

文章编号 1001-8166(2004)增-0527-06

一株硫酸盐还原菌的分离及生理生态特性的研究

甄卫东,任南琪,王爱杰,李建政

(哈尔滨工业大学环境生物技术研究中心,黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要:硫酸盐有机废水生物处理技术一直是人们关注的热点,该种废水处理的关键是如何在有效地去除 COD 的同时,高效地去除 SO_4^{2-} 。厌氧生物处理系统中的硫酸盐还原菌(Sulfate-Reducing Bacteria, SRB)在一定的条件下可以有效地将 SO_4^{2-} 还原而从废水中去除。产酸脱硫反应器是一个复杂的生态学系统,在这个生态系统中,SRB 起着最主要的生态学作用,要研究产酸脱硫反应器中的各种群的微生物的生理生态学,是非常复杂而且难以实现的。为了更好地研究产酸脱硫反应器中的微生物生理生态学,比较好的做法是把在反应器中数量上占优势,并且起主要功能的种群分离出来,对它们进行单独和配合研究。本实验就是利用滚管法和改进的 Hungate 技术,在 $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}=3$ 的稳定阶段,对产酸脱硫反应器中的 SRB 进行了分离,分离出在数量上占优势的 SRB,命名为 SRB-ZH07。在厌氧试管和三角瓶中,进行了 SRB-ZH07 生理生态学研究。pH 值对 SRB-ZH07 的生长和硫酸盐去除率的影响,pH 为 7.0 左右 SRB-ZH07 的生长状况最好,在 34h 菌液的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 达到 0.827,而其它 pH 下的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 各时刻最大只有 0.08。在 34h 时, SO_4^{2-} 的去除速率达到 38.06 mg/h,而 pH 值为 3.0、4.0、5.0、8.0 时各时刻 SO_4^{2-} 的去除速率最大为 9.62 mg/h。乳酸最有利于 SO_4^{2-} 的去除,于 SO_4^{2-} 去除率为 94.24%,其次为丙酸 28.81%,最差的是葡萄糖 13.6%,SRB-ZH07 利用有机底物对硫酸盐的还原率从大到小依次为:乳酸 > 丙酸 > 丁酸 > 乙酸 > 乙醇 > 葡萄糖。 $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}$ 大于 2.0 时, SO_4^{2-} 的去除率为 80%左右; $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}$ 小于 2.0 时, SO_4^{2-} 去除率迅速下降,降低到 50%以下。SRB-ZH07 在有氧和无氧条件下都能生长,但只有在无氧条件下才能有硫酸盐的去除率。在有氧条件下,SRB-ZH07 的生长速率要快于在无氧条件下 SRB-ZH07 的生长速率。SRB-ZH07 代谢乳酸、丙酸、丁酸、戊酸终产物主要乙酸,所以当动态实验出水乙酸含量比较高的时候硫酸盐去除率比较高。出水乙酸的含量高是硫酸盐去除率比较高的标志,而不是原因。

关键词:产酸脱硫反应器,纯种分离,硫酸盐还原菌,生理生态特性

中图分类号 X13 文献标识码 A

从环境中分离硫酸盐还原菌,并对其生物学特性进行研究,国内已经有人开展这方面的工作,张毅、刘克鑫等^[1,2],分别从四川化工厂热交换器中分离到一株嗜热硫酸盐还原菌和嗜盐硫酸盐还原菌,对它们的生物学特性进行了系统深入的研究。从处理含高浓度硫酸盐的有机物废水的生物处理反应器——产酸脱硫反应器中分离优势功能菌,并对其生态特性进行研究的报道还很少。

对影响硫酸盐还原菌的生态因子的研究,一些学者分别在生物处理反应器和纯培养条件下,对 pH 等生态因子的影响进行了研究工作。张小里^[3]研究油田注水井中分离到的纯种硫酸盐还原菌表明,厌氧条件下,SRB 适宜生长的 pH 区间为 6.5 ~ 7.5,最佳 pH 为 7.5,小于 5.5 或大于 8.0 时 SRB 不能生长,有氧条件下,SRB 在 pH 为 8.0 ~ 8.5 时仍能生存乃至增殖。俞教义^[4]研究从中原油田污水

收稿日期 2004-04-10.

