,置于回转式恒温摇瓶柜,于 30 °C、170 r/min 条件下培养。接种后第 2 天溶液出现浑浊、呈乳白色、溶液 pH 下降。经过 3 次划线分离后,挑取单菌落接种于斜面培养基上,在 4 °C 保存。

**1.3.4 耐盐菌株的分离:**把分离获得的细菌接种到氯化钠浓度分别为 1%、3%、5%和 7%的硫代硫酸钠培养基中,置于 30 °C、170 r/min 条件下培养。筛选分离出一株中度耐高效硫氧化菌,以备后用。

#### 1.4 菌株生理学鉴定

**1.4.1 菌落形态观察:**观察菌株生成菌落的形态特点。观察内容主要有大小、形状、表面、质地和颜色等方面。其中,菌落的大小可量取其直径;形状指圆形或不规则形等;表面指凸起或平展、有无光泽以及是否光滑等;质地指粘、脆而言,可用接种针挑取菌落,试验是否容易挑取。

**1.4.2 菌株形状观察:**将菌株进行革兰氏染色后在光学显微镜下观察。观察内容主要区别革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、观察细菌的形状、菌体排列方式等<sup>[15-16]</sup>。

**1.4.3 菌体特征观察:**用日立 H-7650 透射电镜做菌体特征观察。步骤如下<sup>[17]</sup>: (1) 用 2.5% (体积比)的戊二醛固定收集的细胞样 0.5 h,与 1.25% (质量体积比)水质琼脂混合;(2) 将固定的琼脂制成 1 mm 的切片,继续固定 0.5 h;(3) 把切片用磷酸缓冲液洗涤 3 次后固定于 1% (质量体积比)四氧化锇的磷酸缓冲液中 1 h;(4) 用超纯水漂洗切片,在 1% (质

量体积比)铀酰乙酸溶液中固定 1 h;(5) 用乙醇和氧化丙烯进行梯度脱水,将琼脂切片植入环氧树脂;(6) 铀酰乙酸染色后用于电镜观察。

#### 1.5 菌株分子生物学鉴定

**1.5.1 基因组 DNA 的提取:**采用从生工生物工程(上海)有限公司购买的小量细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取该菌株的基因组 DNA。

**1.5.2 PCR 扩增:**细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。前端引物和后端引物分别为 27F (5'-AGAGTTTGTACCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')。50.0 μL 扩增体系: 10×Taq buffer 5.0 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1.0 μL, 基因组 DNA 2.0 μL, 10.0 μmol/L 前端引物和后端引物各 1.0 μL, rTaq 酶 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 39.5 μL。反应条件: 94 °C 10 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。

**1.5.3 16S rRNA 序列分析及系统发育树的构建:**PCR 产物进行 B 型小 DNA 片段凝胶电泳。测序工作由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。将菌株 CYJN-1 的 16S rRNA 序列采用 NCBI 的 BLAST 软件进行同源性比对,用 ClustalX 1.81 和 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。

#### 1.6 CYJN-1 的生长特性研究

**1.6.1 不同能源物质对 CYJN-1 生长的影响:**为了确定 CYJN-1 菌株的最适能源物质,培养基中的硫代硫酸钠被下面的物质代替(g/L): 蛋白胨 1.0, 葡萄糖 1.0, 酵母提取物 1.0, 乳糖 1.0, 甘氨酸 1.0, 赖氨酸 1.0, 单质硫 10.0, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 10.0, DBT (二丙苯噻吩,有机硫模式化合物) 0.01mmol/L。接种量 5%, 30 °C、170 r/min 培养 2 d,测定细胞浓度,将细胞浓度换算成菌落形成单位(Colony forming unit, CFU)。

**1.6.2 不同温度和初始 pH 对 CYJN-1 生长的影响:**适宜的温度和 pH 环境同样是硫细菌生长所必需的条件。微生物胞内酶和胞外酶的稳定性均受温度和 pH 值影响,过高过低直接影响菌种的生存及活力。为了确定细胞生长的最适温度和 pH, CYJN-1 菌株

在不同温度(10、20、30、40、50 °C)和不同初始 pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)的培养基中 170 r/min 培养 2 d, 测定细胞浓度。

**1.6.3 不同底物浓度对 CYJN-1 生长的影响:** 向培养基中添加不同浓度的硫代硫酸钠, 分别为 5、10 和 20 g/L, 调节起始 pH 为 7.0。取 100 mL 培养基置于 250 mL 锥形瓶中, 接种 5% 的菌液, 在 30 °C、170 r/min 条件下培养, 每隔一段时间测定细胞浓度。

### 1.7 CYJN-1 脱硫性能的测定

本研究采用  $\text{Na}_2\text{S}$  在空气中的主要氧化产物  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  作为  $\text{S}^{2-}$  的来源。摇瓶实验中, 5% 的接种量接种在 100 mL 含硫培养液中, 最适培养条件下每 12 h 测定细胞浓度、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  浓度和  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度。

### 1.8 CYJN-1 耐盐特性的研究

在基础培养基中加入一定比例的  $\text{NaCl}$ , 形成不同的盐浓度梯度, 梯度范围分别为 0、1%、3%、5% 和 7%, 在最适生长条件下测定脱硫菌的生长情况和硫酸盐脱除率。

