

脱氮除硫菌株的分离鉴定和功能确认

蔡 靖, 郑 平*, 胡宝兰, Qaisar Mahmood

(浙江大学环境工程系 杭州 310029)

摘 要: 从长期稳定运行的脱氮除硫反应器污泥中, 分离获得两株具有脱氮除硫功能的芽孢杆菌。经形态观察、生理试验和 16S rDNA 序列比对, 将两菌株归入芽孢杆菌属, 菌株 CB 归类于 *Bacillus pseudofirmus*, 菌株 CS 则与 *Bacillus hemicellulosilytus* 和 *Bacillus halodurans* 最为接近。以 Biolog 板检测, 菌株 CB 的基质多样性不明显, 菌株 CS 则可利用 Biolog 板中多种碳源。菌株 CB 和菌株 CS 都能以硝酸盐氧化硫化物, 其中菌株 CB 对硝酸盐、硫化物的转化能力大于 CS, 菌株 CB 对硝酸盐的亲和力也大于菌株 CS。

关键词: 芽孢杆菌; 分离鉴定; 脱氮除硫

中图分类号: Q939, Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2007)06-1027-05

在发酵、化工、制药(农药和医药)等诸多行业, 所排放的废水不仅含有高浓度的有机污染物, 而且含有高浓度的硫酸盐和氨氮^[1]。以发酵行业的味精废水为例, 其生产过程中产生的离交尾液 COD 浓度高达 30000 ~ 70000 mg/L, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 浓度高达 5000 ~ 7000 mg/L, SO_4^{2-} 浓度高达 8000 ~ 9000 mg/L, 全国每年排放这类废水 1500 万吨以上^[2]。受高浓度硫酸盐和氨氮的影响, 味精废水至今没有经济有效的工程治理技术, 大多数企业仍在超标排放或直接排放, 对环境的污染极为严重^[3]。

厌氧生物处理技术因具有高负荷率、低能耗、低运行成本、低污泥产量和可回收能源等优势, 已成为高浓度有机废水治理的主流工艺。但在厌氧生物处理中, 硫酸盐可被还原成硫化物, 后者对金属、建筑材料和艺术品种具有强烈腐蚀作用。其中, 硫化氢是一种大气污染物, 如果空气中硫化氢含量超过 0.1%, 就会迅速引起人头痛、晕眩等症状, 甚至造成昏迷和死亡。空气中硫化氢不得超过 0.01 mg/L^[4-6]。

除了硫污染外, 氮磷所致的水体富营养化也十分严重, 我国湖泊“水华”及近海“赤潮”时有发生, 且有越演越烈之势^[7]。废水脱氮已成为当前环境界关注的焦点之一。近十多年来, 经过各国研究者的努力, 生物脱氮理论和技术取得了重大突破, 推出了一大批新型生物脱氮技术。在这些生物脱氮技术中,

氨氮硝化是必不可少的重要环节。由于硝化工艺不能彻底消除氮素的不良影响, 通常需与反硝化工艺联用, 进行后续处理。若能把厌氧除碳、好氧硝化、缺氧脱硫组合成一个工艺, 以厌氧段产生硫化物作为电子供体来还原硝化段产生的硝酸盐(简称为脱氮除硫), 则可实现以废制废, 达到对氮硫两种污染物的同时去除。

菌种是生物反应的根本, 分离获得高活性的脱氮除硫菌株, 不仅有助于揭示脱氮除硫工艺机理, 优化脱氮除硫工艺性能, 还可为脱氮除硫工艺提供生产菌种, 促进该工艺的工业化应用。本文拟从生物脱氮除硫反应器中分离相关菌株, 鉴定其分类地位并确认其脱氮除硫功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种分离源: 用于分离菌株的活性污泥样品取自本实验室长期运行的脱氮除硫反应器, 其部分理化性状为: TS 145.03 g/L, VS 68.68 g/L, VS/TS 0.474。脱氮除硫反应器的运行工况为: 采用添加硝酸盐和硫化物的无机培养基作为模拟废水, 容积硫化物去除率 3.73 kg $\text{S}^{2-} - \text{S}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 容积硝酸盐去除率 0.80 kg $\text{NO}_3^- - \text{N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 硫化物去除率 99.42%, 硝酸盐去除率 99.77%。经过 2 年多的稳定运行, 由于基质的选择作用, 反应器活性污泥内以脱氮除硫