* 基金项目 国家高技术研究发展(863)计划项目(编号 2002AA601310) 国家自然科学基金项目(编号 50208006)资助.
作者简介 葛良全(1962-),男,教授,博士生导师,主要从事核地球物理研究工作.E-mail: gelliang@163.com

分离的 SRB pH 为 6.0 ~7.0 的油田污水对 SRB 生长有利, pH =3.0 时 SRB 也能大量繁殖。很多学者研究了 COD /SO₄²⁻ 对硫酸盐去除率有影响^[5,6]。崔高峰利用 UASB 反应器对 COD /SO₄²⁻ 影响 SO₄²⁻ 去除率进行了研究,当 COD /SO₄²⁻ 比值大于 2.0 的时候,硫酸盐的去除率在 95% 以上;当 COD /SO₄²⁻ 比值为 1.5 的时候,硫酸盐去除率为 75%;当 COD /SO₄²⁻ 比值为 1.0 时,硫酸盐去除率为 60%。SRB 是一种厌氧菌,但它对氧气有一定的耐受性,把 SRB 放到有氧环境中,短时间它不会失去活性^[7]。

1 材料和方法

1.1 样品来源

用于分离菌种的样品来自本实验室长期稳定运行的产酸脱硫反应器(CSTR 一体化产酸设备),运行条件进水 COD 3 000 mg/L,进水 SO₄²⁻ 1 000mg/L, HRT 6h, SO₄²⁻ 容积负荷 3.9kg/(m³·d) (污泥负荷 0.9kg/(d·VSS)), 温度 34 ±1 °C, SO₄²⁻ 去除率 80% ~85%。

1.2 培养基成分及其配制方法

分离硫酸盐还原菌培养基配方 K₂HPO₄ 0.5g, NH₄Cl 1.0g, CaCl₂·2H₂O 0.1g, MgSO₄·7H₂O 2.0g, 酵母膏 1.0g, 70% 的乳酸钠溶液 4mL, Na₂SO₄ 0.5g, 刃天青溶液(0.1%) 1mL, 蒸馏水 1 000mL。溶解后用 10% 氢氧化钠溶液调节 pH =7.4 ~7.6, 固体培养基再添加 2% 琼脂,加入 1.2g 的 Fe(NH₄)₂(SO₄)₂。培养基的配制,以及微生物培养都采用 Hungate 技术^[8]。

1.3 分离方法

产酸脱硫反应器中的优势菌硫酸盐还原菌在数量上应该占优势,为了分离到在数量上占优势的硫酸盐还原菌(SRB),对产酸脱硫反应器中的活性污泥进行了系列稀释、培养,认为能生长的最大稀释倍数的试管中的 SRB 就是优势功能菌。对这样的试管中的菌进行分离。

污泥从反应器中取出后,放到灭过菌的无氧具胶塞瓶中,用玻璃珠打碎,用无菌针管系列稀释制成菌悬液,以亚铁盐为指示剂对硫酸盐还原菌进行培养,把最大稀释倍数能生长的菌落挑取,纯化,并对其硫酸盐还原测定,此过程反复进行,直到获得纯培养优势硫酸盐还原菌为止。

1.4 pH 对 SRB 生长和 SO₄²⁻ 去除率的影响

以分离 SRB 的固体培养基(配方见 1.2)培养

分离到的 SRB 将其接种于同样配方的液体培养基中,培养 24h 作为液体菌种。取一些厌氧试管,装入不同 pH 的培养基,灭菌后,接入 10% 的液体菌种,在 34 °C 下进行培养,定时取样,测定 600nm 处的 OD 值和 SO₄²⁻ 的去除率,SO₄²⁻ 的测定采用比浊法^[9]。

