

高效硫酸盐还原菌的分离鉴定及其特性研究

马保国^{1,2}, 胡振琪¹, 张明亮¹, 陈胜华¹, 王 萍¹, 黄晓燕¹

(1. 中国矿业大学(北京)土地复垦与生态重建研究所, 北京 100083; 2. 河北工程大学水利水电学院, 河北 邯郸 056021)

摘要:从煤矸石山淋溶水长期污染的黄土中分离获得一株硫酸盐还原菌。研究了菌株的生理生态特性,探讨了温度、pH 和氧气对菌株的生长及转化硫酸盐效能的影响。结果表明,该菌株是革兰氏阳性菌,可以含有醇羟基的有机碳为碳源(电子供体),硫酸盐等为硫源(电子受体);在有氧和无氧条件下均能生长,菌株为兼性厌氧菌;生长的最适宜 pH 为 7.16;最适生长温度为 35 ℃;硫酸盐转化率最高达 94.3%。同时测定了菌株的生长曲线。

关键词:硫酸盐还原菌;菌株分离;生理特性;硫酸盐还原

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)02-0608-04

Isolation and Identification of High Efficient Sulfate-reducing Bacteria and Its Characteristics

MA Bao-guo^{1,2}, HU Zhen-qi¹, ZHANG Ming-liang¹, CHEN Sheng-hua¹, WANG Ping¹, HUANG Xiao-yan¹

(1. Institute of Land Reclamation and Ecological Restoration, China University of Mining and Technology, Beijing 100083, China; 2. College of Water Resource and Hydroelectricity, Hebei University of Engineering, Handan 056021, China)

Abstract: Sulfate-reducing bacteria (SRB) is isolated from the loess polluted by acid mine drainage in coal mining area in western China. The physiological characteristics of SRB's physiology characteristics and the effect of environmental factors such as temperature, pH and O₂ on sulfate reduction are studied. The results show that this strain of SRB is Gram-positive, and can grow with hydroxy organic carbon as electron donors and SO₄²⁻ as electron acceptor under both anaerobic and aerobic conditions. The sulfate is reduced in this process and the rates of sulfate reduction reaches 94.3%. The optimum conditions for SRB growth are found to be at pH 7.16, 35 ℃. The growth curve of SRB is also identified in this paper.

Keywords: SRB; strain isolation; strain characteristics; sulfate reduction

硫酸盐还原菌 (Sulfate Reducing Bacteria, 简称 SRB) 是一种厌氧性微生物,广泛存在于土壤、海水、污水等缺氧和局部缺氧环境中^[1]。据不完全统计,目前硫酸盐还原菌已有 12 个属,近 40 个种^[2]。有脱硫弧菌 (*Desulfovibrio*),脱硫肠状菌 (*Desulfotomaculum*) 和脱硫单胞菌 (*Desulfomonas*) 等属。硫酸盐还原菌是一种厌氧的革兰氏阴性菌,单细胞,无色,无芽孢,以单极鞭毛运动;在广泛利用有机物的同时把硫酸盐、亚硫酸盐、硫、硫代硫酸盐和连二亚硫酸盐还原成硫化氢,

不沉积铁的氧化物。从环境中分离硫酸盐还原菌,并对其生物学特性进行研究,国内已有报道^[3-6]。关于从煤矸石和长期受煤矸石酸性淋溶水污染的黄土中分离硫酸盐还原菌及其特性的研究还未见报道。

本试验从长期受煤矸石山酸性淋溶水污染的黄土中,分离、纯化得到一株硫酸盐还原菌,并对菌株进行了形态、生理生化鉴定,研究了菌株的生存环境条件及其对硫酸盐转化效果,为酸性煤矸石山硫污染治理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源

用于分离菌种的土样采自山西省阳煤集团三矿的煤矸石山下,长期受煤矸石淋溶水污染的土壤,取样土层为煤矸石覆盖的亚表层土。

收稿日期:2007-07-17

基金项目:国家高技术研究发展(863)计划项目(2006AA06Z355);教育部新世纪优秀人才计划项目(NCET-04-0484)