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA06Z332); 浙江省重大科技攻关项目(2003C13005); 环境修复与生态健康教育部重点实验室开放基金(050002)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-571-86971709; E-mail: pzhang@zju.edu.cn

作者简介: 蔡 靖(1984-), 女, 浙江温州人, 博士研究生, 从事废水生物处理与资源化的研究。E-mail: caijing@zju.edu.cn

收稿日期: 2007-04-20; 接受日期: 2007-08-03; 修回日期: 2007-09-03

功能菌为优势菌群。

1.1.2 培养基 :①液体选择性培养基^[8]②固体选择性培养基 :每升含硝酸钾(KNO₃)140mg NO₃⁻-N ,硫化钠(Na₂S·9H₂O)320mg S²⁻-S ,琼脂 20g ,其余同液体选择性培养基。培养基采用加压蒸汽灭菌(100kPa ,30min)。为避免高温高压条件造成硫化物的减少 ,硫化钠在灭菌后加入。

1.2 分离培养方法

取反应器中的高活性污泥 ,采用系列平板稀释涂抹及划线法分离目标菌株。培养过程置于厌氧培养罐中 ,30℃恒温培养。根据菌落形态的一致性和菌体细胞的一致性 ,判断菌株的纯化情况 ,选取生长快、活性强的菌株进行分类鉴定和功能试验。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 细胞形态观察 :磷钨酸负染后 ,用透射电镜观察。

1.3.2 细胞结构特征 :超薄切片后 ,用 JEM-1200EX 透射电镜观察。

1.3.3 细胞芽孢染色 :孔雀绿染色后 ,用研究显微镜观察^[9]。

1.3.4 菌株的碳源利用情况 :采用 Biolog 细菌自动鉴定仪进行试验。在 Biolog 96 孔平板上 ,除对照孔外 ,将合适浓度的菌悬液接种于各微孔并培养 16h 后 ,读数鉴定^[10]。

1.3.5 菌株 16S r DNA 序列测定和系统发育树构建 :采用标准试剂盒提取被鉴菌株的基因组 DNA ,并以细菌的通用引物 27f(5'-AGAGTTTGATCTG GCTCAG-3')和 1523R(5'-GGTACCTTGTT ACGACTT-3')进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增采用 50μL 反应体系 ,反应条件 :94℃ 5min ;94℃ 1min ,52℃ 1min ,72℃ 2min ,30 个循环 ;72℃ 10min。纯化 PCR 产物 ,测序。测序委托上海英骏生物技术有限公司进行。将测得的 16S r DNA 序列后将结果输入 NCBI GenBank 数据库(National Center for Biotechnology Information , NCBI) ,进行 BLASTN 比对。利用 DNAMAN 软件建立系统发育树 ,用 Bootstrap 分析评估树的稳定性。

1.4 菌株功能确认

菌株功能试验在 65mL 血清瓶中进行。离心收集培养好的菌株 ,并制成菌悬液。每个试验瓶中加入 2mL 菌悬液 ,总反应体积为 50mL ,pH7.0。设定硝酸盐浓度为 49mg NO₃⁻-N/L ,硫化物浓度 280mg S²⁻-S/L。培养前用无氧氮气置换瓶内空气 ,使其处于无氧状态。整个试验置于 30℃ 恒温条件下进行 ,每隔

24h 测定硝酸盐消失量与硫酸盐产生量 ,以此来判断菌株的脱氮除硫能力。

1.5 分析方法^[11]

