



山西阳泉老窑水硫酸盐还原菌的分离鉴定及其还原功能驯化

陈秀云¹, 冯杰², 王红梅^{1,3}, 刘邓^{1,3}, 窦艳芳², 张江华², 马丽媛^{1,3*}

1 中国地质大学(武汉), 环境学院, 湖北 武汉 430074

2 阳泉市水利局, 山西 阳泉 045000

3 湿地演化与生态恢复湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430074

陈秀云, 冯杰, 王红梅, 刘邓, 窦艳芳, 张江华, 马丽媛. 山西阳泉老窑水硫酸盐还原菌的分离鉴定及其还原功能驯化. 微生物学报, 2022, 62(6): 2104–2118.

Chen Xiuyun, Feng Jie, Wang Hongmei, Liu Deng, Dou Yanfang, Zhang Jianghua, Ma Liyuan. Isolation and identification of sulfate-reducing bacteria in goaf water in Yangquan of Shanxi Province and domestication for the reduction. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(6): 2104–2118.

摘要:【背景】含硫煤矿开采后, 地表水/地下水回流至采空区形成酸性老窑水, 含有高浓度重金属离子和硫酸盐, 严重危害生态系统健康。利用微生物自身生长处理老窑水具有成本低、环境友好等特点, 具有良好的应用前景。目前利用的硫酸盐还原菌大多只在适宜温度和中性 pH 条件下具有较高活性, 在北方低温和酸性条件下难以发挥作用。【目的】本研究旨在从山西阳泉山底河流域的老窑水环境中分离硫酸盐还原菌, 并调节温度和 pH 进行驯化, 从而得到高效耐低温耐酸菌株, 为北方老窑水微生物治理提供可用菌种资源。【方法】对山底河流域典型老窑水样品中的微生物进行富集培养, 并筛选硫酸盐还原菌。通过革兰氏染色、扫描电镜对菌株形貌特性进行表征, 利用 16S rRNA 基因序列比对进行菌种鉴定, 探究其生长特性和硫酸盐还原性能。在此基础上降低温度和 pH, 对高效还原硫酸盐菌株进行驯化, 探讨其在北方老窑水污染治理中的应用潜力。【结果】本研究筛选得到 2 株硫酸盐还原菌, 命名为 YQ-1 和 YQ-2, 分别属于革兰氏阴性瘤胃解蛋白质菌属(*Proteiniclasticum*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)。在 30 °C、pH 7.5 条件下, YQ-1 和 YQ-2 对 1 100 mg/L 硫酸根的还原效率分别为 96.75%和 75.48%。选取高效菌株 YQ-1 进行定向驯化, 该菌株经低温驯化后, 在 15 °C、

基金项目: 阳泉市水利局省级水利发展资金(2019046477); 国家自然科学基金(42007306)

Supported by the Provincial Project of Water Resources Development Fund of Water Conservancy Bureau, Yangquan (2019046477) and by the National Natural Science Foundation of China (42007306)

*Corresponding author. E-mail: maly@cug.edu.cn

Received: 16 April 2022; Revised: 21 May 2022; Published online: 30 May 2022

pH 7.5 条件下对硫酸根的去除率为 91.49%，比驯化前提高了 85.69%；进一步进行低 pH 驯化后，在 15 °C、pH 4.5 条件下对硫酸根的去除率为 37.21%，比驯化前提高了 34.30%。【结论】通过驯化培养提高了硫酸盐还原菌 YQ-1 对低温和低 pH 环境的耐受性，同时也提高了其在低温和低 pH 条件下对硫酸根的还原效率，为北方老窑水治理提供了菌种资源和理论依据。

关键词：老窑水；硫酸盐还原菌；单菌株筛选；细菌驯化

Isolation and identification of sulfate-reducing bacteria in goaf water in Yangquan of Shanxi Province and domestication for the reduction

CHEN Xiuyun¹, FENG Jie², WANG Hongmei^{1,3}, LIU Deng^{1,3}, DOU Yanfang², ZHANG Jianghua², MA Liyuan^{1,3*}

¹ School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430074, Hubei, China

² Yangquan Water Resources Bureau, Yangquan 045000, Shanxi, China

³ Hubei Key Laboratory of Wetland Evolution & Ecological Restoration, Wuhan 430074, Hubei, China

Abstract: [Background] Surface water/ground water flows back to the goaf of sulfur-containing coal mine, forming the acidic goaf water. The water, with high salinity and sulfate content, threatens ecosystem health. Microorganisms, which feature low cost and environmental protection, has promising prospect of application in the treatment of goaf water. However, the currently available sulfate-reducing bacteria (SRB) are only highly active under suitable temperature and neutral pH, and are intolerant to low temperature and acidic conditions in northern China. [Objective] To isolate SRB from goaf water in Shandi River Basin of Yangquan, Shanxi, and to domesticate them so that they can tolerate the low temperature and acidic condition and be used for the treatment of goaf water in northern China. [Methods] Microorganisms in goaf water sample from Shandi River Basin were enriched and SRB were isolated. Then the SRB were characterized by Gram staining and scanning electron microscopy and identified based on 16S rRNA sequence alignment. Their growth characteristics and sulfate-reducing capacity were also investigated. On this basis, temperature and pH were lowered to domesticate the efficient SRB, thereby exploring their potential in the treatment of goaf water. [Results] Two strains of SRB, YQ-1 and YQ-2, were isolated, belonging to the Gram-negative *Proteiniclasticum* and *Desulfovibrio*, respectively. At 30 °C and pH 7.5, YQ-1 and YQ-2 reduced 96.75% and 75.48% of the 1 100 mg/L sulfate, respectively. The highly efficient strain YQ-1 was selected for domestication at low temperature and pH. The sulfate removal rate of the strain was 91.49% at 15 °C and pH 7.5 after low-temperature domestication, 85.69% higher than that before domestication. The removal rate was up to 37.21% at 15 °C and pH 4.5 after low-pH domestication, which was 34.30% higher than that before domestication. [Conclusion] The tolerance of YQ-1 to low temperature and low pH was improved, and the efficiency of sulfate reduction was also enhanced after domestication. This work provided strain resources and theoretical basis for the treatment of goaf water in northern China.

Keywords: goaf water; sulfate-reducing bacteria; single-strain screening; bacterial domestication

我国煤矿资源丰富,在促进社会及经济进步的同时,多年开采及煤矿的关停整合,形成大量采空区,采煤活动残留的污染物和采场中的有害物质进入地下水,从而发展成老窑水^[1]。北方老窑水酸性高,常年处于低温状态且含有大量的硫酸根和重金属离子,溢出后严重影响地下水和地表水的水体质量^[2]。在排放过程中,强酸性老窑水会腐蚀金属管道和井下混凝土设备,造成透水事故^[3]。据统计,我国山西省煤矿废水的排水量达到每年 $2 \times 10^8 \text{ m}^3$ ^[4],对生态环境及人类健康的影响不容小觑。因此,老窑水污染的防控和治理工作迫在眉睫。近年来,利用微生物作用的生化法处理效率高、二次污染少,得到了越来越广泛的应用,其中如何提高硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)对硫酸盐的还原效率是该领域的卡脖子难题。

SRB 是一类单细胞原核生物,无色,单级鞭毛运动,通过异化作用将硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐等含硫氧化物作为有机物的电子受体还原为硫化氢^[5],在硫元素的地球化学元素循环中扮演重要角色。SRB 地理分布广泛,在海洋沉积物^[6]、火山口^[7]、矿山废水排水口^[8]、盐碱地^[9]、淡水沉积物^[10]、植物根际^[11]和污水处理厂^[12]等均得到了检测与分离,存在于温度 $-13 \sim 85 \text{ }^\circ\text{C}$ 范围内^[13-14]。SRB 通过调节代谢进行自我保护^[15],氧化有机物作为营养源,产生的硫化氢能够与水中溶解态的金属离子反应生成硫化物沉淀,并通过释放电子来产生碱度,从而提高 pH 值^[16]。目前,利用 SRB 治理老窑水在理论和实验室阶段取得一定进展,利用污水净化厂中的 SRB 对老窑水进行治理,体系中 $2\ 000 \text{ mg/L}$ 硫酸盐的最大去除率达到 64.75%。但是在自然修复中由于生长条件的限制,SRB 对老窑水的治理效果并不显著^[17],尤

