

· 环境生物技术 ·

一株异养型细菌对无机硫化物的降解特性和培养条件优化

庄荣玉¹, 赵洋甬², 沈青青³, 何小蝶⁴, 任雨婷¹, 李美燕¹, 娄永江¹, 严小军¹

1 宁波大学海洋学院 浙江省动物蛋白食品精深加工重点实验室 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211

2 浙江易测环境科技有限公司, 浙江 宁波 315194

3 香飘飘食品股份有限公司, 浙江 湖州 313000

4 中国水稻研究所, 浙江 杭州 311400

庄荣玉, 赵洋甬, 沈青青, 等. 一株异养型细菌对无机硫化物的降解特性和培养条件优化. 生物工程学报, 2018, 34(4): 548-560.

Zhuang RY, Zhao YY, Shen QQ, et al. Characterization and optimization of a heterotrophic bacterium for sulfide degradation. Chin J Biotech, 2018, 34(4): 548-560.

摘 要: 畜禽屠宰加工、鱼粉饲料加工等一些食品工业生产过程中会释放出大量的硫化氢恶臭气体, 导致周边环境的严重污染。为实现以培养异养型细菌脱除硫化氢气体的目的, 取分离到的异养脱硫细菌 XJ-2, 通过诱变筛选得到一株高效脱硫菌株 ZJNB-B3, 其脱硫率达 97%。基于形态学研究、API 50 CHB 生理生化鉴定及 16S rRNA 基因测序, 鉴定该菌为蜡状芽胞杆菌 *Bacillus cereus* ZJNB-B3。该菌 GenBank 登录号为 MF679650。降解特性研究表明, ZJNB-B3 菌株对有毒的硫化物有较高耐受性, 耐受上限高达 300 mg/L。采用响应面法优化环境因素对菌株降解硫化物效率的影响, 得到在最适培养温度 30 °C 下, 初始 S²⁻浓度为 211.8 mg/L、初始 pH 值 6.72、接种量为 5.04% 时, 菌株氧化脱硫效果最显著, 经过实测在 48 h 产生的硫酸盐浓度为 63.8 mg/L, 脱硫率达 97.3%。菌株在氧化硫化物时不会产生硫酸抑制菌株的生长, 可以在 pH 值温和的环境条件下脱硫, 因此, 该菌有较高的工业应用价值。本研究为异养型细菌应用于工业反应器脱除硫化氢恶臭气体提供了小试研究基础。

关键词: 硫化物, 脱硫, 异养型细菌, 蜡状芽胞杆菌, 脱臭, 鉴定

Received: September 1, 2017; **Accepted:** February 21, 2018

Supported by: The Marine Public Welfare Industry Research Key Grant Project of State Oceanic Administration of China (No. 201305013), Research Project of Public Welfare Technology in Zhejiang Province (No. 2017C33009), Agricultural Science and Technology Project of Ningbo Municipality (No. 2014C10034).

Corresponding authors: Yongjiang Lou. Tel/Fax: +86-574-87600167; E-mail: louyongjiang@nbu.edu.cn

Xiaojun Yan. Tel/Fax: +86-574-87608347; E-mail: yanxiaojun@nbu.edu.cn

国家海洋局海洋公益性行业重大科研专项 (No. 201305013), 浙江省科技厅公益技术应用研究计划项目 (No. 2017C33009), 宁波市科技局农业科技攻关项目 (No. 2014C10034) 资助。

网络出版时间: 2018-03-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180305.1746.003.html>

Characterization and optimization of a heterotrophic bacterium for sulfide degradation

Rongyu Zhuang¹, Yangyong Zhao², Qingqing Shen³, Xiaodie He⁴, Yuting Ren¹, Meiyang Li¹, Yongjiang Lou¹, and Xiaojun Yan¹

¹ Key Laboratory of Animal Protein Foods Deep Processing of Zhejiang Province, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China

² Zhejiang Easy Testing Environmental Technology Co., Ltd., Ningbo 315194, Zhejiang, China

³ Xiangpiaopiao Food Co., Ltd., Huzhou 313000, Zhejiang, China

⁴ China National Rice Research Institute, Hangzhou 311400, Zhejiang, China

Abstract: The emission of hydrogen sulfide in the waste gas from slaughter plant, fishmeal feed processing and some other food industrial processing could cause serious air pollution to the surrounding environment. The purpose of this study was to screen heterotrophic bacterium strains for the removal of hydrogen sulfide odor. One heterotrophic bacterial mutant ZJNB-B3 was derived from the sulfide degrader *Bacillus cereus* XJ-2 and its sulfide removal efficiency was 97%. Based on the morphology studies, biochemical tests and 16S rRNA gene analysis, the strain was identified as *Bacillus cereus* ZJNB-B3. The NCBI GenBank accession number is MF679650. Batch tests showed that the strain tolerated up to 300 mg/L of toxic S²⁻ concentration. Response surface methodology was applied to optimize the conditions of degradation of sulfide. The optimal parameters were as follows: initial sulfide concentration 211.8 mg/L, initial pH 6.72, inoculum volume 5.04%, and incubation temperature 30 °C. The accumulated sulfate concentration was 63.8 mg/L and the sulfide removal efficiency was 97.3% after 48 h incubation. No sulfuric acid was generated during sulfide oxidation by the strain. Sulfide could be removed effectively by this strain under mild pH conditions. The results suggested that the strain may have great industrial application potential. This study provides the fundamentals for the removal of hydrogen sulfide gas.

Keywords: sulfide, removal of sulfide, heterotrophic bacterium, *Bacillus cereus*, deodorization, identification

大气污染、恶臭、噪声、水质污染、振动、土壤污染、地基下沉是七大典型公害，恶臭物质居于第二，它包括挥发性无机物 (Volatile inorganic compounds, VIC) 和有机物 (Volatile organic compounds, VOC)^[1]。目前，以人类的嗅觉能够感知的恶臭物质有 4 000 多种，其中有 50 多种对人类的危害较大，主要是硫化氢^[2]、氨、硫醇类^[3]、二甲基硫醚^[4]、三甲胺、醛类、苯类和酚类等^[5]。硫化氢是硫系恶臭成分中最常见的恶臭气体，主要来自于污水处理设施、石油炼制、堆肥、畜禽屠宰、鱼粉饲料加工、制革和造纸等工农业生产排放的废气^[5-9]，其臭阈值很低，约为 0.001 43 mg/m³^[10]，微量浓度的 H₂S 就具有强烈的恶臭气味。H₂S 气体无色，对人体有剧毒，低浓度中毒对眼睛和呼吸系统有强烈的刺激和腐蚀作用，重度中毒造成

中枢神经系统、心脏、肺细胞损害，出现呼吸、心跳骤停，发生闪电型死亡^[2]。它会引起金属和设备腐蚀，在空气中容易被氧化成 SO₂，对生态环境产生酸雨和致毒效应。

恶臭污染物治理难度较大，物理法、化学法对于此种污染的处理存在效率低、能耗高的缺点，废气达标排放较难。目前在国内外生物法脱臭已成为主流方法，具有除臭率高、无二次污染、所需设备简单、运转成本低及废气经过处理可以达标排放等优点^[1,11-12]。其原理是利用微生物的生理代谢活动来降解恶臭物质，将其转化为无异味、对环境无害的产物，从而达到除臭目的。

