

硫酸盐还原菌的分离与生态特点研究

杨建设,黄玉堂,吴楚施,蔡晓宜

(茂名学院环境工程系,广东 茂名 525000)

摘要:采用 S 培养基进行富集培养的方法对硫酸盐还原菌(SRB)进行了分离与鉴定。实验通过对 SRB 的生理和生化特性的了解,结合其生存条件和存在状态进行研究,得出主要的环境因素中 pH 值和温度对 SRB 的腐蚀作用的影响关系,并提出采用合适的环境因素来更好的控制 SRB 的生长代谢活动,得出有效的防治措施来控制硫酸盐还原菌引起的腐蚀,延长有关设备的正常使用寿命。

关键词: 硫酸盐还原菌;硫化氢;分离纯化

中图分类号: X524

文献标识码: A

文章编号: 1005-3409(2006)04-0231-02

The Isolation and Its Eco-Characteristics of SRB Strains

YANG Jian-she, HUANG Yu-tang, WU Chu-shi, CAI Xiao-yi

(The Environmental Engineering Department of Maoming University, Maoming, Guangdong 525000, China)

Abstract: The Sulfate Reducing Bacteria (SRB) was separated and authenticated by using the S culture medium. To understand the SRB physiology and bio-chemical characteristic, the experiment was carried on the research as it's existed in the condition and the existence appearances. The results showed that the main environmental factors, such as the pH value and culture temperature, had a great influence to promote the SRB corrosion. It is suggested that selection of a fit environment factor to control the SRB activity of the growth and the metabolism is better to control the SRB corrosion, and to extend the normal service life of the related equipments.

Key words: Sulfate Reducing Bacteria; H_2S ; separating to turn purely

硫酸盐还原菌(SRB)引起的腐蚀广泛存在于土壤、海水供水系统、油田注水系统及造纸、航运、水电、核电、地热和化学工业的冷却水系统中^[1]。因此,控制硫酸盐还原菌引起的腐蚀成为许多研究者的热点问题。据不完全统计,目前硫酸盐还原菌已有 12 个属,近 40 个种^[2]。有脱硫弧菌(*Desulfovibrio*)、脱硫肠状菌(*Desulfotomaculum*)和脱硫单胞菌(*Desulfomonas*)等。硫酸盐还原菌是一种厌氧的革兰氏阴性菌,单细胞,无色,无芽孢,以单根鞭毛运动;在广泛利用有机物的同时把硫酸盐、亚硫酸盐、硫、硫代硫酸盐和连二亚硫酸盐还原成硫化氢,不沉积铁的氧化物。硫酸盐还原菌普遍生长于土壤、河水、海水、油田中,近期又发现在地下 1 m 的黏土及水深 3 000 m 的海底也有这种细菌的存在^[3]。为了更好地确定合适的环境因素来控制 SRB 的生长代谢活动,提出有效的防治措施,本文分离并研究了环境因素中 pH 值和温度对 SRB 的腐蚀的影响。

1 材料和方法

1.1 培养基

采样点:茂名学院正门右侧池塘的底泥

Starkey 氏培养基(以下简称 S 培养基)

材料: K_2HPO_4 0.5g, NH_4Cl 1.0g, Na_2SO_4 1.0g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0g, 70% 乳酸钠溶液 5.0g, 蒸馏水 1 000 mL, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 0.2g。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的分离纯化方法