### 1.9 检测方法

**1.9.1 硫代硫酸钠的浓度的测定:** 底物硫代硫酸钠的浓度采用碘量滴定法测定<sup>[18]</sup>。步骤如下: (1) 配制稀释溶液: 取 1 mL 的培养液用水稀释至 50 mL (稀释 50 倍)。(2) 在碘量瓶中放入一份 50 mL 的溶液, 加 2 mL 17.5 mol/L 醋酸和 1 mL 1% 的淀粉溶液。(3) 用 0.01 mol/L 浓度的碘液滴定至出现不消失的蓝色为止, 滴定所消耗的碘量来计算  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  的含量。

计算公式:  $Y=(V-V_0)\times C\times M\times X\times 1\,000/50$ , 其中:  $Y$ : 所含  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  的量, 单位为 mg/L;  $C$ : 滴定的碘液浓度, 为 0.01 mol/L;  $M$ :  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  的分子量为 112; 50 是所加溶液的体积, 为 50 mL;  $X$  是稀释倍数;  $V-V_0$  为滴定是所消耗的碘液体积。

**1.9.2 硫酸根浓度的测定:** 所产生的硫酸根用铬酸钡比色法测定<sup>[19]</sup>。步骤如下: (1) 比色管中加入 0.5 mL 样品, 并加 4.5 mL 的蒸馏水(测定标准曲线: 5.0 mL 水样, 分别取 7 支比色管, 分别加入 0、0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mL  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 并加水

至 5.0 mL)。(2) 铬酸钡充分摇匀加 2.5 mL, 混合后静置 3 min。(3) 加 0.5 mL 6 mol/L 的钙氨溶液, 再加 5 mL 1 mol/L 的乙醇振荡 1 min。(4) 慢性定量滤纸过滤, 弃去最初 5 mL, 水做参比在 420 nm 处测定吸光度。(5) 用所测的  $OD_{420}$  值来从标准曲线上求出  $\text{SO}_4^{2-}$  的含量。

**1.9.3 单质硫的检测:** 单质硫的检测采用硫平衡法, 公式为:  $C_S^0=64.13/112.13\Delta C_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}}-32.13/96.13\Delta C_{\text{SO}_4^{2-}}$ , 其中,  $\Delta C_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}}$ : 硫代硫酸盐浓度的减少量;  $\Delta C_{\text{SO}_4^{2-}}$ : 硫酸盐浓度的增加量。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐盐高效硫氧化菌的筛选

硫代硫酸钠为筛选硫氧化细菌的唯一能源物质。富集培养 2 d 后培养液从透明变混浊, 瓶底生成浅黄色絮状物, 通过化学验证其为单质硫。本研究从上海某发电厂冷却水污泥中筛选得到 4 株耐盐特性较强的硫氧化菌, 分别命名为 CYJN-1、CYJN-2、CYJN-3 和 CYJN-4。在  $\text{NaCl}$  浓度分别为 0、1%、3%、5% 和 7% 的基础培养基中培养 24 h, 并测定硫代硫酸钠去除率, 如图 1 所示。可以看出这 4 株菌在不同盐度下都有一定的耐受性, 菌株 CYJN-1 在 0–3% 的盐度下 24 h 内的硫酸盐脱除率在 90% 以上, 在 5%–7% 的盐度下硫酸盐脱除率却不足 20%。总体来看, 菌株 CYJN-1 在不同盐度下的硫代硫酸盐脱除效率和生长状况较比其他 3 株强。因此, 选用硫代硫酸钠去除率最高、耐盐特性较强的 CYJN-1 菌株进行脱硫潜力的研究。

### 2.2 CYJN-1 菌株生理学鉴定与分析

如图 2 和表 1 所示, 光学显微镜中的硫氧化菌 CYJN-1 细胞呈短杆状且运动活跃, 革兰氏染色鉴定为阴性。菌落呈乳白色、反面颜色一致、菌落直径约为 1.0 mm、小而突起、易挑起。采用透射电镜观察发现 CYJN-1 细胞平均长度为  $1.55\pm 0.15\ \mu\text{m}$ 、宽度为  $0.65\pm 0.10\ \mu\text{m}$ 。细胞有一层薄薄的荚膜, 外围有长丝状的鞭毛。鞭毛可助于微生物在贫瘠的生

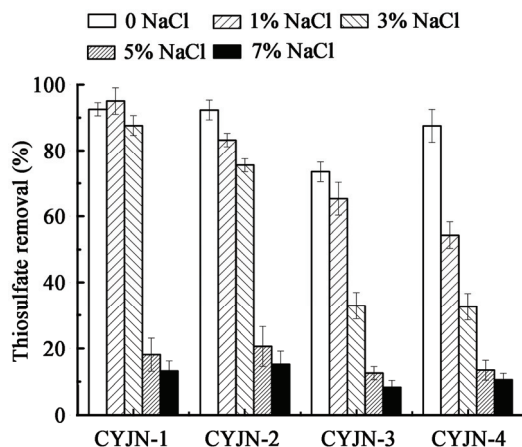


图 1 不同盐度下 CYJN 菌的硫代硫酸盐脱除率比较  
Figure 1 The effects of different salt concentrations on the removal rate of the sodium thiosulfate of the CYJN strain

活环境下寻找营养物质, 荚膜有助于菌种吸附硫颗粒物表面获取有限的能源物质和抵御恶劣条件的胁迫。另有报道称, 一种新型膜蛋白能够有效地促进细菌与能源物质之间的接触, 从而使细胞更好地获得营养物质, 更利于存活于这类极端环境<sup>[20-21]</sup>。预计这些独特的生理构造使菌体更好的适应自然环境下的脱硫体系。