1.5 底物对硫酸盐还原菌硫酸盐去除率的影响

各种有机物浓度按照 COD 为 3 000mg/L,硫酸盐浓度为 1 000mg/L,其它成分按 1.2。将培养 24h 的液体菌种按照 10% 的接种量加到装于厌氧瓶中的无菌培养基中,34 °C 下进行培养 48h,测定 SO₄²⁻ 的去除率。

1.6 氧对 SRB 生长和 SO₄²⁻ 去除率的影响

将 SRB 接种于固体平板上(配方见 1.2),分别进行有氧(将接种的平板放到培养箱中)培养和厌氧培养(把接种的平板放到厌氧罐中^[10]),培养 5d。氧气对 SO₄²⁻ 去除率的影响:将 SRB 液体菌种(见 1.4)分别接种于严格用 Hungate 技术配制的液体培养基(配方见 1.2)进行密封培养(培养瓶用胶塞)和有氧培养(培养三角烧瓶用棉塞),10% 的接种量,34 °C,3d,测定 SO₄²⁻ 的去除率。

1.7 以乳酸作碳源不同 COD /SO₄²⁻ 条件下 SO₄²⁻ 的去除率

将培养基中加入一定量的 SO₄²⁻,使它的浓度为 1 000mg/L,加入一定的乳酸钠溶液,使 COD 分别为 4 000, 3 000, 2 000, 1 000, 800, 670, 600, 400, COD /SO₄²⁻ 分别为 4, 3, 2, 1, 0.8, 0.67, 0.6, 0.4, 其他成分同 1.2,接种液体菌种(见 1.4),10% 的接种量,34 °C,培养 3d,测定 SO₄²⁻ 的去除率。

1.8 液相末端产物分析

采用国产 GC112 型气相色谱仪,氢火焰离子检测器。测定条件是:担体 GDX-103(60-80 目) +2% H₃PO₄,填充柱长 2m × 5mm,载气 N₂:50mL/min, H₂:50 mL/min,空气:500mL/min,柱箱最高温度 250 °C,进样室温度 200 °C,离子室温度 240 °C,柱温 100 ~200 °C,采取程序升温:初始温度 100 °C,初始时间 2min,升温速度 6 °C/min,终止温度 200 °C,终止时间 8min,进样量 2 μL。

2 结果与讨论

2.1 SRB 的分离

利用滚管法和改进的 Hungate 技术,在 COD /SO₄²⁻ =3 的稳定阶段,对产酸脱硫反应器中的硫酸盐还原菌进行了分离,分离出在数量上占优势的硫酸盐还原菌,命名为 SRB-ZH07。

2.2 pH 对 SRB-ZH07 生长的影响

pH 是微生物生长的重要影响因子 细菌生长的 pH 都在中性偏碱的范围内。而对于某种特殊的细菌,它适宜生长的 pH 值可能不在这个范围 细菌适宜生长的 pH 值大都与它们长期生长的环境的 pH 一致。实验运行的产酸脱硫反应器中的 pH 在 6.0~6.5 之间,是否从反应器中分离出的 SRB 的最适 pH 也在此范围内,研究了 pH 对 SRB 生长的影响,以吸光值作为 SRB 数量指标。由图 1 可看出,在 pH 为 7.0 左右 SRB-ZH07 的生长状况最好,在 34h,菌液的 OD_{600nm} 达到 0.827,而其它 pH 下的 OD_{600nm} 各时刻最大只有 0.08,说明在其它酸度条件下菌的生长都受到比较严重的抑制。

