

硫酸盐转化菌的分离筛选与生长特性研究

化学工程专业

研究生 万雪松 指导教师 朱家骅

我国大气污染以煤烟型为主,每年由于 SO_2 和酸雨所造成的直接和间接的经济损失高达千亿元,因此,控制“煤烟型” SO_2 污染的任务紧迫。同时,对日益增多的城市垃圾,目前国内主要采用卫生填埋,其直接后果是产生大量有毒有害的有机废水—垃圾渗滤液,如何处理、转化和合理利用垃圾渗沥液已经成为环保中的又一新课题。

本课题从垃圾渗滤液湿法烟气脱硫—微生物硫转化互补体系出发,使上述两种污染(废水,废气)治理过程合二为一。而本文重点在于硫酸盐转化菌(包括硫酸盐还原菌 SRB 与硫氧化菌)的分离纯化,并对 SRB 的生物学特性进行了详尽的研究。得到了以下结论:

1. 从硫酸厂废水淤泥中分离筛选出了一株 SRB,其菌体形态呈弧状或细杆状,成熟细胞大小 $0.4\sim 0.6\times 3.0\sim 5.0\mu\text{m}$,摇摆式运动,单极生鞭毛,芽孢染色阴性,革兰氏染色阴性。
2. 从府南河污水滞水层水样中筛选出光合细菌中的硫氧化细菌——绿硫菌和紫硫菌,该两株菌均为卵圆形单细胞,细胞大小为 $0.5\sim 1.0\times 1.0\sim 2.0\mu\text{m}$. 革兰氏阴性,菌悬液分别为绿色和红棕色。
3. 分离菌 SRB 属于中温菌,最适生长温度为 35°C ; 最适生长 $\text{pH}6.0\sim 6.5$; 适量氧气不会影响菌体生长。
4. 分离菌 SRB 在硫酸盐异化作用过程中,能以甲醇、乙醇、乳酸、葡萄糖等有机物作为电子供体; $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}$ 比值越大,硫酸盐还原反应进行得就越彻底,但是当 $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}$ 比值大于 2.5 以后,该比值对硫酸根还原率的影响逐渐变小. 在本实验中,我们确定

了 COD /SO₄²⁻ 为 2.0~2.5 的条件, 此时 COD 去除率在 55% 左右, SO₄²⁻ 去除率在 70% 以上。

5. 对分离菌 SRB 的无机盐培养基配方进行了正交优化, 确定了最佳配方, 并且发现 KH₂PO₄ 和 NaCl 对菌体细胞生长的影响最大; 考察了 Fe²⁺ 对分离菌生长的影响, 随着 Fe²⁺ 浓度的增大, 细胞生长代谢活动更加旺盛, 但是当 Fe²⁺ 浓度达到 3~4g/l 以后, 细胞生长对 Fe²⁺ 的需要达到了饱和程度。
6. 在厌氧反应器中对分离菌 SRB 进行了放大培养, 并采用 N₂ 吹脱 H₂S, 提高了硫酸盐还原率; 在最适环境条件中 (包括 pH, 温度, 培养基成分, 培养条件等等), 分离菌 SRB 在培养 5 天后, 可还原硫酸根 1900mg/l, 还原率为 76%。

本研究提供了一种治理环境问题的新思路, 即将两类污染物 (烟气, 垃圾渗滤液) 在同一套工艺中进行互补生物处理, 在产生社会效益的同时又具有一定的经济效益, 体现 “以废治废” 的环境工程新概念。同时本研究成果为对该互补体系进一步开展相关研究提供了良好的基础。

关键词： 脱硫, SRB, 硫氧化细菌, 分离筛选, 生长特性研究

Selection and Study of the Growth Characters of Sulfate-Converting Bacteria

Chemical Engineering

Graduate: Xuesong Wan Supervisor: Jiahua Zhu

The mission for controlling the pollution of "coal smoke type" in our country is urgent because the economy loss resulting from SO₂ and acid rain amounts to thousand hundred million yuan every year; on the other hand, the plentiful household garbage is treated by filling into the grand, therefore it produces substantive poisonous and harmful organic waste water—landfill leachate. So how to handle, convert and make use of the landfill leachate becomes a new focus in the field of environmental protection.

In order to treat both of the waste water and waste gas mentioned above, we base the study on reciprocal systems of flue gas wet desulfurization and microbial transformation of sulfur with landfill leachate. The paper focused on the selection and growth characteristic study of the sulfate-converting bacteria that include the sulfate-reducing bacteria and sulfur oxidizing bacteria. Some conclusions were listed as follows:

1. A strain of sulfate-reducing bacteria was isolated from the sullage of Sichuan Sulfate Factory. The cells are vibrioid-shaped or of thin rod shape with the size of $0.4\sim 0.6\times 3.0\sim 5.0\mu\text{m}$. They are motile by single polar flagella and non-spore-forming. The cells strain Gram-negative.
2. Two strains of sulfur oxidizing bacteria were isolated from the backwater of Fulan River. The cells of them were ovally shaped with the size of $0.5\sim 1.0\times 1.0\sim 2.0\mu\text{m}$. Both of the cells strain

Gram-negative and the colors of the anaerobic culture are green or red-brown, respectively.

3. The optimum temperature of the strain(SRB) is 35 °C ,the optimum pH range 6.0 ~ 6.5, and it is not strictly anaerobic.
4. During the vitriol dissimilation process, the strain (SRB) can use methyl alcohol, ether, lactic acid, glucose... etc. The efficiency of vitriol dissimilation process responds to the COD/ SO₄²⁻ value with direct ratio, but when the COD/ SO₄²⁻ value is over and above 2.5 hereafter, its influence towards vitriol dissimilation process falls down. In the paper, the range of 2.0~2.5 is adopted as the COD/ SO₄²⁻ value, and at this rate 55 percent of SO₄²⁻ and 70 percent of COD are removed.
5. The ingredients of the media were optimized, and the conclusion was drawn that KH₂PO₄ and NaCl play an important role during the growth of the strain (SRB). The influence of the Fe²⁺ on the strain was studied and the metabolism activity of the strain responds to the strength of Fe²⁺ with direct ratio, but when the concentration of Fe²⁺ exceeds 3~4g/l its influence on the strain falls down sharply.
6. To improve the removal ratio of the sulfate, the strain (SRB) was cultivated in the anaerobic reactor, and the N₂ was used to blow the H₂S from the culture. At optimized conditions (pH, temperature, culture medium, etc.), 76% of the sulfate (1900mg/l) can be converted after five days.

The paper try to provide a new idea to handle the environment problem: make the two pollutants (flow gas and landfill leachate) cooperate each other in the same engineering flow, and produce both social and economic benefit, therefore it represents a new concept of environmental and chemical engineering: treat the waste with waste. At the same time, the studying results provide a good basis for the further relating research in the reciprocal system.

Key words: desulfurization, sulfate-reducing bacteria, sulfur oxidizing bacteria, isolation, study of growth characters

1 绪论

二十世纪以来,科学技术和工业文明的高速发展将人类带进了一个前所未有的时代,整个人类世界发生了翻天覆地的变化,让人叹为观止。但环境污染问题却日渐严重,现在已经到了一个令人触目惊心的严重恶化阶段。国际环境保护协会已经警告人们说,人类造成的环境污染问题已经使人类的生存处于极度危险的边缘,工业“三废”和人类生活“三废”带来的各种资源短缺,特别是对与人类生存息息相关的水、大气和土壤的污染,已经严重地威胁到地球上整个生物圈的正常循环,极大地危害着人类的未来。治理环境污染已经迫在眉睫。

我国大气污染以煤烟型为主^[1],所导致的酸雨覆盖面积约占国土面积的30%。我国每年由于SO₂和酸雨所造成的直接和间接的经济损失高达千亿元,因此,控制“煤烟型”SO₂污染的任务紧迫。目前,燃煤烟气脱硫以湿法脱硫为主,由于烟气中SO₂浓度低(0.2%~0.3%)而产生大量低质硫酸,很难资源化,存在二次污染问题;同时该类技术投资大,运行费用高,所以在我国推广应用受到限制。

另一方面,对日益增多的城市垃圾,目前国内主要采用卫生填埋,其直接后果是产生大量渗滤液^[2]。垃圾渗滤液具有NH₃和COD_{Cr}浓度高、微生物营养元素比例失调、COD_{Cr}变化大而NH₃浓度小的特点,是有毒有害的有机废水,对生物和植物都有极大的危害。所以采用“卫生填埋”处理垃圾必然造成严重的二次污染。如何处理、转化和合理利用垃圾渗滤液已经成为环保中的又一新课题。同时,在全球性的食品、医药、造纸、发酵等工业的迅猛发展下,也带来了大量的含高浓度硫酸盐废水(高达3000mg/l),这类废水有很高的COD和BOD,如果不经处理而直接排放到水体中,将会对人体以及环境造成极大危害。

若能找到一种互补体系使上述两种污染(废水,废气)治理过程合二为一,其社会与经济效益不言而喻。

硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria,简称SRB)^[3]作为一种硫酸盐转化菌,在微生物厌氧处理法中起着重要作用。SRB广泛分布于土壤、各种水体、动物体内^[5],它在无氧或极少量氧的情况下,能以有机物作为电子供体、硫酸盐作为末端电子受体进行生长代谢,产生H₂S。同时,SRB参与自然界中多种反应,能有效降低硫酸盐

浓度，使水体净化；还能利用还原产生的硫化物去除废水中的重金属，使废水去毒^[4]。

绿硫细菌和紫硫细菌是严格厌氧的专性光能自养菌^[5]，能够利用 CO_2 为碳源， H_2S 作为光合作用的供氢体。存在于光照和含有硫化物的厌氧水体中，可把下层水中生成的 H_2S 氧化成硫。

为此，本课题提出一垃圾渗滤液湿法烟气脱硫—微生物硫转化互补体系。即以城市垃圾渗滤液为烟气脱硫剂，烟气很容易使垃圾渗滤液中大部分 NH_3 被吹脱，而且烟气中的 SO_2 转化为 $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}$ ，吸收尾液中，由于有机物（C源）浓度很高，不补充 O_2 时，尾液处于厌氧状态，尾液中 SO_4^{2-} 和高浓度的COD, BOD恰好是硫酸盐还原菌（SRB）生长繁殖所需。于是 $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}$ 通过扩散作用由胞外进入胞内，在各种酶的作用下还原为 H_2S ，有机碳源在降解时产生大量的 CO_2 ，使得水体中COD, BOD降低。在硫酸盐还原菌生长末期，接入绿硫细菌和紫硫细菌，将前期生成的 H_2S 氧化为S。而此时有机物基本耗尽，SRB缺少供氢体难以生长。绿硫菌和紫硫菌成为优势菌， SO_4^{2-} 最终转变为S，成为二次资源。防止二次污染，并且成本低廉，实现将两类污染物（烟气，垃圾渗滤液）在同一套工艺中进行互补生物处理，在产生社会效益的同时又具有一定的经济效益，体现“以废治废”的环境工程新概念。

2 文献综述及研究内容

2.1 烟气的危害及烟气脱硫技术

我国大气污染以煤烟型为主，烟气中危害较大的 SO_2 是引起酸雨的主要物质^[1]。酸雨会腐蚀地面建筑物，使土壤酸化，影响动植物的正常生长。我国酸雨面积日益扩大，已达国土面积的 30%。在 2000 年，我国一次性能源消耗量超过 12 亿吨， SO_2 的年排放量达到 3822 万吨。因酸雨造成的经济损失高达千亿元。 SO_2 烟气来源广泛，几乎所有的工矿企业都可能产生，但它主要来自煤炭和石油的燃烧过程，硫化物矿石的焙烧、烧结过程、火力发电厂、有色金属冶炼厂、钢铁厂硫酸厂以及一切燃煤或油的锅炉、炉灶都排放 SO_2 烟气。在各种过程排放的 SO_2 烟气中，约有 90% 来自煤的燃烧过程。

我国目前年耗煤量约为 14 亿吨，占能源比重 75%，而且耗煤量的 85% 被用于直接燃烧。大量 SO_2 排入大气，成为大气的主要污染源，从而使我国的大气环境呈“煤烟型”污染特征。据资料报道 1998 年我国 SO_2 排放量为 2090 万吨，居世界各国首位。因此，控制“煤烟型” SO_2 污染的任务紧迫，烟气脱硫首当其冲。

烟气脱硫的方法很多。大致可分为两类：一类为干法，即采用粉状或粒状吸收剂，吸附剂以及电子束或等离子法来脱除烟气中的 SO_2 ；另一类为湿法，即采用液体吸收剂洗涤烟气，吸收所含的 SO_2 。

迄今，世界各国开发的烟气脱硫技术多达上百种，这些方法中，有的已有工业装置，有的还处于实验阶段。在国外，美国、日本、德国等发达国家烟气脱硫方面起步早，在脱硫工艺和设备研制方面投入大，脱硫技术在世界上一一直处于领先地位，脱硫装置也得到大规模工业应用；在国内，烟气脱硫技术的研究起步不算晚，但进展缓慢。研究的工艺方法虽然很多，但大多仍停留在小试和中试阶段，工业化装置少。

生物脱硫作为一项新兴技术，因其投资小，运行成本低，不产生二次污染等优点而日益受到重视。生物脱硫的原理是将气相中的硫化物转移到液相中，再利用微生物的代谢作用将液相中的硫化物降解。该技术的基础就是硫化物降解微生物的选育。

2.2 垃圾渗滤液的危害及控制

城市里大量的生活垃圾直接影响着城市里人们的身体健康和生活秩序,甚至关系到人们的生存问题。有效处理城市生活垃圾是城市建设与环境保护急待解决的问题。目前对城市生活垃圾的处理方法主要采用“卫生填埋”,这样处理的直接后果是产生大量的垃圾渗沥液。垃圾填埋场渗滤液对周围地下水和地表水均会造成严重的环境污染。CaLvert 曾报导距垃圾处理厂的蓄水池 512m 远的一口井中水,其硬度、钙镁浓度、总固体量和 CO_2 都有增加^[6]。德国 Lang 报导距离填埋场 4km 远的地表水下游,水质出现恶化。Nevenka, Mikac 等报导:渗滤液对含水层的影响不仅仅在于表层,而且贯穿于达 60m 深的垂直截面。Susanc Haper 等报导渗沥液中重金属对周围环境及其后生物处理的毒性影响。关于渗滤液毒性,美国和日本等在此领域进行了试验研究。国内郑曼英等报导^[7],广州市落老虎窿填埋场虽然 1992 年封场,但直至 1995 年其排放的浸出液 BOD、COD、氮和磷仍然超标,其中以氮为甚,赵万有等报导垃圾填埋不采取防渗措施,对地下水必然造成严重污染,主要表现在地下水的水质混浊,有臭味, COD、三氮含量高,油、酚污染严重,细菌、大肠菌超标。

垃圾渗沥液具有 NH_3 和 COD_{Cr} 浓度高、微生物营养元素比例失调、 CoD_{Cr} 变化大而 NH_3 浓度小的特点,是有毒有害的有机废水,对生物和植物都有极大的危害。所以采用“卫生填埋”处理垃圾必然造成严重的二次污染。如何处理、转化和合理利用垃圾渗沥液已经成为环保中的又一新课题。

2.3 硫酸盐还原菌代谢机理及影响因子

2.3.1 硫酸盐还原菌定义及还原代谢机理

SRB 是一组进行硫酸盐还原代谢反应的严格厌氧细菌的总称^[3],是一类形态营养多样化、属种关系复杂的微生物,在有机废水中其含量很高。根据不同的生理生化特征,它们可以分为异化硫酸盐还原菌和异化硫还原细菌(“异化”的意思是指还原的硫酸盐组分并没有同化为细菌的细胞部分,而是作为产物释放)。前者可以利用乳酸盐、丙酮酸盐、乙醇等作为碳源和能源,还原硫酸盐生成硫化物;后者则不