### 2.3 CYJN-1 分子生物学鉴定与分析

Kelly 和 Wood<sup>[22]</sup>在 2000 年将硫杆菌中的一些种重新分类到新指定的属, 其中嗜盐硫杆菌属 (*Halothiobacillus*) 中包括 3 个种, 其分别为那不勒斯菌 (*Thiobacillus neapolitanus*)、盐土植物 (*Thiobacillus halophilus*) 和 *Thiobacillus hydrothermalis*。我们对菌

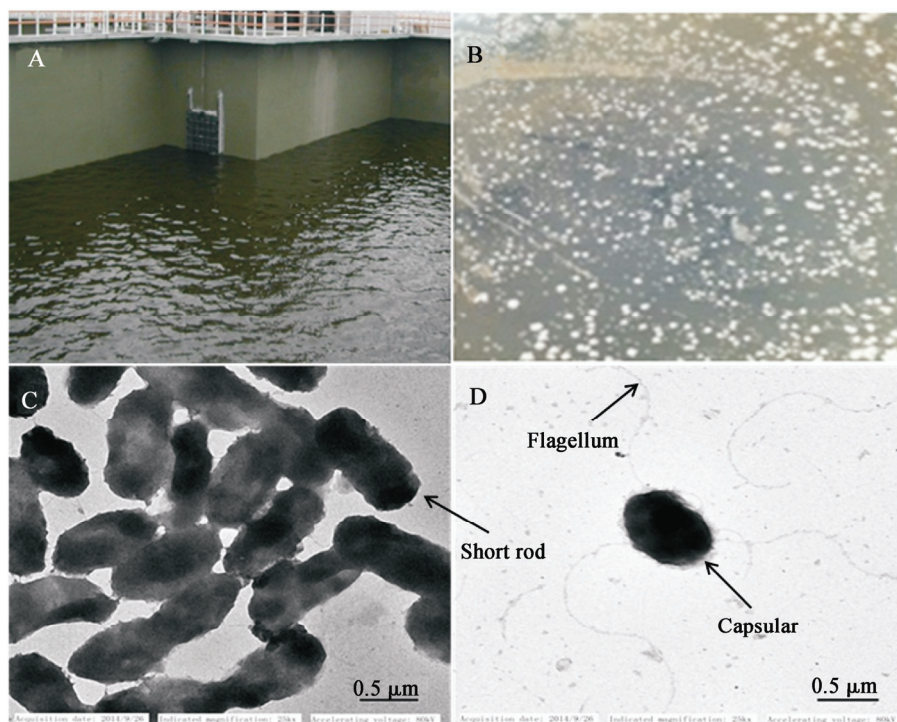


图 2 采样地及菌种 CYJN-1 形态特征图

Figure 2 Collection site and morphological characterization of strain CYJN-1

注: A: 采样点-上海外高桥某发电厂冷却水池; B: CYJN-1 菌落图; C: 细胞群落 TEM 图(Bar, 1 μm; 25.5 k×); D: 单细胞 TEM 图(Bar, 1 μm; 25.5 k×).

Note: A: Sampling points-the cooling water pool of Shanghai Waigaoqiao power station; B: Colony of isolate CYJN-1; C: TEM micrograph (bar, 1 μm; 25.5 k×) of clustered CYJN-1 cells; D: TEM micrograph (bar, 1 μm; 25.5 k×) of a single CYJN-1 cell.



表 1 CYJN-1 生理学特征

Table 1 The physiological characteristics of the CYJN-1 strain

特征 Characteristics	结果 Results
菌落形态 Colony morphology	呈圆形
菌落特征 Colony characteristics	乳白色
革兰氏染色 Gram staining	阴性
菌体形状 Cell shape	短杆状
细胞大小 Cell size	1.55±0.15 μm, 0.65±0.10 μm
鞭毛 Flagellum	+
荚膜 Capsular	+

注：+：阳性。

Note: +: Positive.

株 CYJN-1 的 16S rRNA 基因(1 452 bp)进行了测序, 将 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中与其他 16 株相关菌株进行比对, 根据它们的 16S rRNA 基因序列建立系统发育树, 如图 3 所示。结果显示: 系统发育树分成 3 组, CYJN-1 菌株与盐硫杆菌属中的菌株位于同一组。CYJN-1 与 *H. neapolitanus* (AB308268, 99%)、*H. neapolitanus* (JF416645, 98%)

和 *H. neapolitanus* (NR025943, 98%) 都有较高的序列相似性。排硫杆菌属和嗜酸硫杆菌属包括在第 1 组和第 3 组中, 他们与 CYJN-1 菌的遗传相似性只有 91%。因此, 结合《伯杰氏细菌鉴定手册》中菌落、细胞形态和生理生化特性可以鉴定 CYJN-1 菌株为那不勒斯菌(*H. neapolitanus*)。

## 2.4 *H. neapolitanus* CYJN-1 生长特性的研究

**2.4.1 不同物质对 CYJN-1 生长的影响:** 在硫代硫酸钠培养基内, CO<sub>2</sub> 和 S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> 分别是 CYJN-1 菌株生长的唯一碳源和能源物质, 该菌株可以利用培养基中硫代硫酸盐中还原态硫氧化产生的能量化能生长。但菌株不能在任何单一的有机物培养基中异养生长, 在硫代硫酸钠培养基中添加不同能源物质也不能促进菌株的生长, 表明菌株 CYJN-1 是严格化能自养硫氧化微生物, 如表 2 所示。

