

# 硫化物的生物催化降解研究进展

栾兴社<sup>1</sup>, 张春明<sup>2</sup>, 杜 辉<sup>1</sup>

(1. 山东建筑大学市政与环境工程学院, 山东 济南 250101;

2. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250014)

**摘要:**综述了对硫化物生物催化降解的自养微生物、兼性营养菌与异养菌的分离与性能研究进展, 固定化功能性细胞或酶对硫化物的生物催化降解以及硫化物氧化酶的催化机理及酶学特征, 并展望了硫化物生物催化降解方法的应用前景。

**关键词:**硫化物; 生物催化降解; 硫化物氧化酶

中图分类号: TQ125.12

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)06-0037-03

## Advances in study of sulfide biocatalysis-degradation

LUAN Xing-she<sup>1</sup>, ZHANG Chun-ming<sup>2</sup>, DU Hui<sup>1</sup>

(1. College of Municipal and Environmental Engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan 250101, China;

2. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250014, China)

**Abstract:** The advances in the isolation and performance of autotrophic, facultative and heterotrophic microorganisms used in the sulfide biocatalysis-degradation are reviewed, while discussing the immobilization of functional cells or enzymes, the catalytic mechanism and enzymological characteristics of sulfide-oxidizing enzyme, and the application of biocatalytic methods is also prospected.

**Key words:** sulfide; biocatalysis-degradation; sulfide-oxidizing enzyme

环境中的硫化物来自于工业生产环节和生物转化过程, 其毒性大、腐蚀性强、臭味重。目前采用的硫化物去除方法有直接气提、化学沉淀和氧化等方法, 这些方法能耗较高、需要较多的化学药品及较复杂的沉淀物处理过程, 成本较高。近年来, 许多研究者对利用微生物去除硫化物进行了积极研究, 硫化物的生物催化降解已展现为一项很有前途的技术。

### 1 对硫化物催化降解的自养微生物研究

至 20 世纪 80 年代末, 许多科学家致力于自养菌对硫化物生物氧化的研究。绿菌 (*Chlorobiaceae*), 包括绿硫菌和红硫菌为厌氧光合菌, 在  $\text{CO}_2$  存在下  $\text{H}_2\text{S}$  被氧化为元素硫<sup>[1]</sup>。硫杆菌 (*Thiobacilli*) 营养要求比较简单, 可以利用化能自养去除硫化物<sup>[2]</sup>。脱氮硫杆菌 (*Thiobacillus denitrificans*) 与形成絮凝体的异氧细菌一起培养使反硝化硫杆菌得到固定化, 从而形成具有很好沉降性能的絮凝物用以去除  $\text{H}_2\text{S}$ <sup>[3]</sup>。Tanji 等<sup>[4]</sup>用排硫杆菌 (*Thiobacillus thipparas*) 固定化细胞建立了从恶臭气体中同时去除低浓度二甲硫醚 (DMS)、甲硫醇 (MM) 和  $\text{H}_2\text{S}$  的反应系统。Waagner-Biro Aktiengesellschaft 公司<sup>[5]</sup>研究了用氧化

硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*) 去除污染物中的  $\text{H}_2\text{S}$ 、 $\text{CS}_2$ 、 $\text{COS}$ 、硫醇、硫醚等。最近, 一份德国专利描述了利用氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) 去除  $\text{H}_2\text{S}$  的方法, 该菌主要是催化  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  的再生, 同时去除恶臭物质。

采用富集培养、分离纯化的方法, 马艳玲等从含硫土壤中筛选到一株脱硫活性较高的无机化能自养型的脱氮硫杆菌。正交实验结果表明, 该菌的最佳生长条件为  $30^\circ\text{C}$ , pH 7.0,  $\text{H}_2\text{S}$  质量浓度 15 mg/L, 实验的 3 种因素中以 pH 对菌体生长的影响最大; 脱氮硫杆菌进行脱硫时的最适 pH 为 7.0, 最适温度为  $30^\circ\text{C}$ ; 其脱硫产物主要是硫酸根离子, 脱硫速率为  $91.3 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$ <sup>[6]</sup>。

张克强等报道了在升流式生物填料塔中排硫杆菌转化废水中的硫化物为单质硫的研究结果: 当溶解氧和硫化物消耗比 ( $R$ ) 在 0.53 ~ 1.46 内变化, 反应器能够稳定形成单质硫, 且  $R = 0.83$  时, 转化率为 89%。处理过程中硫化物负荷对脱硫反应器中硫化物转变为哪种形式也有很大影响。采用动态光散射仪对生成的硫颗粒粒径进行分析, 结果显示, 生成硫颗粒的粒径变化幅度较大, 变化范围为  $0.5 \sim 10.0 \mu\text{m}$ <sup>[7]</sup>。