其是在低温低 pH 环境下,SRB 还原能力减弱,甚至不发生还原反应^[18]。因此,提高 SRB 在低温低 pH 条件下的还原效率是目前亟待解决的问题。

本研究从山西阳泉山底河流域的典型老窑水环境中分离出 2 株 SRB,结合扫描电镜及测序手段鉴定其形态特征、分类地位及生长特性。设定温度和 pH 梯度逐步驯化培养,旨在获得耐低温和耐酸性的菌株,为老窑水处理工艺研究提供原位修复的菌种资源。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

本研究围绕山底河流域水系及附近支系展开,于 2019 年 11 月在老窑水出水点附近进行布点取样,分别采集山底河河水(S)及对应底泥样品(D)各 4 份。水体样品的采集深度为 5–15 cm,采集量为 5 L,利用 HQ40D 便携式多参数仪(Hach Company)对水样 pH 进行原位值测量,底泥样品用无菌离心管采集,样品量约为 50 g。样品采集完成低温运回实验室,保存于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 。一部分样品用于 SRB 的富集培养,另一部分用于理化因子的测定。水体样品经 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,利用离子色谱(ICS-600, Thermo)和 ICP-OES (iCAP 7600+, Thermo)测定阴离子和阳离子含量。其中,各阳离子含量为该金属多种价态含量之和。底泥样品经冷冻干燥机(ALPHA 1-2ld)冷冻干燥,去除水分后进行研磨。研磨后的样品与超纯水以 1:5 的比例混合,使用振荡器(Vortex-Genie[®]2, QIAGEN)连续振荡 5 min,以 $8\ 500 \text{ r/min}$ 离心 10 min 获得上清液。上清液经过 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,利用 HQ40D 便携式多参数仪测定 pH,利用离子色谱(ICS-600, Thermo)和 ICP-OES (iCAP 7600+, Thermo)测定样品阴离子和阳离子的含量。

采用 Postgate's 培养基为生长和富集培养基(g/L): NaCl 2.0, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 0.5, NH₄Cl 1.0, MgSO₄·7H₂O 2.0, Na₂SO₄ 0.5, K₂HPO₄ 0.5, yeast extract 1.0, 20% NaOH 溶液调节 pH 值至 7.5。通高纯氮气进行除氧, 用高压蒸汽灭菌锅于 121 °C 灭菌 20 min, 待培养基温度降至 60 °C 以下, 在厌氧手套箱中加入用 0.22 μm 滤膜过滤除菌的乳酸钠溶液 (70%, 5 mL/L)。不额外添加硫酸根。

筛选培养基: 向液体培养基中加入 2% (w) 的琼脂, 用高纯氮气除氧, 于 121 °C 灭菌 20 min, 加入用 0.22 μm 滤膜过滤除菌的乳酸钠溶液, 每支厌氧试管分装 4.5 mL 培养基制成滚管。

1.2 SRB 的分离纯化

选取硫酸根含量最高的水体和底泥样品各一份进行 SRB 单菌株的分离纯化。取 5 g 底泥样品, 加入 45 mL 无菌水进行稀释使总质量为 50 g, 混合均匀制成悬液, 再以 1:10 的体积比分别将悬液和采集的水体样品接入含有 40 mL 的富集培养基的血清瓶中。接种完成后于 30 °C 的生化培养箱中静置培养, 当培养基完全变黑, 表面产生气泡, 同时瓶口散发臭鸡蛋气味时, 说明 SRB 已大量繁殖, 采用 Hungate's 滚管法筛选 SRB 单菌落^[19]。利用血细胞计数法检测富集菌液的细胞浓度, 以无氧生理盐水进行梯度稀释, 取 0.1 mL 细菌浓度为 10⁻²、10⁻¹、10⁰ 的菌液分别接种至厌氧管中, 于 30 °C 恒温培养箱倒置培养。观察到单菌落形成后, 挑选沿试管管壁分布稀疏且靠近管口的菌落接种。在厌氧手套箱中缓慢打开厌氧管的管帽和橡胶塞, 同时向试管内通入高纯氮气, 用无菌毛细管将挑到的菌落快速接入液体培养基中, 于 30 °C 恒温培养箱培养。重复上述接种和培养步骤, 直至获得 SRB 纯菌株。

1.3 SRB 的鉴定

1.3.1 形态学观察

菌株在厌氧固体培养基中生长后, 观察并记录菌落的形状、边缘、透明度和颜色等特征。在培养中和培养结束时分别取样涂片, 进行革兰氏染色, 判断菌株性质。取生长稳定期的菌液, 用浓度为 2.5% 的戊二醇固定 60 min, 利用扫描电子显微镜(日本日立公司, SU8010)观察菌株形貌特征。

1.3.2 分子生物学鉴定

采用裂解法提取菌株 DNA, 取 1 mL 菌液 12 000 r/min 离心 3 min 取其沉淀, 加入 50 μL lysis buffer, 在 72 °C 条件下水浴 10 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行 16S rRNA 基因的扩增, 引物为 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系为 Ex *Taq* 缓冲液 25 μL, 27F 正向引物 1.0 μL, 1492R 反向引物 1.0 μL, ddH₂O 18 μL, DNA 5 μL。反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 基于序列比对结果选取相近菌株 16S rRNA 基因序列, 使用最大似然法在 MEGA 11 软件上构建系统发育树, 自展重复值设为 1 000。测序数据已上传至 NCBI, 登录号为: SUB11308026。菌株已送至中国典型培养物保藏中心进行保藏, YQ-1 和 YQ-2 的保藏编号分别为: CCTCC AB 2022130 和 CCTCC AB 2022129。

1.4 SRB 的生长特性及不同温度和 pH 条件下的还原性能测定

1.4.1 菌株生长特性

实验组: 在 250 mL 血清瓶中, 加入 200 mL

硫酸根浓度为 1 100 mg/L 的 Postgate's 培养基, 接入 2 mL 筛选得到的纯菌株菌液。

对照组: 用等量的 Postgate's 液体培养基替代, 不接种菌液。

实验组和对照组各设置 3 个重复, 封口后放入 30 °C 的生化培养箱中静置培养, 定期取样测定细胞数量、pH、ORP (oxidation-reduction potential) 和硫酸根含量。利用血细胞计数板在显微镜下测定细胞数量。取洁净的血球计数板一块, 用移液器吸取 6.8 μ L 摇匀的菌液滴入计数区中央, 倾斜盖上盖玻片避免气泡产生, 静置片刻进行计数。使用 HQ40D 便携式多参数仪测量 pH 和 ORP 值。采用硫酸钡浊度比色法测定样品中的硫酸根含量。酸性条件下, 硫酸根与钡离子反应形成硫酸钡沉淀, 在 420 nm 波长下有最大吸收峰, 使用酶标仪 (Epoch, BioTek) 测定其吸光度, 根据标准曲线计算硫酸根含量。

1.4.2 不同温度和 pH 条件下菌株的还原性能

采用 Postgate's 培养基在不同温度和不同 pH 条件下对 SRB 单菌株进行培养, 探究菌株还原性能。根据山底河流域全年的平均温度 (10.1 °C)^[20], 设置培养温度为 30 °C、25 °C 和 15 °C。培养基初始 pH 调至 7.5 接入纯菌株菌液, 于不同温度培养箱中静置培养。根据样品的平均 pH 值 (4.77), 设置初始 pH 为 7.5、6.5、5.5 和 4.5。培养基初始 pH 调节至不同的梯度, 于 30 °C 培养箱中恒温培养。上述培养过程各设置 3 个重复, 定期取样测定硫酸根含量。

1.5 SRB 的驯化

1.5.1 不同温度下对 SRB 的驯化

采用梯度降温的方法对菌株进行低温驯化。将纯菌株接入生长培养基, 设置培养温度为 30 °C, 当培养基颜色变黑, 且醋酸铅试纸

条置于瓶口变黑时, 以 10% 的接种比例接种至新的生长培养基中, 降低培养温度至 25 °C 继续培养。待菌株生长再次接种至新的生长培养基, 下调温度至 15 °C 继续培养, 若菌株活性较低则进行多次接种, 直至培养基中出现大量黑色沉淀。低温驯化过程中保持培养基初始 pH 为 7.5。

1.5.2 不同 pH 下对 SRB 的驯化

当菌株在 15 °C 的条件下生长并进行硫酸盐还原时进行 pH 驯化。保持培养温度为 15 °C, 将低温驯化得到的菌株接入初始 pH 为 7.5 的生长培养基中, 作为菌株 pH 驯化的第一代。按照 7.5、6.5、5.5 和 4.5 的 pH 梯度, 菌株生长后立刻接种至初始 pH 更低的培养基中。当菌株接种至初始 pH 为 4.5 的培养基并大量生长时, 得到第四代菌株, 即耐低温和耐低 pH 的 SRB。