作者简介:马保国(1967—),男,河北邯郸人,博士研究生,副教授,主要从事污染环境的生物修复技术方面研究。

E-mail:mabg1166@sohu.com

通讯作者:胡振琪 E-mail:huzq@cumt.edu.cn

1.2 培养基

富集培养基: K_2HPO_4 0.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g; NaHCO_3 0.5 g; CaCl_2 0.2 g; MgSO_4 1.0 g; 乳酸钠 2.0 mL; Vc 0.1 g; 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g; 酵母膏 1.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 0.5 g; 蒸馏水 1 000 mL; pH 7.2。

固体培养基: 在配好的液体培养基中加入琼脂粉, 琼脂浓度为 2%, 在 0.1 MPa, 121 °C 下灭菌 20 min。

1.3 菌株的分离与纯化

采用 100 mL 具塞三角瓶, 分装一定体积的上述液体培养基后高压灭菌, 按 5% 的接种量接种土样至充满状态, 密封 30 °C 厌氧培养, 当溶液变为墨汁色且瓶口处散发出臭鸡蛋味时表明硫酸盐还原菌已大量繁殖。取 10% 的培养液转移培养多次, 以除去大部分异养细菌。培养 2 d 后, 用稀释涂布-叠皿夹层培养法进行厌氧分离培养^[7,8], 5~6 d 后长出一个个单菌落, 挑取单菌落转入液体培养基进行厌氧培养。重复进行稀释涂布、夹层培养、挑选等 2 次, 可得到对 SRB 的纯化, 获得可以鉴定、保存、转接的纯菌株。

1.4 菌株的鉴定

革兰氏染色油镜观察拍片, 进行菌种生理生化鉴定。

将培养的菌株试管在沸水中煮 30 min 后, 无菌接入含 Fe 培养液中, 30 °C 厌氧培养, 一周后观察结果。

1.5 菌株的特性研究

1.5.1 生长曲线测定

用培养液的光密度间接表示细菌数量, 以不接种的培养基为对照, 以一定时间间隔测定接种液的 OD_{600} , 做出 OD_{600} -t 曲线。培养液的光密度变化可以反映微生物生长的不同阶段。

1.5.2 温度、pH 和氧气对菌株生长的影响

以 5% 接种量将菌株接种于培养液中, 分别 20、25、30、35、40、45、50 °C 培养 2 d。以未接种的培养液作空白对照, 根据各培养液的 OD_{600} 值, 记录其生长的温度范围和最适温度。

以 5% 接种量将菌株接种于 pH 分别为 (实测) 3.37、4.37、5.35、5.93、6.21、6.59、7.16、8.05、9.26、9.89 的培养液中, 30 °C 下培养 2 d。以未接种的培养液作空白对照, 根据各培养液的 OD_{600} 值, 记录其生长的 pH 范围和最适 pH。

