

# 一株硫氧化菌的筛选与表征

邱丽娜 李圆原 弓爱君 闫海 王小宁

北京科技大学应用科学学院生物科学与技术系, 北京 100083

**摘要** 利用液体选择培养基、固体选择培养基从污泥中筛选出一种可以氧化低价硫的菌株, 该菌为革兰氏阴性菌, 在光学显微镜下有较强的运动能力. 对含有该菌的培养基进行 pH 值检测, 在培养的第 3 天发现 pH 值有显著下降, 继续培养一周左右, pH 值下降到 0.6; 用离子色谱进行检测, 培养 5 天, 液体培养基中硫酸根含量从  $249.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  增加到  $3679.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 将菌液加入 FeS 培养基中, 培养 2 周后, FeS 被氧化, 培养基颜色变浅.

**关键词** 硫氧化菌; 菌种筛选; 表征

**分类号** Q 939.1

硫氧化菌 (Sulfur-Oxidizing Bacteria 简称 SOB), 是能氧化元素硫、硫化物、硫代硫酸盐和亚硫酸盐等产生代谢产物硫酸的一类菌. 这类菌常见的有硫杆菌属 (*Thiobacillus*) 中的排硫硫杆菌 (*Thiobacillus thloparus*)、氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*)、氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*)<sup>[1]</sup>. 硫杆菌广泛分布在含无机硫和铁的陆地和水域中, 如污水、河口、湖沼的淤泥中. 作为浸矿的主要菌种, 氧化亚铁硫杆菌和氧化硫硫杆菌最初应用于低品位铜矿、铀矿的生产, 后来发展应用于金、锌、钴等多种金属的浸出<sup>[2-6]</sup>. 由于硫氧化菌能氧化低价硫的特性, 也常用此类菌作为生物浸出法 (Bioleaching) 的菌种去除污泥中的重金属<sup>[7]</sup>. 由于该微生物在工业和环保上具有重要价值, 国内目前在生物冶金, 处理污泥中的重金属, 煤炭脱硫, 处理刻蚀以铜及铜合金为材料的基片等方面都有不同程度的应用, 现在的研究目标主要是采用快速、高效、新的育种方法对现有菌株进行改良, 以期望获得多株具有繁殖速率快, 氧化能力强, 适应性强, 特别是对多种重金属离子、表面活性剂、氯离子的耐受性强的优良工业用菌<sup>[8-10]</sup>.

## 1 材料

### 1.1 供试污泥

北京海淀区清河南镇河中浅滩污泥

### 1.2 培养基

液体选择培养基 1 (硫粉培养基):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.4 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.25 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g, 蒸馏水 1 L, 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌, 再加入间歇灭菌的 10 g 硫粉.

液体选择培养基 2 (FeS 培养基):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.25 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02 g, FeS 10 g, 蒸馏水 1 L, 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌.

液体培养基 3 (基础培养基): 葡萄糖 5 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.25 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02 g, 酵母粉 2 g, 蒸馏水 1 L, pH 值 2~3, 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌.

固体选择培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.25 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10 g, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水 1 L, 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌.

## 2 实验步骤

### 2.1 单菌落筛选

吸 5 mL 污泥于 100 mL 已灭菌的液体选择培养基 1 中, 30 °C 振荡培养, 转速  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 培养 1 周以上, 直至 pH 降到 2 以下. 随后吸取 100  $\mu\text{L}$  培养液, 滴加于固体选择培养基的平板上, 涂布, 30 °C 恒温培养箱中培养 1 周以上. 7~10 天左右平板中长出 1~3 mm 直径大小的淡黄色菌落. 再用接种环挑取单菌落, 接种于 100 mL 液体选择培养基 1 中, 振荡培养. 如此固液交替培养 3 次以上, 直到涂布得到较纯的单菌落.

同时进行 5 mL 污泥加入 100 mL 液体培养基 3 (基础培养基) 的筛选, 30 °C 振荡培养, 转速  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 培养 1 周以上 (与液体选择培养基 1 的筛选

收稿日期: 2007-10-23

基金项目: 北京市教育委员会共建项目建设计划

作者简介: 邱丽娜 (1979-), 女, 讲师, 硕士

方法同)。

## 2.2 表征

### (1) 菌的形态特征

观察平板中菌落的大小、形状,并分别采用简单染色法和革兰氏染色法<sup>[11]</sup>在光学显微镜下观察菌体的形态。

### (2) 液体培养基 pH 值测定

用 pH 计测含污泥的液体选择培养基 1 的 pH 值,每天(间隔 24 h)测一次,并对其数据进行记录。同时做一组不加入污泥的液体培养基 1 的对照。

将刚接入单菌落的液体培养基 1 的 pH 值调为 6.0,每天(间隔 24 h)测一次 pH 值,同时做一组不加入菌的对照。

### (3) 离子色谱测定

硫酸根标准曲线测定:配制  $K_2SO_4$  溶液,浓度分别为 9.6, 19.2, 28.8, 38.4, 48  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。根据离子色谱测量的数值列出不同浓度的硫酸根峰面积。硫酸根的保留时间一般在 12.9 min 左右,绘制出硫酸根标准曲线。

