第 49 卷第 8 期　　硅　酸　盐　学　报　　Vol. 49，No. 8
2021 年 8 月　　JOURNAL OF THE CHINESE CERAMIC SOCIETY　　August，2021
http://www.gxyb.cbpt.cnki.net　　DOI：10.14062/j.issn.0454-5648.20200935

不同底物下硫氧化菌的硫氧化特性及其对砂浆性能的影响

荣　辉[1,2,3]，於成龙[1]，张树青[1]，马国伟[3]，王海良[4]，刘志华[1]，张　磊[1]

(1. 天津城建大学材料科学与工程学院，天津 300384；2. 天津市建筑绿色功能材料重点实验室，天津 300384；
3. 河北工业大学土木与交通学院，天津 300401；4. 天津城建大学土木工程学院，天津 300384)

摘　要：研究了不同底物下硫氧化菌的硫氧化特性及其对砂浆试样的力学性能和微观结构的影响。结果表明：硫氧化菌生长浓度在不同底物环境中表现不同，其生长浓度由高到低所对应的底物分别是 $Na_2S_2O_3$、Na_2SO_3、Na_2S；不同底物下硫氧化菌转化 SO_4^{2-}的方式均存在自然氧化和生物氧化两种形式。硫氧化菌代谢途径中发现了一种先将 $S_2O_3^{2-}$经 *SseA* 酶转化为 SO_3^{2-}，再经 *Soe* 酶转化为 SO_4^{2-}的新途径。砂浆试样在 $Na_2S_2O_3$ 底物环境中较于 Na_2SO_3 底物环境中生成膨胀性石膏含量偏低，这是因为与 $Na_2S_2O_3$ 的生物氧化相比，Na_2SO_3 自然氧化的 SO_4^{2-}浓度较高，反应速率较快，腐蚀效果更为显著。处于 $Na_2S_2O_3$ 底物环境中的砂浆试样抗压强度变化率 10.4%、质量变化率 1.04%；处于 Na_2SO_3 底物环境中的砂浆试样抗压强度变化率–12.9%、质量变化率 1.44%。$Na_2S_2O_3$ 底物环境试样生成石膏的含量低于 Na_2SO_3 底物环境试样生成石膏的含量，分别在 75 d 和 45 d 后由于大量石膏的膨胀力作用下使得砂浆试样最终劣化。

关键词：硫氧化菌；砂浆；硫氧化特性；微观结构；力学性能
中图分类号：TU528.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0454–5648(2021)08–1650–12
网络出版时间：2021–06–18



Sulfur Oxidation Characteristics of Sulfur Oxidizing Bacteria under Different Substrates and its Effect on Properties of Mortar

RONG Hui[1,2,3], *YU Chenglong*[1], *ZHANG Shuqing*[1], *MA Guowei*[3], *WANG Hailiang*[4], *LIU Zhihua*[1], *ZHANG Lei*[1]
(1. School of Materials Science and Engineering, Tianjin Chengjian University, Tianjin 300384, China;
2. Tianjin Key Laboratory of Building Green Functional Materials, Tianjin Chengjian University, Tianjin 300384, China;
3. School of Civil and Transportation Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China;
4. School of Civil Engineering, Tianjin Chengjian University, Tianjin 300384, China)

Abstract: Sulfur oxidation characteristics of sulfur oxidizing bacteria under different substrates and the mechanical properties and microstructure of mortar samples were investigated. The growth concentrations of sulfur oxidizing bacteria are different under different substrates, *i.e.*, the corresponding growth concentration decreases from high to low in an order of $Na_2S_2O_3$, Na_2SO_3 and Na_2S. The natural oxidation and biological oxidation both occur in the transformation of SO_4^{2-} by the sulfur oxidizing bacteria under different substrates. $S_2O_3^{2-}$ can be transformed to SO_3^{2-} through *SseA* enzyme and then to SO_4^{2-} through *Soe* enzyme. The swelling gypsum content of mortar sample under $Na_2S_2O_3$ substrate is lower than that under Na_2SO_3 substrate. This is because SO_4^{2-} concentration of natural oxidation of Na_2SO_3 is greater than that of the biological oxidation, thus leading to a higher reaction rate and a stronger corrosion effect. The compressive strength and mass change rate of the mortar samples under $Na_2S_2O_3$ substrate are 10.4% and 1.04%, respectively. The change rate of compressive strength and mass of the mortar samples under Na_2SO_3 substrate are –12.9% and 1.44%, respectively. Combined with the mineral composition analysis results, it is indicated that the gypsum content of the samples under $Na_2S_2O_3$ substrate is lower than that of the samples under Na_2SO_3 substrate, while the mortar samples are eventually deteriorated, due to the expansive force of a large amount of gypsum after 75 d and 45 d.

收稿日期：2020–12–22。　修订日期：2021–01–24。
基金项目：国家自然科学基金项目(51978439)；天津市交通运输科技发展计划项目(2018-38)；中国博士后科学基金项目(2019M651000)。
第一作者：荣　辉(1983—)，男，博士，副教授。
通信作者：马国伟(1968—)，男，博士，教授。

Received date: 2020–12–22.　**Revised date:** 2021–01–24.
First author: RONG Hui (1983–), male, Ph. D., Associate Professor.
E-mail: huirongtcu@126.com
Correspondent author: MA Guowei (1968–), male, Ph. D., Professor.
E-mail: guowei.ma@hebut.edu.cn

Keywords: sulfur oxidizing bacteria; mortar; sulfur oxidation characteristics; microstructure; mechanical properties

混凝土的微生物腐蚀(MICC)是指由微生物通过自身新陈代谢作用造成的混凝土腐蚀，是一个渐进且多阶段劣化过程，会导致混凝土表面损伤、疏松、浆体脱落、骨料外露、开裂和钢筋锈蚀，很大程度上缩短了混凝土结构的使用寿命，将从预期的100 a 降低到 30～50 a，而且在极端情况下甚至会降低到 10 a，甚至更短[1–2]。混凝土的微生物腐蚀在自然界中涉及范围很广且在温暖和寒冷的气候中普遍存在，各类基础设施尤其在污水处理系统、海洋工程等微生物富集区域问题较为严重[3–6]。大量研究表明混凝土的微生物腐蚀是一个世界性的问题[7–20]。因此，混凝土的微生物腐蚀现象受到了广大研究人员的关注并予以研究。

1945 年 Parker 等[4,21]发现并提出混凝土微生物腐蚀的作用机理，揭示了混凝土失效与微生物新陈代谢作用有关，硫氧化细菌、硫酸盐还原菌等细菌通过新陈代谢作用生成的生物硫酸是造成混凝土腐蚀的主要原因。随后 Islander 等[10]针对污水中硫氧化细菌存在的嗜中菌和嗜酸菌两类细菌对混凝土的腐蚀分别进行研究并深化了 Parker 的腐蚀作用机理。目前有关研究表明：混凝土作为一种非均匀且多孔材料，在复杂的环境下会受到微生物侵蚀与环境因素的协同作用[22]。当前混凝土的微生物腐蚀主要是针对污水管道下的硫化氢[4,10,21]，然而种类多样、分布广泛的硫氧化菌不仅可以氧化硫化氢，还可以氧化硫化合底物，其均为微生物腐蚀必要的能源[23–24]。环境中不同的硫源底物(硫化物、单质硫、硫代硫酸盐和亚硫酸盐等)最终完全被硫氧化菌氧化为硫酸盐(SO_4^{2-}) [25–26]。那么，硫氧化菌转化不同硫源形成 SO_4^{2-}的过程是否相同？在转化形成 SO_4^{2-}过程中硫氧化菌主要受哪些基因片段控制？不同底物硫源下硫氧化菌的基因表达控制是否相同？另外，硫氧化菌转化不同硫源底物形成 SO_4^{2-}的速率和浓度是否相同？而上述问题的探明决定着硫氧化菌在不同底物环境下对混凝土的腐蚀速率和腐蚀破坏特征。因此，针对不同硫源底物环境下硫氧化菌的硫氧化特性及其对砂浆性能和结构的影响研究具有重大意义。

