



## 研究报告

## 粪产碱杆菌的分离鉴定及其生物转化作用

李敏<sup>1</sup> 王琦<sup>2</sup> 魏菁<sup>3</sup> 刘继军<sup>4</sup> 高云航<sup>\*1</sup>

1 吉林农业大学动物科学技术学院 吉林 长春 130118

2 金普海关 辽宁 大连 116600

3 哈尔滨海关技术中心 黑龙江 哈尔滨 150028

4 中国农业大学动物科学技术学院 北京 100083

**摘要:**【背景】硫化氢( $H_2S$ )作为畜牧生产过程中释放的一种有毒有害气体,严重危害畜禽和人类的健康,因此降解硫化氢特别是生物氧化法转化硫化氢已成为当前研究热点。【目的】筛选高效硫氧化菌株并研究其生物转化作用。【方法】以长春市某养鸡场采集的新鲜粪便为材料,分离鉴定硫氧化菌株。采用单因素分析法优化其生长条件,研究生物转化效率,检测 *soxY*、*soxZ* 基因 mRNA 表达水平。【结果】获得一株高效硫氧化菌株 JF9,经鉴定为粪产碱杆菌。最佳生长条件:底物浓度 0.5 g/L,温度 35 °C,初始 pH 7.0,在此条件下  $Na_2S$  去除率达 94%以上。菌株 JF9 存在 *soxY* 和 *soxZ* 基因,其转录水平在硫源诱导前后差异显著( $P<0.05$ )。【结论】分离得到的粪产碱杆菌具有良好的硫化物转化能力,脱硫过程中硫氧化基因高效表达。

**关键词:** 粪产碱杆菌, 硫化氢, 生物转化, *sox* 基因

Isolation, identification and biotransforming of *Alcaligenes faecalis*LI Min<sup>1</sup> WANG Qi<sup>2</sup> WEI Jing<sup>3</sup> LIU Jijun<sup>4</sup> GAO Yunhang<sup>\*1</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China

2 Jinpu Customs, Dalian, Liaoning 116600, China

3 Harbin Customs Technology Center, Harbin, Heilongjiang 150028, China

4 College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100083, China

**Abstract:** [Background] Hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) is a toxic and harmful gas released in the process of livestock production, which seriously harmed the health of livestock and human beings. Therefore, the degradation of hydrogen sulfide, especially the transformation of hydrogen sulfide by biological oxidation, has become a current research focus. [Objective] In order to screen the highly efficient sulfur-oxidizing strains and study its biotransformation. [Methods] Using fresh feces collected from a chicken farm in

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2018YFD0501800, 2016YFD0501400); Key Research and Development Program of Xinjiang Autonomous Region (2017BY082); Science and Technology Development Project of Jilin Province (20190201296JC); National Modern Agricultural Industry Technology System Construction Project (CARS-37)

**\*Corresponding author:** E-mail: gaoyunhang@163.com

**Received:** 21-12-2020; **Accepted:** 21-04-2021; **Published online:** 12-05-2021

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFD0501800, 2016YFD0501400); 新疆自治区重点研发计划(2017BY082); 吉林省科技发展计划(20190201296JC); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-37)

**\*通信作者:** E-mail: gaoyunhang@163.com

**收稿日期:** 2020-12-21; **接受日期:** 2021-04-21; **网络首发日期:** 2021-05-12

Changchun city as the material, sulfur-oxidizing strains were isolated and identified. The growth conditions were optimized by using single-factor analysis, the biotransformation efficiency was studied, and the mRNA expression levels of *soxY* and *soxZ* genes were detected. **[Results]** A highly efficient sulfur-oxidizing strain, JF9, was successfully obtained, which was preliminarily identified as *Alcaligenes faecalis*. Optimal growth conditions: substrate concentration 0.5 g/L, temperature 35 °C, initial pH 7.0. Under these conditions, the removal percentage of Na<sub>2</sub>S was over 94%. The strain JF9 had *soxY* and *soxZ* genes, and their transcription levels were greatly induced by sulfur substrates ( $P<0.05$ ). **[Conclusion]** The isolated strain *Alcaligenes faecalis* had a considerable ability to degrade sulfide, and the sulfur-oxidizing genes were highly expressed during the desulfurization process.

