

研究报告

一株耐高温硫氧化菌爱媛类芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件优化

陈莉¹, 赵艺¹, 周雨洁¹, 李伟光^{*1,2}

1 哈尔滨工业大学环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150090

2 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150090

陈莉, 赵艺, 周雨洁, 李伟光. 一株耐高温硫氧化菌爱媛类芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 25-38

Chen Li, Zhao Yi, Zhou Yujie, Li Weiguang. Isolation, identification and fermentation optimization of a thermophilic sulfide-oxidizing strain *Paenibacillus ehimensis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 25-38

摘要:【背景】市政污泥堆肥过程中大量释放的含硫臭气不仅会污染周围环境, 也会降低堆肥质量。生物脱硫除臭技术具有效率高、无二次污染等优点, 但目前研究较多的中常温硫氧化菌在堆肥高温环境中易失活, 而耐高温菌的研究较少, 其在高温条件下的脱硫性能有待进一步探究。【目的】筛选并鉴定耐高温硫氧化菌株, 研究并优化硫氧化的环境条件, 为该菌在堆肥脱硫除臭方面的应用提供理论基础。【方法】利用含硫化物的选择性培养基从污泥堆肥物料中筛选纯化耐高温菌株, 从表观形态观察、生理生化分析和 16S rRNA 基因序列分析的角度确定其种属地位, 结合单因素分析和正交试验优化影响菌株硫氧化作用和生长能力的环境条件, 并用 Logistic 模型拟合该菌的生长动力学曲线。【结果】筛选出一株耐高温硫氧化菌 LYH-1, 初步鉴定为爱媛类芽孢杆菌(*Paenibacillus ehimensis*), 该菌的 16S rRNA 基因序列 GenBank 登录号为 MW659161。优化后的最佳硫氧化条件为温度 50 °C、pH 7.5、接种量 5%, 此时硫酸盐的生成量可达到 86.89 mg/L、生成率为 36.20%。优化后的最佳生长条件为温度 50 °C、pH 8.0、接种量 5%, 此时的 OD_{420} 可达到 0.520; 同时在该生长条件下拟合菌株的生长动力学, 得到最大比生长速率 μ_m 为 $0.304\ 2\ h^{-1}$ 。【结论】爱媛类芽孢杆菌 LYH-1 具有较强的硫氧化能力和环境抗性, 这为生物脱硫研究领域提供了新的菌种资源, 也为污泥堆肥高温期的含硫臭气控制提供了一定的理论支持。

关键词: 耐高温; 爱媛类芽孢杆菌; 生长动力学; 硫氧化性能; 发酵优化

基金项目: 国家自然科学基金(51878216)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (51878216)

*Corresponding author: E-mail: hitlwg@126.com

Received: 2021-07-13; Accepted: 2021-08-14; Published online: 2021-09-23

Isolation, identification and fermentation optimization of a thermophilic sulfide-oxidizing strain *Paenibacillus ehimensis*

CHEN Li¹, ZHAO Yi¹, ZHOU Yujie¹, LI Weiguang^{*1,2}

1 School of Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, Heilongjiang, China

2 State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] The sulfur-containing odor emitted from municipal sludge composting could not only pollute the surrounding environment but also reduce the compost qualities. Biological desulfurization technology is highly efficient and without secondary pollutions. However, recent studies have been focused on the mesophilic strains, which are usually inactivated in thermophilic composting environments. Studies on the thermotolerant sulfide-oxidizing bacteria are scarce, and the desulfurization performance of the thermotolerant bacteria awaits further study. [Objective] To provide a theoretical basis for the biological application of composting desulfurization, a thermotolerant sulfide-oxidizing strain was isolated and identified, and the environmental conditions of the sulfide oxidation process were optimized. [Methods] The selective medium containing sulfide was used to screen and purify the thermophilic strain from sludge compost materials. The strain was identified by its morphological characteristics, physiological and biochemical analysis, and 16S rRNA gene sequence analysis. Single-factor and orthogonal experiments were used to optimize the fermentation conditions, and we also used the Logistic model to fit the growth kinetics curve of the strain. [Results] A thermophilic sulfide oxidizing strain LYH-1 was isolated and identified as *Paenibacillus ehimensis*; the GenBank accession number was MW659161. The optimized sulfide oxidation conditions were 50 °C of the temperature, pH 7.5, and 5% of the inoculation amount, the sulfate production amount reached 86.89 mg/L, and the production rate was 36.20%. The optimized growth conditions were 50 °C of the temperature, pH 8.0, and 5% of the inoculation amount, and the OD_{420} reached 0.520; under these conditions, the growth kinetics were fitted to obtain the maximum specific growth rate at $0.304\ 2\ h^{-1}$. [Conclusion] *Paenibacillus ehimensis* LYH-1 has strong sulfide oxidation and environmental resistance abilities. It provides new bacterial resources for biological desulfurization and theoretical support for sulfur-containing odor control during the high-temperature period of sludge composting.

Keywords: thermophilic characteristics; *Paenibacillus ehimensis*; growth kinetics; sulfide oxidation performance; fermentation optimization

污泥是市政污水处理厂在处理过程中产生的液体或固体、半固体残留物^[1]。污泥的产量巨大、来源广泛、组分复杂^[2], 不仅包含大量重金属、细菌病毒和寄生虫卵等有害物质, 同时还含有丰富的氮、磷和有机物等资源^[3-4], 具有巨大的资源化潜力。目前, 污泥处理技术主要包

括浓缩脱水、好氧发酵、热干化、厌氧消化等, 其中, 好氧堆肥技术因其有机质分解效率高、操作简单、基建运行费用低等优点^[5-6], 逐渐发展为国内外污泥处理的主流技术之一。然而在高温好氧堆肥过程中, 堆体内存在的局部缺氧或厌氧环境会导致含硫臭气的产生^[7], 硫化氢、

甲硫醇和二甲基二硫醚等含硫臭气的大量释放不仅会污染大气环境、危害人类健康,也会导致堆体内的硫素损失严重,影响堆肥质量^[8]。

与其他除臭技术相比,生物除臭技术的除臭效率高、无二次污染、使用更加方便、处理成本更低^[9-10],该技术的核心是控硫除臭微生物的筛选和应用^[11]。生物脱硫除臭的过程通常是在无色硫细菌或光合硫细菌等硫氧化细菌的作用下,将 S^{2-}/HS^- 等还原态硫在关键硫氧化酶的作用下氧化成高价态的 S^0 和 SO_4^{2-} 的过程^[12-13]。硫氧化细菌的种类繁多、分布广泛,在煤炭工艺脱硫^[14]、污废水处理^[15-16]方面有着较为广泛的应用。目前研究报道的硫氧化菌多为硫杆菌属 (*Halothiobacillus* sp.)^[17-18]、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)^[19-20]、产碱菌属 (*Alcaligenes* sp.)^[21] 等常温菌株的筛选和应用,但污泥堆肥过程中的臭气多在高温期释放,中常温硫氧化菌在高温条件下多处于失活状态^[22],这致使高温期含硫臭气的控制受到限制,而高温条件下的硫氧化作用需要耐高温菌株来实现,因此耐高温除臭菌株的筛选是十分必要的。然而,目前耐高温硫氧化菌株筛选培育的相关研究较少,耐高温菌株脱硫的发酵条件优化也鲜见报道,其在高温条件下的脱硫性能和硫氧化机制仍需进一步探索。

