



## 研究报告

## 表面活性剂对嗜盐嗜碱硫碱弧菌 D301 生成及利用硫颗粒的影响

刘志霞<sup>1,2</sup> 杨茂华<sup>\*2</sup> 穆廷桢<sup>2</sup> 刘金龙<sup>1</sup> 邢建民<sup>\*2</sup>

1 河北科技大学生物与工程学院 河北 石家庄 050018

2 中国科学院过程工程研究所 中国科学院绿色过程与工程重点实验室 北京 100190

**摘要:**【背景】微生物脱硫是脱除气体中硫化氢的一种有效方法,其中,硫颗粒的生成与代谢是控制生物脱硫效率的关键,但目前相应的控制方法很少。【目的】研究不同种类表面活性剂对硫碱弧菌 D301 生成及利用硫颗粒的影响。【方法】通过摇床培养,利用 X 射线衍射、冷场发射扫描电镜、能谱分析及傅里叶红外光谱对硫颗粒进行表征。【结果】单质硫主要以 S<sub>8</sub> 形式存在,吐温-80 和十二烷基磺酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)的添加对硫颗粒的形态及生成量影响明显。对照组中生成的硫颗粒呈规则球形,光滑完整,其表面附着蛋白质等生物大分子;加入 0.01 g/L 吐温-80 后,硫颗粒呈长杆状、颗粒增大、利用速率减慢;加入 0.3 g/L 的 SDS 后,硫颗粒呈短棒状、生成量减少、利用速率加快,同时延缓了硫碱弧菌 D301 的衰亡。【结论】添加表面活性剂可以改变硫颗粒形态并且影响其利用,是一种调控硫颗粒生成和代谢的有效手段。

**关键词:** 生物脱硫, 硫碱弧菌, 硫颗粒, 表面活性剂

Effect of surfactants on the formation and metabolism of sulfur particles by *Thiobacillus thiooxidans* D301LIU Zhixia<sup>1,2</sup> YANG Maohua<sup>\*2</sup> MU Tingzhen<sup>2</sup> LIU Jinlong<sup>1</sup> XING Jianmin<sup>\*2</sup>

1 School of Biology and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China

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

**Abstract:** [Background] Bio-desulfurization is an effective method of removing hydrogen sulfide from industrial gas, biogas, natural gas, etc. In the process of bio-desulfurization, the formation and metabolism of sulfur particles is the key steps that directly affect the efficiency of desulfurization. However, our understanding of the methods of regulating sulfur particles is still insufficient. [Objective] The effects of different surfactants on the formation and metabolism of sulfur particles by *Thiobacillus thiooxidans* D301 were studied. [Methods] *T. thiooxidans* D301 was cultured in erlenmeyer flask, and the sulfur-oxidizing

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31872633, 21878307, 31800030); National Key Research and Development Program of China (2020YFA0906800)

**\*Corresponding authors:** E-mail: YANG Maohua: mhyang@ipe.ac.cn; XING Jianmin: jmxing@ipe.ac.cn

**Received:** 16-03-2020; **Accepted:** 02-07-2020; **Published online:** 11-09-2020

**基金项目:** 国家自然科学基金(31872633, 21878307, 31800030); 国家重点研发计划(2020YFA0906800)

**\*通信作者:** E-mail: 杨茂华: mhyang@ipe.ac.cn; 邢建民: jmxing@ipe.ac.cn

**收稿日期:** 2020-03-16; **接受日期:** 2020-07-02; **网络首发日期:** 2020-09-11

bacteria and sulfur particles were characterized by X-ray diffraction (XRD), cold field emission scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive system (EDS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). **[Results]** The elemental sulfur in sulfur particle mainly exists in the form of  $S_8$ . The addition of Tween-80 or SDS has a significantly effect on the morphology and production of sulfur particles. In the control experiment, the sulfur particles generated were regular spherical, smooth and intact, and biological macromolecules such as proteins cover to the surface of the sulfur particles. When 0.01 g/L Tween-80 is added, long rod-shaped and larger-sized sulfur particles are formed and the metabolic rate of elemental sulfur slows down. When 0.3 g/L SDS is added, the sulfur particles are in the form of short rods. Less sulfur particles are formed, and they are rapidly metabolized by *T. versutus* D301. **[Conclusion]** Regulating the morphology and metabolic rate of sulfur particles can be achieved by adding specific surfactants during bacterial cultivation.

**Keywords:** biological desulfurization, *Thiocalvivibrio versutus*, sulfur particles, surfactant

硫化氢( $H_2S$ )是一种可溶于水的有毒有害气体,以毒性、腐蚀性和气味难闻著称,不但会引起人的神经中毒,而且能与大气层的臭氧反应生成硫酸,形成酸雨<sup>[1]</sup>。我国规定工作场地的环境中最大允许  $H_2S$  浓度为 10 mg/L (GB-Z2-2002)<sup>[2]</sup>。因此,含  $H_2S$  的废气排放或利用之前必须进行有效的脱硫处理<sup>[3]</sup>。与物理化学方法相比,微生物脱硫法可以高效地将  $H_2S$  转化为单质硫,同时具有硫化物去除效率高、投资少、成本低、无二次污染等优点而被广泛使用<sup>[4-5]</sup>。

在生物脱硫过程中<sup>[6]</sup>,硫化物首先失去 2 个电子被氧化为单质硫,形成的单质硫通过沉降作用实现硫的分离,同时单质硫也可被微生物进一步氧化为亚硫酸、硫酸。作为生物脱硫的中间产物,硫颗粒本身的粒径一般在 0.1–10.0  $\mu m$  之间,是由一个硫核心结构和外层包裹如蛋白质一样的有机聚合物构成,该结构使其具有空间和电稳定性<sup>[7-9]</sup>。同时,硫颗粒的产率是影响脱硫效率的关键,如果大量的硫颗粒被氧化菌继续氧化会导致脱硫效率下降。目前,人们已经通过筛选优良菌种、调控  $S^{2-}/O$  比、优化培养条件等方式研究了硫颗粒生成和利用的影响因素,以达到调控硫颗粒形成和利用的目的。许吉现等<sup>[10]</sup>的研究发现,当脱硫菌实际消耗的  $O_2$  与  $S^{2-}$  物质的量之比为 0.83 时,硫化物向单质硫的转化率可达 75.54%,这极大地降低了硫酸盐的生成。而且,溶液内盐的浓

度越高越有利于硫的聚集<sup>[11]</sup>,促进更好地絮凝分离。有研究发现,当硫氧化菌利用硫颗粒时会分泌一些有机物对硫颗粒进行修饰,使其亲水性增强,增加颗粒在液体中的分散性<sup>[12-13]</sup>,促进对硫颗粒的利用速率。