**Keywords:** *Alcaligenes faecalis*, H<sub>2</sub>S, biotransformation, *sox* gene

硫和硫化物的氧化还原是整个自然界化学循环中至关重要的一环, 微生物体内酶的联合作用可以对含硫化合物进行转化, 在自然界硫循环链中扮演着不可或缺的角色。硫化氢(H<sub>2</sub>S)是一种无色、带有腐败臭鸡蛋气味、易燃且有腐蚀性的有毒有害气体, 具有黏膜刺激性<sup>[1-2]</sup>, 会引起畜禽咽炎、结膜炎, 使畜禽免疫力下降, 影响生长性能<sup>[3-4]</sup>。作为化合价最低的一种含硫化合物, H<sub>2</sub>S具有极强的还原性, 易成为微生物的电子供体被微生物氧化转化为安全无毒的硫酸盐<sup>[5]</sup>, 利用这一特点, 可以采用微生物法去除 H<sub>2</sub>S, 此过程脱硫效率高、去除彻底且对环境友好<sup>[6]</sup>。

现今已分离鉴定出多种具有硫化物氧化功能的细菌, 研究表明这些细菌中存在多种硫氧化酶和不同氧化途径<sup>[7-8]</sup>, 主要为硫化物醌氧化还原酶-硫双加氧酶系统(Sulfide Quinone Oxidoreductase-Persulfide Dioxygenase, SQR-PDO)<sup>[9]</sup>、硫转移酶(Sulfate Transferase, STF)、黄素细胞色素 C 硫化物脱氢酶(Flavocytochrome C Sulfide Dehydrogenase, FCSD)、硫氧化酶(Sulfur Oxidase, Sox)多酶复合体系统<sup>[10]</sup>等, 其中 Sox 多酶复合体中载体蛋白 SoxYZ 发挥最主要作用<sup>[11-12]</sup>。粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)是一种广泛存在于自然界中的细菌, 近年来的研究表明 *A. faecalis* 能够降解多种有毒有害物质, 如苯酚<sup>[13]</sup>、氰化物<sup>[14]</sup>、亚砷酸盐<sup>[15]</sup>、硫化氢等, 其中关于 *A. faecalis* 氧化 H<sub>2</sub>S 的研究多应用于生产实际, 而对硫化物氧化途径和调控机制研究

较少。

本研究从长春市某养殖场采集的新鲜鸡粪中筛选到一株具有较优脱硫能力的粪产碱杆菌并对其生长条件进行优化, 在最佳生长条件下进行脱硫能力测定, 检测菌株硫氧化基因 *soxY* 和 *soxZ* 的 mRNA 表达水平, 以期为粪产碱杆菌硫氧化调控机制的完善及硫氧化模型建立提供参考和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

无机盐培养基: NH<sub>4</sub>Cl 1.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L, NaCl 1.0 g/L, 添加硫代硫酸钠至 10.0 g/L。

基础 LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L。

固体 LB 培养基: 在基础 LB 培养基中加入 1.5% 琼脂, 在 1×10<sup>5</sup> Pa 条件下灭菌 20 min 后冷却凝固。

筛选培养基: 基础 LB 培养基在 1×10<sup>5</sup> Pa 条件下灭菌 20 min, 冷却后添加硫代硫酸钠至 10.0 g/L。

RNAiso Plus、实时荧光定量 PCR 试剂 2×TB Green® Premix Ex Taq™、反转录试剂 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser, 宝日生物技术(北京)有限公司。

2 mol/L NaOH 和 4 mol/L HCl 用于调节初始 pH。

引物: 序列见表 1。

表 1 本文所用 PCR 引物  
Table 1 Primers of PCR used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
1. 16S rRNA	27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT	1 500
2. soxY	F: TTACATGCCGAGCCGCC R: ATGACTTCCTCTAAACTTCCCTCCC	504
3. soxZ	F: TCAGCCGCTGATGCTCAGC R: ATGAGTAAACCACGTATCTGGATCAGC	327
4. 16S rRNA	F: GGCCGCAAGGTTCAAACCTCA R: ACCCAACATCTCACGACACG	165
5. soxY	F: AGGCGAACTGCGACTTCTGTTG R: GATCATTCTGGCTCAGGGCAACC	90
6. soxZ	F: ATCGTCCGTCCAGCTCATCTCC R: CGGCGAGCCCTTGTTCAACTG	115

注：1、2、3：常规 PCR 引物序列；4、5、6：实时荧光定量 PCR 引物序列  
Note: 1, 2, 3: Sequences of primers routine PCR; 4, 5, 6: Sequences of primers by real-time fluorescence quantitative PCR

1.2 菌株的筛选

将新鲜鸡粪以 1:100 于无菌生理盐水中重悬，在 37 °C、120 r/min 恒温振荡培养箱中振荡 1 h 后静置 30 min。取上层液体以 1%接种量转接于无机盐培养基中，在 37 °C、120 r/min 培养箱中恒温培养。采用稀释涂布平板法，取培养 1 d 后的菌悬液涂布于固体 LB 培养基上 37 °C 培养。挑取单菌落进行分离纯化培养，得到的纯化菌株回接于含硫代硫酸钠的无机盐培养基中，若出现浑浊则将菌株分离并保存。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 形态学和生理生化鉴定

将筛选所得菌株接种于固体 LB 培养基上，在 37 °C 培养箱中恒温培养 24 h 后观察菌落形态并进行革兰氏染色鉴定。参照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[16]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[17]</sup>对菌株进行糖发酵、氧化酶、接触酶、吡啶、M-R、V-P、明胶液化、淀粉酶、硝酸盐还原、亚硝酸盐还原等试验。

