

一株新的反硝化短程除硫菌的鉴定及主要培养因素筛选

孙彦富, 刘晖, 刘洁萍, 周康群, 王继增, 黄淑钿

仲恺农业工程学院环境科学与工程系, 广东 广州 510225

摘要: 依据反硝化除硫原理, 以味精废水污泥为种泥, 利用全混流反应器富集并分离出同步反硝化短程除硫菌 (SNB1), 采用传统与现代分子生物学相结合的手段对其鉴定, 以确定其分类地位; 同时对SNB1的主要培养因素 (营养和环境) 进行筛选。结果表明: SNB1的形态特征及生理生化指标与 *Thauera selenatis* 最相似, 同源性达99.0%, 属短杆菌属, 尚无中文命名; 生理生化指标、富集条件及富集过程物料平衡显示SNB1是一株兼性厌氧反硝化除硫菌; 培养SNB1的最佳碳源为蔗糖, 最佳氮源为蛋白胨, 最佳培养温度为35 °C, 最适宜pH范围为7~9; 最佳条件培养时, OD₆₅₀和对数细菌数量 (CFU) 呈直线相关, 相关系数 $R^2=0.981$ 。

关键词: 反硝化除硫; 反硝化短程除硫菌; 生长因素

中图分类号: X703

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2009) 06-2091-07

随着工农业的迅速发展, 水体环境的污染也越来越严重。许多工农业废水中同时含有 S^{2-} 、 NO_3^- 和有机物, 其中 S^{2-} 是造成水体发黑发臭的重要因素之一, 因此寻求一种可同时去除 S^{2-} 、 NO_3^- 和有机物的处理工艺具有十分重要的环境意义。

生物法除硫 (S^{2-}) 因其运行费用低而倍受青睐。当前国内外一些研究人员开展了生物同步脱氮除硫的研究, 但多集中在同步反硝化全程除硫工艺 ($S^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$), 而同步反硝化短程除硫工艺 ($S^{2-} \rightarrow S^0$)^[1], 因其同时还具有回收单质硫的潜力也开始受到重视。Sergey Kalyuzhnyi 等^[2]采用 H_2S 将硝酸 (HNO_3) 还原为亚硝酸 (HNO_2), 并自身氧化为 H_2SO_4 的过程来处理食品发酵废水; Eleni Vaio-poulou等^[3]提出采用自养型反硝化菌去除石油化工厂污水的 S^{2-} ; Yan-Ling Ma等^[4]通过固定在不同载体上的脱氮硫杆菌去除 H_2S ; 荷兰一家公司设计了一套反硝化除硫工艺^[5]; Jesús Reyes-Avila等^[6]也开展了短程除硫反硝化脱氮处理炼油废水的工艺研究, 其通过驯化的活性污泥同步去除了废水中的氮、有机物和 S^{2-} ; Krishnakumar等^[7]提出一些微生物能够以硝酸盐为电子受体将硫化物氧化成单质硫; 姜国芳等^[8]研究氧化硫硫杆菌 (*Thiobaeterium thiooxydans*) 的除硫活性, 表明氧化硫硫杆菌具有处理含 S^{2-} 工业、矿业废水并回收 S^0 和金属特性; 杨秀山等^[9]的研究证明脱氮硫杆菌以较大数量、较高的转化 S^{2-} 和还原 NO_3^- -N为 N_2 的潜力存在于ANANOX系统缺氧相中; 王爱杰等^[10-11]进行了反硝化短程除硫新工艺的初探, 并对脱氮硫杆菌纯菌株进行研究, 得出脱氮硫杆菌能以 NO_3^- -N为电子受体将 S^{2-} 氧化为

S^0 , NO_3^- -N则被还原为 N_2 的结论; 李军^[12]提出氧化硫硫杆菌具有反硝化脱氮作用。反硝化短程除硫相对全程工艺具有以下优点: (1) 可以进一步节省耗氧量; (2) 可进一步缩短反应时间, 减少占地面积和 CO_2 排放量; (3) 可解决出水 SO_4^{2-} 质量浓度高、pH值低的问题; (4) 同时产生的 S^0 沉积于泥中有利于回收利用。因此反硝化短程除硫技术是一种高效、低耗、节能的新技术。

本研究依据同步反硝化除硫原理, 采用全混流反应器富集、筛选、分离和鉴定反硝化短程除硫菌, 并对反硝化短程除硫菌的主要培养因素进行筛选, 为富集、分离高效短程反硝化除硫菌, 提高反硝化除硫过程的效率, 开发高效节能低耗的反硝化除硫工艺和工程应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验反应装置