表面活性剂一般为具有亲水与疏水基团的有机两性分子,可形成特定的胶束与无机物质产生静电吸引、氢键及配位等相互作用力<sup>[14]</sup>,从而改善物质的界面状态和界面能,甚至影响某些应用方面的性能<sup>[15]</sup>。一般情况下,表面活性剂可分为离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂。曾颖峰等<sup>[16]</sup>的研究表明,十二烷基苯磺酸钠(Sodium Dodecylbenzenesulphonate, SDBS)、聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)、十六烷基三甲基氯化铵(Hexadecyltrimethylammonium Chloride, CTAC)这 3 种表面活性剂均可降低  $MoS_2$  颗粒间的团聚程度,有利于  $MoS_2$  纳米颗粒的生成,其中 CTAC 的改性效果最好。姜成英等<sup>[17]</sup>发现,不同的表面活性剂对微生物脱除柴油中有机硫的影响不同,同一条件下,添加吐温-80 的样品脱硫率高于加入 Span80 和 TrintonX-100 的脱硫率。王怡等<sup>[18]</sup>发现,添加十二烷基磺酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)可促进剩余污泥水解释放溶解性碳、氮、磷,但导致总硫绝对量增加。崔晶晶等<sup>[19]</sup>的研究表明,经过十六烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl Trimethyl Ammonium

Bromide, CTAB)、十二烷基三甲基溴化铵(N,N,N-Trimethyl-1-Dodecanaminium Bromide, DTAB)这3种季胺类表面活性剂改性后,高岭土纳米管的吸附脱硫能力有所增强。有研究表明<sup>[20-21]</sup>,当以硫粉为硫源时,加入吐温类表面活性剂可提高硫粉表面亲水性,促进硫杆菌与硫粉附着,有利于细菌生长。然而,如果表面活性剂过量,会使溶液表面张力低于最适范围,导致细菌的浓度降低,因此需要确定表面活性剂的最佳加入量。

气体生物脱硫过程涉及固、液、气三相,硫颗粒作为该过程的中间产物起着重要作用,所以调控硫颗粒生成和利用的过程是关键。同时,嗜盐嗜碱硫氧化菌作为嗜盐嗜碱菌中重要的功能性类群,具有很好的脱硫活性,可以氧化低价还原态的硫化合物形成单质硫以及 $\text{SO}_4^{2-}$ 。其中,化能自养型嗜盐嗜碱硫弧菌(*Thi alkalivibrio*)<sup>[22]</sup>已经被用于脱除气体中的硫化氢<sup>[23]</sup>,并且取得了很好的效果。因此,本文以课题组从内蒙古盐湖泥样中分离得到的一株嗜盐嗜碱硫弧菌(*Thi alkalivibrio versutus*) D301<sup>[24]</sup>为研究对象,探讨不同表面活性剂对培养过程中硫颗粒的生成及利用的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

所用菌株是从内蒙古盐湖的泥样中分离得到一株 *T. versutus* D301<sup>[24]</sup>,为革兰氏阴性细菌,细菌大都单个存在,成棒状或弧状,宽0.2–0.4  $\mu\text{m}$ ,长0.5–2.5  $\mu\text{m}$ 。

### 1.2 主要试剂和仪器及培养基

十二烷基磺酸钠(SDS)、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、吐温-80,河北百灵威超精细材料有限公司;蛋白牛血清白蛋白(Albumin Bovine, BSA),西陇化工股份有限公司。

超净工作台,北京亚太科隆实验科技开发中心;恒温培养箱,黄石医疗器械厂;全温摇床,太仓市实验设备厂;台式高速冷冻离心机,上海力申科学仪器有限公司;电子天平,梅特勒-托利

多仪器(上海)有限公司;离子色谱, Dionex 公司;可见分光光度计,日本株式会社日立(HITACHI)制作所;X射线衍射仪,日本理学株式会社北京公司;冷场发射扫描电镜, Carl Zeiss Jena 公司;傅立叶红外光谱仪, Thermo Scientific 公司。

TD 液体培养基(g/L):  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  19.820,  $\text{NaHCO}_3$  58.800,  $\text{NaOH}$  5.000,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.268,  $\text{KNO}_3$  0.505,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.000,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.100。

配制的微量元素液(mg/L): EDTA 5.000,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.000,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100.000,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  30.000,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  200.000,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20.000,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  30.000,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10.000,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  300.000。使用量2 mL/L,微量元素过滤后加入, pH 为9.5。

TD 固体培养基(TDS): 只需在 TD 液体培养基中加入1.5%的琼脂粉,摇匀灭菌,倒平板即可获得。上述培养基在  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌20 min。

### 1.3 方法

以硫代硫酸钠代替硫化氢为硫源进行培养。因为硫代硫酸钠分子中含有一个-2价硫原子,与剧毒的硫化氢培养结果类似,因此目前大多硫氧化菌实验室研究均以无毒的硫代硫酸钠为硫源,如 Sharshar 等<sup>[25]</sup>开展 *Thi alkalivibrio versutus* D306 生长驱动的多级诱导表达系统的研究和 Kappler 等<sup>[26]</sup>研究硫代碱性菌环菌型菌株 ALM1 的全基因组序列(DSM 14477T)时都是以硫代硫酸盐为硫源对菌株进行培养的。

#### 1.3.1 表面活性剂对硫颗粒生成和利用的影响

通过2次划线得到单菌落,经摇瓶活化,按5%的接种量接入100 mL TD 培养基中,分别加入不同浓度的吐温-80(终浓度为0.1、0.01、0.001 g/L)、SDS(终浓度为0.1、0.3、0.5 g/L)、BSA(终浓度为0.03、0.02、0.01、0.005 g/L)和 CTAC(终浓度为0.1、0.2、0.4、0.5 g/L),在30 °C、160 r/min 下培养4–5 d,观察培养过程中硫颗粒的形态变化、均一性和分散性等情况。

### 1.3.2 不同浓度的吐温-80 和 SDS 对硫颗粒生成的影响

挑取单菌落活化后, 按 5% 的接种量接入 100 mL TD 培养基中, 分别加入不同量的吐温-80 (至终浓度为 0.1、0.01、0.001 g/L) 和 SDS (至终浓度为 0.1、0.3、0.5 g/L), 以不加表面活性剂为对照, 每组实验设置 3 个平行。在 30 °C、160 r/min 下培养 4–5 d, 定时取样用分光光度计在 600 nm 下进行细菌光密度测定, 然后基于测定值绘制出 D301 的生长曲线; 同时定时取样测定  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  的消耗和  $\text{SO}_4^{2-}$  的生成情况, 再基于测定值绘制出其代谢曲线。

## 1.4 分析方法

### 1.4.1 细菌光密度测定

以 TD 培养液为校准液, 样品经 4 000 r/min 离心 3 min 后取上清, 用可见分光光度计在 600 nm 下测定 OD 值。

### 1.4.2 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 及 $\text{SO}_4^{2-}$ 的测定

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  $\mu\text{m}$  微孔滤膜进行过滤。样品测定方法参考文献[27]。