本实验中选取硫氧化菌(Thiobacillusthioparus DSM505)[15, 27]作为单一腐蚀微生物，首先通过测量不同底物环境($Na_2S_2O_3$、Na_2SO_3、Na_2S)下硫氧化菌的 OD、pH 和 SO_4^{2-}浓度变化以及硫氧化菌基因表达，探究其硫氧化特性，确定底物环境对菌的繁殖规律、硫源转化能力和 SO_4^{2-}转化途径的影响；然后通过分析不同腐蚀龄期下砂浆的形貌、质量变化率和抗压强度变化率，同时结合 X 射线衍射仪和扫描电子显微镜–能谱仪分析砂浆的水化产物以确定硫氧化菌在不同底物下对砂浆结构性能的影响。

1　实验

1.1　材料

水泥为唐山市丰润区顺鑫水泥有限公司 P·O 42.5 普通硅酸盐水泥。砂子为细度模数 2.8 的天然河砂。减水剂为萘系高效减水剂。拌合水为实验室干净自来水。砂浆水灰比为 0.33，配合比见表 1。试样采用一次投料法，将骨料、水泥投入自动搅拌机内干拌 30 s，然后加入水、减水剂再搅拌 3 min 后出料，浆体装入 40 mm×40 mm×160 mm 模具中，振动成型。成型后，用塑料薄膜覆盖，防止水分蒸发，24 h 后拆模放置于(20±2)℃、相对湿度≥95%条件下养护。

表 1　砂浆试样配合比

Table 1　Mix proportion of mortar sample　kg/m^3

Cement	Sand	Water	Water reducer
798	1198	260	7.98

硫氧化菌(Thiobacillusthioparus DSM505)培养基成分如表 2 所示。根据前期对微生物培养方法的探究，将硫氧化菌置于无菌环境下以 2%接种量加入灭菌冷却后的培养基，置于 30 ℃、150 r/min 转速的恒温振荡培养箱中培养 4 d 待用。

1.2　方案

将高温高压灭菌后相同掺量(10 g/L)不同类型的底物培养基按 2%浓度接种硫氧化菌后，将其置于 30 ℃震荡培养 15 d，然后每隔 1 d 测试溶液的 ρ_{590} 值(微生物在 590 nm 波长下的光密度，用以反映微生物浓度)以及 pH 值，每隔 2 d 测试溶液 SO_4^{2-}浓度。通过分析硫氧化菌在不同硫化合底物下测试周期内的光密度值、pH 值和 SO_4^{2-}浓度的变化，进而确定硫氧化菌的生长浓度和硫源转化能力。通过提取菌液和生物膜中硫氧化菌的总 RNA 进行质量检测，并将硫氧化菌总 RNA 反转录得到硫氧化菌的 cDNA，最后进行荧光实时定量 PCR 反应完成硫氧

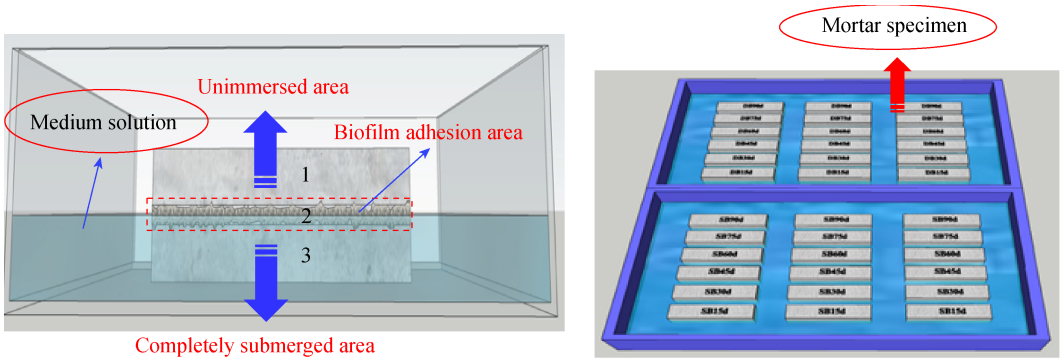
化菌基因表达测试。

采用硫氧化菌菌液半浸浸泡砂浆试样，暴露空气部分标记 1，气液交界面上下 5 mm 区域标记 2，完全浸没液体部分标记 3，具体浸泡方式和试验装置示意图如图 1 所示。通过观察不同龄期气液交界面处砂浆试样的宏观性能和微观结构变化来分析硫氧化菌对砂浆试样侵蚀的作用，其中宏观性能包括砂浆的外观形貌、质量变化率和抗压强度变化率；微观性能包括砂浆的矿物组成和 SEM–EDS 微观结构分析。试验设置对照组(DB)和试验组(SB)，其中对照组为不同底物灭菌后的无菌培养基，试验组为不同底物灭菌后的培养基加入硫氧化菌培养至对数期的菌液，每组龄期设置 3 块试样。试验周期 90 d，测试龄期间隔为 15 d。

表 2 培养基成分

Table 2 Medium composition g/L

	K_2HPO_4	KH_2PO_4	$(NH_4)_2SO_4$	$MgSO_4$	$MnSO_4$	$CaCl_2$	$FeCl_3$	$Na_2S_2O_3$	Na_2SO_3	Na_2S
Sodium thiosulfate group	4	4	0.1	0.1	0.02	0.1	0.02	10		
Sodium sulfite group	4	4	0.1	0.1	0.02	0.1	0.02		10	
Sodium sulfide group	4	4	0.1	0.1	0.02	0.1	0.02			10



(a) Distribution of mortar sample soaking area (b) Mortar sample immersion test device

图 1 砂浆试样浸泡示意图

Fig. 1 Soaking schematic diagram of mortar specimen

1.3 方法

采用精密 pH 测试仪测试硫氧化菌培养过程中溶液的 pH 值，精确至小数点后 1 位；取菌液经离心机分离杂质及大分子有机物的上清液 5 mL，通过 ICS-1500 离子色谱仪分析溶液中的 SO_4^{2-}浓度；采用 T6 新世纪紫外分光光度计测量溶液中的细菌浓度，取 5 mL 菌液于比色皿中，选取光度值为 ρ_{590} 进行测试。

参照 TIANGEN 公司的 RNA prep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒(DP430)说明书的方法，提取菌液或生物膜中硫氧化菌的总 RNA 并进行质量检测；参照康为世纪公司 HiFiScript cDNA Synthesis Kit(CW2569M)说明书的方法，进行硫氧化菌总 RNA 反转录得到硫氧化菌的 cDNA 并将浓度调至 100 ng/μL；参照宝生物工程有限公司的 SYBR® Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus) (RR420L)说明书方法，采用 StepOne Plus™实时 PCR 扩增仪进行荧光实时定量 PCR 反应。

使用普通摄像机记录砂浆表面形貌的演变，然后采用超景深显微镜对砂浆试样生物膜粘附处进行拍照，通过浸泡菌液各龄期的形貌变化，表征硫氧化菌在砂浆表面的粘附过程并采用 EDS 分析验证生物膜。

将标准养护 28 d 的砂浆试样在浸泡菌液前称重记为质量 M_1，将浸泡至各龄期的试样取出称重记为质量 M_2，两者差值(M_2–M_1)与浸泡前的质量 M_1 的比值 R 得到砂浆试样质量变化率，如式(1)所示：

$$R=(M_2-M_1)/M_1\times100\% \quad (1)$$

式中：R 是质量变化率，%；M_1 是腐蚀前砂浆质量，g；M_2 是腐蚀后砂浆质量，g。

按照 GB/T17671–1999《水泥胶砂强度检测方法》进行抗压强度试验并计算浸泡后试样的抗压强

度变化率，其公式如式(2)所示：

$$f=(F_2-F_1)/F_1\times100\% \quad (2)$$

式中：f 为抗压强度变化率，%；F_1 为浸泡第 15 d 每组试样的抗压强度，MPa；F_2 为浸泡 15 d 后每个龄期试样的抗压强度，MPa。

采用 Rigaku ultima-V1 型 X 射线衍射仪进行矿物组成分析，起始角度为 5°(2θ)，终止角度为 60°(2θ)，扫描步长为 0.02°(2θ)，扫描速率为 10(°)/min，扫描范围选取 10°～45°(2θ)。

