铁元素对硫酸盐还原过程的影响及微生物群落响应

赵阳国^{1,2},任南琪^{1*},王爱杰¹,刘一威¹ (1.哈尔滨工业大学市政环境工程学院,黑龙江 哈尔滨 150090;2.中国 海洋大学环境科学与工程学院,山东 青岛 266100)

摘要:采用常规化学分析和微生物群落变性梯度凝胶电泳(DGGE)监测技术,探讨投加不同价态铁元素对硫酸盐还原过程的影响以及相应 的微生物群落动态响应.结果表明,反应器启动后5d内硫酸盐去除率达到80%,在此过程中群落条带逐渐减少,但与已分离的硫酸盐还原菌 (SRB)菌株一致的条带并没出现;Fe³⁺的投加极显著地改变了原有的高效群落结构,硫酸盐去除率降至20%,氧化还原电位(ORP)有所上升;而 Fe²⁺和Fe⁰的投加未改变已经形成的顶极群落结构模式,也未显著降低硫酸盐去除率,仅硫化物的浓度变化对Fe²⁺的投加有短暂的响应. 关键词:硫酸盐还原;铁元素;微生物群落;变性梯度凝胶电泳

中图分类号:X835 文献标识码:A 文章编号:1000-6923(2007)02-0199-05

The influence of Fe elements on sulfate reduction process and the response of microbial community. ZHAO Yang-guo^{1,2}, REN Nan-qi^{1*}, WANG Ai-jie¹, LIU Yi-wei¹ (1.School of Environmental and Municipal Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China ;2.College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China). *China Environmental Science*, 2007,27(2) :

Abstract : The influence of different valence state Fe element on sulfate reduction process and the dynamic response of corresponding microbial community were explored by conventional chemical analyses and microbial community denatured gradient gel electrophoresis (DGGE) technique. Only 5d after the starting of reactor, the sulfate-removal rate reached 80%, in this process, the community bands decreased gradually, but the already departed corresponding band of the sulfate-reducing bacteria (SRB) did not appear. The addition of Fe³⁺ altered remarkably the structure of original high efficient community. The sulfate-removal rate reduced to 20% and oxygen reduction potential (ORP) had a little increase; but the addition of Fe²⁺ and Fe⁰ did not alter the structure model of the extreme community. Already formed sulfate-removal rate also did not reduce markedly and only the concentration change of sulfide had short response on the addition of Fe²⁺.

Key words : sulfate reduction ; Fe element ; microbial community ; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

硫酸盐废水处理及硫化物资源化,是硫元素 分别在硫酸盐还原菌(SRB)和硫氧化微生物作用 下逐渐析出单质硫的过程.出水中高浓度硫化物 的积累是实现硫元素资源化和重金属离子去除 的限速步骤,一般通过调节进水中的碳硫比、碱 度、pH值和水力停留时间(HRT)等工艺参数,实 现硫酸盐高效去除和硫化物最大浓度积累^[1-2].

铁元素是SRB细胞中与硫酸盐还原相关的 多种功能酶的辅基成分,通过自身价态相互转化 实现呼吸酶传递电子的作用^[3].有研究认为,Fe²⁺ 是硫酸盐还原过程中的重要佐剂,在进水投加一 定浓度的Fe²⁺能够刺激SRB的活性,进而提高硫 酸盐的去除率和硫化物的积累量^[3-4].实验表明, 环境中Fe²⁺浓度增大,SRB的代谢活动更为旺盛, 生长高峰期延长^[3].Marchal等^[5]研究发现,当Fe²⁺ 的浓度低于0.5µmol/L时,SRB的生长受到抑制. 另外,Fe⁰能够降低硫酸盐还原过程所需要的电 子供体浓度,表现出较为积极的作用^[6].然而,刘晓 华等^[7]的研究却表明,Fe³⁺和Fe²⁺均能够对硫酸盐 还原过程中的关键酶—亚硫酸盐还原酶活性产 生明显抑制.由此可见,不同价态的铁元素对硫酸 盐还原过程可能具有重要作用,但对这种作用的 系统研究以及相应的微生物群落的动态还未见

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

收稿日期:2006-07-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50208006)

酸盐的去除率机硫化物的积累量¹³⁻⁵.头验表明, * 责任作者, 教授, rnq@hit.edu.cn

报道.另外,铁元素对硫酸盐还原效率的改变是通 过刺激SRB的活性来实现,还是通过提高SRB相 关微生物的数量或改变原有的群落结构模式来 实现,这些关键问题仍需要进一步探讨.本研究以 乳酸为碳源,分别就不同价态铁元素对硫酸盐还 原过程中的作用进行系统研究,并应用变性梯度凝 胶电泳(DGGE)对不同时期的群落结构进行解析.