能还原硫酸盐，只能还原元素硫或其他含硫化合物（如亚硫酸盐、硫代硫酸盐）。

自然界中微生物硫素的微生物循环如图 2.1 所示^[8]：

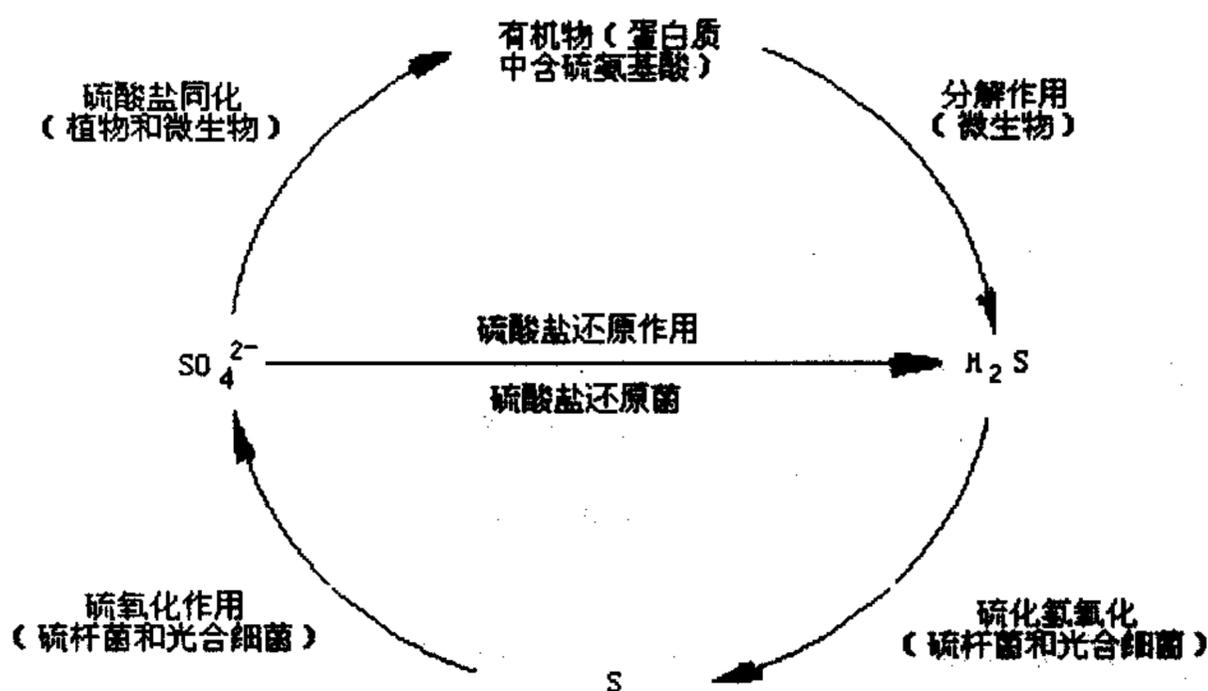


图 2.1 自然界中硫素的微生物循环

可以看出 SRB 在硫素微生物循环中的重要作用，它不仅解除 H_2S 对动植物的毒害作用，而且可以提供其它微生物生长所需的硫，有利于生物生长。在好氧条件下， H_2S 能为化能自养的硫磺细菌，主要为光合细菌所氧化，产生无污染单质硫。所以如果能使硫酸盐经 H_2S 变成硫单质就可以避免污染，达到治理环境的目的。

异化硫酸盐还原菌在富含硫酸盐的废水厌氧微生物处理中相当活跃^[3, 4, 9, 10, 11, 12]，它以硫酸盐做最终电子受体，分解废水中的有机物获得合成细胞特质和维持生命所需的能量。SRB 的代谢可以分为分解代谢和合成代谢两部分，与硫酸盐还原相关的是分解代谢。关于 SRB 的分解代谢可以用以下三个阶段描述：分解代谢、电子传递、生物氧化，如图 2.2 所示：

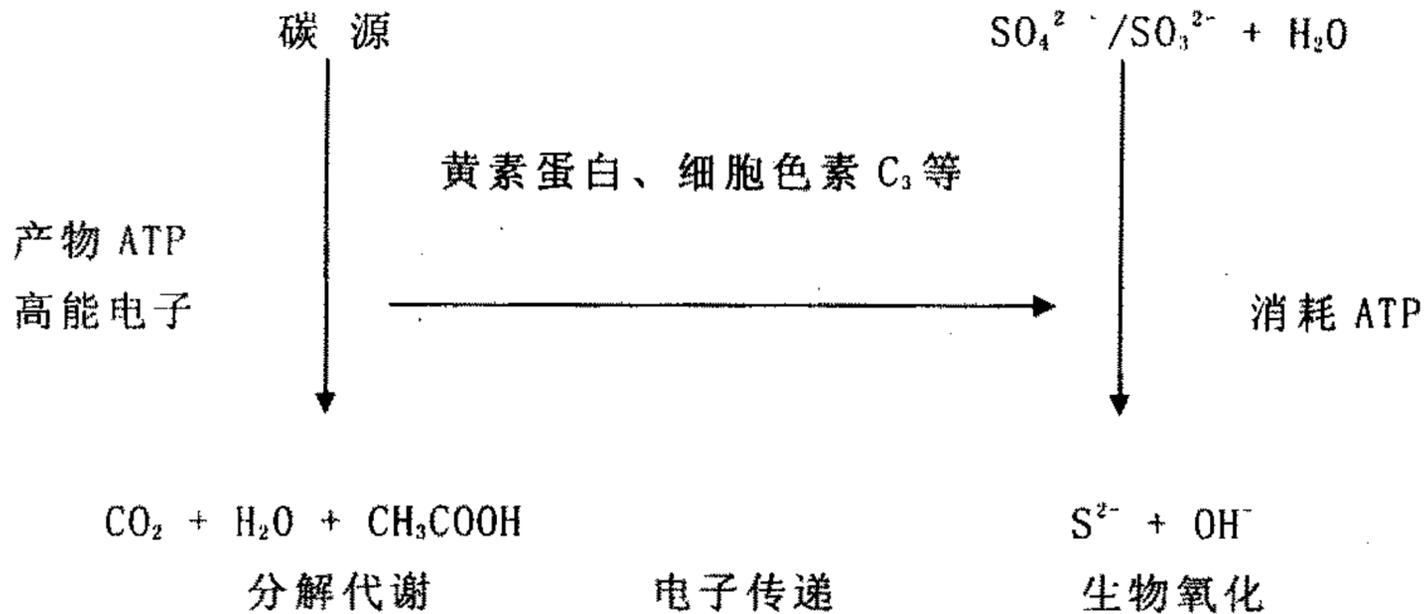
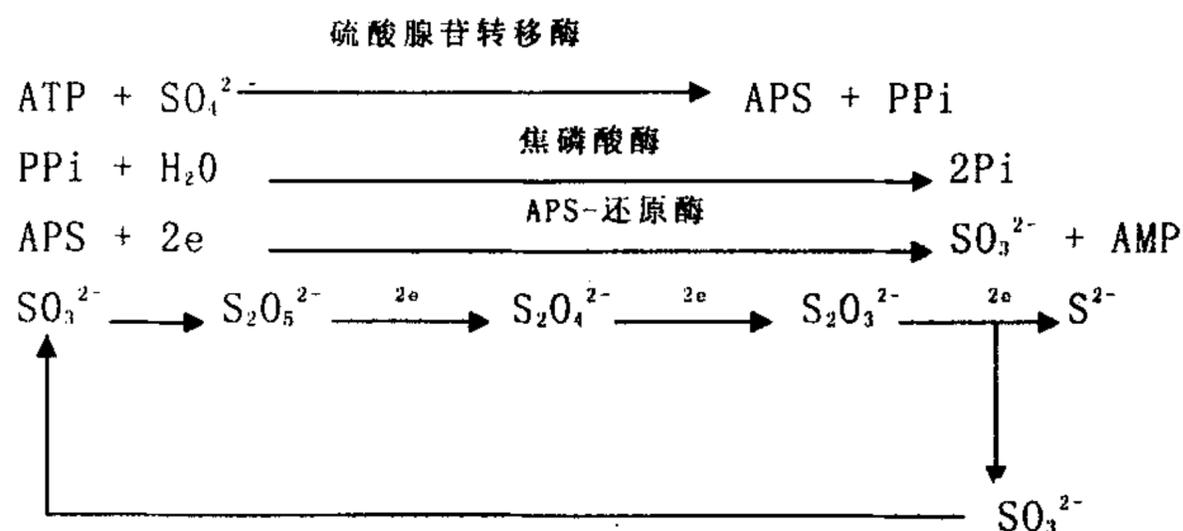


图 2.2 SRB 的分解代谢过程

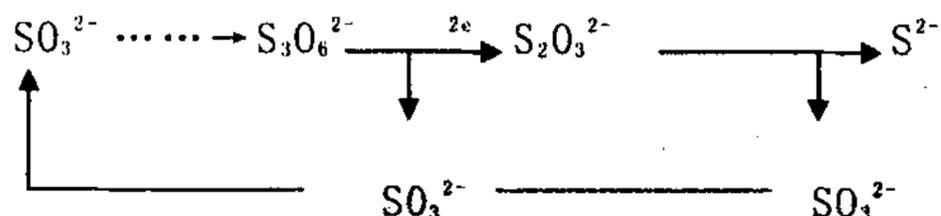
在分解代谢过程的第一阶段，有机物碳源的降解是在厌氧状态下进行的，同时通过底物水平磷酸化（即直接利用底物分子中的能量生成 ATP），产生少量 ATP（三磷酸腺苷，微生物体中的通用能源）；第二阶段中，前一阶段中释放的高能电子通过 SRB 中特有的电子传递链（如黄素蛋白，细胞色素 C 等）逐级传递，产生大量的 ATP。在最后阶段中，电子被传递给氧化态的硫化合物，并将其还原为 S²⁻，此时，需要消耗 ATP 提供能量。从这一过程可以看出，有机物不仅是硫酸盐还原菌的碳源，也是其能源，硫酸盐（或氧化态的硫元素）仅作为最终电子受体起作用。它首先在细胞外积累，然后进入细胞，在细胞内，第一步反应是 SO₄²⁻ 的活化，即 SO₄²⁻ 与 ATP 反应转化为腺苷酰硫酸（APS）和焦磷酸（PPi），PPi 很快分解为无机磷酸（Pi），推动反应不断进行，APS 继续分解为偏亚硫酸盐和磷酸腺苷（AMP）。亚硫酸盐脱水后变成偏亚硫酸盐（S₂O₆²⁻），S₂O₆²⁻ 极不稳定，很快转化为中间产物连二亚硫酸盐（S₂O₄²⁻），S₂O₄²⁻ 又迅速转化为 S₃O₆²⁻，S₃O₆²⁻ 分解为硫代硫酸盐（S₂O₃²⁻）和亚硫酸盐（SO₃²⁻），S₂O₃²⁻ 又经自身氧化还原作用，变成 SO₃²⁻ 和最终代谢产物 S²⁻，S²⁻ 被排出体外，进入周围空间。

因此，整个分解代谢过程细菌利用 CO₂、H₂O、CH₃COOH 或其他小分子有机物，SO₄²⁻ / SO₃²⁻ 扩散入胞内获得电子并消耗 ATP 还原为低价的硫（S²⁻ / S），完成其整个分解过程。

在分解过程中有关方程式如下：



上述 SO_3^{2-} 还原成 S^{2-} 的过程中，需要 6 个电子，由亚硫酸还原酶复合物系统逐步催化进行。另外还有不同的还原途径被提出^[13]，如下所示：



但是这两种还原途径都显示出三种酶参与了 SO_3^{2-} 还原为 S^{2-} 的过程，即：连三亚硫酸盐形成酶，连三亚硫酸盐还原酶或硫代硫酸盐形成酶和硫代硫酸盐还原酶^[3, 13, 14, 15, 16]。

本次实验主要根据 SRB 的代谢分解原理，利用硫酸盐异化还原反应处理高浓度硫酸盐，再经过分离纯化菌种获得优势硫酸盐还原细菌。如果将硫酸盐还原过程的三个阶段连接起来，则硫酸盐异化还原反应的可能代谢途径如图 2.3 所示：

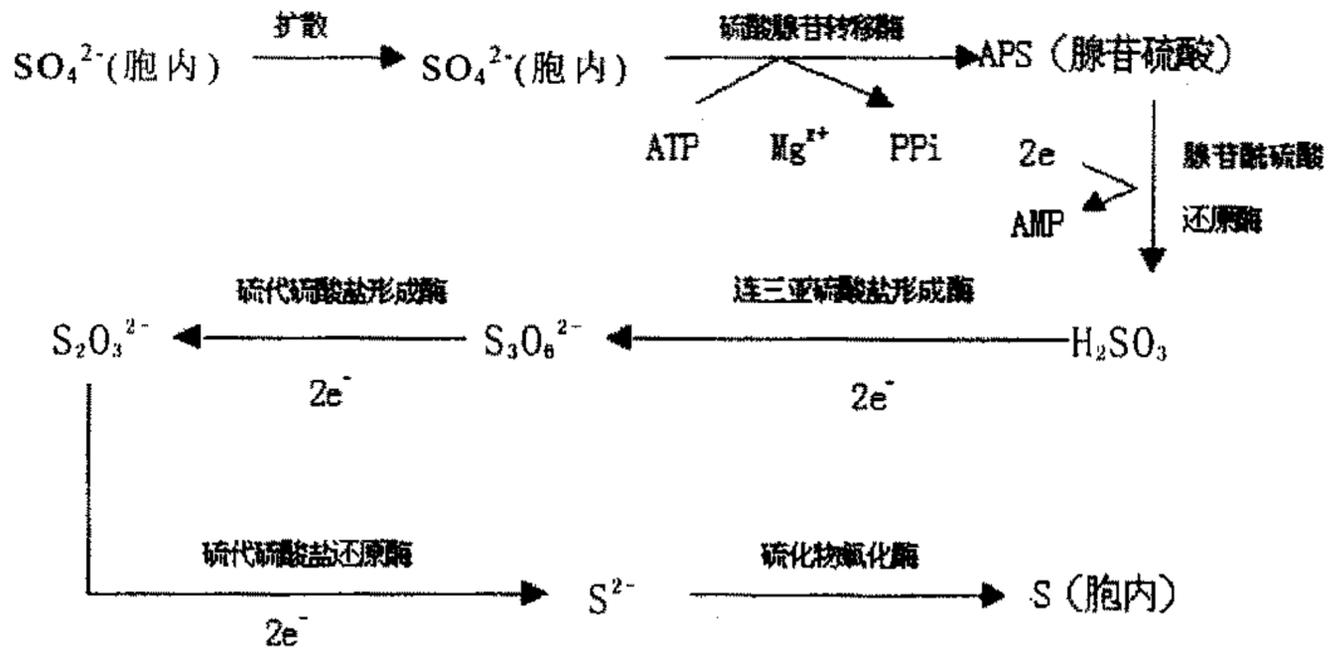


图 2.3 硫酸盐异化还原反应过程

通过硫酸盐异化还原反应过程图示，可以看出 SRB 的生长代谢过程中，有机物降解为 SO_4^{2-} 的转化提供反应条件 (H_2 , ATP 等)， SO_4^{2-} 的转化又再生出有机物进一步降解所需的 H^+ , ADP 等，即两种生化过程互相补充，而且当废水中有能形成短链脂肪酸的发酵细菌存在时，SRB 还可以完成一个完整的厌氧降解“生物链”^[17]，如图 2.4 所示(注：MPB-产甲烷菌，AB-乙酸菌)

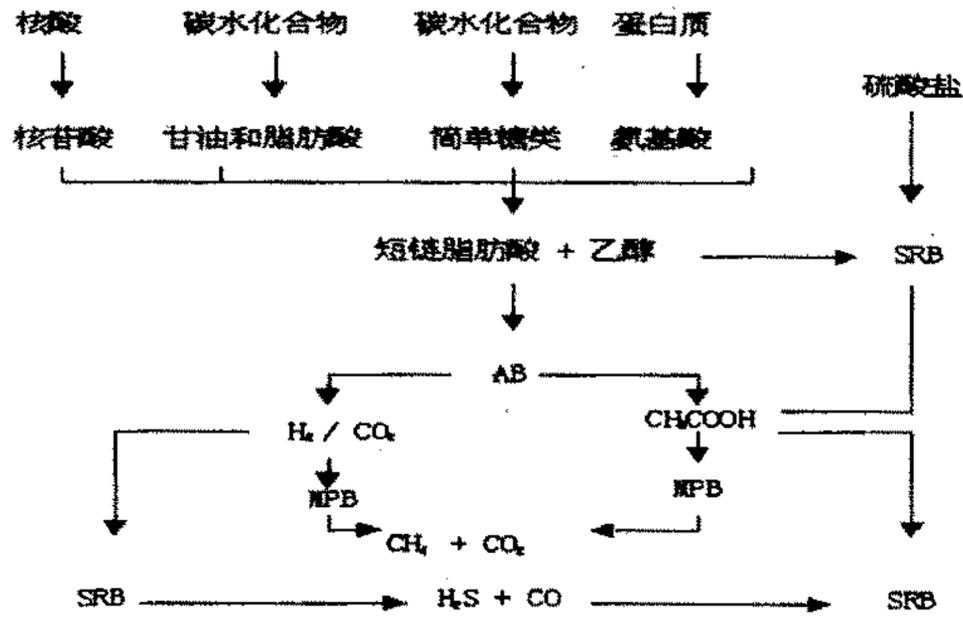


图 2.4 厌氧降解“生物链”