## 2 能够氧化硫化物的兼性营养菌与异养菌的分离

与自养微生物相比,兼性营养菌与异养菌具有在有机物环境中易培养、生长快、代谢能力强的特点。对此类菌株的研究能有效地提高硫化物去除效率及去除能力。

从这一研究角度,笔者所在课题组从土壤中分离到了硫化物氧化兼性链霉菌,分离菌株对曲酒发酵池窖泥中的致臭硫化物具有明显的去除效果,并在一定的浓度范围内对共处的乙酸菌和产脂酵母菌有生长和代谢的刺激作用<sup>[8]</sup>。随后分离的链霉菌(*Streptomyces*)LD048对培养影响的因素为:硫化物氧化酶产生的最适接种量为1%;在实验的pH范围内,起始培养最适pH为7.4;随着培养液中乙醇体积分数由1%~5%的增加,菌体生长和硫化物氧化活性的积累都在下降;酵母提取物是一有效的生长刺激因子,在无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的基础上添加0.15%的酵母提取物,能够提高菌体生物量95%; $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 与 $\text{SO}_4^{2-}$ 对菌体生长和代谢产物积累都有严重的抑制作用。培养过程分析表明,培养56h硫化物氧化酶产生达到稳定水平,氧化 $\text{S}^{2-}$ 的活性为 $33.43 \mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ <sup>[9]</sup>。Cho等报道了分离到的一株异养微生物,即能够降解 $\text{H}_2\text{S}$ 的黄单孢菌(*Xanthomonas*)DY44。在pH7和30℃下通过基础无机盐的分批培养,在细胞生长的静止后期得到的最大比 $\text{H}_2\text{S}$ 去除率为 $3.92 \text{ mmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。氧化硫化物的代谢产物为多聚硫。经高压灭菌(120℃,20 min)的细胞失去了硫化物降解能力,但由 $\gamma$ 射线杀死的细胞和细胞提取物都能氧化 $\text{H}_2\text{S}$ ,这说明了热敏感细胞内硫化物氧化酶系统的存在<sup>[10]</sup>。王帆等在有臭味的污泥中,经选择性培养基培养驯化高效降解 $\text{S}^{2-}$ 的脱硫菌。在温度为30℃、pH为2~3、摇床转速为180 r/min的条件下,分别对此脱硫菌的生长曲线、降解能力以及对液态 $\text{S}^{2-}$ 的降解规律进行研究。结果表明,驯化后的脱硫菌不仅对硫化物有很强的耐受能力,而且有很好的降解能力<sup>[11]</sup>。

## 3 固定化功能性细胞或酶对硫化物的生物催化降解

功能性细胞或酶固定化技术是实现细胞或酶重复、连续使用进而提高使用效率、降低使用成本的有效手段。为经济地把 $\text{H}_2\text{S}$ 转化为元素S, Kim等利用海藻胶固定化了的泥生绿硫杆菌硫代硫酸盐小种

(*Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*)。在光能、厌氧条件下发生的生物转化反应为: $2n\text{H}_2\text{S} + n\text{CO}_2 \longrightarrow 2n\text{S} + n(\text{CH}_2\text{O}) + n\text{H}_2\text{O}$ 。他们也发现了依赖于光能和 $\text{H}_2\text{S}$ 输入率的硫酸盐积累副反应: $\text{H}_2\text{S} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2(\text{CH}_2\text{O}) + \text{H}_2\text{SO}_4$ 。在建立的固定化细胞厌氧、分批反应中,光线易于穿过透明的固定化海藻胶珠进入内部空间, $\text{H}_2\text{S}$ 最适氧化速率为 $3.8 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ , $\text{SO}_4^{2-}$ 积累可以忽略<sup>[12]</sup>。马艳玲等以海藻酸钙包埋脱氮硫杆菌制成的固定化微生物颗粒填充生物固定床,用以净化低浓度 $\text{H}_2\text{S}$ 废气。实验研究了温度、pH、进气浓度及流速对反应体系中 $\text{H}_2\text{S}$ 脱除率的影响,测定了生物固定床中代谢物的种类及其含量。结果表明,当进气口的质量浓度低于 $6 \times 10^{-5} \text{ mg}/\text{L}$ 、温度在25~40℃、pH在6.0~7.5时,生物固定床对废气中 $\text{H}_2\text{S}$ 的脱除率可达90%以上。在反应过程中pH保持不变;进气口的流速对不同浓度的 $\text{H}_2\text{S}$ 影响较大。当进气口 $\text{H}_2\text{S}$ 质量浓度为 $3 \times 10^{-5} \text{ mg}/\text{L}$ 且流速为35 L/h时,脱除率高达95%以上。元素硫作为主要产物防止了生物固定床的酸化,并保证了脱硫装置的稳定性<sup>[13]</sup>。2007年,张春明等报道了对链霉菌LD048在液体培养条件下合成的硫化物氧化酶进行的固定化研究。固定化选用了壳聚糖为载体,戊二醛为交联剂。最适固定化条件为:酶与载体的质量比为1:2.5,交联剂的质量分数为0.05%,吸附时间和交联时间分别为3 h和16 h。固定化后酶的活性回收率为58.8%,1 g固定化酶的催化活性达到2 000 U,  $K_m$ 值为 $2.43 \times 10^{-5} \text{ mol}/\text{L}$ ;固定化酶在100℃下保温2 h,酶活仅下降6%。催化操作表明,在以 $2.5 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 的容积负荷对固定化酶进行的装置化运行实验中,连续15天的催化操作后,固定化酶对 $\text{S}^{2-}$ 的去除效果仍在85%以上<sup>[14]</sup>。