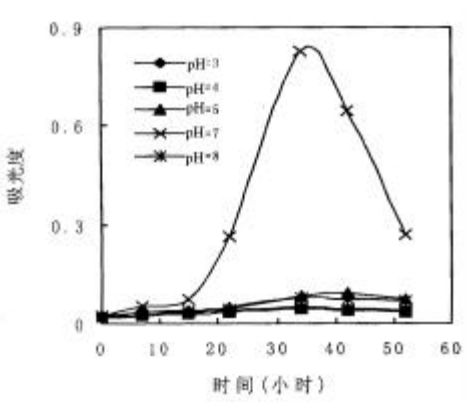


图1 pH 对 SRB - ZH07 生长的影响

Fig.1 Growth of SRB - ZH07 in different pH value

2.3 pH 对 SRB-ZH07 硫酸盐去除速率的影响

测定不同 pH 条件下硫酸盐的去除率,再除以时间得不同酸度条件下硫酸盐的去除速率(图 2)。从图 2 可以看出在 pH =7.0 时,SRB-ZH07 对硫酸盐的去除速率要明显大于其它几种状况,在 34h 时,SO₄²⁻ 的去除速率达到 38.06mg/h,而 pH 为 3.0、4.0、5.0、8.0 时各时刻 SO₄²⁻ 的去除速率最大为 9.62 mg/h,说明 pH =7.0 时菌的生长和硫酸盐的去除效果均达到了最佳。SRB-ZH07 所能忍受的 pH 值范围较窄,尤其是过低的 pH 值必定使 SRB-ZH07 代谢活性降低,难以进行硫酸盐还原作用。如果仅从硫酸盐还原的角度考虑,选择中性偏碱的 pH 值可以保证硫酸盐还原菌发挥更大的作用,而且相对较高的 pH 值可使反应器内 H₂S 浓度较低,减轻 H₂S 对 SRB-ZH07 的抑制作用。

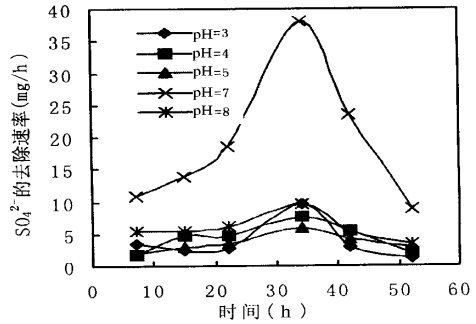


图2 不同酸度条件下 SRB - ZH07 对 SO₄²⁻ 的去除速率

Fig.2 Removal rate of SO₄²⁻ by SRB - ZH07 in different pH value

2.4 不同底物对 SRB-ZH07 硫酸盐去除率的影响

产酸脱硫反应器中,SRB-ZH07 用于硫酸盐还原的电子供体为乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、H₂ 等。不同污泥来源,不同驯化条件下得到的生态系统中利用各种碳源的 SRB-ZH07 的分布必然有较大的差异,从而表现为 SRB-ZH07 对各种碳源的不同利用能力。在其他条件都相同的条件下,测定了不同底物对硫酸盐去除率的影响。由图 3 可以看出乳酸最有利于硫酸盐的去除,SO₄²⁻ 去除率为 94.24%,其次为丙酸 28.81%,最差的是葡萄糖 13.6%,说明葡萄糖最不利于硫酸盐的去除。SRB-ZH07 利用底物对硫酸盐的还原率从大到小依次为:乳酸 >丙酸 >丁酸 >乙酸 >乙醇 >葡萄糖。

2.5 氧对 SRB 生长和硫酸盐去除率影响

为测定在有氧环境中 SRB 能否生长,以及在有氧情况下 SRB-ZH07 对硫酸盐的去除率大小,把 SRB 接种到固体培养基上,分别在有氧和无氧条件下培养,结果见图 4,左边的平皿在有氧条件下培养,右边的平皿在厌氧条件下培养,可以看出在好氧和厌氧情况下硫酸盐还原菌都得到了生长,但是在有氧情况下菌不变黑,而无氧情况下会变黑。说明在有氧情况下,SRB 可能不能还原硫酸盐。为了进一步验证,分别在有氧和无氧条件下,测定了 SRB 对硫酸盐的去除率。结果如图 5,有氧和无氧条件下,硫酸盐的去除率分别为 4.33%和 46.57%,无氧下的去除率明显高于有氧。如前所述,SRB 在有氧和无氧条件下都能生长,在两种培养条件下,生长速度有什么不同?利用 SRB 在液体培养基上的培养,测定了氧对 SRB 生长速度的影响。从图 6 可以看