配制初始 pH 为 4.5 的生长培养基, 以 10% 比例接入生长到对数期的第四代菌株, 于 15 °C 生化培养箱中静置培养, 生长后得到第五代菌株。驯化过程中定期用注射器于厌氧瓶中取 2 mL 菌液测定硫酸根含量。

2 结果与讨论

2.1 样品理化性质分析

在山底河流域收集的水体和底泥样品大部分呈酸性, pH 值范围为 2.33–7.64 (表 1)。SO₄²⁻ 含量较高, 在水体中浓度值为 930–12 939 mg/L 含量远超正常的地表水标准 (250 mg/L)^[21], 在底泥中浓度值为 1 710–12 590 mg/kg。取样点 1 处重金属含量最高, 尤其是水体样本 S1 中 Al 和 Fe 的含量均超出了 1 400 mg/L。本研究选取硫酸根浓度最高的 S1 和 D1 样品, 开展 SRB 的筛选工作。

表 1 山底河河水(S)及底泥(D)样品的基本理化性质

Table 1 Physicochemical properties of Shandi River water (S) and sediment (D) samples

Sample	S1	S2	S3	S4	D1	D2	D3	D4
pH	2.33	6.91	3.61	6.23	3.18	7.57	5.68	7.64
SO ₄ ²⁻	12 939.00	930.00	1 842.00	967.00	12 590.00	1 725.00	8 360.00	1 710.00
Mn	41.50	2.63	5.83	2.46	37.65	3.30	6.20	2.25
Na	31.90	120.00	172.00	102.00	21.15	209.50	127.50	72.00
Mg	1 027.00	66.00	120.00	56.30	570.00	188.50	337.00	68.50
Ca	422.00	209.00	241.00	169.00	2 435.00	461.50	2 665.00	715.00
Al	1 400.00	0.01	22.00	0.05	530.00	0.10	0.00	0.15
Fe	1 438.00	0.04	3.85	0.07	111.00	0.00	0.00	0.05
Cl ⁻	2.23	32.00	40.60	32.20	1.50	29.15	20.05	13.60
NO ₃ ⁻	0.00	16.70	11.10	16.10	2.30	1.95	3.25	2.35

The unit of measurement content were S: mg/L; D: mg/kg.

2.2 SRB 的鉴定

经过筛选, 得到 2 株具有硫酸盐还原功能的革兰氏阴性纯菌株, 分别命名为 YQ-1 和 YQ-2。如图 1 所示, 菌株 YQ-1 呈两端钝圆椭球状, 无鞭毛, 长约 1.2–1.8 μm, 直径约 0.6–0.8 μm, 菌落形态为白色, 凸状隆起, 边缘整齐。菌株 YQ-2 呈两端锐圆椭球状, 向上拱起呈微弧状, 无鞭毛, 长约 0.8–1.2 μm, 直径约 0.2–0.3 μm, 菌落形态为米黄色, 凸状隆起。

将菌株 YQ-1 和 YQ-2 的测序序列提交到 NCBI 进行 BLAST 比对, 基于比对结果, 选

取 17 株单菌 16S rRNA 基因序列在 MEGA 11 中使用最大似然法构建系统发育树(图 2)。比对结果表明 YQ-1 与瘤胃解蛋白质菌属 (*Proteiniclasticum*) 的序列相似性较高, YQ-2 与脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 的序列相似性较高。菌株的系统发育树构建结果表明, YQ-1 与 *Proteiniclasticum ruminis* DSM 24773 strain D3RC-2 亲缘关系最近, 相似度达到了 100%。YQ-2 与 *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644 亲缘关系最近, 相似度同样达到 100%。

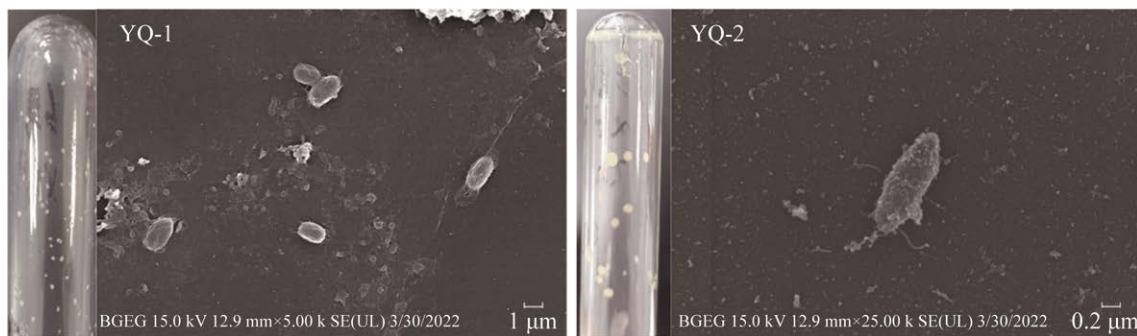


图 1 硫酸盐还原菌 YQ-1 和 YQ-2 菌株形态图

Figure 1 Strain morphology diagram of the sulfate-reducing bacteria YQ-1 and YQ-2.

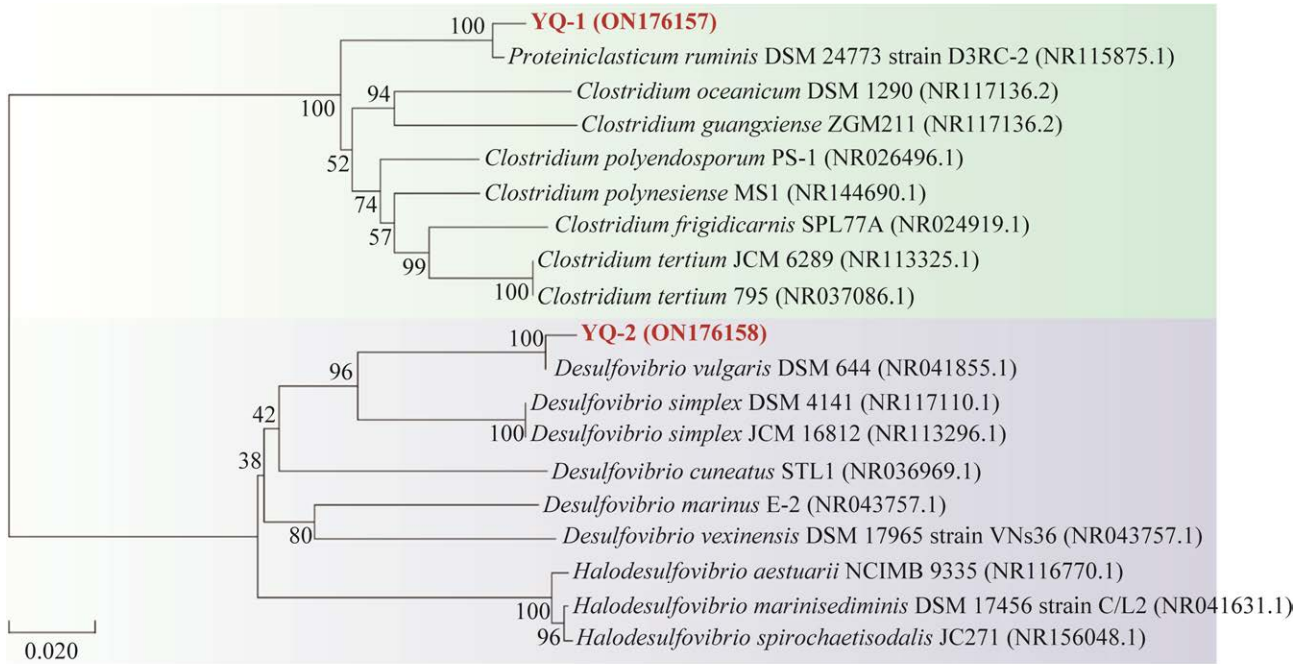


图2 菌株 YQ-1、YQ-2 和相关菌株的 16S rRNA 基因系统进化发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of YQ-1, YQ-2 and other related strains. Numbers in parentheses represent the NCBI reference sequence; numbers at the nodes indicate the bootstrap values on N-J analysis of 1 000 resampled data sets. The 0.02 scale bar represents 2% change of amino acid residues.