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验采用连续搅拌槽式反应器(CSTR),反应 器内温度为35,模拟废水成分主要为乳酸 (COD 4000mg/L)和硫酸盐(4000mg/L),另加少量 (NH₄)₂HPO₄以补充氮磷,HRT为10h.种泥取自哈 尔滨双城护城河底泥,厌氧状态下驯化30d后,接 入反应器.

为反映不同价态铁元素对硫酸盐还原过程 的影响,参考文献[4-6]于反应器运行稳定期,依次 在进水中投加20mg/L Fe³⁺和Fe²⁺,并于稳定期一 次性投加2000mg/L Fe⁰.反应器运行过程中,根据 文献[8]的方法,对进出水中的硫酸盐浓度、碱度 和pH值、硫化物及反应器的氧化还原电位(ORP) 进行检测.

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增

间隔一定时间,于反应器中部吸取活性污泥, 通过离心获得污泥 0.25~0.5mg(湿重),采用 Powersoil 土壤 DNA 提取试剂盒(Mobio, USA) 提取总 DNA,最终溶解于 100μL 2mmol/L Tris-HCl (pH 8.0).

DGGE 分析时,采用真细菌 16S rRNA 通用 引物 BA101F(5'-TGGCGGACGGGTGAGTAA-3')和 BA534R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), 对应于 *E.coli* 16S rRNA 的 101~118bp 和 534~ 518bp.引物 BA534R 5'端有一个 40bp GC 夹,由 Invitrogen(上海)合成.为防止 PCR 选择性扩增, 采用 25μL 反应体系 4 管平行进行.反应程序为: 预变性 94 ,5min;接以 30 个循环包括 94 变性 40s,55 退火 40s,每一循环下降 0.1 ,72 延伸 1min,循环完毕,72 延伸 5min.4 管混合后电泳 分析 PCR 产物的浓度和质量.

1.3 DGGE 条件与图谱分析

采用 Bio-Rad 公司 DcodeTM基因突变检测系 统进行 DGGE 分析.变性梯度胶为 30%~60% (100%的变性剂为 7mol/L 的尿素和 40%的去离 子甲酰胺的混合物).待胶凝固后,将胶板装入电 泳槽,取 5 μ L PCR 样品混合加样缓冲液后上样. 在 200V 电压下,60 电泳 5h.电泳结束后,剥胶 银染.

将 DGGE 图谱中各泳道数字化后,采用 SPSS 软件(SPSS Inc., Chicago IL)以 PCA 方法对 各泳道群落进行主成分分析,并与反应器运行状 态相结合,解析群落变化与反应器功能的关系.

2 结果与讨论

2.1 不同价态铁元素对硫酸盐还原过程的影响

由于污泥经过驯化选择作用,与硫酸盐还原 相关的微生物类群得到大量富集.由图 1 可见,接 入反应器后仅 5d,硫酸盐去除率即达到 80%以上. 自第 9d,在进水中加入 20mg/L 的 Fe³⁺,硫酸盐去 除率迅速下降至 20%,而碱度和 pH 值未受明显 影响,ORP 有所上升,在-400mV 以上,相比高效运 行下硫酸盐还原反应器中 ORP 略高^[1],反应器 在该状态下运行 12d,进水恢复到初始状态.Fe³⁺ 去除后仅 1d,硫酸盐去除率又恢复到 80%左右.

