



研究报告

一株嗜盐嗜碱硫氧化菌的筛选、鉴定及硫氧化特性

李向园^{1,2} 杨茂华^{*2} 穆廷桢² 刘金龙¹ 赵国群¹ 邢建民^{*2}

1 河北科技大学生物科学与工程学院 河北 石家庄 050018

2 中国科学院过程工程研究所绿色过程与工程重点实验室 北京 100190

摘要:【背景】沼气和天然气等清洁能源中往往会含有一定量的硫化氢，硫化氢的存在不仅污染环境，而且对人类危害很大。【目的】以硫代硫酸钠为唯一硫源从巴丹吉林沙漠盐碱湖岸边沉积物中分离筛选得到一株硫氧化菌 BDL05，并研究其硫氧化特性。【方法】通过形态观察、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析对硫氧化菌 BDL05 进行鉴定。【结果】菌株 BDL05 为革兰氏阴性菌，弧状，其 16S rRNA 基因序列与 *Thiomicrospira microaerophila* ASL 8-2 的相似性达 99.8%，将其命名为 *Thiomicrospira microaerophila* BDL05。该菌氧化硫代硫酸盐的最适 pH 为 9.3，最适总盐浓度为 0.8 mol/L，在以硫化钠为硫源的气升式反应器中单质硫的生成率为 94.7%，生成速率为 3.0 mmol/(L·h)。【结论】菌株 *Thiomicrospira microaerophila* BDL05 为嗜盐嗜碱硫氧化菌，其耐盐耐碱性较强，比生长速率快，硫化钠氧化能力较强，是一株在气体生物脱硫方面具有应用价值的菌株。

关键词: 生物脱硫，硫氧化菌，嗜盐嗜碱

Screening, identification and sulfide oxidation characteristics of a haloalkaliphilic sulfur oxidizing bacterium

LI Xiang-Yuan^{1,2} YANG Mao-Hua^{*2} MU Ting-Zhen² LIU Jin-Long¹
ZHAO Guo-Qun¹ XING Jian-Min^{*2}

1 College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China

2 Key Laboratory of Green Process and Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: [Background] Biogas and natural gas often contain a certain amount of hydrogen sulfide. Hydrogen sulfide is not only polluting the environment but is also harmful to humans. [Objective] In this study, a sulfur-oxidizing bacterium was screened from sodium alkali lake sediments in the Badain Jaran Desert using sodium thiosulfate as the sole energy source, and its sulfur oxidation properties were studied. [Methods] Strain BDL05 was identified by a variety of methods including Gram staining, colony

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31872633, 21878307, 31800030)

***Corresponding authors:** YANG Mao-Hua: Tel: 86-10-82544980; E-mail: mhyang@ipe.ac.cn
XING Jian-Min: jmxing@ipe.ac.cn

Received: 21-12-2019; **Accepted:** 02-07-2020; **Published online:** 08-07-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31872633, 21878307, 31800030)

***通信作者:** 杨茂华: Tel: 010-82544980; E-mail: mhyang@ipe.ac.cn

邢建民: E-mail: jmxing@ipe.ac.cn

收稿日期: 2019-12-21; **接受日期:** 2020-07-02; **网络首发日期:** 2020-07-08

morpholog, and 16S rRNA gene sequence analysis. **[Results]** Strain BDL05 was a Gram-negative bacterium, helical, belonging to the family of *Ectothiorhodospiraceae* and *Thiomicrospira* genus. The 16S rRNA gene sequence similarity of BDL05 to *Thiomicrospira microaerophila* ASL 8-2 reached 99.8%, so it was named as *Thiomicrospira microscopila* BDL05. The optimum pH for sodium thiosulfate was 9.3, and the optimum total sodium salt concentration was 0.8 mol/L. It had a strong ability to oxidize sodium sulfide. In the airlift reactor using sodium sulfide as the sulfur source, the yield of elemental sulfur was 94.7%, and the production rate was 3.0 mmol/(L·h). **[Conclusion]** This indicated that *Thiomicrospira microaerophila* BDL05 was a sulfur oxidizing bacteria which can be of a strong applicability in gas biological desulfurization.

Keywords: Biological desulfurization, Sulfur oxidizing bacteria, Halophilic alkaliphilic

沼气和天然气属于清洁能源,但这些气体中往往含有一定量的硫化氢。硫化氢的存在会带来诸多问题,如硫化氢在空气中会被氧化为 SO_2 , 遇水易形成酸雨。同时,硫化氢对人体的危害也是不容忽视的,长期暴露于高浓度的硫化氢环境下,会导致人脑干骨髓神经麻痹昏迷甚至死亡^[1-3]。因此,对天然气、沼气等进行脱除硫化氢的处理是必须的。在多种脱硫方法中,生物脱硫具有反应条件温和、脱除效率高、可回收硫磺、无二次污染、成本低等优势,受到越来越多的关注^[4]。在生物脱硫过程中, H_2S 首先被碱性吸收液吸收,形成硫氢化物(HS^-),然后,利用硫氧化菌的代谢作用将 HS^- 氧化为单质硫,再通过沉降作用将单质硫分离出来^[5]。在这一过程中,硫氧化菌起到关键的催化作用。

自然界中的硫氧化菌 (sulfur oxidizing bacteria, SOB) 包含多种营养型,如化能自养型、化能异养型、光能自养型和光能异养型,其中,具有工业应用潜力的大多属于化能自养硫氧化菌。化能自养硫氧化菌,又名无色硫氧化菌,属于革兰氏阴性,能以还原态的含硫化合物作为能源,如硫化氢、硫代硫酸盐、亚硫酸盐、单质硫、有机硫等^[6]。根据最适生长 pH 的差别,SOB 分为嗜酸、嗜中和嗜碱型,在过去的十几年中对于嗜酸型 SOB 研究较多,如嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*),其在金属酸性淋洗中起到重要应用;嗜中性 SOB 在环境中分布更加广泛,通常出现在自来水、海水等生境中,有些种类的生长 pH 可以到 9.0^[7-9]。最常见且研究最多的是硫杆菌属