Proteiniaclasticum 属的菌株多从牦牛瘤胃中分离出来, 以蛋白质和纤维素为底物进行产酸反应, 具备污泥减量化的作用^[22]。近些年在酸性矿山废水污泥^[23]和厌氧反应器中都分离出 *Proteiniaclasticum* 属的菌株, 并发现该属菌株参与了体系内的硫代谢过程^[24]。 *Desulfovibrio* 是比较典型的硫酸盐还原菌, 前人采用 *Desulfovibrio medium* DSMZ 63 对酸性矿山废水进行处理, 发现该菌株能高效还原体系中的硫酸盐, 并去除重金属离子^[25]。

2.3 SRB 的生长特性

在 30 °C、pH 7.5 条件下培养 YQ-1 菌株。生长曲线表明, YQ-1 在第 1 天处于生长延滞期, 第 2 天开始大量繁殖, 进入生长对数期。第 5–6 天, 细胞浓度达到最大值, 菌株处于稳定生长期。第 7 天细胞数量开始减少, 菌株进入

衰亡期(图 3A)。对照组中, ORP 呈缓慢下降趋势, 下降幅度小, 降至-104.3 mV 后变得平缓, 硫酸根的初始浓度与终浓度无明显差别。实验组中, 初始 pH 值为 6.84, 前 3 d, pH 呈现先上升后下降的趋势, 在第 3 天到达最低点。第 4 天, pH 上升, 在第 8 天达到峰值 7.67, 再次下降至 7.4 左右逐步稳定(图 3B)。氧化还原电位呈下降趋势, 下降幅度显著, 从 36.86 mV 降至-428.21 mV, 第 5 天到达最低点后趋于平缓(图 3C)。硫酸根初始浓度为 1 137.5 mg/L, 第 5 天降至 48.75 mg/L, 最终硫酸根的去除率达到 96.25% (图 3D)。

在 30 °C、pH 7.5 条件下培养 YQ-2 菌株。生长曲线表明, 0–1 d, YQ-2 处于生长延滞期, 第 1–5 天为其对数生长期, 第 9 天进入衰亡期(图 4A)。在对照组中, 氧化还原电位缓慢下降, 第 8 天降至-104.3 mV 后无明显变化。

硫酸根的初始浓度与终浓度无明显差别。实验组 pH 波动较大, 第 1 天上升后立即下降, 第 2 天到达 pH 最低点, 之后波动变化, 总体呈上升趋势(图 4B)。培养过程中 pH 值呈现先升高后降低再逐渐升高的趋势, 可能与菌株的生长特性有关。生长初期, SRB 与体系内的硫酸根反应, 生成大量的 H_2S , 体系中 H^+ 减少, pH 升高。生长旺盛期, 细胞代谢不断积累有机酸等产物, pH 降低^[26]。氧化还原电位呈下降趋势, 下降幅度大, 16 d 后逐渐稳定在 -420 mV 左右(图 4C)。硫酸根浓度在 0-10 d 呈缓慢下降

趋势, 第 10-12 天下降速度加快。第 16 天时, 硫酸根浓度降至 318.75 mg/L, 最终硫酸根去除率达到 75.48%(图 4D)。

2.4 温度和 pH 对 SRB 还原硫酸根的影响

调节培养基的培养温度和初始 pH, 探究不同培养条件对菌株还原硫酸根的影响。结果表明, 在 YQ-1 培养过程中, 当保持初始 pH 7.5, 温度降到 25 °C 或 15 °C 时, 均未出现明显黑色沉淀, 体系内硫酸根的含量仍高于 1 000 mg/L (图 5A); 当保持培养温度为 30 °C, pH 6.5 或低于 6.5 时, 同样未出现明显黑色沉淀, 还原反

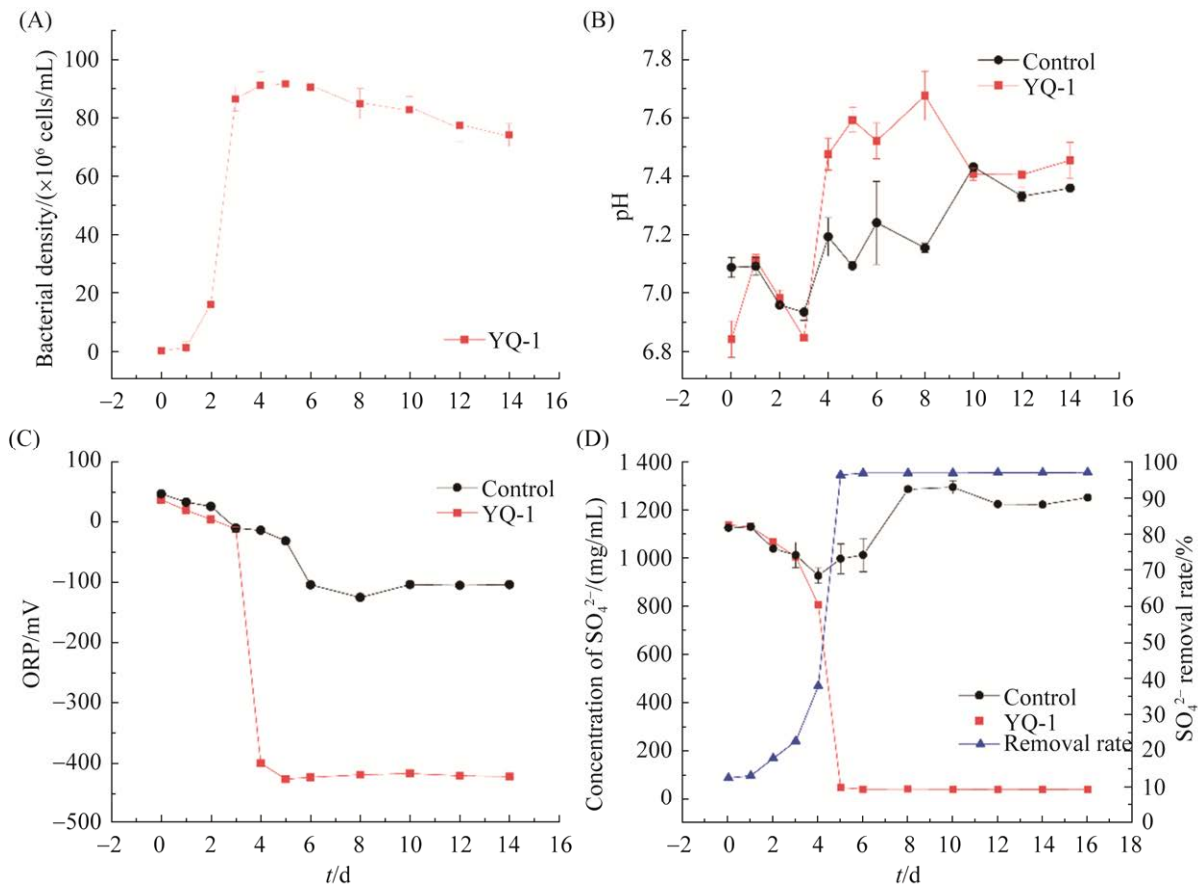


图 3 YQ-1 在 30 °C、pH 7.5 条件下的生长特性。YQ-1 培养过程中细菌密度(A)、pH(B)、氧化还原电位(C)和硫酸根含量(D)的变化

Figure 3 Growth characteristics of YQ-1 at 30 °C and pH 7.5. Changes of bacterial density (A), pH (B), ORP (C) and sulfate content (D) during YQ-1 culture. Error bars in figure representing standard deviation, reflecting the degree of dispersion of data between three samples.×