**2.4.2 温度和初始 pH 对 CYJN-1 生长的影响:** 适宜的温度环境是细菌生长所保证酶活性的重要条件之一, 不同的温度对硫细菌的生长有明显的影响。从图 4 可以看出, 30 °C 和 40 °C 的生长状况明显优于其他温度, CFU 为 1.4×10<sup>6</sup> cells/mL, 比较得

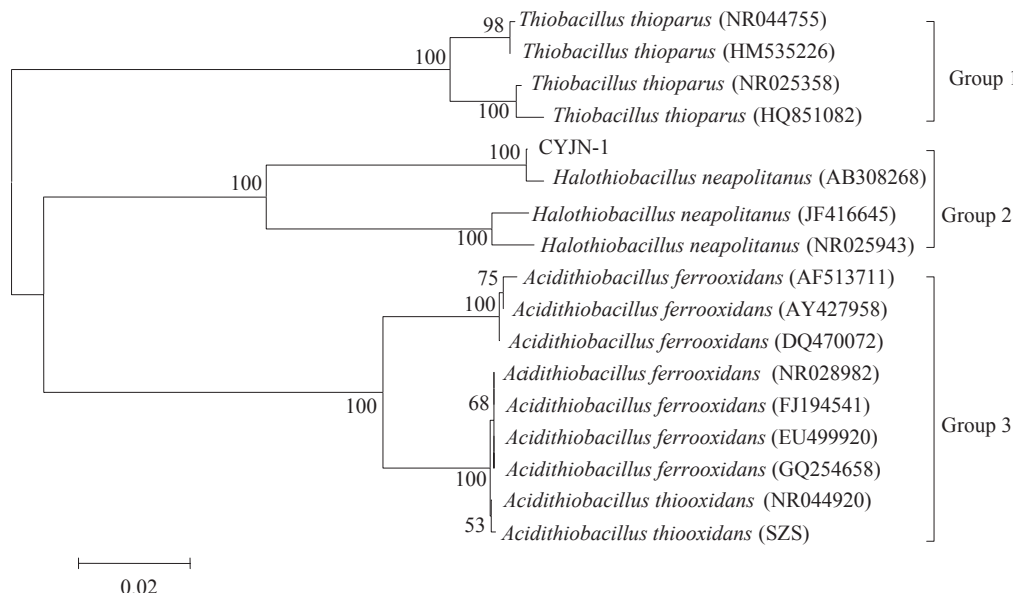


图 3 根据 CYJN-1 菌株 16S rRNA 基因序列为基础构建的系统发育树

Figure 3 The constructed phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence analysis of the the CYJN-1 strain

表 2 不同物质对 CYJN-1 生长的影响  
Table 2 The effects of different substances on the growth of the CYJN-1 strain

能源物质 Energy substances	结果 Results
蛋白胨 Peptone	—
葡萄糖 Glucose	—
酵母提取物 Yeast extract	—
乳糖 Lactose	—
甘氨酸 Glycine	—
赖氨酸 Lysine	—
硫化钠 Sodium sulfide	—
单质硫 Elemental sulfur	—
硫代硫酸钠 Sodium thiosulfate	—
二丙苯噻吩 DBT	—

注: +: 可利用; -: 不可利用。

Note: +: Available; -: Unavailable.

知 30 °C 为菌株最适生长温度。同样, 不同的初始 pH 对菌体生长也有较大的影响, 如图 5 所示。总体来看, 起始 pH 4.0–9.0 菌体均有生长, 说明硫细菌对 pH 的耐受幅度较宽。菌体生长的最适初始 pH 为 7.0, 此时硫细菌 CFU 达到  $1.4 \times 10^6$  cells/mL 左右, pH 在 6.0–8.0 时菌体仍有较好的生长, 说明该菌生长的最适 pH 环境在中性左右, 偏酸或偏碱对菌株生长都有抑制。

**2.4.3 底物浓度对 CYJN-1 生长的影响:** 不同的底物浓度对 CYJN-1 的生长有较大的影响, 从图 6 中可以看出底物浓度为 20 g/L 时 CFU 为最高, 达到  $1.55 \times 10^6$  cells/mL, 5 g/L 时为最低, 这是因为可供菌体利用的硫源限制了菌体的生长。对于底物充足的条件, 存在着相对于微生物需求的潜在的过剩能源。对微生物来说, 底物的消耗不能调整到恰好符合能量的需求, 因此有时底物不能完全被利用, 造成能量在生物体外流逝。当底物浓度充足时分解代谢和合成代谢的耦合效率降低, 所以微生物需要更多的底物来满足自身所需的物质和能量, 因此底物过多或过少都影响微生物的正常代谢<sup>[23]</sup>。

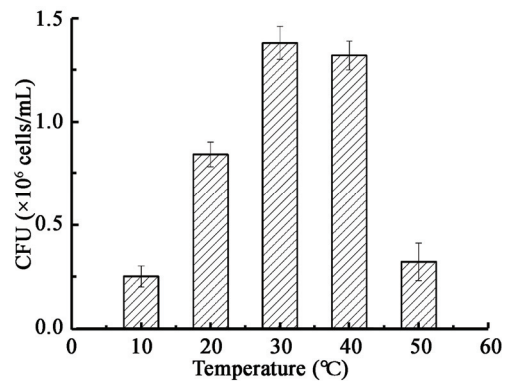


图 4 温度对 CYJN-1 生长的影响

Figure 4 The effects of different temperatures on the growth of the CYJN-1 strain