Thiobacillus sp., 如排硫硫杆菌 (*Thiobacilli thioparus*), 其不仅能脱除 H_2S , 而且可以同时处理甲硫醇、二甲基硫醚等有机硫^[10-11]。在生物脱硫工艺中,目前普遍采用的硫氧化菌为排硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiopatus*) 和脱氮硫杆菌 (*Thiobacillus denitrificans*) 等,它们都属于嗜中性 pH、低盐度耐受菌。

随着对硫化氢脱除效率要求的提高,需要进一步提高吸收液的 pH 和盐度,以便提高气体吸收过程中的 H_2S 吸收容量和去除率,这就要求硫氧化菌具有耐受高盐高碱的特性,因此,相较于中性 pH 的硫氧化菌,嗜盐嗜碱硫氧化菌在生物脱硫应用中更具优势。目前,人们发现的嗜盐嗜碱硫氧化菌都属于着色菌目 (*Chromatiales*), 其中包括硫碱弧菌属 (*Thioalkalivibrio*)、硫碱螺菌属 [*Thioalkalispira*, 原名硫碱微菌属 (*Thioalkalmicrobium*)] 和硫碱杆菌属 (*Thioalkalibacter*)^[12-13]。目前研究多以硫碱弧菌为主,其硫氧化速率可达 0.34 mmol/(L·h), 单质硫生成率可达 93%, 耐受的最大钠盐浓度高达 4.3 mol/L, 最适 pH 为 9.0-10.0, 能将硫化物、单质硫、硫代硫酸盐和多硫化物氧化产生单质硫和硫酸盐^[13]。除此之外,其他属的嗜盐嗜碱硫氧化菌研究较少。

巴丹吉林沙漠是我国第三大沙漠,湖泊众多,其中的部分盐湖是典型的碳酸钠盐湖,盐湖矿化度高达 100 g/L, pH 范围为 8.0-11.0^[14-16] (图 1)。由于其特殊的生存环境,使得碳酸钠盐湖中逐渐形成适应耐盐耐碱的极端微生物群体,是理想的筛选嗜



图1 巴丹吉林沙漠盐湖
Figure 1 Soda Lake in Badain Jaran desert

盐嗜碱硫氧化菌的采样地。本研究从巴丹吉林沙漠盐湖沉积物中筛选得到一株嗜盐嗜碱硫氧化菌,并对其生长特性和硫氧化特性进行了初步研究,以期作为生物脱硫技术提供更加优良的工业菌株。

1 材料与方法

1.1 样品

从巴丹吉林沙漠盐湖岸边0.5 m处采集沉积物样品,用于菌种分离。

1.2 主要试剂、仪器和培养基

Mix 酶、引物,北京美吉桑格生物医药科技有限公司。离子色谱仪, Dionex IonPac™ AS14A 分析柱(4×250 mm), Dionex 公司;冷场发射扫描电子显微镜,电子株式会社(JEOL);PCR 仪, Bio-Rad 公司;光学显微镜, Leica 公司。

基础培养基(g/L): $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 19.8, NaHCO_3 29.0, NH_4Cl 0.3, KNO_3 0.5, K_2HPO_4 2.0, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 微量元素 20.0 μL , 琼脂粉 15.0 (固体培养基), 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。pH 8.5, 总钠盐浓度为 0.5 mol/L。

培养基 S1 (g/L): $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 19.8, NaOH 5.0, NaCl 17.5, NaHCO_3 29.4, NH_4Cl 0.3, KNO_3 0.5, K_2HPO_4 2.0, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 微量元素 20.0 μL 。

培养基 S2 (g/L): Na_2S 3.0, NaOH 5.0, NaCl 21.6, NaHCO_3 29.4, NH_4Cl 0.3, KNO_3 0.5, K_2HPO_4 2.0, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 微量元素 20.0 μL 。

培养基 S3 (g/L): Na_2S 15.0, NaOH 5.0, NaCl 21.6, NaHCO_3 29.4, NH_4Cl 0.3, KNO_3 0.5, K_2HPO_4 2.0, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 微量元素 20.0 μL 。

微量元素(1 L): EDTA 5 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, H_3BO_3 300 mg。

1.3 硫氧化菌的分离与筛选

取 1 g 泥样于 10 mL 的基础培养基中,轻摇均匀,使之充分混合。然后以 3 000 r/min 的转速离心 5 min,取上层液体稀释 500 倍,以 10 μL 的接种量接种于 96 孔板中,于 30 °C 静置培养 3 d。把固体培养基划分为 96 个小格,以牙签沾取 96 孔板中的菌液分别点样在固体培养基的小格中,30 °C 培养 4 d。之后挑固体培养基小格中的菌落分别划线平板培养,30 °C 培养 4 d。待长出单菌落,挑取单菌落进行菌落 PCR,PCR 产物送交北京美吉桑格生物医药科技有限公司进行 16S rRNA 基因序列分析鉴定。通过 NCBI BLAST 鉴定筛选到的菌株,并将其保藏于 4 °C 冰箱中备用。

1.4 菌株形态学观察

取出保存于 4 °C 的菌种在固体基础培养基划线,倒置于 30 °C 培养箱培养 3 d 后,观察菌落形态。细菌革兰氏染色反应参照标准方法进行^[17]。通过扫描电镜观察细菌的细胞形态并测定菌体大小^[18]。

