

# 酿酒废水硫氧化细菌的分离鉴定及其硫氧化特性

韩佳悯, 罗剑飞, 林炜铁

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 本研究从酿酒废水中分离了一株化能自养硫氧化细菌 LS2, 通过 16S rRNA 基因和硫氧化功能酶基因 *soxB* 分析表明该菌株与 *Halothiobacillus* 亲缘关系最近, 但 *Halothiobacillus* sp. LS2 的基因组中存在完整的固氮酶基因簇 *nif*, 其关键编码基因 *nifH* 与 *Acidithiobacillus* 属中 *A. ferrooxidans* 和 *A. ferrivorans* 相似性最高, 均高于 80%。通过细胞水平的比较研究, 菌株 LS2 在有氮和无氮条件下均可生长, 在 1 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的条件下生长量最高可达 1.98×10<sup>7</sup>/mL, 而无氮条件下生长量较有氮条件下少, 最高可达 1.37×10<sup>7</sup>/mL; 基于基因表达分析, 菌株 LS2 的 *nifH* 表达量因氮源存在而下调, 硫代硫酸盐浓度增加而上调, 其中在 5 mM S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> 浓度下其表达量上调了约 33 倍。说明该菌的固氮作用与硫氧化反应息息相关。本研究获得了一株具有固氮能力的化能自养硫氧化细菌, 所获得的结果可为含硫化物废水的治理提供一种新思路。

**关键词:** 化能自养型细菌; 硫氧化作用; 固氮作用

文章编号: 1673-9078(2020)06-155-160

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.0669

## Isolation and Identification of Sulfur-oxidizing Bacterium from Brewery Wastewater and Its Sulfur-oxidizing Characteristics

HAN Jia-min, LUO Jian-fei, LIN Wei-tie

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** In this study, a chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterial strain LS2 was isolated from brewery wastewater. The analyses of 16S rRNA gene and sulfur-oxidizing enzyme gene *soxB* revealed that this strain was most closely related to genus *Halothiobacillus*, although the genome of *Halothiobacillus* sp. LS2 had a complete gene cluster encoding nitrogen-fixing enzyme *Nif*; Its key gene *nifH* had the highest similarity to *A. ferrooxidans* and *A. ferrivorans* in the genus *Acidithiobacillus* (both of which were higher than 80%). A comparative study at the cellular level indicated that the strain LS2 was able to grow under both nitrogen and nitrogen-free conditions. The maximum growth of LS2 under the condition of 1 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> could reach 1.98×10<sup>7</sup>/mL, whilst the growth in the absence of nitrogen (up to 1.37×10<sup>7</sup>/mL) was less than that in the presence of nitrogen. The gene expression analysis revealed that *nifH* expression of strain LS2 was down-regulated due to the presence of a nitrogen source but up-regulated with the increase of thiosulfate concentration. The expression of *nifH* was up-regulated by 33 times at a S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> concentration of 5 mM, indicating that nitrogen fixation was closely related to sulfur oxidation. In this study, a chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium with nitrogen-fixing ability was obtained, and the obtained results can provide a new idea for the treatment of sulfide-containing wastewater.

**Key words:** chemoautotrophic bacterium; sulfur oxidation; nitrogen fixation

引文格式:

韩佳悯, 罗剑飞, 林炜铁. 酿酒废水硫氧化细菌的分离鉴定及其硫氧化特性[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 155-160

HAN Jia-min, LUO Jian-fei, LIN Wei-tie. Isolation and identification of sulfur-oxidizing bacterium from brewery wastewater and its sulfur-oxidizing characteristics [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 155-160

