

研究报告

硫氧化菌种脱除硫化物生成单质硫限制性因素优化

冯守帅 计云鹤 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】针对硫氧化菌种较为特殊的生化特性, 优选其氧化硫化物生成单质硫过程的相关限制性因素, 以提高该类菌种生成单质硫效率。【方法】采用一株典型脱硫菌 *Thermithiobacillus tepidarius* JNU-2 (*T. tepidarius* JNU-2) 氧化硫化物生成单质硫。研究该菌株在以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为能源底物时的培养特性和脱硫性能, 并结合单因素实验对菌株氧化硫化物生成单质硫的限制性因素进行优选。【结果】*T. tepidarius* JNU-2 在以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为唯一能源底物培养时的 μ_{\max} 为 0.207 h^{-1} , 最终生物量为 4.0×10^6 cells/mL。98% 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 在 24 h 时被消耗殆尽, 此时单质硫产量达到最大值为 0.8 g/L。随后单质硫逐渐被氧化利用, 最终稳定在 0.2 g/L。经过对该过程主要限制性因素进行单因素实验优化, 确定最佳碳氮源、 MgSO_4 、 FeSO_4 和能源底物条件分别为: CO_2 、 NH_4Cl 0.5 g/L、 MgSO_4 0.5 g/L、 FeSO_4 0.1 g/L 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 15.0 g/L。优化后的氧化 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 生成单质硫过程的最大生物量可达 4.8×10^6 cells/mL, 单质硫产量提升至 1.14 g/L。相较于未优化之前, 单质硫的产量提高了 42.5%。【结论】优化该过程主要限制性因素可有效提高化能自养型 *T. tepidarius* JNU-2 氧化硫化物生成单质硫效率。

关键词: 硫氧化菌种, 脱除硫化物, 单质硫, 限制性因素

Optimization of restrictive factors during process of removing sulfide into elemental sulfur by sulfur oxidizer

FENG Shou-Shuai JI Yun-He YANG Hai-Lin*

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

Abstract: [Objective] Concerning the special biochemical characteristics of sulfur oxidizer, we optimized related restrictive factors during the process of oxidizing sulfide to elemental sulfur for improving productivity of the elemental sulfur. [Methods] A typical desulfurization strain *Thermithiobacillus tepidarius* JNU-2 (*T. tepidarius* JNU-2) was used for oxidizing sulfide into elemental sulfur. The culture trait and desulfurization performance was respectively studied with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ as the energy substrate. Then the process of oxidizing sulfide into elemental sulfur related

Foundation item: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20150133); Scientific Program of Jiangnan University (No. JUSR11538)

*Corresponding author: 86-510-85918119; E-mail: bioprocessor@aliyun.com

Received: April 30, 2015; Accepted: May 27, 2015; Published online (www.cnki.net): June 26, 2015

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(No. BK20150133); 江南大学自主科研计划科研基金项目(No. JUSR11538)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918119; E-mail: bioprocessor@aliyun.com

收稿日期: 2015-04-30; 接受日期: 2015-05-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-26

restrictive factor was optimized via single factor experiments. **[Results]** With $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ as the sole energy substrate, μ_{\max} of *T. tepidarius* JNU-2 was 0.207 h^{-1} and the final biomass was 4.0×10^6 cells/mL. Nearly 98% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ had been consumed at 24 h and elemental sulfur production reached the maximum value 0.8 g/L. Then elemental sulfur was gradually oxidized and eventually maintained at 0.2 g/L. The optimum conditions of major restrictive factors such as carbon and nitrogen source, MgSO_4 , FeSO_4 and energy substrate was determined through the single factor experiments as follow. CO_2 , NH_4Cl 0.5 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, FeSO_4 0.1 g/L, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 15.0 g/L. After optimization, the maximum biomass reached 4.0×10^6 cells/mL during the process of oxidizing $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ into elemental sulfur and its titer was increased to 1.14 g/L, which was improved by 42.5% compared to the previous non-optimized one. **[Conclusion]** The efficiency of elemental sulfur from oxidizing sulfide by chemoautotrophic *T. tepidarius* JNU-2 could be effectively improved via optimization of major restrictive factors.