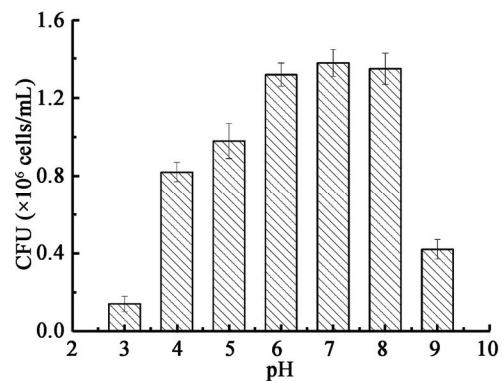


图 5 初始 pH 对 CYJN-1 生长的影响

Figure 5 The effects of different initial pH values on the growth of the CYJN-1 strain

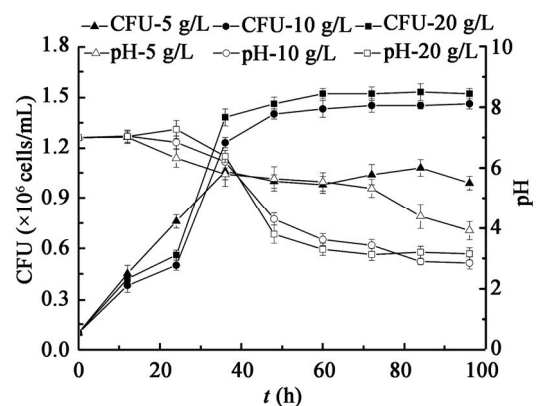


图 6 不同底物浓度对 CYJN-1 生长的影响

Figure 6 The effects of different substrate concentrations on the growth of the CYJN-1 strain

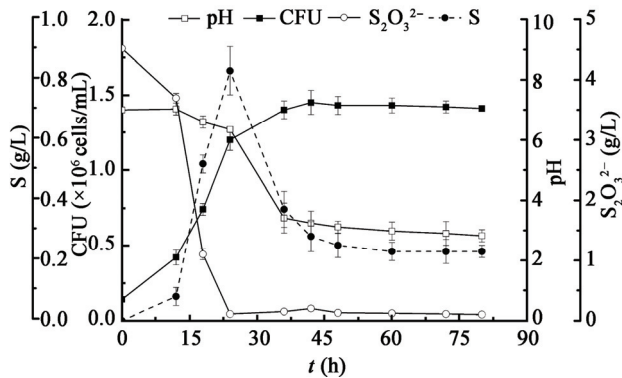


图7 CYJN-1 初步脱硫实验

Figure 7 The preliminary desulfurization experiments of the CYJN-1 strain

## 2.5 *H. neapolitanus* CYJN-1 脱硫特性的研究

**2.5.1 CYJN-1 菌株初步脱硫实验：**以硫代硫酸钠为唯一能源底物的培养基里对 CYJN-1 进行初步的脱硫实验，其生长曲线和化学指标如图 7 所示。可以看出，开始培养 12 h 内细胞处于适应环境的延滞期，菌株的生长缓慢，生长曲线呈平线状。在随后的 12 h 内，细胞进入指数增长期，生长旺盛，生长速度极快，细胞数量呈倍数增长，生长曲线陡然上升。此时，单质硫呈现迅速增长的趋势，最高可达 0.83 g/L，硫代硫酸钠转化率在 94% 左右，这一结果高于排硫硫杆菌 (*Thiobacillus thioparus*) 的 90%<sup>[24]</sup>。这是由于细胞在延滞期后快速进入指数增长期，硫代硫酸盐被 CYJN-1 用作电子供体以获得

能量，大部分的硫代硫酸盐中的还原态硫被氧化生成单质硫。因此，研究这一时期的环境和细菌的特点有助于提高脱硫效率和单质硫产量。培养 40 h 之后因培养基营养物质有限，而细胞数量过多，相互竞争，所以死亡的细胞数和新生的细胞数持平，进入平稳期。在培养过程中，硫代硫酸盐浓度的下降伴随着硫酸盐浓度的上升，这表明菌株 CYJN-1 以单质硫为中间代谢产物将硫代硫酸盐内-2 价的硫氧化成硫酸盐，这与文献报道的硫化物生物氧化的相关途径相吻合<sup>[25]</sup>，且与 Gao 等<sup>[26]</sup>报道的硫氧化菌相比其氧化性能强、脱硫率高、自然条件的耐受性等方面也具有一定的优势。

**2.5.2 CYJN-1 脱硫生成单质硫的观察：**在硫代硫酸钠培养基中 CYJN-1 培养一定时间在培养基底部可观察到单质硫的积累。将产生的硫通过干燥收集后得到固体为淡单色、有较强的硫磺味、易结块、比商品硫磺更容易磨成粉末。回收硫中含有一定的较比商品硫磺强。通过扫描电镜观察，发现颗粒大小在 5–10 μm 之间、大小不一、形状不规则。硫氧化菌可吸附于硫颗粒表面，不断进行氧化使得颗粒表面形成了一些细小的沟壑与微坑<sup>[27-28]</sup>，如图 8 所示。