在厌氧环境条件下,先把菌种接种到 S 培养基里进行富集培养,形成优势菌种,再用含琼脂 2% 的 S 培养基分离纯化,然后挑单菌落用 S 培养基扩大繁殖。

1.2.2 硫酸盐还原菌的鉴定方法

培养硫酸盐还原菌通常需要含有硫酸盐的特殊培养基,并在培养基中加入亚铁盐。判断硫酸盐还原菌是否存在的传统方法是以产生全黑的菌落或液体培养基全部变成黑色为依据。

1.2.3 菌种的鉴别分析方法

(1)产硫化氢定性测试方法。使硫酸盐还原成硫化氢是硫酸盐还原菌最主要的特征,所以测试是否有硫化氢产生非常必要。把浸有 $AgNO_3$ 液体的试纸条置于瓶口,Ag 离子遇到硫化氢产生化学反应试纸条慢慢从边缘向内变黑,如果 3 min 内(时间长了,空气中的氧会把 Ag 离子氧化变黑)试纸没有变黑,就表明没有硫化氢产生。

(2)染色鉴定方法。染色用革兰氏染色法,普通光学显微镜观察,然后用数码相机拍下照片。

1.2.4 主要环境因素影响的实验

(1)pH 影响测试。取出冷藏在冰箱中的菌种,在 37 ± 1 培养箱中培养 2 d。把 4 L S 培养基分 6 份,pH 值分别调在 4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0。将配好的培养基溶液分

* 收稿日期:2006-03-30

基金项目:茂名学院基金;茂名市科技计划项目资助

作者简介:杨建设(1957-),男,博士,广东省茂名学院教授,主要从事环境工程教学与科研。

别倒进3个已经过高压灭菌锅消毒的250 ml葡萄糖注射瓶中,每瓶注进180 ml,余120 ml空间。用消毒过的移液管移取10 ml菌种液到18个培养基中,塞上塞子。在30℃下培养3 d。3 d后用硫氮测定仪测产生硫化氢的总量。

(2)温度影响测试。同上所述,将配好的培养基溶液分别倒进10个已经过高压灭菌锅消毒的250 ml葡萄糖注射瓶中,每瓶注进180 ml,余120 ml空间。用消毒过的移液管移取10 mL菌种液到9个培养基中,塞上塞子。分别放在20、30、40、50℃下,培养3 d。3 d后用硫氮测定仪测产生硫化氢的总量。

2 实验结果

本实验主要目的是分离获得产生大量硫化氢的硫酸盐还原菌。鉴于此,采用了多菌样厌氧分离培养方法,选育出了优良菌株。

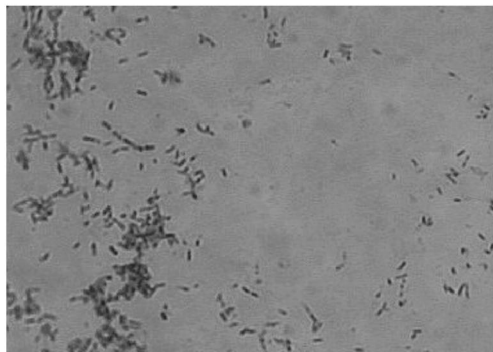


图1 用革兰氏染色法光学显微镜观察的细菌照片

2.1 菌种的分离纯化结果

富集培养经过一系列的分离纯化,从中获得纯菌株1株。其形态见细菌照片图1。

2.2 菌种的鉴定结果

从固体培养基接种的扩大培养的培养液全部变成浓黑。把浸有AgNO₃液体的试纸条置于瓶口,试纸迅速从边缘向内变黑。证明有大量的硫酸盐还原菌繁殖出来。

2.3 pH影响测试结果

3 d后打开瓶塞,能闻到臭鸡蛋的硫化氢气体的味道;把浸有AgNO₃液体的试纸条置于瓶口,试纸迅速从边缘向内变黑。这表明培养基里面的确实含有大量的SRB细菌,结果如图2所示。

可以看出,pH值为4.0和9.0的没有出现黑色沉淀,pH值5.0~8.0的瓶中,溶液中下部存在悬浮的絮状物质,pH值为9.0的瓶,溶液中不存在悬浮物,瓶底部有一层致密的沉积物。测试硫化氢产率结果如图2所示。在pH值4.0~9.0内,不同的pH值硫酸盐还原菌的含量也不尽相同,在pH值为约5.0时最高,在pH值为9.0时不产生硫化氢。