白酒酿造大多以高粱、小麦、玉米等作为原材料, 工艺过程中产生的工业废水可以分为低浓度废水和高浓度废水两部分, 其中高浓度废水中含有多种氨基酸

投稿日期: 2019-07-16

作者简介: 韩佳悯 (1994-), 女, 硕士, 研究方向: 环境微生物

通讯作者: 林炜铁 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物生态学、发酵工程等

和蛋白质<sup>[1]</sup>, 厌氧环境中会在硫酸盐还原菌 (SRB) 的作用下产生大量 S<sup>2-</sup>和 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup><sup>[2]</sup>。由于硫化物对环境的危害性, 酿酒工业中产生的含硫废水成为废水治理中亟待解决的问题之一。废水中的硫化物主要包括硫化氢、硫化铵和有机硫化物等<sup>[3]</sup>。含硫化物废水具有腐蚀性, 当其浓度过高时会对废水生化处理系统造成影响, 导致微生物失去活性<sup>[4]</sup>。另外, 硫化物对于人体

和动植物的健康也有较大的影响。目前对于硫化物废水的处理方法包括汽提法、吸附法、液膜法等物理方法和酸化吸收法、氧化法等化学方法,以及有氧、缺氧生物氧化等生物处理方法<sup>[5]</sup>。物理和化学方法由于耗能较高、需要较多化学药品,因而成本较高且工艺繁琐,因此生物脱硫方法较前二者更受青睐。生物脱硫方法中硫氧化细菌起到至关重要的作用,其能使硫化物被氧化为单质硫或硫酸盐<sup>[5]</sup>。自然界中存在着多种微生物参与并主导硫氧化反应,若以不同碳源来源来分类,可分为异养型(heterotrophic)、自养型(autotrophic)及兼性自养型(facultative autotrophic);若以不同能量来源分类则可分为化能营养菌和光合菌;不同需氧类型硫氧化微生物可以分为好氧型、微好氧型、兼性厌氧型及严格厌氧型<sup>[6-8]</sup>。

本文从生物法处理后的酿酒废水珠江入口中分离了一株化能自养硫氧化细菌,基因组分析表明该菌具有固氮潜力;通过16S rRNA基因和硫氧化酶功能基因对该菌的系统发育进行了分析,比较了菌株在有氮和无氮下的生长情况,并在硫氧化酶和固氮酶基因表达水平上研究了氮源和底物浓度对固氮和硫氧化作用的影响。通过研究,表明该化能硫氧化细菌具有固氮能力,可能为含硫化物废水的治理提供重要的菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 主要仪器设备

Taq PCR Mastermix 购于天一辉远有限公司; DL 2000 Marker, Zomanbio 公司; ICS-900 离子色谱; Dionex™ IonPac™ AS16 IC 色谱柱; LRH-150 生化培养箱、WFZ UV-280SH 紫外分光光度计、CP-80MX 超高速离心机; SHZ-D (III) 循环真空泵; ABI7500 荧光定量 PCR 仪。

#### 1.1.2 主要试剂

试剂: RNAiso Plus (TaKaRa Code No. 9108Q); Glycogen 核酸助沉剂, 北京庄盟生物 ZP423; PrimeScript™ RT reagent Kit, TaKaRa Code No.RR037; 2×TransStart® Top/Tip Green qPCR Super Mix、ROX Reference Dye, 北京全式金生物。

培养基 T 配方:  $K_2HPO_4$  3.0 mmol/L;  $MgSO_4$  1.2 mmol/L;  $NH_4Cl$  1.0 mmol/L;  $FeSO_4$  0.02 mmol/L; pH 6.5~7.0。待灭菌完毕,加入 0.2 g/L  $NaHCO_3$  和 10.0 mmol/L 的  $Na_2S_2O_3$  (两种试剂提前进行过滤除菌), 固体琼脂培养基加入 1.5%的琼脂糖<sup>[9]</sup>。培养基 Tm 配

方:  $K_2HPO_4$  3.0 mmol/L;  $MgSO_4$  1.2 mmol/L;  $FeCl_2$  20.0  $\mu$ mol/L;  $Na_2MoO_4$  0.39 mg/L, pH 6.5~7.0。待灭菌完毕,加入 0.2 g/L  $NaHCO_3$  (试剂进行过滤除菌)。

菌种: 采用 T 培养基将保存于-80 °C 的菌株 LS2 进行活化,活化温度 30 °C,置于摇床 150 r/min 培养 4 d,培养液逐渐变浑浊并产生淡黄色的硫颗粒,适度稀释后通过平板涂布方法接种到 T 固体培养基中,进一步进行菌种纯化,最后挑单菌落进行液体培养。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 进化树构建