有报道认为^[18]高浓度硫酸盐有机废水中 90%左右的 SO_4^{2-} 可以被微生物还原, 同时废水中 COD_{Cr} 和 NH_3 进一步得到消耗和降解, 实现将高浓度硫酸盐有机废水进行有效的生物转化和生物处理。因此对同时富含有机物质和硫酸盐的废水, 利用 SRB 处理能够达到以废治废的目的, 有效治理环境污染。美国 Tulsa 大学的 P. T. Selvaraj 等几位学者^[19, 20, 21, 22, 23, 24, 25]自 1989 年到 1997 年利用硫酸盐还原菌直接将气相 SO_2 还原为 H_2S , 然后用脱氮硫杆菌使 H_2S 转化为 S, 并在 1997 年进行烟气和富含 $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}$ 的废水固定化细胞生物反应器脱硫研究中发现, 以城市污水作为碳源和能源的硫酸盐还原菌能将烟气中的 SO_2 变成 H_2S 。

根据这一思路, 本人提出了将垃圾渗沥液和烟气中的 SO_2 这两种污染物有机地联系起来, 实现废气治废水的生物互补处理。利用硫酸盐还原菌通过异化硫酸盐的生物还原反应, 将硫酸盐还原为 H_2S , 并利用硫氧化微生物将 H_2S 氧化为单质硫。筛选纯化并研究具有处理这两种污染物能力的硫酸盐还原菌即是本实验课题的主要目的。

2.3.2 硫酸盐还原菌影响因子

对 SRB 的硫酸盐还原作用产生影响的因素主要有以下几个方面:

(1) pH pH 是影响 SRB 活力的主要因素^[3], SRB 一般不在 $\text{pH} < 6.0$ 的条件下生长, 生长最适 pH 值一般在中性范围内。当 pH 值在 6.48~7.43 之间时, 硫酸盐还原效果最好, 而且当 pH 值为 6.6 时可以得到最大的硫酸盐还原率, pH 值范围为 6.0~8.0 时, 硫酸盐还原反应也是可行的^[26]。Zebell 和 Pfennig 等人也持有类似的观点。他们认为, SRB 在 pH 范围为 7.0~7.8 的弱碱性条件下更适于生长。它所能容忍的 pH 范围为 5.5~9.0。有研究报道, SRB 在 pH 4.0 的强酸环境下还可生长, 其可容忍的最大碱性值为 pH 9~5。

(2) 温度 温度是影响厌氧 SO_4^{2-} 还原的主要环境参数。可以将 SRB 分为中温菌和嗜热菌两类。至今所分离到的 SRB 菌属大多是中温性的, 其最适温度一般在 30℃ 左右。SRB 在 28~38℃ 时生长最好, 其临界高温值是 45℃。Maree 和 StrvJo 认为^[26], SO_4^{2-} 还原的最佳温度为 31℃, 其高温临界值一般在 45~48℃ 之间。又有研究表明, 纯培养的 SRB 最

佳生长温度是 30℃ 左右，但在含硫酸盐废水和各菌种混合共生的复杂体系中，SRB 的硫酸盐还原速率不仅仅取决于环境的温度，还要受竞争的影响，一般在 35℃ 时，其硫酸盐还原速率最大。Maree 和 Strydom 报道^[27]，SRB 的最佳生长率发生在 30.5℃，当温度在 38℃ 以上时，SRB 生长受抑制。并且在反应器降低温度正常运行后，SRB 不易恢复原状。当温度高于 50℃ 时可在几分钟内杀死中温菌。高温 SRB 的最佳生长温度为 54~70℃，最高值为 56—85℃。Rintala^[28]分别在 55℃ 和 70℃ 下取得了较为理想的实验效果。当温度在 4℃~40℃ 之间以至更低时，对这两种 SRB 菌属均产生抑制作用。

(3) 硫化物 SO_4^{2-} 还原形成的 H_2S 和 S^{2-} 硫化物，特别是 H_2S ，对许多细菌的生长都有抑制作用。早期的研究表明，SRB 对 H_2S 的毒性影响相当敏感，当 H_2S 的浓度为 40—50mg/L，SRB 受到完全抑制，且当 H_2S 的浓度超过毒性水平 3~6h 后，SRB 菌种的活性会不可逆地丧失。Renze 和 Maree 均认为^[27]，SRB 可适应的总硫化物水平为 900mg—S / L。当 pH 为 7.0 时， H_2S 和 HS^- 的相对比例为 1: 1 (25℃ 时 H_2S 的 $\text{pK}_a=7.0$)，从而确定此时游离 H_2S 对 SRB 的毒性水平为 450mg—S / L。研究表明，硫酸盐还原过程中产生的 H_2S 对 SRB 的毒性作用是直接、可逆的，即 H_2S 对 SRB 的抑制作用不是由于离子的不可利用性所引起的，且当硫化氢从受抑制的菌种上吹脱后，其活性又增长了。这种高浓度的游离 H_2S 引起的可逆的抑制作用胜于急剧的毒性作用。Renze 和 Almelda^[29] 等认为， H_2S 对 SRB 的抑制作用可能是由 H_2S 内在毒性对生长系统作用的结果，或是由于 Fe^{2+} 变为难溶的 FeS 时产生的间接毒性作用。同时，他们对 H_2S 的抑制作用采用了非竞争性抑制作用模式进行了数学表达，并得出 H_2S 的抑制浓度 $[\text{H}_2\text{S}]_{\text{max}}$ 为 547mg / L (16.1mM)，与其他研究者们所得到的实验结果基本吻合。由于硫化物对 SRB 有机体的抑制作用，使得 SRB 的生长曲线通常是线性的，而不是指数形式。

因此，在硫酸盐还原过程中为防止硫化物的毒性主要需控制的是未离解的(游离的) H_2S 。目前所采取的控制 H_2S 浓度的措施有^[29, 30]：增加反应器中的 pH 值[在碱性 pH 值时，大部分硫化物以 HS^- 、 S^{2-} 游离形式存在，对生物活性影响不大；投加重金属以形成金属硫化物沉淀，Fe、Co、Ni、Cu、Zn 等微量元素也可以与 S^{2-} 形成硫化物沉淀，降低消化

液中溶解态 S^{2-} 的浓度；在低 pH 值条件下将 H_2S 气体从反应器中吹脱去除。Maree 和 Strydom 认为在上向流填充床反应器中采用回流可以实现硫化物的去除，这可能是由于回流增加了生物膜层和水流层之间的扩散率，使 pH 梯度尽可能降低，并使高度集中的硫化氢浓度可以更快地扩散的缘故。

目前，许多研究者采用惰性气体，尤其是 N_2 ，逆流通过反应器以吹脱 H_2S 气体。如 Maree, Hulse 等人在实验中使用 N_2 以 6L/h 的速率连续通入介质来吹脱 H_2S 气体；Gerhard 在实验中使用 N_2 以 3—30L/h 的速率来吹脱 H_2S 气体，Maree 和 Hill 还曾在密闭系统中以 N_2 和 CO_2 气体吹脱 H_2S 。

(4) 氧气(空气) SRB 属于严格厌氧菌， O_2 总是抑制 SRB 生长^[3]，任何 SRB 均不可以 O_2 作为电子受体生长。SRB 生长的氧化还原电位 (Eh) 必须低于 -100mV。氧气(空气)是对 SRB 最有效的抑制因子。

(5) COD SRB 属于异养微生物，生长必需有机碳源，因此生长环境中必须要有一定浓度的 COD，根据 SO_4^{2-} 与 COD 在硫酸盐还原中的关系^[31] (图 2.5)

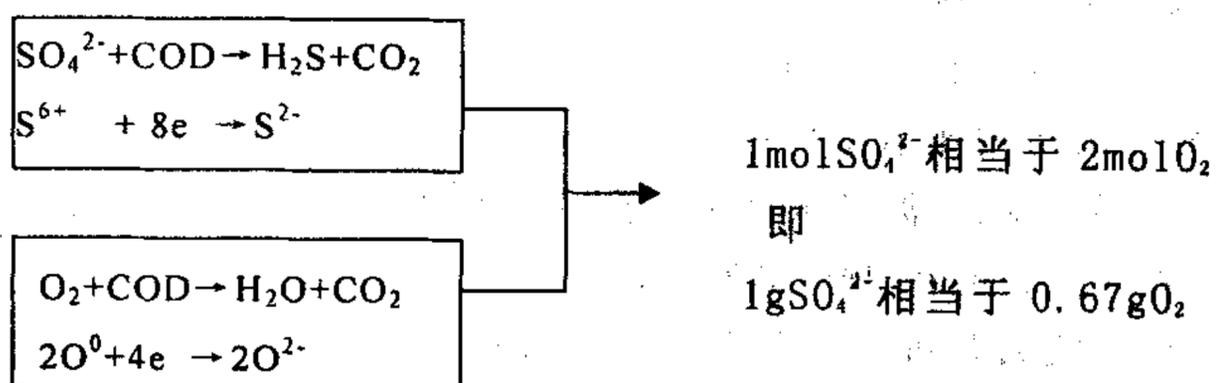


图 2.5 SO_4^{2-} 与 COD 在硫酸盐还原中的关系

所以，SRB 在还原硫酸盐时要求需要有足够的 COD 含量，即 COD 与 SO_4^{2-} 的质量比应当大于 0.67，高于此值， SO_4^{2-} 可以被完全还原，低于此值， SO_4^{2-} 只能被部分还原。如果考虑到产甲烷菌 (MPB) 与 SRB 对基质的竞争， SO_4^{2-} 完全被还原所需 COD 要大于理论值 0.67。Choi 和 Rim^[32] 认为 COD/ SO_4^{2-} 超过 2.7 时，MPB 占优势，而 COD/ SO_4^{2-} 比值低于 1.7 时，SRB 占优势，COD/ SO_4^{2-} 比值在 1.7~2.7 之间时，MPB 和 SRB 竞争激烈。

2.4 绿硫细菌和紫硫细菌的定义和应用

SRB 还原 SO_4^{2-} 的产物 H_2S 仍然是污染物, 而且在合适的条件下又会氧化为 SO_4^{2-} 。所以将 SRB 生物还原产生的 H_2S 氧化为单质硫是至关重要的一步。本课题采用光合细菌中的紫硫细菌和绿硫细菌来完成这一步。

紫硫细菌专性光能自养^[5], 利用 CO_2 为碳源, H_2S 作为光合作用的供氢体 (有的利用其他无机硫化物作供氢体), 严格厌氧, 典型生活环境为含硫化物的水体。在自然界中, 它们存在于厌氧含硫酸盐的水域中, 少数种适专性嗜盐菌, 多数种的最适生长温度为 $20\sim 30^\circ\text{C}$ 。在天然水域中, 它们常生活于含 CO_2 和 H_2S 的厌氧水层中; 有时因大量增殖而呈现红色, 该菌之所以能大量繁殖, 是因为在厌氧环境中, 以 H_2S 为营养源的生物很少, H_2S 对其他生物的生长起抑制作用, 另一原因是紫硫细菌以光能作能量来源。

绿硫细菌是严格厌氧的专性光能自养菌, 能利用 H_2S 或其他还原性无机硫化物或 H_2 作电子供体, 氧化 H_2S 生成元素硫沉淀于细胞外。不能利用硫酸盐作硫源, 具有固氮活性, 有的菌种需要维生素 B_{12} , 不能利用有机物作唯一碳源, 虽然能在光照下同化乙酸, 但必须同时存在 H_2S 和 CO_2 , 不合成聚- β -羟基丁酸。这群细菌和紫硫细菌一起存在于光照和含有硫化物的厌氧水体中, 一些棕色菌种能生长在池塘和湖的深层处, 个别菌株已从海港水体中分离到。绿硫细菌的最适 pH 为 $6.5\sim 7.0$, 最适生长温度在 $20\sim 30^\circ\text{C}$ 之间。

紫硫和绿硫细菌可把下层水中生成的 H_2S 氧化成硫, 进一步氧化成 SO_4^{2-} 。紫硫细菌在进行 $\text{H}_2\text{S}\rightarrow\text{S}$ 反应的同时, 也进行 $\text{S}\rightarrow\text{SO}_4^{2-}$ 的反应, 但后者反应很慢, 在反应过程中, 生成的硫粒蓄积在细胞内。而绿硫细菌在 H_2S 存在的情况下, 只能进行 $\text{H}_2\text{S}\rightarrow\text{S}$ 反应, 生成的硫粒附着在细胞外侧。由于绿硫细菌生活的厌氧层不断有 H_2S 产生, 所以在细胞表面不断有硫粒蓄积, 其中一部分硫粒被还原菌再还原成 H_2S , 一部分硫粒沉积在水底, 这说明光合细菌可能与湖底硫床底的形成有关。

把绿硫细菌和硫酸盐还原菌在厌氧光照条件下混合培养, 则两者互相提供营养源而生存。即绿硫细菌氧化 H_2S (电子供体), 分泌硫的同时以 CO_2 作碳源来繁殖。共生的硫酸盐还原菌还原分泌的硫 (电子受

体)，再生成 H_2S ，同时分解乙醇，生成 CO_2 。如图 2.6 所示。

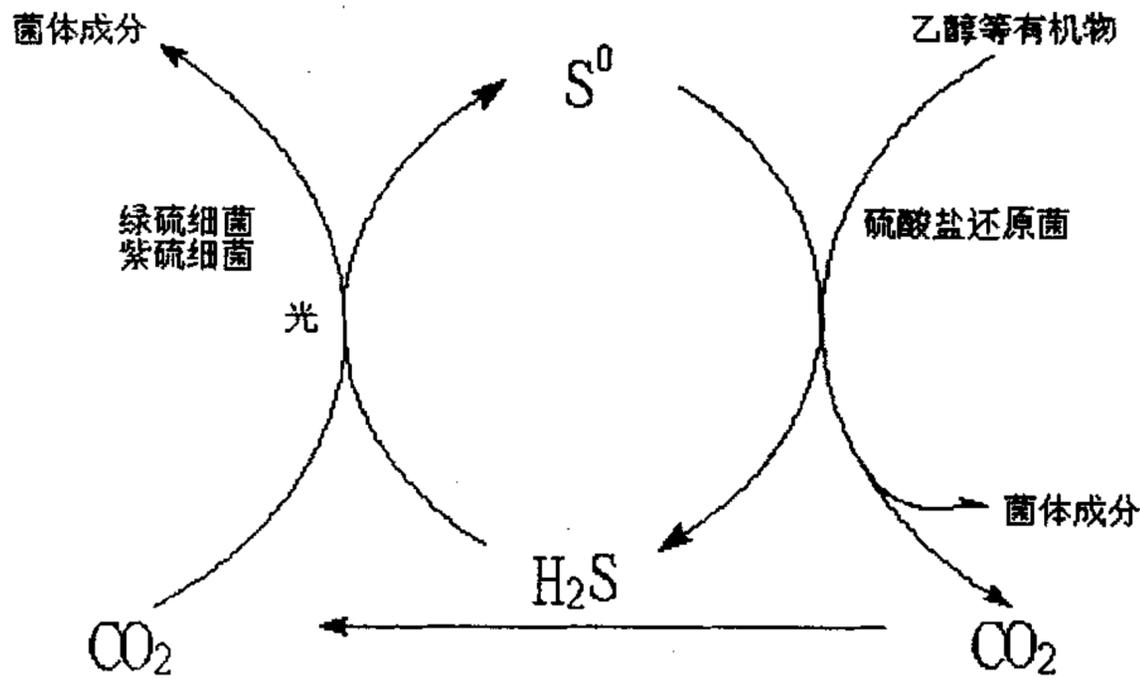


图 2.6 紫硫细菌，绿硫细菌和硫酸盐还原菌混合培养时营养物的互补关系

2.5 本课题的研究思路

本课题提出以城市垃圾渗滤液为烟气脱硫剂，烟气很容易使垃圾渗滤液中大部分 NH_3 被吹脱，而且烟气中的 $SO_2 \rightarrow SO_4^{2-}/SO_3^{2-}$ ，吸收尾液中，由于有机物（C 源）浓度很高，不补充 O_2 时，尾液处于厌氧状态，尾液中 SO_4 和高浓度的 COD, BOD 刚好是 SRB 生长繁殖所需。于是 SO_4^{2-}/SO_3^{2-} 通过扩散作用由胞外进入胞内，在各种酶的作用下还原为 H_2S ，同时有机碳源在降解时产生大量的 CO_2 ，使得水体中 COD, BOD 降低。在硫酸盐还原菌生长末期，将绿硫细菌和紫硫细菌接入培养液，将 H_2S 氧化为 S。而此时有机物基本耗尽，SRB 缺少供氢体难以生长。则尾液中 COD 得以消耗和降解， SO_4^{2-} 转变为 S，防止二次污染，并且成本低廉，实现将两类污染物（烟气，垃圾渗滤液）在同一套工艺中进行互补生物处理，在产生社会效益的同时又具有一定的经济效益，体现“以废治废”的环境工程新概念。