紫外分光光度法分析硝氮(NO₃⁻-N) ,铬酸钡分光光度法分析硫酸盐硫(SO₄²⁻-S)。

2 结果和分析

2.1 分离菌株及其形态特征

经过反复分离、培养和纯化 ,获得数个菌株 ,从中筛选两个生长较快的菌株(CB 和 CS)作进一步的研究。在 30℃ 恒温培养 3d 后 ,在培养基上出现菌落。菌株 CB 革兰氏染色阴性 ;菌体细胞呈杆状 ,两端钝圆 ,大小为(0.5 ~ 0.75)μm ×(1.5 ~ 1.8)μm ;具端生鞭毛(图 1-A) ;有芽孢 ,呈卵圆形 ,端生 ,胞囊稍膨大。从细胞结构特征看 ,细胞壁表面光滑 ,外有类似荚膜包裹 ,有锯齿状突起(图 1-B)。在选择性培养基上 ,该菌落为白色 ,呈圆形 ,大小 0.5 ~ 1mm、表面光滑 ,易挑起。

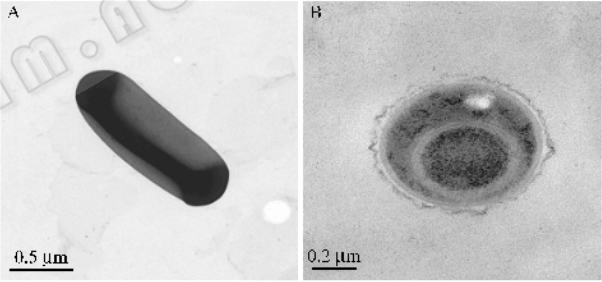


图 1 菌株 CB 透射电镜照片

Fig.1 TEM photos of strain CB. A : Morphological character(× 60000) ; B : Structure character(× 100000).

菌株 CS 革兰氏染色阴性 ,菌体细胞呈杆状 ,两端钝圆 ,大小为(0.5 ~ 0.75)μm ×(2 ~ 2.5)μm(图 2-A) ;无鞭毛 ;有芽孢 ,呈卵圆形 ,亚端生 ,胞囊稍膨大(图 2-B)。在选择性培养基上 ,该菌落为白色 ,呈圆形 ,大小 0.1 ~ 0.2mm、表面光滑 ,易挑起。

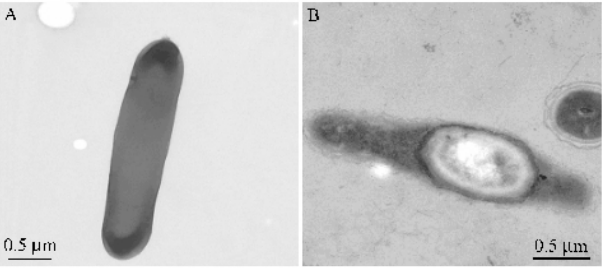


图 2 菌株 CS 透射电镜照片

Fig.2 TEM photos of strain CS. A : Morphological character(× 40000) ; B : Structure character(× 50000).

2.2 菌株碳源利用情况

将菌株 CB 和菌株 CS 分别接种到 95 种碳源的 Biolog GN 板微孔中,培养 16h 后,测定菌株碳源利用情况,结果表明,菌株 CB 除了不能利用吐温-40、吐温-80、衣康酸和葵二酸作为碳源以外,可以利用 Biolog 板中其他碳源,但是利用能力不显著。菌株 CS 能够利用糊酸、阿拉伯糖、L-岩藻糖、D-半乳糖、a-D-葡萄糖、L-鼠李糖、D-半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、a-酮丁酸、a-酮戊二酸、a-戊酮酸、琥珀酰胺酸和葡萄糖醛酰胺作为碳源,但不能利用吐温-80 和尿尿酸作为碳源,对 Biolog 板中其他碳源的利用能力也不显著。

2.3 菌株 16S rDNA 序列及其系统发育分析

通过 PCR 扩增,所得的菌株 CB 和菌株 CS 的

16S rDNA 产物均为 1428bp。菌株 CB 和 CS 在 Gene Bank 数据库中的登录号分别为 EF542806 和 EF542807。

将两个菌株的 16S rDNA 序列输入 Gene Bank 数据库中进行 BLASTN 比对。结果显示,菌株 CB 和菌株 CS 都与芽孢杆菌属的细菌具有较高的同源性,其中与 *Bacillus pseudofirmus*、*Bacillus hemycellulosilyticus*、*Bacillus halodurans*、*Bacillus akibai*、*Bacillus wakoensis* 的同源性高达 98%。菌株 CB 和菌株 CS 与这些菌株之间的系统发育树如图 3 所示。由系统发育树可以看出,菌株 CB 与 *Bacillus pseudofirmus* OF4 最为接近,菌株 CS 则与 *Bacillus hemycellulosilyticus*、*Bacillus halodurans* 最为接近。