菌株 LS2 基因组测序由华大基因完成,其在 NCBI 的序列号为: CP016027.1。本实验基于各个类别的硫氧化细菌和固氮细菌的 16S rRNA 基因、*nifH* 基因及 *soxB* 基因序列,利用 Ribosomal Database Project 数据库的 Seqmatch 程序对已有的序列进行分析。利用 Clustal X version 1.8 对核苷酸序列或氨基酸序列进行比对分析;利用 MEGA 6 软件进行进化距离的计算并完成进化树的构建。

#### 1.2.2 种子液的准备

往 Tm 培养基中加入 1 mM  $Na_2S_2O_3$ ,并以 1 mM  $NH_4Cl$  为氮源,对复活纯化后的菌株 LS2 进行液体培养,3 d 后离心收集菌体,用 Tm 培养基洗涤菌体沉淀,转入新鲜的 Tm 培养基(无硫无氮)中继续培养 24 h (消耗胞内和胞外储存的单质硫),离心收集菌体,用 Tm 培养基洗涤沉淀,以此为后续实验的种子液。

#### 1.2.3 测定菌株 LS2 在有/无氮氮条件下的生长曲线

有氧条件下,分别在 Tm 培养基的中加入无氮(0 mM  $NH_4Cl$ )、有氮(1 mM  $NH_4Cl$ ),以 1 mM  $Na_2S_2O_3$  为底物,置于 30 °C、150 r/min 摇床培养,采用稀释涂布平板的方法测定每组细菌生长量(三个平行)变化规律。

#### 1.2.4 初始氮氮浓度对 *soxB* 和 *nifH* 基因表达的影响

将培养好的种子液按 100%比例转接到新的 Tm 培养基中(使用 Tm 培养基对收集到的菌体进行多次清洗,确保无氮氮存在,重悬后将所有种子液混合后再分配),分别加入 0、1、5、10、50 mM 的  $NH_4^+$  为氮源,加入 5 mM 的  $S_2O_3^{2-}$  为底物,置于 30 °C、150 r/min 恒温摇床进行培养,提取第 8 h 的 RNA,以 16S rRNA 基因为内参,以 0 mM  $NH_4^+$  实验组为对照,采用荧光定量 PCR 方法对 *soxB* 和 *nifH* 进行相对定量分析。

### 1.2.5 初始底物浓度对 *soxB* 和 *nifH* 基因表达的影响

按 100% 比例转接种子液到装有 Tm 培养基的 250 mL 三角瓶中 (使用 Tm 培养基对收集到的菌体进行多次清洗, 确保无氨氮存在, 重悬后将所有种子液混合后再分配), 分别加入 0 mM 和 1 mM 的  $\text{NH}_4^+$  为氮源, 在摇床中适应 1 h 后分别加入 0、0.1、0.5、1、5 mM 的  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  为底物, 置于 30 °C、150 r/min 恒温摇床进行培养, 提取第 8 h 的 RNA, 以 16S rRNA 基因为内参, 以 0 mM 底物实验组为对照, 采用荧光定量 PCR 方法对 *soxB* 和 *nifH* 进行相对定量分析。

### 1.2.6 数据处理

本文对基因表达的研究采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  相对定量方法进行, 得到的数据为目的基因相对于对照组基因的表达变化倍数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株 LS2 关于 16S rRNA、*nifH* 及 *soxB*

#### 基因的进化发育分析

硫氧化细菌 LS2 是一株化能自养的硫氧化细菌, 只能通过硫氧化产生的能量固定  $\text{CO}_2$  为碳源生长。从图 1 的进化分析可知, 菌株 LS2 与 *Halothiobacillus neapolitanus* Pankhurst T1 亲缘关系最近, 相似度为 95%, 表明该菌株属于  $\gamma$  变形菌纲的盐生硫杆菌属 (*Halothiobacillus*), 该菌属中目前已知的种包括 *H. neapolitanus*、*H. kellyi*、*H. hydrothermalis* 等, 都属于好氧的化能自养细菌。*soxB* 基因编码硫酸盐硫脂酶或