2.4 温度影响测试结果

如图3所示,该菌种在25~40℃时产硫化氢最多最适合生长,超过这个范围菌体的生长就很缓慢,甚至不生长。其不同温度下产硫化氢速率如图3所示。

3 讨论与结论

3.1 讨论

在国内外文献报道中^[4,5],pH值是影响硫酸盐还原菌生长繁殖的重要因素,硫酸盐还原菌对pH值的适应能力很强,适合SRB生长的pH值范围较广,一般在5.5~9.0之间SRB都可以生长繁殖,但最适宜的pH值为7.0~7.5。然而,我们的实验结果却在5左右。该结果的pH值出现和国

内外文献报道中不尽相同的原因可能是本实验测试的产物以硫化氢为指标的。硫化氢属酸性物质,当其大量产生时势必会降低培养液的pH值,从而导致我们所测的结果偏低。与前人研究间具体差异的原因可能是多方面的,需要在今后实验中进一步验证之。

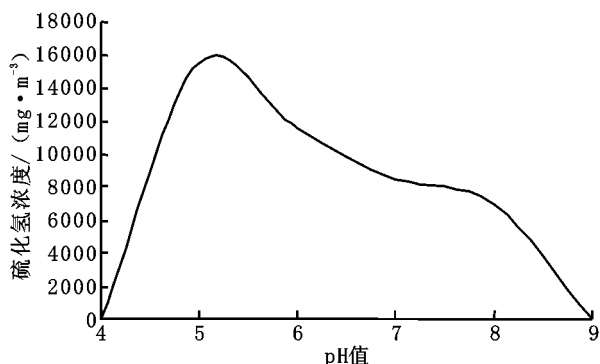


图2 不同pH值下SRB产硫化氢变化

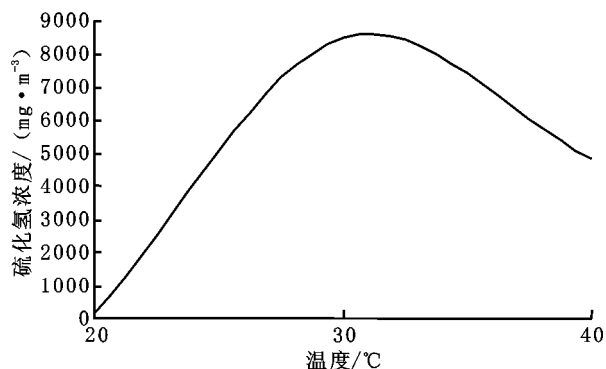


图3 不同温度下SRB产硫化氢速率

前人根据硫酸盐还原菌生长对温度的要求^[4,5],可将其分为两种:中温菌最适温度一般在30~35℃,高温菌最适温度一般为55~60℃。温度直接决定SRB的生长速度与代谢活动,温度太低太高均会抑制SRB的生长代谢活动。SRB通常分为中温SRB和嗜热SRB,最适宜生长温度分为28~38℃和54~70℃。本实验由于采用的常规污泥做富集培养材料,应该适合于常温下SRB的反应类型,对适应高温SRB反应类型未做研究。那么,根据不同温度条件下测定硫化氢产生速率,可证明本研究所用SRB属于中温菌,其生长温度为25~35℃,最适宜温度为30℃。30℃时SRB生长代谢活动最旺盛,所以硫化氢产生速率也最高。在液体培养、分离纯化等过程中均选用30℃。

3.2 结论

(1)厌氧环境下,从采样的底泥中培养出硫酸盐还原菌,实验表明该SRB具有较强的腐蚀性。

(2)pH值是影响硫酸盐还原菌生长繁殖的重要因素之一。适合SRB生长的pH值范围较广,一般只在pH值为5.0~9.0之间SRB生长繁殖。而最佳pH值为5左右的环境条件。