1.3.2 分子生物学鉴定

按照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说

明书进行菌株 DNA 提取，使用通用引物 27F 和 1492R 对筛选菌株 16S rRNA 基因进行扩增。PCR 反应体系：DNA 模板 1 μL，2×*Taq* Master Mix 12.5 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL，ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μL。PCR 反应条件：94 °C 5 min；94 °C 30 s，50 °C 30 s，72 °C 45 s，共 30 个循环；72 °C 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳验证，送生工生物工程(上海)股份有限公司测序，所得数据提交至 GenBank 数据库进行 BLAST 比对，使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。同时对菌株 *soxY*、*soxZ* 基因进行扩增，除退火温度更改为 60 °C 外，PCR 反应体系和反应条件同上。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳验证，送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 菌株生长条件的优化

取种子液以 1%接种量接种于 100 mL 基础 LB 培养基中，添加 Na<sub>2</sub>S 使底物浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0 g/L，置于 35 °C 恒温振荡培养箱中培养 48 h，测定生物量和降解率变化，每个处理均重复 3 次且设空白对照；确定最佳底物浓度后，依次对

温度(5 个梯度: 20、25、30、35、40 °C)、pH (7个梯度: 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)进行优化。

### 1.5 菌株转化性能测定

取种子液以 1%接种量接种于 100 mL 基础 LB 培养基中, 利用优化后的生长条件恒温培养 48 h, 每隔 12 h 分别测定溶液中  $\text{Na}_2\text{S}$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  浓度, 各处理均重复 3 次且设空白对照。

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  浓度测定: 在 250 mL 碘量瓶中加入 50 mL 蒸馏水、1 g 碘化钾、20 mL 重铬酸钾标准溶液 [ $c(\frac{1}{6} \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)=0.01 \text{ mol/L}$ ]、5 mL 硫酸溶液 [ $c(\frac{1}{2} \text{H}_2\text{SO}_4)=3 \text{ mol/L}$ ], 放置于暗处 5 min, 用待测液滴定溶液至浅黄色, 加 1 mL 淀粉(10 g/L), 继续滴定至蓝色消失。按公式(1)计算  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液浓度:

$$C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = \frac{C \times V_1}{V} \quad (1)$$

其中  $C(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$  为待测溶液中硫代硫酸钠浓度, mol/L;  $C$  为重铬酸钾标准溶液浓度, mol/L;  $V_1$  为重铬酸钾标准溶液体积, mL;  $V$  为待测溶液的滴定体积, mL。

硫化物测定采用对氨基二甲基苯胺分光光度法<sup>[18]</sup>; 硫酸根测定采用铬酸钡分光光度法<sup>[19]</sup>。

### 1.6 菌株 *soxY*、*soxZ* 基因 mRNA 表达量测定

取种子液以 1%接种量接种于 100 mL 基础 LB 培养基中, 实验组在最优生长条件下培养 48 h, 对照组除不添加硫源外, 其他培养条件与实验组相同。各组取 1 mL 菌液, 4 °C、8 000 r/min 离心弃上清, Trizol 法提取细菌总 RNA, 于-80 °C 冰箱中保存备用。每个处理均重复 3 次且设空白对照。

Trizol 法提取细菌总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性, 按反转录试剂说明书将提取总 RNA 反转录所得产物即 cDNA, 于-20 °C 冰箱中保存备用。实时荧光定量 PCR 反应体系: 模板

2  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu\text{L}$ , 每个样品 3 个重复。实时荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 共 40 个循环。以 16S rRNA 基因为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 *soxY*、*soxZ* 基因 mRNA 相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选与鉴定

#### 2.1.1 菌株形态学和生理生化特征

通过分离筛选得到一株异养硫氧化细菌, 能够高效转化硫化物和硫代硫酸钠, 编号为 JF9。菌株菌落边缘规整, 光滑湿润不透明, 形态为圆形, 在含硫代硫酸钠的固体 LB 培养基中生长呈淡黄色; 菌株革兰氏染色反应呈阴性, 菌体为短杆状。

生理生化试验结果见表 2。由表 2 可知, 该菌株不能发酵糖类, 氧化酶、接触酶反应呈阳性, 吲哚试验、M-R 试验、V-P 试验、明胶液化试验、淀粉酶试验均呈阴性, 能利用硝酸盐, 不

表 2 菌株的生理生化特征

Table 2 Physiological-biochemical properties of strain JF9

检测内容 Test index	检测结果 Results	检测内容 Test index	检测结果 Results
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	—	吲哚试验 Indole experiment	—
乳糖发酵 Lactose fermentation	—	M-R 试验 M-R experiment	—
麦芽糖发酵 Maltose fermentation	—	V-P 试验 V-P experiment	—
甘露醇发酵 Mannitol fermentation	—	明胶液化试验 Gelatin liquefaction	—
蔗糖发酵 Sucrose fermentation	—	淀粉酶试验 Amylase experiment	—
氧化酶试验 Oxidase experiment	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
接触酶试验 Catalase experiment	+	亚硝酸盐还原 Nitrite reduction	—
		硝酸盐还原 Nitrate reduction	—