无机硫和其化合物在自然界中分布范围很广，能以 30 多种不同的离子或分子形式存在，仅有 5 种无机硫化物在室温和一个大气压下在溶液

中具有稳定性,它们是 SO_4^{2-} 、 HSO_4^- 、 S^0 、 H_2S 、 HS^- 。其他形式的硫例如多硫化物、硫代硫酸盐和连多硫酸盐则是不稳定的。自然界中能氧化无机硫化物的细菌种类很多,大部分是光合硫细菌和化能自养型细菌^[2],目前工业上用于脱除硫化氢的微生物主要是自养型硫杆菌属细菌 *Thiobacillus* sp.^[13-15],此类细菌对硫化氢的转化途径较简单,普遍是利用还原态的硫化物作为能源,将硫转化为单质硫、硫酸或者硫酸盐等物质,其催化的硫素转化途径为: $\text{S}^{2-} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$ 。王帆等^[16]在有臭味的污泥中筛选到一株氧化亚铁硫杆菌,降解硫化物的最大量为 1 290.3 mg/L。伍永钢等以自养菌^[17]应用到生物滴滤床净化 H_2S 气体,去除率稳定在 95% 以上。钱东升等^[10]用板式生物滴滤塔净化硫化氢的研究表明净化也主要由自养菌完成。然而自养型硫氧化细菌进行硫化物的去除存在一些缺点:1) 有些菌种在氧化硫化物的同时产生硫酸,会抑制菌体活性,大量产酸还会导致菌体自溶,降低除硫速率;2) 有些需要加入碱进行中和,增加了处理成本。

本研究团队承担了鱼粉饲料加工、畜禽屠宰加工恶臭废气生物法处理工程的科研项目,鱼粉加工废气除含有硫化氢、氨气无机污染物,还含有高浓度三甲胺^[18]、甲硫醇、甲硫醚、二甲二硫等有机恶臭污染物。屠宰加工废气除含有硫化氢、氨气,还含有反复回用融化食品级脱毛石蜡和松香的高温挥发有机成分,自养菌难以在含有机成分混合废气的环境中生长。此外,将废气与车间中的空气引入工业生物滴滤塔的离心机风量高达 $4 \times 10^4 \text{ m}^3/\text{h}$,反应器内需要使用好氧的异养型微生物,因此筛选具有脱除硫化氢气体功能的异养菌具有重要意义。

目前国内外关于能够高效去除无机硫化物的异养型脱硫微生物的降解特性基础研究鲜有报道。本团队在前期工作中已经筛选出一株具有高效脱硫功能的异养型真核微生物热带假丝酵母菌

ZJY-7^[19]。为实现以异养型细菌脱除硫化氢气体之目的,本研究又选育出一株比较容易培养、在自然环境下能够高效脱硫的异养型细菌蜡状芽胞杆菌,对其降解硫化物的生理特性进行了考察,并采用响应面法优化菌株的脱硫工艺参数,为今后将该细菌应用到工业生物滴滤塔反应器脱除 H_2S 废气奠定小试研究基础。

1 材料与方法

1.1 出发菌株

本实验室保存的脱硫菌 *Bacillus cereus* XJ-2 菌株,分离自宁波市某鱼粉加工厂污水沉淀池的污泥,脱硫率达 87.1%^[20]。

1.2 培养基

营养肉汤培养基:蛋白胨 10.0 g,牛肉浸出粉 3.0 g,氯化钠 5.0 g (杭州微生物试剂有限公司),加热溶于 1 000 mL 蒸馏水,根据不同需要调 pH 后,121 °C 灭菌 20 min。

分离筛选培养基:营养琼脂培养基 (杭州微生物试剂有限公司)。

1.3 诱变试剂

将脱硫 XJ-2 菌株在新鲜斜面上活化,30 °C 培养 24 h,共活化 2 次。将菌苔转移到装有玻璃珠的磷酸缓冲溶液 (pH 7.0) 三角瓶中,置于 30 °C、180 r/min 下摇瓶 30 min,制成菌悬液,细胞浓度约 1.2×10^8 – 1.5×10^8 CFU/mL。取 10 mL 菌悬液于培养皿中,将皿盖打开,在超净台紫外灯下照射 20 s,30 °C 恒温避光培养 48 h,然后涂布在营养琼脂固体平板上,在 30 °C 培养 48 h,挑取生长的单菌落进行平板划线、分离,纯化后的 15 个菌株,编号分别为 ZJNB-B1, ZJNB-B2, …… , ZJNB-B15,保藏在斜面培养基上。

1.4 高效脱硫菌株筛选

1.4.1 初筛

取上述 15 个菌株,分别接种到初始 pH 7.0、

100 mL 营养肉汤锥形瓶中,置于 30 ℃、150 r/min 下培养 18 h 的种子液。在 850 mL 容量的气体研究用密封瓶 (以下简称反应瓶) 中加入初始 pH 7.0、小于 150 mL 的营养肉汤,灭菌后先加入浓 Na_2S 水溶液使得初始 S^{2-} 浓度为 200 mg/L,加 5% 种子液使反应初始的液体总体积为 150 mL,瓶口用橡胶塞密封,在 30 ℃、150 r/min 下培养 48 h,每种处理做 4 个重复试验。检测 48 h 各瓶中硫酸盐的浓度,以评定菌株对 S^{2-} 的氧化脱除能力,最终确定 4 株生成硫酸盐浓度较高的菌株为脱硫能力比较好的初筛菌株。

1.4.2 复筛

取上述初筛 4 株菌株,按照初筛方法进行复筛,每种处理做 4 个重复试验。检测 48 h 残余 S^{2-} 浓度和硫酸盐浓度,选择出累积硫酸盐浓度最高的、同时脱硫率较高的复筛菌株,即为高效脱硫菌株。

1.5 菌株鉴定

形态学鉴定:采用光学显微镜 (日本 Olympus, BX51) 和扫描电子显微镜 (日本 Hitachi, SU-70)。生理生化鉴定:采用 API 50 CHB 试剂条,购自上海梅里埃生物工程有限公司。分子生物学鉴定:采用生工生物工程 (上海) 股份有限公司的 Ezup 柱式 SK8255 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒进行 DNA 提取和纯化,对菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增,细菌通用引物序列为 27F: 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增反应参数如下: 94 ℃ 预变性 4 min; 循环数 35 次 (95 ℃ 变性 45 s, 55 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 60 s); 72 ℃ 终延伸 10 min, 4 ℃ 保温 10 min 以上。取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,用 SanPrep SK8131 DNA 凝胶回收试剂盒回收,产物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序 (ABI 3730-XL, Applied Biosystems,

USA)。测序结果与 NCBI 的 GenBank 中的已知序列进行同源性比较分析,选取 1 500 bp 左右长度进行比对,采用邻位连接法 (Neighbor-joining) 进行系统发育分析 (MEGA 6.06),以确定菌株的属名和种名。

1.6 菌株生长曲线测定

将脱硫菌株接种于种子培养基,在 30 ℃、150 r/min 下培养 18 h,接种 5% 到 400 mL 的营养肉汤中,在 30 ℃、150 r/min 下培养,测定该菌株的生长曲线。