(3)根据不同温度条件下测定硫化氢产生速率,可证明本研究所用SRB确属中温菌,其生长温度为25~35℃,最适宜温度为30℃。用革兰氏法染色,普通显微镜下观察。革兰氏反应和形态都基本一样。所以认为实验培养出一个硫酸盐还原菌的纯菌株。SRB菌落早期为乳黄色、湿润光滑、直径约0.5~1 mm,后期为黑色、直径约1~2 mm。细胞为革兰氏阴性。根据《常见细菌系统鉴定手册》^[6],将所得SRB初步鉴定为脱硫弧菌属。

(下转第236页)

5 岩土侵蚀的治理措施

生物措施、耕作措施、工程措施是人们进行水土流失治理的三大措施,其中以生物措施最为有效,植被的地上和地下部分以及在地表形成的枯枝落叶层均对防止水土流失起到了积极的作用,尤其对于排土场这种松散的堆积体,虽然宏观的地基处理、排土工艺等工程措施是基础,在排土场的锥形形成后,必须采取一系列的工程措施,如排土场边缘修建挡水墙,平台内缘坡脚处挖排水渠,平台内采取畦状整地等暂时性工程措施,但由于排土场局部在很长一段时间之内都处于不稳定状态,大型的工程措施难以实施,加上工程措施的投资大,而植物措施对于改善养分十分贫瘠的排土场,经过 17 年的实践检验是一项长期可行的水土保持治理措施,但具体的最佳的植被组合模式,不同的区域有不同的配置模式。

6 结论与讨论

6.1 结 论

- (1) 岩土侵蚀的内涵为:一是侵蚀的对象是岩土非均匀混合物,也就是说,地表组成物的微变化比较复杂;二是侵蚀的方式、程度与原地貌有明显的不同。
- (2) 岩土侵蚀的形成条件与原地貌的不同之处主要为:地面形态及地层层序;地表物质组成及其理化性状;再塑地貌的时空变化。
- (3) 岩土侵蚀的侵蚀形式,除具有原地貌的侵蚀形式外,还出现了排土场特有的侵蚀形式:非均匀沉降、坡面泥石流、土砂流泻等。
- (4) 由于排土场的物理性质的特殊性,因地制宜的水保措施应为以植物措施为主,工程措施为辅。

参考文献:

[1] 王治国,白中科.黄土区大型露天矿排土场岩土侵蚀及其控制技术的研究[J].水土保持学报,1994,8(2):10-17.

[2] 孙传尧.黄河中游河龙段岩土侵蚀的地质背景[J].陕西地质,2001,19(2):82-86.

[3] 李晋川,白中科.露天煤矿土地复垦与生态重建[M].北京:科学出版社,2000.

[4] 郑粉莉,高学田著.黄土坡面土壤侵蚀过程与模拟[M].陕西人民出版社,2000.

[5] 白中科,王治国,赵景逵,等.安太堡露天煤矿水土流失特征与控制[J].煤炭学报,1997,22(5):542-546.

[6] 白中科,王文英,李晋川,等.黄土区大型露天煤矿剧烈扰动土地生态重建研究[J].应用生态学报,1998,9(6):621-626.

[7] 白中科,胡振华,王治国.露天煤矿排土场人为加速侵蚀及分类研究[J].土壤侵蚀与水土保持学报,1998,4(1):34-40.

[8] 王青杵.煤炭开采区废弃物堆置体坡面侵蚀特征研究[J].中国水土保持,1998,(8):26-29.

[9] 王治国,李文银,蔡继清.开发建设项目水土保持与传统水土保持的比较[J].中国水土保持,1998,(10):16-18.

[10] 段喜明,王治国,宋振勇,等.安太堡露天煤矿南排土场滑坡体稳定性及治理[J].土壤侵蚀与水土保持学报,1999,13(1):86-91.