因此，根据上述思路，首先要选育出具有硫酸盐转化能力的 SRB，然后，驯化提高 SRB 的硫酸盐还原转化能力，最后处理转化高浓度 SO_4^{2-}

的垃圾渗滤液烟气脱硫吸收尾液。

本研究的重点在于分离选育对 SO_4^{2-} 、COD 有较强转化作用的 SRB，并对分离菌的生长特性和生理特性进行详尽研究，同时驯化 SRB，探讨 $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}$ 的机理。

3 实验材料与方法

3.1 实验材料与设备

3.1.1 主要设备:

- | | |
|-----------------------------------------------|------------------|
| 1、S XK—106 型净化工作台 | 2、SHA-82 气浴恒温振荡器 |
| 3、TG328A 型分析天平 | 4、水浴锅 |
| 5、721—A 型分光光度计 | 6、752 紫外光栅分光光度计 |
| 7、LRH—150B 型生化培养箱 | 8、冰箱 |
| 9、PH2—型酸度计 | 10、高速台式冷冻离心机 |
| 11、手提式压力消毒锅 | 12、抽滤装置一套 |
| 13、冰柜 | 14、砝码天平一架 |
| 15、DB—200 型电热鼓风恒温干燥器 | |
| 16、78—1 型电热恒温培养箱 (带恒温控制器) | |
| 17、78-1 型磁力加热搅拌器 | |
| 18、SH2-D(III) 循环水式真空泵 | |
| 19、WH-851 旋涡混合器 | |
| 20、LD4-2 低速离心机 | |
| 21、容量瓶 (1000ml, 500ml, 250ml, 100ml, 50ml) | |
| 22、三角瓶 (1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100ml, 50ml) | |
| 23、烧瓶 (500 ml, 250 ml, 100 ml) | |
| 24、G4 熔结玻璃坩锅 (30ml) | 25、盖玻片 |
| 26、目镜测微尺 | 27、载玻片 |
| 28、回流装置一套 | 29、酸式滴定管 |

3.1.2 主要实验药品 (注: 所有药品均为分析纯)

- | | | |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2、NaOH | 3、KCl |
| 4、 KH_2PO_4 | 5、 MgSO_4 | 6、 CaCl_2 |
| 7、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ | 8、 NH_4FeSO_4 | 9、 MgCl_2 |
| 10、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 11、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 12、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| 13、NaCl | 14、 $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 15、 NH_4Cl |
| 16、乳酸钠 | 17、 H_2SO_4 | 18、Hcl |

3.1.3 主要实验试剂:

- 1、琼脂
- 2、酵母膏
- 3、大豆蛋白胨
- 4、维生素 C
- 5、L-Cys 半胱氨酸
- 6、蒸馏水
- 7、0.9%生理盐水
- 8、盐酸 (1:1)
- 9、氨水 (1:1)
- 10、BaCl₂·H₂O 溶液 (100g/l)
- 11、甲基红指示液 (1g/l)
- 12、AgNO₃ 溶液(约 0.1mol/l)
- 13、革兰氏染色液 : 1) 草酸铵结晶紫染液 ; 2) 卢戈氏碘液 ;
3) 番红复染液 ; 4) 乙醇溶液 (95%) ;
- 14、齐氏石碳酸复红染色剂
- 15、吕氏碱性美蓝染色剂
- 16、Leifson 染色液 (鞭毛染色)
- 17、石炭酸溶液
- 18、重铬酸钾标准溶液 (1/6K₂Cr₂O₇=0.2500mol/L)
- 19、试亚铁灵指示液
- 20、硫酸亚铁铵标准溶液 (0.1mol/L)
- 21、硫酸-硫酸银溶液: 500ml 浓硫酸中加入 5g 硫酸银, 放置 1~2 天, 不时摇动使其溶解。

3.2 菌种与培养基

3.2.1 菌种来源:

SRB 菌种来自于青白江川化硫酸厂厂区内的淤泥中。紫硫细菌和绿硫细菌来自于府南河污水滞水区。

3.2.2 培养基:

3.2.2.1 琼脂蛋白胨培养基^[33] (基础培养基):

酵母膏	0.6g	KCl	0.05g
AGAR	3~4g	蒸馏水	200ml

培养基的酸度由土样的 pH 值来确定, 考虑到所筛选的菌种对 SO₄²⁻ 的特殊利用, 因此另行加入 0.5g 的 (NH₄)₂SO₄。

3.2.2.2 SRB 加富培养基^[9. 18. 34. 35. 36. 37. 38]:

KCl 0.3g	MgSO ₄ ·7H ₂ O 3.0g	MgCl ₂ ·6H ₂ O 2.5g
NH ₄ Cl 0.5g	NaCl 1.0g	KH ₂ PO ₄ 0.6g
2%乳酸钠	维生素 C 0.5g	L-Cys 半胱氨酸 0.5g

酵母浸汁 2.0g 胰蛋白胨 2.0g $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.0g
蒸馏水 1000 ml pH 6.0~6.5
Vc, 半胱氨酸, $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 在培养前加入。
固体培养基加入 2% 琼脂。

3.2.2.3 SRB 纯度检查培养基^[38]:

胰蛋白胨 4g 葡萄糖 10g Na_2SO_4 2g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g 琼脂 15g 蒸馏水 1000ml
灭菌后加入单独灭菌的 $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (浓度 0.05%)
调 pH 6.5~7.0

3.2.2.4 绿硫/紫硫菌加富培养基^[5]:

KH_2PO_4 0.5g NH_4Cl 1.0g $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2~0.5g
 NaHCO_3 50ml $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20ml NaCl 1.0g
 NaHCO_3 和 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为 10% 溶液, 培养之前加入
用无菌的 H_3PO_4 (10%) 或 Na_2CO_3 调 pH 至 7~8
固体培养基加入 2% 琼脂

3.3 实验方法

3.3.1 培养基, 玻璃仪器等的灭菌^[33]:

3.3.1.1 高压蒸汽灭菌

实验中所有培养基的灭菌都采用高压蒸汽灭菌, 培养基采用 0.1MPa、121℃、15~20min 的条件灭菌; 玻璃仪器的灭菌采用 0.1MPa、121℃、8min 的灭菌条件。

3.3.1.2 干热灭菌

玻璃仪器的灭菌温度为 160℃~170℃, 时间 2h。

3.3.1.3 紫外线灭菌

对部分无法用高压蒸汽灭菌和干热灭菌的物品（如化学试剂的灭菌），在无菌室内先喷洒 3%~5% 的石炭酸溶液，再用紫外线照射 15min~30min。

3.3.2. 分光光度计测定 OD_{605nm} 值^[33];

用分光光度计测细菌菌悬液的吸光度（OD 值）可以知道菌种的生长情况，二者成正比例关系，这是常用的观察菌种生长情况的测量方法：

1. 检查仪器各个调节旋钮是否正常，接通电源开关。
2. 打开比色皿暗箱盖预热 40 分钟，调节波长于 605nm，灵敏度旋钮调至第一档，调节暗电流旋钮，校正电表“0”位。
3. 取四只厚度均为 1cm 的比色皿，其中一只装参比溶液（本实验未做其它说明时都是用蒸馏水作参比液，用于空白实验来校满偏），其余三个比色皿装入待测溶液，依次放入比色槽架内并盖上暗箱盖。
4. 取四只厚度均为 1cm 的比色皿，其中一只装参比溶液（本实验未做其它说明时都是用蒸馏水作参比液，用于空白实验来校满偏），其余三个比色皿装入待测溶液，依次放入比色槽架内并盖上暗箱盖。
5. 使参比液处于 $T=100\%$ 的位置，然后拉动拉杆使各比色皿分别进入光路中，读取其 OD 值，读后立即打开暗箱盖。
6. 重复上述测定操作 1~2 次，求出平均值，关闭电源完成操作。

3.3.3 重铬酸钾法测 COD_{Cr} ^[33];

1. 取 20.00ml 混合均匀的水样置 250ml 磨口的回流锥形瓶中，准确加入 10.00ml 重铬酸钾标准溶液及数粒小玻璃珠，连接磨口回流冷凝管，从冷凝管口慢慢加入 30ml 硫酸-硫酸银溶液，轻轻摇动锥形瓶使其混和均匀，加热回流 2 小时。
2. 冷却后，用 90ml 水冲洗冷凝管壁，取下锥形瓶，溶液总体积不得少于 140ml，否则因酸度太大，滴定终点不明显。
3. 溶液再度冷却后，加 3 滴试亚铁灵指示液，用硫酸亚铁铵标准

溶液滴定，溶液的颜色由黄色经蓝绿色至红褐色为终点，记录硫酸亚铁铵标准溶液的用量。

4. 测定水样的同时，以 20.00ml 重蒸馏水，按同样操作步骤做空白试验，记录滴定空白时硫酸亚铁铵标准溶液的用量。

$$5. V. \text{ 计算 } \text{COD}_{\text{Cr}}(\text{O}_2, \text{mg/L}) = \frac{(V_0 - V_1) * c * 8 * 1000}{V}$$

式中， c —硫酸亚铁铵标准溶液的浓度 (mol/L)； V_0 —滴定空白时硫酸亚铁铵标准溶液用量 (ml)； V_1 —滴定水样时硫酸亚铁铵标准溶液的用量 (ml)； V —水样的体积 (ml)；8—氧 (1/20) 的摩尔质量 (g/mol)。

3.3.4 直接电位法测 pH 值：

培养基的酸度测定用直接电位法来测定，采用 PHS-2 型酸度计，利用电池电动势 E 与 pH 值的线形函数关系： $E = K' + 0.059\text{pH}$ (25℃)，将指示剂与参比电极插入被测溶液中形成原电池来得到溶液的 pH 值。由于 K' 难求，实验中使用 pH=6.846 的标准缓冲液来校正酸度计（即“定位”），并且选用 pH=4.003 的另一种标准缓冲液来做二次校正（由于实验所测的 pH 大多在 7 左右），测量方法如下：

1. 接通酸度计的电源，调节温度补偿器为室温温度，预热半小时。
2. 调零点，校满偏。
3. 用 pH=6.846 的标准缓冲液进行定位，再用 pH=4.003 的另一种标准缓冲液校正。
4. 当第二种缓冲液的 pH 指示值与实际的 pH 值相差在 0.05 之内时即可用于测酸度了，每次测不同酸度培养液都要反复用蒸馏水冲洗，吸干。

3.3.5 重量法测 SO_4^{2-} ，计算脱硫率^[39]：

重量法测定 SO_4^{2-} 适用于含盐水、生活污水和工业废水中硫酸盐的测定。本实验采用简化后的测定步骤，尽量减少误差。实验原理简短叙述如下：在盐酸溶液中，硫酸盐与加入的 BaCl_2 反应形成 BaSO_4 沉淀，

沉淀反应在接近沸腾的温度下进行，并在陈化一段时间后过滤，用水洗到无 Cl^- ，烘干或灼烧沉淀，称 BaSO_4 的重量。具体步骤如下：

1. 配置测定所用实验试剂，清洗所需实验仪器，熔结玻璃坩锅需要烘干，称量烘干后的玻璃坩锅质量 M_1 。
2. 量取待测培养液 50ml，4000 转/分的条件下离心分离约 20 分钟后取上层清液 20ml 左右于 500ml 烧杯中。
3. 加数滴甲基红指示剂，用适量的盐酸（1：1）调至显橙红色，再加 2ml 盐酸，加蒸馏水使烧杯内溶液总体积至 200ml 左右，加热煮沸 5min 以上。在煮沸条件下，不断搅拌，逐滴加入热的 BaCl_2 溶液，直到不再出现沉淀，然后多加 2ml，室温下陈化过夜。
4. 用烘干的熔结玻璃坩锅抽滤陈化后的溶液，抽滤过程中反复用热水冲洗烧杯并清洗沉淀直到洗涤液中无氯化物。于 105°C 的烘箱内烘干漏斗（2 小时）至恒重后，取出放入干燥器内冷却，分析天平准确称量，质量记为 M_2 。检验洗涤过程中有无氯化物时，取约 5ml 洗涤液在其中滴加约 5ml AgNO_3 溶液，观察有无浑浊，若溶液澄清则说明洗涤液中无氯化物。
5. SO_4^{2-} 含量计算按下式：

$$M = M_1 * 411.6 * 1000 / V$$

注： M_1 —— 溶液中沉淀出来的硫酸钡重量即，g

V —— 所取培养液上层清液的体积，ml

411.6—— BaSO_4 质量换算为 SO_4^{2-} 的因素

3.3.6 细胞染色^[33]

3.3.6.1 单染色法鉴定菌种形态：

单染色法是利用单一染料对细菌进行染色的一种方法。此法操作简便，适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。染色步骤简述如下：

1. 涂片 挑取待测菌液，均匀涂于滴有生理盐水的载玻片上，形成均匀薄膜。
2. 干燥 室温下自然干燥。
3. 固定 涂面向上通过火焰 2~3 次稳定细胞形态。

4. 染色 齐氏石碳酸复红或吕氏碱性美蓝染色剂染色约 1~2 分钟。
5. 水洗 小水柱冲洗直到涂片上流下的水无色。
6. 镜检 涂片干燥后用显微镜观察细胞形态,物镜放大倍数从小到大,最后用油镜观察,镜检完毕后用二甲苯擦拭镜头。

3.3.6.2 革兰氏染色法:

革兰氏染色反应是细菌重要的鉴别特征,简单操作步骤如下:

1. 涂片 取待测菌种培养物常规涂片,自然干燥后固定。
2. 初染 滴加结晶紫(以刚好覆盖菌膜为宜)染色 1~2 分钟,水洗。
3. 媒染 用碘液冲去残水,并用碘液覆盖约 1 分钟,水洗。
4. 脱色 用滤纸吸去玻片上的残水,将玻片倾斜衬以白色背景,用滴管流加 95%的乙醇脱色,直至流出的乙醇无紫色时,立即水洗。
5. 复染 用番红液复染约 2 分钟,水洗。
6. 镜检 干燥后用油镜观察,菌体被染成蓝紫色的是 G^+ ,被染成红色的是 G^- ,镜检完毕后用二甲苯擦拭镜头,归位。

3.3.6.3 鞭毛染色法:

鞭毛是细菌的运动器官,细菌是否具有鞭毛以及鞭毛着生的位置和数目是细菌的一项重要形态特征。鞭毛染色的基本原理是在染色前先用媒染剂处理,使它沉积在鞭毛上,使鞭毛的直径加粗,然后进行染色。操作步骤简述如下:

1. 菌种的准备:要求用活跃生长期菌种作鞭毛染色和运动性的观察。
2. 载玻片的准备:将载玻片(玻片要求光滑洁净)在含适量洗涤剂的水中煮沸约 20 分钟,取出用清水充分洗净,沥干后放入 95%的乙醇中,用时取出在火焰上烧去酒精以及可能残留的油迹。

3. 菌液的制备：取平板菌种培养物数环于盛有 2ml 无菌水的试管中，制成轻度浑浊的菌悬液用于制片。（注意挑菌时尽可能不带培养基）
4. 制片：用记号笔在载玻片反面将玻片划分为 4 个等分区，在每一小区的一端放一小滴菌液。将玻片倾斜，让菌液流到小区的另一端，用滤纸吸去多余的菌液，室温下自然干燥。
5. 染色：加 Leifson 染色液覆盖第一区的涂面，隔数分钟后加染液于第二区涂面，如此继续染第三、四区（间隔时间进行染色是为了确定最佳染色时间）。染色过程中仔细观察，当整个玻片都出现铁锈色沉淀、染料表面出现金色膜时，直接用水轻轻冲洗，染色时间大约 10 分钟，自然干燥。
6. 镜检：干燥后油镜观察。

3.3.6.4 芽孢染色法：

芽孢是某些细菌生长到一定阶段在菌体内形成的休眠体，通常呈圆形或椭圆形。以往的研究中并没有提及 SRB 在生长中是否形成芽孢，实验利用芽孢染色对 SRB 进行检验。简单操作步骤如下：