1.1.1 连续式强化反硝化短程除硫装置

有效容积 10 L 的连续式反应器, 蜡封口保持厌氧状态, 黑布包裹防止光化细菌作用, 内设机械搅拌器保证活性污泥处于悬浮状态 (见图 1)。反应器搅拌速度 $45 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, pH 为 8.0~8.5, 水力停留时间 2 天, 回流污泥泵回流污泥 $1 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.1.2 人工模拟试验废水

试验废水配方见表 1^[6], 表 2^[6]。

1.2 供试材料

1.2.1 菌种来源

取广州奥桑味精厂 A/O 工艺的沉淀池污泥与自来水混合至 9 L 并加入全混流反应器内, 再加入表 1 和表 2 中的两种试验模拟废水各 0.5 L

基金项目: 广东自然科学基金科学基金项目 (06022869; 07003251); 广州市海珠区科技计划项目 (2007-Z-023); 广东省教育厅资助项目 (LYM08067)

作者简介: 孙彦富 (1963 年生), 男, 高级工程师, 主要从事环境微生物学和水处理技术的研究。E-mail: sunyanfu@126.com

收稿日期: 2009-09-09

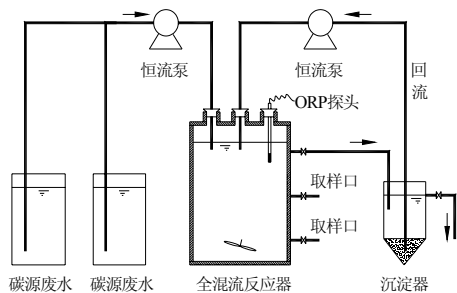


图1 短程除硫反硝化脱氮连续流装置
Fig.1 Continuous flow device of denitrifying and short-cut sulfide removal

表1 人工模拟碳源废水

Table 1 Artificial wastewater of carbon source

名称	基质质量浓度/(g·L ⁻¹)
CH ₃ COONa	12.4
Na ₂ S·9H ₂ O	13.5~32
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.0

表2 人工模拟氮源废水

Table 2 Artificial wastewater of nitrogen source

名称	基质质量浓度/(g·L ⁻¹)
NaNO ₃	7.6
KH ₂ PO ₄	1.5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.03
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.45
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.48
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05

(MLSS=3500~4000 mg·L⁻¹, ORP=-65~-250 mV, SV=10%~20%, pH=8.0~8.5) 连续搅拌活化 24 h, 然后利用恒流泵以 2.5 L·d⁻¹ 的流量同时将两种废水打入全混流反应器内, HRT 为 2 d, 全混流反应器的温度控制在 24~25 °C, 工艺流程为: 进水→厌氧→沉淀(污泥回流)→排放, 试验过程分三个阶段共运行 105 天, 每 7 天提高一次 S²⁻-S (或同时提高 NO₃⁻-N) 的进水质量浓度。第一阶段, 保持 NO₃⁻-N 的进水质量浓度(335 mg·L⁻¹) 不变, 使 S²⁻-S 的进水质量浓度分别为 5、10、20、40、80 mg·L⁻¹ (S/N 分别为 0.015、0.030、0.060、0.119、0.238), 全段共运行 35 天, 目的是淘汰不适应新环境的菌群和总体增殖适应新环境的菌群, 为第二阶段中等 S²⁻-S 质量浓度下富集除硫反硝化菌做准备。第二阶段, 同时改变进水 S²⁻-S 和 NO₃⁻-N 的进水质量浓度, 使 S²⁻-S 的进水质量浓度分别为 104、135、176、228、297 mg·L⁻¹, 而 NO₃⁻-N 的进水质量浓度分别为 518、701、884、1067、1250 mg·L⁻¹, 全段共运行了 35 天且 S/N 保持为 0.238, 目的是逐渐淘汰不耐 S²⁻-S 细菌同时增殖耐 S²⁻-S 细菌(其中包括除硫反硝

化菌)。第三阶段, 保持 NO₃⁻-N 的进水质量浓度不变(1250 mg·L⁻¹), 使 S²⁻-S 的进水质量浓度分别为 386、502、653、848、1103 mg·L⁻¹ (S/N 分别为 0.309、0.402、0.523、0.679、0.883), 全段共运行了 35 天。目的是稳定第一、二阶段富集的除硫反硝化菌并使其快速增殖。

本试验采用第三阶段的质量浓度梯度的污泥(S/N 比为 0.883、NO₃⁻-N 的去除率为 95.8%, S²⁻-S 的去除率为 100%), 将其分离纯化后得到反硝化短程除硫菌, 暂命名为 SNB1。