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative

能利用亚硝酸盐。该菌株符合《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[16]</sup>中对产碱杆菌属的描述,初步鉴定菌株为产碱杆菌。

### 2.1.2 分子生物学鉴定

菌株 16S rRNA 基因序列大小为 1 437 bp。将所得数据提交至 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对后使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树,分析结果显示该菌株与粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*) RB13C11 亲缘关系最近,相似度达 99.7%以上,结合生理生化鉴定结果,菌株 JF9 鉴定为粪产碱杆菌。将菌株 16S rRNA 基因序列上传 GenBank,获得登录号为 MW308612。

对菌株 *soxY*、*soxZ* 基因进行扩增,PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳验证结果如图 1 所示,条带大小正确,分别为 504 bp 和 327 bp。测序所得序列正确,表明菌株 JF9 存在 *soxY*、*soxZ* 基因。

## 2.2 不同培养条件对菌株生长和脱硫效果的影响

### 2.2.1 不同底物浓度对菌株生长和脱硫效果的影响

如图 2 所示,当底物浓度低于 0.5 g/L 时,菌株 JF9 生长良好且高效转化  $\text{Na}_2\text{S}$ 。当  $\text{Na}_2\text{S}$  浓度为 1.0 g/L 时,菌株生长稍缓慢且转化率随之降低。生长至第 48 h 时  $OD_{600}$  值分别为 1.47、1.56、1.78、0.96,表明高浓度  $\text{Na}_2\text{S}$  影响菌株生长繁殖。

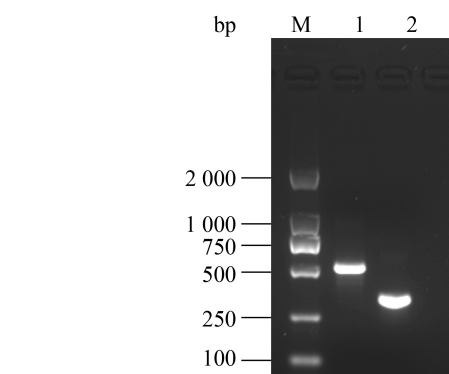
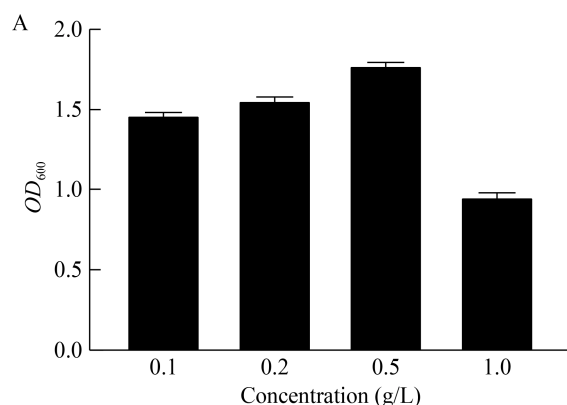


图 1 *soxY* 和 *soxZ* 基因琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 1 Detection of *soxY* and *soxZ* genes by agarose gel electrophoresis

注: M: DL2000 DNA Marker; 1, 2: *soxY*、*soxZ* 基因扩增产物  
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1, 2: *soxY* and *soxZ* genes amplification products

原因可能是过高浓度  $\text{Na}_2\text{S}$  导致培养基渗透压增大,并且转化过程中产生某些有毒物质从而抑制菌株的生长和降低脱硫效果。

### 2.2.2 温度对菌株生长和脱硫效果的影响

如图 3 所示,菌株 JF9 生长对温度变化较敏感,温度过高或过低均会导致细菌生长缓慢,转化率降低。菌株最适生长温度为 35 °C,在此条件下转化效率最高,50 h 内对初始底物浓度为 0.5 g/L 的  $\text{Na}_2\text{S}$  转化率可达 84.89%,温度升高或降低均会对菌株的生长和硫转化有不同程度的抑制作用。

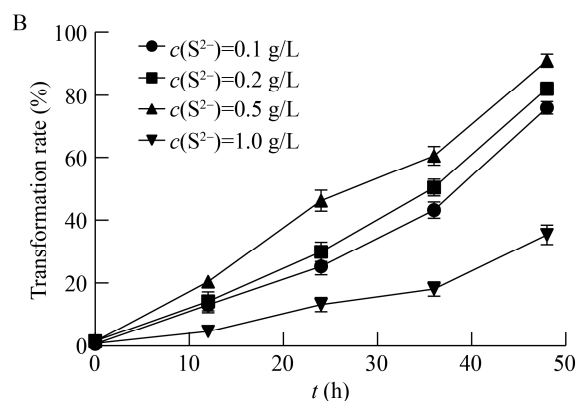


图 2 不同底物浓度对菌株 JF9 生长及硫化钠去除的影响

Figure 2 Effects of different substrate concentrations on growth of strain JF9 and removal of sodium sulfide