1.5 菌株分子生物学鉴定

对筛选出的菌株进行菌落 PCR 扩增 16S rRNA 基因,引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')^[19]。PCR 反应体系(50 μL): Mix 酶 25 μL , 27F、1492R 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , ddH₂O 21 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 35 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物直接送交北京美吉生物科技股份有限公司进行序

列测定。

将所测定得到的序列去掉两端不准确的碱基后提交到 GenBank, 并利用 NCBI 的 BLAST 软件进行相似性比对。将菌株及近缘菌株的 16S rRNA 基因序列用 MEGA 7.0^[20] 软件构建系统发育树, 采用邻接法(neighbor-joining method), Kimura 双参数模型(Kimura 2-parameter model) 1 000 次自展(bootstrap)来评估所建进化树的准确性^[21]。

1.6 硫氧化特性试验

取出保存于 4 °C 的菌种在固体基础培养基划线, 倒置于 30 °C 培养箱培养 3 d, 长出菌落后, 接种于盛有 100 mL 液体基础培养基的三角瓶中, 于 30 °C、160 r/min 摇床培养 30 h, 进入对数生长期, 作为种子液备用。以 2% 的接种量接种于 100 mL 的液体培养基中, 设 3 个平行, 分别在培养时间为 0、7、15、28、32、36、40 h 时取样, 分别测定 $S_2O_3^{2-}$ 浓度、 SO_4^{2-} 浓度和 OD_{600} 值随时间的变化。

1.7 生长特性

1.7.1 pH 对菌株 BDL05 生长的影响

添加 NaOH 调节基础培养基(碳酸盐缓冲液)的初始 pH 分别至 8.5、8.9、9.1、9.3、9.7, 每组

各分装 100 mL 液体培养基至 250 mL 三角瓶, 以 2% 的接种量接入种子液, 于 30 °C、160 r/min 摇床培养, 每组设 3 个平行。分别在培养时间为 0、7、20、23、27、40、44、47 h 时取样测定 OD_{600} 值。

1.7.2 不同初始总钠盐浓度对菌株 BDL05 生长的影响

添加 NaCl 调节基础培养基的初始总钠盐浓度分别为 0.5、0.8、1.0、1.5、2.0 mol/L, 每组各分装 100 mL 液体培养基至 250 mL 三角瓶, 以 2% 的接种量接入种子液, 于 30 °C、160 r/min 摇床培养, 每组设 3 个平行。分别在培养时间为 0、7、21、25、29、32、45、53、69 h 时取样测定 OD_{600} 值。

1.8 气升式反应器中硫氧化特性试验

反应器示意图如图 2 所示, 其由进出水系统、曝气系统、显示及数据采集系统等组成。

1.8.1 以硫代硫酸钠为硫源培养菌株 BDL05

配制 2.5 L 培养基 S1 添加至反应器中, 在反应器中接种 100 mL BDL05 菌液。打开曝气泵曝气, 曝气量为 0.4 mL/min, 运行 3 d, 期间记录 ORP

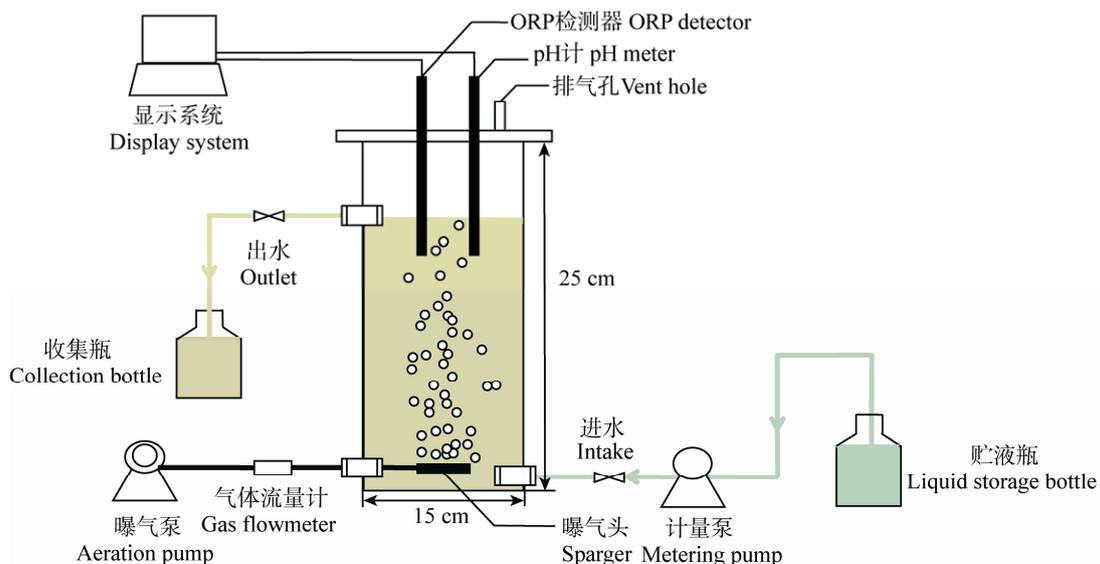


图 2 生物硫氧化反应器示意图

Figure 2 Schematic diagram of biological sulfur oxidation reactor

变化情况, 分别在培养时间为 0、12、22、28、47 h 时取样, 测 SO_4^{2-} 浓度和 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 浓度。