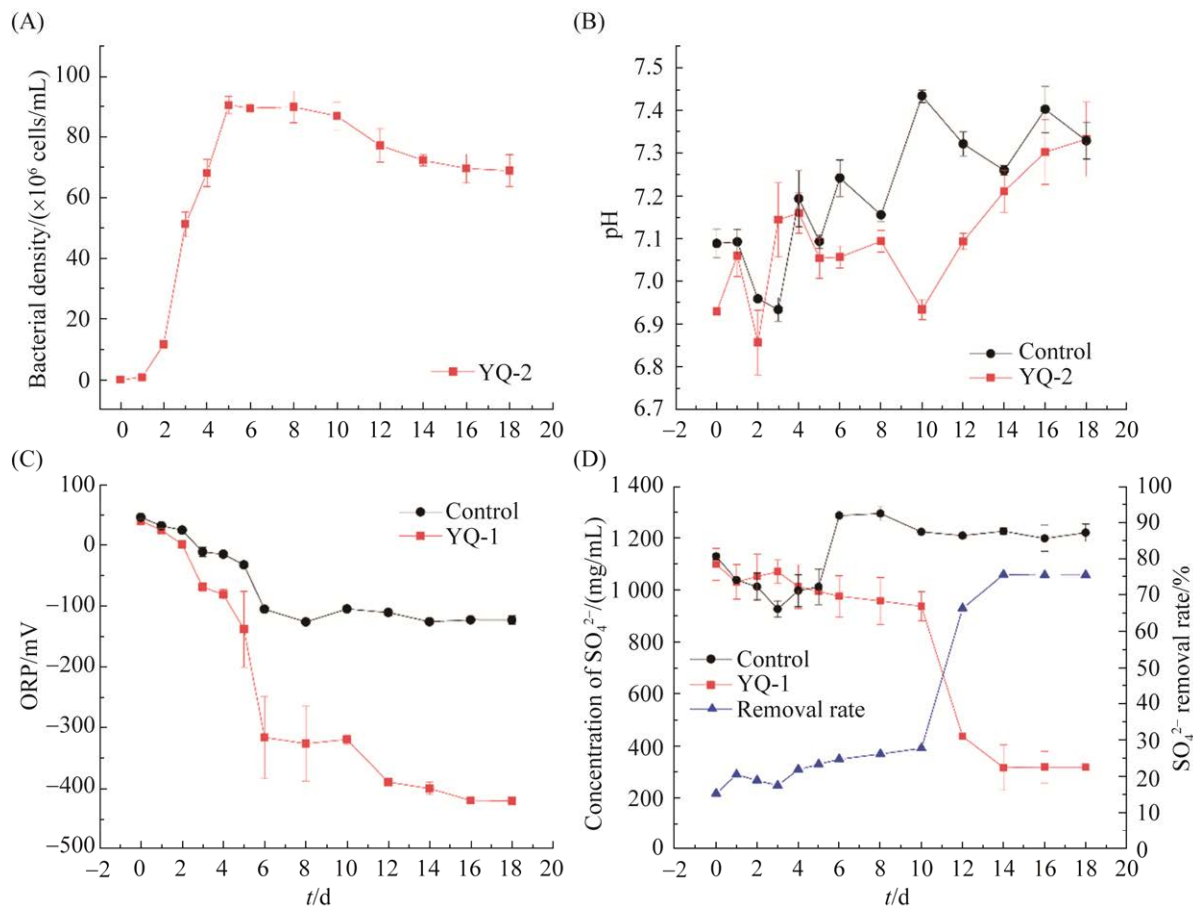


图 4 YQ-2 在 30 °C、pH 7.5 条件下的生长特性。YQ-2 培养过程中细菌密度(A)、pH(B)、氧化还原电位(C)和硫酸根含量(D)的变化

Figure 4 Growth characteristics of YQ-2 at 30 °C and pH 7.5. Changes of bacterial density (A), pH (B), ORP (C) and sulfate content (D) during YQ-2 culture. Error bars in figure represent standard deviation, reflect the degree of dispersion of data between three samples.

应作用较弱。培养到第 10 天时，体系内硫酸根含量仍高于 1 100 mg/L (图 5B)。YQ-1 在 30 °C、pH 7.5 的条件下还原效率较高，pH 和温度降低，还原能力减弱。低 pH 条件下，SRB 代谢能力下降，硫化物的化学平衡发生改变^[27]。前人在探究 pH 和温度对混合 SRB 还原能力的影响时发现，当 pH 低于 6.5、温度低于 25 °C 时，混合菌群的还原能力较弱^[28]，与本研究规律相似。温度低于 16 °C 或高于 47 °C 时，与 YQ-1 亲缘关系较近的 *Proteiniclasticum* BAD-10^T 降解能力明显减弱^[29]，表明温度影响菌株性能。

YQ-2 在不同条件下的还原效果与 YQ-1 类

似，效率受温度和 pH 的影响较大。YQ-2 的生长速度较慢，在 30 °C、pH 7.5 条件下，需要 16 d 将体系中的硫酸盐还原到 400 mg/L 左右 (图 6)。YQ-2 在 30 °C、pH 7.5 条件下还原效率较高，与其亲缘关系较近的 *Desulfovibrio vulgaris* DSM 644^T 菌株有相同的生长特性^[30]。低温和酸性条件会抑制微生物的生长繁殖，导致代谢活动减弱^[31]，进而降低菌株的还原效率。前人对从处理硫酸盐废水的厌氧反应器中分离得到的脱硫菌属进行功能研究，发现当温度低于 25 °C 或 pH 小于 5 时该菌株无明显生长现象^[32]，这与本研究中菌株的生长特性相似。

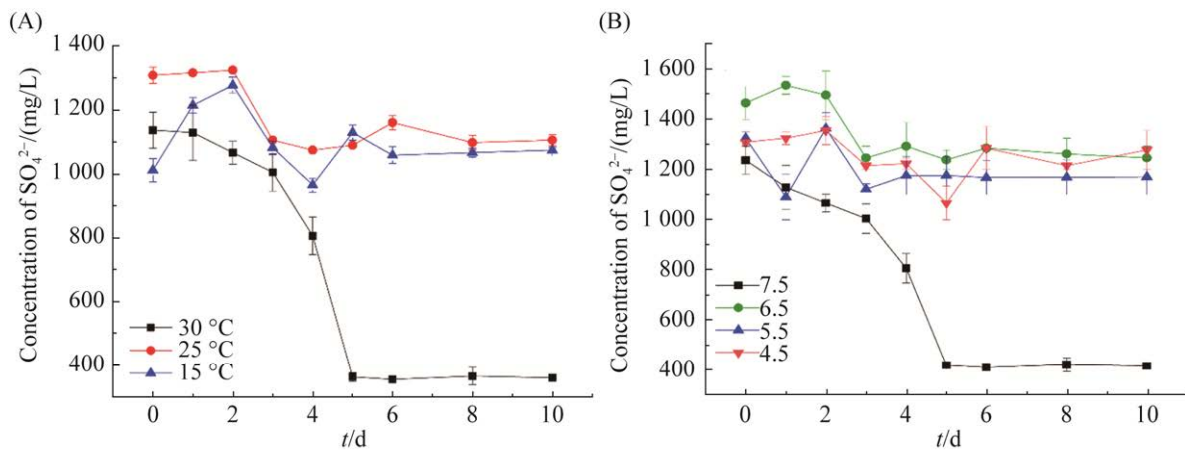


图 5 温度(A)和 pH (B)对 YQ-1 硫酸盐还原效率的影响

Figure 5 The effect of temperature (A) and pH (B) on the sulfate reduction efficiency of YQ-1. Error bars in figure represent standard deviation, reflecting the degree of dispersion of data between three samples.

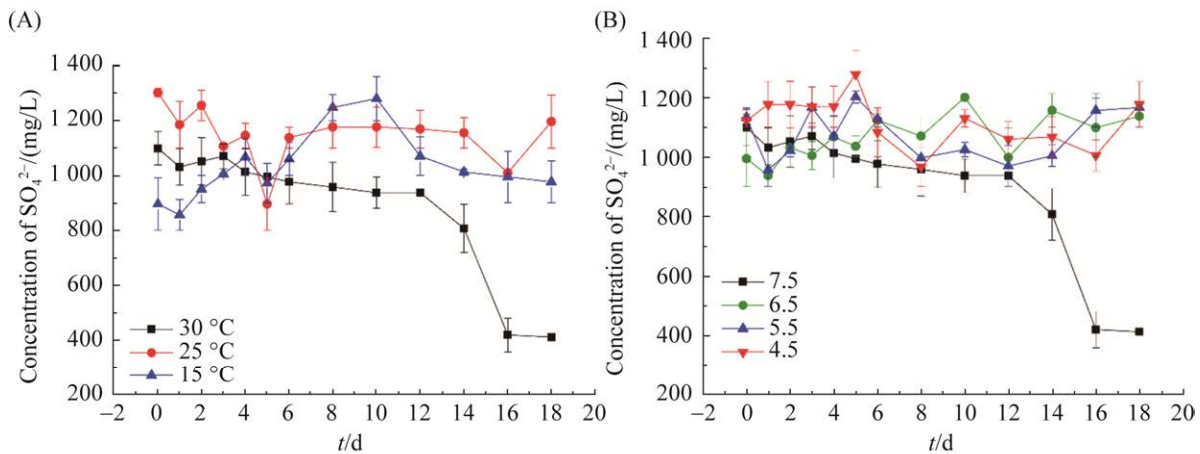


图 6 温度(A)和 pH (B)对 YQ-2 硫酸盐还原效率的影响

Figure 6 The effect of temperature (A) and pH (B) on the sulfate reduction efficiency of YQ-2. Error bars in figure represent standard deviation, reflecting the degree of dispersion of data between three samples.