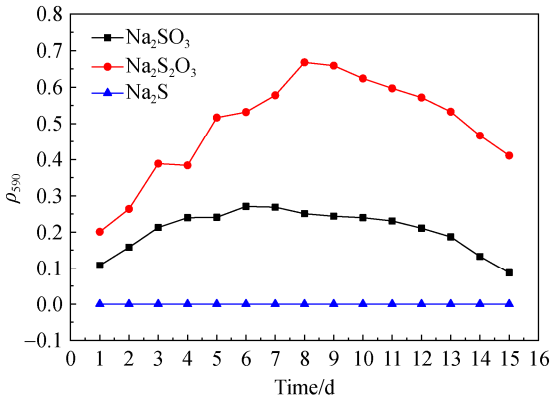
取腐蚀部位的砂浆试样，置于 80 ℃烘箱中干燥后研磨，采用 JEC-3000FC AUTO FINE COATER 全自动离子溅射仪对样品喷金、镀膜，采用 JSM-7800F 扫描电子显微镜拍摄腐蚀产物的微观形貌，采用 EDS 能谱根据样品表面不同元素发出来的特征 X 射线来分析元素的种类。

2　结果与讨论

2.1　硫氧化菌的硫氧化特性

2.1.1　不同底物下硫氧化菌生长及硫源转化能力

选取 $Na_2S_2O_3$、Na_2SO_3、Na_2S 3 种硫源作为反应底物，分别配制等摩尔质量的硫源培养基。由图 2 的 ρ_{590} 生长曲线可知，硫氧化菌在 $Na_2S_2O_3$ 为底物时生长最好，此时 ρ_{590} 最大值达到 0.668。在 Na_2SO_3 为底物时生长较差，ρ_{590} 最大值仅为 0.271，而硫氧化菌在 Na_2S 为底物的环境下 ρ_{590} 变化不明显。上述结果说明硫氧化菌在 $Na_2S_2O_3$ 环境下生长最好，Na_2SO_3 次之，而在 Na_2S 环境下硫氧化菌不生长。



ρ_{590} is optical density at 590 nm for reflection bacteria concentration.

图 2　不同底物下硫氧化菌的生长曲线

Fig. 2　Growth curves of sulfur oxidizing bacteria under different substrates

由图 3 的 pH 值可以明显看出，当反应底物为 $Na_2S_2O_3$ 时，溶液的 pH 值在 7.5 左右，原因是 $Na_2S_2O_3$ 会发生如式 3[28]的氧化反应：

$$2Na_2S_2O_3+3O_2==2Na_2SO_4+2SO_2\uparrow \quad (3)$$

当反应底物为 Na_2SO_3 时，溶液的 pH 值在 7.8 左右，这是因为 Na_2SO_3 会发生如式 4[26]的氧化反应：

$$2Na_2SO_3+O_2==2Na_2SO_4 \quad (4)$$

由于 Na_2SO_4 水溶液呈弱碱性且 SO_3^{2-}更易于自然氧化形成 SO_4^{2-}，因此 Na_2SO_4 底物溶液 pH 值偏高；而当反应底物为 Na_2S 时溶液的 pH 值由初始的 6.5 迅速升为 11，原因是 Na_2S 水解形成 NaOH，如反应式(5)、式(6)所示[29]，因此溶液呈高碱性。高碱性不适于硫氧化菌的生长，故该底物下的硫氧化菌 ρ_{590} 变化不明显。

$$Na_2S + H_2O==NaOH + NaHS \quad (5)$$

$$NaHS + H_2O==NaOH + H_2S \quad (6)$$

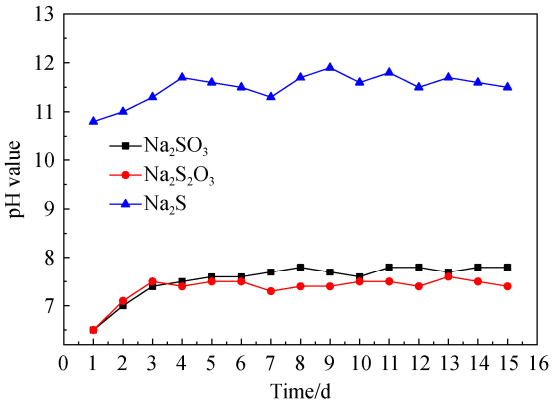


图 3　不同反应底物的 pH 值变化

Fig. 3　pH value change of different substrate

由图 4 的 SO_4^{2-}浓度变化可以看出，2 种底物环境均存在自然氧化和生物氧化 2 种途径形成 SO_4^{2-}。以 $Na_2S_2O_3$ 为底物时，试验组 SO_4^{2-}浓度随时间的增加而快速增长，最高浓度为 2 054 mg/L；对照组 SO_4^{2-}浓度增长缓慢，最高浓度为 931 mg/L，仅占试验组的 45%左右。因此，在 $Na_2S_2O_3$ 为反应底物时，所形成的 SO_4^{2-}主要由硫氧化菌代谢产生。以 Na_2SO_3 为底物时，试验组和对照组的 SO_4^{2-}浓度在第 2 天均达到 2 000 mg/L 左右，随后 SO_4^{2-}浓度的增长缓慢，最高浓度分别为 3 318、2 729 mg/L，说明 Na_2SO_3 主要发生自然氧化，且反应较快，所形成 SO_4^{2-}占总 SO_4^{2-}含量的 80%以上，因此 Na_2SO_3 环境生物氧化形成的 SO_4^{2-}的贡献较少。综上，$Na_2S_2O_3$ 环境更利于硫氧化菌代谢 SO_4^{2-}。

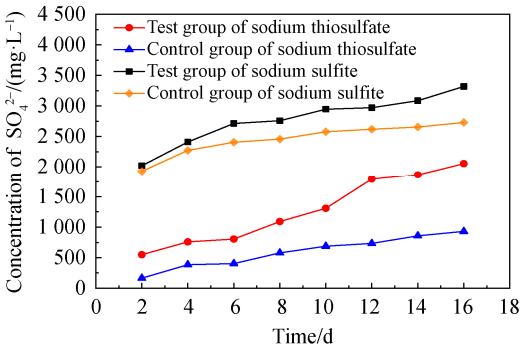


图 4 不同底物下 SO_4^{2-}浓度变化

Fig. 4 Concentration changes of SO_4^{2-} under different substrates

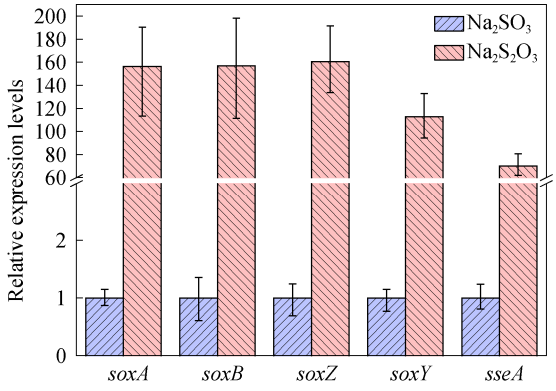
2.1.2 硫氧化菌基因表达

(1) 硫氧化基因表达

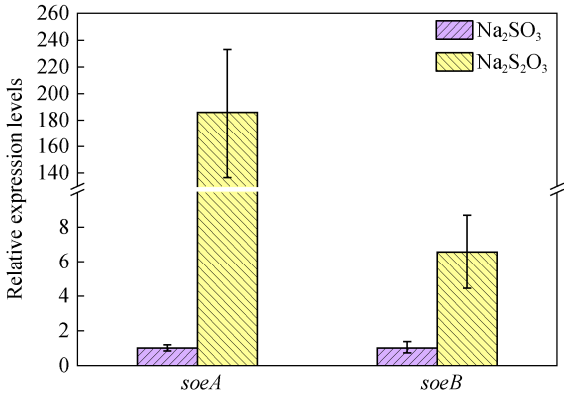
图 5 为硫氧化菌对不同硫氧化基因的表达水平，其中 *soxA*、*soxB*、*soxY*、*soxZ* 为 $S_2O_3^{2-}$氧化成 SO_4^{2-}的相关基因；*sseA* 为 $S_2O_3^{2-}$氧化成 SO_3^{2-}的相关基因，其 qPCR 表达水平如图 5a 所示；*soeA*，*soeB* 为 SO_3^{2-}氧化为 SO_4^{2-}的相关基因，其 qPCR 表达水平如图 5b 所示。