1.2.2 SNB1 的液体培养基配方

表 3 包含 SNB1 的液体培养基配方和培养条件。

1.2.3 SNB1 主要培养因素筛选液

主要培养因素的筛选均以表 3 中的培养基为基础, 且下一步筛选是以上一次筛选出的最佳结果为前提。

表3 液体培养基配方

Table 3 Composition of liquid medium

组成成分	培养基质量浓度/(g·L ⁻¹)
NaNO ₃ (氮源)	1.5
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
KCl	0.5
酵母膏	1.0
蔗糖(碳源)	30
蒸馏水	1000 mL
pH	7
温度	25 °C

(1) 最佳碳源筛选培养基: 调整表3中碳源分别为葡萄糖(30 000 mg·L⁻¹)、蔗糖(30 000 mg·L⁻¹)和乙酸钠(30 000 mg·L⁻¹)而得三种试验液体培养基。

(2) 最佳氮源筛选培养基: 调整表3中的氮源分别为硝酸钠(1 500 mg·L⁻¹)、氯化铵(1 500 mg·L⁻¹)、蛋白胨(1 500 mg·L⁻¹)和硫酸铵(1 500 mg·L⁻¹)而得四种试验液体培养基。

(3) 最佳初始pH筛选培养基: 调整表3中pH分别为7、8、9和10而得四种试验液体培养基。

(4) 最佳培养温度筛选培养基: 培养基采用表3中的配方, 碳源、氮源和pH均为最佳条件, 培养温度分别为5 °C、20 °C、25 °C、35 °C、38 °C。

(5) 最佳培养时间筛选培养基: 培养基采用表3中的配方, 碳源、氮源、pH和温度均为最佳条件。

1.3 试验方法与步骤

1.3.1 SNB1菌株的分离

将 1.2.1 的种泥接种于 1.2.2 的培养基中进行分离与纯化。将最佳稀释度平板上单一菌落经过 2~3

次平板划线纯化得单菌株，将单菌株转接于牛肉浸膏液体培养基中进行保存。

1.3.2 SNB1 菌株显微形态观察^[13-15]

将幼龄菌落进行革兰氏染色，并通过 100×10 倍的光学显微镜观察颜色和形态。

1.3.3 SNB1 菌株的生理生化指标

革兰氏染色、产氨试验、氧化酶试验、接触媒试验、葡萄糖氧化发酵试验、吲哚、耐盐等主要生化特性试验^[13-15]。

1.3.4 DNA 提取、PCR 扩增、基因序列比对及进化树构建

对获得的培养物进行离心收集沉淀，用 TE 缓冲液 (pH = 8.0) 洗涤，通过溶菌酶裂解和冻融步骤裂解细胞，以 SDS 和酚/氯仿提取基因组 DNA^[16]。16S rRNA 基因扩增采用寡聚核苷酸引物 27 f 和 1522 r^[17]。PCR 扩增程序：94 °C 预变性 4 min，94 °C 变性 1 min，55 °C 复性 1 min，72 °C 延伸 2 min，30 个循环，最后 72 °C 延伸 7 min。扩增产物送广东省微生物研究所测序。所得 16S rDNA 基因序列，在 GenBank 数据库中进行 BLAST 序列的相关性搜索^[18]。同时利用相关种属的 16S rDNA 序列，构建系统发育树。序列对排用 CLUSTAL X1.83^[19]进行多序列匹配排列，进化树的构建用 Neighbour-joining 方法。进化树分枝模式的稳定性用 PHYLIP 软件包中的 SEQBOOT 和 CONSENSE 进行 Bootstrap 分析，重复 1000 次，计算各分支的支持度。

1.3.5 SNB1 主要培养因素筛选方法

在无氧条件将活化后的 SNB1 洗入无菌水中，并调整 SNB1 菌液使 OD₆₅₀ (波长 650 nm) 至 0.35 左右，再分别移一定量的 SNB1 菌液至 1.2.3 SNB1 主要培养因素筛选液中，并密封后恒温振荡培养，一定时间间隔取样进行标准平板菌落计数或测定 OD₆₅₀。

1.4 标准测定方法

标准平板菌落计数法；OD 值法采用分光光度法；pH 值 (98127 手持式 pH 计)。

2 结果与讨论

2.1 SNB1 菌株的形态观察及生理生化指标

由 1.3.1 得到的菌株镜检发现菌体形态单一，琼脂培养基 24 h 后，菌落形态为圆形，菌落表面光滑半透明，边缘整齐，淡黄色，菌落直径为 1~2 mm。肉汤培养沉淀性混浊，在 100×10 倍的显微镜下观察，革兰氏阴性，短杆菌长约 5 μm (见图 2)。生理生化指标试验结果见表 4。