1. 制备菌悬液：加 1~2 滴水于小试管中，用接种环挑取 2~3 环菌苔于试管中，搅拌均匀，制成浓的菌悬液。
2. 染色：加 2~3 滴孔雀绿染液于小试管中，混合均匀后将试管置于沸水浴的烧杯中，加热染色 15~20 分钟。
3. 涂片固定：用接种环挑取试管底部菌液数环于洁净载玻片上，涂成薄膜，然后将涂片通过火焰 3 次温热固定。
4. 脱色：水洗直至流出的水无绿色。
5. 复染：用番红染液染色 2~3 分钟，倾去染液并用滤纸吸干残液。
6. 镜检：干燥后用油镜观察。

3.3.6.5 细胞运动性观测

1. 制片 在洁净载玻片上加一滴无菌水，挑取一环菌液与水混合，再加一环 0.01% 的美兰溶液与其混和均匀，用镊子取一洁净玻片，使

其一边与菌液边缘接触，然后将盖玻片慢慢放下盖在菌液上。

2. 镜检 先用低倍镜找到标本，再用高倍镜观察，也可以用油镜时，盖玻片厚度不能超过 0.17mm，观察时，要用略暗光线。

3.3.6.6 细胞大小的测定

1. 装入目镜，先用低倍镜校正，使某一区域内两线完全重合，然后分别数出两重合线之间镜台测微尺和目镜测微尺所占的格数。再用同样方法高倍镜和油镜校正。
2. 根据下列公式即可计算出在不同放大倍数下，目镜测微尺每格所代表的长度。

$$\text{目镜测微尺每格长度} (\mu\text{m}) = \frac{\text{两重合线间镜台测微尺格数} \times 10}{\text{两重合线间目镜测微尺格数}}$$

3. 菌体大小测定：通过转动目镜测微尺和移动载玻片，测出细菌直径或宽和长所占目镜测微尺的格数。最后将所测得格数乘以目镜测微尺每格所代表的长度，即为该菌的实际大小。
4. 取出目镜测微尺，擦洗目镜测微尺和镜台测微尺。

3.3.7 细胞数量的测定—显微镜直接计数法^[33]

1. 菌悬液制备 以无菌生理盐水将分离菌制成适当浓度的菌悬液。
2. 镜检计数室 在加样前，先对计数板的计数室进行镜检。若有污物，则需清洗，吹干后才能计数。
3. 加样 将清洁干燥的血球计数板上盖上盖玻片，再用无菌的毛细滴管将摇匀的菌悬液由盖玻片边缘滴一小滴，让菌液沿缝隙靠毛细渗透作用自动进入计数室，一般计数室均能充满菌液。
4. 显微镜计数 在计数前若发现菌液浓度太浓或太稀，需重新调节稀释度后再计数。一般样品稀释度要求每小格内均有 5~10 格菌体为宜。每个计数室选五个中格中的菌体进行计数。计数一

个样品要从两个计数室中计得平均数来计算样品得含菌量。

5. 清洗血球技术板，吹干，镜检每个小格是否有残留菌体或其他沉淀物。若不干净，则必须重复洗涤至干净为止。

3.3.8 平皿夹层涂布厌氧培养法

本方法是根据实验室条件而创的新型培养方法，在国内尚未见报道。具体操作方法如下：

1. 将做好的固体培养基，琼脂浓度为 2%，灭菌后保温在 45℃ 左右，培养皿经灭菌后将培养皿盖（外皿）翻转，往其中无菌倒入一层固体培养基，厚度约培养皿盖高度三分之一。待琼脂冷却后，将菌悬液涂布，涂布完后，让菌液渗透几分钟，然后将未凝固的固体培养基再度倒入，在培养基尚未凝固时，使培养皿（内皿）一边与培养基边缘接触，然后慢慢放下使皿内不因一点气泡。
2. 封口 将灭菌融化的石蜡 / 石蜡油混合物倒入培养皿边缝里，使不留空隙，石蜡 / 石蜡油采用 1: 2~3 (W / V)。

所有步骤必须在净化工作台操作，避免污染杂菌。

该方法的优点：

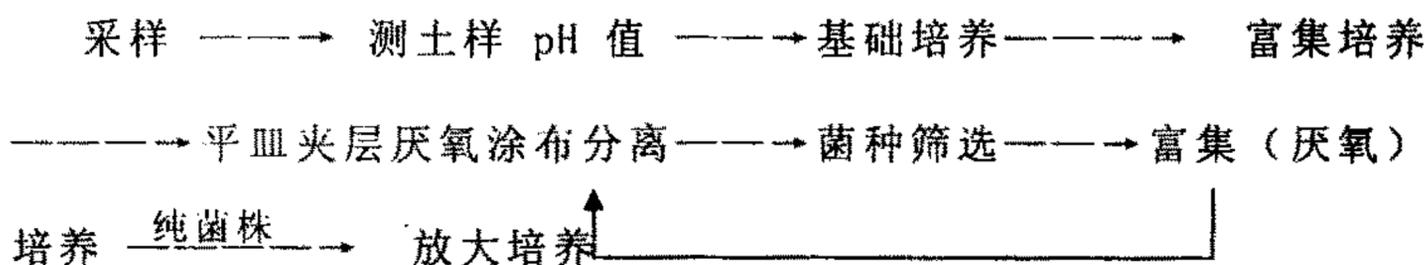
1. 由于两层培养基凝固时间不同，固容易定点挑取菌落进行分析和接种。
2. 分离菌的周围均为固体培养基，故氧气(空气)无法进入其生长环境，从而造成严格的厌氧环境，利于分离菌的生长。
3. 无需价格昂贵的设备，操作简单，快速。

4. 实验内容

4.1 硫酸盐还原菌的分离纯化及生理生化特征研究

4.1.1 硫酸盐还原菌的分离纯化

4.1.1.1 基本实验流程^[40]:



4.1.1.2 实验步骤简述:

1) 菌种采样: 从川化硫酸厂地区的淤泥中分离筛选。

2) 测土样 pH 值: 实验室用精密 pH 试纸测土样 pH 值, 榨取土样中的水分于试纸上, 粗测得菌种生长的 pH 值在 6.0~7.0。粗测的目的在于初步确定基础培养 pH 值, 使所需菌种在实验过程中得以正常生长, 避免因为 pH 值调试不当而造成的菌种生长不良或死亡。

3) 基础培养: 自然条件下实验所需菌种的菌量不大, 且伴有大量其他微生物共生, 所以先用基础培养基 (液体) 厌氧培养, 让各厌氧或兼氧菌群都大量生长繁殖, 再采用固体培养基进行平皿厌氧夹层涂布法对各菌种进行分离。操作步骤简述如下:

I. 按配方配制所需培养基溶液, 并调节 pH 至 6.0~7.0, 包扎后高压湿热灭菌。

II. 称取淤泥样品 10g, 接入 90ml 灭菌后的液体培养基。放入生化培养箱, 30℃ 培养 7 天。

III. 按照基础培养成分 (固体) 配方称量所需药品并调节 pH 至 6.0~7.0, 包扎后高压湿热灭菌。灭菌后在净化工作台上倒平板、编号。

IV. 制备菌悬液: 用接种枪量取培养液 1ml 放入大试管中, 注入无菌水 9ml, 放入振荡器使其充分震荡, 再取 1ml 稀释 10 倍, 依次类推制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 不同稀释度的菌悬液。

V. 涂布平板: 无菌条件下吸取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 中的菌悬液各 0.2ml 放入对应的平板中, 按照平皿夹层涂布厌氧培养法 (3.3.8) 对菌悬液进行涂布分离。

VI. 培养：将制好的平板放入生化培养箱中培养 3~8 天（温度控制在 $28^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ）。

研究表明 SRB 的生长周期为 3~8 天，最适生长温度为 $28^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ，菌落直径大约为 1mm 左右，因此用单染色法和鞭毛染色法挑取直径在 3mm 以下的菌落作镜检，选取形态为短杆状、细杆状或端生鞭毛短杆状的菌落用于富集培养。

4) 富集（厌氧）培养：用 SRB 加富液体培养基富集培养在基础培养中选出的菌种。按照 SRB 加富液体培养基的成分要求称量所需药品，配置成溶液，包扎后高压湿热灭菌，灭菌后在操作台上将 pH 值调为 6.5~7.0。在无菌条件下将培养基分装入容量瓶（一般用 50ml）中。用接种环将所需菌落挑入液体培养基中进行厌氧培养（利用深层培养原理，使液体培养基基本充满容量瓶，并加入少量液体石蜡，用以隔绝空气）， $28^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 下培养 6~8 天，同时用醋酸铅试纸定性检测 H_2S 的生成状况。采用富集培养是为了放大所需菌种，增加原始菌种量。由于所选菌种并不是单一菌种，所以还不能使不同菌种在培养液中分散生长，需要进行菌种的分离纯化。

5) 硫酸盐还原菌的定性检测：由于 SRB 生长繁殖过程要利用 SO_4^{2-} 做电子供体，并将其还原为 H_2S ，所以如果培养基中有 Fe^{2+} ，则会产生 FeS 黑色沉淀，这就可以作为硫酸盐还原菌的定性检测指标；另一方面，若用液体培养，SRB 会产生 H_2S ，于是在培养瓶口放置醋酸铅试纸，若试纸变黑，则说明培养液中产生 H_2S ，并且 H_2S 逸出与醋酸铅反应产生 PbS 而使试纸变成黑色。

6) 平皿厌氧涂布分离：

培养基的配制：使用 SRB 加富固体培养基，琼脂浓度为 2%，湿热法高压灭菌。（SRB 加富培养基配制和灭菌的方法如基础培养基配制法）

平板夹层涂布分离，然后将平板置于 30°C 恒温箱内培养 5~7 天，挑取黑色菌落（产生 FeS ）。接入少量的 SRB 加富液体培养基中，生化培养箱内厌氧培养（ $28^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ）3~8 天。

7) 菌种筛选：镜检分离后的菌种，发现弧形细杆菌为优势菌，是实验所需菌种，所以对选定的弧形细杆菌进行富集（厌氧）培养。

8) 富集(厌氧)培养: 无菌条件下用将菌液放大培养, 并用醋酸铅作标记检验是否有 H_2S 生成, 置于生化培养箱中厌氧培养 3~8 天($28^{\circ}C \sim 30^{\circ}C$)。

9) 反复进行步骤 4~9, 直至镜检出弧形, 细杆状细菌为单一菌, 并且观察平板菌落是否形态单一, 均匀。

4.1.2 分离菌纯度检验

除了使用光学显微镜观察菌体形态, 大小以及革兰氏染色反应是否一致, 初步判断是否污染杂菌。在含有葡萄糖, 蛋白胨的营养琼脂平板上涂布好氧培养^[38], 观察平板上是否长出好氧菌的菌落以检查是否污染有好氧菌。同时采用平皿夹层涂布厌氧培养法进行厌氧培养, 再观察是否长出非黑色的菌落。

4.1.3 硫酸盐还原菌生理生化特性研究

4.1.3.1 硫酸盐还原菌细胞染色及形态鉴定

对菌株细胞的革兰氏染色、鞭毛染色、芽孢染色等均采用实验方法 3.3.6~3.3.7。

形态鉴定采用光学显微镜观察分离菌形状、大小、革兰氏染色结果, 有无鞭毛、芽孢等, 并辅以扫描电镜。

4.1.3.2 分离菌还原硫酸盐能力的初步鉴定^[41]

取对数生长期(3~4 天)菌液接入液体培养基, 将 PbAc 试纸置于瓶口, 如试纸变黑, 说明分离菌具有还原硫酸盐能力。

4.1.3.3 pH 值对分离菌还原转化硫酸盐能力的影响

在除 pH 值外其它条件相同的情况下, 取对数生长期菌液接入 pH3.0~9.0 的液体分离培养基中培养, 培养 4~5 天后, 即可测不同起始 pH 条件下硫酸盐还原能力以及生长过程中 pH 的变化。

4.1.3.4 温度对实验菌株生长的影响:

取对数生长期(3~4 天)菌液接入各相同的容量瓶, 将各容量瓶

分别放置于不同温度条件下 (15~50℃), 培养 3~5 天后测硫酸根去除率 (由于菌体生长情况与硫酸根的消耗量成正比, 故在实验中, 我们经常采用硫酸根的消耗量来表征菌株的生长)。

4.1.3.5 氧气对实验菌株的影响^[33]:

以往的研究表明, SRB 属于严格厌氧菌, O₂总是抑制 SRB 的生长, 任何的 SRB 都不能以 O₂作为电子受体生长。到底情况如何? 我们对纯化后的菌种在培养阶段中作了氧气对菌种生长影响的实验研究。

1) 取纯化后的菌种悬液 0.2 ml 加入 2ml 无菌生理盐水, 制成菌悬液。

2) 将六支装有 SRB 加富培养基 (固体) 的试管置于 100℃水浴中溶化并保温 5~10 分钟。

3) 将试管取出置室温静置冷却到 45℃~50℃室温, 作好标记 (分别记为 ABCDEF), 无菌操作吸取 0.1ml 菌悬液加入相应的试管中, 双手快速搓动试管, 避免振荡使过多的空气混入培养基, 待菌种均匀分布于培养基内后, 将试管置于冰浴中, 使琼脂迅速凝固。

将上述试管置于 30℃温室中静置保温 48 小时后开始连续进行观察。

4.1.3.6 过氧化氢酶的检测^[42]

取一干净的载玻片, 在上面滴一滴 3%的 H₂O₂, 挑取一环培养 18~24 小时的菌苔, 在 H₂O₂溶液中涂抹, 若有气泡 (氧气) 出现, 则为 H₂O₂酶阳性, 即证明分离菌具有过氧化氢酶活性。

4.1.3.7 不同供氢体对菌株生长代谢的影响^[43]

该项测定作为种的主要鉴定依据之一。在不含有机物的分离富集培养基中分别添加: 葡萄糖、甲醇、乙醇、乙酸、乳酸钠、丙酸、苯酚、脂肪酸 (C₆), 然后进行厌氧培养, 并检测是否都有 H₂S 的产生^[7]。

4.1.3.8 培养基中无机盐成分的正交优化试验^[44]

为了考察培养基中无机盐成分对分离菌生长的影响, 同时得到最优化的培养基配方, 本实验根据 L₁₈ (2×3⁷)^[6]进行正交实验, 并通过

测定生长前后的 OD 值作相应的极差分析。在实验中，为了排除 FeS 对 OD 值测定的影响，分离培养基中不加 Fe^{2+} 。在有机成分、还原剂相同的条件下，培养基中无机盐成份见表 4.1，表 4.2

表 4.1 培养基成分因素水平表

培养基成分水平	CaCl ₂ (g/l)	KH ₂ PO ₄ (g/l)	NH ₄ Cl (g/l)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	KCl (g/l)	NaCl (g/l)	MgCl ₂ ·6H ₂ O (g/l)
I	0	0.15	0.25	0.5	0.5	0	0	0.
II	0.2	0.30	0.5	1.0	1.0	0.3	1.0	1.5
III		0.60	1.0	3.0	2.0	0.5	2.0	3.0

表 4.2 培养基成分数据表 L18 (2×3⁷)

CaCl ₂ g/l	KH ₂ PO ₄ g/l	NH ₄ Cl g/l	MgSO ₄ ·7H ₂ O g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄ g/l	KCl g/l	NaCl g/l	MgCl ₂ ·6H ₂ O g/l
0	0.15	0.25	0.5	0.5	0	0	0
0	0.15	0.5	1.0	1.0	0.3	1.0	0.15
0	0.15	1.0	3.0	2.0	0.5	2.0	0.3
0	0.3	0.25	0.5	1.0	0.3	2.0	0.3
0	0.3	0.5	1.0	2.0	0.5	0.0	0.0
0	0.3	1.0	3.0	0.5	0	1.0	0.15
0	0.6	0.25	1.0	0.5	0.5	1.0	0.3
0	0.6	0.5	3.0	1.0	0	2.0	0
0	0.6	1.0	0.5	2.0	0.3	0	0.15
0.02	0.15	0.25	3.0	2.0	0.3	1.0	0
0.02	0.15	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0	0.15
0.02	0.15	1.0	1.0	1.0	0	0	0.3
0.02	0.3	0.25	1.0	2.0	0	2.0	0.15
0.02	0.3	0.5	3.0	0.5	0.3	0	0.3
0.02	0.3	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0
0.02	0.6	0.25	3.0	1.0	0.5	0	0.15
0.02	0.6	0.5	0.5	2.0	0	1.0	0.3
0.02	0.6	1.0	1.0	0.5	0.3	2.0	0