基于上述问题,本研究在污泥堆肥物料中筛选纯化出一株耐高温的硫氧化菌株,通过形态观察、生理生化分析及 16S rRNA 基因测序进行种属鉴定。研究了温度、pH 值、摇床转速、接种量和能源物质对菌株硫氧化性能的影响,基于单因素试验结果,利用正交试验优化菌株培养发酵的环境条件,并在高温条件下对菌株的生长动力学进行拟合,以期对污泥堆肥高温期含硫臭气的强化控制提供理论支持与依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源和培养基

实验所用菌株筛选自黑龙江省哈尔滨市某污泥堆肥处理厂的高温期堆肥物料中。

富集培养基(g/L): 磷酸二氢钾 2.0, 氯化铵 0.5, 碳酸钠 0.5, 氯化镁 0.2, 硫化钠($Na_2S \cdot 9H_2O$) 0.2。调 pH 7.0–7.2。

选择性培养基(g/L)^[23]: 葡萄糖 0.4, 磷酸二氢钾 1.2, 磷酸氢二钾 1.2, 氯化铵 0.4, 氯化镁 0.2, 柠檬酸铁 0.01, 硫化钠($Na_2S \cdot 9H_2O$) 0.08。调 pH 7.0。

分离纯化培养基: 在选择性培养基中加入 1.5–2.0 g/L 琼脂粉。

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 琼脂 10.0–20.0。调 pH 7.0–7.2。

以上培养基在使用前均在 1×10^5 Pa 的条件下灭菌 30 min。

1.2 主要试剂和仪器

氯化铵、硫化钠、葡萄糖等分析纯试剂, 国药化学试剂有限公司; 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒和 PCR 反应通用引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 仪, ABI 公司; 电泳仪, 北京六一生物技术有限公司; 恒温生化培养箱和恒温振荡器, 上海一恒科学仪器有限公司; 水质硫化物酸化吹气仪, 青岛溯源环保设备有限公司; 扫描电子显微镜, 卡尔蔡司公司; 紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 耐高温硫氧化菌株的筛选

1.3.1 菌株初筛

取 10 g 污泥堆肥物料样品放入 70 °C 的烘箱中烘 2–3 h, 称量 5 g 烘后的物料放于装有 95 mL 无菌水的摇瓶中, 于 50 °C、150 r/min 的高温摇床中振荡 2 h。在相同温度下, 取 3% 的

悬浊液于 200 mL 富集培养基中振荡,待培养液出现明显浑浊后,取 3%的悬浊液接入 200 mL 的新鲜富集培养基中。在 50 °C、150 r/min 的条件下富集培养 5 次后的菌液,将其用无菌水以 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的不同梯度进行稀释,分别取 200 μ L 不同浓度梯度的混菌液均匀涂布于分离纯化培养基上,做 3 组重复,放置于 45 °C 恒温培养箱中培养。待平板长出明显菌落后,挑取形态各异的单菌落进行多次划线,以保证获得纯菌株。

1.3.2 菌株复筛

将初筛获取的单菌接种于选择性培养基中,于 50 °C、150 r/min 的摇床中振荡 48 h 制成种子液。将种子液以 3%的接种量接入装有 200 mL 选择性培养基的摇瓶中,在 55 °C 的温度下连续培养,每 3 h 进行一次取样,测定不同菌株的生长量;同时每 12 h 进行一次取样,测量不同菌株对培养基中硫化物的去除能力及其硫酸盐的生成能力,做 3 组重复实验。在高温条件下,选取硫氧化性能较优的菌株进行后续实验。

1.4 菌株的形态观察及种属鉴定

1.4.1 表观形态观察

将筛选得到的菌株稀释涂布于 LB 固体培养基上,倒置于 45 °C 培养箱中培养一段时间,待平板上长出明显的菌落时,对菌落的形态特征进行记录。利用革兰氏染色和扫描电子显微镜^[24],对所筛菌株的微观形态和大小进行分析观察。

1.4.2 生理生化分析

菌株的生理生化特征分析实验如氧化酶、淀粉水解、明胶液化等,具体参照《常见细菌系统鉴定手册》^[25]进行。

1.4.3 分子生物学鉴定

菌株的分子生物学鉴定主要通过 16S rRNA 基因测序进行,利用细菌基因组 DNA 抽提试剂

盒提取硫氧化细菌的基因组 DNA 作为模板,以通用引物 27F (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')作为引物进行 PCR 反应。将 PCR 反应产物在 1.7% 琼脂糖凝胶中进行电泳,目的片段进行胶回收后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。在 NCBI 数据库中对测序结果进行序列比对,运用 MEGA 7.0 软件中的邻接法(neighbor-joining method)^[26]构建系统进化发育树。

1.5 外界条件对菌株生长及硫氧化性能的影响

通过选取温度、pH、转速、接种量和能源物质这 5 种不同的因素,测定外界条件对耐高温硫氧化菌株 LYH-1 的生长情况和硫氧化能力的影响。选取对数期(OD_{420} 达到 0.50)的种子液进行接种,依次设置不同初始温度(30、35、40、45、50、55、60、65 °C)、不同初始 pH 值(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)、不同摇床转速(80、100、130、150、170、200 r/min)、种子液的不同接种量(1%、3%、5%、7%、9%、11%)进行分析。在最优碳源种类分析时,依次用等量的乙酸钠、柠檬酸钠、乳糖、蔗糖、可溶性淀粉和碳酸钠代替培养基中的葡萄糖,其他成分与选择性培养基相同;选得最优碳源后,设置 0.1、0.2、0.5、1.0、1.2 和 1.5 g/L 的浓度梯度分析最优碳源投量。在最优氮源的分析实验中,依次用等量的硝酸钠、蛋白胨、磷酸二氢铵、酵母粉和牛肉膏代替培养基中的氯化铵,其他成分与选择性培养基相同;选得最优氮源后,设置 0.2、0.4、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 g/L 的浓度分析最优氮源投量。上述实验均在培养 50 h 后,分别测定菌株生长量(OD_{420})和硫酸根生成量变化,同时做不接菌的空白对照组,每个实验 3 组重复。

1.6 正交试验优化菌株的发酵条件

在外界条件对菌株影响的单因素试验的基

基础上,选取对硫氧化效能影响较为显著的温度、pH 和接种量作为关键环境因子。利用正交设计助手 V3.1 软件,设计包含 3 因素 3 水平(表 1)的 9 组正交试验,具体试验设计如表 2 所示,以硫酸盐生成量和菌株生长量为响应值,进一步分析得到菌株发酵的最佳条件。

1.7 菌株的生长动力学分析

依据优化后的生长发酵条件进行菌株培养,每隔 3 h 取一定量的发酵液,于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min,弃上清液后,将沉淀物于 105 °C 下烘干至恒重,称取得到菌体干重。连续测量 32 h 后,利用 Logistic 模型^[27]描述菌体干重随发酵时间变化的关系,从而量化得到耐高温硫氧化菌 LYH-1 的生长动力学模型。Logistic 模型的计算公式如式(1)所示:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) X \quad (1)$$