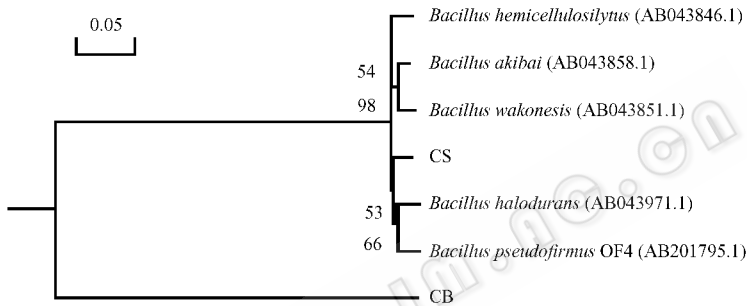


图 3 菌株 CB、CS 与不同菌株之间的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain CB,CS and sequences of validly described bacteria associated. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar 5% sequence divergence.

2.4 菌株的脱氮除硫活性

将菌株 CB 和菌株 CS 分别接种到含有硝酸盐和硫化物的液体选择性培养基中,在 24h、48h、72h 和 96h 测定硝酸盐消失量与硫酸盐产生量,结果如图 4 所示。经过 96h 培养,菌株 CB 对硝酸盐的转化率达 99.8%,菌株 CS 对硝酸盐的转化率为 71.8%。分别对菌株 CB 和菌株 CS 的硝酸盐转化量与时间之间的曲线进行拟合,得到

$$\Delta N_{CB} = 49.76 - 0.48t \quad R^2 = 0.9667 \quad (1)$$

$$\Delta N_{CS} = 48.99 - 0.30t \quad R^2 = 0.9940 \quad (2)$$

式(1)和式(2)中的斜率即为菌株对硝酸盐的转化速率,菌株 CB 和菌株 CS 的硝酸盐转化速率分别为 0.48mg NO₃⁻-N (L·h)⁻¹和 0.30mg NO₃⁻-N (L·h)⁻¹,菌株 CB 的硝酸盐转化速率约为菌株 CS 硝酸盐转化速率的 1.6 倍。

分别对菌株 CB 和菌株 CS 的硫酸盐产生量与时间之间的曲线进行拟合,得到

$$\Delta S_{CB} = -0.60 + 0.61t \quad R^2 = 0.9452 \quad (3)$$

$$\Delta S_{CS} = -0.37 + 0.37t \quad R^2 = 0.9970 \quad (4)$$

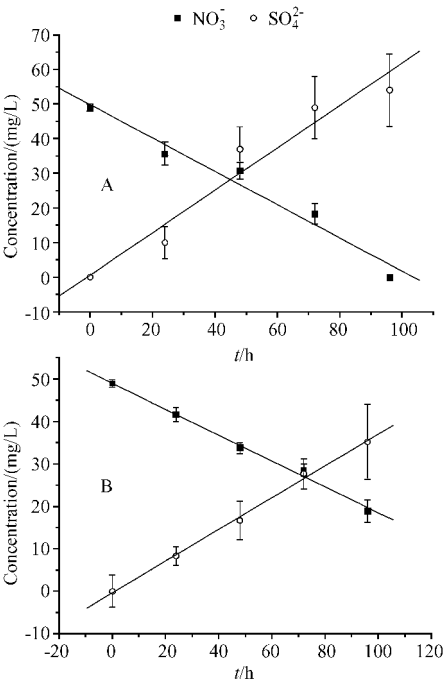


图 4 菌株 CB A) CS B) 转化硝酸盐与产生硫酸盐的情况

Fig.4 Nitrate-reduction and sulfate-production by strain CB(A) and strain CS(B). © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

式(3)和式(4)中的斜率即为菌株对硫酸盐的产生速率,菌株CB和菌株CS的硫酸盐产生速率分别为 $0.61\text{mg SO}_4^{2-}\text{-S}(\text{L}\cdot\text{h})$, $0.37\text{mg SO}_4^{2-}\text{-S}(\text{L}\cdot\text{h})$ 。菌株CB的硫酸盐产生速率也约为菌株CS硫酸盐产生速率的1.6倍,这表明菌株CB对硝酸盐和硫化物的转化能力都大于菌株CS。菌株CB和菌株CS对硫化物的亲和力较高,经过96h转化,硫化物浓度均低于 1mg S/L 。

3 讨论

3.1 菌株CB和菌株CS的归属

从菌株CB和菌株CS的透射电镜照片以及芽孢染色照片看,两菌株都能产生芽孢,可归入产芽孢细菌。菌株CB和菌株CS的细胞形态呈杆状,能在兼性厌氧环境中生长,按照《常见细菌系统鉴定手册》^[12]中产芽孢细菌检索表,可归入双芽孢杆菌属、盐芽孢杆菌属、硫氮素芽孢杆菌属、脂环酸芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、短芽孢杆菌属、硫芽孢杆菌属或芽孢杆菌属。根据16S rDNA序列的BLASTN比对结果,可进一步将菌株CB和菌株CS归入芽孢杆菌属。从菌株CB和菌株CS与芽孢杆菌属菌株之间的系统发育树看,菌株CB与*Bacillus pseudofirmus* OF4最为接近,菌株CS与*Bacillus hemicecellulosilytus*、*Bacillus halodurans*最为接近。

3.2 菌株CB和菌株CS的特性

根据《伯杰氏细菌鉴定手册》^[13],芽孢杆菌属菌株的特性为:严格好氧或兼性厌氧;有机化能营养,利用多种底物进行严格呼吸代谢,严格发酵代谢或兼有呼吸和发酵代谢。没有提及其化能自养性。菌株CB和菌株CS从长期运行的脱氮除硫反应器污泥中分离获得,所用的分离培养基是无机盐培养基,以碳酸盐作为碳源,以硫化物为能源,以硝酸盐作为氮源和电子受体。因此对芽孢杆菌属细菌而言,其化能自养性是一个新的发现,值得深入研究。

据文献报道^[15~18],许多微生物都可以氧化硫化物,如*Thiobacillus*,*Xanthomonas*和*Pseudomonas*等,其中以脱氮硫杆菌较为广泛。而对芽孢杆菌属细菌氧化硫化物的能力研究不多。因此对芽孢杆菌属细菌而言,其氧化硫化物能力是一个新的发现,值得进一步探索。

3.3 菌株CS的基质多样性

一般情况下,芽孢杆菌广泛分布于自然界中,对不良环境具有极强的适应能力,因此普遍用于研究和生产中^[19,20]。但从Biolog板检测结果来看,菌株

CB的基质多样性不明显,菌株CS则可利用Biolog板中的多种碳源,如葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等常见碳源。这可能是因为经过长期自养型驯化后,菌株对有机物质有些适应不良,但是还是能利用一些常见碳源。

一般来说,化能自养型微生物的生长速度往往低于化能异养微生物。利用菌株CS的基质多样性,可通过提供有机碳源来促进菌种生长,加速生物反应器的启动并保持运行效能的稳定。

4 结论

(1)从长期运行的脱氮除硫反应器污泥中,分离获得了两个菌株(菌株CB和菌株CS),经形态学观察和16S rDNA序列比对,将其归入芽孢杆菌属,菌株CB与*Bacillus pseudofirmus* OF4最为接近,菌株CS与*Bacillus hemicecellulosilytus*、*Bacillus halodurans*最为接近。

(2)试验证明,菌株CB和菌株CS都具有脱氮除硫功能。菌株CB对硝酸盐、硫化物的转化能力大于菌株CS,菌株CB对硝酸盐的亲和力也大于菌株CS。

(3)经Biolog板检测,菌株CB的基质多样性不明显,菌株CS则可利用Biolog板中多种碳源。其中,葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等都是常见碳源,利用基质多样性可望促进这类自养型细菌的生长。

参 考 文 献

- [1] 北京水环境技术与设备研究中心,北京市环境保护科学研究院,国家城市环境污染控制工程技术研究中心. 三废处理工程技术手册. 北京:化学工业出版社,2000.
- [2] 王凯军,秦人伟. 发酵工业废水处理. 北京:化学工业出版社,2000.
- [3] 陶涛,詹德昊,卢秀青,等. 味精废水治理的现状与进展. 环境污染治理技术与设备,2002,2(1):68-73.
- [4] Jappinen P, Vilkkä V, Marttila O. Exposure to hydrogen sulfide and respiratory function. *British Journal of Industrial Medicine*, 1990, 47:824-828.
- [5] Bhambhani Y, Singh M. Physiological effects of hydrogen sulfide inhalation during exercise in healthy men. *Applied Physiology*, 1991, 71:1872-1877.
- [6] Kilburn KH, Warshaw RH. Hydrogen sulfide and reduced-sulfur gases adversely affect neurophysiological functions. *Toxicology & Industrial Health*, 1995, 11:185-197.
- [7] 郑平,徐向阳,胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术. 北京:科学出版社,2004.

- [8] 蔡 靖, 郑 平, Qaisar Mahmood, 等. 同步厌氧生物脱氮除硫工艺性能的研究. 生物工程学报 2006 22(5) 840 – 844.
- [10] 郑 平. 环境微生物学实验指导. 杭州: 浙江大学出版社, 2005.
- [11] 姚槐应, 黄昌勇. 土壤微生物生态学及其实验技术. 北京: 科学出版社 2006.
- [12] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社 2002.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社 2001.
- [14] Holt JG, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1994.
- [15] Cho KS, Hirai M, Shoda M. Degradation characteristics of hydrogen sulfide, methanethiol, dimethyl sulfide and dimethyl disulfide by *Thiobacillus thioparus* DW44 isolated from peat biofilter. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1991 71 384 – 389.
- [16] Chung YC, Huang C, Tseng CP. Biodegradation of hydrogen sulfide by a laboratory-scale immobilized *Pseudomonas putida* CH11 biofilter. *Biotechnology Progress* 1996 12 773 – 778.
- [17] Campos JL, Carvalho S, Portela R, et al. Kinetics of denitrification using sulphur compounds: Effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds. *Bioresource Technology* 2007, doi: 10.1016/j.biortech.2007.02.007.
- [18] Ma YL, Yang BL, Zhao JL. Removal of H₂S by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on different matrices. *Bioresource Technology* 2006 97(16) 2041 – 2046.
- [19] Gruber K, Sleytr UB. Influence of an S-layer on surface properties of *Bacillus stearothermophilus*. *Archives of Microbiology* 1991 180 101 – 105.
- [20] Tsai Y, Juang R, Lin S. Production and further characterization of an alkaline elastase produced by alkalophilic *Bacillus* strain Ya-B. *Applied and Environmental Microbiology* 2001, 54(12): 3156 – 3161.

Isolation, identification and characterization of nitrate-reducing and sulfide-oxidizing bacteria

CAI Jing, ZHENG Ping*, HU Bao-lan, Qaisar Mahmood

(Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract : Bacterial strains CB and CS were isolated from the Anoxic Sulfide Oxidizing (ASO) reactor working under steady-state with sulfide and nitrate as electron donor and acceptor, respectively. Based on electron microscopy, physiological test and 16S rDNA phylogenetic sequence analysis, the isolate CB was very close to *Bacillus pseudofirmus* and the isolate CS was very close to *Bacillus hemicellulosilytus* and *Bacillus halodurans*. The 16S rDNA sequences of both isolates were submitted to GenBank, NCBI and accession numbers EF542806 and EF542807 were allotted for isolates CB and CS, respectively. According to Biolog carbon source utilization test, the isolate CB is weak to use the carbon sources, while the isolate CS can use many carbon sources. Both the isolate CB and the isolate CS are able to use nitrate for sulfide oxidation. The isolate CS has greater capability to oxidize sulfide with nitrate as electron acceptor.

Keywords : bacillus; isolation and identification; nitrate-reduction and sulfide-oxidation