此实验的培养基按常规方法制作, 不除氧。接入菌种, 分别按照好氧和厌氧条件培养。

1.5.3 硫酸盐还原率的测定

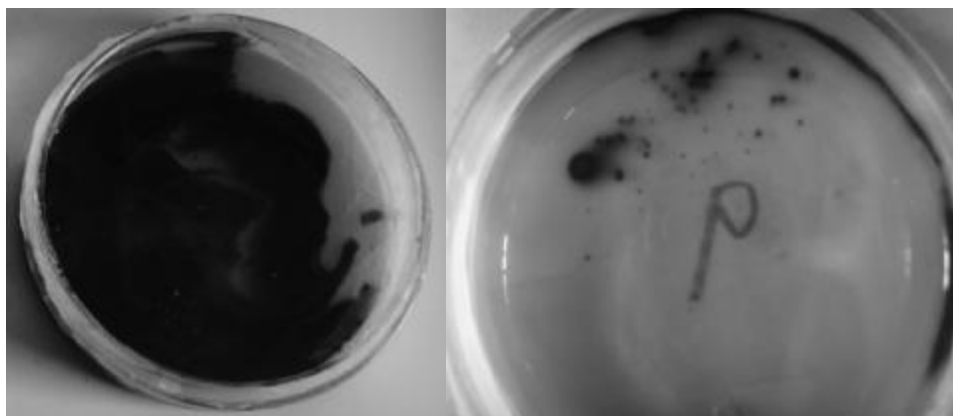
硫酸盐还原率的测定方法见文献[9]。

2 结果与分析

2.1 SRB 的形态、生理特性

土壤悬液经过富集培养后进行涂布-叠皿夹层培养分离, 60 h 后培养基上长出大小不同的圆形黑色菌落(如图 1), 经进一步纯化、筛选, 得到一株快速还原硫酸盐的细菌, 命名为 CMS-1。无 Fe^{2+} 培养基上长出的菌落为乳白色圆形凸起斑点; 含 Fe^{2+} 固体培养基上菌落呈圆形凸起黑色, 菌落直径 1~3 mm; 革兰氏染色为阳性; 细胞生长形态有卵圆形和短棒状, 细胞大小 $0.3\sim0.5\text{ }\mu\text{m}\times1.0\sim3.0\text{ }\mu\text{m}$ (如图 2); 活体观察能运动, 单极生鞭毛。

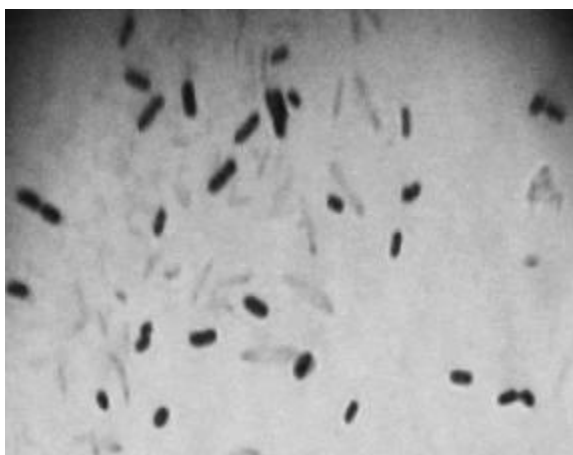
SRB 属于异养微生物, 生长代谢转化硫酸盐需要一定的碳源, 碳源可以增加其生物量和作为电子供体进行硫酸盐还原。SRB 只能利用短碳链有机物, 分别



左图: 分离培养; 右图: 纯化培养 (Left: Isolation culture; Right: Purification culture)

图 1 硫酸盐还原菌的菌落特征

Figure 1 Colony morphology of SRB isolation and purification culture

图2 革兰氏染色照片($\times 1600$)Figure 2 Photomicrograph of SRB($\times 1600$)

在培养基中用甲醇、乙醇、乙酸钠、乳酸钠、葡萄糖、丙酸和酵母膏作单一碳源,试验 SRB 利用碳源情况。根据黑色 FeS 产生量多少和快慢,得出结果为:乙醇、乳酸钠、葡萄糖和酵母膏等有机物为良好碳源,SRB 不能利用甲醇、乙酸钠和丙酸。同时把 SO_4^{2-} 、 $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ 、 SO_3^{2-} 和 S 作为惟一硫源培养,SRB 可以利用 SO_4^{2-} 和 $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$,不能利用 SO_3^{2-} 和 S。

将培养菌株的菌液试管放在沸水中煮 30 min 后,无菌接入含 Fe 试管培养液中,30 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养,一周后观察发现,试管中培养液出现墨汁色沉淀,证明已有 SRB 长出,细菌有芽孢。

2.2 生长曲线

由图 3 可见,由于接种高浓度的菌悬液,菌株的延迟期较短,5 h 后就进入对数生长期,在 21~25 h 生长速度变缓,随后又生长速度又加快,到 46.5 h 时 OD 值达最高峰,稳定约 2 h 后进入衰减亡期,细菌浓度迅速下降,可能与 H_2S 含量高有关系。微生物生长曲线反映其在一定环境中的生长和死亡繁殖规律,既能作为营养和环境影响的理论研究指标,亦可作为调控微生物生长发育的依据。