式中: X : 菌体浓度(干重), g/L; X_m : 最大菌体浓度(干重), g/L; μ_m : 最大比生长速率, L/h。

1.8 关键指标测定与分析方法

菌株的生长量利用 OD_{420} 作为衡量指标,采用紫外分光光度计直接进行测定;利用数据处理软件 GraphPad Prism 8.0.2 对单因素试验所得结果进行 t 检验分析。硫化物和硫酸盐的浓度测定方法具体参考《水和废水监测分析方法》(第 4 版)^[28],批次取样得到的菌液经过 0.22 μm 的水系滤膜过滤后进行离子浓度测定,其中硫化

表 2 9 组正交分析试验设计

Table 2 Orthogonal analysis design of nine experimental groups

Test No.	Temperature (°C)	pH	Inoculation amount (%)
1	45	7.0	3.0
2	45	7.5	4.0
3	45	8.0	5.0
4	50	7.0	4.0
5	50	7.5	5.0
6	50	8.0	3.0
7	55	7.0	5.0
8	55	7.5	3.0
9	55	8.0	4.0

物经过酸化吹气仪预处理后,采用亚甲基蓝分光光度法测定,硫酸盐的浓度测定采用改良的硫酸钡比浊法。硫酸盐生成率的计算公式如式(2)所示:

$$R = \frac{C_2 M_2}{(C_0 - C_1) M_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中: R : 硫酸盐生成率, %; C_0 : 初始硫化物浓度, mg/L; C_1 : 反应后硫化物浓度, mg/L; C_2 : 硫酸盐浓度, mg/L; M_1 : S^{2-} 的相对分子质量; M_2 : SO_4^{2-} 的相对分子质量。

2 结果与分析

2.1 耐高温硫氧化菌株的筛选

利用硫氧化选择性培养基进行初次筛选,共得到 4 株具有硫氧化能力的耐高温菌株,分别编号为 LYH-1、LYH-2、LYH-3 和 LYH-4。将 4 株耐高温菌在 55 °C 条件下进行生长量和硫氧化效能的测定,结果如图 1 所示。由图 1 可知,菌株 LYH-2 和 LYH-3 在 55 °C 下衰亡较为迅速,分别在 9 h 和 15 h 时进入衰亡期,其在高温条件下的生长能力较差;而菌株 LYH-1 和 LYH-4 在高温下生长较为稳定,分别在 12 h 和 9 h 时

表 1 正交试验的关键因素及水平设计

Table 1 The key factors and levels of orthogonal experiment

因素 Factors	水平 Levels		
	1	2	3
A Temperature (°C)	45	50	55
B pH	7.0	7.5	8.0
C Inoculation amount (%)	3.0	4.0	5.0

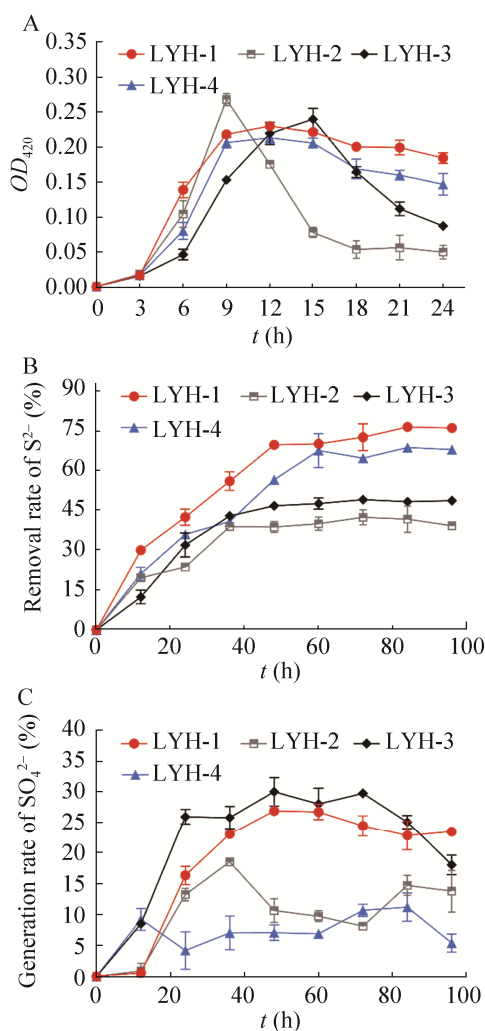


图1 55 °C 条件下耐高温菌株的生长量和硫氧化效能分析 A: OD_{420} ; B: 硫化物去除率; C: 硫酸盐生成率

Figure 1 The growth and sulfide oxidation ability of thermophilic strains at 55 °C. A: OD_{420} ; B: Sulfide removal rate; C: Sulfate generation rate.

进入稳定期。此外,菌株 LYH-1 对硫化物的去除能力最优,在培养的 84 h 时达到了 76.33% 的去除率;并且该菌株的硫酸盐生成能力较为稳定,在 60 h 时达到 26.80% 的硫酸盐生成率峰值。对于菌株 LYH-4,在培养 84 h 后的硫化物去除率为 68.83%,但其硫酸盐生成率仅为 10.72%;在 72 h 时,菌株 LYH-2 和 LYH-3 的硫化物去除

率分别达到 42.52% 和 49.61%,但这 2 株菌的硫酸盐产生量波动较大,高温条件下的硫氧化能力不稳定。因此,综合考虑 4 株菌在高温条件下的生长状况和硫氧化能力的稳定性后,选择菌株 LYH-1 进行后续研究。

2.2 菌株 LYH-1 的形态学观察和生理生化分析

将菌株 LYH-1 接种于 LB 培养基上进行菌落形态观察,发现菌落呈淡黄色,表面光滑,易挑取,不透明,边缘不整齐;革兰氏染色后显示为阴性的产芽孢菌,经扫描电子显微镜观察,菌株 LYH-1 为杆状菌,菌体大小为 $(0.3-5.0) \mu\text{m} \times (1.6-2.4) \mu\text{m}$ (图 2)。菌株生理生化实验的结果显示,LYH-1 能进行明胶液化、淀粉水解、吲哚利用、硝酸盐还原、亚硝酸盐还原和柠檬酸盐利用的反应,对于接触酶、氧化酶、丙二酸利用、 H_2S 产生和反硝化实验的结果显示为阴性。

2.3 菌株 LYH-1 的 16S rRNA 基因序列分析与鉴定

利用 16S rRNA 基因测序对耐高温硫氧化

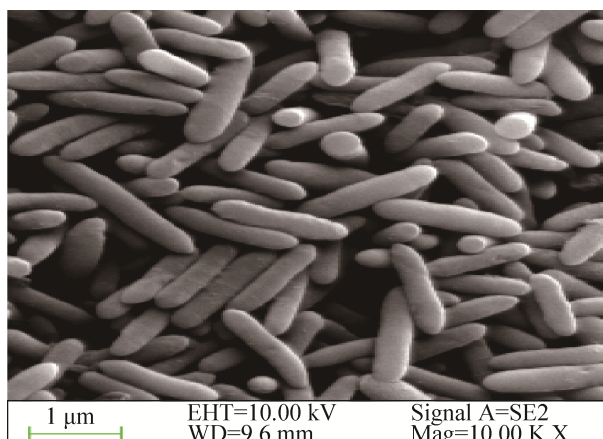


图2 菌株 LYH-1 的扫描电镜观察

Figure 2 Observation of the scanning electron microscope characteristics of strain LYH-1.