4.1.3.9 Fe²⁺对分离菌生长的影响

为了考察 Fe²⁺浓度对分离菌生长的影响,在除 Fe²⁺浓度以外其他条件相同的情况下,添加不同浓度的 Fe²⁺ (0g/l, 0.5g/l, 1g/l, 2g/l, 3g/l, 4g/l, 5g/l) 培养 4 天后测培养液中硫酸根去除量。

4.1.3.10 COD 浓度对分离菌生长及 COD, SO₄²⁻去除率的影响^[17, 45]

由于 COD 是垃圾渗滤液的一个重要指标,也是分离菌生长所需碳

源，因此向 SRB 加富培养基（除去蛋白胨，酵母膏，乳酸钠）中加入不同浓度的有机碳源，测试 COD 对分离菌生长以及 COD, SO_4^{2-} 去除率的影响。有机碳源含量见表 4.3

表 4.3 有机碳源 COD 成分数据表

序列号	酵母膏 (mg/l)	蛋白胨 (mg/l)	乳酸钠 (mg/l)	初始 COD (mg/l)	初始硫酸根含量 (mg/l)	$\text{SO}_4^{2-}/\text{COD}$
1	0	0	0	0	2500	0
2	1000	1000	0	500	2500	0.2
3	500	500	1000	1200	2500	0.48
4	1000	1000	1000	1700	2500	0.68
5	2000	2000	1000	2100	2500	0.84
6	2000	2000	2000	2800	2500	1.12
7	4000	2000	2000	3500	2500	1.40
8	2000	2000	4000	4800	2500	1.92
9	4000	4000	4000	6100	2500	2.24
10	8000	8000	4000	8500	2500	3.45
11	8000	8000	8000	12000	2500	4.76

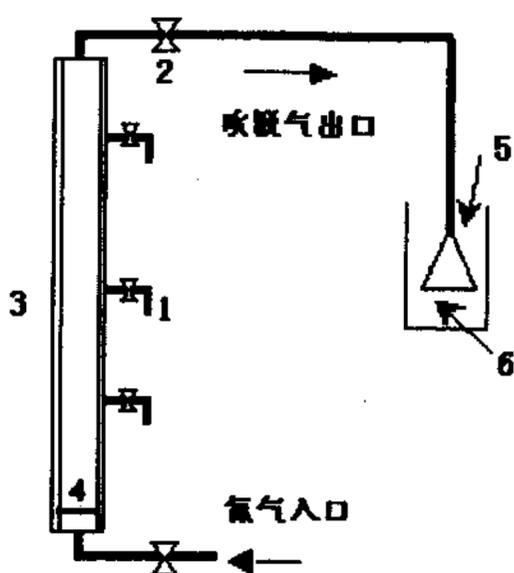
4.1.3.11 硫酸根消耗量随分离菌生长时间的变化

为考察分离菌生长过程中硫酸根消耗量的变化，在由上述实验所确定的最适条件下对分离菌进行培养，每隔 8 小时测试培养液中硫酸根剩余量。

4.1.4 在厌氧反应器中分离菌生长情况 [10, 17, 18]

由于 SRB 生长繁殖过程中所产生的 H_2S 不仅对生物体细胞有毒害作用，而且也造成产物抑制，使得硫酸盐还原作用不完全，因此本实验自行设计一厌氧反应器（图 4.1），反应器内直径 10cm，高度为 600cm，氮气 N_2 从反应器底部进入，对反应液中 H_2S 进行吹脱，吹脱气体进入碱吸收液。在反应期间，定期测试 SO_4^{2-} 去除率。为了测试反应器效果，

同时也在相同条件下对分离菌进行常规的厌氧培养（容量瓶培养）。



1. 取样口 2. 活塞 3. 反应瓶 4. 玻砂 5. 漏斗 6. 碱吸收液

图 4.1 厌氧反应器示意图

4.2 绿硫细菌和紫硫细菌的分离筛选

由于绿硫和紫硫细菌也是厌氧细菌，固其分离筛选流程基本相同于 SRB 的分离纯化流程 4.1.1.1。由于紫硫和绿硫细菌属于光合细菌，所以培养过程中，需要光照条件，于是在培养箱中接入白炽灯，保持光照强度为 2000Lux. 温度 28~30℃ [5. 46. 47. 48]。

分离筛选过程：

I. 采集府南河污水滞水层水样，初测 pH 为 7.0 左右。

II. 以 1:10 比例接种到基础培养基（液体）内厌氧培养一周。

III. 以 1:10 比例转接至绿硫菌和紫硫菌加富培养基（液体）中，厌氧培养 3~10 天，待培养液变绿或者变红，则涂布接入加富固体培养基，厌氧培养。

IV. 固体培养 3~7 天后，待长出绿色或者红褐色的圆形菌落，挑取单细胞接入液体培养基加富培养。

V. 待培养液变绿或者变红，镜检细胞形态是否为单一，否则再次进行固体培养分离。

VI. 反复进行步骤 IV, V, 直至菌落形态以及细胞形态均呈现单一形状。

5 结果及讨论

5.1 SRB 菌落形态

分离菌涂于固体平板上, 1~2 天后, 培养基表面出现乳白色菌落, 直径约 1~2mm, 菌落表面圆滑、湿润。在生长后期, 菌落呈黑色, 并深深的包埋于培养基中, 表面有微小凸起, 而且菌落向四周延伸。

5.2 SRB 细胞染色特性及生长形态变化

通过实验, 所得菌株为单细胞, 染色特性为革兰氏染色阴性、芽孢染色阴性、单极生鞭毛。活体观察发现细胞呈摇摆式运动。生长初期 (0~24h), 细胞粗长, $0.8\sim 1.0\times 3.0\sim 8.0\mu\text{m}$; 生长过程中细胞变细变短, 最终变为细小弧状、杆状, $0.4\sim 0.5\times 1.0\sim 3.0\mu\text{m}$ 。细胞在光学显微镜下和扫描电镜下的照片如图 5.1, 5.2。



图 5.1 SRB 细胞在光学显微镜下的形态 ($\times 1600$)

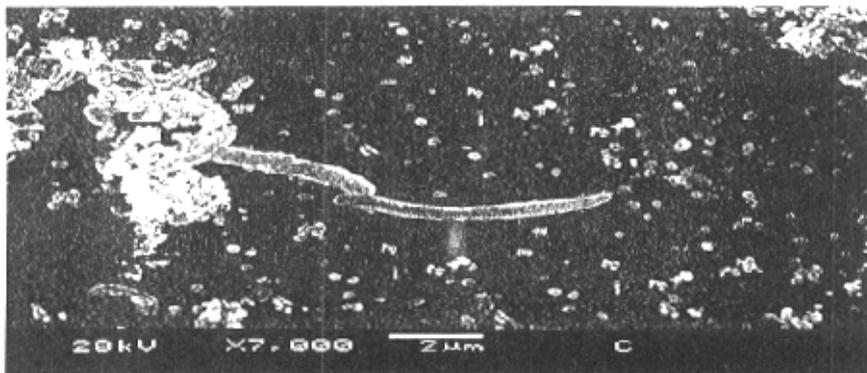


图 5.2 SRB 细胞在扫描电镜下的形态 ($\times 7000$)

5.3 SRB 生物学特性

5.3.1 pH 值对分离菌硫酸盐还原能力的影响

按照实验 4.1.3.3 可得到如下两图：分离菌在不同初始 pH 条件下的硫酸盐还原能力（图 5.3）以及生长过程中 pH 的变化（图.4）。

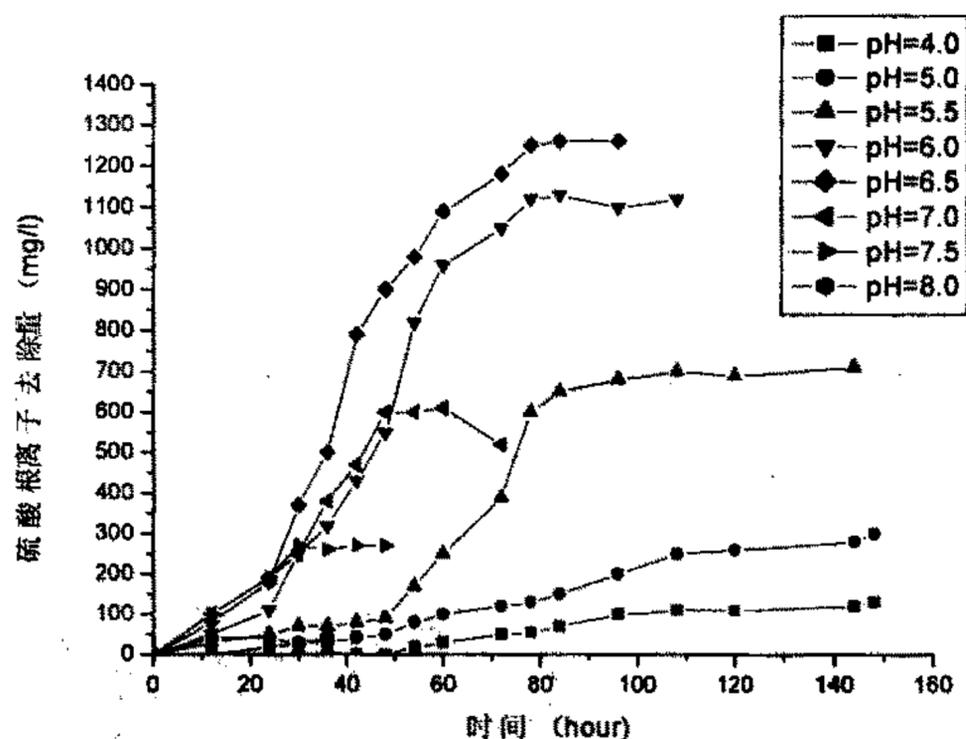


图 5.3 pH 值对分离菌的硫酸盐还原能力的影响

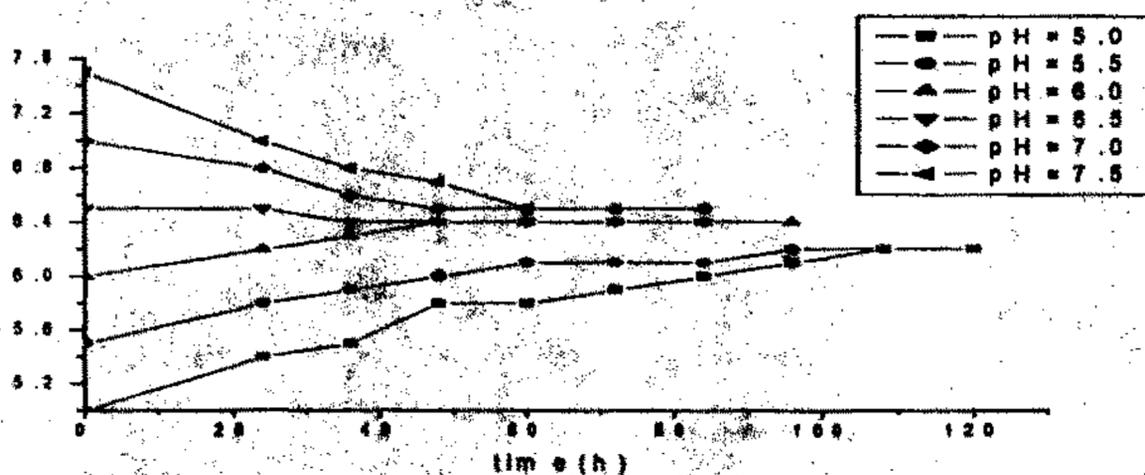


图 5.4 生长过程中 pH 的变化

适宜的 pH 环境是 SRB 还原转化硫酸盐所必须的^[3, 49]。H⁺直接影响 SRB 产生的一系列硫酸盐还原酶的构象、化学性质、生物学功能。pH 过高过低，都会影响硫酸盐还原酶的活性。由图 1 说明分离菌生长 pH 范围为 4.0~8.0，其最适 pH6.0~6.5，过酸或过碱的环境均对菌体生长有显著的抑制作用，这也可根据在分离菌生长过程中，培养液的 pH 值均迅速趋于 6.0~6.5（图 5.4）得以说明。而且在生长 pH 范围 4.0~8.0 内，随着起始 pH 的上升，菌体达到生长高峰所需的时间逐渐缩短。在 pH6.0~6.5，分离菌在 40~60h 即可迅速达到生长高峰。当溶液中 HS⁻ 或者 S²⁻ 含量过高时，生长就开始减缓或衰退。说明当 pH 增大，菌体生长环境中质子氢减少，电子供体迅速耗尽，于是生长周期缩短；当 pH 降低，硫化物主要以 H₂S 形式存在，它产生了明显的毒性和产物抑制，所以菌体生长缓慢；由于上述两种作用，分离菌在 pH6.0~6.5 范围的生长代谢繁殖活动最为良好。

5.3.2 温度对分离菌生长的影响

根据实验 4.1.3.4，测得数据如图 5.5

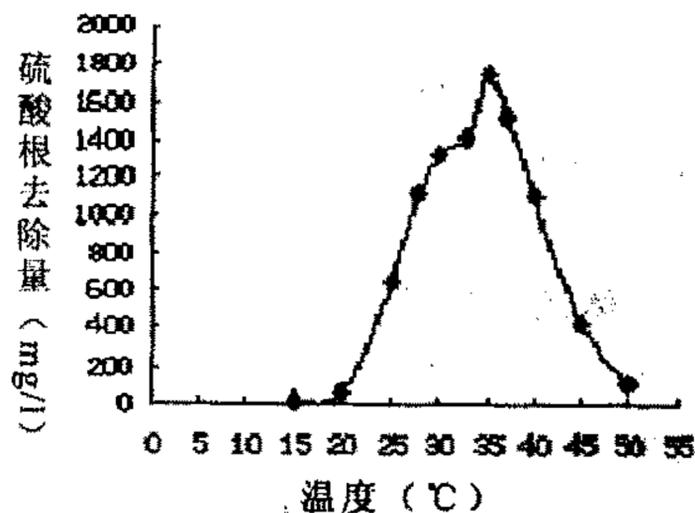
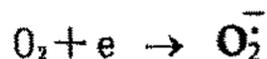


图 5.5 温度对分离菌生长的影响

由图 5.5 可见，分离菌属于中温菌，生长温度为 25℃~45℃，最适生长温度为 35℃，此时分离菌生长代谢活动最为旺盛，硫酸根还原量也最高，本实验对分离菌的培养放大采用 35℃ 环境条件。

5.3.3 氧气对分离菌生长的影响

把菌液接入固体分离培养基培养 2 天后，在试管中下部（严格厌氧处）出现黑色沉淀；3~4 天后，在试管上部以及培养基表面固气接触处（有少量氧气），也有黑色沉淀生成。说明分离菌属于兼性耐氧型微生物（并非严格厌氧），能够耐受少量氧气的存在，可能是分离菌细胞体内有去除有害活性氧机制^[33]；超氧阴离子自由基 O_2^- 是活性氧形式之一，在细胞中可破坏各种生物高分子和细胞膜，也可形成其他活性氧化物，故对生物体十分有害。超氧阴离子自由基可由酶促（如黄嘌呤氧化酶）或非酶促方式进行，即：



而兼性耐氧菌存在下列途径： $2 O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 \xrightarrow{\text{过氧化氢酶}} H_2O + \frac{1}{2} O_2$

所以可以去除超氧阴离子自由基等各种有害的活性氧。分离菌中也有类似的酶系以及代谢途径存在。而且本实验也确定了分离菌有过氧化氢酶活性(5.3.4)。

5.3.4 过氧化氢酶的检测

实验 4.1.3.6 中，发现有气泡出现，说明分离菌具有过氧化氢酶。从而也说明分离菌细胞体内去除有害活性氧机制存在的可能性。

5.3.5 分离菌对不同供氢体的利用情况

在不含有机物的分离培养基中分别添加各种碳源后，用 PbAc 试纸测 H_2S 的产生，结果为如表 5.2。

表 5.2 分离菌对不同碳源利用情况

碳源	甲醇	乙醇	乙酸	乳酸	丙酸	葡萄糖	苯酚	脂肪酸 (C ₆)
结果	++	+++	—	++++	—	+	—	—

“+”：生长(+的数量正比于 PbAc 试纸变黑的程度)；“—”：不生长

如表可见加入甲醇、乙醇、乳酸、葡萄糖的培养液中产生 H_2S ，而加入乙酸、丙酸、苯酚、脂肪酸 (C₆) 的培养液中未产生 H_2S 。说明分

离菌在硫酸盐异化作用过程中，能以甲醇、乙醇、乳酸、葡萄糖等有机物作为电子供体，进行硫酸盐的还原转化。而且根据 H₂S 产生速度和数量，可以看出分离菌对不同电子供体的利用速率为：乳酸 > 乙醇 > 甲醇 > 葡萄糖，而对乙酸、丙酸、苯酚、脂肪酸 (C₆) 则不能利用。根据上述实验结果及细胞形态等特征，参考伯杰氏细菌鉴定手册^[43]，可将分离菌初步鉴定为脱硫弧菌属细菌。