硫水解酶 SoxB 亚基 (Thiosulfohydrolase SoxB) 是 Sox 硫氧化酶系的重要组成部分, 与 SoxXA、SoxYZ 和 Sox(CD)<sub>2</sub> 组成的酶复合体催化单质硫、硫代硫酸盐、硫化物等的氧化反应<sup>[10]</sup>; 本文从基因组测序结果发现菌株 LS2 含有 *soxB* 基因, 从 *soxB* 基因序列分析可知, 菌株 LS2 与 *Halothiobacillus* 属亲缘关系也最近 (图 2)。

在 *nif* 基因簇中, *nifH* 基因在进化上非常保守<sup>[11]</sup>, 因此固氮菌 *nifH* 同源性与其系统分类有比较强的相关性, 因此, 为分析研究菌株 LS2 中 *nif* 固氮酶基因簇的来源, 本文对不同类别的固氮菌基于 *nifH* 序列进行进化发育分析。

从图 3 中 *nifH* 的进化分析可知, 菌株 LS2 与 *Acidithiobacillus* 属中 *A. ferrooxidans* 和 *A. ferrivorans* 相似性最高, 均高于 80%。菌株 LS2 属于  $\gamma$  变性菌纲, 却与 *Acidithiobacillia* 纲和  $\alpha$  和  $\beta$  变形菌纲细菌的 *nifH* 的相似性最高, 而 *Halothiobacillus* 属中的细菌除 LS2 外都无固氮酶基因, 说明 LS2 的固氮酶基因可能通过横向转移来源于上述细菌, 或 *Halothiobacillus* 属尚有很多未知的拥有固氮酶基因的菌种。目前已知的硫氧化细菌中, *Beggiatoa alba* ATCC 33555、*Ectothiorhodospira mobilis* DSM 4180、*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 等在细胞水平上已被证实了具有固氮能力<sup>[12]</sup>; *Thiothrix nivea* DSM 5205、*Thiocystis violascens* DSM 198 等的基因组中发现含有完整的 *nif* 固氮酶基因簇, 但细胞水平的固氮能力还尚待研究。本文从基因组测序结果发现菌株 LS2 具有完整的 *nif* 基因簇, 并对其固氮功能进行了基因表达水平上的研究。