2.5 SRB 的驯化培养

山底河流域属于温带大陆性气候, 年平均温度为 10.1 °C, 流域中被污染水体呈酸性^[19]。为了提高 SRB 在低温和低 pH 条件下的还原效率, 本研究选取生长速度快且还原效率高的 YQ-1 进行驯化。采用梯度降温的方法使 YQ-1 逐渐适应低温环境。结果表明, 在温度 15 °C、pH 7.5 的相同体系内, YQ-1 驯化前的还原效率为 5.80%, 经过低温驯化后还原效率提高至 91.49%, 略低于 30 °C、pH 7.5 条件下的硫酸盐去除率。驯化前

SRB 由于温度大幅降低, 酶的活性受到影响, 繁殖速度减慢, 新陈代谢减弱^[33]。而经过驯化的 SRB 则在逐步降低温度的过程中适应了低温环境。有研究对矿区富集的 SRB 菌群进行低温驯化, 得到在 14 °C 培养条件下, 硫酸根去除率达到 70%的 SRB 菌群^[34]。

保持培养温度为 15 °C, 梯度降低体系的初始 pH 值, 对菌株进一步驯化。结果表明, 初始 pH 为 7.5 的一代菌株还原效率为 91.60%, 初始 pH 为 6.5、5.5 的二、三代菌株还原效率分别为

76.04%和 53.65%，初始 pH 为 4.5 的四代菌株还原效率为 34.12%。随着初始 pH 逐步降低，YQ-1 的还原效率逐渐降低(图 7)。在驯化过程中，对体系内的菌体生物量进行监测。结果表明，当体系内发生大量还原反应时，初始 pH 为 7.5 的体系中菌体生物量为 6.32×10^7 cells/mL，初始 pH 为 6.5、5.5 和 4.5 的体系中菌体生物量分别为 5.44×10^7 、 1.36×10^7 和 6.01×10^6 cells/mL。在初始 pH 7.5 和 6.5 的条件下，硫酸盐还原菌菌体数量差异不大，但其还原效率仍为下降趋势，可能是 pH 对菌体酶活性的抑制及代谢过程造成影响所导致。随着初始 pH 的逐步下调，菌体生物量降低，生长受到抑制。这说明在驯化过程

中硫酸盐还原菌的自身还原能力和生长都受到抑制，从而造成硫酸根还原能力降低。相较培养温度，pH 对 YQ-1 的影响更大。在一些对 SRB 生长条件的研究中发现存在类似现象^[9,35]，这可能与菌株的分离环境有关。当 pH 逐步降低，细胞膜是微生物在低 pH 环境中生理胁迫的首要侵袭目标，细胞膜中脂肪酸的组成和比例的变化是其对外部环境胁迫的一般性应答。经过梯度耐酸驯化，微生物细胞膜中单不饱和脂肪酸的含量和碳链长度比例增加，降低了细胞膜对 H^+ 的透过性，防止细胞膜内的 pH 迅速下降，以维持细胞正常的生理功能，从而能在低 pH 的环境生存^[36]。

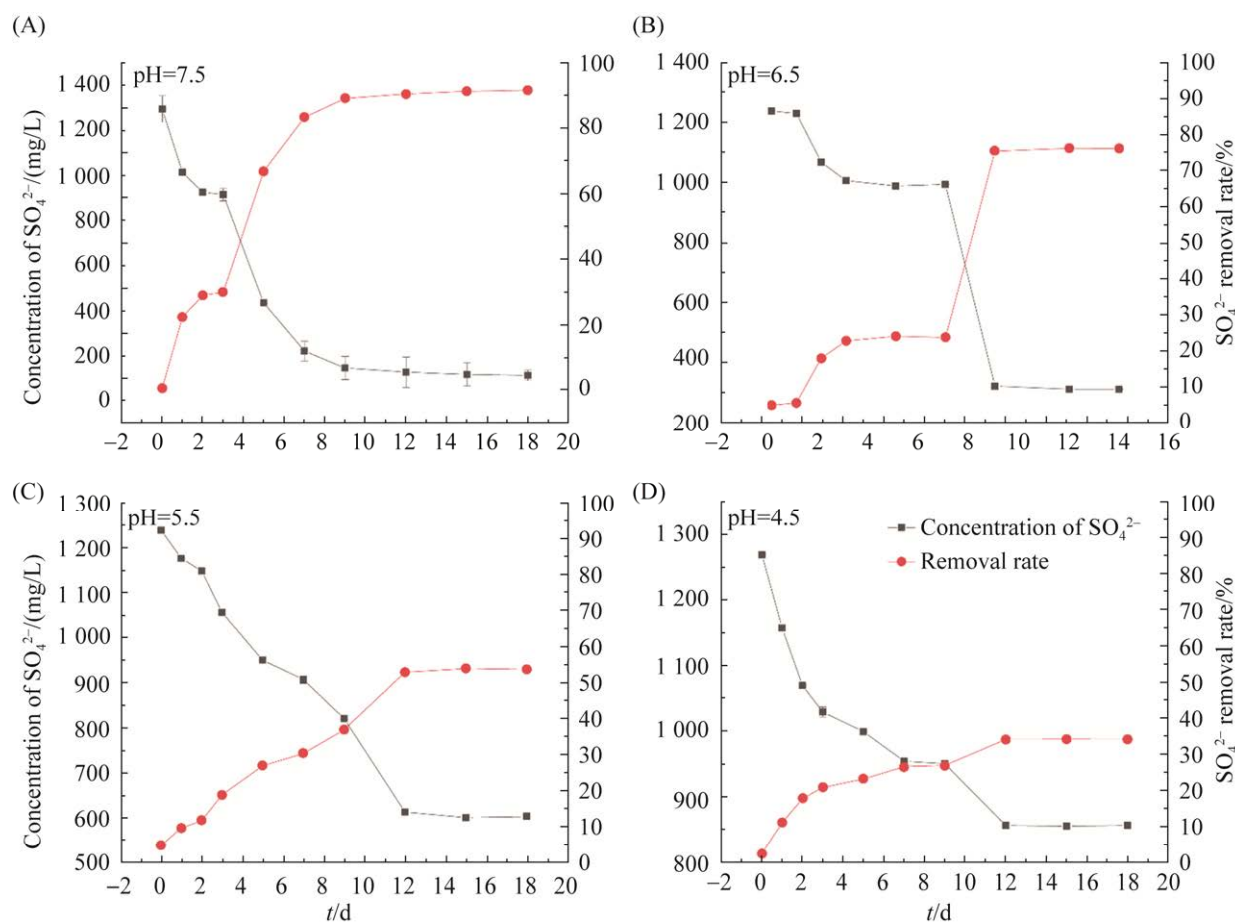


图 7 培养温度为 15 °C，YQ-1 在不同起始 pH 条件下 SO_4^{2-} 的变化及去除率

Figure 7 Variation of SO_4^{2-} and removal rate of YQ-1 under different starting pH conditions at 15 °C. Error bars in figure represent standard deviation, reflecting the degree of dispersion of data between three samples.