2.2 SNB1 的 16S rDNA 基因的序列及系统发育分析

细菌的菌落形态、菌落扩展方式、革兰氏染色、及其各项生理生化指标是确定其分类地位的重要依据。16S rDNA 基因序列是细菌分类的重要参考标

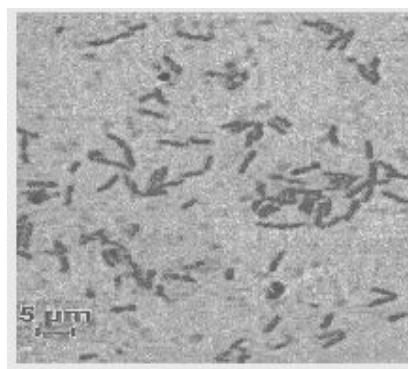


图 2 SNB1 的形态图

Fig.2 Morphology micrograph of SNB1

表 4 SNB1 菌主要的生理生化特性

Table 4 Main physiological and biochemical characteristics of SNB1

测试项目	测试结果	测试项目	测试结果
菌落形态	菌落表面光滑半透明，边缘整齐，淡黄色	亚硝酸盐还原	阳性 (+)
肉汤培养	沉淀性混浊	反硝化	阳性 (+)
革兰氏染色	革兰氏阴性杆状菌	产氨	阴性 (-)
厌氧生长	厌氧条件下能生长，为兼性厌氧菌	吲哚	阴性 (-)
葡萄糖氧化发酵	非发酵型	柠檬酸利用	阳性 (+)
接触酶	阳性 (+)	酪素水解	阴性 (-)
氧化酶	阳性 (+)	淀粉水解	阴性 (-)
V-P 测定	阴性 (-)	脲酶	阴性 (-)
明胶液化	阴性 (-)	果糖	阳性 (+)
硝酸盐还原	阳性 (+)	核糖	阳性 (+)
硫化物氧化	阳性 (+)	乙醇	阳性 (+)
甲基红	阴性 (-)	乙酸钠	阳性 (+)
葡萄糖	阳性 (+)		

准。根据细菌形态、生理生化指标、培养特征和测序结果，采用 BLAST 将 SNB1 长 1431 bp 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已登录的基因序列进行比对，根据 SNB1 的 16S rDNA 序列与 *Thauera* (陶厄氏菌属) 的 9 个菌种的 16S rDNA 序列做出系统进化树 (见图 3)。结果表明，SNB1 与 *Thauera mecher-nichensis* 同源性高达 99.4%，与 *Thauera selenatis* (至今尚无中文命名) 同源性达 99.0%，其生理生化指标与 *Thauera selenatis* 最相似，是一株兼性厌氧反硝化除硫菌。

一方面，生理生化指标显示 SNB1 的反硝化、亚硝酸还原、硝酸盐还原试验均为阳性、产氨试验为阴性，硫化物氧化为阳性，从生理生化角度可推断它是一株兼性厌氧反硝化除硫菌。另一方面，SNB1 源于第三阶段连续式反硝化短程除硫装置，取样条件为：S/N 为 0.883，ORP 为 -253 mV，S²⁻、NO₃⁻、COD、SO₄²⁻ 去除率分别为 100%、95.8%、88.84%、46.47%，且无 NH₄ 检出。通过文献检索，与 SNB1 同源性达 99.0% 的 *Thauera selenatis* 和

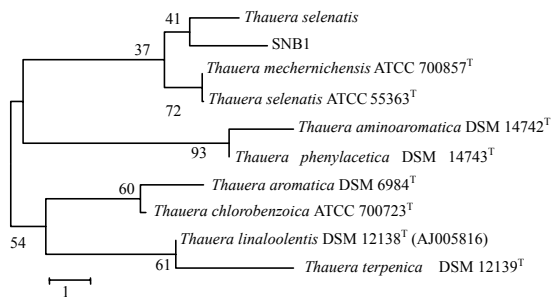


图3 SNB1 菌株的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of SNB1

99.4%的 *Thauera mechernichensis* 仅有反硝化脱氮功能的报道,但本研究 SNB1 的生理生化指标和反硝化短程除硫装置取样条件表明,SNB1 同时具有反硝化和短程除硫功能,SNB1 为一株新的同步反硝化短程除硫菌。