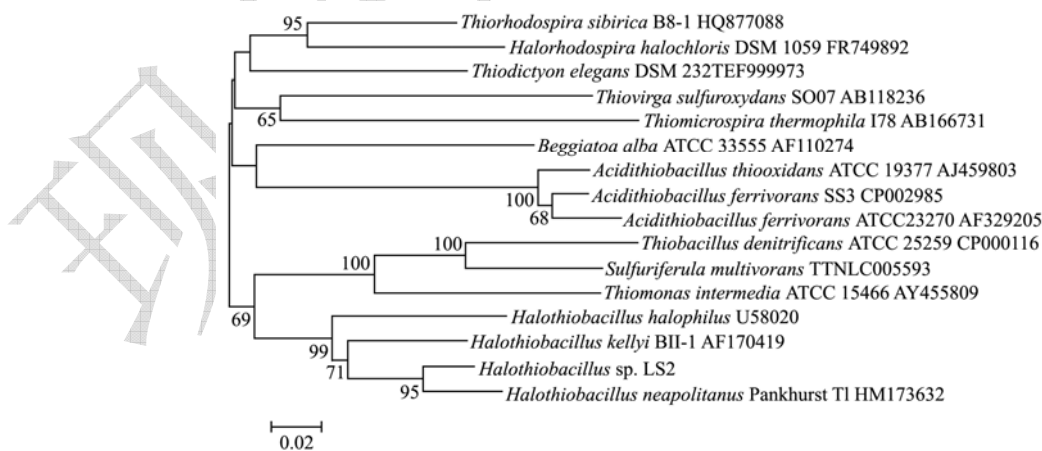


图 1 基于 16S rRNA 基因的硫氧化细菌系统进化发育分析

Fig.1 16S rRNA gene based phylogenetic tree of sulfur-oxidizing bacteria

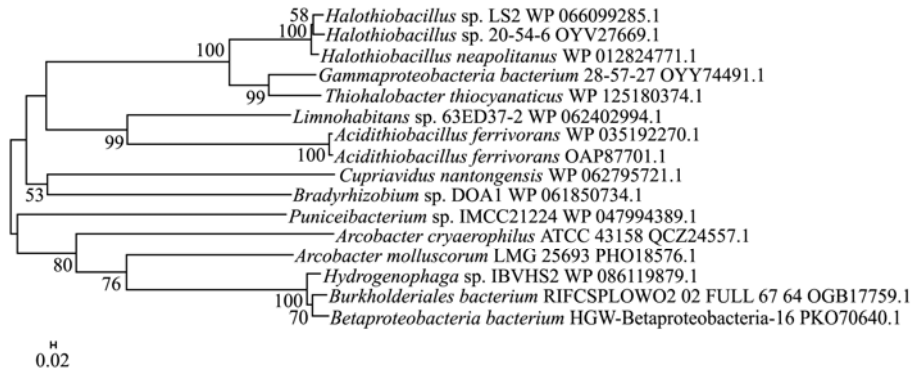


图2 基于 *soxB* 基因的硫氧化细菌系统进化发育分析

Fig.2 *soxB* gene based phylogenetic trees of sulfur-oxidizing bacteria

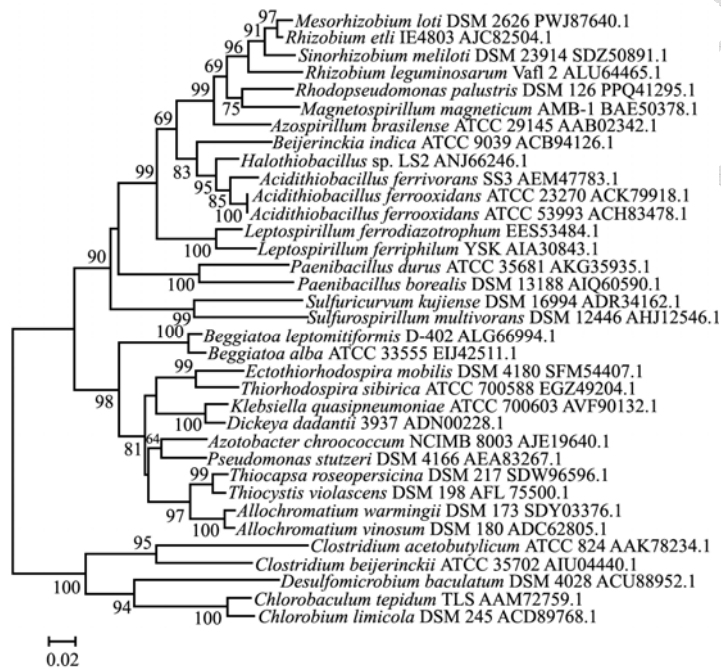


图3 基于 *nifH* 基因的固氮菌系统进化发育分析

Fig.3 *nifH* gene based phylogenetic trees of diazotrophs

2.2 菌株 LS2 在有/无氮条件下的生长情况

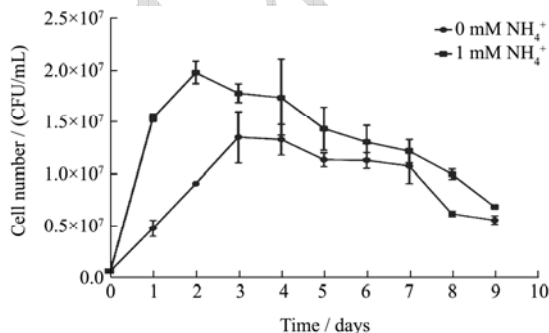


图4 菌株 LS2 以硫代硫酸钠为底物的生长曲线

Fig.4 Growth curve of strain LS2 using sodium thiosulfate as substrate

菌株 LS2 在有氮和无氮条件下的生长情况如图 4 所示, 在 1 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的条件下较快进入对数期, 菌量在第 2 d 达到最高的 1.98 × 10<sup>7</sup>/mL, 生长过程中因硫氧