从图 5a 可以明显看出：*soxA*，*soxB*，*soxZ*，*soxY* 基因在 $Na_2S_2O_3$ 培养条件下表达水平显著，约为 Na_2SO_3 培养条件下表达水平的 120~160 倍，说明 *sox* 基因在 $Na_2S_2O_3$ 为底物环境时能够充分表达，将 $S_2O_3^{2-}$转化成 SO_4^{2-}；sseA 基因在 $Na_2S_2O_3$ 培养条件下表达水平同样明显高于 Na_2SO_3 环境，约为 60～80 倍，可以看出在 $Na_2S_2O_3$ 环境下，硫氧化菌可以利用 $S_2O_3^{2-}$转化为 SO_3^{2-}；从图 5b 可以看出，相比于 Na_2SO_3 环境，在 $Na_2S_2O_3$ 培养条件下的 *soeA* 及 *soeB* 基因表达水平更高，其中 *soeA* 基因表达水平较为显著，约为 Na_2SO_3 环境的 180 倍，*soeB* 基因表达水平约为 Na_2SO_3 环境的 6 倍，说明 *soe* 基因在 $Na_2S_2O_3$ 环境下表达更活跃，更容易将 $S_2O_3^{2-}$转化来的 SO_3^{2-}再转化为 SO_4^{2-}，而硫氧化菌在 Na_2SO_3 环境下直接将 SO_3^{2-}转化为 SO_4^{2-}的能力较低。

综上，从硫氧化菌自身硫氧化基因在两种反应底物条件下的表达水平说明了该菌更适宜在 $Na_2S_2O_3$ 环境下生存并将 $S_2O_3^{2-}$转化为 SO_4^{2-}，虽然硫氧化菌在 Na_2SO_3 环境下活性较低，但同样能够生长并将 SO_3^{2-}氧化成 SO_4^{2-}。因此，得到了硫氧化菌完整的代谢途径，如图 6 所示。



(a) qPCR expression levels of *sox* and *sse* genes



(b) Expression level of qPCR of *soe* gene

图 5 相关硫氧化基因的 qPCR 表达情况

Fig. 5 qPCR expression of sulfur oxidation genes

在 $Na_2S_2O_3$ 环境下，硫氧化菌有 2 条途径：主要通路，$S_2O_3^{2-}$在 *SoxA* 酶作用下转化为中间态 S-S-SO_3，再通过 *SoxY*、*SoxZ*、*SoxB* 酶催化形成最终产物 SO_4^{2-}，这与目前国际公认的硫氧化菌代谢途径相吻合；另一条通路，$S_2O_3^{2-}$经 *SseA* 酶先转化为

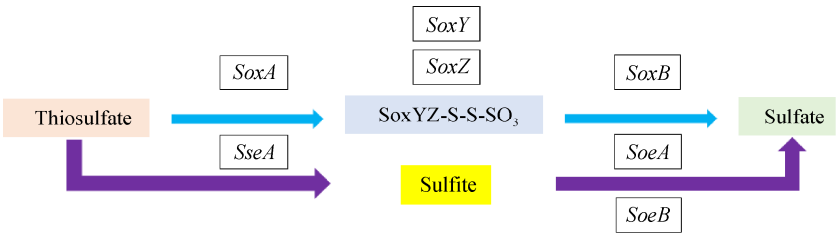


图 6 硫氧化完整代谢途径图

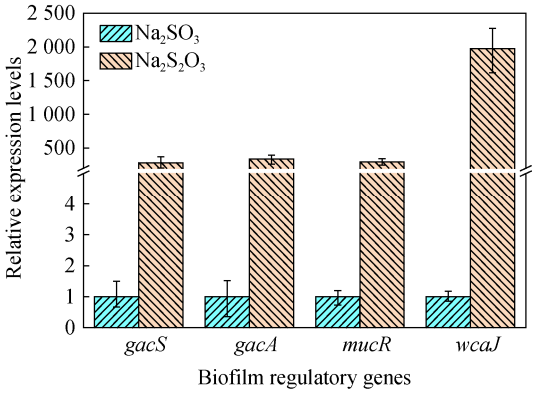
Fig. 6 Complete metabolism pathway of sulfur-oxidizing bacteria

SO_3^{2-}，再经 *Soe* 酶将 SO_3^{2-}转化为 SO_4^{2-}。这条代谢途径证明了硫氧化菌还存在另外一种硫氧化特性，若硫氧化菌在 *sox* 基因缺失的情况下，同样可以利用硫代硫酸盐经亚硫酸盐再转化为硫酸盐对砂浆造成腐蚀作用。

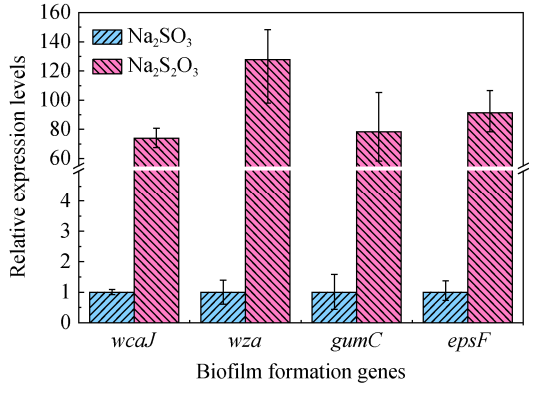
此外，若仅给硫氧化菌提供 Na_2SO_3 作为底物，仍存在通路即直接将 SO_3^{2-}转化为 SO_4^{2-}，但硫氧化菌的 *soeA*，*soeB* 基因单一表达能力较差，需要在 *sox* 基因和 *sseA* 基因协同下才能表达，说明若环境中不含有 $Na_2S_2O_3$ 而仅有 Na_2SO_3 为营养物质，那么由硫氧化菌生物氧化代谢造成的腐蚀作用较低。

(2)　生物膜基因表达

图 7 为硫氧化菌生物膜基因在两种反应底物下的表达水平，其中 *gacS*、*gacA*、*mucR* 为硫氧化菌生物膜的调控基因，其 qPCR 表达水平如图 7a 所示；*wza*、*gumC*、*epsF* 为硫氧化菌生物膜的组分基因，其 qPCR 表达水平如图 7b 所示；*wcaJ* 属于多功能基因，在生物膜的调控和组分形成中均发挥着重要作用。



(a) qPCR expression level of biofilm regulatory genes



(b) QPCR expression level of biofilm component genes

图 7　生物膜相关基因的 qPCR 表达情况

Fig. 7　qPCR expression of biofilm-related genes

从图 7a 可以看出，相比于 Na_2SO_3 培养条件，在 $Na_2S_2O_3$ 环境下的生物膜调控基因表达显著上调，其中 *gacS*、*gacA*、*mucR* 基因的表达水平约为 Na_2SO_3 环境下的 300 倍，而 *wcaJ* 基因在生物膜的调控过程中表达水平约为 Na_2SO_3 环境下的 2 000 倍，说明在 $Na_2S_2O_3$ 环境下更容易调控生物膜的形成。从图 7b 可以看出，相比于 Na_2SO_3 培养条件，在 $Na_2S_2O_3$ 环境下的生物膜组分基因的表达水平同样较为明显，其中 *wcaJ*、*wza*、*gumC*、*epsF* 基因分别上涨了 74 倍、128 倍、78 倍、91 倍，说明在 $Na_2S_2O_3$ 环境下生物膜相关组分的分泌水平更高。

综上说明，硫氧化菌在 $Na_2S_2O_3$ 环境下的生物膜调控基因和组分基因表达水平都明显高于 Na_2SO_3 环境，因而从分子生物学角度证明 $Na_2S_2O_3$ 为硫氧化菌的最佳反应底物，且相比于 Na_2SO_3 作为反应底物更容易形成生物膜。

2.2　不同底物下砂浆及生物膜外观形貌变化

由于 Na_2S 作为底物时并不适于硫氧化菌的生长繁殖，因此分别以 $Na_2S_2O_3$ 和 Na_2SO_3 为反应底物培养菌液浸泡砂浆试样，每 15 d 记录砂浆试样的外观变化及硫氧化菌的附着生长情况，如表 3 所示。其中 A1、A2 分别为 $Na_2S_2O_3$、Na_2SO_3 作为底物浸泡的砂浆外观形貌，B1、B2 分别为超景深显微镜下 $Na_2S_2O_3$、Na_2SO_3 作为底物浸泡的生物膜附着形貌。