菌株进行种属鉴定, 获得菌株 LYH-1 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 410 bp, 提交 GenBank 获得的登录号为 MW659161。同时利用 NCBI 数据库中的 BLAST 工具进行序列的比对分析, 在 MEGA 7.0 软件中利用邻接法 (neighbor-joining method) 构建系统发育树, 结果如图 3 所示。通过对菌株 LYH-1 的序列进行对比分析可知, 与其同源性最相近的是 *Paenibacillus ehimensis* strain B7 (JX282195), 二者的相似度高达 99%。此外, 结合形态观察和生理生化特征分析, 初步确定硫氧化菌株 LYH-1 为一株爱媛类芽孢杆菌 (*Paenibacillus ehimensis*)。

2.4 不同环境条件下菌株 LYH-1 的生长特性及硫氧化性能

2.4.1 温度对 LYH-1 生长量和硫氧化效能的影响

由图 4 可知, 不同温度对菌株 LYH-1 的生长状况和硫酸盐生成能力的影响十分显著 ($P<0.01$)。菌株的 OD_{420} 在 40 °C 时达到最高值为 0.167, 在温度为 40–55 °C 时, 菌株的 OD_{420} 在 0.142–0.167 之间; 当温度继续升高时, 生长量迅速降低, 说明菌株的适宜生长温度在 40–55 °C 之间。此外, 当温度在 30–50 °C 时, 菌株的硫酸盐生成量随着温度的升高而不断增加; 当温度为 55 °C 时, 硫酸盐生成量达到最高,

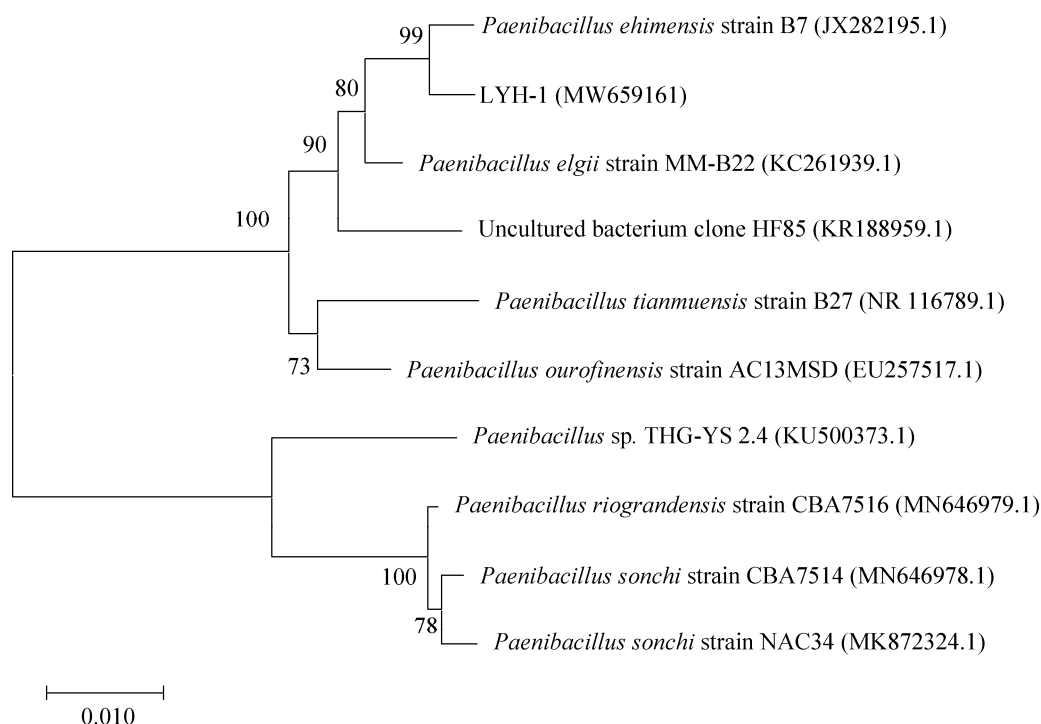


图 3 菌株 LYH-1 及其相关菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 建树所用的 bootstrap 值设置为 1 000; 菌株的 GenBank 登录号用括号内的序号表示; 分支结点处的数字表示可信度; 标尺的数据 0.010 代表进化距离

Figure 3 Phylogenetic tree of strain LYH-1 and related strains based on 16S rRNA gene sequence. The bootstrap value used for tree is set to 1 000; The GenBank accession number of the strain is indicated by the serial number in brackets; The number at the branch node indicates the credibility; the scale data 0.010 represents the evolutionary distance.

为 73.21 mg/L; 而当温度继续升高至 60 °C 和 65 °C 时, 菌株的硫酸盐生成能力急剧降低。这说明温度过低或过高均会显著影响硫氧化相关反应酶的活性, 不利于菌体硫氧化反应的进行, 而当温度为 55 °C 时, 菌株 LYH-1 的硫氧化反应效果最佳, 说明该菌是一株能在高温条件下更好地发挥硫氧化作用的嗜热菌株, 并且硫氧化作用较优的温度范围在 45–55 °C 之间。

2.4.2 pH 对 LYH-1 生长量和硫氧化效能的影响

pH 值对耐高温硫氧化菌 LYH-1 的效能影响如图 5 所示。由于 pH 值的变化可以使菌体膜表面的电位及体内的酶促反应速率发生变化, 从而影响微生物的生长繁殖, 所以环境的酸碱性对菌株生存的影响巨大。非配对 *t* 检验结果显示, pH 的变化对 SO_4^{2-} 生成量的影响十分显著 ($P < 0.01$), 对菌株生长量影响的显著性更大 ($P < 0.001$)。当环境处于弱酸性(pH 值为 5.5–6.5)或碱性(pH 值为 8.0–9.0)时, 菌株 LYH-1 的硫氧化能力较差, 硫酸盐生成量在 13.42–53.90 mg/L 之间; 当环境 pH 值为 7.0–7.5 时, 菌株的生长能力和硫氧化能力较强, 并且当 pH 值为 7.0 时硫酸盐含量达到 80.92 mg/L, 生长量 OD_{420} 也达到最高值 0.149; 并且当 pH 值为 5.5 时, OD_{420} 仅为 0.060。上述结果说明菌株 LYH-1 在中性及

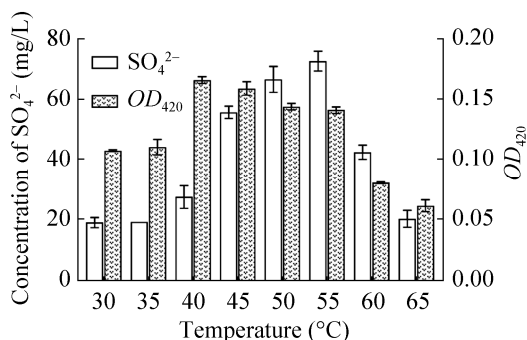


图 4 温度对菌株 LYH-1 的生长及硫氧化性能的影响

Figure 4 Effects of temperature on the growth and sulfide oxidation performance of strain LYH-1.