1.8.2 以硫化钠为硫源培养菌株 BDL05

配制 2.5 L 培养基 S2 添加至反应器中, 配制 1 L 培养基 S3 添加至贮液瓶中作为储液。在反应器中接种 100 mL BDL05 菌液, 打开曝气泵曝气, 曝气量为 0.4 mL/min, 待反应器内菌液开始变白, 菌体大量增长, 打开计量泵开始补料, 运行 3 d, 期间记录 ORP 变化情况, 分别在培养时间为 0、9、27、35、57、75 h 时取样, 测 SO_4^{2-} 浓度。

1.9 分析方法

(1) 离子色谱法测定 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 浓度和 SO_4^{2-} 浓度

样品预处理方法: 样品以 10 000 r/min 的转速离心 5 min 后, 取上清液加水稀释 500 倍, 用 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤。样品测定方法参考文献[22]。

色谱条件: 淋洗液: 0.848 g/L Na_2CO_3 , 0.084 g/L NaHCO_3 ; 色谱柱: Dionex IonPacTM AS14A 分析柱 (4×250 mm); 流速 1.00 mL/min; 抑制器: 自动再生抑制模式, 抑制电流 43 mA; 电导检测器检测; 进样量 10 μL , 样品保留时间为 30 min。

(2) 计算公式

1) 在气升式反应器中 BDL05 以硫代硫酸钠为硫源培养, 其硫利用速率的计算公式为:

$$\text{SOR}=(C_0-C_1)/t$$

SOR: 硫利用速率 (mmol/(L·h)); C_0 : 反应初始

$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的浓度 (mmol/L); C_1 : $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 基本消耗完时的浓度 (mmol/L); t : 培养时间 (h)。

2) 在气升式反应器中 BDL05 以硫化钠为硫源培养, 硫生成率的计算公式为:

$$R=1-\frac{\sum_{i=1}^n(V_i C_i/1000)}{\sum_{i=1}^n(5V_i/26)} \times 100\%, V_i=3v_i t_i/50$$

R: 硫生成率 (%); V_i : 补料体积 (L); v_i : 补料速率 (mL/min); t_i : 补料时间 (h); C_i : 不同时间段 SO_4^{2-} 平均浓度 (mmol/L)。

硫生成速率的计算公式为:

$$\text{SGR}=[R \times \sum_{i=1}^n(150v_i t_i/13)] / \sum_{i=1}^n V_i T$$

SGR: 硫生成速率 (mmol/(L·h)); R: 硫生成率 (%); v_i : 补料速率 (mL/min); t_i : 补料时间 (h); V_i : 补料体积 (L); T: BDL05 在气升式反应器中培养时间 (h)。

(3) 菌液浓度采用分光光度计测 OD_{600} 值

样品以 3 000 r/min 的转速离心 1 min, 取上清液至比色皿中, 测 OD_{600} 值。

2 结果与分析

2.1 硫氧化菌的分离及其形态特征

通过分离纯化, 筛选到一株可以利用硫代硫酸盐的菌株, 编号为 BDL05。革兰氏染色结果如图 3A 所示: 菌株呈红色, 为革兰氏阴性菌, 弧状。



图 3 菌株 BDL05 形态特征图

Figure 3 Morphological characterization of strain BDL05

注: A: 单细胞革兰氏染色图; B: 菌株 BDL05 菌落图; C: 单细胞 SEM 图。

Note: A: Gram staining micrograph of BDL05 cells; B: Colony of strain BDL05; C: SEM micrograph of BDL05 cells.

在固体基础培养基上的菌落形态如图 3B 所示: 形状不规则, 边缘参差不齐, 光滑湿润, 易挑取。随着培养时间的延长, 菌落由透明逐渐变白, 培养 3 d 后菌落直径约 2 mm, 呈乳白色, 说明菌株 BDL05 在生长过程中有胞外硫产生。继续培养, 白色逐渐消失, 说明菌株后期会利用自身产生的胞外单质硫。菌株 BDL05 在扫描电镜下观察, 如图 3C 所示, 细胞呈弯杆状, 宽为 0.4–0.6 μm , 长为 0.9–2.0 μm 。

2.2 菌株 16S rRNA 基因序列分析及其系统发育树的构建

菌株 BDL05 的 16S rRNA 基因经过 PCR 扩增和测序, 去掉两端不准确的碱基后, 与 GenBank 中其他菌株的 16S rRNA 基因序列进行相似性比对, 建立系统发育树, 确定其进化地位。结果显示: 菌株 BDL05 与硫微螺菌属(*Thiomicrospira* sp.)中的菌株位于同一组, 而且与菌株 *Thiomicrospira microaerophila* ASL8-2 最相似, 相似性为 99.8%。据文献[23]报道, 菌株 *Thiomicrospira microaerophila* ASL 8-2 为螺旋状, 有鞭毛。选取 GenBank 中相关菌株的 16S rRNA 基因序列进行同源比对, 建立系统发育树, 确定菌株 BDL05 在系统发育树上的地

位(图 4)。结合菌株的形态学特征, 将菌株 BDL05 命名为 *Thiomicrospira microaerophila* BDL05。

菌株 BDL05 所在的硫微螺菌属(*Thiomicrospira*)与硫碱弧菌属(*Thioalkalivibrio*)、硫碱杆菌属(*Thioalkalibacter*)在系统发育树中进化地位关系如图 4 所示, 3 种类型的嗜盐嗜碱硫氧化菌中, 硫微螺菌属(*Thiomicrospira*)与硫碱弧菌属(*Thioalkalivibrio*)和硫碱杆菌属(*Thioalkalibacter*)的进化地位都较远, 硫碱弧菌属(*Thioalkalivibrio*)和硫碱杆菌属(*Thioalkalibacter*)进化地位更为相近。