色谱条件: 淋洗液: 0.848 g/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、0.084 g/L  $\text{NaHCO}_3$ ; 色谱柱: Dionex IonPac<sup>TM</sup> AS14A 分析柱 (4 mm×250 mm); 流速 1.000 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  $\mu\text{L}$ , 样品保留时间为 30 min。

### 1.4.3 XRD 测定

在培养 60 h 后取样 10 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液及沉淀上层的菌液, 收集硫颗粒, 再用超纯水充分洗涤、混匀, 3 000 r/min 低速离心 5 min, 重复 3 次后置于恒温培养箱中干燥成粉末, 然后把样品粉末尽可能均匀地洒入制样框的窗口中, 再用小抹刀的刀口轻轻刮紧, 使粉末在窗孔内摊匀堆好, 然后用小抹刀把粉末轻轻压紧, 最后用保险刀片(或载玻片的断口)把多余凸出的粉末削去, 然后用 Bruker-D8 XRD 的单色  $\text{CuK}\alpha 1$  源对玻片进行了分析。衍射角度为 10–90°, 角度变化速率是 0.05(°)/s, 物相成分根据哈氏无机数

值索引通过对比得到。

### 1.4.4 冷场发射扫描电镜观察

在硫颗粒利用期(60 h)取样, 3 000 r/min 低速离心 5 min 收集硫颗粒, 再用超纯水充分洗涤、低速离心, 重复 3 次, 适当稀释后点到铝箔上, 室温干燥, 用扫描电镜对样品形貌情况进行表征, 通过能谱分析其元素组成。

### 1.4.5 傅里叶红外光谱(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)分析硫颗粒表面特征

以不加表面活性剂为对照, 分别在培养基中加入适量的吐温-80 和 SDS, 按 5% 的接种量接入 300 mL TD 培养基中, 在 30 °C、160 r/min 培养 60 h 后如上述离心收集硫颗粒, 再用超纯水充分洗涤、混匀、低速离心, 重复 3 次后置于恒温培养箱中干燥成粉末, 以 KBr 为背景样, 研磨后测其图谱作为基准, 再取少量样品与 KBr 混匀, 研磨、压片, 置于傅立叶红外光谱仪中扫描和记录 400–2 300  $\text{cm}^{-1}$  波数的红外吸收光谱值。

## 2 结果与分析

### 2.1 表面活性剂对硫颗粒生成的影响

研究首先对比了不同表面活性剂对 *T. versutus* D301 生成硫颗粒的影响(图 1)。摇瓶培养 42 h 后静置观察发现, 对照组、加入 CTAC 或 BSA 的样品组中, 硫颗粒的存在形态和样貌相似, 如图 1A 所示, 其硫颗粒均呈淡黄色, 以分散状沉积于瓶底, 上层溶液较澄清。如图 1B 所示, 加吐温-80 的样品组中, 硫颗粒仍呈淡黄色, 但硫颗粒生成量明显增加, 而且硫颗粒团聚现象明显, 出现絮状沉淀。如图 1C 所示, 加入 SDS 的样品组, 硫颗粒呈白色, 明显与对照组不同, 而且硫颗粒生成量很小, 且硫颗粒被很快利用, 整个培养过程溶液较浑浊。从对硫颗粒生成的影响来看, 不同表面活性剂表现出不同的作用, 这与顾华志等<sup>[28]</sup>的结果一致, 不同类型的表面活性剂对反应过程所起的作用效果完全不同。其中, 吐温-80 和 SDS 的作用更明显, 因此后续实验也将以吐温-80 和 SDS 作为研究对象进行考察。



图1 表面活性剂对硫颗粒形成的影响

Figure 1 Effect of surfactant on sulfur particle formation

注: A: 对照组; B: 吐温-80; C: SDS

Note: A: Control; B: Tween-80; C: SDS

## 2.2 不同浓度吐温-80 和 SDS 对硫颗粒生成及利用的影响

在 *T. versutus* D301 的生长过程中, 首先将硫代硫酸钠氧化为单质硫来获得生长的能量, 单质硫经过聚集-团聚形成硫颗粒, 此阶段细胞大量繁殖; 待硫代硫酸钠耗尽后, 细胞利用生成的单质硫进行第二阶段生长, 将单质硫氧化为硫酸盐, 之后细胞进入衰亡期。由于硫颗粒的分离纯化比较困难, 而且硫颗粒中含有一定量的非硫组分, 因此很难对单质硫进行准确定量。研究将忽略体系中浓度极低的有机硫、聚硫化物等, 仅考虑 3 种最主要的硫元素存在形式: 单质硫、硫代硫酸钠和硫酸钠, 其中, 单质硫生成量根据硫元素守恒原则来计算, 即单质硫(mol/L)=总硫(mol/L)-2 硫代硫酸钠(mol/L)-硫酸钠(mol/L)。

通过摇瓶实验可确定加入表面活性剂吐温-80 和 SDS 后会导致硫颗粒形态发生显著性变化, 为了进一步确定二者对硫源消耗和硫颗粒生成及利用的影响, 通过 *T. versutus* D301 的代谢、硫源的消耗和硫酸盐的生成进行分析。其结果如图 2 所示。

图 2A 显示了不同浓度吐温-80 对 *T. versutus* D301 生长和硫代谢的影响。从  $OD_{600}$  值的变化来看, 在培养的前 32 h, 加入吐温-80 的实验组与对照组相差不大, 42 h 后实验组  $OD_{600}$  值明显低于对照组。从与之相对应的  $S_2O_3^{2-}$  的消耗曲线可以看出, 加入吐温-80 的实验组与对照组相差不大, 培养 32 h 后基本消耗完全, 这说明在 *T. versutus* D301 利用  $S_2O_3^{2-}$  生长的阶段, 吐温-80 的作用不明显, 这与培养前期  $OD_{600}$  值的变化规律相一致。同时, 实验组

中单质硫的生成量高于对照组, 与图 1B 中观察到的硫颗粒沉淀增多这一现象相符, 而且培养后期硫单质氧化产物  $SO_4^{2-}$  的生成量低于对照组, 以上现象均说明了加入吐温-80 可以减缓硫颗粒的利用, 而且从图 1 中可以看出, 不同浓度的吐温-80 对菌及硫颗粒的影响程度不同, 其中加入 0.01 g/L 吐温-80 的实验组与对照组差别最为明显。国内研究者肖鹏飞等<sup>[29]</sup>的研究也曾得到相似的结果, 表明不同浓度的表面活性剂吐温-80 对 *P. acanthocystis* TMIC34875 菌株生长的影响不同。

图 2B 显示了不同浓度 SDS 对 *T. versutus* D301 生长和硫代谢的影响。从生长曲线可以看出, 加入 SDS 对 *T. versutus* D301 的生长影响较大, 实验组中  $OD_{600}$  值呈现一直上升的规律, 而对照组在培养后期  $OD_{600}$  值呈现下降趋势, 说明加入 SDS 后可以减缓 *T. versutus* D301 的衰亡。与吐温-80 对  $S_2O_3^{2-}$  利用的影响类似, 加入 SDS 对  $S_2O_3^{2-}$  的利用速率没有明显影响, 在 32 h 左右对照组和实验组中  $S_2O_3^{2-}$  均已消耗完。从单质硫的生成量来看, 在培养后期, 实验组中生成的硫颗粒几乎全被利用掉, 这与图 1C 中观察到的现象相一致, 王怡等<sup>[18]</sup>的研究也表明添加 SDS 可促进有机硫向溶解硫快速转化, 加速了硫的消耗。因此本文加入 SDS 后应该是促进了单质硫的利用, 这同样也解释了在培养后期  $OD_{600}$  值持续上升的原因。从培养后期单质硫的含量来看, 加入 0.3 g/L SDS 的实验组与对照组差异最大, 所以后续硫颗粒表征中 SDS 的使用量选取 0.3 g/L。

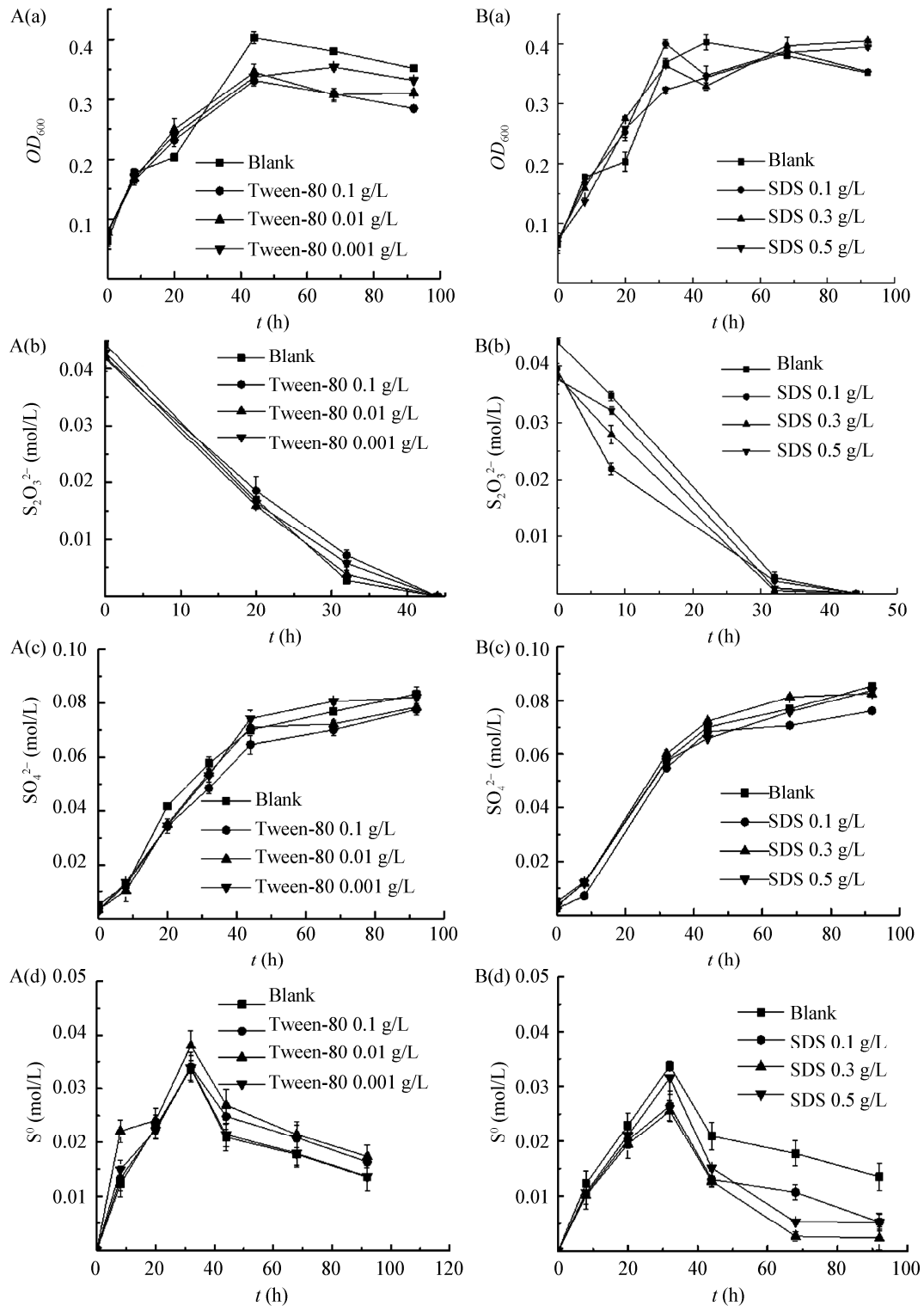


图 2 不同浓度的吐温-80 和 SDS 对菌体生长及硫代谢的影响

Figure 2 The effects of different concentrations of Tween-80 and SDS on bacterial growth and sulfur metabolism

 注: A: 加入吐温-80; B: 加入 SDS。a: 生长曲线; b:  $S_2O_3^{2-}$  的消耗曲线; c:  $SO_4^{2-}$  的生成曲线; d:  $S^0$  代谢曲线

 Note: A: Tween-80; B: SDS. a: Bacterial growth; b: Consumption of thiosulfate; c: Production of sulfate; d: Metabolic of  $S^0$

### 2.3 XRD 表征硫颗粒

为确定培养产物中的主要成分,利用 X 射线衍射仪检测培养 42 h 后生成的硫颗粒特性。经对比,其 XRD 图谱与数据库衍射模式良好匹配。试验结果如图 3 所示,在  $10^{\circ}$ – $90^{\circ}$  的范围内集中了多种物相的特征峰。其中最大峰出现在衍射角度为  $22.94^{\circ}$ – $23^{\circ}$  的位置。该样品成分主要为生物  $S^0$ , 包含  $S$ 、 $S_8$ 、 $S_4$ 、 $S_3$  等,其中  $S_8$  强度最强,说明以硫代硫酸钠为硫源培养的产物是单质硫,并且主要以  $S_8$  形式存在。其中,  $S_8$  是硫的一种同素异形体,属于分子晶体,分子中每个 S 原子与另外 2 个 S 原子形成 S–S 单键。在衍射图中也可以看出,产物的衍射峰相当尖锐,而且最高峰的峰强可达到 7 800,这意味着单质硫的结晶度较高,是比较理想的硫晶体。

### 2.4 冷场发射扫描电镜 (Scanning Electron Microscopy, SEM) 与 能 谱 分 析 (Energy Dispersive System, EDS) 表征硫颗粒形态及组成

通过借助扫描电镜探索表面活性剂(对照组、吐温-80 组、SDS 组)对硫颗粒微观形态的影响,结果如图 4 所示。3 组实验下硫颗粒的微观形态明显不同,图 4A 的对照组中硫颗粒呈规则球形,光滑完整且大小不一,颗粒直径约为  $0.05$ – $10\text{ }\mu\text{m}$ ,推测大的硫颗粒可能是由多个小球聚集而成。加入  $0.01\text{ g/L}$  吐温-80 的样品中,如图 4B 所示,硫颗粒形状发生很大变化,呈现大小不一的长杆状( $1$ – $3$ )  $\mu\text{m}\times$

( $5$ – $25$ )  $\mu\text{m}$ 。如图 4C 所示,当加入  $0.3\text{ g/L}$  SDS 时生成的硫颗粒呈短棒状,约  $1\text{ }\mu\text{m}\times(2$ – $3)\text{ }\mu\text{m}$ ,与对照组相比其均一性、分散度较好。3 种条件下硫颗粒均呈现不同程度的团聚,尤其在对照组中硫颗粒团聚得更加紧密。由此可见,表面活性剂的添加极大地改变了硫颗粒形态和团聚程度,并通过此特性进而影响其利用速率。

对硫颗粒微观区域进行能谱分析(EDS)确定元素种类及相对含量。由于样品粘贴在铝箔纸上以及样品处理时需要喷金处理,导致铝、铂等元素含量高,除此之外,样品中还含有少量铁、铜、锌、钾等培养基残留成分,结果如图 4 所示。从对照组中硫颗粒表面元素来看,除含有 4.8% 硫元素外,还含有碳(12.6%)、氧(5.9%)、氮(0.9%),表明反应生成的硫颗粒表面附着了大量的有机大分子物质。其中氮元素的存在说明其中存在一定量的蛋白质。由于蛋白质中碳氮比一般为(3.5–2.5):1,而对照组中碳氮比远大于此比例,表明硫颗粒表层的大分子中可能还有多糖、脂类等不含氮元素的物质存在。添加吐温-80 后,硫元素(10%)占比显著增加,比对照组增加一倍,同时氮元素(0.1%)明显减少,表明硫颗粒表面附着的物质发生改变,推测硫元素占比上升可能是由于未包覆有机物的纳米级硫颗粒吸附量增加所致。该变化促进了硫颗粒之间的吸附与聚集,导致硫颗粒体积增大、比表面积减小,影响了其与硫氧化菌的接触。加入 SDS 后,与对照组相比,硫颗粒表面的氮(0.4%)、氧元素(1.9%)占比下降,尤其是氧元素下降明显,说明经 SDS 作用后生成的硫颗粒表面物质也发生变化,可能是由于硫颗粒表层吸附的无机硫分子(如硫酸盐等)减少造成的。

### 2.5 傅里叶红外光谱分析

FTIR 分析硫颗粒表面物质组成特性的结果如图 5 所示,其谱带通过比较以往文献确定<sup>[30–32]</sup>。斜方晶硫( $S_8$ )的特征峰出现在  $845\text{ cm}^{-1}$  附近的锐区,该形态是单质硫( $S^0$ )最稳定的存在形式,这也与文献[33]报道相一致。对照组中硫颗粒的表

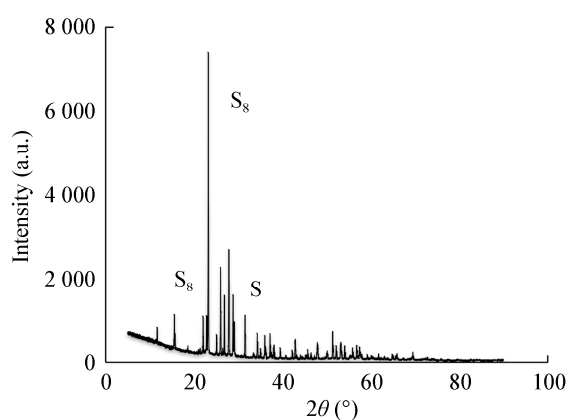


图 3 硫颗粒的 XRD 图谱

Figure 3 XRD pattern of sulfur particles



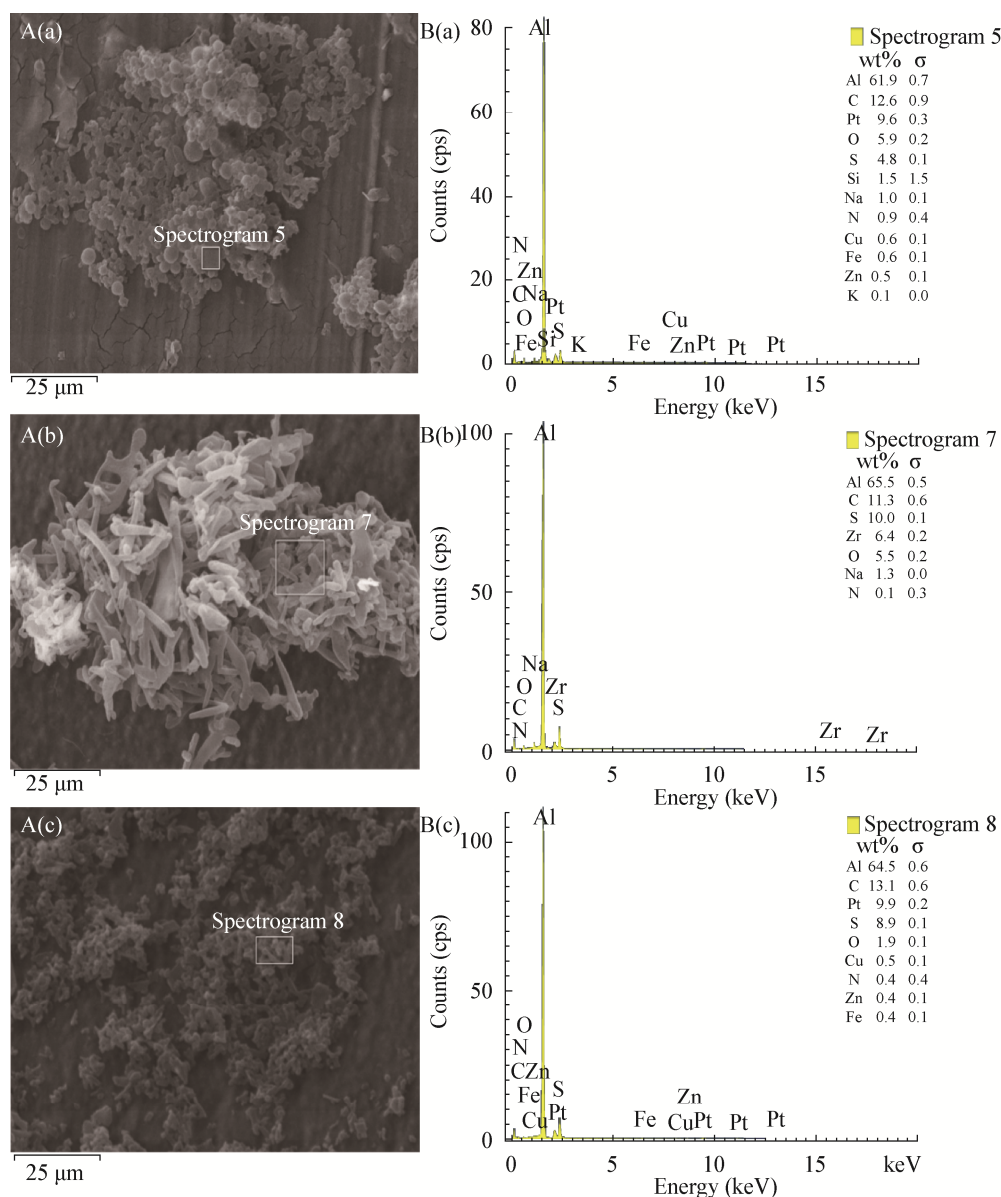


图4 硫颗粒的微观区域元素分布(EDS)

Figure 4 Elemental distribution on the surface of sulfur particles (EDS)

注: A: 冷场发射扫描电镜图; B: 能谱分析图。a: 对照组; b: 0.01 g/L 吐温-80; c: 0.3 g/L SDS

Note: A: Field emission scanning electron microscopy (SEM); B: Energy dispersive system (EDS) analysis diagram. a: Control; b: 0.01 g/L Tween-80; c: 0.3 g/L SDS

观吸收区在  $2\ 000\text{--}1\ 200\text{ cm}^{-1}$  之间, 这可能是培养过程中附着于硫颗粒表面的物质成分。在  $1\ 650\text{--}1\ 890\text{ cm}^{-1}$  和  $1\ 502\text{--}1\ 675\text{ cm}^{-1}$  附近的锐区分别是由  $\text{--C=O}$  拉伸和  $\text{--NH}_2$  弯曲振动造成的, 这 2 个锐区表明存在蛋白酰胺基团( $\text{--CONH--}$ )。在  $1\ 450\text{ cm}^{-1}$  附近的条带可能是  $\text{--CH}_3$  和  $\text{--CH}_2$  基团的弯曲振动, 它们可能包含在多糖和脂质中。 $650\text{ cm}^{-1}$  的波段代

表  $\text{--NH}$  的变形振动, 如图 5B 所示, 加入吐温-80 后,  $1\ 275$ 、 $1\ 008$  和  $1\ 107\text{ cm}^{-1}$  出现锐度波段, 分别代表  $\text{--C=O}$  组和  $\text{--S=O}$  组的伸缩振动, 即出现了一些新官能团, 说明可能纳米硫颗粒裸露在外且与其表面物质结合; 而图 5C 中  $800\text{--}1\ 200\text{ cm}^{-1}$  并无任何特征峰, 与对照组相比, 部分  $\text{--C=O}$ 、 $\text{--C=C}$ 、 $\text{--C=N}$  键消失, 即硫颗粒表面覆盖的多



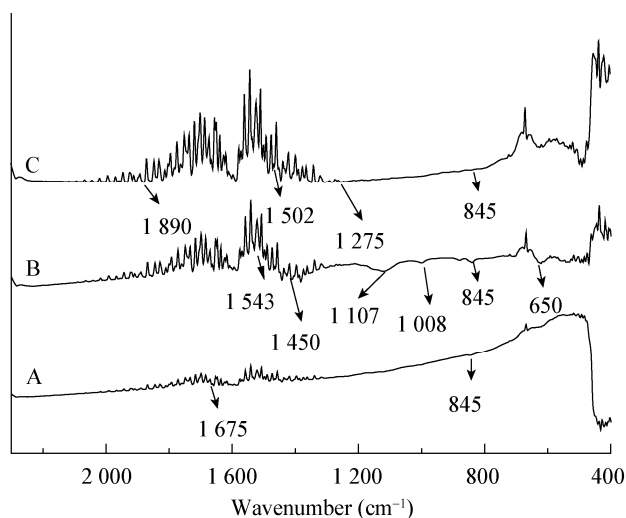


图5 傅里叶红外光谱表征硫颗粒表面基团

Figure 5 Characterization of surface groups of sulfur particles by Fourier transform infrared spectroscopy

注: A: 对照组; B: 0.01 g/L 吐温-80; C: 0.3 g/L SDS

Note: A: Control; B: 0.01 g/L Tween-80; C: 0.3 g/L SDS

糖或脂质成分变化,与能谱分析结果一致,可能是 SDS 与硫颗粒表面物质发生反应。总之,加入表面活性剂后生成的硫颗粒表面成分形态及比例发生改变。

### 3 讨论

研究表明<sup>[9]</sup>,粒径 3 mm 左右生物硫颗粒是由 1 μm 左右的小颗粒聚合而成。生物硫颗粒外膜由蛋白和多糖等物质组成,此种外膜使生物硫颗粒表面呈现亲水性,生物可利用性增强<sup>[34]</sup>。本文通过 XRD 分析(图 3)和扫描电镜分析硫颗粒(图 4)以及傅里叶红外光谱(图 5),得到一致的结论,而且证明 *T. versutus* D301 所产生硫颗粒中的硫元素主要以 S<sub>8</sub> 形式存在<sup>[35]</sup>。

在生物脱硫过程中,控制硫颗粒的生成和利用是调控整个脱硫过程的关键。因此,本研究通过添加不同类型的表面活性剂来探究其对 *T. versutus* D301 的生长以及硫颗粒的影响。经过摇瓶培养后发现,生成的硫颗粒量、形态和分散性出现了显著差异(图 1),这说明加入适当浓度的表面活性剂是改变硫颗粒产生的有效途径。

根据 *T. versutus* D301 的生长代谢和硫颗粒产量的变化情况,添加吐温-80 (0.01 g/L)不仅减缓了 *T. versutus* D301 的生长,而且硫颗粒产量明显增多(图 2A),这可能是因为适当浓度的吐温-80 能有效地改变硫颗粒表面成分,进而影响细菌与硫颗粒之间的接触。研究表明<sup>[36]</sup>,菌与硫颗粒的接触正是硫颗粒利用过程中必不可少的步骤。细菌细胞外聚合物 (EPS)是一类两亲性物质,其可以介导细胞与疏水性表面的接触,在嗜酸硫氧化菌与化学硫磺颗粒吸附过程中起到至关重要的作用。通过扫描电镜观察和能谱分析(图 4),我们认为吐温-80 可能与细菌细胞的分泌物(EPS)结合,在一定程度上减弱了硫颗粒表面的亲水性,从而导致多个疏水性的硫颗粒团聚紧密而暴露在外,最终使硫颗粒的利用率降低。然而阴离子表面活性剂 SDS 极易与阳离子型胞外聚合物反应,使阴离子型胞外聚合物牢牢附着于硫颗粒表面,提高了硫颗粒的亲水性并加快其消耗,同时促进了 *T. versutus* D301 的生长(图 2B)。FTIR 光谱分析(图 5)硫颗粒表面基团 (-OH、-NH、-NH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>、-CH<sub>3</sub>、-C=O、-C-O、-C-C、-C=N、-CONH- 等)发现,表面活性剂的应用导致的部分基团发生改变,或增加或减少,应该也是其与硫颗粒表面物质相互作用的结果。

目前,研究者虽然对生物脱硫中硫氧化过程的生化机理还没有全面的认识,但在本研究中,表面活性剂吐温-80 和 SDS 已被证实对细胞黏附和硫活化过程具有重要作用。进一步的研究不仅有助于建立更有效的生物脱硫体系,而且有助于对硫氧化过程调控的认识。

### 4 结论

通过对比阴离子型(SDS)、非离子型(吐温-80)、阳离子型表面活性剂(CTAC)和蛋白质(BSA),结果发现吐温-80 和 SDS 对硫颗粒的生成和利用影响明显。对照组中生成的硫颗粒呈规则球形,光滑完整,其表面附着蛋白质等生物大分子;加入 0.01 g/L 吐

温-80 后, 硫颗粒呈长杆状, 颗粒体积增大, 聚集性强, 比表面积减小, 影响了硫颗粒与硫氧化菌之间的接触, 硫颗粒利用速率减慢; 加入 0.3 g/L 的 SDS 后硫颗粒呈短棒状, 生成量减少, 促进硫颗粒利用, 同时延缓了硫碱弧菌 D301 的衰亡。所以, 表面活性剂的添加可改变硫颗粒的形态及作用特性。

## REFERENCES

- [1] Van Den Bosch PL, Van Beusekom OC, Buisman CJN, Janssen AJH. Sulfide oxidation at halo-alkaline conditions in a fed-batch bioreactor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(5): 1053-1063
- [2] National Environmental Protection Agency. Determination of Water Quality Sulfides - Methylene Blue Spectrophotometric Method[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1996 (in Chinese)  
国家环境保护局. 水质硫化物的测定亚甲基蓝分光光度法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1996
- [3] Zhang KQ. Study on electrocoagulation and biological treatment of wastewater containing sulfide ( $H_2S$ ,  $S^{2-}$ ,  $HS^-$ )[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2004 (in Chinese)  
张克强. 含硫化物( $H_2S$ ,  $S^{2-}$ ,  $HS^-$ )废水电凝聚与生物处理的技术研究[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2004
- [4] Chi YZ, Li YX. Progress in harm and treatment of sulfide[J]. *Journal of Tianjin Institute of Urban Construction*, 2001, 7(2): 105-108 (in Chinese)  
池勇志, 李亚新. 硫化物的危害与治理进展[J]. *天津城市建设学院学报*, 2001, 7(2): 105-108
- [5] Tu Y. Application of biodesulfurization technology in natural gas purification[J]. *Chemical Engineering of Oil & Gas*, 2003, 32(2): 97-99 (in Chinese)  
涂彦. 微生物脱硫技术在天然气净化中的应用[J]. *石油与天然气化工*, 2003, 32(2): 97-99
- [6] Deng LW, Tang Y, Wu Y. Mechanism of biological desulfurization and its progress[J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 1998, 17(5): 35-39 (in Chinese)  
邓良伟, 唐一, 吴彦. 生物脱硫机理及其研究进展[J]. *上海环境科学*, 1998, 17(5): 35-39
- [7] He H, Xia JL, Peng AA, Zhang CG, Qiu GZ. Research progress of sulfur chemical speciation impacted by acidophilic sulfur-oxidizing bacteria[J]. *The Chinese Journal of Nonferrous Metals*, 2008, 18(6): 1143-1151 (in Chinese)  
何环, 夏金兰, 彭安安, 张成桂, 邱冠周. 嗜酸硫氧化细菌作用下元素硫化学形态的研究进展[J]. *中国有色金属学报*, 2008, 18(6): 1143-1151
- [8] Kleinjan WE, De Keizer A, Janssen AJH. Equilibrium of the reaction between dissolved sodium sulfide and biologically produced sulfur[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 43(3/4): 228-237
- [9] Song ZY. Screening of sulfur oxidizing bacteria and its application in gas desulfurization process[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2013 (in Chinese)  
宋子煜. 硫氧化菌筛选及其在气体脱硫工艺中的应用[D]. 北京: 中国科学院大学博士学位论文, 2013
- [10] Xu JX, Li SY, Li SM, Zhang S, Zhang J. Analysis on the generation rate of sulfur in biological desulfurization process[J]. *China Water & Wastewater*, 2004, 19(S1): 96-97 (in Chinese)  
许吉现, 李素燕, 李思敏, 张胜, 张娟. 生物脱硫工艺中单质硫的生成率分析[J]. *中国给水排水*, 2004, 19(S1): 96-97
- [11] Zhang KQ, Huang WX, Ji M, Li JX, Li Y, Li B, Zhang JF. Characteristics of microbiologically sulfur producing during biological treatment for wastewater containing sulfide[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(2): 522-526 (in Chinese)  
张克强, 黄文星, 季民, 李军幸, 李野, 李斌, 张金凤. 含硫化物废水生物处理过程中单质硫的形成特性[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(2): 522-526
- [12] Hanson TE, Bonsu E, Tuerk A, Marnocha CL, Powell DH, Chan CS. *Chlorobaculum tepidum* growth on biogenic  $S(0)$  as the sole photosynthetic electron donor[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(9): 2856-2867
- [13] Zhang CG, Xia JL, Ding JN, Ouyang XD, Nie ZY, Qiu GZ. Cellular acclimation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to sulfur biooxidation[J]. *Mining, Metallurgy & Exploration*, 2009, 26(1): 30-34
- [14] Huo QS, Margolese DI, Stucky GD. Surfactant control of phases in the synthesis of mesoporous silica-based materials[J]. *Chemistry of Materials*, 1996, 8(5): 1147-1160
- [15] Wang SR, Li XG, Liu DZ. Surfactant Chemistry[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005 (in Chinese)  
王世荣, 李祥高, 刘东志. 表面活性剂化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [16] Zeng YF, Jiang XM, Chen YZ. Influence of surfactants on the preparation of  $MoS_2$  nanoparticles[J]. *Acta Petroles Sinica (Petroleum Processing Section)*, 2001, 17(4): 55-58 (in Chinese)  
曾颖峰, 蒋晓明, 陈月珠. 表面活性剂对制备纳米  $MoS_2$  颗粒的影响[J]. *石油学报(石油加工)*, 2001, 17(4): 55-58
- [17] Jiang CY, Li L, Yang YT, Xing JM, Liu HZ, Chen JY. Effect of surfactants on microbial removal of organic sulfur in diesel oil[J]. *The Chinese Journal of process engineering*, 2002, 2(2): 122-126 (in Chinese)  
姜成英, 李磊, 杨永谭, 邢建民, 刘会洲, 陈家镛. 表面活性剂对微生物脱除柴油中有机硫的影响[J]. *过程工程学报*, 2002, 2(2): 122-126
- [18] Wang Y, Zhang J, Feng S, Peng DC, Xia SQ, Wang SP. Effect of sodium dodecyl sulfate addition on sulfur in hydrolysis system of excess sludge[J]. *China Water & Wastewater*, 2017, 33(3): 102-106 (in Chinese)