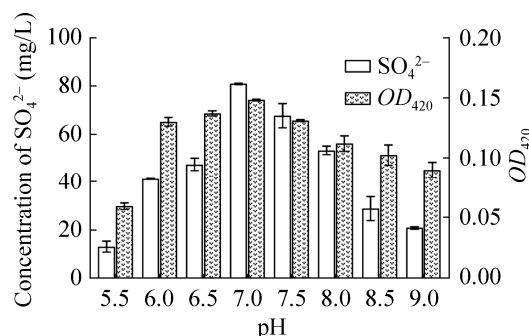


图 5 pH 值对菌株 LYH-1 的生长及硫氧化性能的影响

Figure 5 Effects of pH on the growth and sulfide oxidation performance of strain LYH-1.

弱碱性(pH 值为 7.0–8.0)的环境中能发挥出较优的硫氧化效果。

2.4.3 转速对 LYH-1 生长量和硫氧化效能的影响

摇床转速可用于表征培养基中的氧含量高低, 并且在一定范围内, 转速的大小与培养基的溶解氧含量呈明显的线性关系^[29]。由图 6 可知, 当转速在 80–150 r/min 时, 硫酸盐的生成量和菌株生长量呈逐渐上升的趋势, 并且当转速达到 150 r/min 时, 硫酸盐含量达到最大值 79.12 mg/L, OD_{420} 达到 0.175; 当转速继续升高至 170 r/min 和 200 r/min 时, 硫酸盐生成量迅速下降, 菌的生长量也随之减小。说明过高的氧

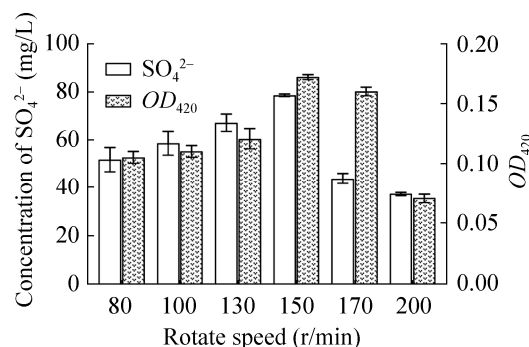


图 6 转速对菌株 LYH-1 的生长及硫氧化性能的影响

Figure 6 Effects of rotate speed on the growth and sulfide oxidation performance of strain LYH-1.

含量不利于菌株 LYH-1 的生长, 同时也会减弱硫氧化反应的能力($P<0.01$)。

2.4.4 接种量对 LYH-1 生长量和硫氧化效能的影响

图 7 反映了初始接种微生物量对菌体的硫氧化效能的影响。当接种量为 1% 时, 硫酸盐含量为 41.75 mg/L, OD_{420} 为 0.095; 当接种量为 3% 时, 硫酸盐生成量达到峰值 75.71 mg/L, 同时生长量达到最高; 当接种量增加至 5% 时, 硫酸盐含量减少到 71.17 mg/L; 当接种量继续增加时, 硫酸盐含量随之下降, 菌体生长量也相应减少。这说明当培养基中的营养成分有限时, 菌初始接种量越高则微生物生长繁殖越迅速, 菌群会更加迅速地进入衰亡期, 微生物之间存在剧烈的生存竞争导致微生物大量死亡, 菌群的硫氧化效能也因此大幅减弱。显著性分析结果同样显示, 初始接种量对菌株生长量的影响显著($P<0.05$), 而对 SO_4^{2-} 生成量的影响十分显著($P<0.01$)。因此, 选取 3%–5% 的较优接种量范围进行后续研究。

2.5 能源物质对 LYH-1 生长量和硫氧化效能的影响

碳源和氮源作为菌株生长必备的能源物

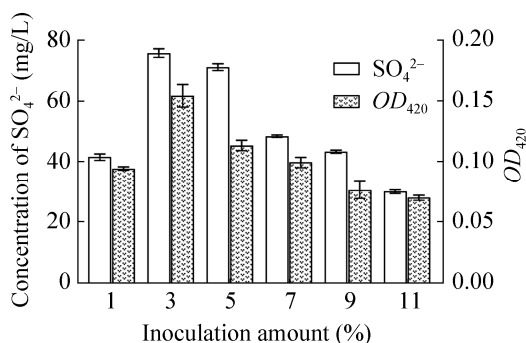


图 7 接种量对菌株 LYH-1 的生长及硫氧化性能的影响

Figure 7 Effects of initial inoculum on the growth and sulfide oxidation performance of strain LYH-1.

质, 对于菌株的新陈代谢和生长繁殖有着至关重要的作用。由图 8A 可知, 菌 LYH-1 可利用的碳源广泛, 既能以无机碳(Na_2CO_3)作为碳源, 也能利用葡萄糖、淀粉等有机碳进行生长。菌株对双糖(蔗糖、乳糖)、多糖和分子量较大的有机碳源(柠檬酸钠)的利用能力较差, 此时 LYH-1 的生长量和硫酸盐生成能力均较低; 当以单糖(葡萄糖)、乙酸钠和 Na_2CO_3 为碳源时, 菌株的生长能力和硫氧化能力均有显著提升, 其中以葡萄糖为碳源时, 硫酸盐生成量达到峰值(76.41 mg/L), OD_{420} 达到 0.152。基于上述实验选取葡萄糖为培养基碳源进行碳源的不同浓度测试, 结果如图 8B 所示。当葡萄糖浓度为 0.2 g/L 时, 硫酸盐生成量为 77.81 mg/L, 达到最大值; 当碳源浓度继续增加时, 菌株 LYH-1 的硫酸盐生成能力也随之降低。葡萄糖浓度在 0.1–1.2 g/L 时, 微生物的生长量随碳源浓度上升而增加, 当碳源浓度为 1.2 g/L 时, OD_{420} 达到 0.510 的最高值。此外, 葡萄糖浓度的变化对微生物生长量无显著性差异($P>0.05$), 然而不同浓度葡萄糖对硫酸盐的累积有显著影响($P<0.01$)。

由图 8C 可知, 菌株 LYH-1 可利用多种氮源物质进行生长。当以氯化铵和牛肉膏为氮源时, 菌株的硫氧化能力较优, 硫酸盐生成量最高可达 77.20 mg/L; 在分别添加蛋白胨、酵母粉和磷酸二氢铵的培养基中, 菌株的硫氧化效果差别不大; 此外, 当以硝酸钠为氮源时, 硫酸盐生成量最低为 31.13 mg/L。基于上述实验选取氯化铵为培养基氮源进行不同的氮源浓度测试, 结果如图 8D 所示。当氯化铵浓度分别在 0.2、0.4 和 0.8 g/L 时, 培养基中的硫酸盐含量分别为 73.88、74.01 和 79.22 mg/L; 当氯化铵浓度升高至 1.0 g/L 时, 硫酸盐含量开始降低, 而 OD_{420} 升至最高值, 达到 0.238; 当氯化铵浓度在 2.0–5.0 g/L 时, 菌株的生长量和硫酸盐生成量均随其浓度的升高而降低。