[11] 吕春娟,白中科,赵景逵.矿区土壤侵蚀与水土保持研究进展[J].水土保持学报,2003,17(6):85-88.

[12] 魏忠义,马锐,白中科,等.露天矿大型排土场水蚀特征及其植被控制效果研究[J].水土保持学报,2004,18(1):164-167.

[13] 魏忠义,白中科.露天矿大型排土场水蚀控制的径流分散概念及其分散措施[J].煤炭学报,2003,28(5):486-490.

[14] 韩武波,马锐,白中科,等.黄土区大型露天矿排土场水土流失评价[J].煤炭学报,2004,29(4):400-404.

[15] Harabin, W Krzaklewski, M. Trafas. The reclamation state of dumping grounds after hard coal exploitation in Poland [A]. in Reclamation, Treatment and Utilization of Coal Mining Wastes[M]. Rainbow(ed), Balkema, Rotterdam, 1990. 125-130.

(上接第 232 页)

参考文献:

[1] 余敦义,等.硫酸盐还原菌生长规律的研究现状与热点[J].中国腐蚀与防护学报,1996,(16):64-68.

[2] 朱绒霞,那静彦.综述硫酸盐还原菌腐蚀的防护措施[J].石油化工腐蚀与防护,1999,(3):50-54.

[3] 刘靖等.硫酸盐还原菌腐蚀研究进展[J].材料保护,2001,34(4):8-13.

[4] 张小里,刘海洪,等.硫酸盐还原菌生长规律的研究[J].西北大学学报(自然科学版),1999,29(5):397-402.

[5] 俞敦义,等.硫酸盐还原菌对油田套管腐蚀的研究[J].石油学报,1996,17(1):154-158.

[6] 东秀珠,蔡妙英,等.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.106-120.

表 2 原地貌与排土场侵蚀影响因素

项 目	原地貌		排土场	
	斜梁台地	斜坡面	平台	斜坡
坡度	3.5~5.5°	5~15°	0~3°	30~40°
侵蚀形式	溅蚀、面蚀(层状)	溅蚀、面蚀(层状)、沟蚀(细沟、浅沟、切沟、冲沟)、洞穴侵蚀	溅蚀、面蚀、洞穴侵蚀、非均匀沉降	面蚀(层状、砂砾化)、沟蚀(细沟、浅沟、切沟)、溅蚀、泻溜、崩塌、土砂流泻、滑坡、坡面泥石流
侵蚀强度	微	轻~中	轻~中	强~强烈
侵蚀营力	水力、风力、重力、人为活动影响轻微		水力、风力、重力、人为活动影响严重	
植被类型	干草原植被,零星分布		以人工乔灌木配置为主,长势良好	
地形地貌	缓坡丘陵		平台-斜坡相间的阶梯状	
土壤类型	栗钙土与栗褐土的过渡带		人工再造土	
地表组成	厚层黄土覆盖,河谷地带覆层较薄		母质、母岩、石砾、煤矸石等	
地表现理化性状	容重适中,土质偏砂,通气性好,养分一般		岩土混合,地表组成的微变化较大,平台地表严重压实,斜坡松散,养分都十分贫瘠	
地层层序	C2-C3-P1-N2-Q1-Q3		C2-C3-P1-N2-Q1-Q3-岩土排弃层内排土场、C2-岩土排弃层	

6.2 讨 论

工矿建设的规模越来越大,废弃岩土的侵蚀影响范围也越来越广,尤其是矿区已经发生的新的侵蚀背景:一方面大型排土场堆垫的岩土过程中造成的“非均匀沉降”,一方面是为节约煤炭开采成本,在新建的大型排土场下进行井工开采,造成上覆岩土变形。这种由露天开采造成的“非均匀沉降”和井工开采诱发的“岩土变形”共同造成“沉陷侵蚀”的外营力,在土壤学科、地质学科与水土保持学科中将成为一个新的研究问题。