注: A: 不同浓度下菌株生长情况; B: 不同浓度下菌株转化率

Note: A: The growth of strains with different concentrations; B: The transformation rate of strains with different concentrations

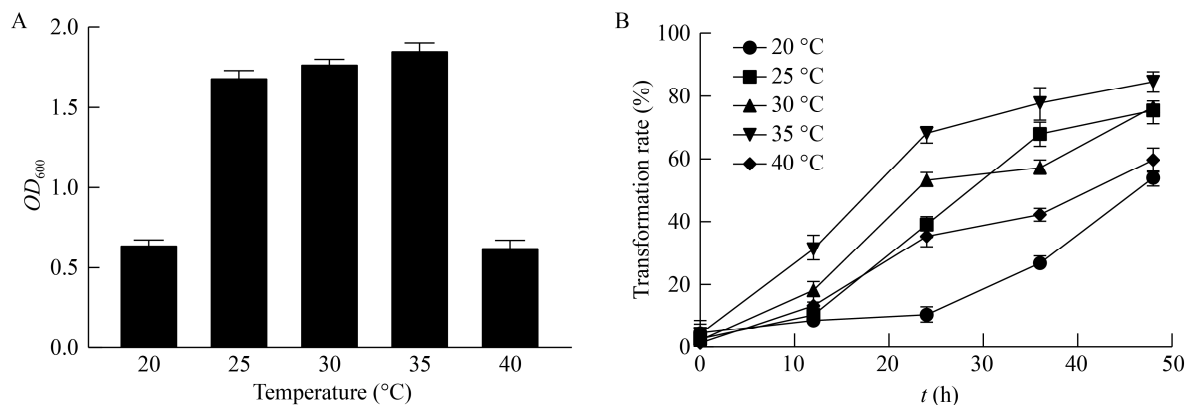


图3 不同温度对菌株 JF9 生长及硫化钠去除的影响

Figure 3 Effect of temperature on growth of strain JF9 and removal of sodium sulfide

注: A: 不同温度下菌株生长情况; B: 不同温度下菌株转化率

Note: A: The growth of strains with different temperature; B: The transformation rate of strains with different temperature

### 2.2.3 初始 pH 值对菌株生长和脱硫效果的影响

如图 4 所示, 在底物浓度 0.5 g/L, 温度 35 °C, 不同初始 pH 值条件下, 脱硫菌 JF9 生长与转化率表现出明显差异。在酸性环境时菌株生长迟滞, 而且底物 Na<sub>2</sub>S 在酸性培养基中以气态硫化氢形式逃逸, 空白组中转化率较高, 致使检测出的 S<sup>2-</sup> 浓度有不同程度降低, 然而菌株在中性或弱碱条件下生长较好, 当 pH 7.0、8.0 时, 菌株生长较快, 生长至稳定期 OD<sub>600</sub> 值分别为 1.84、1.73, pH 7.0 条件下菌株脱硫效果最佳, 最终转化率可

达 88.71%。

### 2.3 菌株降解性能的测定

图 5 为菌株在底物浓度为 0.5 g/L, 温度为 35 °C, 初始 pH 7.0 条件下生长时溶液中 Na<sub>2</sub>S、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 浓度的变化。Friedrich 等<sup>[20]</sup>研究指出, Sox 多酶复合体介导的硫氧化过程为: 在 SoxXA 催化作用下, 硫原子先与 SoxYZ 中 SoxY 亚基 C 端上 Cys 残基相结合形成二硫化物 SoxZY-S-S-, 进而在 SoxB 作用下氧化释放 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>。由图 5 可推断, 转化初期溶液中硫化物被迅