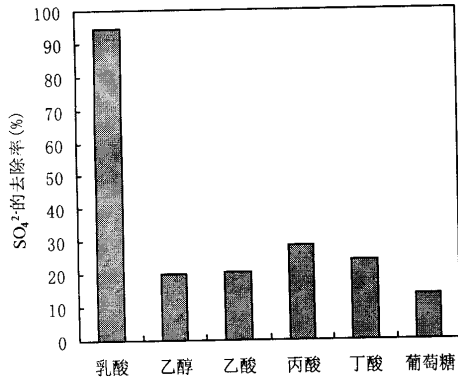


图 3 不同底物对 SRB - ZH07 SO₄²⁻ 去除率的影响

Fig.3 Effect of substrates on rem oval rate of SO₄²⁻ by SRB-ZH07

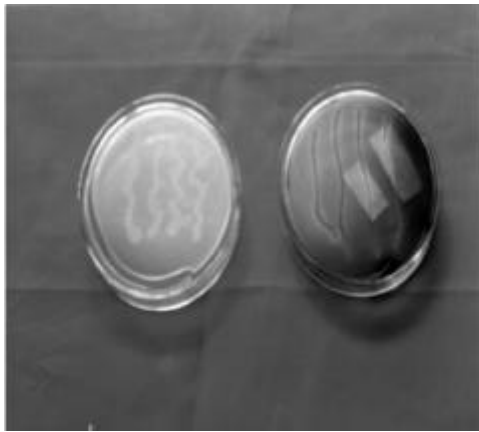


图 4 氧对 SRB - ZH07 还原硫酸盐的影响

Fig.4 Effect of oxygen on rem oval rate of SO₄²⁻ by SRB-ZH07

出,在起始阶段,两种情况下菌的浊度相差无几,经过对数期的迅速生长后,好氧环境下菌的浊度要明显大于厌氧环境,而且最大菌浊出现的时间好氧情况下要比厌氧情况提前 4 小时做左右。

2.6 以乳酸作碳源不同 COD /SO₄²⁻ 条件下硫酸盐的去除率

由图 7 可以看出,随着 COD /SO₄²⁻ 比值的降低,硫酸盐的去除率也呈下降的趋势,在 COD /SO₄²⁻ = 2.0 之前,下降的趋势不太明显,之后硫酸盐的去除率迅速下降。

2.7 SRB-ZH07 代谢各种底物的产物

从图 8 可以看出,硫酸盐还原菌代谢乙醇的终

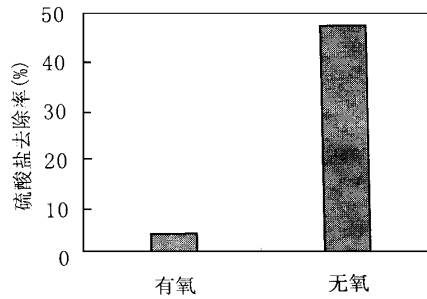


图 5 氧气对硫酸盐去除率的影响

Fig.5 Effect of O₂ on rem oval rate of SO₄²⁻ by SRB-ZH07

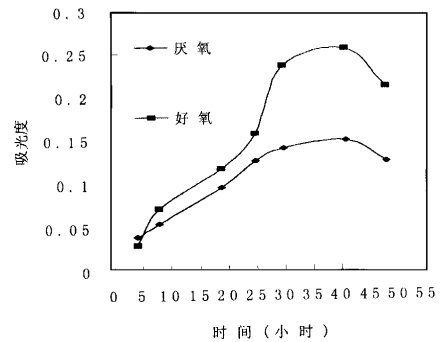


图 6 氧气对 SRB - ZH07 生长的影响

Fig.6 Effect of O₂ on growth of SRB-ZH07

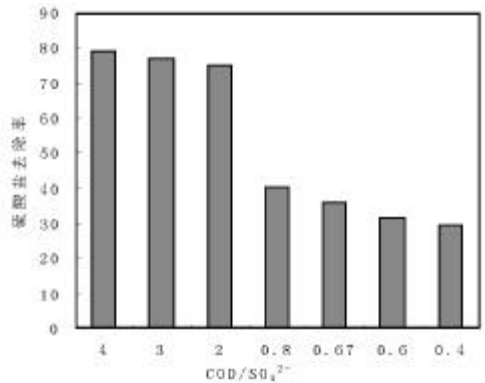


图 7 不同 COD /SO₄²⁻ 条件下 SO₄²⁻ 的去除率

Fig.7 Rem oval rate of SO₄²⁻ in different COD /SO₄²⁻

产物主要是乙酸,其次是丙酸和丁酸,丙酸的终产物

主要是乙酸,之后是乙醇,还有丁酸和戊酸;丁酸的终产物主要是乙酸,其次是丙酸,还有一些乙醇;戊酸的终产物主要是丁酸,其次是乙酸,还有一些丙酸;乳酸的终产物主要乙酸,其次是丁酸,之后是戊酸和丙酸。总之,SRB 代谢各种挥发酸最多的终产物是乙酸,所以当动态实验出水乙酸含量比较高的时候硫酸盐去除率比较高。

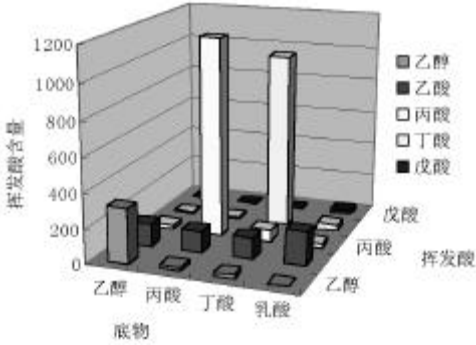


图 8 SRB-ZH-07 代谢各种底物的产物

Fig.8 product of SRB-ZH-07 metabolizing several substrate

3 结 论

(1) 利用 Hungate 技术从产酸脱硫反应器中分离出硫酸盐还原菌,经过验证它们确实是纯种,而且有还原硫酸盐的能力。

(2) SRB-ZH07 在 pH 为 7.0 左右的生长状况最好,而在其它酸度条件下菌的生长都受到比较严重的抑制。在 pH 为 7 左右,SRB-ZH07 对硫酸盐的去除速率要明显大于其它几种状况。

(3) 乳酸最有利于硫酸盐的去除,SRB-ZH07 利用有机酸对硫酸盐的还原率从大到小依次为:乳酸 > 丙酸 > 丁酸 > 乙酸。

(4) SRB-ZH07 在有氧和无氧条件下都能生长,但在有氧条件下不能够去除硫酸盐,只有在无氧条件下才能有硫酸盐的去除率。在有氧条件下,SRB-ZH07 的生长速率要快于在无氧条件下 SRB-ZH07 的生长速率。

(5) 以乳酸做唯一碳源,随着 COD / SO₄²⁻ 比值的降低,硫酸盐的去除率也呈下降的趋势,在 COD / SO₄²⁻ = 2 之前,下降的趋势不太明显,之后硫酸盐的去除率迅速下降。

(6) SRB-ZH07 代谢各种挥发酸最多的终产物是乙酸,所以当动态实验出水乙酸含量比较高的时候硫酸盐去除率比较高

参考文献 (References) :

[1] 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.

[2] 张毅,刘克鑫,廖银章,等.一株中度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.

[3] 张小里,陈志昕,刘海洪,等.环境因素对硫酸盐还原菌生长的影响[J].中国腐蚀与防护报,2000,20(4):224-229.