2.3 生长特性

2.3.1 菌株 BDL05 的生长特征

菌株 BDL05 在摇瓶中培养的生长曲线以及 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 和 SO_4^{2-} 浓度的变化如图 5 所示, 在 30 $^\circ\text{C}$ 、160 r/min 的条件下, 菌株前 7 h 生长较为缓慢。经过延滞期后, 菌株 BDL05 快速生长, 在 32 h 时培养液菌体 OD_{600} 达到 0.6, 之后 OD_{600} 值开始下降。 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 浓度最初为 44 mmol/L, 随着培养时间延长, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 浓度持续下降, 在 32 h 时降至 0.85 mmol/L; SO_4^{2-} 浓度随着培养时间延长逐渐升高, 至 40 h 时 SO_4^{2-} 浓度达到 70.3 mmol/L。硫利用速率为 1.35 mmol/(L·h)。

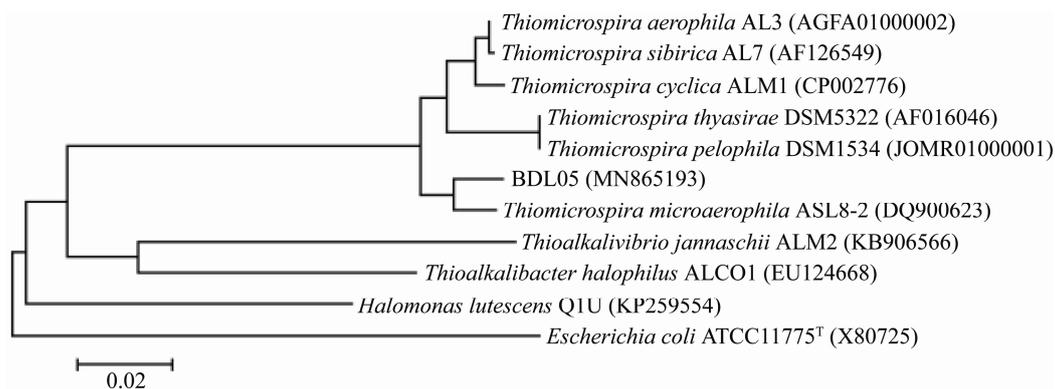


图 4 基于 16S rRNA 基因序列的菌株 BDL05 的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain BDL05 based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 标尺的数据为进化距离。

Note: Numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of the strain; Bar (0.02) represents sequence divergence.

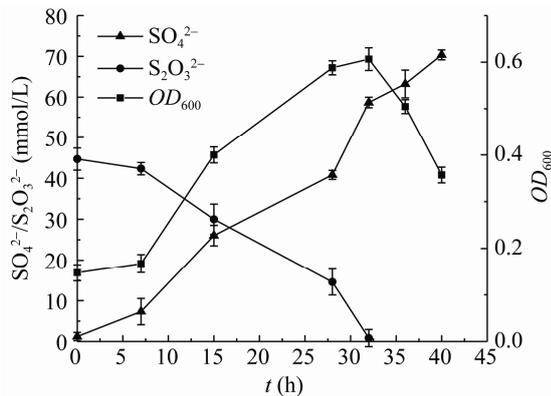


图5 菌株 BDL05 的生长曲线以及 $S_2O_3^{2-}$ 和 SO_4^{2-} 浓度的变化

Figure 5 Growth curve of strain BDL05 and changes of $S_2O_3^{2-}$ and SO_4^{2-} concentrations

2.3.2 pH 对菌株 BDL05 生长的影响

图 6 为不同初始 pH 对菌株 BDL05 生长的影响, 初始 pH 为 8.5–9.7 时, OD_{600} 值都有明显增长, 说明其对 pH 的耐受范围较宽。pH 为 8.5–9.3 时, 前 7 h OD_{600} 值增长缓慢, 之后 OD_{600} 值快速增长, 20–30 h 内 OD_{600} 值陆续达到最高值, OD_{600} 值大小依次为 0.5、0.42、0.54、0.67, 之后 OD_{600} 值迅速下降。初始 pH 为 9.7 时延滞期最长, 20 h 后 OD_{600} 值开始快速增长, 至 40 h 时最大值为 0.57, 随后 OD_{600} 值迅速下降。因此, 菌株 BDL05 的最适 pH 为 9.3。

图 6 中 OD_{600} 值到达最高值之后迅速下降, 原因可能是样品离心处理时转速较低, 部分硫颗粒没有与菌体完全分离, 测得 OD_{600} 值偏大, 而 20 h 之后菌株开始利用硫颗粒, 硫颗粒减少, 导致 OD_{600} 值迅速下降。从图 6 可以看出, pH 对菌株 BDL05 利用硫代硫酸盐的影响较明显。初始 pH 值过高时, 菌体对碱性生长环境的适应期较长, 这可能是由于硫氧化菌需要先消耗营养物质来产生酸性物质^[24], 从而抵消碱性环境对生长的影响, 造成延滞期延长; 初始 pH 值过低时, 菌株生长状况不良, 这可能是由于酸性产物使得硫氧化菌生长环境迅速酸化, 菌体不能适应, 过早进入衰亡期^[25]。