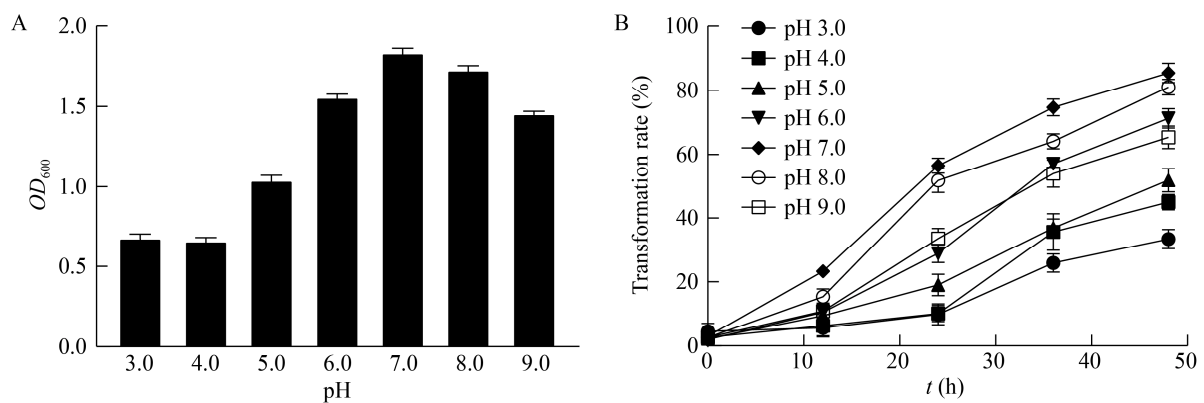


图4 pH 对菌株 JF9 生长及硫化钠去除的影响

Figure 4 Effect of pH on growth of strain JF9 and removal of sodium sulfide

注: A: 不同 pH 下菌株生长情况; B: 不同 pH 下菌株转化率

Note: A: The growth of strains with different pH; B: The transformation rate of strains with different pH

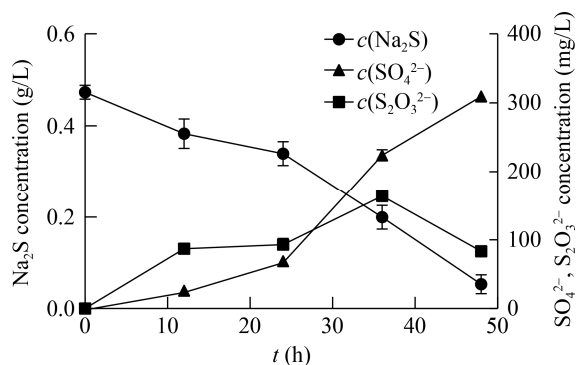


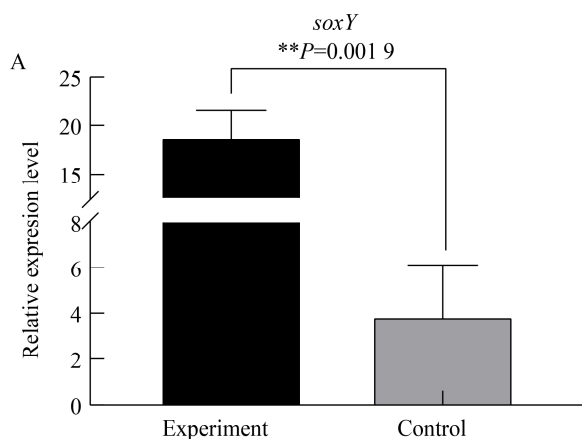
图5 硫化钠转化过程中各代谢物的动态变化

Figure 5 Dynamic changes of various metabolites during the biotransformation of sodium sulfide

速氧化生成硫代硫酸根,在 Sox 酶系作用下,硫代硫酸根被进一步氧化生成硫酸根。菌株培养至 50 h 时转化率可达 94%以上,降解性能较优越。

#### 2.4 硫氧化菌株 *soxY*、*soxZ* 基因 mRNA 相对表达量

如图6所示,菌株 *soxY*、*soxZ* 基因在硫源诱导前后转录水平均出现显著差异,实验组菌株中 *soxY* 基因转录水平约为对照组的 4.87 倍, *soxZ* 基因转录水平约为对照组的 4.25 倍,转录水平差异极显著( $P \leq 0.05$ )。



### 3 讨论与结论

本研究从长春市某养殖场采集的新鲜鸡粪中分离得到一株异养硫氧化菌株 JF9 并鉴定为粪产碱杆菌。菌株 JF9 以底物浓度为 0.5 g/L, 温度 35 °C, 初始 pH 7.0 为最佳生长条件,在此条件下对  $\text{Na}_2\text{S}$  降解率可达 94%以上。

早期对粪产碱杆菌的生物氧化功能研究主要围绕菌株硝化能力<sup>[21]</sup>和亚硝酸盐氧化能力<sup>[15]</sup>,对于粪产碱杆菌氧化  $\text{H}_2\text{S}$  的研究多为生产实际上的应用,对其硫化物氧化机制研究较少。如 Rattanapan 等<sup>[22]</sup>从浓缩乳胶废水中分离纯化培养得到一株粪产碱杆菌 T307,固定在颗粒活性炭上作为填料用以脱除合成沼气中的  $\text{H}_2\text{S}$ ,结果表明在高入口浓度条件(200–4 000 mg/L)下降解率高于 95%; Potivichayanon 等<sup>[23]</sup>使用固定膜生物洗涤塔降解  $\text{H}_2\text{S}$ ,从洗涤器上分离出 2 株新型微生物,分别为不动杆菌属 MU1\_03 和粪产碱杆菌 MU2\_03,2 种菌株降解率分别为 91%和 92%,而 2 种菌株的混合物能够去除 98%  $\text{H}_2\text{S}$ 。

本研究对粪产碱杆菌 JF9 中硫氧化途径进行探索,结果表明粪产碱杆菌 JF9 具有氧化硫化物的能力。有研究指出对于氧化产物  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , Sox 多