由图 1 可见,投加 Fe³⁺反应器状态发生了明 显变化,表现出 Fe³⁺对硫酸盐还原过程的强烈抑 制.然而,硫酸盐去除率的迅速响应,表明 Fe³⁺不 是持久性抑制剂.研究表明^[9],Fe³⁺能够将 S²⁻氧化 为单质 S,降低硫化物的浓度,从而减轻对 SRB 的 抑制,同时 Fe³⁺被还原为 Fe²⁺,Fe²⁺将被微生物利 用,进而有利于硫酸盐还原.本研究得到的结果与 文献报道不同.作者认为,Fe³⁺投加后不但能够氧 化反应器中的硫化物,提高了系统的 ORP,还能 够氧化功能微生物细胞内酶蛋白的二硫键(如 SRB 的亚硫酸还原酶中含有还原态的 Fe₄S₄ 基 团),有研究表明,Fe³⁺对亚硫酸还原酶具有明显的 抑制作用^[7].另外有些 SRB 能够以 Fe³⁺为电子受 体.从而使电子分流,表现为硫酸盐去除率下降.



反应器稳定运行后(30d),于进水中投加 20mg/L Fe²⁺,Fe²⁺的投加并未刺激硫酸盐去除率 明显上升(图 1),由于 Fe²⁺与硫化物作用生成了 FeS,致使系统出水暗黑,碱度迅速下降(硫化物是 碱度的重要组成部分^[1]),而后逐渐上升.研究表 明^[5],Fe²⁺能够刺激含铁功能酶活性,进而提高硫 酸盐去除效率,而本研究结果表明 Fe²⁺对硫酸盐 去除率并没有明显的促进作用.分析原因有 3 点, 一是本研究的电子供体为乳酸,当 SRB 在以乳酸 为碳源和能源时,乳酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶作 用下的氧化脱氢步骤是细胞内电子流动的起点 和限速步骤^[10-13],通过这 2 步反应产生的电子经 过一系列的细胞质或周质内电子传递体的传递 作用,产生 ATP,并最终还原硫酸盐^[10].而研究表 明,SRB 的乳酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶中担当电 子载体作用的是 FAD、FMN、flavodoxin 和 ferredoxin,铁元素不是电子载体^[12];二是 Fe²⁺可 能促进了周质内含铁氢化酶的酶活性,而多数研 究均表明,在 SRB 周质内,含铁氢化酶的主要功 能是催化质子还原产生氢气.该酶活性的提高.不 但不会促进硫酸盐去除.反而会因为电子的分流 而导致硫酸盐还原率下降^[13].三是 Fe²⁺投加量过 低,除了与硫化物反应生成沉淀外,没有剩余的 Fe²⁺进入到细胞内,Bratcova 等^[4]的研究表明,当 进水中 Fe²⁺浓度在 100~400mg/L 时,硫酸盐去除 率随着 Fe²⁺浓度的升高而升高,而本研究所投加 的 Fe²⁺浓度仅为 20mg/L.结合分析可见,SRB 以 乳酸为碳源和能源生长时,低浓度 Fe²⁺不会提高 硫酸盐还原率.

为探讨 Fe^0 可能对 SRB 活性的影响,反应器 运行第 46d,一次性投加 2000mg/L Fe⁰(图 1).Fe⁰ 未明显提高硫酸盐去除率,随着反应器运行反而 有少许降低.在酸性条件下,Fe⁰ 与溶液中 H⁺反应 时,可产生 SRB 能够利用的 H₂,增加电子供体,同 时溶液的 pH 值升高,有益于 SRB 生存.然而,反应 器内 pH 值始终>7.0, Fe^0 可能无法通过与 H⁺作用 产生 SRB 更易利用的底物 H₂;另外,Fe⁰在硫酸盐 还原体系中会发生电化学腐蚀,析出 Fe²⁺,并与 硫化物作用产生沉淀,从而减轻对 SRB 的抑制, 但由于反应器内 pH 值较高(>7.0),绝大多数硫化 物以 HS 的形式存在,SRB 对 HS 的耐性阈值很 高^[1],所以即使反应器内 HS 浓度有所降低, SRB 的活性也不会有太大提高.再者,在产酸发酵系统 中,与发酵产酸菌(FAB)相比,SRB 更易附着于载 体上,从而富集,颗粒状 Fe⁰ 能够充当的载体,使 SRB 在数量和活性上均提高^[1].综上所述,Fe⁰ 可 能只起到了载体作用,然而这种作用并不能显著 提高反应器的运行效率.