加入纯化硫氧化菌的液体培养基 1 中硫酸根离子含量测定:取 1 mL 含硫氧化菌的液体培养基 1 稀释 100 倍,先用定性滤纸过滤,再过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,进样 2~3 mL 入离子色谱仪进行测试,每天测硫酸根离子含量。

### (4) FeS 培养基表征

配制 50 mL 液体培养基 2,加 100  $\mu\text{L}$  纯化硫氧化菌液(挑取固体培养基上较纯的菌落接入 1 mL 无菌水中,混匀),做一组加入 100  $\mu\text{L}$  无菌水对照。30  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养,转速 200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,培养 2 周以上。观察 FeS 颜色变化。

## 3 结果与讨论

### 3.1 硫氧化菌的筛选

培养 1 周后,液体培养基 1(硫粉培养基)中漂浮在液面上的硫粉沉到锥形瓶底部,逐渐被消耗,接种了污泥的硫粉培养基开始混浊。在载玻片上滴一滴混浊液,盖上盖玻片在显微镜下观察,发现有短杆状游动性强的菌。

液体培养基 3(基础培养基)中长出了白色球状霉菌,液体变粘稠,有絮状菌丝,取液体镜检,除了细长的霉菌菌丝外没有发现短杆状游动菌。初步判断由于液体培养基 3(基础培养基)营养成分比较丰富,较适合霉菌的生长,霉菌比硫氧化菌生长快,故该培养基不适于筛选硫氧化菌,而液体培养基 1 不含有有机碳源,霉菌不易生长,适于筛选硫氧化菌。

### 3.2 纯化的硫氧化菌的形态特征

固体培养基中培养得到 1~3 mm 直径大小的淡黄色菌落,见图 1。

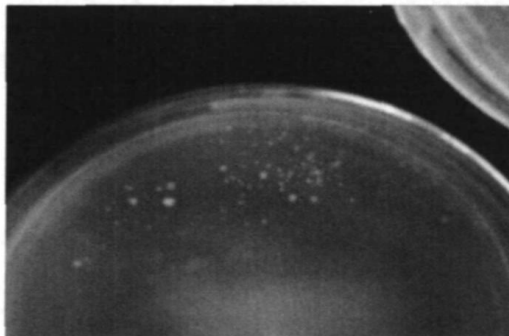


图 1 硫氧化菌菌落图片

镜检观察发现,单个菌体呈短杆状,革兰氏染色呈阴性,菌体着色均一。挑一环菌加入清水中,在 40 倍光学显微镜下观察,菌有很强的运动态,从菌的运动方式看,该菌应该是端生鞭毛。染色图片见图 2。

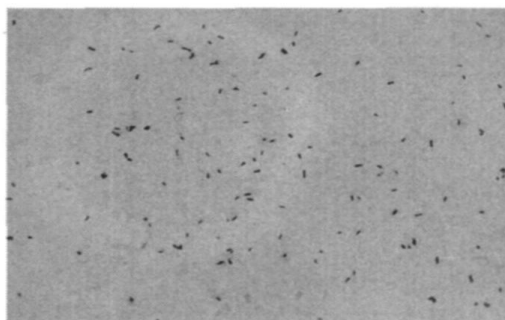


图 2 硫氧化菌简单染色镜检图( $\times 1000$  倍)

### 3.3 硫氧化菌生长对液体培养基 pH 值的影响

A 号瓶为不加污泥的对照样,B 号瓶为加入污泥的液体培养基,在培养的第 4 天可以看到 B 瓶的 pH 值有较明显的下降,从一开始的  $\text{pH}=4$  左右下降到  $\text{pH}=1$ ,证明培养基酸度明显增加,硫粉被氧化生成硫酸,而对照样 A 瓶的 pH 值变化不大,可见污泥中存在硫氧化菌能将硫粉氧化。硫粉本身在自然条件下氧化不明显,见图 3。

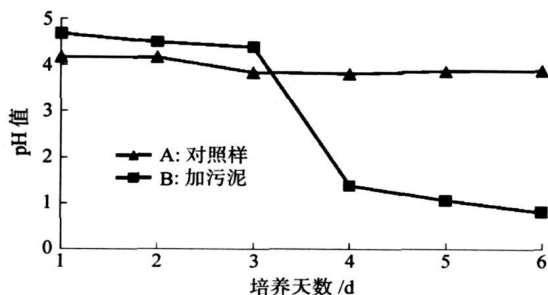


图 3 污泥中菌对培养 pH 值变化曲线

接入单菌落的液体培养基 1 的 pH 值变化情况见图 4, 培养基的 pH 能在第 3 天下降到 1 左右, 纯化后硫氧化菌氧化硫的能力增强了, 继续对其进行培养, pH 值持续下降, 并在培养的第 7 天趋向稳定, 最低 pH 值可以下降到 0.6.

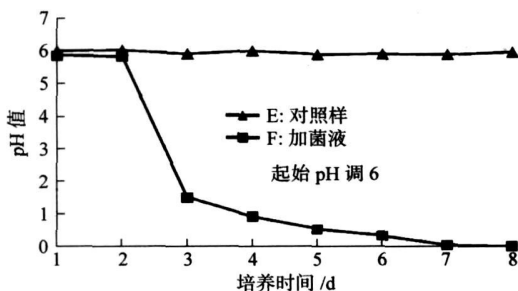


图 4 培养硫氧化菌对培养基 pH 值变化曲线

### 3.4 硫氧化菌的生长对液体培养基中硫酸根离子的影响

根据离子色谱测量的数值列出不同浓度的硫酸根峰面积, 硫酸根的保留时间一般在 12.9 min 左右, 绘制出硫酸根标准曲线见图 5.

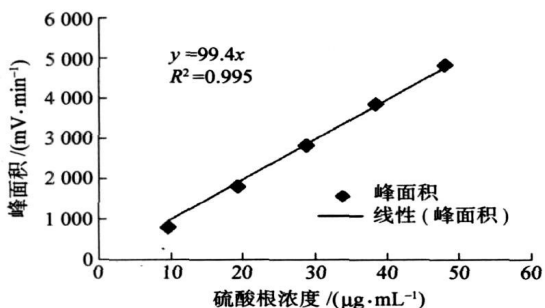


图 5 硫酸根含量标准曲线

测含硫氧化菌的液体培养基 1 的硫酸根含量, 发现随着时间的增加, 硫酸根含量大大提高, 见图 6.

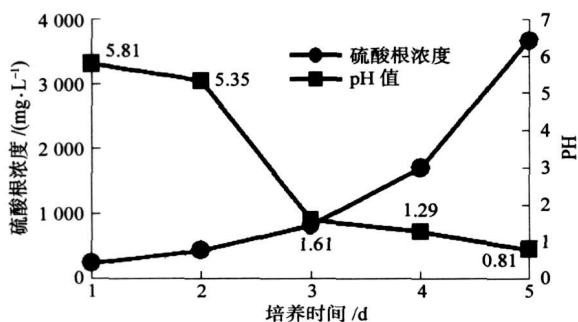


图 6 硫氧化菌对 pH 值和硫酸根的影响

由图 6 可得: 随着时间的推移, 硫酸根含量逐渐增加, 从离子色谱的峰面积来看, 5 天的数值呈对数增

加. 同时将 pH 计在液体培养基中测得的数值也放入图 6 中进行对比. 培养基的起始 pH 值用 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调到 6, 从第 3 天开始, pH 值下降到 1 左右, 而硫酸根含量的增加也表明硫氧化菌正进入对数生长期. 由于硫的疏水性, 培养的第 1 天, 刚加入硫粉时, 液体培养基中硫均悬浮于液面, 下层液体澄清, 从第 3 天开始, 接种了菌液的液体培养基开始混浊, pH 降至 1 左右, 从测定结果看, 硫开始大量被氧化成硫酸, 第 5 天培养基混浊程度增加了.

到第 5 天培养结束的时候, 硫酸根的峰面积达到 36 57.60 mV·min, 用公式  $y = 99.40x$ , 算出硫酸根的含量为 36.797 μg·mL<sup>-1</sup> (稀释 100 倍), 原液的硫酸根含量达到 3 679.7 μg·mL<sup>-1</sup>, 即 3 679.7 mg·L<sup>-1</sup>, 起始硫酸根含量为 249.2 mg·L<sup>-1</sup>.