## 2.6 *H. neapolitanus* CYJN-1 耐盐特性的研究

因高盐度环境下的盐析作用降低了微生物的脱氢酶活性，水的渗透压随着盐浓度的升高而增加，从而引起微生物细胞脱水进而导致细胞原生质

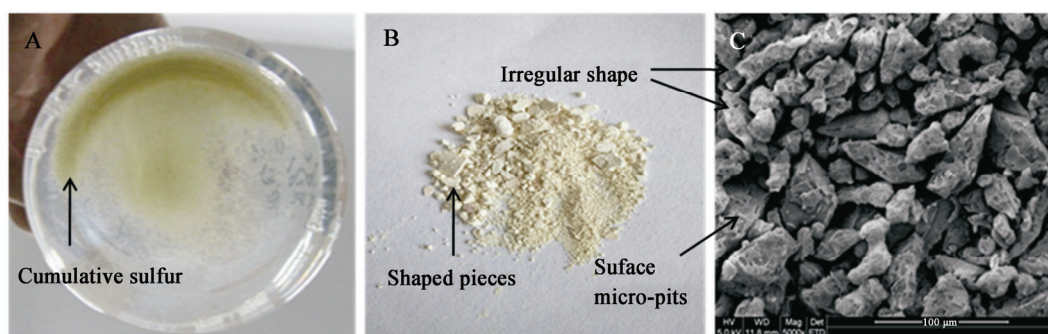


图8 回收单质硫形态观察

Figure 8 Morphological observation of the sulfur recovery

注：A：培养基底部单质硫；B：回收的固体单质硫；C：单质硫 SEM 图(Bar, 10 μm; 5 000×).

Note: A: Sulfur at the bottom of the medium; B: Recyclable solid sulfur; C: SEM micrograph (bar, 10 μm; 5 000×) of sulfur.



分离, 最终导致微生物细胞破裂死亡<sup>[29]</sup>。国内外学者通过对杆菌的研究发现, 当环境中的 NaCl 含量大于 1% 时, 微生物呼吸速率降低, 当 NaCl 含量大于 2% 时, 滴滤池 BOD 去除率降低<sup>[30]</sup>, 而当盐度上升到 3% 时, 则抑制了系统中大部分微生物的新陈代谢作用<sup>[31]</sup>, 且好养和厌氧生化系统的活性微生物数量均呈现下降趋势<sup>[32]</sup>。作为生物脱硫的开放体系, 脱硫菌的耐盐特性也将成为一个重要指标影响着脱硫特性和应用范围。此外, 一些学者发现相比含盐量高低而言, 盐含量的急剧变化对微生物的影响更大<sup>[33]</sup>。

从图 9 和图 10 可以看出, 盐度从 1% 增加到 5% 对脱硫菌生长影响较小, 但盐度增加到 7% 时细胞

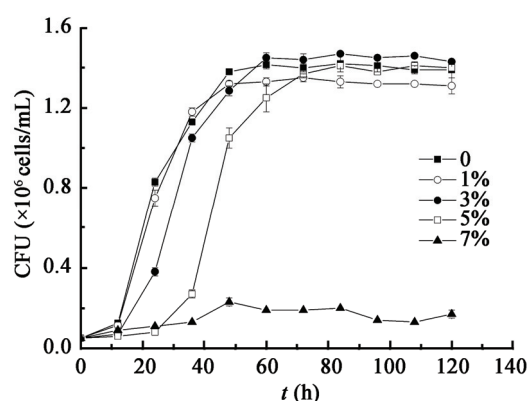


图 9 不同盐度对 CYJN-1 生长的影响

Figure 9 The effects of different salt concentrations the growth of the CYJN-1 strain

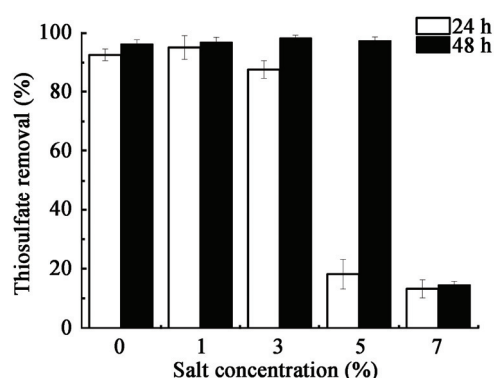


图 10 不同盐度对 CYJN-1 硫代硫酸盐去除率的影响

Figure 10 The effects of different salt concentrations removal rate of the sodium thiosulfate of the CYJN-1 strain

很难维持正常的生长, 机体生长受到抑制。同时我们可以看出, 盐度在 0–1% 时细胞经过短暂的延滞期后很快进入对数期, 24 h 时硫代硫酸钠脱除率达到 94% 以上。盐度增加到 3% 时延滞期变长, 要经过一定的调整之后才能进入对数生长期, 24 h 内的脱除率为 87%, 48 h 时脱除率达 98% 左右。当盐度在 5% 时延滞期将近 30 h, 24 h 内的脱除率降至 20% 左右, 但 48 h 时脱除率迅速达到 98%。如果盐度继续增加菌株将无法进入生长期, 生长速率降低, 细胞停止生长直至死亡。

综上所述, *H. neapolitanus* CYJN-1 在一定的盐度范围内既能正常生长, 又能高效去除硫代硫酸盐, 且与李琳等<sup>[9]</sup>报道的耐盐脱硫菌相比该菌适应性强、脱硫率高、盐度变化能力等方面都有较明显的优势。但随着盐度的继续增加, 菌株生长的停滞期变长、对数增长期的时间延长, 稳定期缩短。停滞期变长是因为接种到和以前盐度不同的培养基上后, 微生物不能立即生长繁殖, 要经过一定时间的调整和适应, 以合成多种酶, 并完善体内的酶系统和细胞的其他成分。对数期的时间延长可能是因为高盐环境下, 一方面微生物要抵御外在的不良环境, 另一方面需要能量合成自身生长所需的物质, 这样的能量分配导致用于生长繁殖的能量相对减少, 从而造成自身生长速率变小, 世代时间变长; 同时可能由于延滞期过长消耗了太多的营养成分而不足以满足菌株的生长。