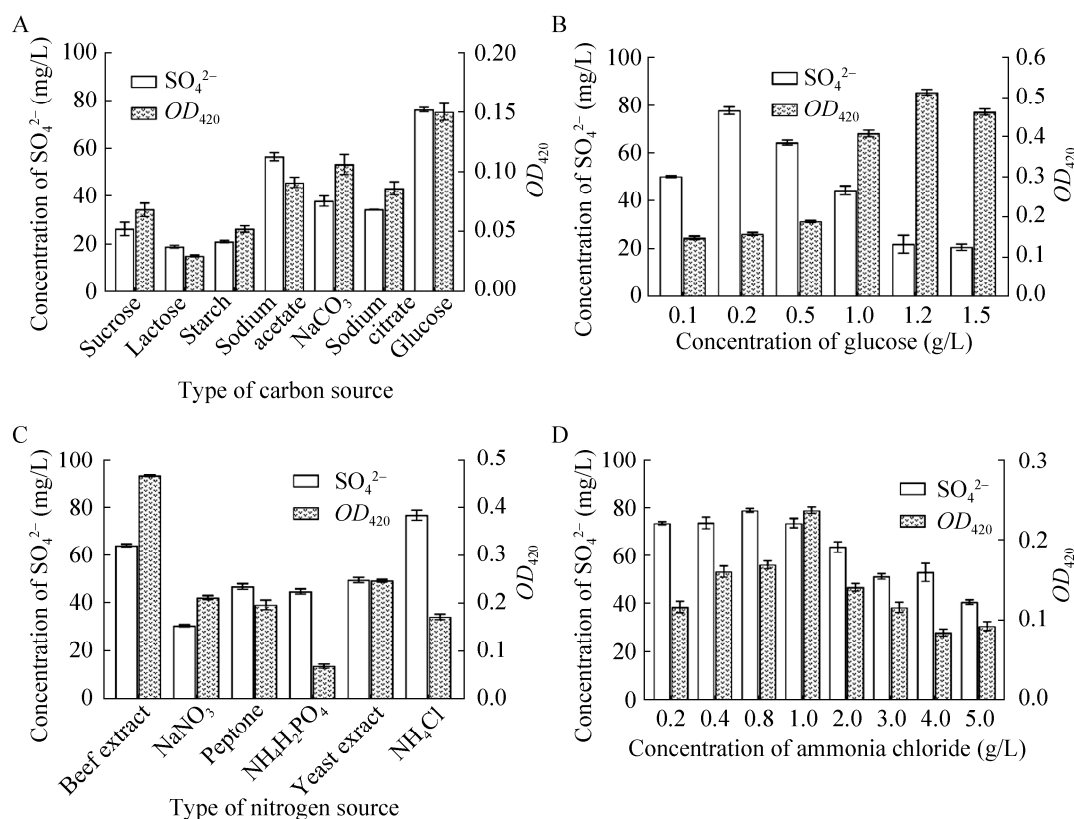


图 8 能源物质对菌株 LYH-1 的生长及硫化性能的影响 A: 碳源种类; B: 最优碳源的浓度; C: 氮源种类; D: 最优氮源的浓度

Figure 8 Effects of energy substances on the growth and sulfide oxidation performance of strain LYH-1. A: Type of carbon source; B: Concentration of optimal carbon source; C: Type of nitrogen source; D: Concentration of optimal nitrogen source.

2.6 菌株 LYH-1 的发酵条件优化

基于上述外界条件的影响实验可知, 各单一因素对菌株的硫酸盐生成能力均有一定的影响。为探究环境因素对菌株 LYH-1 硫氧化能力的影响, 选取温度、pH 和接种量作为关键环境因子, 并设置一系列空白值减少实验误差, 以硫酸盐生成量和菌株生长量为响应结果, 得到的 L₉(3⁴) 的正交试验结果如表 3 所示。正交分析结果显示, 3 种环境因素对硫酸盐生成量的影响大小依次为 pH>温度>接种量, 选取每个因素中最大的 K 值, 得到使硫酸盐生成量最优的环境因素组合为 A₂B₂C₃, 即温度为 50 °C、pH 值为 7.5、

接种量为 5%。3 种环境因素对菌生长量的影响大小依次为温度>pH>接种量, 使菌株生长量达到最大的最优水平组合为温度为 50 °C、pH 值为 8.0、接种量为 5%。此外, 方差分析表明温度对硫酸盐生成和菌株生长量的影响最为显著 ($P<0.01$)。

2.7 最优条件下菌株 LYH-1 的生长动力学分析

在优化后的生长发酵条件中, 将菌液连续培养 32 h 以分析菌株的生长动力学。由公式(1)可知, 在菌株发育初期, 当时间 $t=0$ 时, 可令微生物量 $X=X_0$, 实验可得初期菌体浓度 $X_0=0.1200$ g/L, 最

表 3 菌株 LYH-1 发酵条件优化的正交分析试验结果

Table 3 Orthogonal experiment results of optimizing fermentation conditions of strain LYH-1

Test No.	Temperature (A)	pH (B)	Inoculation amount (C)	Empty column (D)	Sulfate concentration (mg/L)	OD_{420}
1	1	1	1	1	40.90	0.308
2	1	2	2	2	46.74	0.316
3	1	3	3	3	49.14	0.432
4	2	1	2	3	49.59	0.461
5	2	2	3	1	86.89	0.520
6	2	3	1	2	67.70	0.504
7	3	1	3	2	47.53	0.365
8	3	2	1	3	71.96	0.389
9	3	3	2	1	71.70	0.391
K_1	45.59	46.01	60.19	66.50		
K_2	68.06	68.53	56.01	53.99		
K_3	63.73	62.85	61.19	56.90		
R	22.47	22.52	5.18	12.51		
K_1'	0.352	0.378	0.400	0.406		
K_2'	0.495	0.408	0.389	0.395		
K_3'	0.382	0.442	0.439	0.427		
R'	0.143	0.064	0.050	0.032		

大菌体浓度 $X_m=1.242\ 0\ \text{g/L}$, 利用 GraphPad 8.0 软件拟合得到最大比生长速率 $\mu_m=0.304\ 2\ \text{h}^{-1}$, 将上述各个参数代入微分方程进行计算, 因此得到菌株 LYH-1 的生长动力学方程如公式(3)所示:

$$X = \frac{0.149\ 0e^{0.304\ 2t}}{1.122\ 0 + 0.120\ 0e^{0.304\ 2t}} \quad (3)$$

式中: X : 菌体浓度(干重), g/L ; t : 培养时间, h 。

利用非线性拟合的手段,将硫氧化菌 LYH-1 在分批发酵过程中的生长量与培养时间的关系进行模拟,同时以 95%作为置信水平,绘制相应的预测区间曲线,得到的结果如图 9 所示。

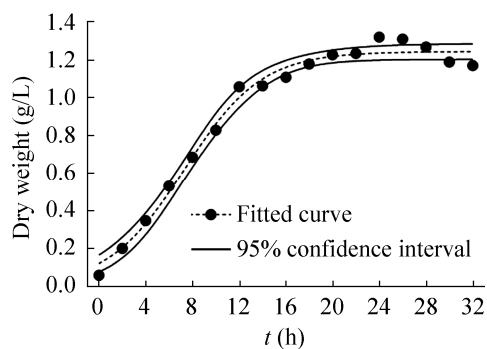


图 9 发酵条件优化后菌株 LYH-1 的生长动力学分析

Figure 9 Analysis of growth kinetics of strain LYH-1 after optimizing fermentation conditions.