对四代 SRB 菌株进行传代培养, 得到五代耐性菌株。将生长培养基的初始 pH 调至 4.5, 以 10% 的比例加入生长到对数期的四代菌株, 于 15 °C 生化培养箱中静置培养, 定期测定 pH 值和 SO_4^{2-} 浓度。结果表明, 五代菌株的硫酸盐去除率为 37.21%, 比四代菌株的还原效率提高了 3.09% (图 8)。

比较 YQ-1 驯化前后的硫酸根去除率, 结果表明, 在相同的培养条件(15 °C、pH 4.5) 下, YQ-1 未驯化时还原效率仅有 2.91%, 经过驯化和传代, 还原效率提高到了 37.21%, 驯化效果显著(图 9)。细菌通过广泛的适应性反应和抗性机制来应对自然界的挑战^[37], 驯化过程即为逐步改变外界条件提高细菌对外界条件的适应性, 在这个过程中活力较强的菌株发生变异, 演变为耐性菌株^[38]。细菌驯化后的广泛多样性和适应度数据表明, 不同的菌株具有不同的选择目标, 即使在单一物种内, 基因型与环境的相互作用也是极其复杂的, 其驯化结果随培养条件改变而发生变化^[39]。有研究在温度为 35 °C

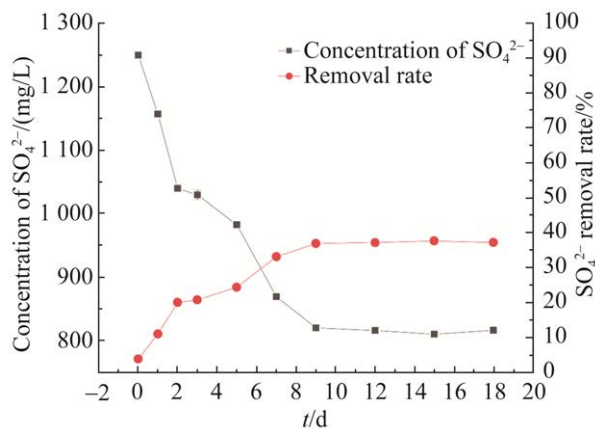


图 8 YQ-1 驯化后进行传代的 SO_4^{2-} 变化及去除率

Figure 8 Changes in SO_4^{2-} and removal rate of domesticated YQ-1 after passaging. Error bars in figure represent standard deviation, reflecting the degree of dispersion of data between three samples.

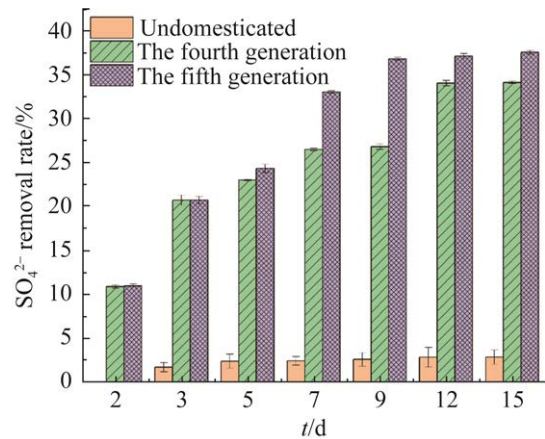


图 9 YQ-1 驯化前后 SO_4^{2-} 去除率的比较

Figure 9 Comparison of SO_4^{2-} removal rate before and after domestication of YQ-1. Error bars in figure represent standard deviation, and different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

条件下对 SRB 进行 pH 梯度驯化, 驯化后 SRB 能在 pH 为 4 的条件下生长并去除体系内 15% 的硫酸根, 传代后还原效率提高, 硫酸根去除率达到 38%^[40], 与本研究得到的驯化规律相似。微生物能否长期连续传代, 是衡量微生物是否稳定的经典方法之一^[41]。YQ-1 经过驯化和传代仍能稳定生存, 说明菌株已经适应新环境, 菌株具有稳定性。

3 结论与展望

本研究通过对来自山底河流域的样品进行微生物富集、筛选、分离与鉴定, 获得 2 株具有高效还原能力的硫酸盐还原菌, 分别隶属于瘤胃解蛋白质菌属(*Proteiniclasticum*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*), 将其命名为 YQ-1 和 YQ-2。2 株菌均能在 30 °C、pH 7.5 的培养条件下还原硫酸盐, 其中 YQ-1 还原效率为 96.25%, YQ-2 还原效率为 75.48%。当温度和 pH 降低时, YQ-1 和 YQ-2 还原能力减弱。选取还原效率较高的 YQ-1 进行梯度驯化实验, 驯化培养和传代后, 最终得到在 15 °C、pH 4.5 条件下, 硫酸盐还原

效率为 37.21%的耐性菌株。驯化前, YQ-1 在相同条件下还原效率只有 2.70%, 驯化后还原效率得到显著提高。驯化实验表明, SRB 具有适应低温和低 pH 环境的能力, 继续进行驯化工作可使其具有更高的还原能力。本研究证实了微生物驯化对北方老窑水的高效治理具有可行性, 同时适应低温和低 pH 条件的硫酸盐还原菌也为北方老窑水的治理提供了可利用菌种资源。

参考文献

- [1] Jiang CF, Gao XB, Hou BJ, Zhang ST, Zhang JY, Li CC, Wang W. Occurrence and environmental impact of coal mine goaf water in karst areas in China. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 275: 123813.
- [2] Gui HR, Qiu HL, Qiu WZ, Tong SJ, Zhang HZ. Overview of goaf water hazards control in China coalmines. *Arabian Journal of Geosciences*, 2018, 11(3): 1–10.
- [3] Luo B, Sun YJ, Xu ZM, Chen G, Zhang L, Lu WN, Zhao XM, Yuan HQ. Damage characteristics and mechanism of the 2017 groundwater inrush accident that occurred at Dongyu Coalmine in Taiyuan, Shanxi, China. *Water*, 2021, 13(3): 368–378.
- [4] 常彩叶. 浅谈中国煤矿水文地质类型划分与特征. *西部探矿工程*, 2021, 33(11): 132–133.
Chang CY. A brief discussion on the classification and characteristics of coal mine hydrogeology in China. *West-China Exploration Engineering*, 2021, 33(11): 132–133. (in Chinese)
- [5] Kushkevych I, Hýžová B, Vítězová M, Rittmann SKMR. Microscopic methods for identification of sulfate-reducing bacteria from various habitats. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 4007–4034.
- [6] Willis G, Nancucheo I, Hedrich S, Giaveno A, Donati E, Johnson DB. Enrichment and isolation of acid-tolerant sulfate-reducing microorganisms in the anoxic, acidic hot spring sediments from Copahue volcano, Argentina. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, 95(12): fiz175.
- [7] Peña-Ocaña BA, Ovando-Ovando CI, Puente-Sánchez F, Tamames J, Servín-Garcidueñas LE, González-Toril E, Gutiérrez-Sarmiento W, Jasso-Chávez R, Ruiz-Valdiviezo VM. Metagenomic and metabolic analyses of poly-extreme microbiome from an active crater volcano lake. *Environmental Research*, 2022, 203: 111862.
- [8] Zhou JM, Xing JM. Haloalkaliphilic denitrifiers-dependent sulfate-reducing bacteria thrive in nitrate-enriched environments. *Water Research*, 2021, 201: 117354.
- [9] Wang F, Peng SQ, Fan L, Li Y. Improved sulfate reduction efficiency of sulfate-reducing bacteria in sulfate-rich systems by acclimatization and multiple-grouting. *Alexandria Engineering Journal*, 2022, 61(12): 9993–10005.
- [10] Song XY, Zeng JN, Zhou Y, Chen QZ, Yang HS, Shou L, Liao YB, Huang W, Du P, Liu Q. Partial function prediction of sulfate-reducing bacterial community from the rhizospheres of two typical coastal wetland plants in China. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2021, 39(1): 185–197.
- [11] Li X, Lan SM, Zhu ZP, Zhang C, Zeng GM, Liu YG, Cao WC, Song B, Yang H, Wang SF, Wu SH. The bioenergetics mechanisms and applications of sulfate-reducing bacteria in remediation of pollutants in drainage: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 158: 162–170.
- [12] Dhar V, Singh R. Impact of partially submersed iron scraps in simultaneously sulfate and nitrate removal using sulfate-reducing bacteria. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 24: 101823.
- [13] Kushkevych I, Kovářová A, Dordevic D, Gaine J, Kollar P, Vítězová M, Rittmann SKMR. Distribution of sulfate-reducing bacteria in the environment: cryopreservation techniques and their potential storage application. *Processes*, 2021, 9(10): 1843–1864.
- [14] Van Den Brand T, Snip L, Palmen L, Weij P, Sipma J, Van Loosdrecht M. Sulfate reducing bacteria applied to domestic wastewater. *Water Practice & Technology*, 2018, 13(3): 542–554.
- [15] Lu Z, Imlay JA. When anaerobes encounter oxygen: mechanisms of oxygen toxicity, tolerance and defence. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(12): 774–785.
- [16] Ayangbenro AS, Olanrewaju OS, Babalola OO. Sulfate-reducing bacteria as an effective tool for