2.2 微生物群落对投加铁元素的响应 反应器运行过程中,微生物群落的动态变化

图谱见图 2,各泳道的异质性、多样性和演替方向 的主成分分析结果见图 3.



图 2 活性污泥中真细菌群落的演替过程

Fig.2 Succession of bacterial community with bioreactor operation and Fe addition

Fe³⁺, Fe²⁺,投加 20 mg/L 的 Fe³⁺, Fe²⁺; Fe⁰一次性投加 2000mg/L 铁粉; M 为包含 3 种微生物的 marker,

分别为: Dd, Desulfovibrio desulfuricans; Eh, Ethanoligenens harbinense(AY295777); Re, Rhodococcus erythropolis

前期研究^[14]表明,自该反应器分离的脱硫弧 菌(*Desulfovibrio desulfuricans*, Dd) (GenBank 登录 号:DQ092636)为反应器内的优势 SRB 类群,该类 群的数量变化与反应器去除效果成正相关,基于 此,本研究应用该菌株为 marker 进行对比,分析 随着反应器运行 SRB 的数量波动.

根据图 2,图 3,群落泳道 d0 和 d5 的相似性较 大,与其他时期群落结构明显不同,表现出更高的 群落多样性,与 SRB 菌株 Dd 一致的条带在此时 未出现.通过与图 1 比较以及 SRB 含量与硫酸盐 还原的正相关关系可知,此时硫酸盐去除率正处 于上升阶段,表明 SRB 相关菌群正处于富集之中. 而 10d 时,群落的多样性、演化的方向已经有了 显著变化,该阶段是 0d 和 5d 群落向 20d 和 25d 群落的过渡时期,条带数量减少,与硫酸盐还原相 关的微生物类群得以充分富集,硫酸盐去除率处 于较高水平.



由图 2 可见,经过 Fe³⁺的作用,20 d 时的群落 结构发生显著变化,10d 时未出现的部分条带,此 时成为优势类群,原有部分条带此时却消失,与图 1 对照表明,Fe³⁺对反应器中功能微生物类群产 生了明显影响,进而降低了硫酸盐去除率.对比 20d 时群落结构图谱,25d 时部分优势条带消失, 但二者的相似性仍较高,说明即使去除了进水中 的 Fe³⁺,但部分微生物类群,尤其是 FAB,并不能 快速恢复;虽然硫酸盐去除率已经恢复,但对应的 SRB 条带较弱或没有出现.

自 30d 开始,与 SRB 菌株 Dd 对应的条带出 现,46d 时相对含量达到最大值(图 1).由图 3 可 见,30d 时群落结构特征与去除 Fe²⁺后的群落结 构较为一致,表明 Fe²⁺对微生物群落结构也产生 了影响,但从图 1 可见,这种影响较弱,Fe²⁺去除前 后群落结构模式未见明显差别.说明 Fe²⁺没有改 变优势类群结构,与反应器去除效率是统一的.

根据图 2,图 3 中 d46 和 d50,Fe⁰未改变反应 器内已经形成的顶极优势类群模式,对群落整个 演替方向没有起到决定性作用.

2.3 微生物群落结构与反应器功能的关系 反应器运行状态与微生物群落结构存在很 好的响应.反应器中的主体是微生物,其状态是由 某些功能微生物类群决定的.在反应器运行整个 过程中,种泥中微生物多样性最高,但随着反应器 启动及乳酸和硫酸盐驯化作用,原有的系统生态 位被打破,绝大多数微生物(包括 SRB)由于无法 适应新的生态位而被淘汰,表现在 DGGE 条带数 量逐渐降低.少数能够适应该环境的 SRB 种类大 量繁殖,SRB 绝对数量升高,从而表现出硫酸盐去 除率升高.