5.3.6 培养基中无机盐成分的正交优化试验

这项实验为了确定培养 SRB 的培养基的最佳组成成分。确定最佳培养基成分有助于 SRB 的生长。

通过实验 4.1.3.8，可得结果如表 5.3

表 5.3 正交试验的极差分析

培养基成分水平	CaCl ₂	KH ₂ PO ₄	NH ₄ Cl	MgSO·7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄	KCl	NaCl	MgCl ₂ ·6H ₂ O
I	1.2	0.759	0.899	0.772	0.9	0.862	1.095	1.162
II	1.709	0.496	0.890	1.016	1.051	1.072	1.368	1.131
III		1.654	1.12	1.121	0.958	0.975	0.146	0.616
极差	0.057	0.193	0.039	0.06	0.025	0.035	0.184	0.091

通过表 5.3 的极差分析可见，KH₂PO₄ 和 NaCl 这两组因素在不同水平下所产生极差（分别为 0.193 和 0.184）远大于其余各组因素在不同水平下所产生的极差（0.02~0.09），从而说明 KH₂PO₄ 和 NaCl 对细胞生长的影响最大。这是因为 KH₂PO₄ 在硫酸盐异化还原过程中能提供质子氢，在电子传递链中起着重要作用，菌株生长对其需要量就较高；而 NaCl 的浓度不能太高或太低，是由于它可以调节细胞内外的电解质平衡。其余几种无机盐成分含量大小对细胞生长并无显著影响。

另外可以根据分析数据确定 SRB 的无机盐培养基成分。具体配比关系如下：

KCl 0.3g/l MgSO₄·7H₂O 3.0g/l MgCl₂·6H₂O 2.5g/l
 NH₄Cl 0.5g/l NaCl 1.0 g/l KH₂PO₄ 0.6g/l (NH₄)₂SO₄ 0.5g/l

5.3.7 Fe²⁺对分离菌生长的影响

通过测定各培养液中硫酸根去除量，可得到如下结果（图3）

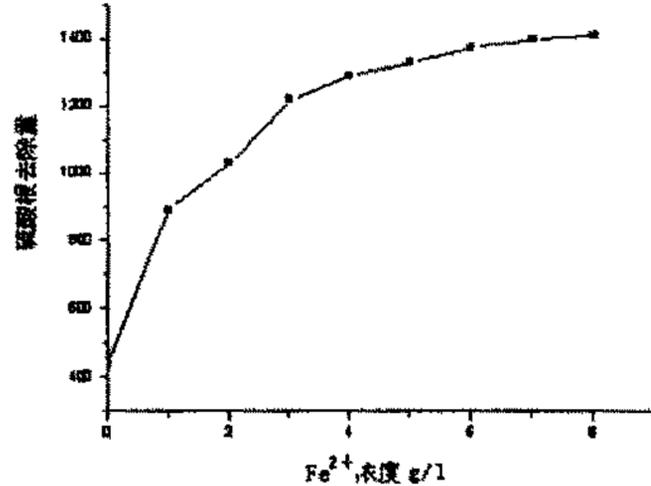


图 5.5 Fe²⁺对分离菌生长的影响

说明 Fe²⁺作为细胞中各种酶（如细胞色素 C₃, 铁还原酶, 过氧化氢酶等）的活性基成分, 对分离菌生长起着显著的促进作用; 而且它可以和培养液中的硫化物结合生成 FeS 沉淀, 减少硫化物对细胞的毒性以及对代谢反应的产物抑制。所以 Fe²⁺加入与否, 对菌体的生长有很大影响。随着 Fe²⁺浓度的增大, 硫酸根去除量增多, 细胞生长代谢活动更加旺盛, 当 Fe²⁺浓度达到 3~4g/l 以后, 细胞生长对 Fe²⁺的需要达到了饱和程度, 此时再增大 Fe²⁺的浓度对细胞生长并无明显的促进作用。

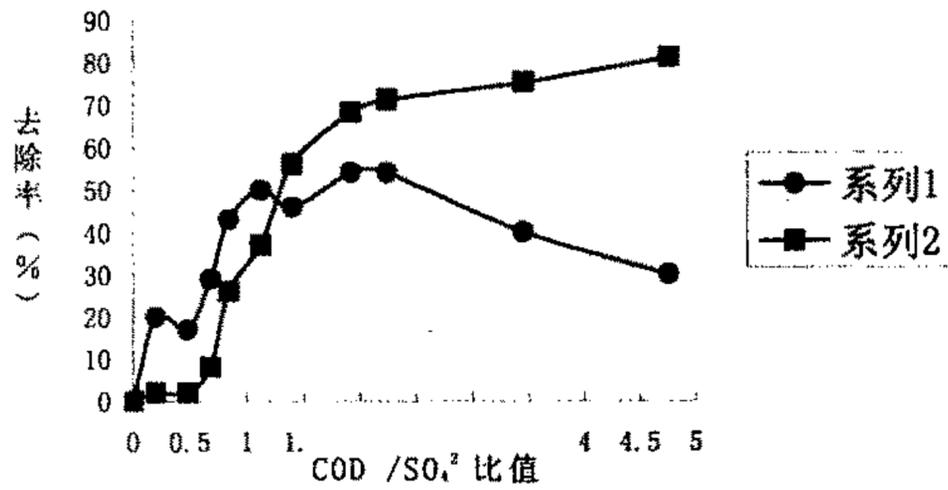
5.3.8 COD 浓度对分离菌生长及 COD, SO₄²⁻去除率的影响

由实验 4.1.3.10, 所得数据如表 5.6

表 5.6 有机碳源 COD 与 SO_4^{2-} 在硫酸盐还原中的关系

序列号	初始 COD (mg/l)	初始 SO_4^{2-} 含量 (mg/l)	初始 COD/ SO_4^{2-}	5d 后 COD (mg/l)	5d 后 SO_4^{2-} 含量 (mg/l)
1	0	2500	0	0	2500
2	500	2500	0.2	400	2460
3	1200	2500	0.48	1000	2450
4	1700	2500	0.68	1200	2310
5	2100	2500	0.84	1200	1850
6	2800	2500	1.12	1400	1570
7	3500	2500	1.40	1900	1100
8	4800	2500	1.92	2200	790
9	6100	2500	2.24	2800	720
10	8500	2500	3.45	5100	630
11	12000	2500	4.76	8500	480

由此可得不同 COD/ SO_4^{2-} 对分离菌的硫酸盐还原能力和 COD 去除率的影响 (图 5.6):

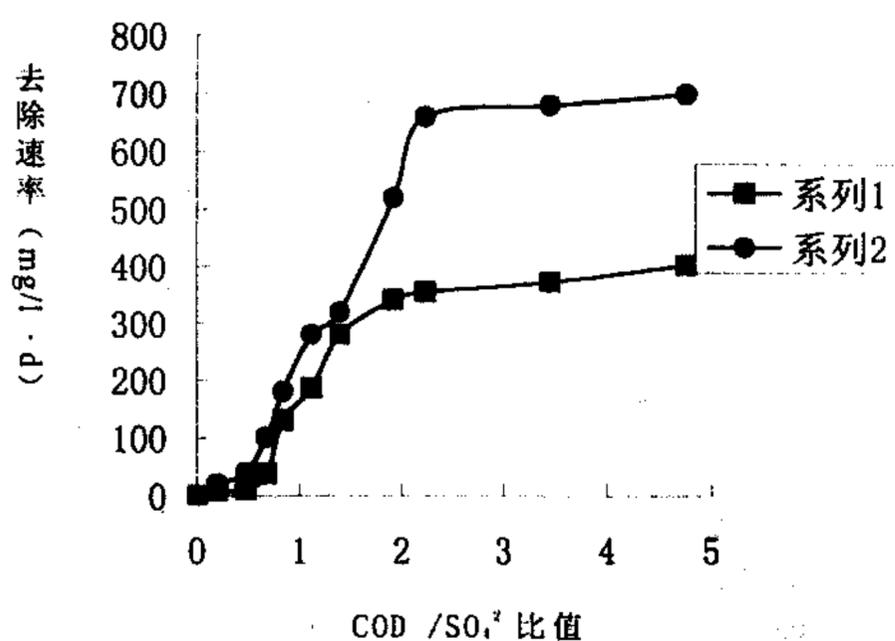


系列 1: COD 去除率; 系列 2: SO_4^{2-} 去除

图 5.6 不同 COD/ SO_4^{2-} 比值对硫酸盐还原量和 COD 去除率的影响

由上图可得结论： i .COD /SO₄²⁻比值越大，硫酸盐还原反应进行得就越彻底，硫酸盐还原率越高. ii . COD /SO₄²⁻在 2.0~2.5 之间，COD 还原率较高 (> 50%). iii. COD /SO₄²⁻比值虽然越大，硫酸盐还原率越高，但是当 COD/SO₄²⁻比值大于 2.5 以后，该比值对硫酸根还原率的影响逐渐变小. iv . 由于硫酸盐还原异化作用中是在 SRB 体内进行 [37. 50. 51]，COD 和 SO₄²⁻要渗透到细菌体内才能进行，COD 和 SO₄²⁻的渗透能力不同，使 COD/SO₄²⁻比值在体内要比体外低，所以体外 COD/SO₄²⁻所要求的比值与理论值不同，需要超过理论值 0.67，在本实验中，我们采用 COD /SO₄²⁻为 2.0~2.5 的条件。

同时，根据表 5.6 的实验组，可以得出在 SO₄²⁻浓度相等的时候，由于 COD 的不同而对 COD，SO₄²⁻去除速率（平均速率）所产生的影响，如图 5.7。



系列 1: SO₄²⁻ 去除率; 系列 2: COD 去除

图 5.7 不同浓度的 COD 对 SO₄²⁻与 COD 平均去除速率的影响

有上图可见，随着 COD 浓度的提高， SO_4^{2-} 与 COD 平均去除速率逐渐增大，但是当 COD / SO_4^{2-} 比值大于 2.0 以后， SO_4^{2-} 与 COD 平均去除速率增幅变小。这是因为在固定 SO_4^{2-} 浓度下，分离菌对其电子供体 COD 的需求有一个饱和值，在达到此饱和值前，COD 浓度的增加促进分离菌的生长，从而提高 SO_4^{2-} 与 COD 去除速率，当 COD 浓度达到饱和值后，COD 的增加不再对分离菌的生长起促进作用，所以 SO_4^{2-} 与 COD 去除速率不再增加。在本实验中，该饱和值为 5000~7000mg/l (COD/ SO_4^{2-} 比值为 2.0~2.5)。

5.3.9 硫酸根消耗量随分离菌生长时间的变化

由实验 4.1.3.11 结果，可得图 5.8

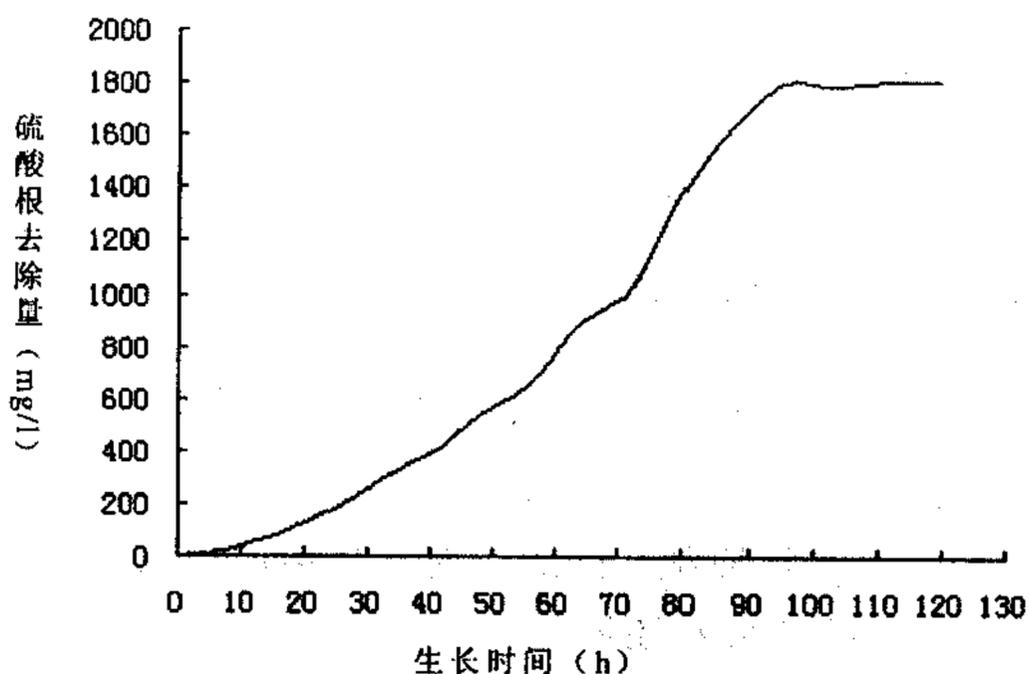
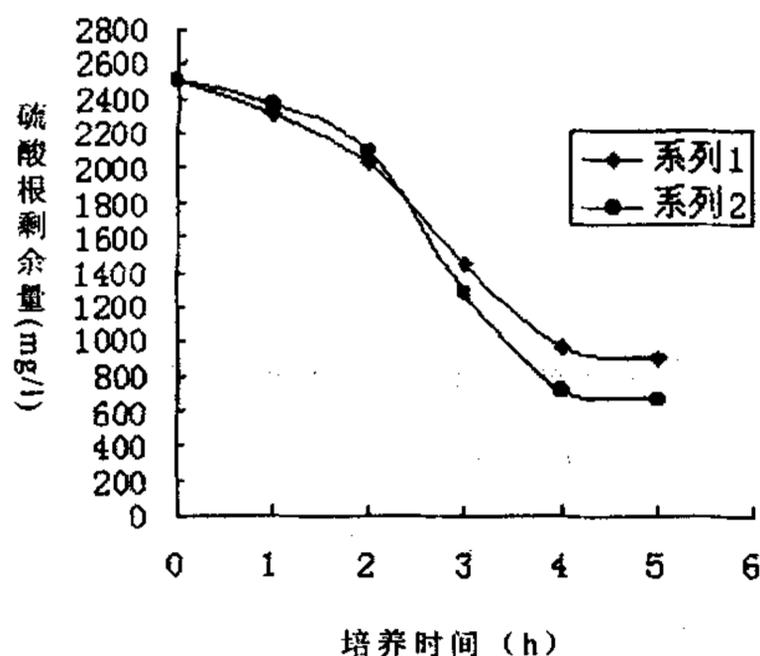


图 5.8 分离菌生长过程中硫酸根的消耗量

由上图可以看出，分离菌在最适条件下 (pH6.5, 温度 35℃, COD 浓度 5000mg/l), 生长很快, 2~4 天内生长达到高峰期, 细胞繁殖代谢活动旺盛, 硫酸根迅速消耗, 4 天以后, 生长繁殖活动减弱甚至停止, 硫酸根基本不消耗. 所以培养时间不宜太长, 因为 4~5 天后, 分离菌已经基本停止生长, 硫酸根离子也不会继续被还原。因此在实验中, 对 SRB 的培养时间应该以 3~5 天为宜。

5.4 在厌氧反应器中分离菌生长情况

通过实验 4.1.4, 对厌氧反应器和容量瓶中的 SRB 厌氧培养 5 天, 并且每隔一天分别取样测试两种培养液中硫酸根含量。可得图 5.9



系列 1: 常规厌氧培养 系列 2: 厌氧反应器培养

图 5.9 分离菌在常规厌氧培养和厌氧反应器培养中硫酸根还原能力的比较

由上图可看出, 在厌氧反应器中, 由于 N_2 对反应液中的 H_2S 进行吹脱, 减少了 H_2S 对分离菌细胞的毒害, 并且在一定程度上有效消除了 H_2S 所产生的产物抑制, 因此, 对分离菌的生长起了促进作用, 从而提高了分离菌的硫酸盐还原能力。

5.5 绿硫细菌和紫硫细菌的分离筛选

5.5.1 绿硫细菌和紫硫细菌的菌落形态

绿硫细菌: 约培养一周后, 固体培养基上出现绿色圆形菌落, 直径 1~2mm, 表面湿滑, 易挑取。

紫硫细菌: 约一周后, 固体培养基上出现红褐色的圆形菌落, 直径约 0.5mm, 表面湿润, 周遍光滑。

5.5.2 绿硫细菌和紫硫细菌的细胞形态

均为卵圆形单细胞，细胞大小为 $0.5\sim 1.0\times 1.0\sim 2.0\mu\text{m}$ 。革兰氏阴性。菌悬液分别为绿色和红棕色。镜检发现部分细胞内具有折光颗粒（硫粒）存在。