[4] 愈敦义,彭芳明,刘小武.环境对硫酸盐还原菌生长的影响[J].材料保护,1996,29(2):1-2.

[5] 崔高峰.COD / SO₄²⁻ 比值对硫酸盐去除率影响的研究[J].工业水处理,2000,20(2):29-31.

[6] 崔高峰,柯建明,王凯军.COD / SO₄²⁻ 值对硫酸盐还原率的影响[J].环境科学,2000,21(4):106-109.

[7] 杨文博等译.微生物生物学(第八版)[M].北京:科学出版社,2001.834-839.

[8] Hungate R. E. A rolltube method for cultivation of strict anaerobes [J]. Methods Microbial, 1969, 3, 117-132.

[9] 国家环保局编.水和废水监测分析(第四版)[M].北京:中国环境出版社,1997.234-237.

[10] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验(第三版)[M].北京:高等教育出版社,1999.77-80.

**RESEARCH ON SEPARATING OF ONE STRAIN OF
SULFATE-REDUCING BACTERIA FROM ACID OGENIC
SULFATE-REDUCING REACTOR AND ON ECOLOGICAL
CHARACTERISTIC OF IT**

ZHEN W ei-dong , REN Nan-qi , W ANG Ai-jie , LI Jian-zheng

(Research Center of Environmental Biotechnology , Harbin Institute of Technology , Harbin 150090 , China)

Abstract : The biological treating technology is always the focus of researchers in the world. The key of this technology is to remove COD and SO_4^{2-} simultaneously and effectively. Sulfate-Reducing Bacteria (SRB) in anaerobic biological treating system can reduce SO_4^{2-} to H_2S so as to remove SO_4^{2-} . But acidogenic-desulfate reactor is a complicated ecological system, SRB lead the most important role in this system. To study physiological and ecological characteristic of each microbial group in this system is very difficult, so isolating main functional group, SRB can simplify this research. Preponderant populations of sulfate-reducing bacteria in an acidogenic sulfate-reducing reactor were isolated using improved Hungate technique and tube-rolling method, this sulfate-reducing bacteria was nominated as SRB-ZH07. In anaerobic tube and conical flask physiological and ecological characteristic of SRB-ZH07 were studied. When pH =7.0 SRB-ZH07 grew best, at the culture moment 34h, OD_{600nm} of the culture solution was up to 0.827, while the highest OD_{600nm} of the culture solution under other pH is 0.08. When pH =7.0, removal rate of SO_4^{2-} was up to 38.06mg/h at 34h, while the greatest removal of SO_4^{2-} was only 9.62 mg/hr when pH was 3.0, 4.0, 5.0, 8.0. Lactic acid was most suitable to reduce SO_4^{2-} , removal rate of SO_4^{2-} was up to 94.24% when lactic is the sole carbon source. Removal rate of SO_4^{2-} was up to 28.81% when propionate is the sole carbon source. Glucose was most unsuitable to reduce SO_4^{2-} , removal rate of SO_4^{2-} was only 13.6% when glucose is the sole carbon source. The order of carbon source used to reduce SO_4^{2-} was: lactic acid > propionate > butyric acid > acetic acid > ethanol > glucose. When COD / SO_4^{2-} was more than 2, removal rate of SO_4^{2-} was about 80%; when COD / SO_4^{2-} was less than 2, removal rate of SO_4^{2-} decreased sharply, even lower than 50%. SRB-ZH07 could grow under aerobic and anaerobic conditions, but only in anaerobic conditions could SRB-ZH07 remove SO_4^{2-} . The growth rate of SRB-ZH07 in aerobic condition was more than that in anaerobic condition. The main metabolic product of SRB-ZH07 metabolizing lactic acid, ethanol, propionate, butyric acid was acetate, so the amount of acetic acid is the index, not reason of the removal rate of sulfate.

Key words Acidogenic-desulfate bio-reactor; Pure strain separation; SRB; Ecological characteristic.