化产酸导致 pH 下降, 因而第 3 d 开始菌量会开始减少, 逐渐呈下降趋势。无氮条件下菌株只能通过固氮提供生长所需氮源, 生长速度较慢, 其生长对数期一直持续至第 3 d, 菌量在第 3 d 达到最高, 约为 1.37 × 10<sup>7</sup>/mL, 从第 5 d 开始菌量会逐渐减少。无氮条件的生长量低于有氮时, 是因为硫氧化产生的能量除了用于生长, 还要用于固氮作用。

生物固氮 ( $N_2 + 8e^- + 16ATP + 8H^+ \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$ ) 是地球上最耗能的酶促反应之一, 每固定 1 分子氮需消耗 8 分子 ATP 和 4 个电子<sup>[13]</sup>。从目前的研究成果中我们知道这些能量主要来源于与其它元素耦合地球化学循环过程中的生化反应, 如化能异养的共生或自生固氮菌 (*Rhizobium*、*Frankia*、*Azotobacter* 等) 氧化有机物获得能量和电子, 是地球上最主要的生物固氮形式; 一些光能自养的蓝藻, 其固氮所需电子来源于异形胞中的碳水化合物而非光合

作用中水的光解反应。此外，一些硫氧化和铁氧化细菌可能通过硫或铁氧化反应提供的电子和/或能量驱动固氮作用，如：几种铁氧化细菌 *A. ferrooxidans*、*L. ferrooxidans*、*L. ferrodiazotrophum* 基因组中有完整的固氮酶基因 *nifHDKENXUSWVABQ*<sup>[14-16]</sup>，但细胞水平上的研究只有 *A. ferrooxidans* 被报道在氧化  $Fe^{2+}$  的同时可进行固氮<sup>[10]</sup>。而本文中从酿酒废水中分离得到的化能自养硫氧化细菌 *Halothiobacillus* sp. LS2 能在无氮的条件下正常生长，最高生长量是有氮条件下的约 0.7 倍，证明 *Halothiobacillus* sp. LS2 能在有氧条件下进行硫氧化作用为固氮作用提供能量和电子，揭示了一种相互偶联的元素循环方式。

### 2.3 初始氨氮对 *soxB* 和 *nifH* 基因表达的影响

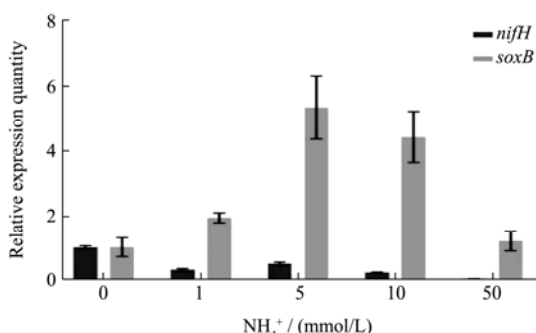


图5 初始氨氮对 *soxB* 和 *nifH* 基因表达的影响

Fig.5 The effect of initial ammonia nitrogen on the expression of *soxB* and *nifH* gene

分别以 0、1、5、10、50 mM 的  $NH_4^+$  为初始氮源时 *soxB* 和 *nifH* 基因的表达情况如图 5 所示，*soxB* 基因表达随着氨氮浓度增加而上升，在 5 mM  $NH_4^+$  的实验组中表达量达到最高，较之对照上调了约 5.3 倍，之后随着浓度继续增加和下降；对比无氨氮的实验组，在加入不同浓度氨氮的实验组中 *nifH* 基因的表达量皆有不同程度下调，当氨氮浓度达到 50 mM 时表达量已不足对照组的十分之一。研究结果说明：氮源存在有利于硫氧化，但不利于固氮作用。