### 3 结论

本研究从上海外高桥某发电厂冷却水污泥中筛选分离出一株耐盐高效硫化菌 *H. neapolitanus* CYJN-1, 确定最适生长条件, 并对该菌脱硫潜力和耐盐特性进行初步研究。结果表明:

(1) *H. neapolitanus* CYJN-1 为专性好氧、化能自养型革兰氏阴性菌、运动活跃、短杆状、平均长度为  $1.55 \pm 0.15 \mu\text{m}$ 、宽度为  $0.65 \pm 0.10 \mu\text{m}$ 、有鞭毛和较厚荚膜, 并以 16S rRNA 基因序列构建系统发育树表明, 该菌为嗜盐硫杆菌属 (*Halothiobacillus*)

中的那不勒斯菌(*neapolitanus*)。

(2) *H. neapolitanus* CYJN-1 通过氧化还原态的硫获得能量,不能利用任何有机物,是一种严格化能自养型微生物。通过单因素实验发现,该菌在较宽泛的温度和 pH 范围内都能生长,氧化能力强,具有良好的适应自然环境脱硫体系的特性。其最适生长条件为:起始 pH 为 7.0,温度 30 °C,底物浓度为 20 g/L。

(3) *H. neapolitanus* CYJN-1 初步脱硫实验发现,在最适生长条件下,24 h 时硫代硫酸盐去除率可达 94%。部分还原态硫氧化生成单质硫,最高生成量为 0.83 g/L。产生的单质硫有硫磺味、易结块、比商品硫磺更容易磨成粉末。通过扫描电镜观察,发现硫颗粒大小不一、形状不规则、颗粒表面有细小的沟壑与微坑。

(4) 耐盐性实验表明, *H. neapolitanus* CYJN-1 具有较强适应盐度变化能力。该菌株在 0~5% (NaCl, 质量体积比) 的盐度范围内能够正常生长,但随着盐度的增加,延滞期也有不同程度的延长。其最适生长盐度在 3% 左右,在此条件下 24 h 内的硫代硫酸钠脱除率为 87%,到 48 h 时脱除率可达到 98%。当盐度达到 5% 以上时延滞期变长,生长受到抑制。因此,该菌在一定盐度变化范围内有较强的脱硫能力,在食品工业、化妆品生产、环境污染的生物修复等领域具有广泛的应用价值。

(5) 该研究结果说明脱硫菌 *H. neapolitanus* CYJN-1 营养要求低、适应范围广、耐盐特性较强。适用于生物脱硫开放体系,且在含盐废水硫化物去除、生物浸矿、生物冶金等领域都具有潜在的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Cui YW, Peng CY, Peng YZ, et al. Effects of salt on microbial populations and treatment performance in purifying saline sewage using the MUCT process[J]. Clean Soil Air Water, 2009, 37(8): 649-656
- [2] Larson PI, Sydnes LK, Lanfald B, et al. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes betaines, glutamic acid and trehalose[J]. Archives of Microbiology, 1987, 147: 1-7
- [3] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(2): 504-544
- [4] Zeng J, Dou YT, Wang L, et al. Analysis of 16S rDNA sequences and DNA-DNA hybridization of moderately halophilic bacteria from Xinjiang region[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2002, 42(2): 133-137 (in Chinese)
- [5] Zhao H, Li AM, Wan B, et al. Isolation and physiology of amoderate halophilic sulfate-reducing bacterium[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 1995, 1(1): 61-67 (in Chinese)
- [6] Woolard MCR, Irvine RL. Treatment of hyper saline wastewater in the sequencing batch reactor[J]. Water Research, 1995, 29(4): 1159-1168
- [7] Qu LT. Isolation identification and characteristics of salt-resistant lactic acid bacteria in Jinzhou pickled cucumber[D]. Jinzhou: Master's Thesis of BoHai University, 2012 (in Chinese)
- [8] Li YD, Long QF, Li WJ, et al. Detection of intracellular compatible solute ectoine in halophilic bacteria from Qinghai Lake by high performance liquid chromatography[J]. Environmental Chemistry, 2013, 32(9): 1687-1691 (in Chinese)
- [9] Li L, Zhao CC, Liu QY, et al. Study on screening and degradation characteristics of moderately halophilic bacteria regarding PASHs[J]. Chemistry and Bioengineering, 2014, 31(2): 5416-5425 (in Chinese)
- [10] Cui XH, Lin ZH, Yang SP. Osmotolerant mechanism of a halophilic purple sulfur bacterium 283-1[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2012, 32(3): 228-231 (in Chinese)
- [11] Vallero MV, Lettinga G, Lens PN. Assessment of compatible solutes to overcome salinity stress in thermophilic (55 °C) methanol-fed sulfate reducing granular sludges[J]. Water Science and Technology, 2003, 48(6): 195-202
- [12] Zhang W, Hu YG, Zhang LQ, et al. Identification of moderately halophilic strain DTY1 and study of its halotolerant mechanism[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(6): 956-960 (in Chinese)
- [13] Hinteregger C, Streichsbier F. *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water[J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(11): 1099-1102
- [14] Soil microbial research will compile. Soil Microbial Experiment[M]. Beijing: Science Press, 1983 (in Chinese)
- [15] Jin SM, Yan WM. Separation thiooxidans plasmid[J]. Microbiology China, 1988(1): 202-213 (in Chinese)
- [16] 曾静, 窦岳坦, 王磊, 等. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌 16S rDNA 全序列及 DNA 同源性分析[J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 133-137
- [17] 赵海, 李安明, 万波, 等. 一株中度嗜盐硫酸盐还原菌的分离及生理特性研究[J]. 应用与环境生物学报, 1995, 1(1): 61-67
- [18] 曲玲童. 锦州腌渍小黄瓜中耐盐性乳酸菌的分离鉴定与性能研究[D]. 锦州: 渤海大学硕士学位论文, 2012
- [19] 李耀东, 龙启福, 李文军, 等. 高效液相色谱检测青海湖嗜盐菌胞内积聚的相溶物质四氢嘧啶[J]. 环境化学, 2013, 32(9): 1687-1691
- [20] 李琳, 赵朝成, 刘其友, 等. 降解含硫杂环芳烃中度嗜盐菌的筛选及降解特性研究[J]. 化学与生物工程, 2014, 31(2): 5416-5425
- [21] 崔小华, 林志华, 杨素萍. 嗜盐紫色硫细菌 283-1 的耐盐机制[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2012, 32(3): 228-231
- [22] 张薇, 胡跃高, 张力群, 等. 中度嗜盐菌 DTY1 的鉴定及其耐盐机制的初步分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 956-960
- [23] 土壤微生物研究会编. 土壤微生物实验法[M]. 北京: 科学出版社, 1983
- [24] 金松漠, 颜望明. 氧化硫杆菌质粒的分离[J]. 微生物学通

- 报, 1988(1): 202-213
- [16] Hoult. Bergey's Manual of Sysematic Bacteriology[M]. 8th Edition. Jinan: Shandong University Press, 1988: 212-241 (in Chinese)
- 霍尔特. 简明伯杰鉴定手册[M]. 第8版. 济南: 山东大学出版社, 1988: 212-241
- [17] Feng S, Yang H, Xin Y, et al. Isolation of an extremely acidophilic and highly efficient strain *Acidithiobacillus* sp. for chalcopryrite bioleaching[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(11): 1625-1635
- [18] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial Identification System Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [19] Institute of microbiology group of bacteria. General Bacterial Identification Methods Used[M]. Beijing: Science Press, 1978 (in Chinese)
- 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978
- [20] Amouric A, Brochier-Armanet C, Johnson DB, et al. Phylogenetic and genetic variation among Fe(II)-oxidizing *Acidithiobacilli* supports the view that these comprise multiple species with different ferrous iron oxidation pathways[J]. Microbiology, 2011, 157(1): 111-122
- [21] Sand W, Gehrke T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(1): 49-56
- [22] Kelly DP, Wood AP. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(2): 511-516
- [23] Liu Y. Energy uncoupling in microbial growth under substrate-sufficient conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49(5): 500-505
- [24] Xian HJ, Yang HF. Oxidation of sodium thiocyanate and sodium thiosulfate by *Thiobacillus thioeparus* T12[J]. Acta Science Circum Stantiae, 1984, 4(3): 258-264
- 鲜海军, 杨惠芳. 排硫硫杆菌 T12对硫氰酸钠和硫代硫酸钠的氧化[J]. 环境科学学报, 1984, 4(3): 258-264
- [25] Chung YC, Huang C, Tseng CP. Operation optimization of *Thiobacillus thioeparus* CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal[J]. Journal of Biotechnology, 1996, 52(1): 31-38
- [26] Yang HL, Gao K, Feng SS, et al. Isolation of sulfide remover strain *Thermithiobacillus tepidarius* JNU-2, and scale-up bioreaction for sulfur regeneration[J]. Annals of Microbiology, 2014, 65(1): 553-563
- [27] Zeng WM. The formation mechanism of passivation layer and its elimination way during bioleaching of chalcopryrite[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Zhongnan University, 2011 (in Chinese)
- 曾伟民. 黄铜矿生物浸出过程中钝化膜的形成机制及其消除方法探讨[D]. 长沙: 中南大学博士学位论文, 2011
- [28] Tributsch H. Direct versus indirect bioleaching[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59(2): 177-185
- [29] Li YC, Bao JG, Zhou X, et al. Review on biotreatment system affected by high salinity organic wastewater[J]. Environmental Science and Technology, 2006, 29(6): 109-111 (in Chinese)
- 李耀辰, 鲍建国, 周旋, 等. 高盐度有机废水对生物处理系统的影响研究进展[J]. 环境科学与技术, 2006, 29(6): 109-111
- [30] Ingram M. The influence of sodium chloride and temperature on the endogenous of *Bacillus cereus*[J]. Journal of General Physiology, 1940, 23(6): 773-780
- [31] Tellez GT, Nirmalakhandan N. Evaluation of biokinetic coefficients in degradation of oil field produced water under varying salt concentrations[J]. Water Research, 1995, 29(7): 1711-1718
- [32] Kapdan IK, Boylan B. Batch treatment of saline wastewater by *Halanaerobium lacusrosei* in an anaerobic packed bed reactor[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2009, 84(1): 34-38
- [33] Wen XH, Zhan XM, Wang JL, et al. Review of the biological treatment of salinity wastewater[J]. Environmental Science, 1999, 20(3): 104-106 (in Chinese)
- 文湘华, 占新民, 王建龙, 等. 含盐废水的生物处理研究进展[J]. 环境科学, 1999, 20(3): 104-106