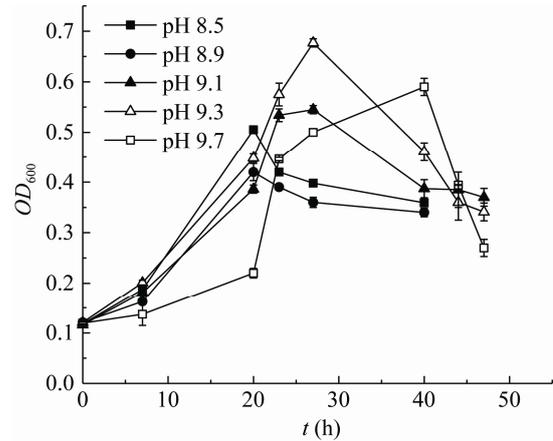


图6 pH 对菌株 BDL05 生长的影响

Figure 6 Effect of initial pH on the strain BDL05 growth

2.3.3 不同初始总钠盐浓度对菌株 BDL05 生长的影响

图 7 为不同初始总钠盐浓度对菌株 BDL05 生长的影响, 初始总钠盐浓度为 0.5–1.5 mol/L 时, OD_{600} 值都有明显增长, 说明其对总钠盐浓度的耐受范围较宽。随着总钠盐浓度增大, 延滞期逐渐延长。当总钠盐浓度为 0.5–1.0 mol/L 时, 7 h 后 OD_{600} 值快速增长, 20–35 h 内 OD_{600} 值陆续达到最高值, OD_{600} 值大小依次为 0.59、0.68、0.6, 之后开始迅速下降。初始总钠盐浓度为 1.5 mol/L 时延滞期长达 25 h, 至 53 h 时 OD_{600} 值最大为 0.49。然而当总钠盐浓度为 2.0 mol/L 时, 菌株 BDL05 基本没有生长。因此, 菌株 BDL05 最适初始总钠盐浓度为 0.8 mol/L。

对于嗜盐嗜碱微生物来说, Na^+ 浓度直接影响着细胞的生存和生理机能。 Na^+ 离子不仅调节细胞内外渗透压平衡, 而且影响碱性酶的活性。初始总钠盐浓度过高, 菌体对高盐生长环境的适应期较长, 原因可能是细胞在高盐环境中生理活性下降, 细胞硫氧化活性较差, 因而延滞期延长。

2.3.4 在气升式反应器中 BDL05 以硫代硫酸钠为硫源的生长和代谢情况

图 8 为以硫代硫酸钠为硫源时, 菌株 BDL05 在反应器中运行的硫代谢和 ORP 变化情况。初始 $S_2O_3^{2-}$ 浓度和 SO_4^{2-} 浓度分别为 44 mmol/L 和

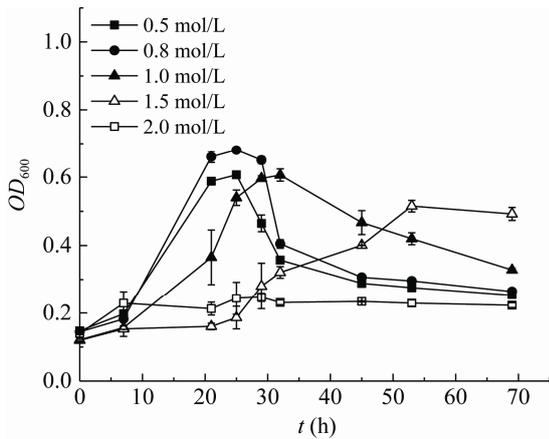


图7 不同初始总钠盐浓度对菌株 BDL05 生长的影响
Figure 7 Effect of initial salt concentrations on the growth of strain BDL05

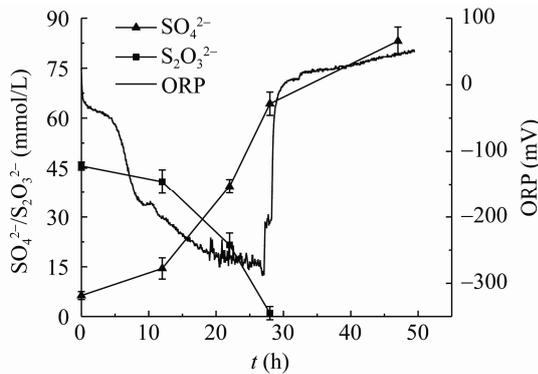


图8 在气升式反应器中以硫代硫酸钠为硫源培养 BDL05
Figure 8 Growth of BDL05 with sodium thiosulfate as sulfur source in airlift reactor

6 mmol/L, 经过 12 h 后, $S_2O_3^{2-}$ 利用速率和 SO_4^{2-} 生成速率迅速升高。随着培养时间延长, 至 28 h 时, $S_2O_3^{2-}$ 浓度下降至 1 mmol/L; 至 45 h 时, SO_4^{2-} 浓度升高至 83 mmol/L。硫利用速率为 1.54 mmol/(L·h), 与菌株 BDL05 在摇瓶培养时硫利用速率(1.35 mmol/(L·h))相比, 在气升式反应器中硫利用速率偏高。

培养过程中, 曝气量保持不变(0.4 mL/min), 反应器中 ORP 初始为 23 mV 左右, 前 19 h 迅速下降, 至 19 h 时下降至 -260 mV 左右并保持稳定, 28 h 后迅速上升。前 19 h 时随着菌株代谢繁殖, 利用氧气和营养物质, 菌液中含氧量下降, ORP

降低至 -260 mV。至 19 h 左右, 菌株进入稳定期, 曝气量、菌株对营养物质及氧气的利用率达到平衡, ORP 保持稳定。28 h 后硫代硫酸钠完全利用, 菌株没有足够的营养物质维持代谢, 菌液中含氧量增加, ORP 迅速上升。

2.3.5 在气升式反应器中 BDL05 以硫化钠为硫源的生长和代谢情况

图 9 为以硫化钠为硫源时, 菌株 BDL05 在反应器中运行的硫代谢和 ORP 变化情况。8 h 之前没有补加 Na_2S , SO_4^{2-} 浓度逐渐上升, 8 h 后随着补料速率的提高, SO_4^{2-} 浓度持续上升, 至 58 h 时达到 18 mmol/L。初始 ORP 为 -300 mV 左右, 随着反应器运行时间的延长, ORP 逐渐下降至 -360 mV 左右; 之后随着 Na_2S 补料速率的增加, ORP 持续下降至 -370 mV 左右; 至补料速率提高至 1.5 mL/min 时, ORP 降至 -420 mV 左右; 停止补料后, ORP 开始上升。反应器中单质硫的生成率为 94.7%, 生成速率为 3.0 mmol/(L·h)。