2.3 SNB1 的主要培养因素筛选结果及分析

2.3.1 不同碳源对 SNB1 生长的影响

可用于培养 SNB1 的碳源有多种,本试验采用较为常见的葡萄糖、蔗糖、乙酸钠为研究对象。由图 4 可知,经三种碳源培养 48 h 的 OD_{650} 分别为 0.347、0.902、0.329;数据显示以蔗糖为碳源时,SNB1 生长效果最佳,葡萄糖次之,乙酸钠最差。糖类是一般微生物较容易利用的碳源和能源物质,但不同微生物对糖类的利用具有选择性。由于蔗糖较葡萄糖能更好地调节培养基内的渗透压,蔗糖形成的渗透压要明显低于葡萄糖,有利于传质过程的进行^[20]。

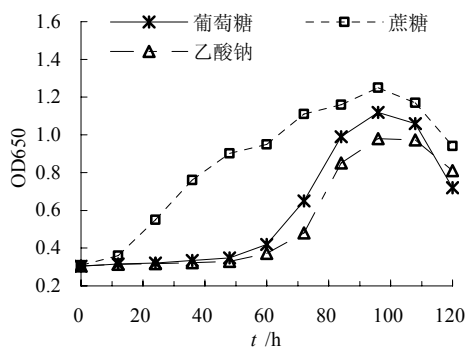


图4 不同碳源的生长曲线

Fig.4 Growth curve of different carbon sources

2.3.2 不同氮源对 SNB1 生长的影响

由图 5 可知,经三种氮源(硝酸钠、蛋白胨、氯化铵和硫酸铵)培养 48 h 的 OD_{650} 分别为 1.061、1.108、0.312、0.312。结果表明,最佳氮源为蛋白胨,硝酸钠次之,氯化铵和硫酸铵较差。

氮是细菌生长的重要元素^[20],蛋白胨、铵盐、硝酸盐和分子氮均为微生物最常用的氮源,但微生

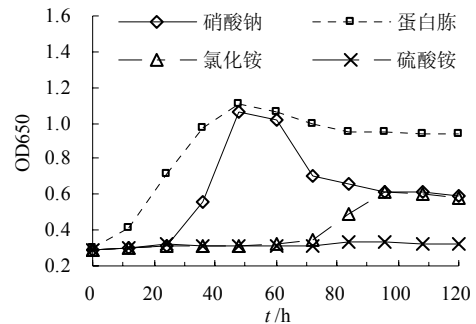


图5 不同氮源的生长曲线

Fig.5 Growth curve of different nitrogen sources

物对它们的利用是具有选择性的。从试验结果可知,蛋白胨和硝酸钠的效果接近,蛋白胨效果略好于硝酸钠,而 NH_4Cl 效果次之, $(NH_4)_2SO_4$ 效果最差。分析其原因, $NaNO_3$ 和蛋白胨分别是微生物所需的无机氮源和有机氮源,但两种氮源对微生物产生胞外多糖的影响却不同。一方面,蛋白胨有利于胞外多糖的产生,而无机氮源 $NaNO_3$ 不利于胞外多糖的获得;另一方面蛋白胨是有机氮源,由蛋白质经酶、酸、碱水解而获得的一种由胨、多肽、氨基酸组成的水溶性混合物,它是微生物培养基的最主要的基础成分且营养丰富,为大多数细菌生长所利用。而硝酸钠是单一的无机氮源,不形成多肽和氨基酸,化学成分简单,营养单一。尽管 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 等铵盐一般被称为速效氮源,许多腐生型(细菌、肠道菌、动植物致病菌)吸收利用铵盐和硝酸盐、亚硝酸盐的能力较强,其吸收 NH_4^+ 后可直接利用作为氮源^[21]。但以铵态氮作为氮源时,如 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 等都会表现出生理酸性,使得培养液的 pH 值下降,完全以 $(NH_4)_2SO_4$ 为氮源时 pH 值会小于 3.0^[22],不利于 SNB1 生长,此观点也与 2.3.3 中最佳 pH 范围筛选的结果相吻合。综上可知,SNB1 的最佳氮源是蛋白胨。