### 3.5 硫氧化菌的生长对 FeS 培养基的影响

通过在 1, 2 号瓶 FeS 培养基中分别加入无菌水和菌液, 经过 30 °C 振荡培养 2 周以上, 发现 1 瓶中的深褐色 FeS 培养基没有太大变化, 而加菌液的 2 号瓶培养基颜色有一定程度的变浅. 推测这是由于硫氧化菌将部分 FeS 固体氧化的缘故. FeS 本身是不溶于水的深褐色固体, 如果其受到菌的氧化, 生成的硫酸根和金属离子会溶在液体培养基中, 造成 FeS 固体含量变少, 培养基颜色变浅. 而加入无菌水的 1 号瓶颜色无太大变化的原因, 可能是由于没有菌的存在 FeS 很难在自然条件下氧化. 用 pH 试纸测 2 瓶培养基的 pH 值, 基本上都在 7~8 左右, 培养基的 pH 值并没有明显变化.

## 4 结论

用固液选择培养基交替培养的方法, 从污泥中分离纯化出一种嗜酸硫氧化菌株, 用简单染色和革兰氏染色等方法, 在光学显微镜下对筛选出的硫氧化菌进行镜检, 观察到该菌呈短杆状, 运动能力较强, 从运动方式看应该是端生鞭毛, 革兰氏染色为阴性. 在培养的过程中, 分别用 pH 计对其培养基 pH 值进行检测, 发现在培养的第 3 天 pH 值由原来的 6 下降到 1 左右, 继续培养, pH 值最终可以达到 0.6 附近, 证明该菌能使液体培养基变酸. 硫氧化菌对硫粉进行氧化过程中, 硫酸根含量呈对数上升趋势, 培养 5 天, 硫酸根含量从 249.2 增加到 3 679.7 mg·L<sup>-1</sup>, 初步推断该菌能氧化硫生成硫酸. 将筛选出来的硫氧化菌在 FeS 培养基中培养, 固体不溶物 FeS 有一定程度的消耗, 证明该菌可以氧化硫化物, 有很好的工业用途.

## 参 考 文 献

- [1] 周顺贵, 王世梅, 余素萍, 等. 污泥中氧化亚铁硫杆菌的分离及其应用效果. *环境科学*, 2003, 24(3): 56
- [2] Kumari A, Natarajan K A. Electrobioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Hydrometallurgy*, 2001, 62(10): 125
- [3] 沈镭, 张太平, 贾晓珊. 利用氧化亚铁硫杆菌和氧化硫硫杆菌去除污泥中重金属的研究. *中山大学学报(自然科学版)*, 2005, 44(2): 111
- [4] 朱南文, 蔡春光, 吴志超, 等. 污泥中重金属的生物沥滤及其机理分析. *上海交通大学学报*, 2003, 37(5): 801
- [5] Jaworska M, Urbanek A. The influence of oxygen concentration in liquid medium on elemental sulphur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *Bioprocess Eng*, 1998, 18: 201
- [6] Kodali B, Rao M B, Narasu M L, Pogaku R. Effect of biochemical reactions in enhancement of rate of leaching. *Chem Eng Sci*, 2004, 59: 5069
- [7] 周顺桂, 周立祥, 王世梅. 嗜酸硫氧化菌株的分离及其在污泥生物脱毒中的应用. *环境科学研究*, 2003, 16(5): 41
- [8] 周立祥, 王良梅. 污水污泥中重金属的细菌淋滤效果研究. *环境科学学报*, 2001, 21(4): 504
- [9] 耿冰, 郑宇, 邸进申. 氧化亚铁硫杆菌的生物学特性研究进展. *生物技术*, 2004, 14(2): 71
- [10] Hosseini T R, Kolahdoozan M, Tabatabaei Y S M. Bioflotation of Sarcheshmeh copper ore using *Thiobacillus Ferroxidans* bacteria. *Miner Eng*, 2005, 18(3): 371
- [11] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999

## Isolation and characterization of a sulfur-oxidizing bacterium

QIU Lina, LI Yuanyuan, GONG Aijun, YAN Hai, WANG Xiaoning

Applied Science School, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

**ABSTRACT** A sulfur-oxidizing bacterial strain was isolated from sewage sludge using liquid selective medium and then purified on solid selective medium. The bacterium can metabolize sulfur or  $S_2O_3^{2-}$  to  $SO_4^{2-}$  during growth. The sulfur-oxidizing strain is Gram-negative, and has ability to swim. After three days of cultivation, the results showed that the pH of medium decreased. After one week, the pH of the medium dropped to about 0.6, which suggests sulfur oxidation is taken place. The concentration of the sulfate was tested by using ion chromatography, and the results showed that the concentration of the sulfate increased from  $249.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $3679.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The sulfur-oxidizing bacterium was then inoculated into the FeS medium, as expected, the FeS was oxidized and the media became lighter in color.

**KEY WORDS** sulfur-oxidizing bacterium; isolation; characterization