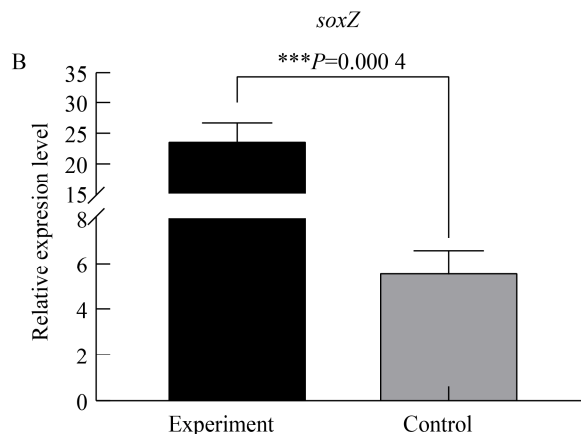


图6 硫氧化菌株降解前后 *soxY* 和 *soxZ* 基因转录水平差异

Figure 6 Differences in transcriptional levels of *soxY* and *soxZ* genes before and after degradation of sodium sulfide

注: A: *soxY* 基因转录水平; B: *soxZ* 基因转录水平。\*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$

Note: A: The transcriptional level of *soxY* gene; B: The transcriptional level of *soxZ* gene. \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$



酶复合体会主导完成  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  的氧化, 将其转化为  $\text{SO}_4^{2-}$  [24-25]。其中  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  需最先与 SoxYZ 蛋白质二聚体共价连接后才能启动氧化过程 [11]。Grimm 等 [26] 通过 RT-qPCR 分析表明, Sox 多酶复合体系基因的表达式与硫化物和硫代硫酸盐相关。本研究发现, 异养菌株 JF9 氧化硫化物的过程呈现出  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  离子浓度先上升后下降,  $\text{SO}_4^{2-}$  离子浓度持续上升的趋势, 表明氧化过程中  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  逐渐累积后不断转化为  $\text{SO}_4^{2-}$ , 与 Harada 等 [27] 研究结果相符。经 PCR 验证菌株 JF9 存在 *soxY*、*soxZ* 基因, 通过实时荧光定量 PCR 法检测菌株 *soxY*、*soxZ* 基因 mRNA 表达水平, 结果显示硫源诱导前后, *soxY* 和 *soxZ* 基因转录水平均出现显著差异, 结合文献 [12] 中对 SoxYZ 蛋白的描述, 表明粪产碱杆菌 JF9 中存在以 SoxYZ 蛋白二聚体为启动程序的 Sox 多酶复合体系以发挥硫化物生物降解功能, 过程应为底物  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  先与硫共价结合蛋白 SoxY 结合后传递至硫化物结合蛋白 SoxZ 形成络合物进而氧化为高价态硫酸盐。虽推断出粪产碱杆菌对  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  可能的氧化过程, 但对于粪产碱杆菌 JF9 中  $\text{S}^{2-}$  氧化生成成为  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  的过程尚不清楚, 粪产碱杆菌对硫的转化可能受多方面因素调控, 本研究为后续研究降解粪产碱杆菌生物转化  $\text{H}_2\text{S}$  功能及调控机制奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Liu JW, Duan C, Liu Y. Technology and application progress on microbial agent treatment of gases containing ammonia and sulfide hydrogen from livestock and poultry farms[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(11): 72-75 (in Chinese)  
刘建伟, 段粹, 刘越. 微生物菌剂处理畜禽养殖场含氨和硫化氢气体技术进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(11): 72-75
- [2] Shinabe K, Oketani S, Ochi T, Kanchanatawee S, Matsumura M. Characteristics of hydrogen sulfide removal in a carrier-packed biological deodorization system[J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, 5(3): 209-217
- [3] Lan ZR, Yu Q, Jiang X. Progress of study on hydrogen sulfide removal using biofilter[J]. Sichuan Environment, 2007, 26(4): 83-87 (in Chinese)  
兰中仁, 余琼, 江霞. 生物过滤法脱除硫化氢臭气的研究进展[J]. 四川环境, 2007, 26(4): 83-87
- [4] Leson G, Winer AM. Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions[J]. Journal of the Air & Waste Management Association, 1991, 41(8): 1045-1054
- [5] Vikrant K, Kailasa SK, Tsang DCW, Lee SS, Kumar P, Giri BS, Singh RS, Kim KH. Biofiltration of hydrogen sulfide: trends and challenges[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 187: 131-147
- [6] Choudhury A, Lansing S. Adsorption of hydrogen sulfide in biogas using a novel iron-impregnated biochar scrubbing system[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, 9(1): 104837
- [7] Hou NK, Xia YZ, Wang X, Liu HW, Liu HL, Xun LY.  $\text{H}_2\text{S}$  biotreatment with sulfide-oxidizing heterotrophic bacteria[J]. Biodegradation, 2018, 29(6): 511-524
- [8] Wang JY, Qin YY, Chen HJ, Tian LM, Li MT. Isolation and identification of endogenous sulfur-oxidizing bacteria of *Potamogeton crispus* and reduced release of  $\text{H}_2\text{S}$  in chicken manure[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2017, 39(2): 176-182 (in Chinese)  
王金英, 秦玉莹, 陈华晶, 田来明, 李明堂. 菹草内生硫氧化细菌的分离鉴定及对鸡粪中硫化氢的减释作用[J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(2): 176-182
- [9] Xia YZ, Lü C, Hou NK, Xin YF, Liu JH, Liu HL, Xun LY. Sulfide production and oxidation by heterotrophic bacteria under aerobic conditions[J]. The ISME Journal, 2017, 11(12): 2754-2766
- [10] Wang R, Lin JQ, Liu XM, Pang X, Zhang CJ, Yang CL, Gao XY, Lin CM, Li YQ, Li Y, et al. Sulfur oxidation in the acidophilic autotrophic *Acidithiobacillus* spp.[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3290
- [11] Bagchi A, Roy D, Roy P. Homology modeling of a transcriptional regulator SoxR of the Lithotrophic sulfur oxidation (Sox) operon in alpha-proteobacteria[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2005, 22(5): 571-577
- [12] Zhang CC, Meng ZZ, Lu YF, Chen X, Li S. Homology modeling and structure analysis of SoxYZ: a carrier of sulfur compounds from *Thiobacillus denitrificans*[J]. China Biotechnology, 2015, 35(7): 68-75 (in Chinese)  
张晨晨, 孟志忠, 陆远芳, 陈新, 李杉. 脱氮硫杆菌硫化物载体 SoxYZ 蛋白的同源建模和结构分析[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(7): 68-75
- [13] Bai J, Wen JP, Li HM, Jiang Y. Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and m-cresol using *Alcaligenes faecalis*[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(4): 510-517
- [14] Pathak U, Mogalapalli P, Mandal DD, Mandal T. Biodegradation efficacy of coke oven wastewater inherent co-cultured novel sp. *Alcaligenes faecalis* JF339228 and *Klebsiella oxytoca* KF303807 on phenol and cyanide:



- kinetic and toxicity analysis[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2021: 1-16
- [15] Boulanger MJ, Murphy MEP. Directing the mode of nitrite binding to a copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: characterization of an active site isoleucine[J]. Protein Science, 2003, 12(2): 248-256
- [16] Editorinchief G. Bergey's manual of systematic bacteriology[J]. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, 1984, 38(4): 443-491
- [17] Dong XZ, Cai MY. Manual of Systematic Determination General Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)  
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [18] Xu CX, Zhang ZE, Wang YP, Dai AF, Wang SM, Yuan J. Uncertainty evaluation for the determination of sulfides in groundwater samples by para-amino aniline photometric method[J]. Geological Bulletin of China, 2012, 31(4): 631-636 (in Chinese)  
许春雪, 张宗恩, 王亚平, 代阿芳, 王苏明, 袁建. 对氨基二甲苯胺比色法测定的地下水中硫化物不确定度的评定[J]. 地质通报, 2012, 31(4): 631-636
- [19] Zhang FY. Improvement measures for determination of sulfate in water by barium chromate spectrophotometry[J]. Energy and Energy Conservation, 2019(10): 78-79 (in Chinese)  
章方扬. 铬酸钡分光光度法测定水中硫酸盐的方法改进措施[J]. 能源与节能, 2019(10): 78-79
- [20] Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A, Fischer J. Prokaryotic sulfur oxidation[J]. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8(3): 253-259
- [21] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Water Research, 2006, 40(16): 3029-3036
- [22] Rattanapan C, Kantachote D, Yan R, Boonsawang P. Hydrogen sulfide removal using granular activated carbon biofiltration inoculated with *Alcaligenes faecalis* T307 isolated from concentrated latex wastewater[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010, 64(5): 383-387
- [23] Potivichayanon S, Pokethitiyook P, Kruatrachue M. Hydrogen sulfide removal by a novel fixed-film bioscrubber system[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(3): 708-715
- [24] Ray S, Bagchi A. Structural analysis of the mode of interactions of SoxB protein with SoxYZ complex from *Allochrocatium vinosum* in the global sulfur oxidation cycle[J]. Computational Molecular Biology, 2013, 3(1): 1-5
- [25] Liu Y, Jiang LJ, Shao ZZ. Advances in sulfur-oxidizing bacterial taxa and their sulfur oxidation pathways[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(2): 191-201 (in Chinese)  
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
- [26] Grimm F, Franz B, Dahl C. Regulation of dissimilatory sulfur oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochrocatium vinosum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 2: 51
- [27] Harada M, Yoshida T, Kuwahara H, Shimamura S, Takaki Y, Kato C, Miwa T, Miyake H, Maruyama T. Expression of genes for sulfur oxidation in the intracellular chemoautotrophic symbiont of the deep-sea bivalve *Calyptogena okutanii*[J]. Extremophiles, 2009, 13(6): 895-903