1.7 单因素对菌株降解硫化物效果的影响

调反应瓶内培养液初始 pH 为 7.0,灭菌后加入初始 S^{2-} 浓度分别为 100、200、250、300、400 mg/L,最后加 5% 种子液使反应初始的液体总体积为 150 mL,置于 30 ℃、150 r/min 下培养 48 h,每隔 12 h 取液体分析硫化物、硫酸盐含量、pH 值、OD 变化,测定出菌株氧化无机硫化物的最适初始 S^{2-} 浓度。然后,在最适初始 S^{2-} 浓度下考察菌株将 S^{2-} 氧化产生硫酸盐的最适初始 pH 值、最适培养温度的生理代谢条件。上述每种处理都设置 3 个平行样,并做空白对照。

1.8 多因素降解硫化物效果的优化

运用响应面法考察初始 S^{2-} 浓度、初始 pH 值和接种量 3 个环境因素在最适培养温度下对菌株降解硫化物的影响。响应面参数设计见表 1。

表 1 Box-Behnken 响应面实验设计因素及水平
Table 1 Factors and levels of the Box-Behnken experimental design

Factor	Code	Level		
		-1	0	1
Initial S^{2-} (mg/L)	A	100	250	400
Initial pH	B	5	6	7
Inoculum volume (%)	C	3	5	7

1.9 检测和分析方法

细胞数量表征采用吸光值 (OD) 法, 使用分光光度计在 600 nm 处进行直接分析 (UV-1800, 美析 (中国) 仪器公司, 上海)。采用戴安公司 (DIONEX) ICS 2000 离子色谱仪检测液体中的 S^{2-} 、 SO_4^{2-} 浓度。

2 结果与分析

2.1 高效脱硫异养型细菌的筛选

初筛: 王惠祥等报道根瘤菌属^[21]异养菌氧化无机硫化物的转化途径与引言中所述的自养菌基本相同。微生物将 S^{2-} 氧化成最稳定的氧化物形式是硫酸盐, 其无异味、对环境无害, 从而能达到降毒除臭目的。因此, 本研究通过检测反应结束硫酸盐的浓度高低, 来评定菌株对无机 S^{2-} 的氧化脱除能力的大小。每一种处理做 4 个重复试验, 最终确定 ZJNB-B2、ZJNB-B3、ZJNB-B5、ZJNB-B8 共 4 株在 48 h 生成硫酸盐浓度较高的菌株为氧化脱硫效果比较好的初筛菌株, 结果见图 1 各处理左柱所示。

复筛: 对初筛出的 4 株菌株进行复筛, 检测初始 0 h S^{2-} 浓度和 48 h S^{2-} 的浓度, 以计算脱硫率, 结果如图 1 各处理的右柱所示; 并检测 48 h 各处理的硫酸盐浓度, 其结果均与初筛平均值相同, 因此在图 1 中不重复表示。由图 1 结果可以得出 ZJNB-B3 菌株累积硫酸盐浓度最高, 同时其脱硫率也为最高, 达 97.2%。将其接种于斜面上, 在 30 °C 下培养 24 h, 置于 4 °C 冰箱中保存。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态学研究

光学显微镜观察到 ZJNB-B3 菌体为革兰氏阳性杆菌, 产中生芽胞, 具有运动性。扫描电镜 (SEM) 观察到的菌株形态见图 2, 菌体细胞大小为 $(1.0-1.2) \mu m \times (3.0-5.0) \mu m$ 。

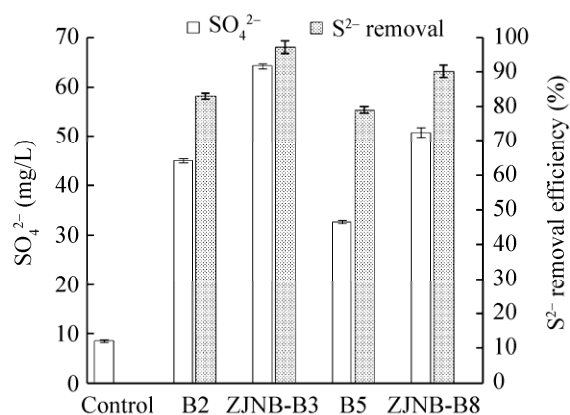


图 1 四个菌株生成硫酸盐的能力和脱硫率

Fig. 1 The sulfate generation and removal efficiency of sulfide of four strains.

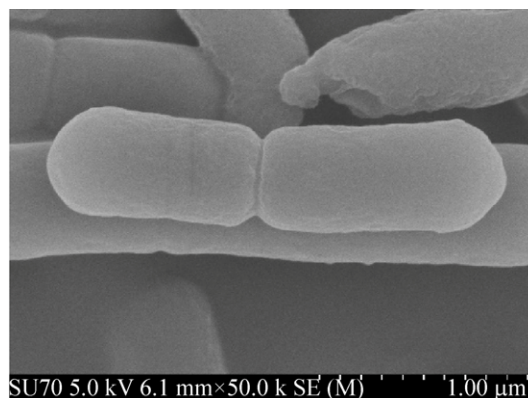


图 2 扫描电镜观察到的 ZJNB-B3 菌株形态

Fig. 2 Morphology of ZJNB-B3 examined under a scanning electron microscope.

2.2.2 生理生化鉴定

碳源利用试验: 采用法国 bioMérieux 公司生产的 API 50CHB 试剂条, 这是一种用于研究芽胞杆菌对 49 种糖发酵作用的快速测定试剂条。将结果 (表 2) 输入 API 芽胞杆菌鉴定数据库中进行对比。补充生理生化试验: 菌株的氧化酶试验阴性; 接触酶试验阳性; 精氨酸双水解酶阴性。鉴定结果表明, ZJNB-B3 为芽胞杆菌属的蜡状芽胞杆菌 *Bacillus cereus*。

2.2.3 分子生物学鉴定

采用 16S rRNA 基因通用引物,对细菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增,并进行 DNA 测序,将得到的序列与 The National Center for Biotechnology Information (NCBI) 的 GenBank 中公开的已知序列通过 Blastn 软件进行比对,目标菌株与已知的 *Bacillus cereus* LN890259.1 相似性达到了 100%。菌

株与 *Bacillus* sp. 中其他相近的模式菌株比对的结果见图 3 系统发育树。根据分子生物学鉴定结果,将菌株命名为 *B. cereus* ZJNB-B3 (蜡状芽胞杆菌 ZJNB-B3)。此菌株于 2016 年 6 月 22 日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号: CCTCC No. M 2016337。2017 年 8 月将菌株的基因序列提交 GenBank,申请登录号为 MF679650。

表 2 API 50CHB 的试验项目及结果

Table 2 Results of API 50CHB test									
Test	Result	Test	Result	Test	Result	Test	Result	Test	Result
0	—	GAL	—	MDM	—	MEL	—	TUR	—
GLY	+	GLU	+	MDG	—	SAC	+	LYX	—
ERY	—	FRU	+	NAG	+	TRE	+	TAG	—
DARA	—	MNE	—	AMY	—	INU	—	DFUC	—
LARA	—	SBE	—	ARB	+	MLZ	—	LFUC	—
RIB	+	RHA	—	ESC	+	RAF	—	DARL	—
DXYL	—	DUL	—	SAL	+	AMD	—	LARL	—
LXYL	—	INO	—	CEL	+	GLYG	+	GNT	—
ADO	—	MAN	—	MAL	+	XLT	+	2KG	—
MDX	—	SOR	—	LAC	—	GEN	—	5KG	—

Results: positive “+”, negative “—”.