观察表 3 中 A1 和 B1 列所示结果可知，砂浆试样在以 $Na_2S_2O_3$ 为底物培养的菌液中浸泡 15 d 时，已在砂浆气液交界面处开始形成黏稠状的生物膜，此时的砂浆试样外观没有明显变化；当浸泡龄期为 30 d 时，砂浆试样表面分泌的生物膜增多，且砂浆试样液面下浸泡菌液的部位出现墨绿色的显色现象。这是由于硫氧化菌为耗氧菌，在繁殖生长过程中消耗了菌液中溶解的氧气，低浓度的氧气含量导致了浸泡部分水泥成分中的 FeS 和 MnS 等微量物质不能被氧化而发生显色反应[30]。当浸泡龄期继续达到 45、60、75、90 d 时，砂浆表面生物膜的附着范围更广，向液面下的砂浆区域扩展且厚度也在不断增加，而砂浆浸泡部分由墨绿色变为黑色，随着龄期的增加，显色现象更为严重。

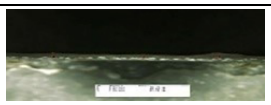
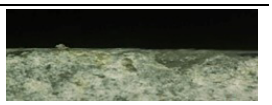
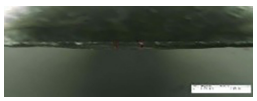
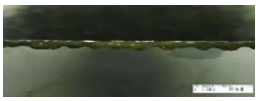
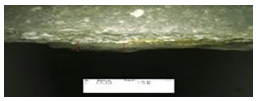
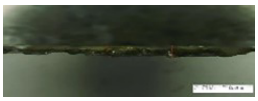
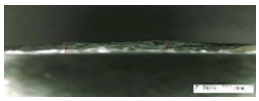
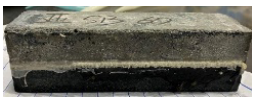
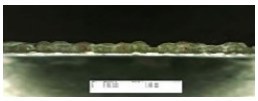
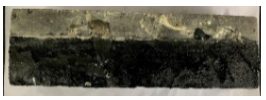
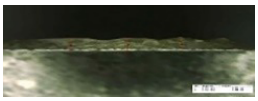
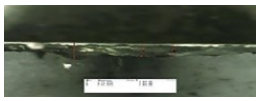
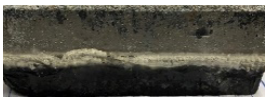
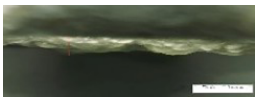
观察表 3 中 A2 和 B2 列所示结果可知，砂浆试样在以 Na_2SO_3 为底物培养的菌液中浸泡 15 d 时没有附着物形成，同时砂浆外观上也没有出现变化；当浸泡龄期为 30 d 时，砂浆气液交界面出现线性的黄色絮状物附着，且浸泡菌液的部位开始出现轻微

显色反应；当浸泡龄期达到 45 d 时，砂浆气液交界面处的絮状物变为云团状且厚度变大，此时砂浆试样浸泡部位全部出现显色反应；当浸泡龄期继续达到 60、75 d 和 90 d 时，砂浆表面的生物膜厚度不断增加，且砂浆表面浸泡菌液部位显色反应相对于 $Na_2S_2O_3$ 组更加明显，其原因是溶液中的 Na_2SO_3 极易发生自然氧化反应，与氧气反应生成 Na_2SO_4，因而是由于溶液中的氧气消耗的更多所致。

由图 8 可看出，砂浆表面形成的生物膜是一种具有立体网状、疏松、多孔结构的微生物群落，其膜内结构错综复杂，有利于氧气和营养物质的运输以及代谢离子的渗透。结合图 9 的 EDS 分析，可以看出砂浆表面的主要元素为 O、C、S、P、Ca，O 元素含量最高，其值为 53.02%，C 元素含量为 7.26%，这是由于砂浆表面形成了生物膜，而膜成分中多糖和蛋白质的主要元素构成为 C 和 O[31]。

表 3 砂浆表面生物膜附着演变过程

Table 3 Evolution process of biofilm adhesion on mortar surface

Corrosion time/d	A1	B1	A2	B2
15				
30				
45				
60				
75				
90				

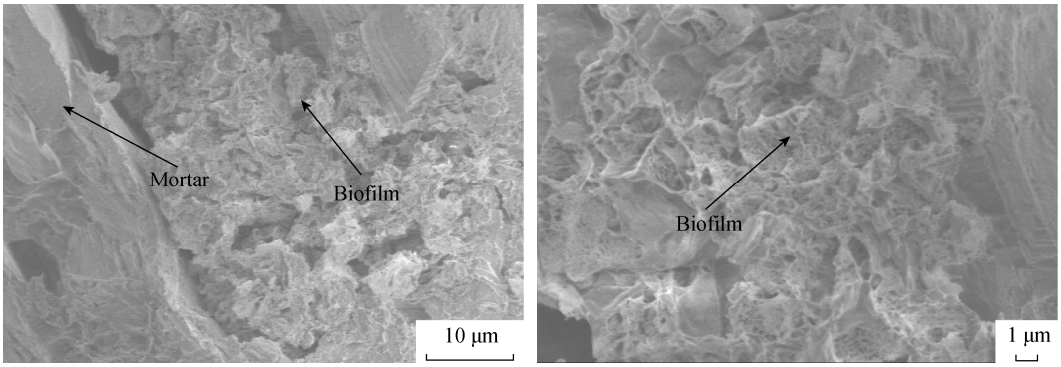


图 8 不同倍率下生物膜微观形貌

Fig. 8 Microscopic morphology of biofilms under different magnifications

另外，生物膜的成分里含有脂质，EDS 分析出的元素含有 8.08%的 P，其为脂类特有的元素[32]。综上，可证明生物膜的存在。

2.3 不同底物下硫氧化菌对砂浆宏观性能及微观结构的影响

2.3.1 质量变化率分析 试验组和对照组分别以 $Na_2S_2O_3$ 和 Na_2SO_3 为反应底物培养出菌液和无菌培养基浸泡砂浆试样，每 15 d 测试 1 次砂浆试样的质量变化率，如图 10 所示。由图 10 可以看出，以 $Na_2S_2O_3$ 为反应底物时，试验组试样在 45 d 前的质量变化不明显，15、30 d 的质量增长率分别为 –0.093%、0.017%，45 d 后的质量变化率明显增加。

其中 45 d、60 d、75 d 的质量增长率分别达到 0.16%、0.49%、1%，90d 的质量增长率为 1.04%，增长速率变缓。对照组在 60 d 后砂浆试样质量变化率才增加，在 90 d 质量变化率才达到 0.26%，原因是对照组溶液中的 SO_4^{2-}含量较低，而试验组的质量变化是由硫氧化菌代谢产生的 SO_4^{2-}侵蚀砂浆所形成的腐蚀产物造成的。

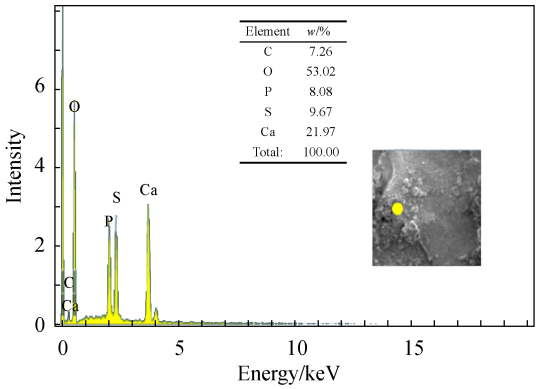


图 9　砂浆表面生物膜 EDS 验证

Fig. 9　Verification of biofilm on mortar surface by EDS

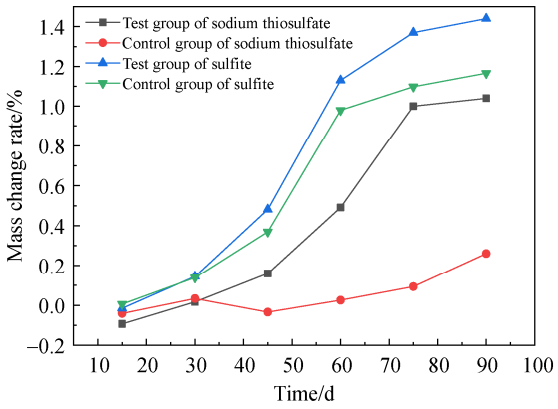


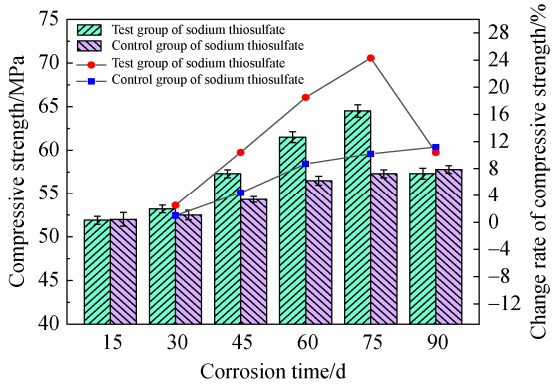
图 10　不同底物下砂浆质量变化率的变化

Fig. 10　Mass change rate of mortars under different substrates

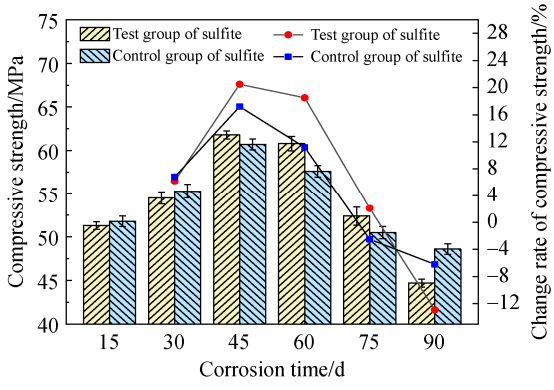
以 Na_2SO_3 为反应底物时，试验组和对照组的质量变化率增长趋势接近，15～60 d 呈现明显增长的趋势，并在 60 d 质量增长率达到了 1%左右，随后质量增长放缓。质量变化的原因同样与 SO_4^{2-}含量有关，反应前期质量变化率变化较快的原因是两组溶液中均含有大量的 SO_4^{2-}，后期质量变化放缓的原因是 SO_4^{2-}与砂浆内部的水化产物反应逐渐达到饱和。

对比不同反应底物的试验组质量变化率可以看出其增长趋势大致相同，但 Na_2SO_3 试验组的增长速率要明显大于 $Na_2S_2O_3$ 试验组，因为 Na_2SO_3 的自然氧化相较于 $Na_2S_2O_3$ 的生物氧化较快，在短时间内能迅速产生大量 SO_4^{2-}。

2.3.2　抗压强度分析　　试验组和对照组分别以 $Na_2S_2O_3$ 和 Na_2SO_3 为反应底物培养出菌液和无菌培养基浸泡砂浆试样，每 15 d 测试 1 次砂浆试样的抗压强度，如图 11 所示。由图 11 可以看出，以 $Na_2S_2O_3$ 为反应底物时，试验组在 75 d 之前的抗压强度均随着龄期的增加而增长，其中试验组的增长幅度要明显大于对照组，每 15 d 的增长量分别为 1.3、3.9、4.2、3.0 MPa，并在 75 d 达到峰值 64.5 MPa，随后 90 d 时其抗压强度降至 57.3 MPa。强度增长的原因是硫氧化菌代谢形成的 SO_4^{2-}与砂浆的含钙化合物反应形成膨胀性产物石膏，改善了砂浆的内部结构，使抗压强度升高；当砂浆内部孔隙达到饱和后，继续生成的石膏产生膨胀应力，使砂浆出现内部裂缝，进而破坏砂浆结构使抗压强度开始下降。对照组的抗压强度 90 d 内一直稳定缓慢增长，与溶液中的 SO_4^{2-}含量较低有关。



(a) Substrate environment of $Na_2S_2O_3$



(b) Substrate environment Na_2SO_3

图 11　不同底物下砂浆的抗压强度及抗压强度变化率

Fig. 11　Compressive strength of mortars under different substrates and change rate of compressive strength

以 Na_2SO_3 为反应底物时，试验组与对照组的抗压强度变化趋势大致相同，均在 45 d 之前不断增大，在 45 d 同时达到最大值，分别为 61.8 MPa 和 60.7 MPa。两组试样在 45 d 之后均开始下降，90 d 时其抗压强度降至 44.7 MPa。每个测试龄期的抗压强度差值都小于 3 MPa，原因是以 Na_2SO_3 为底物时，试验组和对照组溶液中的 SO_4^{2-} 浓度相差不大，均主要来源于 Na_2SO_3 的自然氧化。

相比于 2 种反应底物的试验组可以看出，2 组的抗压强度变化趋势同样是先增长后降低，但 Na_2SO_3 试验组的增长速率更快，且更早达到最大值，原因是 Na_2SO_3 试验组溶液中的 SO_4^{2-} 浓度明显高于 $Na_2S_2O_3$ 试验组所致。

2.3.3 矿物成分变化 砂浆遭受硫酸盐侵蚀进而引起工程结构破坏，通常是由于其内部矿物成分变化引起的。因此，采用 XRD、SEM-EDS 结合分析腐蚀龄期中硫氧化菌在不同硫化合底物下砂浆生物膜粘附区域处矿物成分的变化。

硫氧化菌由于其好氧特性及电性作用(砂浆中 Ca^{2+} 显正电，硫氧化菌显负电)大量聚集在砂浆气液交界面处形成生物性群落即生物膜，通过自身代谢作用将硫化合物转化为 SO_4^{2-}，如式(7)、式(8)[33]和式(9)[26]所示。

氧气充足时：$S_2O_3^{2-}+H_2O+O_2=2SO_4^{2-}+2H^+$ (7)

氧气不足时：$S_2O_3^{2-}+1/2O_2=SO_4^{2-}+S$ (8)

$2SO_3^{2-}+O_2=2SO_4^{2-}$ (9)

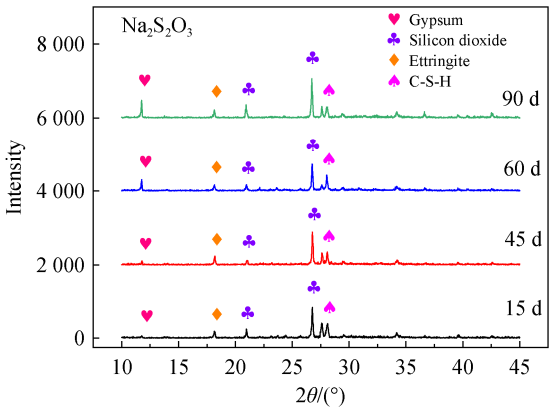
SO_4^{2-} 离子通过生物膜内孔洞通道，渗透进砂浆内部与氢氧化钙、碳酸钙等富钙相发生反应生成大量膨胀性石膏进而对砂浆造成靶向破坏，如式(10)和式(11)[34]所示。石膏的生成还会受到 pH 值和 SO_4^{2-} 浓度的共同影响(SO_4^{2-} 浓度≥1 400 mg/L，pH≤12.45)[35]，上述两种底物下 SO_4^{2-} 浓度和 pH 值测试结果与该条件相吻合。

$Ca(OH)_2+SO_4^{2-}aq.\rightarrow CaSO_4\cdot 2H_2O$ (10)

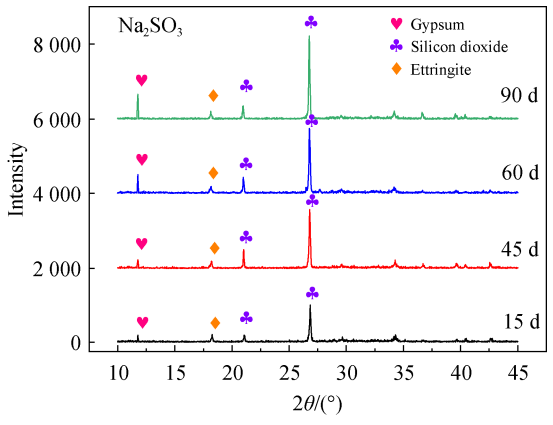
$CaCO_3+SO_4^{2-}aq.\rightarrow CaSO_4\cdot 2H_2O$ (11)

由图 12 可知，在所有样品中均发现了砂浆中的典型矿物成分，包括二氧化硅和钙矾石。最值得关注的是 2 种底物下砂浆的矿物组成中均发现了石膏衍射峰的存在且随着腐蚀龄期的增多结晶度和石膏含量也增高。图 12 a 和图 12 b 分别为 $Na_2S_2O_3$ 和 Na_2SO_3 作为硫化合底物时砂浆受侵蚀的矿物成分演变图。当腐蚀龄期 15 d 时，$Na_2S_2O_3$ 组石膏衍射峰并不明显，而 Na_2SO_3 组石膏衍射峰开始出现。当腐蚀龄期 45～90 d 时，2 组石膏衍射峰均随着腐蚀龄期的增多而增大，且 Na_2SO_3 组各龄期的峰值皆要高于 $Na_2S_2O_3$ 组。造成上述这种现象的主要是 Na_2SO_3 前期自身会发生快速的自然氧化反应，相对于 $Na_2S_2O_3$ 会产生更多的 SO_4^{2-}，与砂浆内部的氢氧化钙反应生成膨胀性的石膏。随着腐蚀龄期的增加使得砂浆内部微观结构变的更加致密，当膨胀到一定程度将导致砂浆表面浆皮脱落进而劣化。

由图 13 可知 2 种底物情况下 90 d 后不同倍率下砂浆生物膜附着处均发现大量板状晶体的存在。当底物为 Na_2SO_3 时，石膏的结晶度和含量均优越于 $Na_2S_2O_3$ 底物。根据 EDS 结果(如图 14 所示)可知，处于 2 种底物下的砂浆气液交界面处主要元素均由 C、O、P、S 及 Ca 组成。生物膜中的多糖、蛋白质和脂类的主要元素为 C、O、P[31]，S、Ca 元素是石膏的元素组成且 Na_2SO_3 组的 S、Ca 元素含量皆高于 $Na_2S_2O_3$ 组，这间接证明 90 d 时其石膏生成量高于 $Na_2S_2O_3$ 组。



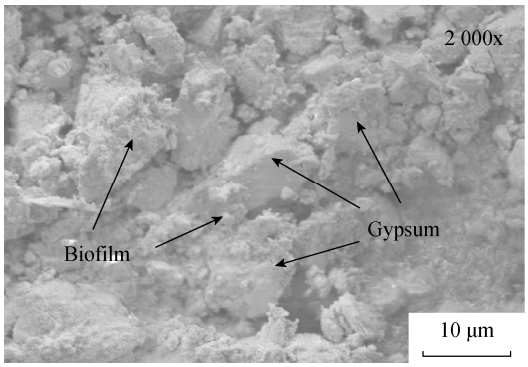
(a) Sodium thiosulfate substrate



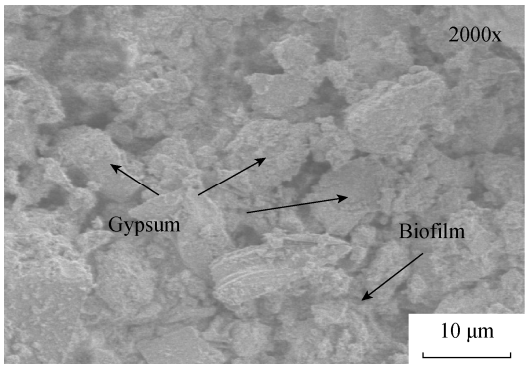
(b) Sodium sulfite substrate

图 12 不同硫化合底物下砂浆生物膜附着处矿化产物 XRD 谱

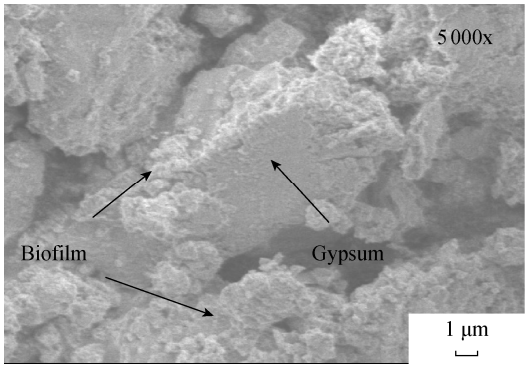
Fig. 12 XRD patterns of mineralized products at the attachment of mortar biofilm under different sulfide substrates



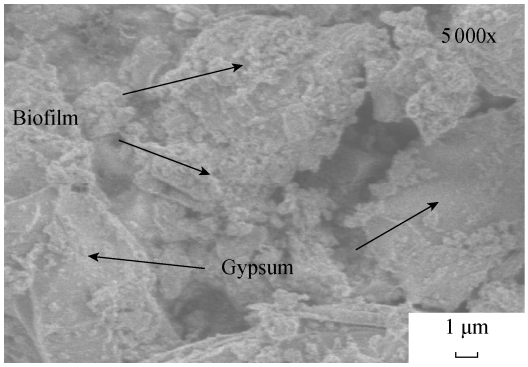
(A1) Sodium thiosulfate substrate group



(B1) Sodium sulfite substrate group



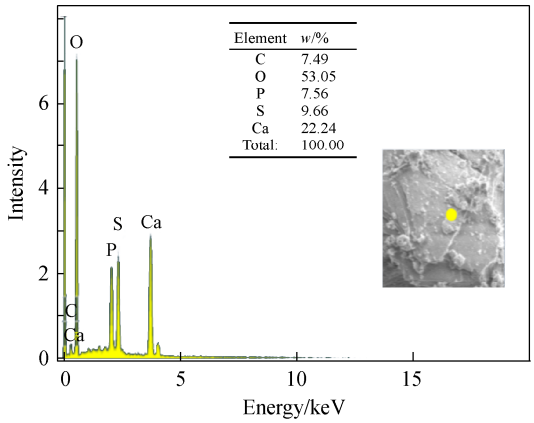
(A2) Sodium thiosulfate substrate group



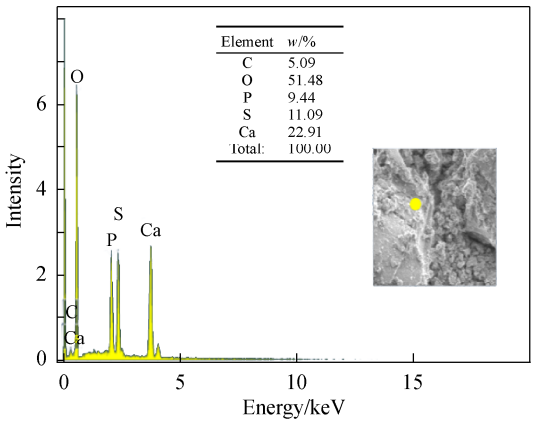
(B2) Sodium sulfite substrate group

图 13　腐蚀 90 d 时不同倍率下砂浆生物膜附着处 SEM 照片

Fig. 13　SEM images of mortar biofilm attachment under different magnifications after 90-day corrosion



(a) $Na_2S_2O_3$ as a substrate



(b) Na_2SO_3 as a substrate

图 14　龄期为 90 d 时砂浆表面 EDS 分析

Fig. 14　EDS spectra of the mortar surface cured for 90 days

3　结论

1) 硫氧化菌在以 $Na_2S_2O_3$ 为底物的环境中生长最优，Na_2SO_3 次之，Na_2S 底物水解呈高碱性不利于菌的生长。$Na_2S_2O_3$ 和 Na_2SO_3 为底物所产生的 SO_4^{2-}均存在自然氧化和生物氧化 2 种途径，其中 $Na_2S_2O_3$ 为底物形成的 SO_4^{2-}主要由硫氧化菌代谢作用产生，而 Na_2SO_3 为底物形成的 SO_4^{2-}主要由自然氧化产生。

2) 硫氧化菌代谢途径中不仅存在直接将 $S_2O_3^{2-}$转化为 SO_4^{2-}的途径，还存在先经 *SseA* 酶转化为 SO_3^{2-}，再经 *Soe* 酶转化为 SO_4^{2-}的途径，其更适宜在 $Na_2S_2O_3$ 环境中将 $S_2O_3^{2-}$和 SO_3^{2-}转化为 SO_4^{2-}，且生物膜调控基因和组分基因表达水平均显著高于 Na_2SO_3 环境，更易于调控生物膜的形成。

3) 通过对砂浆试样 90 d 生物膜粘附处不同硫化合底物环境浸泡下的砂浆矿物组成分析，均发现了石膏衍射峰的存在且同一龄期 Na_2SO_3 为底物时

石膏峰值明显高于 $Na_2S_2O_3$ 为底物时的峰值，主要是由于 Na_2SO_3 自然氧化迅速，其转化成的 SO_4^{2-} 浓度明显高于 $Na_2S_2O_3$ 生物氧化成的浓度。同时结合质量变化率、抗压强度变化率以及微观结构分析表明硫氧化菌在 $Na_2S_2O_3$ 和 Na_2SO_3 底物下主要分别以生物氧化和自然氧化成 SO_4^{2-} 侵蚀砂浆与内部含钙化合物生成膨胀性石膏填补孔隙进而造成砂浆劣化。

参考文献:

[1] O'CONNELL M, MCNALLY C, RICHARDSON M G, et al. Biochemical attack on concrete in wastewater applications: A state of the art review[J]. Cem Concr Compos, 2010, 32(7): 479–485.

[2] BELIE N D, MONTENY J, BEELDENS A, et al. Experimental research and prediction of the effect of chemical and biogenic sulfuric acid on different types of commercially produced concrete sewer pipes[J]. Cem Concr Res, 2004, 34(12): 2223–2236.

[3] JIANG G, ZHOU M, CHIU T H, et al. Wastewater-enhanced microbial corrosion of concrete sewers[J]. Environ Sci Technol, 2016, 50(15): 8084–8092.

[4] PARKER C D. The corrosion of concrete 1. The isolation of a species of bacterium associated with the corrosion of concrete exposed to atmospheres containing hydrogen sulphide[J]. Aust J Exp Biol Med Sci, 1945, 23(2): 91–98.

[5] VOLLERTSEN J, NIELSEN A H, JENSEN H S, et al. Corrosion of concrete sewers-The kinetics of hydrogen sulfide oxidation[J]. Sci Total Environ, 2008, 394(1): 162–170.

[6] WAHSHAT T M. Sulfur mortar and polymer modified sulfur mortar lining for concrete sewer pipe[D]. Ames: Lowa State University, 2001.

[7] ALEXANDER M G, FOURIE C. Performance of sewer pipe concrete mixtures with portland and calcium aluminate cements subject to mineral and biogenic acid attack[J]. Mater Struct, 2011, 44(1): 313–330.

[8] DIERCKS M, SAND W, BOCK E, et al. Microbial corrosion of concrete[J]. CMLS, 1991, 47(6): 514–516.

[9] GRENGG C, MITTERMAYR F, BALDERMANN A, et al. Microbiologically induced concrete corrosion: A case study from a combined sewer network[J]. Cem Concr Res, 2015, 77: 16–25.

[10] ISLANDER R L, DEVINNY J S, MANSFELD F, et al. Microbial ecology of crown corrosion in sewers[J]. J Environ Eng, 1991, 117(6): 751–770.

[11] XUAN L, ULRIKE K, GUANGMING J, et al. The ecology of acidophilic microorganisms in the corroding concrete sewer environment[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 683.

[12] LING Alison L, ROBERTSON Charles E, HARRIS J Kirk, et al. High-resolution microbial community succession of microbially induced concrete corrosion in working sanitary manholes[J]. Plos One, 2015, 10(3): 0116400.

[13] MORI T, KOGA M, HIKOSAKA Y, et al. Microbial corrosion of concrete sewer pipes, H_2S production from sediments and determination of corrosion rate[J]. Water Sci Technol, 1991, 23(7–9): 1275–1282.

[14] MORI T, NONAKA T, TAZAKI K, et al. Interactions of nutrients, moisture and pH on microbial corrosion of concrete sewer pipes[J]. Water Res, 1992, 26(1): 29–37.

[15] OKABE S, ODAGIRI M, ITO T, et al. Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(3): 971–980.

[16] PADIVAL N A, WEISS J S, ARNOLD R G. Control of thiobacillus by means of microbial competition-implications for corrosion of concrete sewers[J]. Water Environ Res, 1995, 67(2): 201–205.

[17] PARKER C D. Mechanics of corrosion of concrete sewers by hydrogen sulfide[J]. Sewage Ind Wastes, 1951, 23(12): 1477–1485.

[18] SAND W, BOCK E J E T L. Concrete corrosion in the Hamburg sewer system[J]. Eviron Techonl Lett, 1984, 5(12): 517–528.

[19] SARICIMEN H, SHAMEEM M, BARRY M S, et al. Durability of proprietary cementitious materials for use in wastewater transport systems[J]. Cem Concr Compos, 2003, 25(4-5): 421–427.

[20] 韩静云, 张小伟, 田永静, 等. 污水处理系统中混凝土结构的腐蚀现状调查及分析[J]. 混凝土, 2000, (11): 52–54+63.
Han Jingyun, Zhang Xiaowei, TIAN Yongjing, et al. Concrete(in Chinese), 2000, (11): 52–54+63.

[21] PARKER C D. The corrosion of concrete—Isolation of a species of bacterium associated with the corrosion of concrete exposed to atmospheres containing hydrogen sulphide[J]. Exp Biol Med Sci, 1945, 23: 14–17.

[22] 韩静云, 戴超, 郜志海, 等. 混凝土的微生物腐蚀[J]. 材料导报, 2002, (10): 45–47.
HAN Jingyun, DAI Chao, GAO Zhihai, et al. Mater Rev(in Chinese), 2002, (10): 45-47.

[23] GRANDCLERC A,GUÉGUEN-MINERBE M,NOUR I, et al. Impact of cement composition on the adsorption of hydrogen sulphide and its subsequent oxidation onto cementitious material surfaces[J]. Constr Build Mater, 2017, 152: 576–586.

[24] SUN X, JIANG G, BOND P L, et al. Impact of fluctuations in gaseous H_2S concentrations on sulfide uptake by sewer concrete: The effect of high H_2S loads[J]. Water Res, 2015, 81: 84–91.

[25] GHOSH W, DAM B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea[J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(6): 999–1043.

[26] 刘阳, 姜丽晶, 邵宗泽. 硫氧化细菌的种类及硫氧化途径的研究进展[J]. 微生物学报, 2018, 58(2): 191–201.
LIU Yang, JIANG Lijing, SHAO Zongze. Acta Microbiol Sin(in Chinese), 2008, 58(2): 191–201.

[27] LEEMANN A, LOTHENBACH B, HOFFMANN C. Biologically induced concrete deterioration in a wastewater treatment plant assessed by combining microstructural analysis with thermodynamic

modeling[J]. Cem Concr Res, 2010, 40(8): 1157–1164.

[28] 荣辉, 高瑞晓, 高礼雄, 等. 污水半浸环境下混凝土的微生物腐蚀研究[J]. 混凝土, 2019, (12): 18–22+28.
RONG Hui, GAO Ruixiao, GAO Lixiong, et al. Concrete(in Chinese), 2019, (12): 18–22+28.

[29] KYUHYEONG PARK, PARK S, CHOI J, et al. Influence of excess sulfide ions on the malachite-bubble interaction in the presence of thiol-collector[J]. Sep Purif Technol, 2016, 168: 1–7.

[30] 姜磊. 硫酸盐侵蚀环境下混凝土劣化规律研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2014.
JIANG Lei. Study on Deterioration of Concrete under Sulfate Attack(in Chinese, dissertation). Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2014.

[31] ANNUK H, MORAN A P. Microbial biofilm-related polysaccharides in biofouling and corrosion[J]. Microb Glycobiol, 2010, 781–801.

[32] KASSINGER S J, HOEK M L V. Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target[J]. Synthetic Syst Biotechnol, 2020, 5(1): 1–10.

[33] ALCÁNTARA S,VELASCO A,REVAH S. Sulfur formation by steady-state continuous cultures of a sulfoxidizing consortium and Thiobacillus thioparus ATCC 23645.[J]. Environ Technol, 2004, 25(10): 1151–1157.

[34] SOLEIMANI S, ORMECI B, ISGOR O B. Growth and characterization of Escherichia coliDH5α biofilm on concrete surfaces as a protective layer against microbiologically influenced concrete deterioration (MICD)[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(3): 1093–1102.

[35] BELLMANN F, MOSER B, STARK J. Influence of sulfate solution concentration on the formation of gypsum in sulfate resistance test specimen[J]. Cem Concr Res, 2006, 36(2): 358–363.