- sustainable acid mine bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1986.
- [17] Wang ZL, Xu YX, Zhang ZX, Zhang YB. Review: acid mine drainage (AMD) in abandoned coal mines of Shanxi, China. *Water*, 2021, 13(1): 8–29.
- [18] 杨春璐, 闫鹏举, 魏宠, 史荣久, 韩斯琴, 张颖, 万传明. 一株源自渤海海域高温酸败油井采出水的硫酸盐还原菌筛选与活性抑制. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1332–1341.
- Yang CL, Yan PJ, Wei C, Shi RJ, Han SQ, Zhang Y, Wan CM. Isolation and activity inhibition of a sulfate-reducing bacterium in produced water from an offshore high-temperature soured oilfield in the Bohai Sea area, China. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1332–1341. (in Chinese)
- [19] Alazard D, Joseph M, Battaglia-Brunet F, Cayol JL, Ollivier B. *Desulfosporosinus acidiphilus* sp. nov.: a moderately acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acid mining drainage sediments. *Extremophiles*, 2010, 14(3): 305–312.
- [20] 刘强. 阳泉市山底河流域酸性老窑水形成机制及其影响研究. 太原理工大学硕士学位论文, 2018.
- [21] 国家环境保护总局. 地表水环境质量标准, 2002.
- [22] Virpiranta H, Sotaniemi V, Leiviskä T, Taskila S, Rämö J, Johnson DB, Tanskanen J. Continuous removal of sulfate and metals from acidic mining-impacted waters at low temperature using a sulfate-reducing bacterial consortium. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 427: 132050.
- [23] Bao YX, Liu JW, Zhang X, Lei P, Qiu JG, He J, Li N. *Sinanaerobacter chloroacetimidivorans* gen. nov., sp. nov., an obligate anaerobic bacterium isolated from anaerobic sludge. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2021, 114(10): 1609–1617.
- [24] Pérez-Díaz MI, Zárate-Segura P, Bermeo-Fernández LA, Nirmalkar K, Bastida-González F, García-Mena J, Jan-Roblero J, Guerrero-Barajas C. Bacterial consortium from hydrothermal vent sediments presents electrogenic activity achieved under sulfate reducing conditions in a microbial fuel cell. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2020, 18(2): 1189–1205.
- [25] Hwang SK, Jho EH. Heavy metal and sulfate removal from sulfate-rich synthetic mine drainages using sulfate reducing bacteria. *The Science of the Total Environment*, 2018, 635: 1308–1316.
- [26] 戴祥昕, 桂梦瑶, 杜俊逸, 吴代赦. 硫酸盐还原菌包覆矿石控制酸性废水排放及碳源的优选研究. *地球与环境*, 2021, 49(1): 73–81.
- Dai XX, Gui MY, Du JY, Wu DS. Sulphate-reducing bacteria covered mine refuse to control acid mine drainage and the optimization of relevant carbon sources. *Earth and Environment*, 2021, 49(1): 73–81. (in Chinese)
- [27] Dev S, Galey M, Chun CL, Novotny C, Ghosh T, Aggarwal S. Enrichment of psychrophilic and acidophilic sulfate-reducing bacterial consortia - a solution toward acid mine drainage treatment in cold regions. *Environmental Science Processes & Impacts*, 2021, 23(12): 2007–2020.
- [28] 刘辰, 周磊, 高洁, 张厚军. 混合硫酸盐还原菌的筛选及其生理特性研究. *铀矿冶*, 2017, 36(3): 217–221.
- Liu C, Zhou L, Gao J, Zhang HJ. The study on screening and physiological characteristics of mixed sulfate reducing bacteria. *Uranium Mining and Metallurgy*, 2017, 36(3): 217–221. (in Chinese)
- [29] Liu JW, Bao YX, Zhang X, Zhao SY, Qiu JG, Li N, He J. Anaerobic biodegradation and detoxification of chloroacetamide herbicides by a novel *Proteiniclasticum sediminis* BAD-10^T. *Environmental Research*, 2022, 209: 112859.
- [30] Leavitt WD, Venceslau SS, Waldbauer J, Smith DA, Pereira IAC, Bradley AS. Proteomic and isotopic response of *Desulfovibrio vulgaris* to DsrC perturbation. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 658.
- [31] Phyto AK, Jia Y, Tan Q, Sun H, Liu Y, Dong B, Ruan R. Competitive growth of sulfate-reducing bacteria with bioleaching acidophiles for bioremediation of heap bioleaching residue. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(8): 2715–2729.
- [32] 董艳荣, 狄军贞, 胡海洋, 周君厚, 阮滨, 孙雪莹, 赵中茜. 硫酸盐还原菌分离及其处理煤矿酸性废水工艺的实验研究. *水资源与水工程学报*, 2019, 30(2): 25–30.
- Dong YR, Di JZ, Hu HY, Zhou JH, Ruan Z, Sun XY, Zhao ZQ. Experimental study in isolation of sulfate reducing bacteria and treatment of acid mine drainage process. *Journal of Water Resources and Water Engineering*, 2019, 30(2): 25–30. (in Chinese)
- [33] 吴文菲, 刘波, 李红军, 李松, 陈泽智. pH、盐度对微生物还原硫酸盐的影响研究. *环境工程学报*, 2011,

- 5(11): 2527–2531.
- Wu WF, Liu B, Li HJ, Li S, Chen ZZ. Effect of pH and salinity on sulfate reduction by microorganism. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(11): 2527–2531. (in Chinese)
- [34] Virpiranta H, Taskila S, Leiviskä T, Rämö J, Tanskanen J. Development of a process for microbial sulfate reduction in cold mining waters - cold acclimation of bacterial consortia from an Arctic mining district. *Environmental Pollution*, 2019, 252(Pt A): 281–288.
- [35] Putri AYP, Widjajanti H, Handayani HE. Isolation and potency test of sulfate reducing bacteria (SRB) as bioremediation agent for ex-coal mining soil. *Sriwijaya Journal of Environment*, 2020, 5(1): 23–29.
- [36] 夏凯, 朱军莉, 梁新乐. 醋酸菌耐酸机理及其群体感应研究新进展. *微生物学报*, 2017, 57(3): 321–332.
Xia K, Zhu JL, Liang L. Advances in acid resistant mechanism of acetic acid bacteria and related quorum sensing system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(3): 321–332. (in Chinese)
- [37] Hao T, Xiang P, Mackey HR, Chi K, Lu H, Chui H, Van Loosdrecht MC, Chen G. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment. *Water Research*, 2014, 65: 1–21.
- [38] Steensels J, Gallone B, Voordeckers K, Verstrepen KJ. Domestication of industrial microbes. *Current Biology*, 2019, 29(10): R381–R393.
- [39] Eydallin G, Ryall B, Maharjan R, Ferenci T. The nature of laboratory domestication changes in freshly isolated *Escherichia coli* strains. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(3): 813–828.
- [40] 段黎, 皮科武. 硫酸盐还原菌的驯化及硫酸盐降解动力学研究. *湖北工业大学学报*, 2016, 31(2): 116–120.
Duan L, Pi KW. Study on the domestication of sulphate reducing bacteria and the kinetics of sulphate degradation. *Journal of Hubei University of Technology*, 2016, 31(2): 116–120. (in Chinese)
- [41] 孔亚楠, 张文羿, 白梅, 乌云, 赵亚荣, 张和平. 益生菌 *Lactobacillus plantarum* P-8 长期连续传代 1 000 代过程中稳定性的研究. *中国乳品工业*, 2013, 41(4): 15–18.
Kong YN, Zhang WY, Bai M, Wu Y, Zhao YR, Zhang HP. Stability of the probiotic *Lactobacillus plantarum* P-8 after long-term continuous subculturing for 1 000 generations. *China Dairy Industry*, 2013, 41(4): 15–18. (in Chinese)



马丽媛, 副教授, 博导, “地大学者”青年拔尖人才。入选中国科协“优秀中外青年交流计划”, 担任河南省地质学会生态地质专委会副秘书长。长期从事微生物介导的元素地球化学循环、微生物功能组学及微生物生态学研究, 以极端酸性矿山、铅锌/锑冶炼场地和煤矿老窑水为研究载体, 主持国家自然科学基金、国家重点研发计划子课题、湖北省自科等科研项目 8 项。担任智利南极研究所(INACH)国际项目评审专家, 担任 *Frontiers in Microbiology Review* 编辑。参与中国大学 MOOC《普通生物学》课程建设, 参编教材/专著 2 部, 已授权发明专利 2 项。发表 SCI 论文 50 余篇, 在 *Bioresource Technology*、*mSystems*、*Science of the Total Environment*、*Microbiology Spectrum* 等刊物上以第一和通讯作者发表学术论文 17 篇, 引用次数 800 余次, Google Scholar H 指数 21。