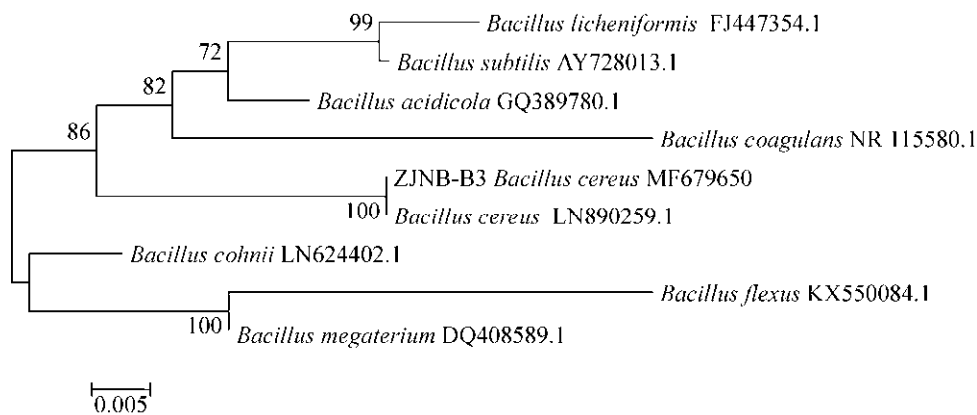


图 3 菌株 ZJNB-B3 与 *Bacillus* sp. 中模式菌株的系统发育树
Fig. 3 The phylogenetic tree of the strain ZJNB-B3 with other strains of *Bacillus* sp..

2.3 菌株生长曲线测定

测 30 °C 培养菌液在波长 600 nm 处的吸光值 (OD_{600}), 该波长下细胞数量与 OD 值呈正比, 可用 OD 值变化表征细菌数量的变化, 以未接种液体培养基作为空白, 绘制生长曲线。由图 4 可见, 菌液在 0–2 h 吸光值较小, 小于 0.5, 这是细菌生长的延迟期, 是菌体对所处环境的适应期; 在 2–22 h 时, 菌液的吸光值呈直线快速上升, 这是细菌生长对数期, 细菌在适宜的环境条件下不断吸收营养物质细胞繁殖速度最快; 在 22–85 h 时, 吸光值的变化幅度较小, 基本上保持稳定, 为细菌生长的稳定期, 此阶段, 细胞代谢产物的积累速度达到高峰, 显微镜还观察到此阶段菌体开始形成芽胞; 在 85–100 h 时, 吸光值明显呈现下降趋势, 为细菌生长的衰亡期。

2.4 单因素下菌株降解硫化物生理特性研究

由图 4 可知菌株在不含 S^{2-} 环境下在 48–72 h 都处于菌体生长的稳定期。向营养肉汤中加入 200 mg/L 初始 S^{2-} 底物, 然后接种 5% 种子液, 每隔 12 h 检测 0–72 h 各瓶中硫酸盐浓度, 发现反应 48 h 后累计的硫酸盐浓度变化不大, 在 72 h 瓶中硫酸盐的浓度很接近在 48 h 硫酸盐的值, 因此之后在含有 S^{2-} 环境因素下的菌株生理特性研究都在 48 h 结束。

2.4.1 菌株最高耐受有毒硫化物的浓度

硫化物对好氧生物是一种高度有毒的物质^[22], 毒性作用主要包括有呼吸毒性和神经毒性。硫化物特别是 H_2S 渗透进入生物体内的能力很强, 如在较小型底栖生物组织中其扩散系数约为 $5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ^[23]。硫化物很容易穿过生物体的体表, 进而对其生理代谢产生毒性效应。因此, 硫化物对微生物细胞也具有一定的毒性。

肉汤初始 pH 值为 7、初始 S^{2-} 为 100–400 mg/L, 接种 5% 的种子液, 置于 30 °C、150 r/min 下培养 48 h 硫酸盐的含量变化见图 5, 反应期间的 pH 值、

OD 变化分别见图 6、7。由图 5 可知, 当初始 S^{2-} 浓度从 100、200 mg/L 不断上升到 250 mg/L 时, 由于添加的 Na_2S 水溶液碱性很强, 反应初始 0 h 的 pH 从 8.09 不断增大到 8.66 (图 6), 但是 48 h 的代谢产物硫酸盐的浓度不断增长, 分别为 22.2、47.7、57.5 mg/L, 柱子上面的字母 a、b、c、d 表示结果有显著差异 ($P < 0.05$)。

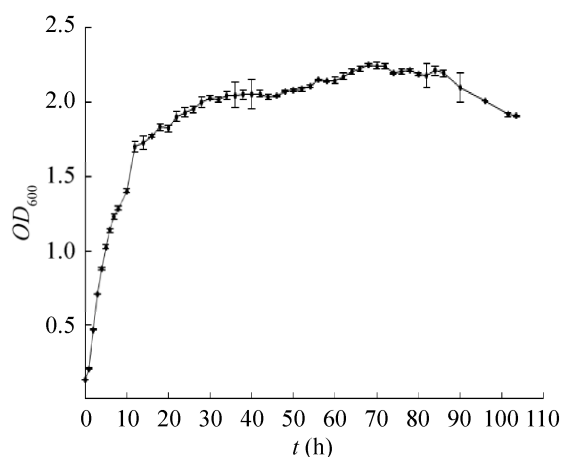


图 4 菌株 ZJNB-B3 的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of ZJNB-B3 strain.

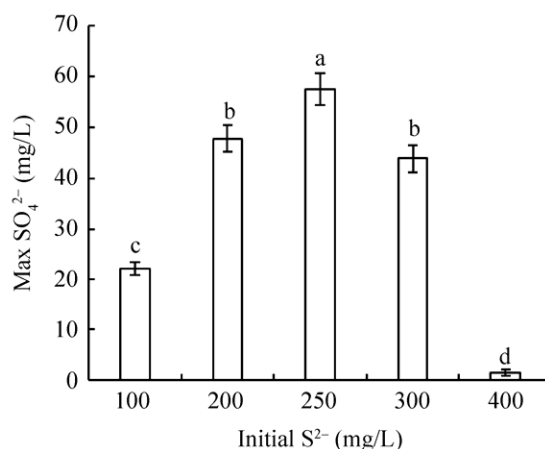


图 5 菌株在不同初始 S^{2-} 浓度下累计硫酸盐浓度

Fig. 5 The maximum accumulation of concentration of sulfate subjected to different initial sulfide treatments $P < 0.05$.

