

文章编号:1001-5132 (2010) 02-0001-05

# 一株光合细菌的分离及其硫化物的处理效果

袁盈波, 潘志崇, 张德民\*

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 从宁海东坝养殖场底泥中分离获得一株光合细菌, 通过纯化和初步鉴定, 得知该菌株是一株隶属于外硫红螺菌属的紫色硫细菌(*Ectothiorhodospira sp.*). 该菌株能以 S、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  和  $\text{Na}_2\text{S}$  等多种含硫化合物作为无机电子供体. 不同废水中硫化物处理效果的研究显示, 该菌株处理高浓度硫化物的效果较为明显, 其对畜禽废水和鱼粉废水中硫化物的去除率可分别达到 68.55% 和 56.15%.

**关键词:** 紫色硫细菌; 硫化物; 废水处理

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

光合细菌(Photosynthetic Bacteria, 简称 PSB) 是一类具有原始光能合成体系的原核生物, 能在厌氧条件下利用各种有机物或无机物作为电子供体进行不放氧光合作用. 它广泛分布于自然环境中, 在自然界的碳、氮、硫等生命元素的循环中起着重要的作用. 光合细菌具有非常广阔的应用前景, 它能够在自然界高浓度有机污水中大量繁殖, 在污水自净和维持生态平衡中发挥着不可替代的作用.

目前, 光合细菌的研究和应用大部分集中在紫色非硫细菌上, 国内对紫色硫细菌的研究仅见于少数几篇文献<sup>[1-2]</sup>. 对光合细菌污水处理的研究也主要侧重于氨氮和 COD, 而对于硫化物处理方面的研究较为缺乏<sup>[3-5]</sup>. 紫色非硫细菌对硫化物利用的能力相对较弱, 只有当硫化物的浓度保持在较低水平时, 硫化物才能被较好地利用<sup>[6]</sup>. 而紫色硫细菌对硫化物具有较高的耐受性, 能以硫化氢

等无机物作电子供体还原二氧化碳, 合成有机物, 从而起到去除硫化物的作用. 因此, 筛选具有优良性状的紫色硫细菌, 并研究其在处理含有高浓度硫化物废水中的效果有着重要的意义.

笔者从养殖场底泥中分离获得一株紫色硫细菌, 对该菌株进行了常规的鉴定, 并对其在处理不同废水中硫化物的效果进行了初步研究, 为紫色硫细菌更好地应用于生产实践提供依据.

## 1 材料和方法

### 1.1 样品来源及培养基

用于分离菌株的样品采自浙江宁海东坝养殖场底泥.

光合细菌富集以及分离纯化培养基分别采用 Biebl and Pfennig's 培养基<sup>[7]</sup>和 RCVBN 培养基<sup>[8]</sup>, 半固体培养基由 RCVBN 培养基中加入  $4\sim 6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

收稿日期: 2009-10-28.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(208053); 宁波市科技攻关项目(2006C100042).

第一作者: 袁盈波(1985-), 女, 浙江宁波人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 环境微生物学. E-mail: zhouzhouyib@163.com

\*通讯作者: 张德民(1964-), 男, 河南范县人, 博士/教授, 主要研究方向: 环境微生物学. E-mail: zhangdemin@nbu.edu.cn

的琼脂和  $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  制成。

## 1.2 废水来源

硫化物处理效果实验选取 4 种不同环境的废水: (1)生活污水, 取自宁波大学旁双桥河道底泥污水; (2)畜禽废水, 取自奉化一养殖场的畜禽粪便排出物, 用自来水稀释浸泡数天后的废水; (3)鱼粉废水, 取自象山一家鱼粉加工厂; (4)垃圾渗滤液, 取自象山石浦垃圾填埋场。

## 1.3 菌株的富集与分离纯化

### 1.3.1 菌株的富集

用灭菌匙取适量养殖场虾塘底泥样品于无菌培养皿中, 带回实验室。在无菌室将 25 mL 富集用的液体培养基装入 30 mL 厌氧管中, 接入采集的 1 g 底泥样品, 振荡混匀, 在 30 °C、3 000~5 000 lx 的光照培养箱中培养 7 d, 直至培养液显现红色。用微量移液器取 1 mL 富集培养物转接至另一装有新鲜培养液的试管中, 重复以上操作 2~3 次, 得到生长良好的光合细菌富集培养物。