Keywords: Sulfur oxidizer, Sulfide removal, Elemental sulfur, Restrictive factors

近年来我国雾霾天气频繁出现, 造成严重的环境污染, 同时也威胁到人们身体健康和出行交通安全。其中, 硫化物颗粒是雾霾的主要组成成分之一。生物脱硫是指利用微生物把硫化物氧化为单质硫, 从而减少体系中硫化物的浓度^[1-3]。主要涉及微生物可分为三类: 光合硫细菌、丝状硫细菌和无色硫细菌^[4-6]。与传统化学脱硫相比, 生物脱硫有着很多优势, 如减少毒害化学试剂用量、中间副产物单质硫可回收利用、操作简单且条件温和等, 受到越来越多研究人员的关注^[7]。

但是生物法处理硫化物同样也面临不可忽视的问题。由于该过程所涉及菌种多为自养型微生物, 其生长速率普遍偏低, 导致培养效果及单质硫产量均不理想, 难以满足实际科研和生产需求^[7]。其中, 氧化硫化物生成单质硫的主要限制性因素如利用能源底物率较低, 尤其容易受到碳氮源、金属离子及能源底物种类和浓度等是主要瓶颈^[7-9]。研究表明适当的碳源和氮源可促进无色硫细菌的生长及单质硫的产生^[5]。某些金属离子是硫氧化菌种细胞内酶的辅基或者激活物, 尽管含量较低, 在代谢过程中却起着不可替代的作用^[8]。此外, 该类微生物的主要能源底物还原态硫的种类和浓度可直接制约菌体生长和单质硫产量^[9]。因此, 有必要针对该类菌种的培养和产单质硫所涉及到的以上限制性因素进行系统优化。

本实验以一株典型脱硫菌株 *Thermithiobacillus*

tepidarius JNU-2 为实验对象, 首先考察了 *T. tepidarius* JNU-2 的培养特性和脱硫性能, 进而分别研究了碳氮源、金属离子及能源底物等主要限制性因素对菌株生物量及单质硫产量的影响, 确定了菌株的最适生长及产单质硫的培养条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 菌株 *T. tepidarius* JNU-2 保存于本实验室。

1.1.2 培养基: 第一部分(g/L): K_2HPO_4 4.0, KH_2PO_4 4.0, pH 7.0。第二部分(g/L): $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5.0, NH_4Cl 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 另加微量元素 10.0 mL/L。微量元素溶液成分(g/L): Na_2EDTA 45.00, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.58, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.05, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.63, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.12, CaCl_2 5.56, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.01, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.10, pH 7.0。采用 3 mol/L 的盐酸调节培养基 pH, 第一部分 1×10^5 Pa 灭菌 15 min, 第二部分采用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌。

1.2 *T. tepidarius* JNU-2 生长曲线及脱硫性能的实验

T. tepidarius JNU-2 接种及培养条件为: 接种量为 5%、初始 pH 7.0 及 30 °C。培养周期为 84 h。每间隔 12 h 测定 pH、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 浓度、 SO_4^{2-} 浓度以及单质硫的产量。同时, 取 100–200 mL 的培养液系列

稀释后,涂布于固体平板上,倒置于 30 °C 恒温培养箱中培养,待长出菌落后,计算菌落的个数,测定培养基中菌落形成单位数(CFU)。

1.3 *T. tepidarius* JNU-2 培养和产单质硫的限制性因素优化实验

实验优化了培养基中碳氮源、MgSO₄、FeSO₄、能源底物种类及底物浓度对 *T. tepidarius* JNU-2 生物量及单质硫产量的影响。碳、氮源种类及添加量组合如表 1 所示。MgSO₄ 的添加量分别为 0、0.2、0.5、0.8 和 1.0 g/L。FeSO₄ 的添加量分别为 0、0.05、0.10、0.15、0.20 和 0.25 g/L。能源底物的种类分别为 Na₂S₂O₃、单质硫、Na₂SO₃、NaSO₄ 以及 Na₂S, 浓度分别为 2.0、2.0、2.0、2.0 和 0.2 g/L。底物浓度实验的 Na₂SO₃ 浓度分别为 3.0、5.0、10.0、15.0 和 20.0 g/L。

1.4 检测方法

1.4.1 *T. tepidarius* JNU-2 的 CFU 检测: 采用平板活菌计数测定 *T. tepidarius* JNU-2 的生物量。取 5 mL 培养液 1 200 r/min 离心 2 min, 去除底部颗粒沉淀物质, 然后 8 000 r/min 离心 5 min 获取菌体。

采用无菌水将获得菌体适度稀释, 选取 OD₆₀₀=0.5 的稀释度的培养液进行系列稀释后, 在固体培养基上进行涂布并倒置于 30 °C 培养。计算最终菌落个数, 并建立 OD 值与 CFU 之间的标准曲线。生物量产率及比生长速率根据式(1)及(2)计算。

$$P = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

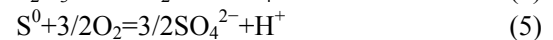
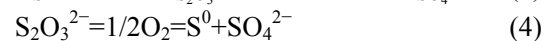
$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