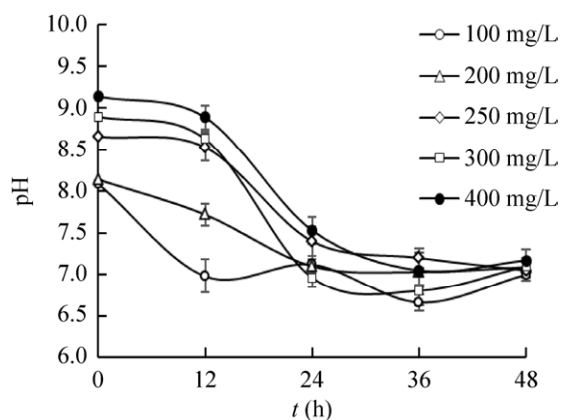


图6 菌株在不同初始 S^{2-} 浓度时的 pH 值变化

Fig. 6 pH value at different initial S^{2-} concentrations of the strain.

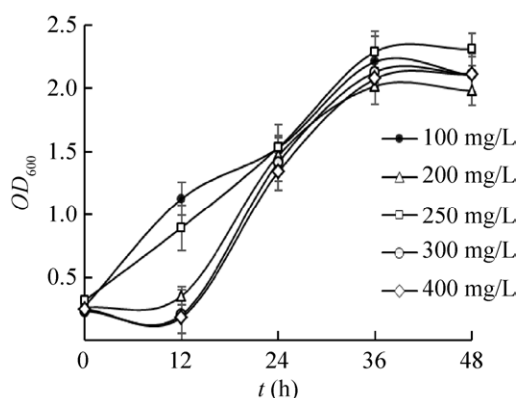


图7 菌株在不同初始 S^{2-} 浓度时的 OD 变化

Fig. 7 OD value at different initial S^{2-} concentrations of the strain.

当添加 S^{2-} 为 300 mg/L 时, 0 h 的 pH 值为 8.90, 48 h 的硫酸盐浓度略微下降到 43.9 mg/L, 其对硫化物的脱除能力仍然显著。而当初始 S^{2-} 浓度为 400 mg/L 时, 反应初始 0 h 的 pH 值高达 9.14, 12 h 的 OD 值比 0 h 的 OD 值下降, 说明反应开始阶段处于强碱性条件下, 接种的细菌被部分杀死而且生长受到抑制, 培养 24 h 后 pH 值才下降到 7.53, OD 值增大到 1.34, 菌体开始繁殖, 48 h 时 pH 值降为 7.17, 但产生的硫酸盐仅为

1.90 mg/L, 细菌的脱硫效果显著变差。从上述的结果和分析可知, 菌株对有毒的硫化物有较高耐受性, 耐受上限高达 300 mg/L, 菌株氧化无机硫化物的最适初始 S^{2-} 浓度是 250 mg/L, 此条件下氧化 S^{2-} 产生的硫酸盐浓度最大, 达 57.5 mg/L。

2.4.2 菌株氧化 S^{2-} 产生硫酸盐的最适初始 pH 值

在预备试验中, 将营养肉汤初始 pH 值先调到 5、6、7、8、9, 然后添加浓 Na_2S 水溶液, S^{2-} 浓度为 15 000 mg/L (pH 值为 13.6), 培养液摇匀使初始 S^{2-} 浓度为 250 mg/L。在肉汤初始 pH 值为 8 和 9 的处理组, 加入 S^{2-} 为 250 mg/L 后, 再测定培养液的 pH 值, 都大于 9.2, 由图 6、7 的研究结果已知 0 h 的 pH 大于 9.14 的溶液如果接种后, 菌株细胞难以生长, 因此最适初始 pH 值的研究, 肉汤初始 pH 值定为 5、6、7。加入最适初始 S^{2-} 为 250 mg/L, 接种 5% 种子液, 置于 30 °C 下培养, 考察 0–48 h 的硫酸盐浓度, 由图 8 可知, 菌株氧化 S^{2-} 产生硫酸盐的最适初始 pH 值为 7。

2.4.3 菌株氧化 S^{2-} 产生硫酸盐的最适培养温度

调肉汤最适初始 pH 值为 7, 加入 250 mg/L S^{2-} 和 5% 种子液, 置于 25 °C、30 °C、35 °C 下培养, 检测 0–48 h 硫酸盐浓度。由图 9 可知菌株氧化 S^{2-} 产生硫酸盐的最适培养温度为 30 °C。

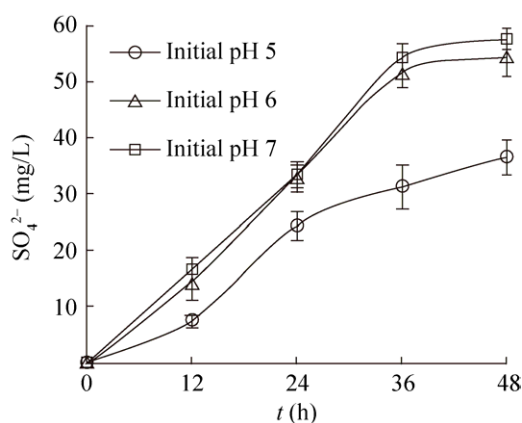


图8 菌株产生硫酸盐的最适初始 pH 值

Fig. 8 The optimal initial pH value for sulfate generation of the strain.

2.5 响应面法优化菌株降解硫化物的工艺参数

响应面法 (Response surface methodology, RSM) 是利用合理的试验设计, 采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系, 解决多变量问题的一种统计方法。它可以在整个响应面区域内寻求最优实验点, 是降低成本、优化加工条件的一种有效方法, 在食品^[24-25]、生物技术^[26-27]、环境生物技术^[28-30]等研究领域有广泛的应用。

本研究通过响应面法考察 3 个环境因素对菌株降解无机硫化物效率的影响。利用 Design-expert 软件, 以初始 S^{2-} 浓度、初始 pH 值、接种量% 作为变量 A、B、C, 以 48 h 时的硫酸盐浓度作为响应值, 按照表 1 的 Box-Behnken 响应面实验设计进行试验。各因素试验结果和模型预测值如表 3 所示。

对表 3 中的硫酸盐浓度的试验数据进行多元回归, 得到回归方程式(1):

$$SO_4^{2-}(\text{mg/L}) = 62.08 - 18.41A + 1.35B + 0.11C - 0.4AB - 0.13AC + 0.7BC - 36.28A^2 - 5.9B^2 - 6.58C^2 \quad (1)$$

表 3 响应面法试验的实际值与预测值

Table 3 Actual and predicted values of RSM test

Run	Factor			Actual SO_4^{2-} (mg/L)	Predicted SO_4^{2-} (mg/L)
	A	B	C		
1	100.00	5.00	5.00	36.9	36.56
2	400.00	5.00	5.00	0.8	0.54
3	100.00	7.00	5.00	39.8	40.06
4	400.00	7.00	5.00	2.1	2.44
5	100.00	6.00	3.00	37.7	37.40
6	400.00	6.00	3.00	1.2	0.82
7	100.00	6.00	7.00	37.5	37.87
8	400.00	6.00	7.00	0.5	0.80
9	250.00	5.00	3.00	48.2	48.84
10	250.00	7.00	3.00	50.1	50.14
11	250.00	5.00	7.00	47.7	47.66
12	250.00	7.00	7.00	52.4	51.76
13	250.00	6.00	5.00	59.0	62.08
14	250.00	6.00	5.00	59.1	62.08
15	250.00	6.00	5.00	66.0	62.08
16	250.00	6.00	5.00	64.7	62.08
17	250.00	6.00	5.00	61.6	62.08