2.3.3 不同起始 pH 值对 SNB1 生长的影响

由图 6 可知,在不同起始 pH 下培养 48 h 的

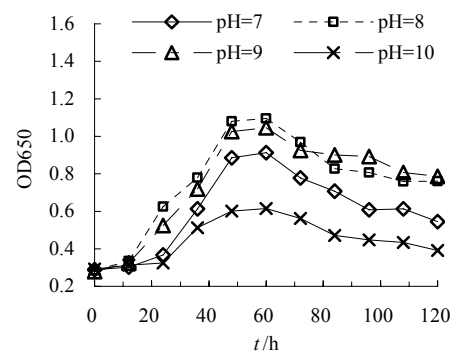


图6 不同 pH 的生长曲线

Fig.6 Growth curve of different pH

OD₆₅₀ 分别为 0.886、1.080、1.026、0.802。结果表明，当 pH 在 7~9 范围时 SNB1 菌的生长曲线十分相似，而 pH 为 10 时培养效果明显下降，表明 SNB1 的最佳生长 pH 值为 7~9 范围。

pH 对 SNB1 生命活动的影响表现为以下几个方面^[21]：一是使蛋白质、核酸等大分子所带电荷发生变化，从而影响其生物活性；二是引起细胞膜电荷变化，导致微生物细胞吸收营养物质的能力发生变化；三是改变环境中营养物质的可给性及有害物质的毒性。不同微生物对 pH 条件的要求各不相同，它们只能在一定 pH 范围内生长，即最高、最适与最低三个数值，在最适 pH 范围内微生物生长繁殖速度快，在最低或最高 pH 值的环境中，微生物虽然能生存和生长，但生长非常缓慢而且容易死亡。微生物生长的 pH 值范围极广，一般 pH 在 2~8 之间，有少数种类还可超出这一范围，事实上，绝大多数微生物都可生长在 pH 为 5~9 范围内。

在反硝化除硫工艺中，pH 过低会使水体中的硫化物以 H₂S 气体的形式逸出，过高会导致水体中微生物的死亡，活性污泥分解。Buisman^[5]等用无色硫细菌进行废水除硫研究发现，硫化物转化为单质硫的最适 pH 为 8.0~8.5，在 pH 为 6.5~7.5 时，转化率显著降低。另外，由 S²⁻转化为 S⁰的过程是一个产碱的过程，同时反硝化过程也使 pH 上升。因此随着培养时间的增加，培养液的 pH 也会上升。以上观点与本试验结果一致。

2.3.4 不同培养温度对 SNB1 菌株生长的影响

由图 7 可知，在不同温度下培养 48 h 的 OD₆₅₀ 为 0.324、0.565、0.868、1.113、0.975，表明在 35~38 °C 之间 SNB1 生长情况较好，20~25 °C 的生长情况略差，5 °C 时 SNB1 几乎不生长，在 35 °C 时生长情况最佳。

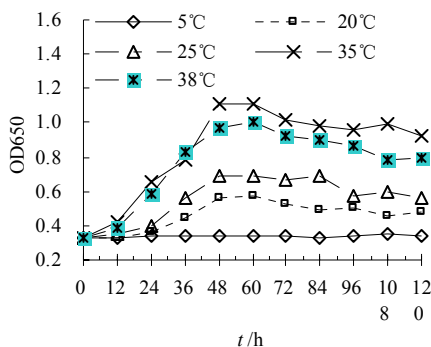


图 7 不同温度的生长曲线
Fig.7 Growth curve of different temperatures

温度对于 SNB1 的影响^[20]，可以从温度对有机体影响的有利和有害两方面加以解释。首先，当细菌在适宜的温度范围内，温度每提高 10 °C 酶促反

应速度将提高 1~2 倍，因而其代谢速率也相应的提高。当温度升高，细胞内的化学反应和酶促反应加快，生长较迅速，代谢活力增强，所以在低温时随着温度的升高，生长效果逐渐增加。但另一方面，蛋白质、核酸和细胞内的其他成分对高温都很敏感，当温度超过了有机体内的最高耐受极限时，有机体内的蛋白质、核酸等物质开始失活，特点是使生化反应顺利进行的酶发生不可逆的失活，菌体内的生化反应便不能顺利进行，并开始发生紊乱，因而代谢活力下降。因此当温度在一定范围内增加时，SNB1 的增殖和代谢活力也随之增强。本试验条件下，SNB1 的最佳生长温度为 35 °C。

2.3.5 SNB1 的最佳培养时间

细菌培养一般经历了四个阶段（延迟期、对数期、稳定期和衰亡期）。由图 8 显示，0~24 h 时段为迟缓期，24~48 h 为对数生长期，48 h 以后为稳定期和衰亡期，但两者的分界不明显。所以本试验均以 48 h 为 SNB1 的计数点。在整个培养内 OD₆₅₀ 和对数细菌数量 (CFU) 有很好的相关性 (见图 9)，