5.5.3 绿硫细菌和紫硫细菌的分离培养结果讨论

分离菌(绿硫菌和紫硫菌)从菌落特征，细胞形态上均与资料文献中所阐述的绿硫和紫硫菌的特征^[5]一致。同时分离菌能够在较高浓度的 H_2S 环境中(约 $300\text{mg}/\text{l}$)生长繁殖，说明了分离菌在代谢过程中利用并且转化 H_2S 的可能性，如果能够进一步证明光镜下所看到的折光颗粒是硫粒，则可以确定分离菌氧化 H_2S 为单质硫的能力，从而进一步摸索其生理特性及生长代谢途径。

H_2S ，S 等硫形态的分析方法可用现代极谱法，离子选择性电极和库仑分析技术等^[52]。

结论

本研究从垃圾渗滤液湿法烟气脱硫—微生物硫转化互补体系出发, 重点在于硫酸盐还原菌的分离纯化, 并对其生物学特性进行了详尽的研究, 同时也致力于光合细菌中的硫氧化细菌: 绿硫细菌和紫硫细菌的分离筛选. 得到了以下结论:

1. 从硫酸厂废水淤泥中分离筛选出了一株 SRB, 其菌体形态呈弧状或细杆状, 成熟细胞大小 $0.4\sim 0.6\times 3.0\sim 5.0\mu\text{m}$, 摇摆式运动, 单极生鞭毛, 芽孢染色阴性, 革兰氏染色阴性。
2. 从府南河污水滞水层水样中筛选出光合细菌中的硫氧化细菌——绿硫菌和紫硫菌, 该两株菌均为卵圆形单细胞, 细胞大小为 $0.5\sim 1.0\times 1.0\sim 2.0\mu\text{m}$, 革兰氏阴性。菌悬液分别为绿色和红棕色。
3. 分离菌 SRB 属于中温菌, 最适生长温度为 35°C ; 最适生长 pH $6.0\sim 6.5$; 体内含有过氧化氢酶, 适量氧气不会影响菌体生长。
4. 分离菌 SRB 在硫酸盐异化作用过程中, 能以甲醇、乙醇、乳酸、葡萄糖等有机物作为电子供体; $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}$ 比值越大, 硫酸盐还原率越高, $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}$ 在 $2.0\sim 2.5$ 之间, COD 还原率较高 ($> 50\%$)。在本实验中, 我们采用 $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}$ 为 $2.0\sim 2.5$ 的条件, 此时 COD 去除率在 55% 左右, SO_4^{2-} 去除率在 70% 以上。
5. 对分离菌 SRB 的无机盐培养基配方进行了正交优化, 确定了最佳配方, 并且发现 KH_2PO_4 和 NaCl 对菌体细胞生长的影响最大; 考察了 Fe^{2+} 对分离菌生长的影响, 随着 Fe^{2+} 浓度的增大, 细胞生长代谢活动更加旺盛, 但是当 Fe^{2+} 浓度达到 $3\sim 4\text{g/l}$ 以后, 细胞生长对 Fe^{2+} 的需要达到了饱和程度。
6. 在厌氧反应器中对分离菌 SRB 进行了放大培养, 并采用 N_2 吹脱 H_2S , 提高了硫酸盐还原率; 在最适环境条件中 (包括 pH, 温

度，培养基成分，培养条件等等)，分离菌 SRB 在培养 5 天后，可还原硫酸根 1900mg/l，还原率为 76%。

本研究论证了垃圾渗滤液湿法烟气脱硫—微生物硫转化互补体系的可行性，筛选出相应的硫酸盐转化菌。其中硫酸盐还原菌能够在高浓度的 SO_4^{2-} 和 COD 环境中生长繁殖的 SRB，并通过体内各酶系的作用将 SO_4^{2-} 还原为 H_2S ，同时降解有机碳源，使得水体中 COD 降低。同时可望通过筛选出的绿硫细菌和紫硫细菌将 H_2S 氧化为 S，防止二次污染，并且成本低廉，实现将两类污染物（烟气，垃圾渗滤液）在同一套工艺中进行互补生物处理，在产生社会效益的同时又具有一定的经济效益，体现“以废治废”的环境工程新概念。同时本研究成果为对该互补体系进一步开展相关研究提供了良好的基础。

展望

鉴于时间的关系,本研究至此,但还有以下问题,需要在以后的工作中继续研究和探讨:

1. 对分离菌 SRB 代谢机理的探讨:通过测试培养液不同时期胞内或者胞外硫形态,并且定量分析具体各还原态硫的含量^[52],确定在 SO_4^{2-} 转化成 H_2S 的过程中,到底经过了哪些步骤,同时提取出分离菌体内各还原酶,从而对 SRB 还原途径,机理进行证明与阐述^[53]。
2. 将用于烟气吸收的垃圾渗滤液尾液对分离菌 SRB 进行长期驯化,从而使分离菌能利用该尾液作为生长环境,并且能够在去除 SO_4^{2-} 与 COD 方面取得高转化率。
3. 对分离菌绿硫细菌和紫硫细菌的生物学特性进行进一步的研究,确定并提高它们氧化 H_2S 成为 S 的能力,并且摸索其生长规律。
4. 研究利用分离菌 SRB 与绿硫菌、紫硫菌的互惠共生原理使它们在垃圾渗滤液烟气吸收尾液中共生^[54, 55];即在 SRB 处理尾液的后期,将绿硫和紫硫菌接入,将 H_2S 转化为 S,从而完成 $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}$ 。

参考文献

- 1 王纬,屠传经,胡亚才.微生物烟气脱硫技术的展望.环境污染与防治,1997,19(2):28~30.
- 2 张彤,赵庆祥,朱怀兰.城市垃圾渗滤液及其生物处理对策.城市环境与城市生态,1994,7(4):44~48.
- 3 赵宇化,叶央芳.硫酸盐还原菌及其影响因子.环境污染与防治,1997,19(5):41-43.
- 4 李新荣,沈德中.硫酸盐还原菌的生态特性及其应用.应用与环境生物学报,1999,5:10-13
- 5 刘如林,刁虎欣,梁凤来,赵大建等.光合细菌及其应用.中国农业科技出版社,1991.
- 6 Martin, A.M. Biological Degradation of Wastes. First Edition, London, England. Elsevier Applied Science. 1991,207~230
- 7 宋军.城市生活垃圾填埋场渗滤液处理的工艺技术.上海环境科学,1997,16(1)17~22.
- 8 郑士民,颜望明,钱新民.自养微生物.科学出版社,1983.
- 9 俞敦义,彭芳明等.环境对硫酸盐还原菌生长的影响.材料保护,1996,29(2),1-3.
- 10 李亚新,苏冰琴.硫酸盐还原菌和酸性矿山废水生物处理.环境污染治理技术与设备,2000,1(5)1-11
- 11 Jan Thomas Rosnes, Terse Torsvik, Torleiv Iien. Spore-Forming Thermophilic Sulfate-Reducing Bacteria Isolated from North Sea oil Field Waters. Applied and Environmental Microbiology, Aug,1991,2302-2307.
- 12 JOSEPH N.Boyer. End products of Anaerobic chitin Degradation by Salt Marsh Bacteria as Substrates for Dissimilatory Sulfate Reduction and Methanogenesis. Appl. And Envi. Microbiology. Dec.1986:1415-1418.
- 13 Daryl M. Mc Cartney et al.. Water Environ. Res., 1993,65:655.
- 14 Vikas Uberoi et al.. Water Environ. Res., 1995,67(3):331.
- 15 Liang chen,Liu Ming-Y,Jean Le Gall. Characterization of Electron Transfer Proteins[M]. New York: Larry L.Barton. Plenum Press,1995
- 16 陈世和,陈建华,王士芬微生物生理学原理.同济大学出版社,1991.

- 17 左剑恶, 胡纪萍. 含硫酸盐有机废水的厌氧生物处理. 环境科学, 1991, 12(3): 67~71
- 18 赵毅, 杨景亮, 任洪强, 罗人明, 刘三学. 含硫酸盐高浓度有机废水生物处理技术. 中国环境科学, 1999, 19(3): 281~284.
- 19 Selvaraj, Punjai T; Little, Mark H. Analysis of immobilized cell bioreactors for desulfurization of flue gases and sulfite/sulfate-laden wastewater. Biodegradation. 1997.8(4).227~236.
- 20 Lee, Kuoh, Sublette, Keery L, Simultaneous combined microbial reduction of sulfur and nitric oxide from a gas stream. Appl. Biochem. Biotechnol, 1991,28~29:623~634.
- 21 Sublette, Kerry L, Gwozda, Kenneth J. an economic analysis of microbial reduction of sulfur dioxide as a means of byproduct recovery from regenerable process for flue gas. Appl. Biochem. Biotechnol. 1991.28~29.635~46.
- 22 Selvaraj, Punjai T, Dasu, Badri N. Microbial process for the reduction of sulfur dioxide. U.S.5269929 A 14 Dec.1993, 7pp.
- 23 Deshmane, Vinay, Lee, Cheng Ming, Kerry I. Microbial process for the reduction of sulfur dioxide with pretreated sewage sludge and elemental hydrogen as electron donor. Appl. Biochem. Biotechnol. 1993.
- 24 Sublette, Kerry L. Microbial Reduction of Sulfur Dioxide as a means of By-product Recovery from Regenerable Process for Flue Gas Desulfurization. EPRI Bid Process of Coal. May 1-3 90, p5-49 (16).
- 25 Badri N. Dasu, Vinay Deshmane and et al. Microbial Reduction and Nitric Oxide. Fuel, Dec 93.V72, n12, p1705 (10).
- 26 Renze T. Van Houten and G. Lettinga, A Novel Reactor Design for Biological Sulphate Removal, Proc. 8th International Conf. On Anaerobic Design, Vol. 3. May 25~29, 1997, Sendai, Japan.
- 27 Renze T. et al., Biological Sulphate Reduction Using Gas- Lift Reactor Fed with Hydrogen and Carbon Dioxide as Energy and Carbon Source, Biotech. Bioeng., 1994,44(5):586~594.
- 28 Jukka A. Rintala, Sulphate-Reducing Bacteria(second edition), Cambridge

- University Press.1984.
- 29 Marre J.P. And Sstrydom Wilma F., Biological Sulphate Removal from Industrial Effluents in an Upflow Packed Bed Reactor. Wat. Res., 1987,21(2):141~146
 - 30 Gerhard Stucki et al., Biological Sulfuric Acid Transformation Reactor Design and Process Optimization, Biotech. Bioeng., 1993,41(3):303~315.
 - 31 贺延龄等.废水的厌氧生物处理, 中国轻工业出版社.1999, 34
 - 32 崔高峰, 柯建明, 王凯军. COD/SO₄²⁻值对硫酸盐还原率的影响.环境科学, 2000, 21 (4) 105~109.
 - 33 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验.高等教育出版社.1998.
 - 34 张毅, 刘可鑫等.一株嗜热硫酸盐还原菌的分离和生物学特性研究.应用与环境生物学报,1995, 1 (2): 173-180.
 - 35 赵海, 李安明, 万波, 刘克鑫.一株中度嗜盐的硫酸盐还原菌的分离及生理特性研究.应用与环境生物学报, 1995, 1 (1): 61~67.
 - 36 张小里, 刘海洪, 陈开勋, 郭生武, 陈志昕.硫酸盐还原菌生长规律的研究.1999, 29 (5): 397~403.
 - 37 崔高峰, 王伯勇, 杜高英, 王清, 许海洲.启动条件对硫酸盐还原菌活性的影响.2000, 30 (4): 382~387.
 - 38 郭爱莲, 候静芳, 黄淑菊.脱硫弧菌的分离研究, 1999, 西北大学学报(自然科学版), 25 (1): 45~49.
 - 39 国家环境保护局, 水质检测标准. 1989-12-25 批准, 水质 硫酸盐的测定 重量法.
 - 40 王玮.一株有脱硫性能细菌的分离与特性研究.上海环境科学,1997,16(12):11-13
 - 41 陈皓文.海洋硫酸盐还原菌及其活动的经济重要性.黄渤海海洋, 16(4): 65~75.
 - 42 娄隆后等.微生物在土壤养分中转化的作用.科学出版社,1962.
 - 43 Baltimore: Willams, Wilkins. Holt J G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.1990.335~346.
 - 44 北京大学数学系. 正交设计.1976.
 - 45 于忠民.污水生物处理应用微生物研究与进展.污染防治技术, 11(4): 246~

- 249.
- 46 郑士民, 庄国强, 吴志红. 细菌脱硫 (上, 下). 环境保护, 156 (10): 14~16; 156 (11): 6~7.
- 47 杨素萍, 赵春贵, 张铁, 张肇铭. 一株可利用硫化物的紫色硫细菌的分离与鉴定. 山西大学学报 (自然科学版), 17 (1), 81~85.
- 48 左剑恶, 袁琳, 胡纪萍等. 利用无色硫细菌氧化废水中的硫化物的研究. 环境科学, 16(6):7~10.
- 49 Philip Elliott, Santo Ragusa and David Catcheside. GROWTH OF SULFATE-REDUCING BACTERIA UNDER ACIDIC CONDITIONS IN AN UPFLOW ANAEROBIC BIOREACTOR AS A TREATMENT SYSTEM FOR ACID MINE DRAINAGE. Elsevier Science Ltd. Wat. Res. Vol.32, No.12, pp.3724~3730.
- 50 Young-Chae Song, Byeong-Cheon, Piak, Hang-Sik Shin and Sung-Jin La. Influence of electron donor and toxic materials on the activity of sulfate reducing bacteria for the treatment of electroplating wastewater. Wat. Sci. Tech. 1998, Vol.38, No.4-5, pp 187~194.
- 51 冀滨弘, 章非娟. 高浓度盐有机废水厌氧处理技术的进展. 中国沼气, 1999, 17 (3): 3~7.
- 52 李国刚, 齐文启. 水和废水中硫的电化学形态分析方法. 上海环境科学 1995, 14 (1): 23~27.
- 53 James M. Odom. Hydrogenase, Electrontransfer Proteins, and Energy Coupling in the Sulfate-Reducing Bacteria *Desulfovibrio*. Ann Rev. Microbiol 1984.38:551~592.
- 54 曹从荣, 柯建明, 崔高峰, 王凯军. 荷兰的烟气生物脱硫工艺. 国外科技, 2002: 38~39.
- 55 李亚新, 苏冰琴等. 生物法处理含硫酸盐酸性废水及回收单质硫工艺. 工业给排水, 2000: 28~30.
- 56 万雪松, 万海清, 朱家骅. 硫酸厂淤泥废水中 SRB 的选育及特性研究. 重庆环境科学, 2003, 25 (3): 26~28.

致谢

时至论文完成之际，首先我要感谢我的导师朱家骅教授自始至终的指导。他在论文的选题和研究方向的确定以及实验和论文期间的诸多方面都给予了指导。朱家骅教授严谨的治学态度给我以许多启迪和影响。同时我要感谢万海清副教授，从实验到论文，他对我一直严格要求，悉心教诲，给予了我很大的帮助，同时在生活上更对我非常关心，从他那里我不但学会了許多新知识，更重要的是学会了怎样去做好研究，让我受益匪浅。在此论文完成之际，特向两位老师表示最诚挚的谢意。

当然我还要感谢夏素兰教授对我一贯的关心，此外生化实验室的研究生葛长海同学，在实验中做了大量的工作，与我共同合作顺利完成实验，在此向他表示感谢。同时还要感谢父母及家人对我一贯的支持，谁言寸草心，报得三春晖。

同时感谢国家自然科学基金 No. 20076030 项目资助。

作者

2003/5/15

作者在读期间科研成果简介

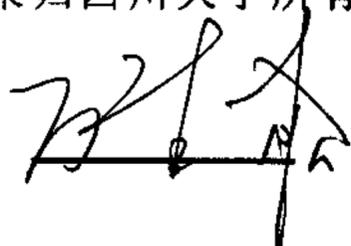
硫酸厂淤泥废水中 SRB 的选育及特性研究.重庆环境科学, 2003, 25
(3): 26~28. 万雪松, 万海清, 朱家骅.

声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得四川大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

本学位论文成果是本人在四川大学读书期间在导师指导下取得的,论文成果归四川大学所有,特此声明。

研究生:



导师:

