

研究报告

脱氮硫杆菌改良的耐热诱变及其诱变特性

刘怀珠¹, 于慧艳², 胡彬彬¹, 姚永红³, 张洋¹, 赵亮¹, 朱广斌⁴, 吴新世^{*4}

1 唐山冀油瑞丰化工有限公司, 河北 唐山 063200

2 中国石油天然气股份有限公司冀东油田分公司勘探开发建设监督中心, 河北 唐山 063200

3 中国科学院天津工业生物技术研究所 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

4 天津理工大学 化学化工学院, 天津 300384

刘怀珠, 于慧艳, 胡彬彬, 姚永红, 张洋, 赵亮, 朱广斌, 吴新世. 脱氮硫杆菌改良的耐热诱变及其诱变特性[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 168-185.

LIU Huaizhu, YU Huiyan, HU Binbin, YAO Yonghong, ZHANG Yang, ZHAO Liang, ZHU Guangbin, WU Xinshi. Improved mutagenesis and mutagenic characteristics of thermotolerant strains of *Thiobacillus denitrificans*[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 168-185.

摘要:【背景】菌种诱变尤其是化学诱变已有诸多报道, 应用十分广泛, 但大多都为常规诱变。这样的诱变通常不对细胞做任何特殊处理, 诱变过程随机、诱变不可控, 导致诱变效率低下。【目的】筛选出耐热的同步脱硫脱氮菌株, 对菌种进行改良的耐热诱变, 同时对诱变剂进入细胞内外的情况进行较为详细的探讨。【方法】以脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)为研究对象, 对其同时进行常规诱变和改良的耐热诱变。在改良的诱变中, 诱变之前需先采用哌嗪-1,4-二乙磺酸(piperazine-1,4-diethylsulfonic acid, PESA)法将对数生长期的细胞处理成易感态, 以此改变细胞膜的透过性, 然后分别加入不同体积(0.5%–3.0%)的诱变剂硫酸二乙酯(diethyl sulfate, DES), 在设定温度 45 °C 诱变 20 min。在突变株的筛选上采用升温培养的方式在 47 °C 测试其耐热能力和脱硫脱氮性能, 以得到真正的耐热突变株。另一方面, 在菌株诱变的同时, 利用 $S_2O_3^{2-}$ 可终止 DES 诱变的特性对诱变剂在细胞内外的分布状况进行分析, 对不同方案下的实验结果进行较为深入的探讨。

【结果】在得到耐热的同步脱硫脱氮高性能突变株的同时, 通过两种方案的对比实验, 证实了改变细胞膜透过性对诱变剂进入细胞内有明显的促进作用。达到同样的诱变效果所需诱变剂的剂量中, 改良的耐热诱变约为常规诱变的 1/10–1/9; 诱变剂进入胞内的比率中, 前者约占 DES 加入总量的 41.8%–40.4% 左右, 而后者仅占 5.6%–4.4%; 细菌的正突变率可能与进入胞内的诱变剂剂量密切相关, 改良的诱变中进入胞内的 DES 剂量更适合于得到较高的正突变率, 但诱变剂剂量不能决定单个突变如突变株的耐热性、硫化物高去除率等在哪种情况下或何时发生; 证实了诱变剂进

资助项目: 高校产学研联合创新项目(JDYT-rfhg-2022-JS-1872)

This work was supported by the University Industry-University-Research Joint Innovation Project (JDYT-rfhg-2022-JS-1872).

*Corresponding author. E-mail: webwxs@sina.com

Received: 2024-04-07; Accepted: 2024-05-16; Published online: 2024-06-19

入胞内的最大剂量取决于细胞自身的承载能力,与诱变方案无关。产物分析实验表明, $S_2O_3^{2-}$ 可用于终止 DES 诱变。【结论】对细胞先进行易感态处理后诱变,再通过升温复筛,最终得到 7 株耐热能力提高的脱硫脱氮高性能突变株,为菌种诱变的相关研究提供新思路。

关键词: 脱氮硫杆菌; 改良的耐热诱变; 耐热突变株; 诱变剂的分布状况

Improved mutagenesis and mutagenic characteristics of thermotolerant strains of *Thiobacillus denitrificans*

LIU Huaizhu¹, YU Huiyan², HU Binbin¹, YAO Yonghong³, ZHANG Yang¹, ZHAO Liang¹, ZHU Guangbin⁴, WU Xinshi^{*4}

1 Tangshan Jiyou Ruifeng Chemical Limited Company, Tangshan 063200, Hebei, China

2 Exploration and Development Construction Supervision Center of Jidong Oilfield Branch of China National Petroleum Corporation, Tangshan 063200, Hebei, China

3 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

4 School of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China

Abstract: [Background] Extensive studies have been carried out on strain mutagenesis, especially chemical mutagenesis, in strain breeding. However, most of these studies employ conventional mutagenesis, which usually does not involve any special treatment of target cells and has low mutagenic efficiency due to random and uncontrollable mutagenic process. [Objective] To screen thermotolerant strains for simultaneous sulfide and nitrate removal, we improved the mutagenic scheme on the target strain and studied the entry of mutagen into the cells. [Methods] Both conventional mutagenesis and improved mutagenesis were carried out for *Thiobacillus denitrificans*. In the improved mutagenesis, piperazine-1,4-diethylsulfonic acid (PESA) was used to treat the exponential-phase cells into a susceptible state before mutagenesis to change the permeability of cytoplasmic membrane, and then different volumes (0.5‰–3.0‰) of the mutagen diethyl sulfate (DES) were separately added into the cell suspension for mutagenesis at a set temperature of 45 °C for 20 min. The thermotolerance and sulfide and nitrate removal performance were tested at 47 °C to obtain the thermotolerant mutants. During the process of strain mutagenesis, we used $S_2O_3^{2-}$, which could terminate DES mutagenesis, to observe the distribution of mutagen inside and outside the cells and compared the experimental results under different mutagenic schemes. [Results] We obtained the thermotolerant mutants capable of simultaneously removing sulfide and nitrate. The comparison of the two mutagenic schemes proved that changing the permeability of cytoplasmic membrane promoted the entry of mutagen into the cells. To achieve the same mutagenic effect, the improved mutagenesis only needed 1/10–1/9 of mutagen required by conventional mutagenesis. The percentage of mutagen entering the cells was 41.8%–40.4% of the total DES added in the improved mutagenesis and only 5.6%–4.4% in the conventional mutagenesis. The forward mutation efficiency might be closely related to the dosage of mutagen entering the cells, and the dosage in the improved mutagenesis was more suitable for achieving higher forward mutation efficiency. However, the

dosage of mutagen did not determine under which circumstance or when individual mutation, such as thermotolerance or higher sulfide removal efficiency of mutants, probably occurred. The maximum dosage of mutagen entering cells depended on cell's loading capacity and was independent of mutagenic schemes. The product analysis showed that $S_2O_3^{2-}$ could be used to terminate the mutagenesis triggered by DES. **[Conclusion]** After treating the cells into a susceptible state, mutagenesis was carried out. And then through temperature-rise screening, 7 thermotolerant mutants with high-performance for sulfide and nitrate removal were obtained, providing new ideas for research on strain mutagenesis.

Keywords: *Thiobacillus denitrificans*; improved mutagenesis of thermotolerance; thermotolerant mutant; distribution of mutagen inside and outside cells

油田采出废水中常含有高浓度硫化物(S^{2-} , HS^- , H_2S)^[1]。这些硫化物能强烈腐蚀生产设备, 直接排放则会污染环境、危害人体健康, 因此排放前需将这些有毒有害的污染物从废水中除去^[2]。生物法去除这些污染物常用到脱硫微生物。一些自养型脱硫微生物如脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)^[3-4]、排硫硫杆菌(*T. thioparus*)^[5]、氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)^[6]等一般都具有良好的同步脱硫脱氮能力, 使用它们可以很方便地去除废水中的硫化物。这些菌株通常需在常温(20–35 °C)下才能充分发挥其脱硫脱氮性能, 一旦温度升高到一定范围如 40–45 °C, 其脱硫能力会大大降低^[7]。然而, 含硫废水从油井中的平均出井温度约为 60 °C, 处理过程中温度虽有下降, 一般也不低于 45–50 °C^[8]。若采用生物法进行废水脱硫, 就需要相应的功能菌株至少能耐受 45 °C 的温度。工业生产和科研中使用的自养型脱硫脱氮菌种的耐热性能却少有报道能达到或超过 45 °C。在嗜温性能上, 大多数脱硫菌株属于嗜中温菌(15–45 °C), 45 °C 对于多数细菌来说已是生命活动的极限温度^[7,9]。这些菌株在 45 °C 下基本停止生长, 其脱硫脱氮性能非常弱。用这些菌株很难去除油井采出废水中的硫化物, 这就要求筛选出耐热能力达到或超过 45 °C 且脱硫

脱氮性能不低于原始菌株的新菌株。

获得这些新菌株的常规方式通常是生理性适应或各种诱变。前者需要相关条件不断强化刺激, 相关刺激取消后, 其性能就会衰退。获得稳定性状的途径则通常采用诱变的方式: 单因素诱变或复合诱变^[10-11]。菌种诱变的工作量大、操作烦琐、效率低下, 尤其是化学诱变的效果差、致死率高、正变率低, 不易得到目的菌株^[12]。其中的原因及解决办法则是科研工作者们一直在努力探索的问题。细胞结构生物学家们认为, 细胞对进出胞内的物质有严格的限制选择性, 这种限制选择性主要通过细胞壁和细胞膜的功能来实现, 这限制了诱变剂进出细胞的自由度^[13]。据目前已有文献^[14-15]来看, 已报道的常规诱变则不对细胞的选择透过性做任何处理, 而是忽略或未考虑这些影响因素, 这样的诱变过程只能得到随机的、难以预测的结果。一直以来, 鲜有关于诱变时菌株细胞对于诱变剂的选择性和透过性等方面的研究报道。诱变剂能否进入细胞内以及进入胞内的剂量, 对诱变的效果有决定性的影响。因此, 本文尝试改进菌株耐热诱变的方法, 通过改变细胞膜对化学诱变剂的透过性来提高诱变剂对 DNA 的接触和诱变概率, 以提高筛选获得耐热突变高性能菌株的效率, 同时对诱变剂进入细

胞内的状况进行研究,考察诱变发生之前的中间过程及其对诱变效果的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

脱氮硫杆菌(*T. denitrificans*) LG-1,本实验室保存。

1.2 培养基

脱硫脱氮自养菌无机盐培养基,参照文献[16]进行配制。

脱硫脱氮自养菌无机盐硅胶平板培养基^[16]:取 5 mL 灭菌无机盐培养基溶液^[16],均匀涂布于已紫外灭菌(≥ 30 min)的硅胶平板上,待培养液渗透吸收 30 min 以上且倒置无水滴滴下时,紫外灭菌 30 min 以上,待用。

硅胶平板:参照文献[16]制作。

1.3 主要试剂和仪器

0.1 mol/L 哌嗪-1,4-二乙磺酸(piperazine-1,4-diethylsulfonic acid, PESA)缓冲液配制:参照文献[17]并做出改进:甘油 12%、0.3 mol/L CaCl_2 15%、PESA 母液 2%。其中,甘油和 CaCl_2 溶液 121 °C 湿热灭菌 30 min, PESA 母液经 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌,各组份按上述比例分别添加,以无菌去离子水补齐所需体积。

PESA 母液配制^[17]: 3.024 g PESA 溶于 8 mL 去离子水中, 5 mol/L KOH 调 pH 6.7,定容至 10 mL, 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌,分成若干小份, 2 mL/小份, -20 °C 冻存,可根据需要量倍增或倍减。

DES, 色谱纯, 菌株诱变剂, 天津江天化工有限公司生产; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 色谱纯, 用于终止 DES 诱变, 天津第一化学试剂厂生产。

超微量分光光度计, IMPLLEN 公司生产; 场发射扫描电镜, ZEISS 公司; X 射线衍射仪(X-ray diffractometer), Rigaku 公司; 气相色谱

仪(gas chromatograph, GC), Agilent 公司。

1.4 菌株诱变过程

1.4.1 绘制菌株的生长曲线

将菌株 LG-1 接入无机盐培养基^[16], 于 (30 \pm 1) °C 避光厌氧静置培养, 定时取样, 660 nm 波长处测其光密度值 OD_{660} , 以培养时间为横坐标, 以光密度 OD_{660} 为纵坐标绘制生长曲线, 确定菌株的对数生长期。

1.4.2 菌株易感态制备

参照文献[17]并改进,对培养至对数生长期(此时菌液光密度值 OD_{660} 约为 0.2–0.3)的细胞进行易感态制备。取 40 mL 菌液冰浴预冷 15 min, 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 40 mL PBS 缓冲液(pH 7.0)悬起菌体沉淀,再以同样的转速、温度和时间离心,重复 3 次,空干残余液体,收集管底菌体泥,用 10 mL 冰浴 0.1 mol/L PESA 缓冲液重悬菌体,冰浴 15 min 后再以 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min, 弃上清,空干残余液体,再用 1 mL 冰浴 PESA 缓冲液悬起管底菌体沉淀,制成易感态细胞,此易感态细胞需在冰浴下或 -20 °C 存放,且最多存放 10 h,所以通常为现用现制备。

1.4.3 菌株的单因素耐热诱变

取新鲜制备的易感态细胞各 10 mL, 分别加入冰浴 DES 0、5、10、15、20、25、30 μL , 每个体积下的样品制备两份。分别混匀,先冰浴 2 min,再 45 °C 热激 2 min,然后立即转入冰浴 2 min^[17]。其中第一份立即按照 1.6.1 节所述进行处理。另一份转入 45 °C、100 r/min 避光振荡诱变 20 min。按 2 倍 DES 体积分别加入 1.0 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 终止诱变^[18],再以 1 500 r/min 离心 5 min,取上层菌液,弃下层沉淀,向菌液中分别加入无机盐培养基 10 mL,于黑暗处 45 °C、100 r/min 振荡培养 2 h 后,以 PBS 缓冲液(pH 7.0)梯度稀释后取 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释液各 100 μL , 分别

涂布于紫外灭菌的硅胶平板培养基^[16], 45 °C黑暗静置培养 96 h, 计数各平板培养基长出的单菌落, 绘制 DES 诱变存活曲线。分别挑取单菌落接种至试管无机盐培养基中 120–150 r/min 避光振荡培养 96 h, 考察筛选到的各单菌株的脱硫脱氮性能, 挑选出耐热能力超过且脱硫脱氮性能不低于原始菌株的突变株, 绘制正突变曲线。

1.5 菌株耐热突变遗传性状的筛选

耐热突变株的升温测试: 为避免筛到假阳性突变株例如生理适应性菌株, 将初筛得到的耐热(45 °C)高性能脱硫菌株接种于无机盐硅胶平板培养基^[16], 47 °C避光静置培养, 120 h 后考察生长情况, 反复 3 次。挑取平板上长出的单菌落无菌转入试管无机盐培养液^[16]中, 无须再避光, 47 °C静置培养 120 h, 测其脱硫脱氮能力。此温度下的脱硫性能若低于原始菌株, 需在 45 °C下进一步考察其脱硫效率: 若某一突变菌株 47 °C不生长, 可将其重新涂布于硅胶平板培养基^[16]后 45 °C培养, 进行传代实验, 考察其生长情况和在液体培养基中的脱硫脱氮能力, 进一步排除假阳性菌株。

最终选取耐热性状稳定、脱硫性能良好的突变株用于去除油井废水(45 °C≤T≤47 °C)中的硫化物。

1.6 诱变发生前 DES 在细胞内外的分布状况分析

1.6.1 样品预处理

将 1.4.3 节得到的第一份样品以 1 500 r/min、4 °C离心 5 min, 取上层菌液和下层沉淀(记为“沉淀 1”)分别处理。先将上层菌液以 3 000 r/min、4 °C离心 15 min, 弃上清, 收集底部菌体, 用 10 mL 冰浴 PBS (pH 7.0)悬起菌体, 再以同样的转速、温度和时间离心, 反复 3 次。最后以冰浴无菌水 10 mL 悬起菌体, 进行超声波细胞破

碎(100 W, 破碎 10 min), 然后于 4 °C、1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 取下层沉淀, 以相同的温度、时间和转速离心上清液共 3 次, 每次弃上清, 收集并用无菌水洗涤沉淀, 得到沉淀 2 样品。向每份沉淀 2 样品中分别加入无菌水调至 10 mL, 再分别加入 2 倍于初始 DES 体积的 1.0 mol/L Na₂S₂O₃ 溶液^[18]。待二者反应后, 按文献[19-20]所述测试溶液中残余 S₂O₃²⁻对应的光密度值, 根据 S₂O₃²⁻的光密度 OD₂₁₇-浓度 *c* 标准曲线^[19]得到溶液中残余的 S₂O₃²⁻浓度, 从而间接得到进入胞内 DES 的量。

同理, 对沉淀 1 样品也分别洗涤离心后加无菌水调至 10 mL, 再分别加入 2 倍于初始 DES 体积的 1.0 mol/L Na₂S₂O₃ 溶液^[18]。待反应后, 测试溶液中残余 S₂O₃²⁻对应的光密度值, 从而间接得到胞外 DES 的量。

比较胞内和胞外 DES 的量, 分析这种控制诱变剂进入细胞的方式对诱变效果可能产生的影响。

1.6.2 光密度 OD₂₁₇-S₂O₃²⁻浓度 *c* 标准曲线^[19]

精密称取 Na₂S₂O₃·5H₂O 50.5 mg 置于 50 mL 容量瓶中, 加无菌水溶解并定容, 避光保存。精密量取上述新鲜配制的溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 分置于 25 mL 容量瓶中, 定容。217 nm 波长下采用超微量分光光度法^[20]测量各溶液的光密度值, 绘制 OD₂₁₇-S₂O₃²⁻浓度 *c* 标准曲线。

1.7 常规诱变过程

取新鲜培养的对数生长期细胞(OD₆₆₀≈0.2–0.3)各 10 mL, 分别加入 DES 0、50、100、150、200、250、300 μL, 每一体积下的样品分别制备两份, 混匀。其中第一份立即按 1.6.1 节所述进行处理。另一份按常规方式于 45 °C、100 r/min 避光振荡诱变 20 min。以 2 倍 DES 体积分别加入 1.0 mol/L Na₂S₂O₃ 终止诱变^[18], 再以 1 500 r/min

离心 5 min, 取上层菌液, 弃下层沉淀, 向菌液中分别加入无机盐培养基溶液 10 mL, 于 45 °C、100 r/min 黑暗处振荡培养 2 h 后, 以 PBS (pH 7.0) 梯度稀释后取 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释液各 100 μ L, 分别涂布于紫外灭菌的硅胶平板^[16], 45 °C 黑暗处静置培养 96 h, 计数各平板上长出的单菌落, 绘制 DES 诱变存活曲线。分别挑取单菌落转入试管无机盐培养基溶液^[16], 120–150 r/min 避光振荡培养, 考察筛选到的各突变株的脱硫脱氮性能, 挑选出耐热能力、脱硫脱氮性能均超过原始菌株的突变株, 绘制正突变曲线。

1.8 参数的检测与计算

样液中硫化物的检测方法参照文献[21], 对废水硫化物(以 S^{2-} 计)含量进行测定, 按公式(1)计算废水硫化物(以 S^{2-} 计)的浓度值:

$$y=0.9529x+0.0575, R^2=0.9994 (n=6) \quad (1)$$

其中, y 为废水 S^{2-} 光密度值 OD_{665} , x 为废水 S^{2-} 浓度(μ g/mL), 检测范围为 0.02–0.80 μ g/mL。

根据公式(1)计算得到废水中硫化物(以 S^{2-} 计)的各浓度值, 按公式(2)计算废水 S^{2-} 去除率:

$$r=(m-n)/m \times 100\% \quad (2)$$

其中, r 为 S^{2-} 去除率(%), m 为废水 S^{2-} 初始浓度(μ g/mL), n 为废水 S^{2-} 残余浓度(μ g/mL)。

$$\text{细菌存活率: } x=y/z \quad (3)$$

其中, x 为细菌存活率, y 为诱变后的活菌数, z 为诱变之前的原始活菌总数。

$$\text{正突变率: } a=b/c \quad (4)$$

其中, a 为细菌的正突变率, b 为诱变之后得到的耐热性能超过且脱硫能力不低于原始菌株的突变株数目, c 为诱变之后得到的耐热性能超过原始菌株的突变株总数。

2 结果与分析

2.1 菌株的诱变曲线

实验研究表明, 原始菌株在无机盐培养基

中生长的延迟期约为 0–24 h, 对数生长期约为 24–72 h, 72 h 后进入稳定期(生长曲线图略)。

对处于对数生长期的细胞参照 Xia 等^[22–24]报道的常规诱变方法进行诱变, 结果如图 1 所示。可以看出, 随着 DES 加入量增加, 菌株的存活率一直在降低。当加入量达到 300 μ L 时, 其存活率降低到 4.7%, 继续增大加入量细菌将全部死亡。同时, 随着 DES 用量增加, 菌株的耐热正突变率先增大后减小。当 DES 用量为 200 μ L 时, 菌株的正突变率达到最大值 18.9%。此后随着 DES 用量继续加大, 正突变率迅速减小, 这可能是由于 DES 用量增加, 细胞快速死亡所致。当 DES 加入量为 300 μ L 时, 菌株耐热正突变率减小到 0.9%, 逐渐趋于 0。与下述的改良诱变相比, 不对细菌进行透过性处理, 而只是采用常规方式诱变, 结果是低效的。

相较而言, 对菌株先进行易感态处理, 然后诱变, 结果表明(图 2), 细胞膜对非营养物质的透过率增加。随着诱变剂用量增加, 有更多 DES 透过细胞膜进入胞内, 提高了 DES 与 DNA 接触和诱变的概率。DES 对 DNA 的作用主要是负向的, 导致 DNA 损伤^[7,9], 菌株存活率逐步

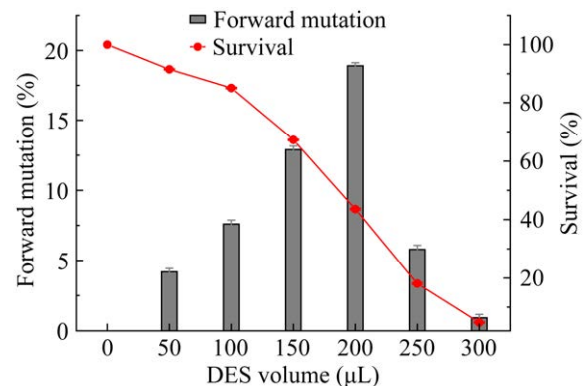


图 1 基于常规诱变的菌株诱变结果

Figure 1 Mutagenic result of the strain based on the conventional mutagenesis.

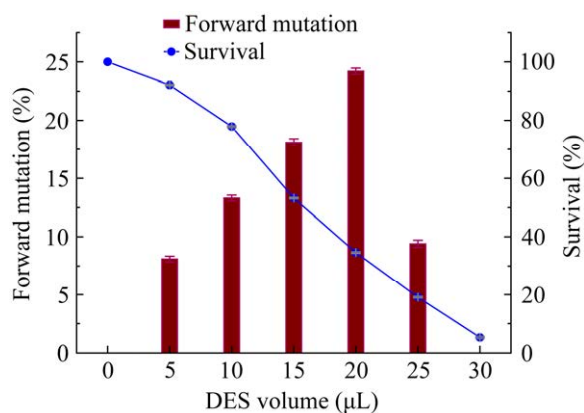


图2 基于改良诱变方案的菌株诱变曲线

Figure 2 Mutagenesis curve of the strain based on the improved mutagenic scheme.

降低。当DES加入量为30 μL、诱变20 min时,菌株存活率仅剩5.2% (4/77),继续增加DES的量,细菌将全部死亡。另一方面,随着DES用量增加,菌株的耐热正突变率呈现先增加后锐减的趋势。当DES用量增加到20 μL时,正突变率达到最大值24.2%,诱变效果显著。然而文献报道的DES单因素诱变的最大正突变率仅5.56%^[24]。新方案得到的正变率也比本实验中的常规诱变高出5.3% (24.2%–18.9%),这个提高值可能与进入胞内的诱变剂的量有关。由此可见,改变细胞膜的透过性以提高诱变剂向胞内的渗透进而提高正变率是可以实现的。只有正变率提高了,才能从中筛选到性能优异的耐热突变株。

本实验的特色之处在于对诱变剂进入细胞内采取措施进行了控制,而不是像常规方法那样只是将二者简单混合,让诱变剂随机进入细胞。这样处理过的细胞,当诱变剂进入胞内时受抑制的程度显著降低,因而有更多DES进入胞内。量化实验表明,胞内适量DES有利于提高细胞的正变率,结果是这种改良诱变的正变率比传统诱变提高了5.3%。

另外,从两种方案的诱变剂用量对比也可

以看出,对细菌进行易感态处理后,达到同样的诱变效果,DES用量只需常规诱变的1/10–1/9,而后者需要更多DES。实际上常规诱变中,大部分DES被截留在细胞膜外,只有极少量能进入胞内发挥诱变作用,并且进入胞内的DES可能也不是最适剂量,因而正变率低。

2.2 突变株的耐热特性

菌株经易感态处理并诱变后,经反复筛选并经传代验证,选出7株耐热性能(45 °C≤T≤47 °C)超过且脱硫能力不低于原始菌株的典型突变株(表1)。实验表明,原始菌株在30 °C对废水中硫化物(以S²⁻计)的去除率最高,达到(98.5±0.2)%,与文献报道的结果基本一致^[25-26];当温度升至35 °C时,其对硫化物的去除率快速降至(82.7±0.1)%;当温度为45 °C时,菌株几乎不生长或生长极其缓慢,脱硫效率低下,仅(9.3±0.2)%,可见温度对菌株的脱硫能力影响很大。经诱变筛选得到的7个突变株耐热能力均达到45 °C,且在同一温度(35、45、47 °C)下的脱硫性能均优于原始菌株,诱变效果显著。这可能是由于突变株的耐热性能提高^[27],因此其对硫化物的处理效果受温度升高影响不大。也可能是由于突变株基因组中与硫代谢相关的基因通过突变得加强而提高^[28]。将这些突变株分别在其相应耐受温度和30 °C交替培养连续传代12次,证实其耐热性能和脱硫脱氮能力稳定,未发生性状衰退现象,说明其性能为诱变遗传所获得,而非生理适应性变化。

在7个突变株中,mut 17、mut 43、mut 67这3个突变株均从47 °C分离得到,它们在47 °C长势良好且脱硫脱氮性能超过原始菌株。mut 43和mut 17是耐热能力最强且脱硫效率相对较高的2个突变株,可耐受温度47 °C,此时的S²⁻去除率分别为(58.5±0.2)%和(56.1±0.3)%,而45 °C的S²⁻去除率分别为(84.4±0.2)%和

表 1 突变株的耐热性能及脱硫能力^aTable 1 Respective thermotolerance and sulfide removal efficiency of each mutant^a

菌株 Strain	S ²⁻ 去除率 Removal efficiency of S ²⁻ (%)			耐受温度 ^c Tolerable temperature (°C) ^c	诱变剂量 Mutagenic dosage (μL)
	35 °C	45 °C	47 °C		
原始菌株 LG-1 Original strain LG-1		98.5±0.2 ^b		35	— ^d
原始菌株 LG-1 Original strain LG-1	82.7±0.1	9.3±0.2	2.4±0.3	35	—
突变株 mut 5 Mutant mut 5	92.3±0.3	84.1±0.2	38.9±0.2	45	10.0
突变株 mut 9 Mutant mut 9	88.7±0.1	83.8±0.3	43.4±0.2	45	15.0
突变株 mut 17 Mutant mut 17	86.9±0.3	82.1±0.1	56.1±0.3	47	20.0
突变株 mut 43 Mutant mut 43	91.2±0.1	84.4±0.2	58.5±0.2	47	10.0
突变株 mut 67 Mutant mut 67	90.8±0.2	83.1±0.2	50.7±0.3	47	20.0
突变株 mut 79 Mutant mut 79	92.6±0.3	85.8±0.1	36.4±0.2	45	15.0
突变株 mut 92 Mutant mut 92	87.6±0.3	82.1±0.2	33.7±0.2	45	25.0

^a: 表 1 中未列出硝酸盐氮的去除率; ^b: 30 °C下原始菌株的 S²⁻去除率; ^c: 各菌株的耐受温度为其能在无机盐硅胶平板培养基^[16]上生长的极限温度; ^d: 表 1 中“—”表示不对该菌株进行诱变。

^a: The removal efficiency of N-nitrate was not listed in table 1; ^b: The removal efficiency of S²⁻ catalyzed by the original strain at 30 °C; ^c: The tolerable temperature of each strain was the maximum value at which it could grow on the inorganic substance silica gel culture medium^[16]; ^d: “—” in table 1 indicated that mutagenesis for the strain was not carried out.

(82.1±0.1)%。因此它们都适合作为“中高温”含硫废水处理工程中的功能菌来使用。其中 mut 43 是从 DES 加入体积为 10.0 μL 的诱变中筛选得到, mut 17 为从 DES 加入体积为 20.0 μL 的诱变中筛选得到, 二者的电镜照片分别如图 3、图 4 所示。

mut 5、mut 9、mut 79 和 mut 92 这 4 个突变株为 45 °C 筛选得到。它们在 47 °C 长势不好, 但按 1.5 节所述经多轮复筛, 证实其为耐热突变株, 其耐热性能为诱变遗传所获得而非生理适应性变化。其中, mut 79 在耐受温度 45 °C 的突变株中脱硫效率最高, 为(85.8±0.1)%, 并且在所有突变株中脱硫效率也最高(45 °C)。mut 79 筛选自 DES 加入体积为 15.0 μL 的诱变中,

mut 5 筛选自 DES 10.0 μL 的诱变中。由此可见, 脱硫效率高的菌株耐受温度的能力不一定强, 反之亦然, 耐热能力强的菌株脱硫效率不一定最高。对于单个菌株而言, 单因素诱发的突变可能发生在 DNA 上的不同位点, 以某一性状为主: 或耐热能力强, 或脱硫效率高, 双向正突变(耐热且脱硫能力强)发生于一个细胞上的概率很低^[28]。

通过对突变株的耐热能力、硫化物最高去除率和最大正变率对应的 DES 加入体积数(图 2, 表 1)进行对比可以看出, 最耐热的突变株对应的加入体积数与最大正变率对应的体积数并不必然一致。同样地, 硫化物去除率最高的突变株对应的加入体积数与最大正变率对应的体积

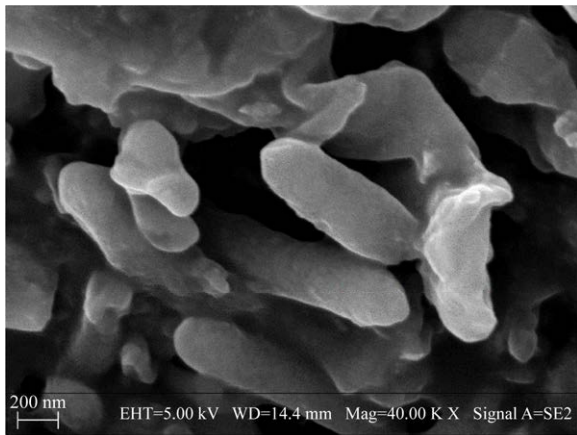


图3 突变株 mut 43 扫描电镜照片(40 000×)
Figure 3 SEM image of mutant mut 43 (40 000×).

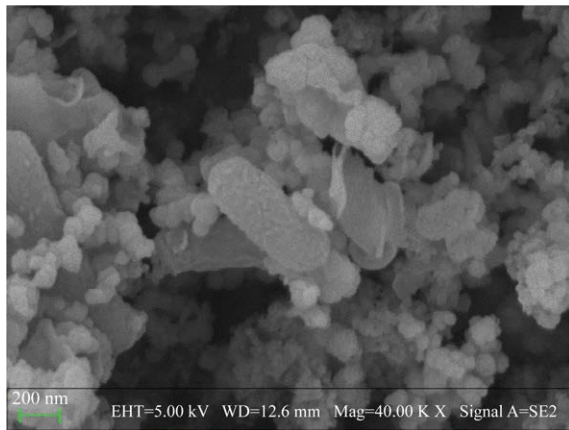


图4 突变株 mut 17 扫描电镜照片(40 000×)
Figure 4 SEM image of mutant mut 17 (40 000×).

数也可能不同。例如, 47 °C时 S^{2-} 去除率最大的 mut 43 对应的加入体积为 10.0 μL , 且它在 45 °C的 S^{2-} 去除率仅次于 mut 79, 它与最大正变率对应的加入体积数(20.0 μL)并不一致。脱硫效率最高的 mut 79 对应的体积数(15.0 μL)与最大正变率对应的体积数也不相同。最大正变率反映的是一种群体突变效应, 而耐热能力或 S^{2-} 最高去除率反映的是一种单一突变现象, 这种不一致性并不矛盾。同一种诱变剂在不同加入体积下分别得到了不同的突变性状: 或耐热能力强, 或脱硫效率高, 或正变率得到提高。

据此推测, DES 对 DNA 的诱变可能是非专一位点诱变或无差别诱变。下一步的研究工作应从两个方向着手: 生理水平上, 测试参与脱硫的或耐热的关键酶活性; 分子水平上, 进一步明确突变的精准位点, 以进一步探究 DES 诱变是特异性诱变还是无差别诱变。

2.3 DES 在细胞内外的分布状况

2.3.1 $S_2O_3^{2-}$ 的光密度 OD_{217} -浓度 c 标准曲线

$S_2O_3^{2-}$ 的光密度 OD_{217} -浓度 c 标准曲线方程: $OD_{217}=0.0153c-0.0012$, $R^2=0.9997$ ($n=6$), $S_2O_3^{2-}$ 浓度在 8.00–40.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好, 超过该范围则呈非线性。

2.3.2 常规诱变中 DES 在细胞内外的分布状况

将 1.7 节得到的 $S_2O_3^{2-}$ 样品适当稀释后采用超微量分光光度法^[20]于 217 nm 波长下测溶液紫外吸收值 OD_{217} , 再由标准曲线得到与胞内和胞外 DES 分别反应后剩余 $S_2O_3^{2-}$ 的量, 如表 2 所示。将胞内、胞外 DES 分别用 $S_2O_3^{2-}$ 处理后, 测剩余 $S_2O_3^{2-}$ 的光密度值 OD_{217} 。由光密度值基于标准曲线得到剩余 $S_2O_3^{2-}$ 含量(μg), 再将其换算成体积(μL , 表 2), 实验所用 $S_2O_3^{2-}$ 浓度 $c=1.0$ mol/L, 以质量表示的含量不再显示。

由表 2 数据可知, 与胞内 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ 远高于与胞外 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ 的量, 从而与胞内 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ 远少于与胞外 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ 的量。可以预测, 渗入胞内的 DES 的量远少于被截留在胞外的 DES。这一观点将被下面的实验结果所证实。

另外, 可以看出, 如果将与胞内 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ 和与胞外 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ 二者的量进行加和(如 2.15+35.82), 此值远小于当初加入的 $S_2O_3^{2-}$ 的总量(如 100 μL)。可能是因为与胞内 DES 的反应和与胞外 DES 的反应这两个反应体系不同。具体原因有待进一步探索。

表 2 常规诱变中, $S_2O_3^{2-}$ 对应的光密度值 OD_{217} 与其浓度的关系Table 2 Relationship between the optical density OD_{217} of $S_2O_3^{2-}$ and its concentration in the conventional mutagenesis

条目 Item	DES 加入量 Dosage of DES added (μL)						
	0	50	100	150	200	250	300
$S_2O_3^{2-}$ 加入量 Dosage of $S_2O_3^{2-}$ added (μL)	0	100	200	300	400	500	600
与胞内 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ OD_{217} 值* OD_{217} of remaining $S_2O_3^{2-}$ after reacting with intracellular DES*	0	0.185	0.371	0.372	0.497	0.311	0.374
与胞内 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ 稀释倍数 Dilution ratio of remaining $S_2O_3^{2-}$ after reacting with intracellular DES	0	2	2	3	3	6	6
与胞内 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ Remaining $S_2O_3^{2-}$ after reacting with intracellular DES (μL)	0	97.85	196.29	294.88	393.29	493.19	592.99
与胞内 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ ** Dosage of $S_2O_3^{2-}$ reacting with intracellular DES** (μL)	0	2.15	3.71	5.12	6.71	6.81	7.01
与胞外 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ OD_{217} 值* OD_{217} of remaining $S_2O_3^{2-}$ after reacting with extracellular DES*	0	0.121	0.241	0.361	0.482	0.399	0.477
与胞外 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ 稀释倍数 Dilution ratio of remaining $S_2O_3^{2-}$ after reacting with extracellular DES	0	2	2	2	2	3	3
与胞外 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ Remaining $S_2O_3^{2-}$ after reacting with extracellular DES (μL)	0	64.18	127.60	190.73	254.02	315.93	377.93
与胞外 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ ** Dosage of $S_2O_3^{2-}$ reacting with extracellular DES** (μL)	0	35.82	72.40	109.27	145.98	184.07	222.07

*数据较多, 为便于计算, 表 2 中与胞内/胞外 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ 对应的 OD_{217} 值均采用平均值($n=3$)。**此组数值为与 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ 的量, 它不能通过测光密度获得, 而是由其加入量扣除剩余量而得到。

* Due to the large amount of data, and for the convenience of calculation, the optical density OD_{217} of remaining $S_2O_3^{2-}$ after reacting with intracellular/extracellular DES listed in table 2 was the average value ($n=3$). ** This group of parameters represented the dosage of $S_2O_3^{2-}$ that reacted with DES, which couldn't be obtained by measuring its optical density, but was obtained by subtracting the remaining dosage from its total dosage added.

通过表 2 中的与胞内、胞外 DES 分别反应的 $S_2O_3^{2-}$ 的量, 计算出胞内 DES 和胞外 DES 的量(以 μL 计), 由此断定常规诱变中 DES 在细胞内外的分布状况(表 3)。基于表 3 数据至少可得出如下结论。

(1) 常规诱变中, 细胞膜因未受影响而呈现正常的选择透过性功能, 其允许非营养物质 DES 进入胞内的概率非常小。随着 DES 用量增大, 也许是高浓度的胁迫, 其渗入胞内的量逐渐增加, 从而与 DNA 接触并诱变的几率加大。然而, 其渗入胞内的量并不能无限增大, 而是

有一个范围域。由表中数据可知, 当溶液中 DES 加入量为 0–200 μL 时, 其渗入胞内的总量从 0 增至 8.77 μL , 增幅较大。结合图 1 可知, 当溶液中 DES 加入量为 200 μL 时, 此时恰好可得到最大正突变率(18.9%), 因此可认为 8.77 μL 接近其最佳渗入量。可见不是 DES 加入得越多越好。从胞外与胞内 DES 量的对比可知, 大部分 DES 被截留在细胞膜外, 只有极少量能渗入细胞质内, 200 μL 应是 DES 在溶液中的最佳加入量, 此时渗入胞内的量约占加入总量 4.4%。如果继续增加其加入量, 会有更多 DES 渗入胞

表3 常规诱变中, DES 在靶细胞内外的分布状况

Table 3 Distribution of DES inside and outside the target cells in the conventional mutagenesis

条目 Item	DES 加入量 Dosage of DES added (μL)						
	0	50	100	150	200	250	300
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 加入量 Dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ added (μL)	0	100	200	300	400	500	600
与胞内 DES 反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ^a Dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ reacting with intracellular DES ^a (μL)	0	2.15	3.71	5.12	6.71	6.81	7.01
胞内 DES 的量 ^b Dosage of intracellular DES ^b (μL)	0	2.81	4.85	6.70	8.77	8.90	9.17
与胞外 DES 反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ^a Dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ reacting with extracellular DES ^a (μL)	0	35.82	72.40	109.27	145.98	184.07	222.07
胞外 DES 的量 ^b Dosage of extracellular DES ^b (μL)	0	46.84	94.68	142.89	190.90	240.71	290.41
理论计算与实际加入的差量 Difference between calculated value and dosage added (μL)	0	-0.35	-0.47	-0.41	-0.33	-0.39	-0.42
DES 渗入胞内的比率 ^c Percentage of DES entering cells ^c (%)	0	5.6	4.9	4.5	4.4	3.6	3.1

^a: 与胞内/胞外 DES 反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的量来源于表 2 中的相应数据。DES 比重: $\rho_1=1.179 \text{ g/mL}$ (20°C)。^b: DES 渗入胞内的量/胞外的量为通过计算与之反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的消耗量而得到。^c: DES 渗入胞内的比率为胞内 DES 的量与通过计算得到的 DES 总量的比值, 如: $2.81/(2.81+46.84)\times 100\%=5.7\%$, 其余类推。

^a: The dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ reacting with intracellular/extracellular DES came from the corresponding value in table 2. The specific gravity of DES: $\rho_1=1.179 \text{ g/mL}$ (20°C). ^b: The dosage of intracellular/extracellular DES was obtained by calculating the consumption of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ that reacted with it. ^c: The percentage of DES entering the cells was the ratio of the dosage of intracellular DES to the total DES calculated, for example, $2.81/(2.81+46.84)\times 100\%=5.7\%$, and so on for the rest.

内, 但增加趋势已明显减小, 似乎逐渐接近饱和。这时其对细胞的毒害作用也逐渐显现, 并超过对细胞的正向诱变作用^[28]。当 DES 用量达到 $300 \mu\text{L}$ 时, 其渗入胞内的量约为 $9.17 \mu\text{L}$, 结合图 1 可知, 此时细胞仅存活 4.7% , 对应的正变率仅 0.9% , 溶液中几乎无活菌。这些多余的量(相对于 $8.77 \mu\text{L}$)除了对 DNA 造成损伤外, 也可能影响到细胞内的其他大分子物质如某些蛋白酶的功能, 这也许是存活率和正变率均快速下降的主要原因之一。另一方面, 虽然有 $8.77 \mu\text{L}$ DES 进入细胞内, 但可以假设这些 DES 并非全部作用于 DNA。细胞有严格的自我保护机制, 有相应的酶系如降解酶、修饰酶、修复酶等保护 DNA 不受损伤^[7,9]。因此, 进入胞内的 DES

在与 DNA 接触前可能先被胞内酶降解掉大部分, 只留下极少部分, 这余下的极少部分进入核内作用于 DNA, 使之发生突变。

(2) 从 DES 渗入胞内的比率来看, 当 DES 用量为 $0-200 \mu\text{L}$ 时, 仅有约 $5.6\%-4.4\%$ 渗入了胞内, 细胞膜的正常功能限制了它的进入。当 DES 用量超过 $200 \mu\text{L}$ 时, 其渗入胞内的比率快速下降, 说明 $200 \mu\text{L}$ 是本次诱变中 DES 加入量的拐点, 与上述结论一致。同时也说明渗入胞内的 DES 最终会达到饱和, 本次诱变的饱和量为 $9.17 \mu\text{L}$, 继续增大加入量, 细胞将全部死亡(图 1)。渗入比率变化不大也说明细胞能承载的 DES 可能是按一定比率增加, 直至饱和, 所以

溶液中加入过多量诱变剂如 DES 并不能起到太大作用, 只要确保能接近其最佳渗入量即可。然而, 现实实验中找到其最佳加入量并非易事。如果想仅通过增加诱变剂的量来提高正变率不易实现, 必须通过其他途径来达到此目的, 如改变细胞膜的透过性等。

(3) 需要指出的是, 上文中提到的 DES 渗入量如 8.77 μL 、9.17 μL 等为实验体系中所有个体细胞内 DES 渗入量的总和, 而非单个细胞内的渗入量, 它是个统计学数值。下述的改良诱变中也是如此。

2.3.3 改良的诱变中 DES 在细胞内外的分布状况

与常规诱变中的样品处理类似, 将 1.6.1 节得到的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 样品适当稀释后在 217 nm 波长下测其光密度值, 再根据标准曲线得到与胞内和胞外 DES 分别反应后剩余 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的量(表 4)。

可以看出, 用 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 将胞外、胞内 DES 分别“中和”处理后, 测剩余 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 对应的光密度值, 从标准曲线分别得到其对应含量, 再计算出与胞内、胞外 DES 分别反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的量, 同理常规诱变, 以体积计(μL)。首先可以看出,

表 4 改良的诱变中, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 对应的光密度值 OD_{217} 与其浓度的关系

Table 4 Relationship between the optical density OD_{217} of sodium thiosulfate and its concentration in the improved mutagenic scheme

条目 Item	DES 加入量 Dosage of DES added (μL)						
	0	5	10	15	20	25	30
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 加入量 Dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ added (μL)	0	10	20	30	40	50	60
与胞内 DES 反应后的剩余 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ OD_{217} 值* OD_{217} of remaining $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ after reacting with intracellular DES*	0	0.160	0.321	0.484	0.428	0.546	0.501
与胞内 DES 反应后的剩余 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 稀释倍数 Dilution ratio of remaining $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ after reacting with intracellular DES	0	2	2	2	3	3	4
与胞内 DES 反应后的剩余 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ Remaining $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ after reacting with intracellular DES (μL)	0	8.50	16.99	25.54	33.91	43.22	52.88
与胞内 DES 反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ** Dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ reacting with intracellular DES** (μL)	0	1.50	3.01	4.46	6.09	6.78	7.12
与胞外 DES 反应后的剩余 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ OD_{217} 值* OD_{217} of remaining $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ after reacting with extracellular DES*	0	0.299	0.296	0.440	0.392	0.480	0.422
与胞外 DES 反应后的剩余 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 稀释倍数 Dilution ratio of remaining $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ after reacting with extracellular DES	0	—	2	2	3	3	4
与胞外 DES 反应后的剩余 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ Remaining $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ after reacting with extracellular DES (μL)	0	7.91	15.63	23.23	31.05	37.99	44.58
与胞外 DES 反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ** Dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ reacting with extracellular DES** (μL)	0	2.09	4.37	6.77	8.95	12.01	15.43

*与表 2 中的光密度值类似, 表 4 中与胞内/胞外 DES 反应后剩余 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 对应的 OD_{217} 值均采用平均值($n=3$)。**此组数值为与 DES 反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的量, 它不能通过测光密度获得, 而是由其加入量扣除剩余量而得到。

* Similar to the optical density in table 2, the OD_{217} of remaining $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ after reacting with intracellular / extracellular DES listed in table 4 was averaged ($n=3$). ** This group of parameters represented the dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ that reacted with DES, which couldn't be obtained by measuring its optical density, but was obtained by subtracting the remaining dosage from its total dosage added.

与胞内 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ 多于与胞外 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ 的量, 则与胞内 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ 少于与胞外 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ 的量, 推测被截留在胞外的 DES 多于渗入胞内的 DES。与常规诱变相比, 新方案中不仅加入 $S_2O_3^{2-}$ 的总量少(约为前者 1/10), 而且其与胞内 DES 发生反应的比例反而更高。

同样可以看出, 与常规诱变类似, 与胞内 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ 和与胞外 DES 反应后的剩余 $S_2O_3^{2-}$ 之和不等于加入总量[以体积计, 如 $(8.50+7.91)\neq 10.00 \mu\text{L}$ 等]。同理, 与胞内 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ 和与胞外 DES 反应的 $S_2O_3^{2-}$ 之和也不等于开始加入 $S_2O_3^{2-}$ 的总量[如 $(1.50+2.09)\neq 10.00 \mu\text{L}$ 等]。胞内的反应和胞外的反应可能存在两套反应体系, 情况各不相同, 具体原因有待分析。

通过表 4 中的与胞内和胞外 DES 分别反应的 $S_2O_3^{2-}$ 的量推算出渗入胞内的 DES 和被截留在胞外的 DES 的量, 由此判断改良诱变中 DES 在细胞内外的分布状况, 列于表 5 中。对表 5 中数据分析如下。

(1) 将细胞处理成易感态再诱变, 只需少量 DES 即可达到同样的诱变效果, 甚至高于常规诱变。如前所述, 在某一突变率或存活率下, 新方案所加 DES 只需常规剂量的 1/10–1/9 (2.1 节)。可见对细胞进行易感态处理, 确实改变了细胞膜的透过性, 细胞不再对 DES 有更高的识别度, DES 更容易渗入细胞质内, 进而造成诱变。

(2) 即使在低浓度下, DES 也不能全部进入细胞内, 仍有一部分被截留在细胞膜外。当 DES 浓度升高后, 其渗入胞内的量会显著增加, 也许是诱变剂高浓度胁迫的结果。当溶液中 DES 加入量为 0–20 μL 时, 其渗入胞内的量从 0 增至 7.96 μL 。结合图 2 可知, 恰好此时正变率达到最大值 24.2%, 高于常规诱变的最大正变率(18.9%)约 5.3% (2.1 节提及), 诱变效果显著。

于最大正变率而言, 可能 7.96 μL 是比 8.77 μL 更合适的剂量, 但有待验证。此后, 当 DES 加入量从 20 μL 增至 30 μL 时, 其向胞内渗入的量仍在增加, 从 7.96 μL 增至 9.31 μL , 但增幅显著缩小, 并且正变率也开始减小。可见溶液中 DES 最佳加入量为 20 μL , 它向胞内的渗入量约占总量的 40.4%, 此时的正向诱变效应达到最佳状态。可以看出, 不论是改良的诱变还是常规诱变, 以其最大正变率对应的 DES 体积数与其最佳加入量的对应关系, 可以认为最大正变率这一群体突变现象与渗入胞内的诱变剂的量密切相关。相比较而言, 胞内渗入量与 2.2 节中提到的单一突变现象如耐热能力提高或 S^2 最高去除率可能并无直接对应关系, 胞内渗入量不能决定单一突变现象的发生。单一突变现象可能与 DES 分子掺入 DNA 位点的随机性有关^[9,28]。

继续增大 DES 加入量, 细胞内逐渐接近饱和。此过程中, 过多诱变剂导致的致死效应逐渐超过其正向诱变效应^[28]。到 30 μL 时, 菌株存活率仅剩 5.2%, 正变率为 0。

(3) 改变细胞膜透过性可以增加 DES 渗入量的另一个参数是 DES 渗入胞内的比率。一方面, DES 用量在 0–20 μL 时, 其渗入胞内的比率约为 41.8%–40.4%。而常规诱变的这一数值仅 4.0%左右, 约为前者的 1/10。很明显易感态细胞更有利于诱变剂进入胞内, 证明了对菌种诱变的可行性。另一方面, 当 DES 加入量超过 20 μL 时, DES 渗入胞内的比率同样快速下降, 除了与添加量急剧加大(而渗入量增加有限)有关外, 可能也与其致死率快速增加有关。常规诱变中, DES 进入胞内只能依赖于随机性, 而且需要较大的量才能达到同样的诱变效果。而对细胞先处理后诱变, 诱变剂进入胞内的比率会加大, 诱变只需更少的剂量即可。

(4) 对比常规诱变(表 3)和改良诱变(表 5)的结果可以看出, 尽管不同方案达到同样的诱变效果需要加入的诱变剂剂量不同, 不管哪种方案下, DES 在细胞内的致死剂量大致是相似的, 进入胞内的 DES 最多为 9.17–9.31 μL 之间, 细胞能承受的剂量不能超过这个范围, 否则很快全部死亡。由此可得出结论, 不管哪种诱变, 进入胞内的 DES 剂量最终与诱变方案无关, 可能与细胞内所能承载的量有关。改变细胞膜的透过性能减少诱变所需诱变剂的剂量、增加诱变剂渗入胞内的比率并因此提高正突变率, 但不能改变细胞所能承载的最终剂量。

2.3.4 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 终止 DES 诱变的产物验证

(1) 产单质硫的验证

$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 与 DES 反应后的产物溶液呈较强的酸性, 调 pH 至中性, 以 6 000 r/min 离心 15 min,

取上清液和沉淀分别处理。其中的沉淀呈微黄的乳白色, 根据反应特性初步断定为单质硫(S^0)。参照文献[29-30]对其进行预处理: 无菌去离子水冲洗产物表面至无杂质存在, 减压抽滤后 80 $^\circ\text{C}$ 烘干 2 h, 扫描电镜对其扫描分析, 如图 5 所示。产物呈近似菱形结构, 表面光滑、结构致密、杂质含量较少。

对硫颗粒同时进行 XRD 结构分析。结果表明, 较强的衍射峰出现在 2θ 为 23.082 $^\circ$ 、25.879 $^\circ$ 、26.749 $^\circ$ 、27.769 $^\circ$ 和 28.680 $^\circ$ 处, 如图 6A 所示, 空间群形式为 Fddd, 对应 S^0 的(222)、(026)、(311)、(040)和(313)晶面族, 与 S_8 标准图谱(08-0247)(图 6B)对比, 出峰基本吻合, 表明生成 S^0 的主要存在形式为 S_8 , 即斜方硫, 常温可稳定存在。斜方硫已有诸多报道^[30-32], 与本实验中得到的结果一致。

表 5 改良的诱变中 DES 在靶细胞内外的分布状况

Table 5 Distribution of DES inside and outside the target cells in the improved mutagenic scheme

条目 Item	DES 加入量 Dosage of DES added (μL)						
	0	5	10	15	20	25	30
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 加入量 Dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ added (μL)	0	10	20	30	40	50	60
与胞内 DES 反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-a}$ Dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ reacting with intracellular DES ^a (μL)	0	1.50	3.01	4.46	6.09	6.78	7.12
胞内 DES 的量 ^b Dosage of intracellular DES ^b (μL)	0	1.96	3.93	5.83	7.96	8.87	9.31
与胞外 DES 反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-a}$ Dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ reacting with extracellular DES ^a (μL)	0	2.09	4.37	6.77	8.95	12.01	15.43
胞外 DES 的量 ^b Dosage of extracellular DES ^b (μL)	0	2.73	5.71	8.85	11.70	15.71	20.17
理论计算与实际加入的差量 Difference between calculated value and dosage added (μL)	0	-0.31	-0.36	-0.32	-0.34	-0.42	-0.34
DES 渗入胞内的比率 ^c Percentage of DES entering cells ^c (%)	0	41.8	40.8	39.7	40.4	36.4	31.6

^a: 与胞内/胞外 DES 反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的量来源于表 4 中相应数据。^b: DES 渗入胞内的量/胞外的量为通过计算与之反应的 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 的消耗量而得到。^c: DES 渗入胞内的比率为胞内 DES 的量与通过计算得到的 DES 总量的比值, 如: $1.96/(1.96+2.73)\times 100\%=41.8\%$, 其余类推。

^a: The dosage of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ reacting with intracellular/extracellular DES came from the corresponding value in table 4. ^b: The dosage of intracellular/extracellular DES was obtained by calculating the consumption of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ that reacted with it. ^c: The percentage of DES entering the cells was the ratio of the dosage of intracellular DES to the total DES calculated, for example, $1.96/(1.96+2.73)\times 100\%=41.8\%$, and so on for the rest.

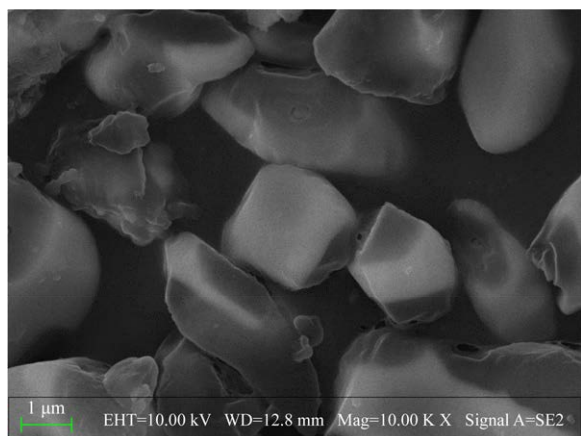


图5 单质硫的外观形态(10 000×)

Figure 5 Appearance of elemental sulfur (10 000×).

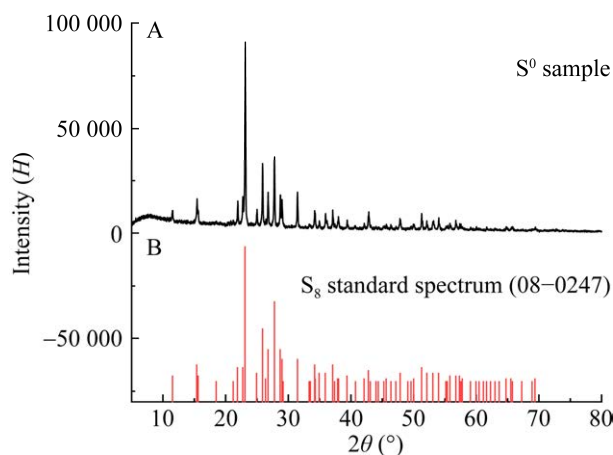


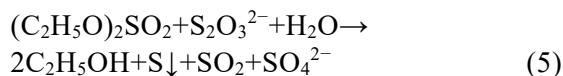
图6 单质硫的存在形式

Figure 6 Existence form of elemental sulfur.

(2) 产物乙醇的验证

对上述离心得到的上清液进行气相色谱(GC)分析,结果如图7所示。标准谱图中,乙醇出峰时间为3.527 min;样品谱图中,产物出峰时间3.532 min。对比可知,样品峰出峰时间与标准物出峰时间基本一致,由此断定样品的产物之一为乙醇(C_2H_5OH)。

结合上述单质硫的鉴定及溶液呈较强的酸性,基于元素守恒原则^[33],推测 $S_2O_3^{2-}$ 与 DES 发生反应如下:



以 $S_2O_3^{2-}$ 终止 DES 诱变在细胞环境下即可进行,不需要酸或碱参与,其对细胞的毒性最小,与文献报道的结论一致^[18],这也是 $S_2O_3^{2-}$ 可用于终止 DES 诱变的原因所在。

3 讨论与结论

菌株的 DES 诱变已有诸多报道^[18,22-24],不同诱变要达到的目的可能不同。Xia 等^[22-24]诱变的目的是产量性状突变,本实验则是要得到能稳定遗传的耐热性状且脱硫能力不会降低,虽然目的不同,但都得到了理想的突变株,这体现了 DES 诱变的无差别性、广泛性和适用性。相较于产量性状突变,耐热性状突变对菌株的淘汰率更高^[27],然而采用 DES 诱变结合合理的方案设计,则容易得到耐热性状稳定的突变株。本实验中,对细胞先进行易感态处理后诱变,再通过升温复筛,最终得到 7 株耐热能力提高且能稳定遗传的突变株。这些突变株的耐热能力均达到 45 °C,有些可达到 47 °C,并且脱硫脱氮性能不弱于原始菌株。

正突变率是考察菌株诱变效果的一个重要指标,只有正突变率得到提高,才能从中筛选出性能优异的耐热突变株^[28]。刘俊梅等^[18,23-24]报道了 DES 参与的诱变,不同诱变条件下得到的正突变率差别很大。褚帅北等^[23]报道的复合诱变正变率最高可达 27.2%,但单因素如 DES 诱变的正变率则没有单独报道。刘俊梅等^[18]报道的复合诱变也缺少关于 DES 的单因素正变率结果。李雅华等^[24]报道了单因素 DES 的正变率,仅 5.56%,达不到本方案的诱变效果。这些报道均未对细胞膜进行透过性改变,而只是将诱变剂与靶细胞简单混合进行诱变,因而诱变效果差。而本实验的改良诱变中,通过改变细胞膜

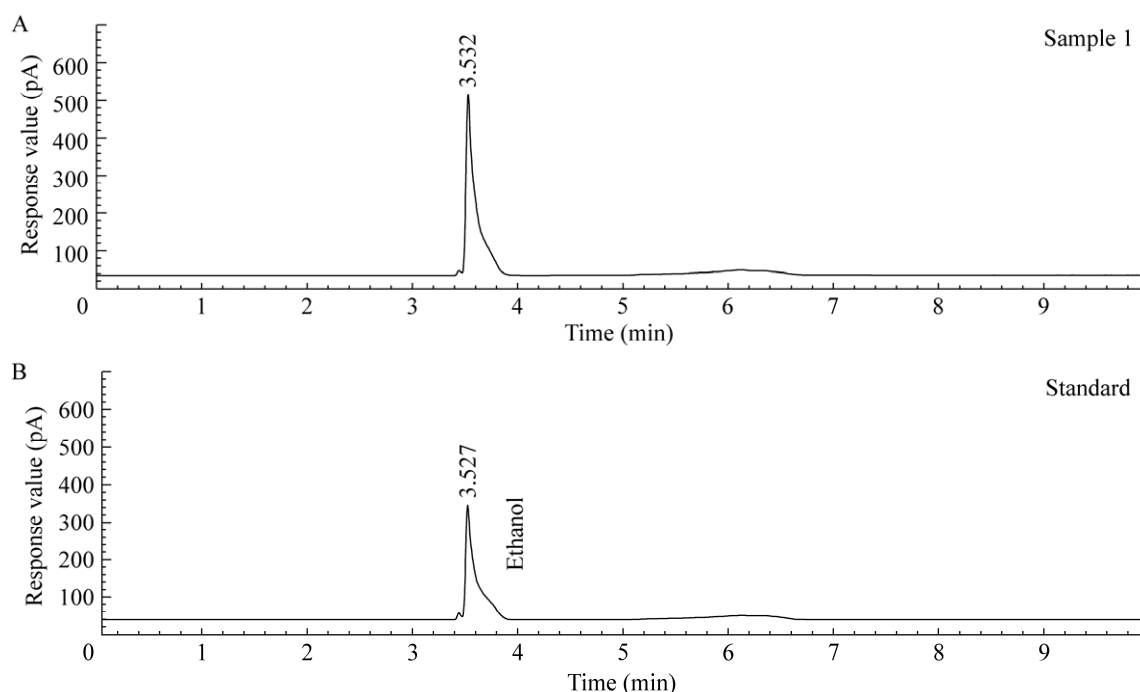


图 7 产物溶液的气相色谱分析结果 色谱条件为进样口: 220 °C; 分流比: 20:1; 氢火焰离子化检测器(FID): 240 °C; 进样量: 1 μ L; 初始温度: 40 °C; 初始保留时间: 2 min; 运行时间: 10 min。

Figure 7 GC analysis of the product solution. GC conditions: Injection temperature: 220 °C; Split ratio: 20:1; Hydrogen flame ionization detector (FID): 240 °C; Injection volume: 1 μ L; Initial temperature: 40 °C; Initial retention time: 2 min; Operation time: 10 min.

的透过性, 改变了 DES 渗入胞内的量, 使其更接近于最佳诱变剂量, 由此得到的耐热正变率达到 24.2%, 比常规诱变(18.9%)提高了 5.3%, 诱变之前对细胞进行透过性处理提高了对非营养物质的透过性, 这也是首次在菌种诱变中对诱变剂进出细胞进行干预, 为菌种诱变提供了新思路。

DES 在细胞内外的分布实验表明, 细菌的最大正变率与渗入胞内的诱变剂剂量密切相关。渗入胞内的剂量能影响到正突变率这一群体突变参数, 但不能决定突变株的单一突变如耐热性或 S^{2-} 最大去除率等在哪种情况下或何时发生。细胞可承载的诱变剂最大剂量取决于细胞自身的承载能力, 与诱变方案无关。诱变中通过改变细胞膜的透过性, 可减少诱变剂的

使用量、允许更高比率的诱变剂进入细胞内、更容易得到适合于正向突变的胞内渗入量和相应较高的正变率。

DES 是菌株诱变中常用的诱变剂, 其诱变尤其是耐热诱变效果显著, 但它是一种脂类, 其禁配物包括碱类化合物^[34]。而硫代硫酸钠呈弱碱性, 诱变结束时可用于终止 DES 触发的诱变^[18,24], 这样对细胞膜的伤害最小, 对细胞的毒性也最小。实验表明, 按 2 倍 DES 体积加入 1.0 mol/L $S_2O_3^{2-}$ 可完全消解掉所加 DES, 与刘俊梅等^[18]、李雅华等^[24]报道的结果相一致。然而这些文献仅报道了以 $S_2O_3^{2-}$ 终止其诱变, 并未对 DES 在胞内或胞外的分布情况进行过研究。本次实验针对这一状况进行定量分析, 尝试了解诱变发生之前的中间过程, 以便能为菌种诱

变提供指导。

产物验证实验中得到的单质硫与文献[30-32, 35]报道过的单质硫形态不同。这些文献报道的单质硫是细菌代谢的主产物之一, 在其生成过程中, 单质硫与其他物质共同形成近似球形混合物颗粒^[30-32, 35]。而本实验中得到的单质硫则是胞内或胞外提取的 DES 与 $S_2O_3^{2-}$ 反应后的产物, 与前者相比, 杂质干扰较少, 纯度更高、晶体形状更规则。XRD 分析其晶体结构为斜方硫 S_8 , 与文献[30-32, 35]报道的结果一致。而产物成分分析表明, 产物中除了单质硫外, 还有乙醇, 这说明 $S_2O_3^{2-}$ 可用于终止 DES 诱变, 也说明了实验中用 $S_2O_3^{2-}$ 定量分析胞内、胞外 DES 的可行性。

REFERENCES

- [1] 谭燕, 程杰成, 屈睿, 吴晓磊. 油井采出液中硝酸盐还原菌的分离培养及对硫酸盐还原的抑制[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 390-394.
TAN Y, CHENG JC, QU R, WU XL. Isolation of Nitrate reducing bacteria from oilfield produced water and their inhibition to sulfate production[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2007, 13(3): 390-394 (in Chinese).
- [2] 李乐卓, 王三反, 吴楠, 周键, 陈霞. 采用化学非均相催化工艺处理油田含硫废水[J]. 中国给水排水, 2015, 31(4): 102-104.
LI LZ, WANG SF, WU N, ZHOU J, CHEN X. Chemical heterogeneous catalysis process for treatment of sulfur containing wastewater from oilfield[J]. China Water & Wastewater, 2015, 31(4): 102-104 (in Chinese).
- [3] D'AQUINO A, KALINAINEN N, AUVINEN H, ANDREOTTOLA G, PUHAKKA JA, PALMROTH MRT. Effects of inorganic ions on autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans* and on heterotrophic denitrification by an enrichment culture[J]. The Science of the Total Environment, 2023, 901: 165940.
- [4] 徐金兰, 薛淑君, 曹泽壮, 巩丽霞, 曹芬. 富硫废水中稳定生物单质硫效果与机制研究[J]. 工业水处理, 2024, 44(9): 67-74.
XU JL, XUE SJ, CAO ZZ, GONG LX, CAO F. Mechanism and effect insight on stabilizing biological S^0 in sulfur-rich wastewater[J]. Industrial Water Treatment, 2024, 44(9): 67-74 (in Chinese).
- [5] RAMÍREZ M, GÓMEZ JM, AROCA G, CANTERO D. Removal of hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus thioparus* in a biotrickling filter packed with polyurethane foam[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(21): 4989-4995.
- [6] CHEN HR, ZHANG DR, NIE ZY, XIA JL, LI Q, ZHANG RY, YIN HH, PAKOSTOVA E. Reductive dissolution of jarosite by inorganic sulfur compounds catalyzed by *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. Hydrometallurgy, 2022, 212: 105908.
- [7] 周德庆. 微生物学教程[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2020.
ZHOU DQ. Microbiology Tutorial[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2020 (in Chinese).
- [8] 周永璋, 曾建民, 张坚. 油井采出液成分与温度对 Q235 钢腐蚀行为的影响[J]. 机械工程材料, 2008, 32(12): 25-28.
ZHOU YZ, ZENG JM, ZHANG J. Effect of component and temperature of the oil-well produced water on corrosion behavior of Q235 steel[J]. Materials for Mechanical Engineering, 2008, 32(12): 25-28 (in Chinese).
- [9] 沈萍, 陈向东. 微生物学[M]. 8 版. 北京: 高等教育出版社, 2016.
SHEN P, CHEN XD. Microbiology[M]. 8th ed. Beijing: Higher Education Press, 2016 (in Chinese).
- [10] WANG JL, CHEN PZ, LI SP, ZHENG XQ, ZHANG CX, ZHAO WJ. Mutagenesis of high-efficiency heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium *Rhodococcus* sp. strain CPZ 24[J]. Bioresource Technology, 2022, 361: 127692.
- [11] HUANG YT, WANG LY, ZHANG X, SU N, LI HP, ODA Y, XING XH. Quantitative evaluation of DNA damage caused by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and other mutagenesis methods using a rapid *umu*-microplate test protocol for microbial mutation breeding[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2021, 39: 205-210.
- [12] 王筱. 紫外-NTG 复合诱变获得四霉素高产菌株及其高产机制研究[D]. 长春: 吉林化工学院硕士学位论文, 2024.
WANG X. Study on the high yield of tetramycin by UV-NTG combined mutagenesis and its mechanism[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Institute of Chemical Technology, 2024 (in Chinese).
- [13] 丁明孝, 王喜忠, 张传茂, 陈建国. 细胞生物学[M]. 5 版. 北京: 高等教育出版社, 2020.
DING MX, WANG XZ, ZHANG CM, CHEN JG. Cell Biology[M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press, 2020 (in Chinese).
- [14] 李冰, 齐欢, 张成宏, 张绍勇, 张立钦, 向文胜, 王继栋. 乙基伊维菌素高产菌株选育及其发酵工艺优化[J]. 农药学报, 2022, 24(6): 1434-1445.
LI B, QI H, ZHANG CH, ZHANG SY, ZHANG LQ, XIANG WS, WANG JD. Breeding of high-yield strains for producing ethyl ivermectin and the optimization of the fermentation process[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2022, 24(6): 1434-1445 (in Chinese).
- [15] 章魁普. 盐霉素高产菌种诱变育种和双组份系统 RspA1/A2 全局调控机理研究[D]. 上海: 华东理工大学博士学位论文, 2020.
ZHANG KP. Study on mutagenesis screening of high-yield salinomycin mutant and the global regulation mechanism of two-component system RspA1/A2 in *Streptomyces albus*[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of East China University of Science and Technology, 2020 (in Chinese).
- [16] 吴新世, 冯澳, 曹韩源. 一种用无机质固体培养基筛选脱硫反硝化自养型菌株的方法: CN113444667B[P]. 2022-11-01.
WU XS, FENG A, CAO HY. Method for screening

- desulfurization and denitrification autotrophic strain by using inorganic substance solid culture medium: CN113444667B[P]. 2022-11-01 (in Chinese).
- [17] 郭姣洁, 薛永常, 徐书景, 马书娜, 鞠建松. 热激后冰浴时间与复苏时间对化学转化法转化效率的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(9): 5041-5042.
GUO JJ, XUE YC, XU SJ, MA SN, JU JS. Effects of the ice bath time after heat shock and the recovery time on the transformation efficiency of chemical transformation[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(9): 5041-5042 (in Chinese).
- [18] 刘俊梅, 王庆, 王丹, 杨盼盼, 丁伟, 朴春红, 王玉华, 于寒松. 紫外线和硫酸二乙酯复合诱变选育 PHB 高产菌株[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2242-2248.
LIU JM, WANG Q, WANG D, YANG PP, DING W, PIAO CH, WANG YH, YU HS. Mutagenesis of poly- β -hydroxybutyric acid producing strain by UV and diethyl sulfate[J]. Microbiology China, 2016, 43(10): 2242-2248 (in Chinese).
- [19] 熊建华. 紫外分光光度法测定溶液中硫代硫酸钠含量[J]. 医药导报, 2004, 23(11): 866.
XIONG JH. Determination of sodium thiosulfate in solution by ultraviolet spectrophotometry[J]. Herald of Medicine, 2004, 23(11): 866 (in Chinese).
- [20] NOZARI-ASBEMARZ M, ABBASI-AHD A, SHOKOUFI N. Headspace single-drop microextraction combined with nanodrop spectrophotometry for ultra-trace detection of ethanethiol using a suspended drop of AuNPs as a plasmonic sensor[J]. Journal of Sulfur Chemistry, 2023, 44(5): 588-601.
- [21] 中华人民共和国生态环境部. 水质 硫化物的测定 亚甲基蓝分光光度法: HJ 1226—2021[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2022.
Ministry of Ecology and Environment of P. R. C. Water quality—Determination of sulfide—Methylene blue spectrophotometric method: HJ 1226—2021[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2022 (in Chinese).
- [22] XIA MW, YANG Y, XU R, LI CW, CUI CB. A new polyketide purpurogenic acid: the activated production of polyketides by the diethyl sulphate mutagenesis of marine-derived *Penicillium purpurogenum* G59[J]. Natural Product Research, 2019, 33(1): 89-94.
- [23] 褚帅北, 胡文婷, 惠丰立. ARTP-DES 复合诱变结合前体耐受性选育达托霉素高产菌株[J]. 精细化工, 2023, 40(9): 1969-1975, 2002.
CHU SB, HU WT, HUI FL. Selective breeding of high daptomycin-producing strain by ARTP-DES complex mutagenesis combined with precursor tolerance[J]. Fine Chemicals, 2023, 40(9): 1969-1975, 2002 (in Chinese).
- [24] 李雅华, 张启航, 王姣, 安东, 刘新. 产 IAA 菌株的 UV 和 DES 诱变筛选及培养条件优化[J]. 核农学报, 2020, 34(9): 1873-1880.
LI YH, ZHANG QH, WANG J, AN D, LIU X. Screening of IAA-producing strains by UV and DES mutagenesis and optimization of culture conditions[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(9): 1873-1880 (in Chinese).
- [25] KIM AH, SHIN C, CRIDDLE CS. Membrane-aerated biofilm reactor enabling simultaneous removal of ammonium and sulfide from a simulated anaerobic secondary effluent[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2024, 188: 105747.
- [26] MA YL, YANG BL, ZHAO JL. Removal of H₂S by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on different matrices[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(16): 2041-2046.
- [27] 李庆伟, 徐静, 李瑶. 热休克蛋白进化及生物学功能研究进展[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2024, 47(1): 78-85.
LI QW, XU J, LI Y. Research progress on function and evolution of heat shock protein[J]. Journal of Liaoning Normal University (Natural Science Edition), 2024, 47(1): 78-85 (in Chinese).
- [28] 盛祖嘉. 微生物遗传学[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007.
SHENG ZJ. Microbial Genetics[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2007 (in Chinese).
- [29] 孙月, 陈柯序, 王凯权, 楼菊青, 王如意, 李强标, 蔡靖. 亚硝酸盐型同步脱氮除硫工艺单质硫产率及特性[J]. 中国环境科学, 2021, 41(3): 1228-1233.
SUN Y, CHEN KX, WANG KQ, LOU JQ, WANG RY, LI QB, CAI J. Yield and characteristics of elemental sulfur in the process of simultaneous nitrite and sulfide removal[J]. China Environmental Science, 2021, 41(3): 1228-1233 (in Chinese).
- [30] 刘怀珠, 于慧艳, 胡彬彬, 赵亮, 赵康宁, 朱广斌, 吴新世. 分段递进式除硫工艺对油井采出含硫废水的处理研究[J]. 工业水处理, 2024, 44(7): 171-178.
LIU HZ, YU HY, HU BB, ZHAO L, ZHAO KN, ZHU GB, WU XS. Research on the treatment of sulfide-containing wastewater from oilwell production using segmented progressive sulfide removal process[J]. Industrial Water Treatment, 2024, 44(7): 171-178 (in Chinese).
- [31] 王兵, 王丹, 李永涛, 任宏洋, 岳丞, 罗东宁, 林奇. 基于单质硫回收的高含硫废水氧化[J]. 环境工程学报, 2015, 9(11): 5408-5414.
WANG B, WANG D, LI YT, REN HY, YUE C, LUO DN, LIN Q. Oxidation of high concentration sulfide wastewater based on elemental sulfur recovery[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(11): 5408-5414 (in Chinese).
- [32] JANSSEN A, DE KEIZER A, van AELST A, FOKKINK R, YANGLING H, LETTINGA G. Surface characteristics and aggregation of microbiologically produced sulphur particles in relation to the process conditions[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1996, 6(2): 115-129.
- [33] 王凯权. 基于高单质硫产率的亚硝酸盐型同步脱氮除硫工艺研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2022.
WANG KQ. Performance of simultaneous nitrite and sulfide removal process based on high elemental sulfur yield[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2022 (in Chinese).
- [34] 张克旭, 陈宁, 张蓓, 赵桂仙. 代谢控制发酵[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010.
ZHANG KX, CHEN N, ZHANG B, ZHAO GX. Metabolic Control Fermentation[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2010 (in Chinese).
- [35] LIU CS, ZHAO DF, YAN LH, WANG AJ, GU YY, LEE DJ. Elemental sulfur formation and nitrogen removal from wastewaters by autotrophic denitrifiers and anammox bacteria[J]. Bioresource Technology, 2015, 191: 332-336.