3 讨论与结论

耐高温硫氧化菌株的筛选对于污泥堆肥高温期的含硫臭气控制具有十分重要的意义。本研究通过从哈尔滨市某污泥堆肥处理厂的堆肥物料中进行筛选,分离纯化得到4株能将硫化物转化为硫酸盐的耐高温菌株LYH-1、LYH-2、LYH-3和LYH-4,综合考虑4株菌在55℃的生长状况和硫氧化性能的稳定性,选择LYH-1进行后续研究。菌株LYH-1的革兰氏染色结果为阴性,属于产芽孢杆菌,扫描电镜观察大小为(0.3–5.0) $\mu\text{m} \times (1.6–2.4) \mu\text{m}$;利用16S rRNA基因测序及构建系统发育树的方法,同时结合生理生化实验分析,初步鉴定该菌为一株爱媛类芽孢杆菌(*Paenibacillus ehimensis*)。爱媛类芽孢杆菌多在生成抗生素、抑制致病菌生长方面有相关研究^[30],而在污泥堆肥除臭领域尚未有相关报道,这说明爱媛类芽孢杆菌LYH-1的筛选纯化丰富了硫氧化细菌的微生物资源。

目前已筛选出的硫氧化菌株大多为中常温菌。Asano等^[31]在30℃下从牛粪堆肥中分离出一株那不勒斯硫杆菌(*Halothiobacillus neapolitanus*),该菌在培养10 d后可将培养基中21%的硫代硫酸盐完全氧化;Sun等^[19]从活性污泥中筛选出副球菌(*Paracoccus* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)等多株硫氧化菌,所有菌株在33℃下对硫化物的去除率均达到84%以上。赵冬梅等^[32]从好氧堆肥中筛选出一株耐高温假黄色单胞菌(*Pseudoxanthomonas byssovorax*),该菌株对50 mg/L硫化物的最高氧化率为36.89%。与上述报道的菌株相比,在温度为30–65℃、pH值为5.5–9.0的条件下,菌株LYH-1不仅能够存活且能高效地进行硫氧化反应,该菌株对环境温度和酸碱度的耐受范围广,具有较强的环境抗逆性,并且在初始硫化物浓度为80 mg/L及温度为55℃时,硫酸盐生成量最高可达到80.92 mg/L。基于

外界条件的单因素试验表明,当温度在45–55℃之间、pH值为7.0–8.0、转速为130–150 r/min、接种量为3%–5%、外加碳源为葡萄糖、外加氮源为氯化铵时,该菌最终氧化产物硫酸盐的生成量越多,更有利于菌株进行硫氧化作用。此外,菌株LYH-1既能以无机碳(Na_2CO_3)作为碳源,也能利用葡萄糖、淀粉等有机碳进行生长,说明该菌为一株混养型硫氧化菌株,混养型菌株的碳源利用范围广,具有在C/N比较低的污泥堆肥中应用的前景。由正交试验优化菌株发酵条件的实验可知,在温度为50℃、pH值为7.5、接种量为5%的条件下,硫酸盐的生成量最高可达到86.89 mg/L,生成率高达36.20%;并且温度的变化对菌生长状况的影响最为显著($P < 0.01$),其次是pH和接种量。利用Logistic模型拟合菌株的生长动力学,得到一条典型的“S”型菌株生长曲线,该菌在50℃的最大比生长速率 μ_m 为0.304 2 h^{-1} 。冯守帅等^[33]研究发现一株*Thermithiobacillus tepidarius* JNU-2在30℃时的 μ_m 为0.20 7 h^{-1} ;Xu等^[34]筛选得到的一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)在30℃时的最大比生长速率为0.11 h^{-1} 。与上述菌株相比,耐高温菌株LYH-1在高温条件下的比生长速率更大,该菌在50℃时可迅速进行生长繁殖,菌体内的硫氧化酶的温度抗逆性较强,说明该菌株在堆肥应用中会迅速提高堆肥温度,大大缩短堆肥周期。

综上所述,耐高温硫氧化菌株LYH-1(*Paenibacillus ehimensis*)具有较好的环境抗逆性和硫氧化能力,可为高温条件下污泥堆肥领域的硫化物($\text{S}^{2-}/\text{HS}^-$)氧化和含硫臭气的生物控制提供研究思路,具有一定的实际应用价值。

REFERENCES

- [1] Yang G, Zhang GM, Wang HC. Current state of sludge production, management, treatment and disposal in China[J]. Water Research, 2015, 78: 60-73