## 4 硫化物氧化酶的催化机理及酶学特征

日本科学家Ohta等获得了能把硫化氢氧化为无臭物质的异养链霉菌(*Streptomyces* sp.)SH91。通过离子交换、疏水层析等若干纯化步骤,进一步纯化获得了硫化物氧化酶。应用SDS-PAGE分析测定出的相对分子质量为37 000。酶的最适反应pH和温度分别为6.5℃和30℃。在pH6.0~8.0、温度40℃,该酶活仍稳定。该酶能被 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 活化,也能被 $\text{Mn}^{2+}$ 和 $\text{Al}^{3+}$ 抑制。催化反应的主要产物为硫代硫酸盐<sup>[15]</sup>。后来, Nakada等对分离的异养芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)BN53-1的硫化氢氧化酶

纯化到均一性。此酶是相对分子质量约为 37 000 的单体,活性需要 FAD(不能被 FMN 替代)。最适反应 pH 为 7.5,温度是 40℃。在 pH 6.0~7.0 和温度达到 30℃时,酶是稳定的。酶被  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  激活,被  $\text{Al}^{3+}$ 、二硫苏糖醇(DTT)和 2-巯基乙醇抑制。氧化  $\text{H}_2\text{S}$  的主要产物是元素硫,没有检测到  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。酶的 N-末端序列表明与其他 FAD 需要酶有相似性<sup>[16]</sup>。以沼泽沉积物为材料,Mohapatra 等分离出了能够产生丝氨酸型硫化物氧化酶的节杆菌(*Arthrobacter* sp.)FR-3。在 pH 7.5 和 30℃时,酶的产量最大。在实验的各种碳源和氮源中,葡萄糖和酵母提取物是硫化物氧化酶分泌最有效的基质。纯化到均一性的硫化物氧化酶用 SDS-PAGE 分析的相对分子质量为 43 000,能够有效地固定化于二乙氨基-(DEAE)-纤维素基质上。游离酶和固定化酶的最适 pH 分别为 7.5 和 6.0。固定化作用提高了酶对温度的稳定性。固定化酶的半衰期是 45℃、30 min,比游离酶长 10 min。游离硫化物氧化酶活性被 1 mmol/L 的  $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  及巯基试剂(对氯汞苯甲酸和碘乙酸)完全抑制。1 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$  和金属螯合剂(EDTA)不影响催化活性<sup>[17]</sup>。

笔者对链霉菌 LD048 硫化物氧化酶的催化机理研究表明: $\text{S}^{2-}$  在硫化物氧化酶的作用下首先被氧化为  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,然后生成  $\text{SO}_3^{2-}$ ,最后产生末端产物  $\text{SO}_4^{2-}$ ;  $\text{O}_2$  对细胞生长是必需的,同时是反应过程中的电子受体。酶学特征研究表明:酶的最适反应温度大于 35℃,在 80℃下维持 4 h,酶活仍能完全保留;酶的最适反应 pH 为 8.0;金属  $\text{Mn}^{2+}$  是酶活性的有效促进剂,在实验浓度范围内酶活提高达 35.6%;酶促反应的最适底物浓度为 6.0 mmol/L<sup>[18]</sup>。在用 2 000 L 发酵罐进行产酶培养时,发酵通气量由 0.4 L/(L·min)增加到 0.6 L/(L·min),能使产酶达到高峰的时间缩短 12 h,并能使酶活提高 3.5%。对发酵液中硫化物氧化酶进行提取的结果说明,丹宁吸附回收率为 96%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀回收率为 99.9%;乙醇和丙酮对酶的沉淀回收率低于 60%。制品的动物实验毒理学特征分析表明,实验的硫化物氧化酶制剂是一种安全、无毒的微生物发酵制品<sup>[19]</sup>。

## 5 展望

现在,由于生物技术的快速发展以及生物方法的无害性、高效性和特异性,应用生物催化降解硫化物减小其对人类健康和生态环境的危害是一个必然的发展趋势。在以后有关本领域的研究和开发中,

学者们不仅会在筛选新性能的菌种、提高酶的稳定性上下功夫,还会在提高酶的活性和产率、降低生物催化成本的问题上进行深入研究。在硫化物生物降解过程中,生物催化可能比生物转化成本要高,这是因为酶制剂的生产比培养细胞要复杂得多。在未来的研究中,学者们会不断改进酶制剂的生产方法并且寻找发挥酶的最高活性所需的条件,使其应用更廉价。总之,生物催化在硫化物生物降解过程中将朝着安全、经济、实用的方向发展,应用前景也会越来越广阔。

## 参考文献

- [1] Cork D J, Garunas R, Sajjad A. *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*: Biocatalyst in the production of sulfur and organic carbon from a gas stream containing  $\text{H}_2\text{S}$  and  $\text{CO}_2$ [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1986, 45: 913 - 918.
- [2] Gadre R V. Removal of hydrogen sulfide from biogas by chemotrophic fixed-film bioreactor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, 34: 410 - 414.
- [3] Sublette K L, Sylvester U D. Oxidation of hydrogen sulfide by continuous cultures of *Thiobacillus denitrificans*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, 29: 753 - 758.
- [4] Tanji Y, Kanagawa T, Mikami E. Removal of dimethyl sulfide, methyl mercaptan, and hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus thioparus* TK-m[J]. *Journal of Fermentation and Engineering*, 1989, 67: 280 - 285.
- [5] Waagner-Biro Aktiengesellschaft, Glanzstoff Austria GesmbH. Procedure for microbiological transformation of sulphur containing harmful components in exhaust gases: US, 4968622[P]. 1990 - 11 - 06.
- [6] 马艳玲,赵景联,杨伯伦,等.脱硫细菌的筛选及其对硫化氢降解性能研究[J]. *化工环保*, 2004(21): 8 - 10.
- [7] 张克强,黄文星,季民,等.含硫化物废水生物处理过程中单质硫的形成特性[J]. *农业环境科学学报*, 2006(2): 522 - 526.
- [8] 栾兴社.窖泥兼性自养链霉菌研究[J]. *山东科学*, 1991, 4(2): 10 - 15.
- [9] 栾兴社,于伟正,王桂宏,等.硫化物氧化兼性自养金色链霉菌 LD48 培养的影响因素研究[J]. *化工科技*, 2004, 12(5): 14 - 17.
- [10] Cho K, Hiral M, Shoda M. Degradation of hydrogen sulfide by *Xanthomonas* sp. Strain DY44 isolated from peat[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(4): 1183 - 1189.
- [11] 王帆,李淑芹,许景钢.脱硫菌的培养驯化与降解硫化物性能的研究[J]. *东北农业大学学报*, 2004, 35(1): 21 - 24.
- [12] Kim B W, Kim I K, Chang H N. Bioconversion of hydrogen sulfide by free and immobilized cells of *Chlorobium thiosulfatophilum*[J]. *Biotechnology Letters*, 1990, 12: 381 - 386.
- [13] 马艳玲,赵景联,杨伯伦.固定化脱氮硫杆菌净化硫化氢气体的研究[J]. *现代化工*, 2004, 24(2): 40 - 43.
- [14] 张春明,栾兴社,王桂宏,等.链霉菌 LD048 硫化物氧化酶的固定化及催化操作研究[J]. *现代化工*, 2007, 27(8): 45 - 47, 49.

(下转第 41 页)

经6次更换后,电池电压输出达到了383 mV左右(外电阻500 $\Omega$ )。然后将生活污水与醋酸钠溶液(500 mg/L)按1:5的比例混合后置于MFC的阳极池中,2天后更新溶液,更新2次后直接以混有无机营养盐的醋酸钠溶液加入到MFC中,直到电池输出最大电压达到稳定。无机营养液按文献[6]配制,在加入到电池以前通入N<sub>2</sub>以置换出溶液中的溶氧。

### 1.3 16S rDNA的提取及PCR扩增方法

16S rDNA的提取及PCR(polymerase chain reaction)扩增方法为:将电池中的微生物分离纯化后提取单个细菌的16S rDNA后,对细菌16S rDNA V6-V8区进行PCR扩增,扩增后的DNA样品用琼脂糖凝胶电泳检查扩增结果。扩增以埃希杆菌属大肠杆菌(*Escherichia coli*)16Sr DNA序列960到1392核苷酸片段为引物。正向引物为5'-(GC clamp 1)-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3',反向引物为1392r 5'-ACG GGC GGT GTG TAC A-3',引物均由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

### 1.4 DNA测序及同源性比较

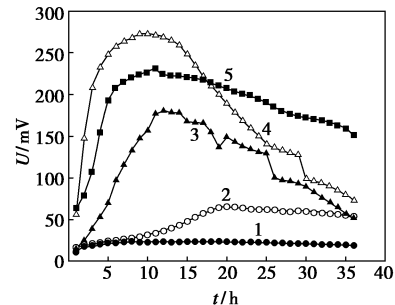
PCR扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测合格后委托北京英俊生物公司进行DNA测序。DNA测序结果提交NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)用BLAST进行检索和同源性比较,得到细菌菌属。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微生物驯化过程的输出电压变化及特征分析

图1为以生活污水作为营养液时,电池分批换水过程中输出电压随时间变化曲线。每次换水后,电池电压均随时间变化,在达到峰值并维持一段时间后下降;在首次加入营养液时电池输出电压很低(不到20 mV,外接电阻500 $\Omega$ ),经多次换水后,电压峰值逐步增大,电压上升到峰值所需的时间缩短,峰值延续时间延长。以上现象说明:①电池阳极电势的产生主要是由于微生物吸附在电极表面而致,而不是由于悬浮在溶液中的微生物或者化学物质所产生的;②电池的输出电压与电极表面的微生物数量有关,在电池微生物驯化的初期,吸附在电极表面的

微生物数量较少,因此能够传递给电极的电子数量较少,输出电压较低;而经多次换水后,电池表面吸附的微生物达到饱和,因此电压输出随时间的变化曲线基本稳定。



曲线标号即为次数

图1 驯化培养阶段电池电压随时间的变化图

### 2.2 电池性能随时间的变化

当电池输出性能稳定后,考察电池各种性能(外接电阻500 $\Omega$ )随时间的变化,结果见表1。前12 h内,电池产生的库仑量随时间呈直线增长,12 h后输出电量增长幅度减小。初始阶段电池库仑转化率较低,而随时间变化,电池库仑转化率逐步升高,到12 h时,最大升高到46.9%,到24 h时略微下降,但仍维持在40%以上。初始阶段转化率较低的主要原因可能是溶液中还有少量残余的O<sub>2</sub>存在,而电池运行足够长时间后,库仑效率略微下降主要有2方面原因:一是电池中底物浓度的降低导致微生物的代谢活性降低,二是溶液中悬浮微生物增多,不能转移到电极上的电子增多。其 $\ln(C/C_0)$ 与时间 $t$ 之间成直线关系, $\ln(C/C_0) = -0.06716 t$ ,  $r = 0.9923$ 。可见溶液中醋酸钠的总生化降解动力学过程属于一级反应。

表1 电池输出电量和溶液COD随时间的变化

时间/h	0	2	5	8	12	24
出水 COD/mg·L <sup>-1</sup>	394	346	279	215	203	75
COD降解率/%	0	12.2	29.2	45.4	48.5	81.0
库仑转化率/%	0	31.8	32.5	33.5	46.9	41.9
电量/C	0	5.1	12.6	20.2	30.3	45.1

(上接第39页)

- [15] Ohta Y, Sumida K, Nakada Y. Purification and properties of a sulfide-oxidizing enzyme from *Streptomyces* sp. strain SH91[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43: 1097 - 1101.
- [16] Nakada Y, Ohta Y. Purification and properties of hydrogen sulfide oxidase from *Bacillus* sp BN53-1[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(4): 452 - 455.

- [17] Mohapatra B R, Goud W D, Dinardo O, et al. Optimization of culture conditions and properties of immobilized sulfide oxidase from *Arthrobacter* species[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 124(3): 523 - 531.
- [18] 栾兴社, 王桂宏, 黄俊, 等. 链霉菌 LD048 硫化物氧化酶的催化机理及酶学特征[J]. 现代化工, 2006, 26(z2): 88 - 91, 93.
- [19] 栾兴社, 黄俊, 张克峰, 等. 链霉菌 LD048 硫化物氧化酶的提取及毒理特征研究[J]. 科学研究月刊, 2007, 27(3): 42 - 44. ■