- 王怡, 张洁, 冯莎, 彭党聪, 夏四清, 王社平. 添加 SDS 对剩余污泥水解系统中硫的影响[J]. 中国给水排水, 2017, 33(3): 102-106
- [19] Chun JJ, Ma Z, Ding T, Qi XZ. Effect of quaternary ammonium surfactants on adsorption desulfurization performance of kaolin nanotubes[J]. Chemical Industry and Engineering, 2016, 33(6): 14-18 (in Chinese)  
崔晶晶, 马智, 丁彤, 齐晓周. 季铵盐表面活性剂改性对高岭土纳米管吸附脱硫性能的影响[J]. 化学工业与工程, 2016, 33(6): 14-18
- [20] Kingma Jr JG, Silver M. Autotrophic growth of *Thiobacillus acidophilus* in the presence of a surface-active agent, Tween 80[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 38(5): 795-799
- [21] Gong WQ, Zhang XZ, Liu YJ, Chen W, Bian X, Liu J, Huang YB, Yang HG. Influence of surfactants on leaching of phosphate ore with *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. Journal of Central South University (Science and Technology), 2007, 38(1): 60-64 (in Chinese)  
龚文琪, 张晓峥, 刘艳菊, 陈伟, 边勋, 刘俊, 黄永炳, 杨红刚. 表面活性剂对嗜酸氧化硫硫杆菌浸磷的影响[J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2007, 38(1): 60-64
- [22] Xu XH. Removal of H<sub>2</sub>S from high-salt and high-alkali solution by immobilized magnetic nanoparticles of *Thiobacillus thiooxidans* multipotential[D]. Beijing: Master's Thesis of University of 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 H<sub>2</sub>S 的研究[D]. 北京: 中国科学院大学硕士学位论文, 2015
- [23] Van Den Bosch PLF, Sorokin DY, Buisman CJN, Janssen AJH. The effect of pH on thiosulfate formation in a biotechnological process for the removal of hydrogen sulfide from gas streams[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(7): 2637-2642
- [24] Mu TZ. Study on metabolic engineering and desulfurization process of *Thiobacillus thiooxidans* SOB306[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of University of 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: 中国科学院大学博士学位论文, 2016
- [25] Sharshar MM, Samak NA, Hao XM, Mu TZ, Zhong W, Yang MH, Peh S, Ambreen S, Xing JM. Enhanced growth-driven stepwise inducible expression system development in haloalkaliphilic desulfurizing *Thiobacillus thiooxidans*[J]. Bioresource Technology, 2019, 288: 121486
- [26] Kappler U, Davenport K, Beatson S, Lapidus A, Pan C, Han C, Del Carmen Montero-Calasanz M, Land M, Hauser L, Rohde M, et al. Complete genome sequence of the haloalkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic thiosulfate and sulfide-oxidizing  $\gamma$ -proteobacterium *Thiobacillus cyclicum* type strain ALM 1 (DSM 14477<sup>T</sup>)[J]. Standards in Genomic Sciences, 2016, 11(1): 38
- [27] Conboy JJ, Henion JD, Martin MW, Zweigenbaum JA. Ion chromatography/mass spectrometry for the determination of organic ammonium and sulfate compounds[J]. Analytical Chemistry, 1990, 62(8): 800-807
- [28] Gu HZ, Wang HF, Wang HZ, Wang J. Influence of different surface active agents on the preparation of nanometer ZnO/ZrO<sub>2</sub> and the desulfurization properties[J]. Journal of Synthetic Crystals, 2007, 36(3): 642-645 (in Chinese)  
顾华志, 汪慧峰, 汪厚植, 汪姣. 不同表面活性剂对纳米 ZnO/ZrO<sub>2</sub> 的制备和脱硫性能的影响[J]. 人工晶体学报, 2007, 36(3): 642-645
- [29] Xiao PF, Qin BD, Li YW. Effects of nonionic surfactants on degradation of organochlorine pesticides by white rot fungus and its enzyme[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2015, 21(1): 22-28 (in Chinese)  
肖鹏飞, 秦必达, 李玉文. 非离子表面活性剂强化白腐菌及其粗酶液对有机氯农药的降解[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(1): 22-28
- [30] Peng AA, Liu HC, Nie ZY, Xia JJ. Effect of surfactant Tween-80 on sulfur oxidation and expression of sulfur metabolism relevant genes of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2012, 22(12): 3147-3155
- [31] He H, Yang Y, Xia JL, Ding JN, Zhao XJ, Nie ZY. Growth and surface properties of new thermoacidophilic archaea strain *Acidianus manzaensis* YN-25 grown on different substrates[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18(6): 1374-1378
- [32] Marnocha CL, Sabanayagam CR, Modla S, Powell DH, Henri PA, Steele AS, Hanson TE, Webb SM, Chan CS. Insights into the mineralogy and surface chemistry of extracellular biogenic S<sup>0</sup> globules produced by *Chlorobaculum tepidum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 271
- [33] Zhang CG, Xia JJ, Zhang RY, Peng AA, Nie ZY, Qiu GZ. Comparative study on effects of Tween-80 and sodium isobutyl-xanthate on growth and sulfur-oxidizing activities of *Acidithiobacillus albertensis* BY-05[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2008, 18(4): 1003-1007
- [34] Tan SN, Chen M. Early stage adsorption behaviour of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on minerals I: an experimental approach[J]. Hydrometallurgy, 2012, 119-120: 87-94
- [35] Janssen AJH, Lettinga G, De Keizer A. Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur: colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1999, 151(1/2): 389-397
- [36] Marnocha CL, Levy AT, Powell DH, Hanson TE, Chan CS. Mechanisms of extracellular S<sup>0</sup> globule production and degradation in *Chlorobaculum tepidum* via dynamic cell-globule interactions[J]. Microbiology, 2016, 162(7): 1125-1134