### 2.4 初始底物浓度对 *soxB* 和 *nifH* 基因表达的影响

*soxB* 和 *nifH* 基因在不同底物浓度下的表达情况如图 6 所示：以不加硫代硫酸钠的实验组作为对照，发现无氮源组中 *nifH* 基因的表达量随着  $S_2O_3^{2-}$  浓度的增大而增大，其中 5 mM  $S_2O_3^{2-}$  浓度下 *nifH* 基因表达量上调了约 33 倍，说明底物浓度增加对固氮作用有促进作用。氮源存在时，低浓度底物下 *nifH* 的表达受到抑制，而高浓度时表达量上调，在 5 mM  $S_2O_3^{2-}$  条件下

可上调达到对照组的 5 倍。根据基因表达分析，我们推测固氮作用与硫氧化反应有重要关联，随着硫氧化速率的增加，可能为固氮作用提供更多能量。

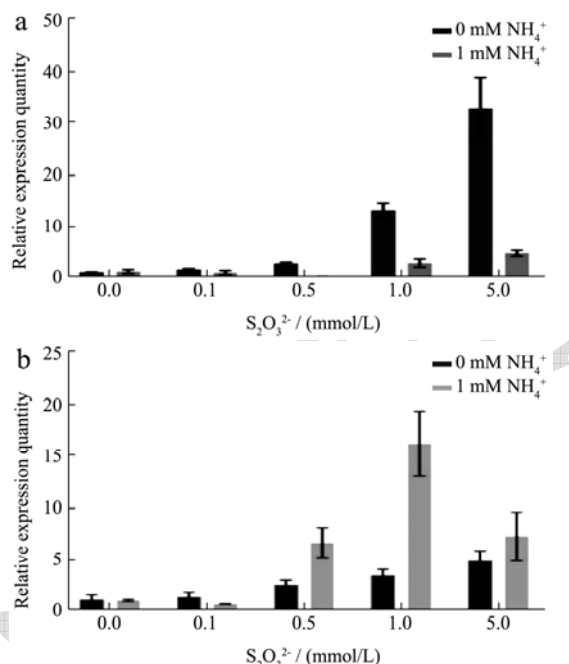


图6 初始底物浓度对 *nifH*(左) 和 *soxB*(右) 基因表达的影响

Fig.6 The effect of initial substrate concentration on the expression of *nifH* gene (left) and *soxB* gene (right)

无氮源时，*soxB* 基因的表达量随着  $S_2O_3^{2-}$  浓度的增大而增大，5 mM  $S_2O_3^{2-}$  浓度下 *soxB* 基因表达量上调了约 5 倍，表明底物浓度的增大有利于菌株 LS2 进行硫氧化反应；氮源存在时，*soxB* 基因的表达量也是随着  $S_2O_3^{2-}$  浓度的增大而增大，1 mM  $S_2O_3^{2-}$  浓度下 *soxB* 基因的表达量最大，约上调了 17 倍，而随着底物浓度的继续增加其表达量开始下调。这些结果表明：底物浓度增加有利于硫氧化反应，从而为固氮作用提供更多能量。

据雄飞的研究利用逆转录 PCR 对几株还原脱氯微生物的 *nifH* 基因进行定性及定量的分析，从表达水平揭示了还原脱氯微生物的生物固氮以及固氮作用与还原脱氯反应的联系<sup>[17]</sup>。本文利用荧光定量 PCR 方法对硫氧化作用关键基因 *soxB* 和固氮酶关键基因 *nifH* 进行表达量的分析，探究了初始氨氮浓度和初始底物浓度对这两种基因表达的影响，发现氮源存在时 *soxB* 表达量随氮源浓度的升高表现为先上升后下降的趋势，在 5 mM  $NH_4^+$  的实验组中表达量达到最高，而 *nifH* 表达量则随氮源浓度升高而下调；底物浓度增加有利于 *soxB* 基因的表达，同时也由于硫氧化作用为固氮作用提供能量，*nifH* 基因的表达量也随之上升。这种研究方法能更加直观地从表达水平上揭示两种生化功能的关联性。