式中: A 为初始 S^{2-} 浓度 (mg/L), B 为初始 pH 值, C 为接种量 (%)。

对本试验所拟合的回归方程模型进行方差分析, 结果见表 4, 模型的显著系数 $P < 0.0001$, 说明回归方程极显著; 模型的相关系数 $R^2 = 0.9952$, 说明该模型能较准确地预测响应值的变化。

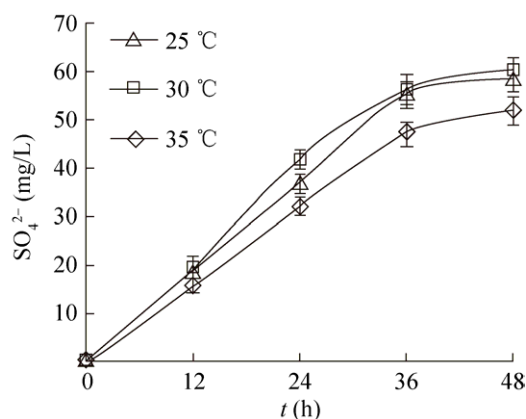


图 9 菌株产生硫酸盐的最适培养温度

Fig. 9 The optimal temperature for sulfate generation of the strain.

表 4 响应面试验菌株产生硫酸盐结果的方差分析

Table 4 Analysis of variance for response of sulfate concentration

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value	Significant
Model	8 865.50	9	985.06	162.40	<0.000 1	**
A	2 712.20	1	2 712.20	447.00	<0.000 1	**
B	14.58	1	14.58	2.40	0.165	
C	0.10	1	0.10	0.017	0.900 8	
AB	0.64	1	0.64	0.11	0.755	
AC	0.063	1	0.063	0.01	0.922	
BC	1.96	1	1.96	0.32	0.588	
A ²	5 541.30	1	5 541.30	913.30	<0.000 1	**
B ²	146.70	1	146.70	24.18	0.0017	**
C ²	182.20	1	182.20	30.02	0.000 9	**
Residual	42.47	7	6.07			
Lack of fit	1.64	3	0.55	0.054	0.981 4	
Pure error	40.83	4	10.21			
Cor total	8 908.00	16				

$R^2=0.995\ 2$; *: $P<0.05$, significant; **: $P<0.001$, more significant.

用该多元回归方程式得到各个因素对响应值的响应曲面图, 投影在 X 轴的等高线可以直观地看出两个因素之间的相互影响作用, 等高线形状越接近于椭圆则表示两个因素之间交互作用越强, 越圆表示这两个因素的交互作用不显著。从图 10 可知, 初始底物 S^{2-} 浓度和初始 pH 值对菌株的氧化脱硫效果有显著的影响。

经过 Design-expert 软件的分析, 对得到的回归方程式求一阶偏导, 令其等于 0 后, 可以得到菌株最优的降解硫化物条件, 即 ZJNB-B3 菌株在最适初始底物 S^{2-} 浓度为 211.8 mg/L、初始 pH 值为 6.72、接种量为 5.04% 时, 菌株的氧化脱硫效果最显著, 此时的硫酸盐浓度应为 64.4 mg/L。

2.6 最优降解硫化物工艺参数的验证

为验证响应面法得到的模型的准确性, 对菌株在上述最优的降解硫化物工艺参数下进行了 3 次验证试验, 测定了 0–48 h 的 S^{2-} 和 SO_4^{2-} 的浓度变化 (图 11), 以及 pH 值和 OD 变化 (图 12)。这 3 次试验平均实际测得菌株在 48 h 能够将液体中 S^{2-} 浓度降为 6.32 mg/L, 脱硫率达 97.0%, 脱硫产生的 SO_4^{2-} 的浓度为 63.8 mg/L, 与预测值 64.4 mg/L 较

为接近, 预测值与实际测定值两者的相对误差为 0.94%, 可见响应面法所拟合的多元回归方程能够比较准确地预测不同环境因素下菌株氧化降解 S^{2-} 产生的稳定氧化物 SO_4^{2-} 的值。

对比不含有毒物 S^{2-} 时菌株的生长曲线 (图 4), 由含有毒物 S^{2-} 时图 12 中的 OD 值变化曲线可知, 细菌的生长延迟期明显比图 4 中的 0–2 h 变长到 0–12 h 左右, 12–30 h 的对数生长期的增长速率也比图 4 变慢, 不含有毒物 S^{2-} 时细菌在 22 h 后已经达到稳定期, 而含有毒物 S^{2-} 时在 30 h 后才出现稳定期, 证明 211.8 mg/L 的高浓度有毒物 S^{2-} 的存在, 对菌体的生理代谢产生了不利的影响, 使蜡状芽胞杆菌 ZJNB-B3 细胞的生长繁殖速度变慢。

邱丽娜等从污泥中筛选出一种革兰氏阴性硫氧化菌 (是自养型 SOB, 但未鉴定是什么菌属), 将其接种到不含碳源、加有硫粉的无机盐培养基中, 调节起始 pH 为 6 置于 30 °C 下培养, 到第 3 天 pH 下降到 1 左右, 培养到第 7 天 pH 可下降到 0.6, 推断该菌能氧化硫粉生成硫酸^[31], 可以作为生物浸出法的菌种用于浸矿或去除污泥中的重金属。

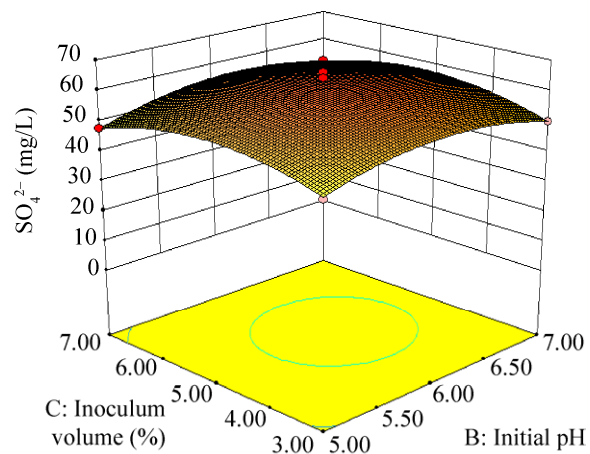
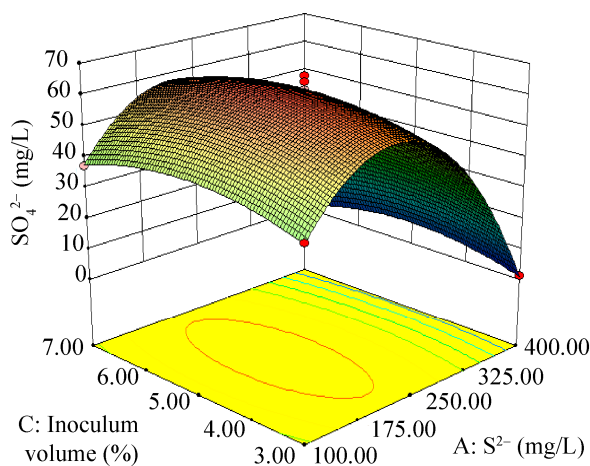
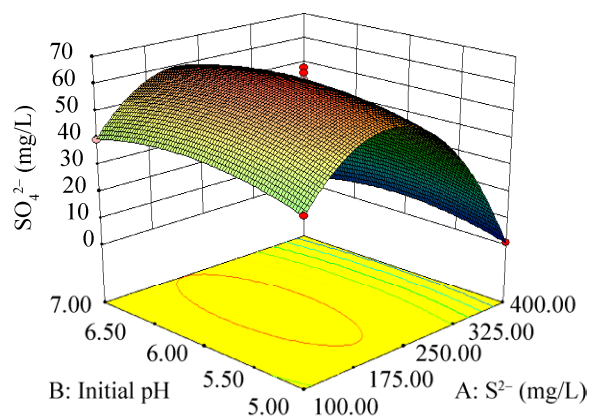


图 10 环境因素对菌株产生硫酸盐影响的响应面

Fig. 10 Three-dimensional surface figure of the influence of environmental factors on sulfate concentration of the strain.

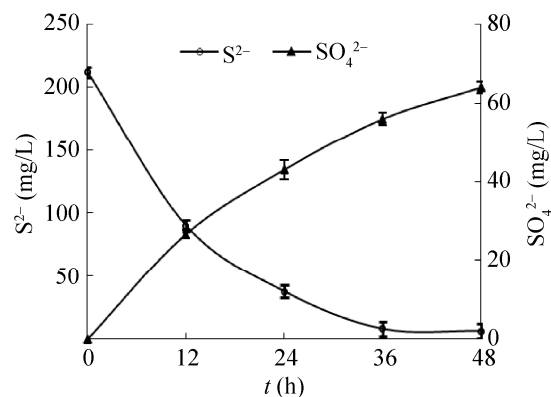


图 11 菌株在最适条件下硫化物和硫酸盐浓度变化

Fig. 11 The concentrations of sulfide and sulfate at the optimal desulfurization condition of the strain.

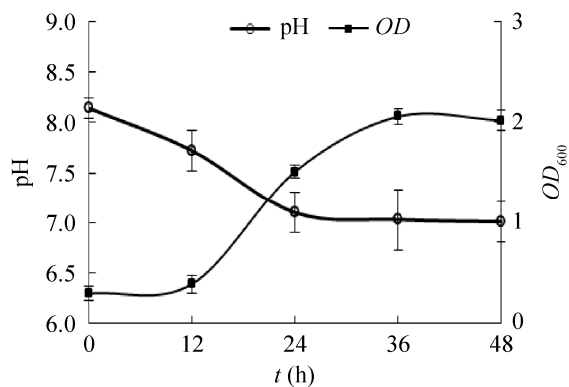


图 12 菌株在最适脱硫条件下 pH 值和 OD 的变化

Fig. 12 The pH and OD values at the optimal desulfurization condition of the strain.

在我们的研究中, 图 12 中 ZJNB-B3 菌株在 0–48 h 的 pH 值变化范围是 8.20–7.04, 在图 6 中, 当初始 S^{2-} 浓度为 100–300 mg/L 时, 菌株在 0–48 h 的 pH 值变化范围也均在 8.90–7.10, 各处理组在反应结束累积硫酸盐达最高时 pH 值均从碱性降到中性, 证明了 ZJNB-B3 菌株在氧化硫化物时不会产生硫酸抑制菌体的生长, 此菌株可以在 pH 值温和的环境条件下脱硫。其在小试研究脱硫过程中表现出 pH 值的稳定, 表明该菌有较高的工业应用价值, 可以将此菌应用于禽畜屠宰加工、鱼粉饲料加工等工业生产排放的恶臭硫化氢气体

的脱除处理,使用此异养菌的工业反应器如生物滴滤塔,将具有以下优点:其循环营养液不需要加入碱进行中和,降低了处理的成本;脱硫过程中 pH 值的稳定,可以使反应器保持稳定的脱除效率,容易操作管理,对于反应器的稳定运行具有重要的意义。本课题组正在进行此菌应用于生物滴滤塔处理禽畜屠宰加工污水处理站生产的硫化氢恶臭废气的研究,相关研究结果将另文发表。

3 结论

通过对出发菌株诱变得到一株生长快速且脱硫率高达 97% 的异养型脱硫细菌,基于形态学研究、生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列分析,鉴定菌株为蜡状芽胞杆菌,命名为 *Bacillus cereus* ZJNB-B3, GenBank 登录号为 MF679650。运用响应面法优化环境因素对菌株降解无机硫化物效率的影响,得到在最适培养温度 30 °C 下,初始 S^{2-} 浓度为 211.8 mg/L、初始 pH 为 6.72、接种量为 5.04% 时,菌株氧化脱硫效果最显著,实验测定硫酸盐浓度为 63.8 mg/L。

脱硫菌蜡状芽胞杆菌 ZJNB-B3 在氧化硫化物时不会产生硫酸抑制菌体的生长,可以在 pH 值温和的环境条件下实现高效脱硫效果,相较于一些在氧化硫化物时会产生硫酸抑制菌体活性的自养型细菌,该菌在硫化氢气体脱除方面有更高的工业应用价值。

REFERENCES

- [1] Rappert S, Müller R. Microbial degradation of selected odorous substances. *Waste Manag*, 2005, 25(9): 940–954.
- [2] Syed M, Soreanu G, Falletta P, et al. Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes—A review. *Can Biosyst Eng*, 2006, 48: 2.1–2.14.
- [3] Chen DZ, Sun YM, Han LM, et al. A newly isolated *Pseudomonas putida* S-1 strain for batch-mode-propanethiol degradation and continuous treatment of propanethiol-containing waste gas. *J Hazard Mater*, 2016, 302: 232–240.
- [4] Chen DZ, Zhao XY, Miao XP, et al. A solid composite microbial inoculant for the simultaneous removal of volatile organic sulfide compounds: preparation, characterization, and its bioaugmentation of a biotrickling filter. *J Hazard Mater*, 2018, 342: 589–596.
- [5] Yin J. Biological removal of odorous gases by biofilter and microbiological mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004 (in Chinese).
殷峻. 生物滤塔处理恶臭气体及微生物学机理[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [6] Talaiekhosani A, Bagheri M, Goli A, et al. An overview of principles of odor production, emission, and control methods in wastewater collection and treatment systems. *J Environ Manage*, 2016, 170: 186–206.
- [7] Henshaw PF, Medlar D, McEwen J. Selection of a support medium for a fixed-film green sulphur bacteria reactor. *Water Res*, 1999, 33(14): 3107–3110.
- [8] Rappert S, Müller R. Odor compounds in waste gas emissions from agricultural operations and food industries. *Waste Manag*, 2005, 25(9): 887–907.
- [9] Chen JY. Influence of slaughtering and meat product processing industry on the environment and the countermeasures to pollution. *J Meteor Environ*, 2006, 22(5): 59–61 (in Chinese).
陈金宇. 肉类屠宰加工行业对环境的主要影响及污染防治对策. *气象与环境学报*, 2006, 22(5): 59–61.
- [10] Qian DS, Fang JY, Chen DZ, et al. Removal of hydrogen sulfide by plate type-biotrickling filter. *Environ Sci*, 2011, 32(9): 2786–2793 (in Chinese).
钱东升, 房俊逸, 陈东之, 等. 板式生物滴滤塔高效净化硫化氢废气的研究. *环境科学*, 2011, 32(9): 2786–2793.
- [11] Burgess JE, Parsons SA, Stuetz RM. Developments in odour control and waste gas treatment biotechnology: a review. *Biotechnol Adv*, 2001, 19(1): 35–63.
- [12] Hu HP, Luo G, Liu J, et al. Study of biological techniques to the deodorization of odor. *Energ Environ Prot*, 2006, 20(5): 1–4 (in Chinese).
胡和平, 罗刚, 刘军, 等. 生物技术在恶臭气体处理中的应用研究. *能源环境保护*, 2006, 20(5): 1–4.
- [13] Chung YC, Huang C, Tseng CP. Operation optimization of *Thiobacillus thioparus* CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. *J Biotechnol*, 1996, 52(1): 31–38.
- [14] Lee EY, Cho KS, Ryu HW. Simultaneous removal of H_2S and NH_3 in biofilter inoculated with *Acidithiobacillus thiooxidans* TAS. *J Biosci Bioeng*, 2005, 99(6): 611–615.
- [15] Yao CZ, Zhang KQ, Ji M, et al. Use of *Thiobacillus thioparus* for enhanced treatment of sulfur containing wastewater. *China Water Wastewater*, 2004, 20(2): 57–59.

- (in Chinese).
- 姚传忠, 张克强, 季明, 等. 排硫硫杆菌生物强化处理含硫废水. 中国给水排水, 2004, 20(2): 57-59.
- [16] Wang F, Li SQ, Xu JG. Cultivation of desulfurizing-bacteria and the study of degrading capability of sulfide. J Northeast Agric Univ, 2004, 35(1): 21-24 (in Chinese).
- 王帆, 李淑芹, 许景钢. 脱硫菌的培养驯化与降解硫化物性能的研究. 东北农业大学学报, 2004, 35(1): 21-24.
- [17] Wu YG, Ren HQ, Ding LL, et al. Study on the start-up of an innovative polyethylene carrier biotrickling filter treating waste gas containing hydrogen sulphide. Environ Sci, 2006, 27(12): 2396-2400 (in Chinese).
- 伍永钢, 任洪强, 丁丽丽, 等. 新型聚乙烯填料生物滴滤床净化硫化氢气体的启动研究. 环境科学, 2006, 27(12): 2396-2400.
- [18] Yang X, Lou YJ, Yan XJ. Study on the malodorous gas in fish meal processing removal by DBD technique. J Nucl Agric Sci, 2016, 30(11): 2180-2188 (in Chinese).
- 杨贤, 娄永江, 严小军. DBD 技术处理鱼粉厂恶臭气体的研究. 核农学报, 2016, 30(11): 2180-2188.
- [19] Zhuang RY, Lou YJ, Qiu XT, et al. Identification of a yeast strain able to oxidize and remove sulfide high efficiently. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(1): 391-400.
- [20] Sun PX, Lou YJ, Zhuang RY, et al. Isolation and identification of a bacteria strain for desulfurization of hydrogen sulfide from feed-fishmeal processing. Chin J Environ Eng, 2015, 9(9): 4465-4470 (in Chinese).
- 孙佩璇, 娄永江, 庄荣玉, 等. 一株鱼粉加工硫化氢恶臭气体脱除菌株的分离与鉴定. 环境工程学报, 2015, 9(9): 4465-4470.
- [21] Wang HX, Jiang LY, Wu XW, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of a sulfide-oxidizing bacterium. Chin J Appl Environ Biol, 2011, 17(5): 706-710 (in Chinese).
- 王惠祥, 姜理英, 吴晓薇, 等. 硫氧化细菌的分离鉴定及降解特性. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 706-710.
- [22] Wang SF. The oxidative detoxification and metabolic adaptation of *Urechis unicinctus* to sulfide[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006 (in Chinese).
- 王思锋. 单环刺螠(*Urechis unicinctus*)对硫化物的氧化解毒及代谢适应[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [23] Powell E. Oxygen, sulfide and diffusion: why thiobiotic meiofauna must be sulfide-insensitive first-order respirers. J Mar Res, 1989, 47(4): 887-932.
- [24] Yang WX, Gao YX. Response surface methodology & its application in food industry. China Food Addit, 2005(2): 68-71 (in Chinese).
- 杨文雄, 高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用. 中国食品添加剂, 2005(2): 68-71.
- [25] Sun LJ, Liang JZ. Optimization of chelation of soybean peptides with calcium using response surface method. J Chin Cereals Oils Assoc, 2010, 25(1): 22-27 (in Chinese).
- 孙莉洁, 梁金钟. 响应面法优化大豆肽与钙离子螯合的研究. 中国粮油学报, 2010, 25(1): 22-27.
- [26] Liu HB, Zhang W, Chen YT, et al. Technology optimization of *Medicago sativa* leaf protein separation with foam fractionation. Trans Chin Soc Agric Eng, 2016, 32(9): 271-276.
- 刘海彬, 张炜, 陈元涛, 等. 泡沫法分离苜蓿叶蛋白工艺优化(英文). 农业工程学报, 2016, 32(9): 271-276.
- [27] Zheng J, Guo J, Wang YJ, et al. Isolation of a methane-utilizing *Klebsiella* sp. strain and its application for detecting methane. Chin J Biotech, 2009, 25(5): 695-700 (in Chinese).
- 郑军, 郭珺, 王玉军, 等. 一株可利用甲烷的克雷伯氏菌的分离及其在甲烷检测中的应用. 生物工程学报, 2009, 25(5): 695-700.
- [28] Cheng ZW, Chen JM, Yu JM, et al. Structural characterization and property analysis of surface-active substance accumulated during biodegradation of hydrophobic α -pinene by *Pseudomonas fluorescens*. Water Air Soil Pollut, 2013, 224: 1457.
- [29] Cheng ZW, Gu XN, Jiang YF, et al. Isolation and identification of an α -pinene-degrading bacterium and its degradation characteristics. Chin Environ Sci, 2011, 31(4): 622-630 (in Chinese).
- 成卓韦, 顾信娜, 蒋轶锋, 等. 一株 α -蒎烯降解菌的分离鉴定及降解特性研究. 中国环境科学, 2011, 31(4): 622-630.
- [30] Yan L, Liu Q, Zhang S, et al. Response surface optimization for hydrogen sulfide removal using fermentation broth produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Biotechnology, 2012, 22(6): 86-88 (in Chinese).
- 晏磊, 刘权, 张爽, 等. 响应面法对 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 发酵液脱除 H_2S 的优化研究. 生物技术, 2012, 22(6): 86-88.
- [31] Qiu LN, Li YY, Gong AJ, et al. Isolation and characterization of a sulfur-oxidizing bacterium. J Univ Sci Tech Beijing, 2007, 29(S2): 212-215 (in Chinese).
- 邱丽娜, 李圆原, 弓爱君, 等. 一株硫氧化菌的筛选与表征. 北京科技大学学报, 2007, 29 (增刊 2): 212-215.

(本文责编 陈宏宇)