Fe³⁺对群落结构的影响最为明显,原有的高效优势群落结构被打破,从而影响到硫酸盐去除率.去除 Fe³⁺后,与 SRB 对应条带出现,并且始终保持较高浓度,Fe²⁺和 Fe⁰ 未改变其状态,从而使硫酸盐去除率一直处于较高水平.研究表明,以糖蜜为底物的反应器在高效稳定运行时,SRB 在群落中数量比例小于 1.5%^[15],由于 SRB 是硫酸盐还原的主体,仅占 1.5%的 SRB 就发挥着巨大作用.通过对本研究中条带 Dd 含量分析表明,在泳道 d46 中,Dd 条带已经占到整个群落的 5%,这与底物较为简单更易被 SRB 直接利用有关.

3 结论

3.1 在反应器启动期,群落多样性最丰富,随着 反应器运行以及底物驯化作用,群落趋于简单,不 适应新生态位的微生物逐渐被淘汰.

3.2 Fe³⁺明显改变了反应器的优势高效群落结 构模式,硫酸盐去除率、硫化物浓度显著降低, ORP 有所升高.

3.3 Fe²⁺和 Fe⁰ 对反应器运行效率和优势群落 结构未见明显影响.

3.4 以 SRB 菌株为标记,表明与该菌株对应条带的出现和浓度同硫酸盐去除率呈正相关,浓度最大时占整个群落的 5%.

参考文献:

- [1] 王爱杰.产酸脱硫反应器中的硫酸盐还原菌的生态学研究-顶 极群落形成与生态因子调控 [D]. 哈尔滨:哈尔滨建筑大学, 2000.
- [2] Greben H A, Maree J P, Eloff E, et al. Improved sulfate removal

rates at increased sulfide concentration in the sulfidogenic bioreactor [J]. Water S. A., 2005,31(3):351-358.

- [3] 张小里,刘海洪,陈开勋,等.硫酸盐还原菌生长规律的研究 [J].西北大学学报, 1999,29(5):397-403.
- [4] Bratcova S, Groudev S, Georgiev P. The effect of some essential environmental factors on the microbial dissimilatory sulphate reduction [A]. Annual of the university of mining and geology 'St. Ivan Rilski' part II, mining and mineral processing [C]. Sofia: University St. Kliment Ohridski, 2002,44/45:123-127.
- [5] Marchal R, Chaussepied B, Warzywoda M. Effect of ferrous ion availability on growth of a corroding sulfate-reducing bacterium [J]. Int. Biodeterior. Biodegradation, 2001,47(3):125-131.
- [6] 康 勇,孔 琦,冯 颖,等.COD 与 Fe⁰ 对硫酸盐还原菌还原作
 用的影响 [J]. 天津大学学报, 2006,39(4):396-399.
- [7] 刘晓华,万海清.亚硫酸盐还原酶的分离纯化和酶学性质的研究[J]. 酿酒科技, 2006,(6):28-31.
- [8] 时 红,孙新忠,范建华,等.水质分析方法与技术 [M]. 北京:地 震出版社, 2001.
- [9] Mussmann M, Ishii K, Rabus R, *et al.* Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea [J]. Environ. Microbiol., 2005,7(3):405-418.
- [10] Heidelberg J F, Seshadri R, Haveman S A, et al. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio* vulgaris Hildenborough [J]. Nat. Biotechnol., 2004,22(5):554-559.
- [11] Matias P M, Pereira I A C, Soares C M, *et al.* Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview [J]. Prog. Biophys. Mol. Biol, 2005,89(3):292-329.
- [12] Ogata M, Yagi T. Pyruvate dehydrogenase and the path of lactate degradation in *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F1 [J]. J. Biochem., 1986,100(2):311-318.
- [13] Guiral-Brugna M, Giudici-Orticoni M-T, Bruschi M, et al. Electrocatalysis of the hydrogen production by [Fe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough [J]. J. Electroanal. Chem., 2001,510(1/2):136-143.
- [14] 赵阳国,任南琪,王爱杰,等.硫酸盐废水处理系统强化菌株的分 离鉴定及功能基因分析 [J]. 化工学报,2006,57(10):2401-2406.
- [15] 赵阳国,任南琪,王爱杰,等.SSCP技术解析硫酸盐还原反应器中 微生物的群落结构 [J]. 环境科学, 2005,26(4):171-176.

作者简介:赵阳国(1975-),男,山东济南人,讲师,博士,研究方向为 废水处理与微生物分子生态学.发表论文 12 篇.