8 h 左右 ORP 突然上升后又迅速下降, 原因可能是 8 h 之前没有补加硫化钠, 菌株没有充足的营养物质维持代谢, 菌液中含氧量增加, ORP 迅速上升。开始补料后 ORP 迅速下降, 之后随着补料速率的提高, ORP 持续下降, SO_4^{2-} 浓度持续上升。

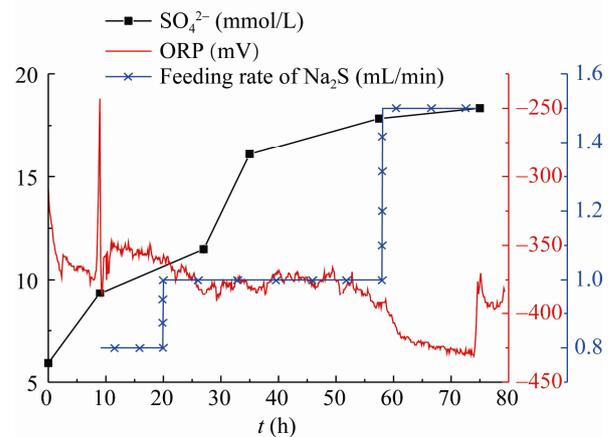


图9 在气升式反应器中以硫化钠为硫源培养 BDL05
Figure 9 Growth of BDL05 with sodium sulfide as sulfur source in airlift reactor

3 讨论与结论

本研究从巴丹吉林沙漠盐湖沉积物中筛选出一株具有较强氧化 Na_2S 能力的菌株 BDL05, 经 16S rRNA 基因序列相似性分析, 结合其形态特征和生理特征, 鉴定该菌为 *Thiomicrospira microaerophila*。

本研究重点对 *Thiomicrospira microaerophila* BDL05 的最适生长条件和硫氧化特性进行了研究。结果表明, 菌株 BDL05 硫氧化最适 pH 为 9.3, 最适盐浓度(Na^+)为 0.8 mol/L, 属于嗜盐嗜碱性硫氧化菌。已报道菌株 *Thioalkalivibrio versutus* D301^[26]和 *Thioalkalivibrio sulfidophilus* HL-EbGr7^[27] 的最适 pH 分别为 8.8 和 9.5, 最适盐浓度分别为 1.0 mol/L 和 0.4 mol/L。菌株 BDL05 的耐碱性与两者相当, 耐盐性与 D301 相当, 但明显高于 HL-EbGr7。BDL05 具有较强的硫氧化能力, 在以硫化钠为硫源的反应器中单质硫的生成率为 94.7%, 生成速率高达 3.0 mmol/(L·h)。已报道菌株 *Thioalkalivibrio halophilus* ALR 14^[28] 的单质硫生成率为 93%, 生成速率为 0.34 mmol/(L·h), 菌株 BDL05 与之相比, 单质硫生成率相当, 生成速率明显较高。

目前应用于生物脱硫领域的菌株多为硫碱弧菌属(*Thioalkalivibrio*)^[26-28], 鲜有关于硫碱螺菌属(*Thiomicrospira*)应用于生物脱硫的报道。目前研究表明, 两者最适 pH 都为 9.0–10.0, 耐碱性相当, *Thiomicrospira* 属硫氧化菌, 具有低(G+C)mol% 含量(48.0%–51.2%)、高生长速率、高 HS^- 和 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 氧化速率^[29], 在高浓度硫化物环境中占主导地位, 是典型机会主义策略的代表。相比而言, *Thioalkalivibrio* 属中大多数细菌生长缓慢, HS^- 和 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的氧化速率较低, 更适合高盐环境。

Sorokin 等^[30]对比了 *Thiomicrospira cyclicum* 和 *Thioalkalivibrio jannaschii* 的生长和硫氧化速率情况, 两者最大比生长速率分别可达 0.33 h^{-1} 和 0.2 h^{-1} , *Thiomicrospira* 属表现出更高的比生长速率和底物氧化速率。高生长速率对于化能自养微生物来说非常重要, 尤其在脱硫反应器启动或恢复的

情况下, *Thiomicrospira* 属较高的比生长速率和底物氧化速率在脱硫过程中可以大大缩短反应器的启动时间, 降低脱硫成本。因此, 菌株 *Thiomicrospira microaerophila* BDL05 在生物脱硫方面具有潜在的应用价值, 可作为脱硫菌株应用。