### 1.3.2 菌株的分离和纯化

取 1 mL 富集培养物作梯度稀释, 分别取  $1 \times 10^{-8}$ ~ $1 \times 10^{-6}$  稀释度的菌悬液 1 mL 加入稀释管中, 然后加入 25 mL 半固体分离培养基, 密闭后充分混匀, 再于光照培养箱中培养 7 d, 直至管中出现红色单菌落。

从稀释管中挑取单菌落, 在分离液体培养基中培养 7 d, 再重复半固体培养基深层逐级稀释, 如此反复纯化 2~3 次, 直到培养基中没有其他杂菌菌落出现。通过光学显微镜(日本奥林巴斯 CX-31)和 DGGE 电泳图谱检查菌株纯度, 直到获得纯菌株为止。

## 1.4 菌株的基本特征

### 1.4.1 形态学特征观察

菌株液体培养物和菌落形态特征直接用肉眼观察。革兰氏染色、细菌菌体大小及菌体形态均按一般细菌鉴定方法进行, 以光学显微镜观察和测量菌体。

### 1.4.2 生长曲线的测定

取经活化后的菌液接种到液体培养基中, 每隔 12 h 取样稀释至 4 倍, 用紫外可见分光光度计(UV-3100PC 型)于 660 nm 处测定其吸光值, 连续测定 6 d, 按吸光度值作光合细菌的生长曲线。

### 1.4.3 无机电子供体利用能力的测定

硫化物无机电子供体的终浓度分别为 0.1% (w/v) S、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_3$  和  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 。

## 1.5 16S rDNA 序列分析

以该菌株基因组 DNA 为模板, 用细菌通用性引物(27 f~1 512 r)进行 16S rDNA 序列扩增。基因组 DNA 提取方法参照张德民等<sup>[9]</sup>, PCR 反应体系和反应条件参照钱丽君等<sup>[10]</sup>。将 PCR 反应后的扩增产物直接送至上海生物工程技术服务有限公司进行序列测定, 获得菌株 16S rDNA 序列。将所得序列用 BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行相似性比对。

## 1.6 废水处理试验

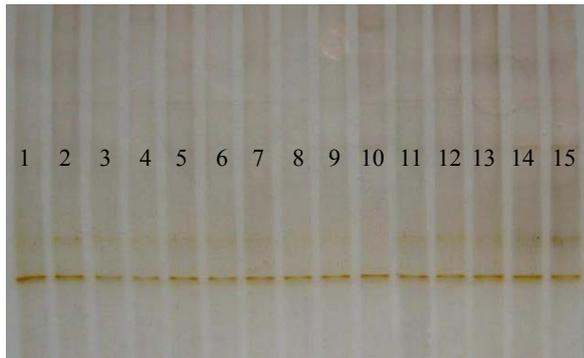
将 4 种废水水样分别加入到 500 mL 无菌蓝盖瓶中, 将 pH 调至 6.8~7.0, 按 10% 的接种量加入对数生长期的光合细菌菌液, 置于室温条件下密闭光照培养 7 d, 每组 3 个重复, 于接种后第 3 d 和第 7 d 取样测定样品中硫化物浓度。硫化物的测定采用碘量法<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离纯化

宁海东坝养殖场的底泥很容易就富集到光合细菌, 但是, 我们从此富集培养物中却无法通过软琼脂法分离得到其单菌落。后经改变培养条件及调整培养基组成等一系列实验, 最终通过添加合适浓度的  $\text{Na}_2\text{S}$  才得到单菌落, 并能通过挑取单菌落得到液体培养物。通过光学显微镜检测, 菌体大小及形状已趋一致。但我们得到的菌株生长性状

却不太稳定. 因此又对其再次进行单菌落纯化, 分离到 15 个单菌落, 对其进行了 16S rDNA 的 PCR-DGGE 指纹比较(图 1). 图 1 显示的条带为菌株 PSB-1 16S rDNA 基因 V3 区的 PCR 扩增产物的 DGGE 条带, 15 个单菌落样品都具有有一条稳定的条带, 表明已获得纯培养物. 我们将该菌株命名为 PSB-1.



1-15 泳道为 15 个单菌落的液体培养物 16S rDNA 的 PCR 产物

图 1 菌株 PSB-1 的 PCR-DGGE 图谱

## 2.2 菌株的基本特征

### 2.2.1 菌株形态学特征

光照厌氧条件下菌液呈红色, 单菌落为绒球状、红色, 直径约为 0.5~1.0 mm; 菌体为卵圆形, 以二分分裂方式繁殖, 革兰氏阴性, 大小为(1.0~1.5)  $\mu\text{m} \times (2.2\sim 2.9) \mu\text{m}$ (图 2).



图 2 菌株 PSB-1 的光镜显微照片(1000 $\times$ )

### 2.2.2 PSB-1 的生长曲线

以吸光值与培养时间的关系作 PSB-1 的生长曲线(图 3). PSB-1 在 24 h 左右时即进入对数生长期,

48 h 后生长速率明显放缓, 细菌总量达到最大值, 即达到光合细菌生长的静止期. 此时, 光合细菌处理硫化物的效率最高, 持续时间达 72 h, 所以取生长 48 h 左右时的细菌进行废水处理实验.

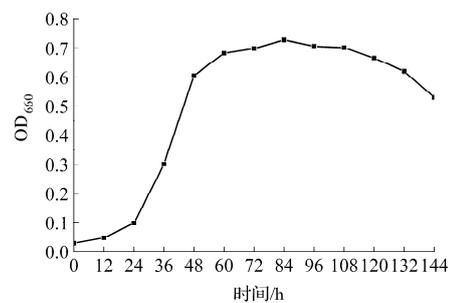


图 3 菌株 PSB-1 的生长曲线

### 2.2.3 无机电子供体的利用

通过菌株对硫源的利用(表 1)可以得知, 菌株 PSB-1 能以 S、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  和  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  作为无机电子供体, 但不能利用  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ .

表 1 无机电子供体对菌株 PSB-1 生长的影响

无机电子供体	利用情况
S	+
$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$	+
$\text{Na}_2\text{SO}_3$	-
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	+

注: “+”表示可以利用, “-”表示不能利用.

## 2.3 16S rDNA 序列分析

将菌株 PSB-1 的序列送入数据库进行 BLAST 相似性分析, 比对结果表明, 在 Genebank 中, 该菌株与外硫红螺菌属的沙氏外硫红螺菌(*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*)的 16S rRNA 基因序列相似性达到了 99.7%. 但是该菌株的形态学特征以及生理生化特征(数据将另文发表)与沙氏外硫红螺菌存在较大差异, 因此可以判定该菌株是一株隶属于外硫红螺菌属的紫色硫细菌, 根据 Bergey's 系统细菌学手册<sup>[12]</sup>, 将 PSB-1 鉴定为 *Ectothiorhodospira sp.*.

## 2.4 PSB-1 对废水中硫化物的处理效果

光合细菌对不同废水中硫化物的处理效果见

表 2 菌株 PSB-1 处理废水中硫化物的效果

废水种类	起始 S <sup>2-</sup> / (mg·L <sup>-1</sup> )	3 d S <sup>2-</sup> /(mg·L <sup>-1</sup> )		3 d 去除 率/%	7 d S <sup>2-</sup> /(mg·L <sup>-1</sup> )		7 d 去除 率/%
		实验组	对照		实验组	对照	
生活污水	0.90±0.01	0.78±0.01	0.88±0.01	13.33	0.73±0.01	0.91±0.01	18.89
畜禽废水	35.93±1.01	20.66±0.53	35.17±0.97	42.50	11.30±0.38	34.91±0.88	68.55
鱼粉废水	23.74±0.49	16.11±0.27	23.14±0.52	32.14	10.41±0.22	22.96±0.50	56.15
垃圾渗滤液	27.91±0.50	27.34±0.59	27.88±0.78	2.04	27.10±0.61	28.10±0.50	2.90

表 2.

除垃圾渗滤液外, 光合细菌 PSB-1 对其他 3 种废水中的硫化物均有不同程度的降解, 其中对畜禽废水和鱼粉废水处理效果最好, 7 d 后硫化物的去除率分别达到 68.55% 和 56.15%, 对生活污水的处理效果较差, 去除率仅为 18.89%. 从以上 3 种废水中硫化物的起始浓度可知, 畜禽废水和鱼粉废水具有高浓度的硫化物, 而生活污水的硫化物浓度非常低, 实验结果充分说明该菌株对高浓度硫化物具有较好的降解效果, 而对降解低浓度硫化物的能力较弱. 此外, 畜禽废水和鱼粉废水中含有较为丰富的有机物, PSB-1 能有效利用这些有机物作为自身繁殖的营养源, 光合细菌总量得以迅速增加, 从而更加有效地降低水体中硫化物的浓度; 而生活污水中因适合光合细菌生长的有机成分相对较为缺乏, 光合细菌繁殖较慢, 处理效果也相对较差.

对垃圾渗滤液的处理效果基本上没有, 这是因为垃圾渗滤液的成份较为复杂, 通常含有较高浓度的有害物质, 这些有害物质可能不利于光合细菌的生长, 加入的菌株在短时间内已基本死亡. 在以后的研究中可以考虑对垃圾渗滤液进行一定程度的稀释后再用光合细菌进行处理, 以降低有害物质对光合细菌的毒害, 从而发挥其降解硫化物的作用.

畜禽废水和鱼粉废水的实验结果还显示, 第 3 d 的硫化物去除率已分别达到 42.50% 和 32.14%, 占 7 d 去除率的 50% 以上, 这表明光合细菌在适宜的条件下, 处于高活力和高浓度的菌种降解硫化

物的效果较好.

### 3 结论

(1) 研究分离得到的菌株 PSB-1 经常规方法和 16S rDNA 鉴定, 是一株隶属于外硫红螺菌属的紫色硫细菌 *Ectothiorhodospira sp.*, 该菌株具有生长迅速、稳定性好等优良性状.

(2) 菌株 PSB-1 降解有机废水中高浓度硫化物的效果较好, 而对废水中低浓度硫化物的降解能力较弱.

#### 参考文献:

- [1] 杨素萍, 连建科, 赵春贵, 等. 含奥氏酮嗜盐紫色硫细菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(5):571-576.
- [2] 杨素萍, 赵春贵, 张铁, 等. 一株可利用硫化物紫色硫细菌的分离与鉴定[J]. 山西大学学报, 1994, 17(1):81-85.
- [3] 周洪波, 刘飞飞, 邱冠周. 一株光合细菌的分离鉴定及污水处理能力研究[J]. 生态环境, 2006, 15(5):901-904.
- [4] 黄宝兴, 李兰生, 赵亮, 等. 固定化海洋光合细菌处理生活污水的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2006(2):69-74.
- [5] 邓晓皋, 唐赞. 几株光合细菌的分离鉴定及用于水质净化的初步研究[J]. 四川师范学院学报, 2001, 22(1):84-88.
- [6] 李秀珠. 一种紫色非硫光合细菌对硫化物的抑制及其在对虾养殖中的应用[J]. 福建水产, 1997(1):9-13.
- [7] Biebl H, Pfennig H. Isolation of members of the family Rhodospirillaceae[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1981.
- [8] Weaver P F, Wall J D, Gest H. Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*[J]. Arch Microbiol, 1975, 105:

- 207-216.
- [9] 张德民, 黄志勇, 杨惠芳, 等. 几株红假单胞菌属细菌的表现特征及其遗传多样性研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(3):229-236.
- [10] 钱丽君, 张德民, 徐小红. 应用 DGGE 分析三疣梭子蟹养殖塘底泥细菌的多样性[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 204-210.
- [11] 国家海洋局. 海洋调查规范[M]. 北京: 海洋出版社, 1975.
- [12] Don J B, Noel R K, Jame T S, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. 2nd ed. Michigan: Springer, 2005.

## Separation of Strand of Photosynthetic Bacteria and its Use in Removal of Sulfide from Waste Water

YUAN Ying-bo, PAN Zhi-chong, ZHANG De-min\*

( Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China )

**Abstract:** A strand of photosynthetic bacteria is separated from sediment of a shrimp pond. Judging by its characteristics, PSB-1 belongs to a genus of *Ectothiorhodospirace* found in purple sulfur bacteria. It can utilize S,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  and sulfide as inorganic electron donor. It can be used to remove sulfide from a variety of wastewaters. Good results are noted with livestock wastewater and fishmeal wastewater: The rate of sulfide removal can reach 68.55% and 56.15%. However, when treating the organic wastewater with low concentration of sulfide, a poor effect (only 18.89%) is identified.

**Key words:** purple sulfur bacterium; sulfide; waste water treatment

**CLC number:** Q939.9

**Document code:** A

(责任编辑 史小丽)