### 3 结论

本研究从酿酒废水中分离了一株化能自养硫氧化细菌 *Halothiobacillus* sp. LS2, 其基因组中同时含有硫氧化酶系和固氮酶系编码基因, 尽管其 16S rRNA 基因和 *soxB* 基因与 *Halothiobacillus* 属最相近, 但其 *nifH* 基因却与 *Acidithiobacillia* 纲的 *Acidithiobacillus* 属最相似, 说明菌株 LS2 的固氮酶基因可能通过基因横向转移从其它菌获得或 *Halothiobacillus* 属仍有很多未知的物种。菌株 LS2 即可在有氮条件下生长, 也可在无氮条件下通过固氮作用获得氮源生长; *nifH* 和 *soxB* 基因的表达分析表明菌株 LS2 的硫氧化反应与固氮作用是息息相关的, 是一种相互偶联的元素循环方式。

### 参考文献

- [1] 王富花,陈清秀.白酒酿造中废水处理方法及工程治理措施[J].酿酒科技,2013,12:80-84  
WANG Fu-huang, CHEN Qing-xiu. Liquor-making wastewater treatment methods and engineering control measures [J]. Liquor-making Science and Technology, 2013, 12: 80-84
- [2] 郝晓地,戴吉,魏丽.生物除硫理论与技术研究进展[J].生态环境,2006,15(4):844-853  
HAO Xiao-di, DAI Ji, WEI Li. Research progress of biological sulfur removal theory and technology [J]. Ecology and Environment, 2006, 15(4): 844-853
- [3] 李彦俊,魏宏斌.废水处理中硫化物脱除技术的研究与应用[J].净水技术,2010,29(6):9-12,56  
LI Yan-jun, WEI Hong-bin. Research and application of sulfides removal technology in wastewater treatment [J]. Water Purification Technology, 2010, 29(6): 9-12, 56
- [4] 陈季华.废水处理工艺设计及实例分析[M].上海:华东师范大学出版社,1989  
CHEN Ji-hua. Design and Analysis of Wastewater Treatment Process [M]. Shanghai: East China Normal University Press, 1989
- [5] 李丛丛.废水中硫化物的生成、硫化物对生化系统的影响及其处理技术的研究[D].青岛:青岛科技大学,2014  
LI Cong-cong. Study on sulfide production, influence of sulfide on biochemical system and removal technology in sulfate wastewater [D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2014
- [6] Barer M. R, Harewood C. R. Bacterial viability and culturability [J]. Adv. Microb. Physiol, 1999, 41: 93-137
- [7] 罗剑飞.硫氧化群落结构分析及其特性研究[D].广州:华南理工大学,2011  
LUO Jian-fei. Microbial community analysis and characterization of sulfur-oxidizing bacteria [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011
- [8] Friedrich C G, Bardischewsky F, Rother D, et al. Prokaryotic sulfur oxidation [J]. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8(3): 253-259
- [9] Ghosh W, Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33: 999-1043
- [10] 谭小琴.珠江水体硫氧化细菌多样性及其硫代谢途径研究[D].广州:华南理工大学,2016  
TAN Xiao-qin. The diversity and sulfur metabolic pathway of sulfur oxidizing bacteria in the pearl river water [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016
- [11] Georgiadis MM, Komiya H, Chakrabarti P, et al. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii* [J]. Science, 1992, 257(5077): 1653-1659
- [12] Mackintosh M E. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. Journal of General Microbiology, 1978, 105: 215-218
- [13] Reed S C, Cleveland C C, Townsend ART. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective [J]. Annual Review Ecology, Evolution, Systematics, 2011, 42: 489-512
- [14] Lin KH, Liao BY, Chang HW, et al. Metabolic characteristics of dominant microbes and key rare species from an acidic hot spring in Taiwan revealed by metagenomic [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 1029
- [15] Parro V, Moreno-Paz M. Gene function analysis in environmental isolates: The *nif* regulon of the strict iron oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans* [J]. PNAS, 2003, 100: 7883-7888
- [16] Tyson G W, Lo I, Baker B J, et al. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. from an acidophilic microbial community [J]. Applied Environmental Microbiology, 2005, 71: 6319-6324
- [17] 琚雄飞.还原脱氯微生物的生物固氮研究[D].合肥:中国科技大学,2007  
JU Xiong-fei. Nitrogen fixation by reductively dechlorinating bacteria [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2007