- [2] Murray A, Horvath A, Nelson KL. Hybrid life-cycle environmental and cost inventory of sewage sludge treatment and end-use scenarios: a case study from China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(9): 3163-3169
- [3] Głab T, Żabiński A, Sadowska U, Gondek K, Kopeć M, Mierzwa-Hersztek M, Tabor S, Stanek-Tarkowska J. Fertilization effects of compost produced from maize, sewage sludge and biochar on soil water retention and chemical properties[J]. *Soil and Tillage Research*, 2020, 197: 104493
- [4] Meng LQ, Li WG, Zhang SM, Wu CD, Lv L. Feasibility of co-composting of sewage sludge, spent mushroom substrate and wheat straw[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 226: 39-45
- [5] Bian RX, Sun YJ, Li WH, Ma Q, Chai XL. Co-composting of municipal solid waste mixed with matured sewage sludge: the relationship between N_2O emissions and denitrifying gene abundance[J]. *Chemosphere*, 2017, 189: 581-589
- [6] Białobrzewski I, Mikš-Krajnik M, Dach J, Markowski M, Czekala W, Gluchowska K. Model of the sewage sludge-straw composting process integrating different heat generation capacities of mesophilic and thermophilic microorganisms[J]. *Waste Management*, 2015, 43: 72-83
- [7] Wang K, Li WG, Li XK, Ren NQ. Spatial nitrifications of microbial processes during composting of swine, cow and chicken manure[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14932
- [8] Zhao S, Yang XF, Zhang WJ, Chang J, Wang DS. Volatile sulfide compounds (VSCs) and ammonia emission characteristics and odor contribution in the process of municipal sludge composting[J]. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 2019, 69(11): 1368-1376
- [9] Choi E, Kim J, Choi I, Ahn H, Dong JI, Kim H. Microbial additives in controlling odors from stored swine slurry[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2015, 226(4): 104
- [10] Rappert S, Müller R. Microbial degradation of selected odorous substances[J]. *Waste Management*, 2005, 25(9): 940-954
- [11] Kim JD, Kang KH. Isolation of *Lactobacillus sakei* strain KJ-2008 and its removal of characteristic malodorous gases under anaerobic culture conditions[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(12): 2427-2435
- [12] Zhang LH, De Schryver P, De Gussem B, De Muynck W, Boon N, Verstraete W. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: a review[J]. *Water Research*, 2008, 42(1/2): 1-12
- [13] Yin ZX, Xie L, Khanal SK, Zhou Q. Interaction of organic carbon, reduced sulphur and nitrate in anaerobic baffled reactor for fresh leachate treatment[J]. *Environmental Technology*, 2016, 37(9): 1110-1121
- [14] 李静泉, 姜燕, 许继飞, 赵吉. 嗜酸氧化硫杆菌 DS1 的分离鉴定及单质硫氧化特性[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(2): 228-232
- Li JQ, Jiang Y, Xu JF, Zhao J. Isolation and identification of *Thiobacillus thiooxidans* DS1 and its elemental sulfur oxidation characteristics [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(2): 228-232 (in Chinese)
- [15] 杨娟, 谢翼飞, 李旭东, 陈瑜江, 赵玉萍. 一株耐盐硫氧化细菌的分离鉴定及脱硫机理[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(5): 819-823
- Yang J, Xie YF, Li XD, Chen YJ, Zhao YP. Isolation, identification and desulfurization mechanism of a sulfur-oxidizing bacterium with salt tolerance[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(5): 819-823 (in Chinese)
- [16] 陈金才, 冯守帅, 高凯, 计云鹤, 罗斌, 杨海麟. 耐盐硫氧化菌的筛选、鉴定及脱硫性能研究[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(9): 1651-1661
- Chen JC, Feng SS, Gao K, Ji YH, Luo B, Yang HL. Isolation, identification and biodesulfurization performance research of salt-tolerant sulfur oxidizing bacteria[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(9): 1651-1661 (in Chinese)
- [17] Gu WJ, Sun W, Lu YS, Li X, Xu PZ, Xie KZ, Sun LL, Wu HT. Effect of *Thiobacillus thioparus* 1904 and sulphur addition on odour emission during aerobic composting[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 254-260
- [18] Chen Y, Wen Y, Zhou Q, Huang JG, Vymazal J, Kusch P. Sulfate removal and sulfur transformation in constructed wetlands: the roles of filling material and plant biomass[J]. *Water Research*, 2016, 102: 572-581
- [19] Sun ZQ, Pang BW, Xi JY, Hu HY. Screening and characterization of mixotrophic sulfide oxidizing bacteria for odorous surface water bioremediation[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 290: 121721
- [20] 甘晓. 鸡粪除臭菌的筛选鉴定、培养条件优化及其应用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2014
- Gan X. Screening, identification, optimization of deodorization strains and the application in chicken manure deodorizing[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [21] Kantachote D, Charernjiratrakul W, Noparatnaraporn N, Oda K. Selection of sulfur oxidizing bacterium for sulfide removal in sulfate rich wastewater to enhance biogas

- production[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2008, 11(2): 107-118
- [22] 程艳, 刘永德, 赵继红. 污泥堆肥中高温菌的研究进展[J]. 中国资源综合利用, 2014, 32(2): 31-32
- Cheng Y, Liu YD, Zhao JH. Research progress on thermophilic bacterium in composting[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2014, 32(2): 31-32 (in Chinese)
- [23] 王惠祥, 姜理英, 吴晓薇, 陈建孟. 硫氧化细菌的分离鉴定及降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 706-710
- Wang HX, Jiang LY, Wu XW, Chen JM. Isolation, identification and degradation characteristics of a sulfide-oxidizing bacterium[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2011, 17(5): 706-710 (in Chinese)
- [24] 李修善. 阿式肠杆菌和萎缩芽孢杆菌扫描电镜样品制备观察和分析[J]. 曲阜师范大学学报(自然科学版), 2016, 42(1): 102-104
- Li XS. Preparation for observation and analysis of *Enterobacter asburiae* and *Bacillus atrophaeus* SEM specimen[J]. Journal of Qufu Normal University: Natural Science, 2016, 42(1): 102-104 (in Chinese)
- [25] 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
- Dong XZ, Cai MY. Manual for Systematic Identification of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [26] Ahmadi M, Jorfi S, Kujlu R, Ghafari S, Darvishi Cheshmeh Soltani R, Jaafarzadeh Haghighifard N. A novel salt-tolerant bacterial consortium for biodegradation of saline and recalcitrant petrochemical wastewater[J]. Journal of Environmental Management, 2017, 191: 198-208
- [27] 刘佳文. 两种梭菌的丁醇发酵工艺优化及动力学研究[D]. 福州: 福州大学硕士学位论文, 2018
- Liu JW. The optimization of butanol fermentation process of two kinds of *Clostridium* and kinetic studies[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fuzhou University, 2018 (in Chinese)
- [28] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- State Environmental Protection Administration of China. Monitoring and Analysis Methods for Water and Wastewater[M]. 4th Edition. Beijing: China Environment Science Press, 2002 (in Chinese)
- [29] Qin W, Li WG, Gong XJ, Huang XF, Fan WB, Zhang DY, Yao P, Wang XJ, Song Y. Seasonal-related effects on ammonium removal in activated carbon filter biologically enhanced by heterotrophic nitrifying bacteria for drinking water treatment[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(24): 19569-19582
- [30] 王曦. 爱媛类芽孢杆菌南京分离株的鉴定及其体内外的抑菌活性[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2009
- Wang X. Screening, identification of a *Paenibacillus ehimensis* isolate from Nanjing and its antimicrobial effect in *in vitro* and *in vivo*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2009 (in Chinese)
- [31] Asano R, Sasaki T, Nakai Y. Isolation and characterization of sulfur oxidizing bacteria from cattle manure compost[J]. Animal Science Journal, 2007, 78(3): 330-333
- [32] 赵冬梅, 顾文杰, 张发宝, 王立群. 1 株好氧堆肥高温 H_2S 脱臭菌的筛选、鉴定及生长特性[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(6): 47-52
- Zhao DM, Gu WJ, Zhang FB, Wang LQ. Isolation, identification and growth characteristics of a thermophilic bacterium for H_2S deodorization during aerobic composting[J]. Journal of Microbiology, 2012, 32(6): 47-52 (in Chinese)
- [33] 冯守帅, 计云鹤, 杨海麟. 硫氧化菌种脱除硫化物生成单质硫限制性因素优化[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1): 36-43
- Feng SS, Ji YH, Yang HL. Optimization of restrictive factors during process of removing sulfide into elemental sulfur by sulfur oxidizer[J]. Microbiology China, 2016, 43(1): 36-43 (in Chinese)
- [34] Xu XJ, Chen C, Guo HL, Wang AJ, Ren NQ, Lee DJ. Characterization of a newly isolated strain *Pseudomonas* sp. C27 for sulfide oxidation: reaction kinetics and stoichiometry[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 21032