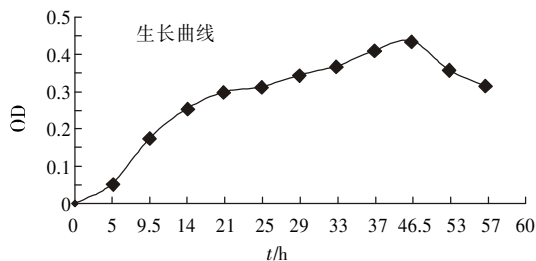
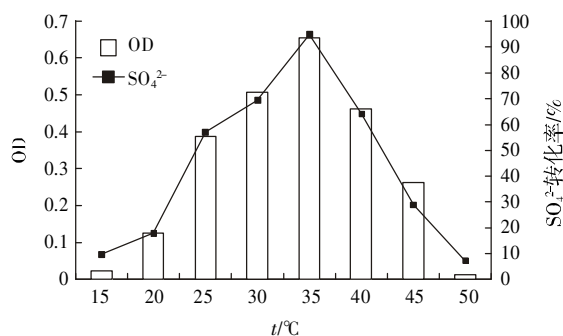


图3 SRB 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of SRB

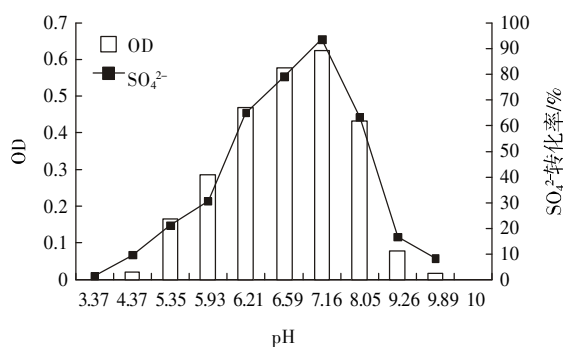
2.3 温度对 SRB 生长及 SO_4^{2-} 转化率的影响

菌株在不同温度下的生长情况表明(如图 4),菌株的生长适应温度范围也较宽,在 20~45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下生长均较好。菌株的最适宜生长温度 30~40 $^{\circ}\text{C}$,在 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的 SO_4^{2-} 转化率最高为 94.3%。根据菌样来源及不同温度下测定的 SO_4^{2-} 转化率,可证明分离的 SRB 属中温菌,35 $^{\circ}\text{C}$ 时生长代谢最旺盛,其 SO_4^{2-} 转化率也最高。在培养、驯化和转化过程中选用 35 $^{\circ}\text{C}$ 最适宜。

图4 温度对 SRB 还原 SO_4^{2-} 能力的影响Figure 4 Effect of temperature on reduction efficiency of SRB for SO_4^{2-}

2.4 pH 对 SRB 生长及 SO_4^{2-} 转化率的影响

菌株在 30 $^{\circ}\text{C}$ 和不同 pH 下的生长情况表明(如图 5),菌体生长适应的 pH 范围较宽。在 pH 5.0~9.0 条件下生长较好,其生长的适宜 pH 为 6.0~8.0。菌株在 pH 为 7.16 时生长最旺盛,代谢能力最强, SO_4^{2-} 转化率最高为 93.4%。高于或低于 pH 7.16 时, SO_4^{2-} 转化率都随着 pH 值的升高或下降而下降,培养液的 pH 对菌体生长和硫酸盐转化率影响很大。

图5 pH 对 SRB 还原 SO_4^{2-} 能力的影响Figure 5 Effect of pH on reduction efficiency of SRB for reduce SO_4^{2-}

2.5 O_2 对 SRB 生长的影响

分别接种菌液于两个含 Fe 培养液的 100 mL 三

角瓶中,一个用塞密封,另一个用透气封口膜封口,实验设3次重复。把菌液置于35℃培养箱中培养,观察发现厌氧培养处理24h后就出现墨汁色沉淀,而又养处理培养42h后培养液中也出现墨汁色沉淀,证明两种处理都有SRB生长,菌株在有氧和厌氧条件下均能生长,分离的SRB属兼性厌氧菌。这与大部分报道的都为厌氧菌不同,也有报道从产酸脱硫反应器和油田注水水样中分离出非严格厌氧的兼性厌氧菌^[5,10]。进一步做过氧化氢酶实验,在载玻片上滴一滴菌液,再滴加1~2滴3% H_2O_2 ,玻片上有气泡出现,说明SRB具有过氧化氢酶,其细胞体内有去除有害活性氧机制的可能性。

3 结论

(1)分离所得SRB的菌体形态呈卵圆状或短棒状,含铁培养基的菌落黑色圆斑,直径1~3mm;细胞大小0.3~0.5 μm ×1.0~3.0 μm ;革兰氏染色阳性,有芽孢;能运动有鞭毛;属中温菌,最适宜生长温度35℃;最适宜生长pH 7.16左右。接种后5~46h为对数生长期,菌体繁殖较快,培养2d细菌数量达到最大值。

(2)SRB的硫酸盐还原能力较高,在30℃培养条件下,最适宜的pH 7.16时硫酸盐的转化率可达到93.4%;在最适宜的培养温度35℃和培养液的pH为6.89时,对硫酸盐的转化率可以达到94.3%。

(3)分离得到的SRB以乙醇、乳酸钠、葡萄糖和酵母膏等有机物为碳源和 SO_4^{2-} 、 $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$ 为硫源,在有氧和厌氧条件下都可以生长,属兼性厌氧菌,细胞体内有去除有害活性氧机制。

参考文献:

- [1] Widdel F. Biology of Anaerobic organisms[M]. New York: Academic Press, 1988.114.
- [2] 闵航.厌氧微生物学[M].杭州:浙江大学出版社,1992.
- [3] 张毅,刘克鑫,廖银章,等.一株嗜热的硫酸盐还原菌的分离和生物学特性研究[J].应用与环境生物学报,1995,1(2):173-180.
ZHANG Yi, LIU Kexin, LIAO Yinzhang, et al. Isolation and characterization of a strain of thermophilic sulfate-reducing bacterium[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 1995, 1(2):173-180.
- [4] 张毅,刘克鑫,廖银章,等.一株嗜盐的硫酸盐还原菌的分离和生理特性研究[J].应用与环境生物学报,1995,1(1):61-67.
ZHANG Yi, LIU Kexin, LIAO Yinzhang, et al. Isolation and physiology of a strain of moderate halophilic sulfate-reducing bacterium [J].*Chin J Appl Environ Biol*, 1995, 1(1):61-67.
- [5] 甄卫东,任南琪,王爱杰,等.一株硫酸盐还原菌的分离及生理生态特性的研究[J].地球科学进展,2004,19(增):527-631.
ZHEN Weidong, REN Nanqi, WANG Aijie, et al. Isolation and physiology and ecology characteristics of a strain of sulfate-reducing bacterium [J]. *Advance in Earth Sciences*, 2004,19(Suppl.):527-631.
- [6] 陈效,孙立平,徐盈,等.硫酸盐还原菌的分离和生理特性研究[J].环境科学与技术,2006,29(9):38-40.
CHEN Xiao, SUN Liping, XU Ying, et al. Isolation and physiology characteristics of sulfate-reducing bacteria[J]. *Environmental Science and Technology*, 2006,29(9):38-40.
- [7] [日]土壤微生物研究会.土壤微生物实验法[M].北京:科学出版社,1983.
[Jap.]Society of Soil Microorganism[M]. *Experiment of Soil Microorganism*[M]. Beijing: China Science Press,1983.
- [8] 万海清,苏仕军,葛长海,等.一种分离培养硫酸盐还原菌的改进方法[J].应用与环境生物学报,2003,9(5):561-562.
WAN Haiqing, SU Shijun, GE Changhai, et al. A improved method for isolation and cultivation of sulfate-reducing bacteria[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2003,9(5):561-562.
- [9] kolmert A, Wikstrom P, Hallberg K B. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacteria culture[J].*Journal of Microbiological Methods*, 2000,41(3):179-184.
- [10] 张小里,刘海洪,陈开勋,等.硫酸盐还原菌生长规律的研究[J].西北大学学报(自然科学版),1999,29(5):397-402.
ZHANG Xiaoli, LIU Haihong, CHEN Kaixun, et al. The study of growing regulation of sulfate-reducing bacteria[J]. *Journal of Northwest University (Natural Science Edition)*, 1999, 29(5):397-402.