REFERENCES

- [1] Mu TZ. Metabolic engineering of haloalkaliphilic *Thioalkalivibrio versutus* SOB306 and its application in biodesulfurization[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, 2016 (in Chinese)
穆廷桢. 嗜盐嗜碱多能硫碱弧菌 SOB306 代谢工程及脱硫工艺研究[D]. 北京: 中国科学院过程工程研究所博士学位论文, 2016
- [2] Nam B, Kim H, Choi Y, et al. Neurologic sequela of hydrogen sulfide poisoning[J]. *Industrial Health*, 2004, 42(1): 83-87
- [3] Nishimura S, Yoda M. Removal of hydrogen sulfide from an anaerobic biogas using a bio-scrubber[J]. *Water Science and Technology*, 1997, 36(6/7): 349-356
- [4] Gommers PJF, Buleveld W, Kuenen JG. Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor—I. Start-up and reactor performance[J]. *Water Research*, 1988, 22(9): 1075-1083
- [5] Buisman CJN, Geraats BG, Ijspeert P, et al. Optimization of sulphur production in a biotechnological sulphide-removing reactor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35(1): 50-56
- [6] Luo JF. Microbial community analysis and characterization sulfur-oxidizing bacteria[D]. Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2011 (in Chinese)
罗剑飞. 硫氧化菌群落结构分析及其特性研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2011
- [7] Naegel HJ, Lindner J, Merkle W, et al. Effects of temperature, pH and O_2 on the removal of hydrogen sulfide from biogas by external biological desulfurization in a full scale fixed-bed trickling bioreactor (FBTB)[J]. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2013, 6(1): 69-81
- [8] Roman P, Klok JBM, Sousa JAB, et al. Selection and application of sulfide oxidizing microorganisms able to withstand thiols in gas biodesulfurization systems[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(23): 12808-12815
- [9] Montebello AM, Fernández M, Almenglo F, et al. Simultaneous methylmercaptan and hydrogen sulfide removal in the desulfurization of biogas in aerobic and anoxic biotrickling filters[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 200-202: 237-246
- [10] Zhang L, Hirai M, Shoda M. Removal characteristics of

- dimethyl sulfide by a mixture of *Hyphomicrobium* sp. I55 and *Pseudomonas acidovorans* DMR-11[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, 74(3): 174-178
- [11] Cano PI, Colón J, Ramírez M, et al. Life cycle assessment of different physical-chemical and biological technologies for biogas desulfurization in sewage treatment plants[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 181: 663-674
- [12] 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
- [13] Sorokin DY, Banciu H, Robertson LA, et al. Halophilic and haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria[A]/Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry[M]. Berlin: Springer, 2013: 529-554
- [14] Li Y. Study on microbial diversity of surface sediments from salt lake in Badain Jaran desert[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia University, 2018 (in Chinese)
李悦. 巴丹吉林沙漠盐碱湖沉积物微生物多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2018
- [15] Li L, Hao CB, Wang LH, et al. Microbial diversity of salt lakes in Badain Jaran desert[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(4): 412-424 (in Chinese)
李璐, 郝春博, 王丽华, 等. 巴丹吉林沙漠盐湖微生物多样性[J]. 微生物学报, 2015, 55(4): 412-424
- [16] Song XX. The screening of halophiles and salt-tolerant phenol degrading bacteria in Badain Jaran desert salt lake and characteristics degradation of phenol[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia University, 2016 (in Chinese)
宋晓雪. 巴丹吉林沙漠盐湖嗜(耐)盐苯酚降解菌的筛选及其降解特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2016
- [17] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial Identification System Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 353-356 (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: 353-356
- [18] Liang JN, Liu YW, Xie JY. The improvement of bacteria sample preparation method for scanning electron microscope observation[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2013, 32(3): 276-278 (in Chinese)
梁静南, 刘一苇, 谢家仪. 制备细菌类单细胞生物扫描电镜样品方法的改进[J]. 电子显微学报, 2013, 32(3): 276-278
- [19] Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies[J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7401
- [20] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [21] Xu HX, Jiang LJ, Li SN, et al. Diversity of culturable sulfur-oxidizing bacteria in deep-sea hydrothermal vent environments of the South Atlantic[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(1): 88-100 (in Chinese)
徐铤绣, 姜丽晶, 李少能, 等. 南大西洋深海热液区可培养硫氧化微生物多样性及其硫氧化特性[J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 88-100
- [22] Conboy JJ, Henion JD, Martin MW, et al. Ion chromatography/mass spectrometry for the determination of organic ammonium and sulfate compounds[J]. Analytical Chemistry, 1990, 62(8): 800-807
- [23] Sorokin DY, Foti M, Pinkart HC, et al. Sulfur-oxidizing bacteria in Soap Lake (Washington State), a meromictic, haloalkaline lake with an unprecedented high sulfide content[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(2): 451-455
- [24] Lin DQ, Zhang YK, Gu XY. Isolation, identification and characterization of thiosulfate-oxidizing bacterium TX[J]. Microbiology China, 2009, 36(11): 1638-1644 (in Chinese)
林栋青, 张彦科, 顾向阳. 硫代硫酸盐氧化菌 TX 的分离、鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(11): 1638-1644
- [25] Wang T. The study of sulfide bio-oxidation to sulfur[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2008 (in Chinese)
王庭. 硫化物生物氧化为单质硫的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2008
- [26] Xu XH. Research on removing of H₂S from haloalkaline wastewater by magnetic nanoparticles immobilized *Thioalkalivibrio versutus*[D]. Beijing: Master's Thesis of Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, 2015 (in Chinese)
许晓卉. 磁性纳米颗粒固定化多能硫碱弧菌从高盐高碱溶液中脱除 H₂S 的研究[D]. 北京: 中国科学院过程工程研究所硕士学位论文, 2015
- [27] Muyzer G, Sorokin DY, Mavromatis K, et al. Complete genome sequence of "*Thioalkalivibrio sulfidophilus*" HL-EbGr7[J]. Standards in Genomic Sciences, 2011, 4(1): 23-35
- [28] Sorokin DY, van den Bosch PLF, Abbas B, et al. Microbiological analysis of the population of extremely haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria dominating in lab-scale sulfide-removing bioreactors[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(6): 965-975
- [29] Sorokin DY, Kuenen JG. Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(4): 685-702
- [30] Sorokin DY, Gorlenko VM, Tourova TP. *Thioalkalimicrobium cyclicum* sp. nov. and *Thioalkalivibrio jannaschii* sp. nov., novel species of haloalkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from hypersaline alkaline Mono Lake (California)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(3): 913-920