式中: P 为生物量变化速率, μ 为比生长速率, X_1 和 X_2 为第 1、2 次取样的生物量。

1.4.2 硫酸盐和硫代硫酸盐浓度的检测: 分别采用铬酸钡分光光度法^[10]和碘量法^[11]测定硫酸盐和硫代硫酸盐的浓度。

1.4.3 单质硫的检测: 单质硫的检测采用硫平衡法^[12], 所涉及公式和反应式如下:

$$C_S^0 = 64.13/\Delta C_{S_2O_3^{2-}} - 32.13/96.13\Delta C_{SO_4^{2-}} \quad (3)$$



$\Delta C_{S_2O_3^{2-}}$: 硫代硫酸盐浓度的变化值; $\Delta C_{SO_4^{2-}}$: 硫酸盐浓度的变化值。

2 结果与分析

2.1 *T. tepidarius* JNU-2 培养特性和脱硫性能分析

T. tepidarius JNU-2 以 Na₂S₂O₃ 为唯一能源底物时的培养特性和脱硫性能如图 1A 所示。硫化物生物氧化过程涉及到的主要反应机理如式(6)–(8)所示^[3,8]。接种后经过约 12 h 的延滞期, 细胞逐渐步入对数生长期。经过 24 h 后 98% 的硫代硫酸根被消耗殆尽, 40 h 后进入稳定期, 此时生物量达到稳态, 约为 4.0×10⁶ cells/mL。 *T. tepidarius* JNU-2 利用 Na₂S₂O₃ 过程中, 培养基的 pH 呈先升后降趋势。这是由于前期 Na₂S₂O₃ 的还原态硫化物的消耗生成单质硫, 如式(6), 会伴随生成 OH⁻, 而后期单质硫不断被氧化利用, 如式(7)所示, 继续产生 H⁺。这使得 pH 在 12 h 时达到最高值 7.2, 随后开始降低最

表 1 不同氮源组合及其含量

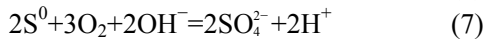
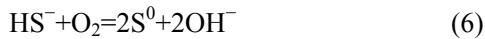
Table 1 Different nitrogen source combination and its content

组合 Combination	含量 Content (g/L)
CO ₂	ND
Na ₂ CO ₃	1.0
NaHCO ₃	1.0
Glucose	1.0
Sucrose	1.0
NH ₄ Cl	0.5/1.0/1.5
NaNO ₃	0.5/1.0/1.5
Peptone+NH ₄ Cl	1.0+0/1.0+0.5/1.0+1.5
Peptone+NaNO ₃	1.0+0/1.0+0.5/1.0+1.5

注: ND: 170 r/min 振荡培养, 未检测 CO₂ 浓度, 相当于对照体系。

Note: ND: Shaking-culture at 170 r/min, CO₂ concentration is not detected, which is recognized as compared system.

终稳定在 3.0 左右。硫酸根浓度呈逐渐增长趋势, 最终可达到 7.1 g/L。培养前期的单质硫产量随着时间的增加而增加, 24 h 时达到最大值 0.8 g/L, 24 h 之后产量随着时间的增加而逐渐减少, 最终稳定在 0.2 g/L 左右。



T. tepidarius JNU-2 的比生长速率(μ)如图 1B 所示, μ 呈现先增长后降低的趋势, 在 20 h 左右时达到最大值, μ_{\max} 为 0.207 h⁻¹。这与其唯一的能源底物 Na₂S₂O₃ 浓度变化趋势也是基本吻合的。图 1B 中显示单质硫的比生成速率呈先增后降趋势。在 12 h 左右时达到最大值 0.12×10⁻³ g/(cells·h), 但随后开始降低, 并在 24 h 后变成负值。这是因为 24 h 后累积的单质硫开始被氧化利用而导致产量开始降低, 如式(7), 所以单质硫的产量也呈现先增后降的趋势。伴随着单质硫的消耗会产生硫酸根, 硫酸根的含量则逐渐升高。

2.2 碳源和氮源对 *T. tepidarius* JNU-2 生物量及单质硫产量的影响

2.2.1 碳源种类对生物量及单质硫产量的影响: *T.*

tepidarius JNU-2 的生物量偏低导致单质硫产量不理想, 是微生物去除硫化物的主要瓶颈之一。本实验分别从碳氮源、金属离子浓度以及底物种类和浓度等方面进行了发酵优化实验, 以提高 *T. tepidarius* JNU-2 的生物量及单质硫产量。碳源物质为细胞代谢过程提供了所需要碳骨架。Na₂CO₃、NaHCO₃、CO₂、葡萄糖和蔗糖对菌株生物量及单质硫产量的影响, 如图 2A 所示。*T. tepidarius* JNU-2 在以 CO₂ 为碳源时生长状况最好, 菌株的生物量可达 4.2×10⁶ cells/mL, 以 Na₂CO₃ 为碳源时生物量会下降到 3.8×10⁶ cells/mL, 而 NaHCO₃ 为碳源时菌株的生物量只能达到 2.8×10⁶ cells/mL。然而在以葡萄糖和蔗糖为碳源的培养基中几乎没有生长。该结果表明 *T. tepidarius* JNU-2 属严格自养型细菌, 有机碳源的存在会严重抑制细胞生长。Wang 等^[13]的研究表明某些硫氧化菌种如那不勒斯硫杆菌是严格自养型微生物, 外加有机碳源时的菌体生物量仅为不添加有机碳源时的 10%, 并且单质硫生成同样显著下降。与此同时, 单质硫产量与生物量呈现较为相似趋势。因此确定 *T. tepidarius* JNU-2 的最佳碳源为 CO₂ 且无需其他形式碳源辅助。

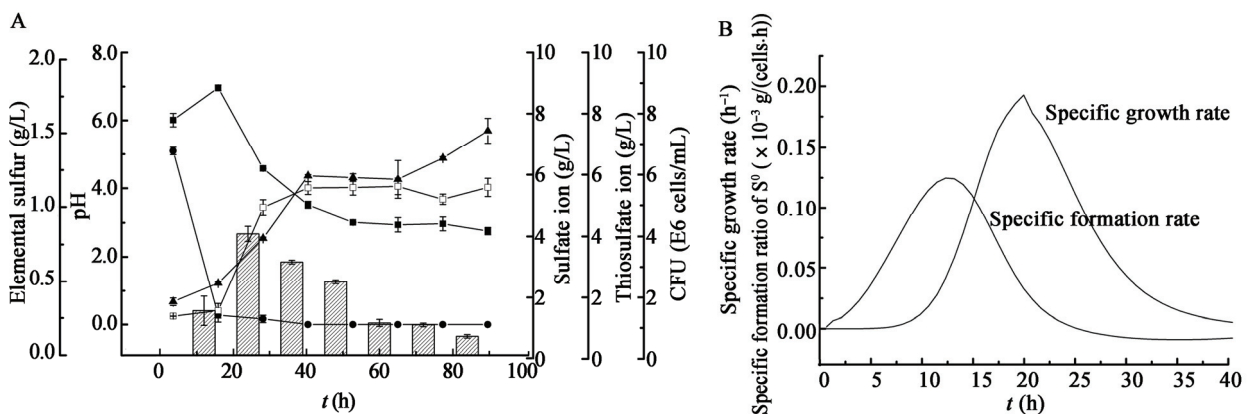


图 1 *T. tepidarius* JNU-2 的培养、脱硫特性及动力学变化曲线

Figure 1 Changes of culture, desulfurization and kinetics traits of *T. tepidarius* JNU-2

注: A: 培养和脱硫相关参数; B: 比生长速率和单质硫比生成速率。-■-: pH; -□-: CFU; -▲-: 硫酸根离子; -●-: 硫代硫酸根离子; ▨: 单质硫。

Note: A: Culture and desulfurization parameters; B: Specific growth rate and specific formation rate of elemental sulfur. -■-: pH; -□-: CFU; -▲-: Sulfate ion; -●-: Thiosulfate ion; ▨: Elemental sulfur.

2.2.2 氮源对生物量及单质硫产量的影响: 氮源是构成体内蛋白质及核酸的重要成分。实验选用了 NH_4Cl 、 NaNO_3 、 Na_2CO_3 +蛋白胨、 NH_4Cl +蛋白胨 4 种组合作为氮源。结果如图 2B 所示, 当氮源为 NH_4Cl 时 *T. tepidarius* JNU-2 的生长效果最好, 其添加量为 0.5 g/L 时, 培养 84 h 后菌株的生物量最高可达到 4.4×10^6 cells/mL。而当氮源为 NaNO_3 时, 经过 84 h 培养后的生物量最高仅为 3.5×10^6 cells/mL。而当有机蛋白胨无论作为唯一还是复合氮源时, 菌株的生长受到明显的抑制, 经过 84 h 的培养后菌株的生物量只能达到 0.5×10^6 cells/mL。氮源为 NH_4Cl 和 NaNO_3 时菌株生物量的变化趋势基本相同。当氮源的浓度超过 0.5 g/L 时, 氮源浓度的增加可能会导致渗透压过高, 反而抑制了菌株的生长, 此时菌株生物量也呈现较为明显的下降。不同浓度和种类的氮源条件下的单质硫产量与生物量呈现了相似的趋势。与 Buisman 等^[5]和 Tao 等^[14]报道有机氮源会部分抑制硫氧化菌氧化硫化物的结果也是一致的。当 NH_4Cl 的浓度为 0.5 g/L 时单质硫的产量取得最大值 1.0 g/L, 因此确定 0.5 g/L 的 NH_4Cl 为最佳氮源。

2.3 硫酸镁和硫酸亚铁对 *T. tepidarius* JNU-2 生物量及单质硫产量的影响

2.3.1 硫酸镁对生物量及单质硫产量的影响: 由于脱硫体系中硫酸根离子浓度通常较高, 该类微生物对其耐受性普遍较强。同时为避免引入过多其他离子干扰实验, 如氯离子, 故采用 MgSO_4 和 FeSO_4 考察常见金属离子对该类微生物和单质硫产量的影响。结果如图 3A 所示, 没有添加 MgSO_4 时微生物生长情况最差, 经过 84 h 的培养, 生物量仅为 0.5×10^6 cells/mL。随着 MgSO_4 浓度的增加, 微生物的生长状况逐渐转好, 在添加 0.5 g/L 的 MgSO_4 时, 菌株的生物量可以达到 4.8×10^6 cells/mL。但当 MgSO_4 浓度继续增加时, 生物量开始逐渐降低。当添加 1.5 g/L 的 MgSO_4 时, 菌株的生物量仅为 2.3×10^6 cells/mL, 还不足 0.5 g/L 的 MgSO_4 时菌株生物量的 50%。这可能是因为 Mg^{2+} 是 *T. tepidarius* JNU-2 细胞内多种代谢酶系的激活剂, 适量低浓度

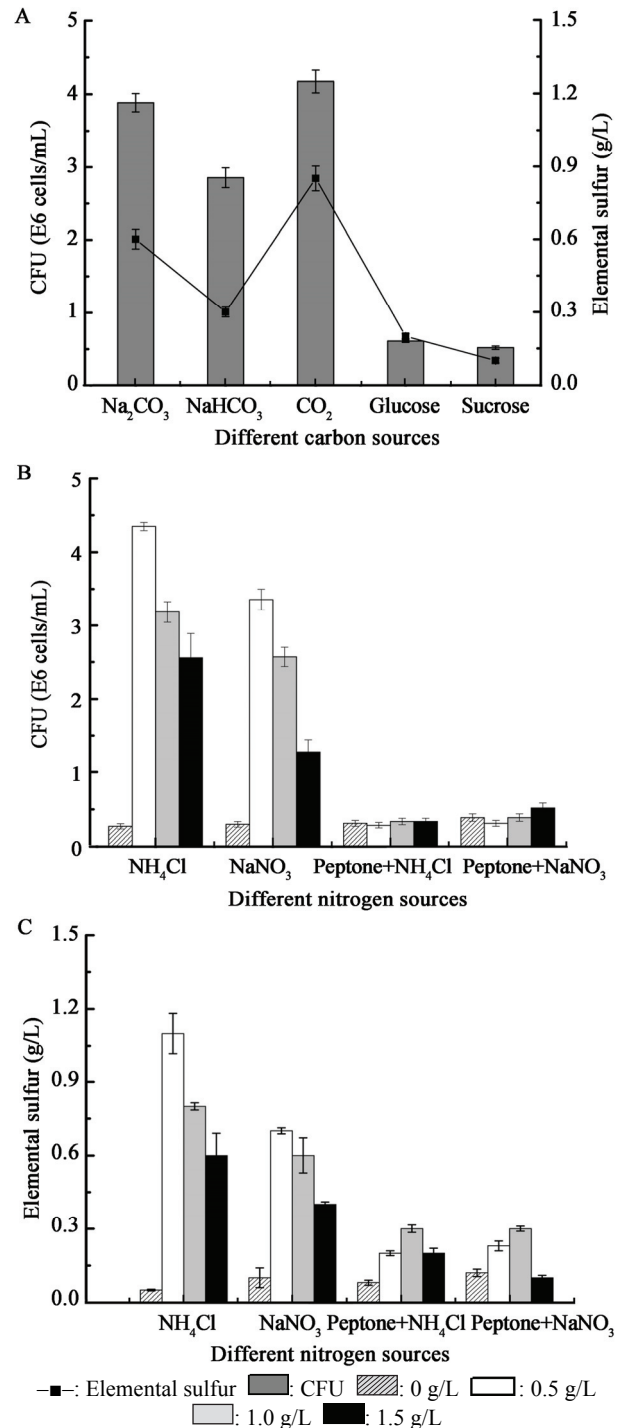


图 2 碳氮源对生物量及单质硫产量的影响

Figure 2 Effects of carbon and nitrogen source on the production of biomass and elemental sulfur

注: A: 碳源种类对生物量和单质硫产量影响; B: 氮源对生物量的影响; C: 氮源对单质硫产量的影响。

Note: A: Effects of carbon sources on biomass and sulfur production; B: Effects of carbon sources on biomass; C: Effects of carbon sources on sulfur production.

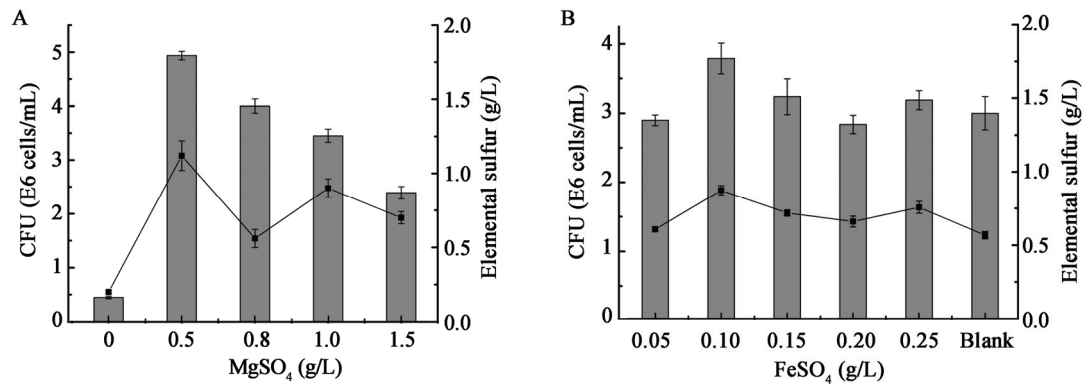


图3 硫酸镁和硫酸亚铁对生物量及单质硫产量的影响

Figure 3 Effect of MgSO₄ and FeSO₄ on the production of biomass and elemental sulfur

Note: A: MgSO₄; B: FeSO₄. —■—: Elemental sulfur; ■: CFU.

镁离子添加有利于激活胞内的酶系, 进而促进了菌株增长。而当 Mg²⁺浓度过高时会抑制细胞内酶活性, 最终导致生物量下降。MgSO₄ 浓度为 0.5 g/L 时, 单质硫产量也达到最大值 0.9 g/L。因此实验采用 0.5 g/L 的 MgSO₄ 为培养基补充 Mg²⁺。Liu 等^[15] 研究发现适当的外加 Mg²⁺、Ca²⁺ 和 K⁺ 等可提升硫氧化菌种去除硫化物的效率, 而 Zn²⁺ 的添加则会部分降低微生物除硫化物的效率。

2.3.2 硫酸亚铁对生物量及单质硫产量的影响: Fe²⁺ 可参与众多的生物代谢过程, 如呼吸作用、光合作用及 DNA 的合成等, 也是微生物生长过程中必不可少的微量元素。有研究表明添加适当浓度的 FeSO₄ 可以提高硫化物脱氢酶的活性^[16]。考察不同浓度的 FeSO₄ 对生物量及单质硫产量的影响, 结果如图 3B 所示。不添加 FeSO₄ 的对照组生物量最小, 而随着 FeSO₄ 浓度的增加菌株的生物量呈先增加后减少的趋势。当添加 0.1 g/L 的 FeSO₄ 时菌株的生物量最高可以达到 3.5×10⁶ cells/mL。FeSO₄ 的添加量过高时(大于 0.1 g/L), 细胞内过量的游离 Fe²⁺ 会与超氧阴离子发生反应, 生成羟基自由基。该基团极强的氧化性自由基会破坏糖、脂和 DNA 等结构, 最终导致生物量下降^[14]。与此同时, FeSO₄ 的添加量可适度的提升单质硫的产量, 但作用并不明显。添加 0.1 g/L 的 FeSO₄ 时单质硫的产量最高, 为 0.87 g/L, 相比于对照组的 0.70 g/L, 提高了约 24%。

与生物量趋势类似, 继续增大其浓度, 单质硫产量反而呈现一定下降, 这与 Liu 等^[17] 添加适量的 Fe²⁺ 提高硫氧化菌活性的研究结果基本一致。因此选择向培养基中添加 0.1 g/L 的 FeSO₄。

2.4 能源底物对 *T. tepidarius* JNU-2 生物量的影响

2.4.1 能源底物种类对生物量的影响: 化能自养型的硫氧化细菌可把低价态的含硫化合物氧化为高价态的含硫化合物, 从中获得自身代谢所需的能量, 能源底物来源的不同会导致其利用效率有所差异^[18]。选择 NaS₂O₃、单质硫、Na₂SO₃、NaSO₄ 和 Na₂S 作为能源底物, 考察能源底物的不同对生物量的影响。结果如图 4A 所示, 当能源底物为 Na₂SO₃ 时, 培养 84 h 后 *T. tepidarius* JNU-2 的生物量即可达到 4.1×10⁶ cells/mL。而以 Na₂S 为能源底物时, 培养 84 h 后菌株的生物量仅为 3.0×10⁶ cells/mL。当以单质硫为能源底物时菌体生长的速度更为缓慢, 最终生物量只能达到 1.0×10⁶ cells/mL。以 NaSO₄ 和 Na₂SO₃ 为能源底物时菌株则基本无法正常生长。因而 *T. tepidarius* JNU-2 可以高效利用 NaS₂O₃, 适度利用 Na₂S, 微弱利用单质硫, 而不能利用 NaSO₄ 和 Na₂SO₃。

2.4.2 底物浓度对生物量及单质硫产量的影响: 能源底物浓度也会对化能自养型的硫氧化菌种 *T. tepidarius* JNU-2 的生物量及单质硫的产量产生决

定性影响。如图 4B 所示, 底物浓度为 15.0 g/L 时的生物量最大, 可以达到 4.8×10^6 cells/mL。当底物浓度较低时, 底物和胞内各种酶的反应类似于米式方程, 反应速率伴随底物浓度的升高而增加, 最终生物量及单质硫的产量也相应增加。当底物浓度过高使得酶活性中心处于饱和状态, 活性位点减少同时构象也会发生变化, 导致酶的活性降低和生理代谢减缓, 最终的生物量及单质硫产量也相应降低^[19]。因此, 过高底物浓度也不利于生物量和单质硫的积累。单质硫的产量与生物量取得了相似的变化趋势。当底物浓度为 15.0 g/L 时, 单质硫的产量最高可达 1.14 g/L。优化前后微生物生长和单质硫产量主要相关参数如表 2 所示。

3 结论

(1) *T. tepidarius* JNU-2 的延滞期为 12 h, 最大比生长速率(μ_{\max})为 0.207 h^{-1} , 40 h 后进入稳定期, 生物量可以达到 4.0×10^6 cells/mL。经过 24 h 后 98% 的硫代硫酸根即可被消耗殆尽, 此时单质硫达到最大值为 0.8 g/L, 随后单质硫的产量开始减少, 最终稳定在 0.2 g/L。

(2) 对 *T. tepidarius* JNU-2 氧化硫化物生成单质硫相关的限制性因素进行单因素实验优化, 确定碳源、氮源、 MgSO_4 、 FeSO_4 和能源底物的最佳条件为: CO_2 、 NH_4Cl 0.5 g/L、 MgSO_4 0.5 g/L、 FeSO_4 0.1 g/L 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 15 g/L。优化后的最高生物量和单质硫产量分别达到 4.8×10^6 cells/mL 和 1.14 g/L。相对于优化前, 单质硫的产量提高了 42.5%。

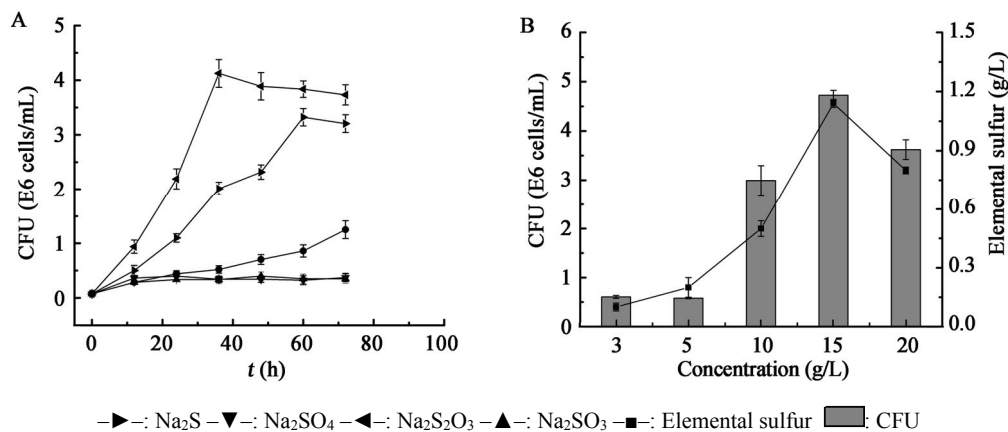


图 4 能源底物种类和浓度对生物量及单质硫产量的影响

Figure 4 Effect of energy substrate and concentration on the production of biomass and elemental sulfur

Note: A: Energy substrates types; B: Concentration of energy substrates.

表 2 优化前后主要培养参数比较

Table 2 The comparison of key parameters between before and after optimization

参数 Parameters	培养时间 Culture time (h)	最大比生长速率 μ_{\max} (h^{-1})	终了菌浓 Final biomass (cells/mL)	硫产量 S^0 Sulfur titer (g/L)	转化率 Converted rate ($\text{g S}^0/\text{cell}$)	生产强度 Productivity ($\text{g S}^0/(\text{cell}\cdot\text{h})$)
Blank	84	0.207	4.0 E6	0.80	2.00×10^{-10}	2.38×10^{-12}
Optimization	84	—	4.8 E6	1.14	2.33×10^{-10}	2.77×10^{-12}

参 考 文 献

- [1] Xi JR, Liu JX, Xu S, et al. Characteristics of *Thiobacillus denitrificans* in desulfuration and its application in hydrogen sulfide removal[J]. Microbiology China, 2014, 41(7): 1402-1409 (in Chinese)
席婧茹, 刘俊新, 徐爽, 等. 脱氮硫杆菌的脱硫特性及其处理恶臭物质硫化氢的应用[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1402-1409
- [2] González-Sánchez A, Revah S. The effect of chemical oxidation on the biological sulfide oxidation by an alkaliphilic sulfoxidizing bacterial consortium[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(2): 292-298
- [3] Hao XD, Dai J, Wei L. Theoretical and technical progresses of biological sulfur removal[J]. Ecology and Environment, 2006, 15(4): 844-853 (in Chinese)
郝晓地, 戴吉, 魏丽. 生物脱硫理论与技术研究进展[J]. 生态环境, 2006 15(4): 844-853
- [4] Mei J, Tao XX, Liu JY. Study of culture conditions of desulfurizing bacteria and desulphurization[J]. Metal Mine, 2007, 37(11): 106-110 (in Chinese)
梅健, 陶秀祥, 刘金艳. 脱硫菌培养条件及脱硫研究[J]. 金属矿山, 2007, 37(11): 106-110
- [5] Buisman CJ, Driessen W, Meijer H, et al. Effect of organic substrates on biological sulphide oxidation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 33(4): 459-462
- [6] Lin WC, Chen YP, Tseng CP. Pilot-scale chemical-biological system for efficient H₂S removal from biogas[J]. Bioresource Technology, 2013, 135(10): 283-291
- [7] Ravichandra P, Gopal M, Annapurna J. Biological sulfide oxidation using autotrophic *Thiobacillus* sp.: evaluation of different immobilization methods and bioreactors[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(4): 1280-1291
- [8] Henshaw PF, Zhu W. Biological conversion of hydrogen sulphide to elemental sulphur in a fixed-film continuous flow photo-reactor[J]. Water Research, 2001, 35(15): 3605-3610
- [9] Liao B, Ji GD, Cheng LQ. Profiling of microbial communities in a bioreactor for treating hydrocarbon-sulfide-containing wastewater[J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(8): 897-899
- [10] Namgung HK, Ahn HY, Song JH. Development of a two-phase bioreactor for the biological removal of hydrogen sulfide from biogas[J]. Energy Procedia, 2012, 14: 1143-1148
- [11] Han JZ, Fu TF, Wang Y. Study on treatment of sulphide wastewater using colourless sulfur bacteria[J]. Environmental Science and Technology, 2010, 23(5): 4-7 (in Chinese)
韩金枝, 付腾飞, 王燕. 无色硫细菌处理含硫废水的试验研究[J]. 环境科技, 2010, 23(5): 4-7
- [12] Kim H, Kim YJ, Chung JS, et al. Long-term operation of a biofilter for simultaneous removal of H₂S and NH₃[J]. Journal of the Air & Waste Management Association, 2002, 52(12): 1389-1398
- [13] Wang A, Liu C, Han H, et al. Modeling denitrifying sulfide removal process using artificial neural networks[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 168(2/3): 1274-1279
- [14] Tao F, Yu B, Xu P, et al. Biodesulfurization in biphasic systems containing organic solvents[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7): 4604-4609
- [15] Liu HL, Chen BY, Lan YW, et al. Biosorption of Zn(II) and Cu(II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*[J]. Chemical Engineering Journal, 2004, 97(2): 195-201
- [16] Kimberley T, Vikrama B, Mehdi N. Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 44(1): 73-94
- [17] Liu WG, Liang CZ, Chen JQ, et al. Effect of operating parameters on sulfide biotransformation to sulfur[J]. Journal of Environmental Sciences, 2013, 25(12): 2417-2421
- [18] Lohwacharin J, Annachhatre AP. Biological sulfide oxidation in an airlift bioreactor[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(7): 2114-2120
- [19] Beristain-Cardoso R, Texier AC, Sierra-Álvarez R, et al. Effect of initial sulfide concentration on sulfide and phenol oxidation under denitrifying conditions[J]. Chemosphere, 2009, 74(2): 200-205