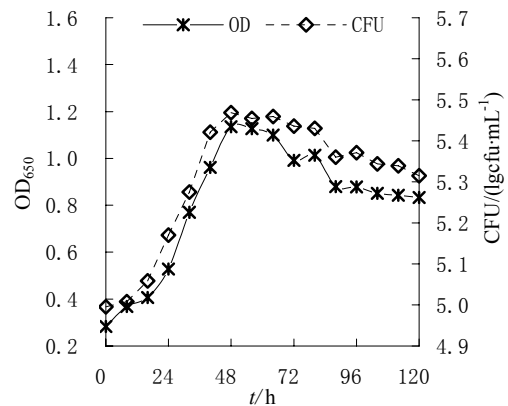


图 8 最佳条件下的生长曲线
Fig.8 Growth curve under the best condition

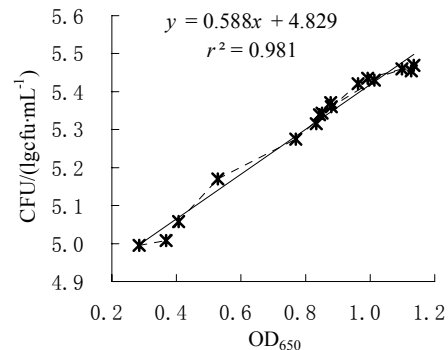


图 9 最佳条件下 OD₆₅₀ 与 CFU 相关曲线
Fig.9 Correlation curve of OD₆₅₀ and CFU under the best condition

相关系数 $r^2=0.981$ 。

因在对数生长期 OD₆₅₀ 和 CFU 的相关性很好

[23], 因此在严格控制实验条件下, 可通过 OD_{650} 来推算活菌体数以代替菌体计数方法, 也可判断细菌生长是否进入对数生长期。

3 结论

(1) 利用连续式强化反硝化短程除硫全混流反应器富集并经培养分离得到 SNB1 单菌株, 通过形态观察、生理生化指标试验、形态特征和 16S rDNA 序列同源性比较显示, SNB1 的 DNA 序列与 *Thauera mechernichensis*、*Thauera selenatis* 同源性达 99.0% 和 99.4%, 其形态特征及生理生化与 *Thauera selenatis* 最相似, 结合富集条件和物料平衡显示它是一株新的兼性厌氧反硝化除硫菌, 属短杆菌属, 目前尚未有中文命名。

(2) SNB1 分别在葡萄糖、蔗糖、乙酸钠三种碳源中生长, 生长效果最佳的为蔗糖; 硝酸钠、蛋白胨、氯化铵、硫酸铵四种氮源中, 蛋白胨为最佳; 最佳培养温度为 35 °C, 最适宜 pH 范围为 7~9。

(3) 最佳条件培养时, OD_{650} 和 CFU 呈直线相关, 相关系数 $r^2=0.981$ 。

参考文献:

- PETER J F GOMMERS, WILLEM BULEVELD, GUS KUENEN J. Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I Start-up and reactor performance[J]. *Water Research*, 1988, 22(9): 1075-1083.
- SERGEY KALYUZHNYIA, MARINA GLADCHENKO, ARNOLD MULDERB, et al. Deamox-New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite[J]. *Water Research*, 2006, 40: 3637-3645.
- ELENI VAIPOULOU, PARIS MELIDIS, ALEXANDER AIVASIDIS. Sulfide removal in wastewater from petrochemical industries by autotrophic denitrification[J]. *Water Research*, 2005, 39: 4101-4109.
- YAN LING MA, BO LUN YANG, JING LIAN ZHAO. Removal of H_2S by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on different matrices[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 2041-2046.
- EERAHIMI S. Biotreatment of SO_2 and H_2S contaminated gas streams[J]. The Netherlands: Delft University of Technology, 2005: 1-23.
- JESÚS REYES-AVILA, ELÍAS RAZO-FLORESA, JORGE GOMEZ, Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification[J]. *Water Research*, 2004, 38: 3313-3321.
- KRISHNAKUMAR B, MANILAL V B. Bacterial oxidation of sulphide under denitrifying conditions[J]. *Biotechnology Letters*, 1999, 21(5): 437-440.
- 姜国芳, 刘亚洁, 乐长高. 氧化硫硫杆菌的研究进展[J]. *生物学杂志*. 2005, 22(2): 11-13, 16.
JIANG Guofang, LIU Yajie, LE Changgao. Advances in *Thiobacillus thiooxidans*[J]. *Journal of Biolog*, 2005, 22(2): 11-13.
- 杨秀山, Garuti G, Tilche A. 厌氧-缺氧-好氧处理城市废水系统缺氧相中的脱氮硫杆菌[J]. *环境科学*, 1993, 6(12): 429-433.
YANG Xiushan, GARUTI G, TILCHE A. *Thiobacillus denitrificans* in the anoxic phase of a combined anaerobic-anoxic-oxic municipal wastewater treatment process[J]. *Environmental Science*, 1994, 6(12): 429-433.
- 王爱杰, 杜大仲, 任南琪, 等. 脱氮硫杆菌在废水中除硫、脱氮处理工艺中的应用[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2004, 36(2): 56-60.
WANG Aijie, DU Dazhong, REN Nanqi. Application of *Thiobacillus denitrificans* in wastewater denitrification and de-sulfide treatment processes[J]. *Journal Harbin Institute of Technology*, 2004, 36(2): 56-60.
- 王爱杰, 万春黎, 任南琪, 等. 一株同步脱氮除硫菌的分离鉴定及其代谢特征[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2008, 40(4): 536-539.
WANG Aijie, WAN Chunli, REN Nanqi. Identification and metabolic characterization of a strain with function of simultaneous desulfurization and denitrification[J]. *Journal Harbin Institute of Technology*, 2008, 40(4): 536-539.
- 李军, 杨秀山, 彭永臻. 微生物与水处理工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 378-382.
LI Jun, YANG Xiushan, PENG Yongzhen. *Microbiology and Water Treatment Engineering*[M]. Beijing: Chemical Engineering Press, 2002: 378-382.
- KIRSTEN S, JORGENSEN, ANNELI, et al. Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge[J]. *Anaerobe Environmental Microbiology*, 1995, (1): 161-168.
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-398.
DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. *Manual of Ordinary Systemic Bacteriology*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 353-398.
- R.E 布坎南, N.E 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 274-279.
RE Buchanan, NE Gibbons. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*[M]. Beijing: Science Press, 1994: 274-279.
- GUI X L, MAO P H, ZENG M, et al. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 357-363.
- STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*[M]. New York: Wiley, 1991.
- A ITSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool[J]. *Molecular Biology*, 1990, 215: 403-410.
- SAITOU N, NEI M. *Mol Biol Evol*, 1997, 4: 406-425.
- 顾宇飞, 罗屿, 马文涛. 温度、碳、氮、磷对一株芽孢菌生长的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(1): 86-89.
GU Yufei, LUO Yu, MA Wenyi. Effects of temperature, organic carbon, nitrogen and phosphate on the growth of bacillus sp. isolated from microcystis aeruginosa[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2006, 6(1): 86-89.
- 毛跃建, 张晓君, 张宝让. 专一性 PCR 和变性梯度胶电泳协助从焦化废水处理装置中分离优势功能菌 *Thauera* 属菌株[J]. *微生物学报*, 2008, 48(12): 1634-1641.
MAO Yuejian, ZHANG Xiaojun, ZHANG Baorang. Specific-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis assistant isolation of *Thauera* sp. from a coking wastewater treatment plant[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(12): 1634-1641.
- A ITSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment

search tool[J]. *Molecular Biology*, 1990, 215: 403-410.

[23] GOMMERS P J F, BIJLEVELD W, KUENEN J G. Simultaneous

sulfide and acetate oxidation in a denitrifying bed reactor I star up and reactor performance[J]. *Water Research*, 1988, 22: 1075-1083.

Identification and screen of main culture factors of a new denitrifying and short-cut sulfide removal bacteria

SUN Yanfu, LIU Hui, LIU Jieping, ZHOU Kangqun, WANG Jizeng^{*}, HUANG Shutian

Department of Environmental Science and Engineering, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China

Abstract: Based on denitrifying and sulfide removal principal, monosodium glutamate wastewater sludge was used as inoculum. The continuous stirred reactor was applied to enrich and isolate simultaneously denitrifying and short-cut sulfide removal bacteria (named SNB1). Traditional and modern molecular biology methods were adopted to identify and determine the taxonomic status of the strain. The main culture factors (nutrition and environment) were screened. The result shows: Morphological characteristics and biochemical characteristics of SNB1 are similar to that of *Thauera selenatis*. SNB1 has the 99.0% homology with *Thauera selenatis*. It belongs to short rod species. *Thauera selenatis* is not named in Chinese. Biochemical properties/enrichment conditions and material balance during enrichment process demonstrate that SNB1 is a kind of facultative anaerobic denitrifying and sulfide removal bacteria. The best carbon source of culture SNB1 is sucrose. The best nitrogen source is peptone. The best culture temperature is 35 °C and the best pH is 7~9 between, respectively. When culture condition is best, OD₆₅₀ and CFU (lgcfu·mL⁻¹) behave linear correlation and the correlation coefficient (R^2) is 0.981.

Key words: denitrifying and sulfide removal; denitrifying and short-cut sulfide removal bacteria; culture factor