

耐碱性硫酸盐还原菌发酵培养基的优化研究

姚亮¹, 赵运生², 孔京², 孔凡敏², 胡永红^{1*}

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 211816;

2. 中石化南京化工研究院有限公司, 江苏南京 210048)

摘要:以耐碱性硫酸盐还原菌降解率为指标, 比较基础碱性培养基不同的碳源、(有机与无机)氮源、无机盐的降解效果, 筛选其中效果较好的8个因素, 优化1株耐碱性硫酸盐还原菌的发酵工艺; 设计PB试验并分析其中影响最为显著的3个因素; 进行最陡爬坡实验逼近因素的最佳质量浓度, 以最陡爬坡实验降解率最高的组为中心值进行中心组合试验, 并分析得到最佳优化因素为: 乙醇质量浓度为 5.27 g/L、酵母粉质量浓度为 2.03 g/L、KCl 质量浓度为 4.02 g/L。在此条件下, 降解率达到 81.21%, 较未优化前提高 17.99%。

关键词:生物脱硫; 硫酸盐还原菌; 响应面; 二氧化硫降解; 发酵优化

中图分类号: TQ920.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2021)12-0154-06

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2021.12.031

Optimization of fermentation medium for alkali-resistant sulfates-reducing bacteria

YAO Liang¹, ZHAO Yun-sheng², KONG Jing², KONG Fan-min², HU Yong-hong^{1*}

(1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China;

2. Sinopec Nanjing Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd., Nanjing 210048, China)

Abstract: Taking the degradation rate of alkali-resistant sulfates-reducing bacteria to sulfur as the index, the effects of different carbon sources, organic and inorganic nitrogen sources, and inorganic salts in basic alkaline medium are compared, 8 factors with better effects are screened, and the fermentation process of one alkali-resistant sulfates-reducing bacteria is optimized. PB tests are designed to analyze three factors with the most significant effect. The steepest climbing experiment is carried out to approach the best mass concentration of the factor. Taking the group with the highest degradation rate in the steepest climbing test as the central value, central combination test is carried out, and the optimization factors are obtained through analysis. The best factors are as follows: the mass concentrations of ethanol, yeast powder and KCl are $5.27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $2.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $4.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Under the best conditions, the degradation rate reaches 81.21%, which is 17.99% higher than that before optimization.

Key words: biological desulfurization; bacteria for reduction of sulfates; response surface; degradation of sulfur dioxide; optimization of fermentation

煤炭燃烧产生的烟气是 SO_2 排放的主要来源^[1-2]。释放到大气中的 SO_2 被氧化为 SO_3 , 导致硫酸雨的形成, 破坏淡水湖泊和河流生态系统^[3]。 SO_2 的排放不仅会对环境造成严重破坏, 而且还会对人类健康造成严重损害, 高浓度 SO_2 将会刺激呼吸系统, 导致呼吸道系统相关疾病的风险增加。

生物法烟气脱硫是近年来新兴的从工业烟气中去除 SO_2 的技术方法之一。荷兰 Paque 公司和 Hoogovens 公司共同开发的 Biostar 工艺, 其串联厌氧好氧反应器实现了 SO_2 到 S 的转换^[4]。由于不需要购买石灰石等反应物, 节省了物料储存的空间和更低的能耗, 该工艺相较于传统湿法脱硫成本降

低 30%^[5]。

在该工艺流程中, SO_2 被碱液吸收后以 SO_3^{2-} 形式存在, SO_3^{2-} 在厌氧反应器中被硫酸盐还原菌还原为 S^{2-} , 产生的 S^{2-} 在好氧反应器由硫氧化细菌氧化为 S^0 。厌氧反应系统中, 产生的 S^{2-} 若以 H_2S 分子形式存在, 不仅会降低硫酸盐还原菌的活性, 还会产生难闻的臭鸡蛋味和腐蚀设备^[6-7], 危害从业人员的健康与安全。碱性环境不仅有利于 SO_2 的吸收, 同时使 H_2S 以 HS^- 形式存在, 减少了产物对硫酸盐还原菌的抑制。

为了寻找适合碱性环境生长的菌株, 课题组自南京汤山温泉景区的土样中筛选得到降解效果良好

收稿日期: 2021-01-28; 修回日期: 2021-09-30

基金项目: 微生物法脱硫工业气体中二氧化硫及硫磺回收(202010112)

作者简介: 姚亮(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物脱硫, 1318688437@qq.com; 胡永红(1968-), 女, 博士, 教授, 研究方向为生物化工, 通讯联系人, hyh@njtech.edu.cn。

的原始菌株,并进行多次氮离子诱变获得可在 pH=10 的环境中生存的耐碱硫酸盐还原菌,命名为 SBR-A19-3。在前期工作的基础上,笔者主要采用单因素试验、PB 试验、最陡爬坡实验、中心组合试验、响应面分析等方法,探索耐碱性硫酸盐还原菌的最优培养配方,以期为该菌株后期的产业化提供理论依据。

1 硫酸盐还原菌的培养优化

1.1 材料与方法

1.1.1 菌种

硫酸盐还原菌 SBR-A19-3。

1.1.2 培养基

基础碱性培养基:Na₂CO₃·5 g/L、Na₂SO₄ 2 g/L、乳酸钠 5 mL(60%水溶液)、NH₄Cl 1 g/L、NaCl 2 g/L、酵母膏 1 g/L;pH=10。

指示剂硫酸亚铁铵、还原剂抗坏血酸用无菌水溶解,现用现配。0.22 μm 滤头过滤除菌,适量加入使培养液中最终质量浓度为 0.5 g/L。

1.1.3 主要试剂和仪器

主要试剂:铬酸钡、浓盐酸、氨水、硫酸亚铁氨,西陇科学股份有限公司生产;NH₄Cl、K₂PO₄、KCl、NaCl、乙醇、乳酸钠(60%水溶液),国药集团化学试剂有限公司生产;酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖、蔗糖、乳糖,北京奥博星生物技术有限责任公司生产。

仪器设备:电热恒温培养箱(上海跃进 PYX-DHS.400BS-III);灭菌锅(厦门致微 GI54DWS);厌氧操作台(Ruskinn Bugbox M);紫外分光光度计(普析通用 T6);电子天平(梅特勒托利多 MS105DU);恒温摇床(Ecotron S-000123558)。

1.2 实验方法

1.2.1 硫酸根浓度的检测

采用铬酸钡分光光度法检测硫酸根含量^[8-9]。配置标准硫酸根溶液,测试不同稀释倍数的标准液的吸光值,拟合两者之间的线性关系。

1.2.2 单因素实验设计

在基础碱性培养基中,置换不同的碳源、(有机与无机)氮源、无机盐,比较不同培养配方的效果。配置的培养基在 30℃、转速为 0 的情况下发酵培养 3 d,测定每种因素对菌株脱硫率的影响。

1.2.3 Plackett-Burman(PB)设计试验

选择单因素实验中降解率较高的组,利用 Design Expert(D-E)软件设计 PB 试验方案。

1.2.4 最陡爬坡试验

在 PB 实验中筛选影响最为显著的 3 个因素,并根据 PB 设计拟合的方程的相应的变量系数及正负情况,确定爬坡的间距和方向。

1.2.5 响应面法分析

使用 D-E 分析研究了硫酸盐还原菌对硫酸根降解率最高的培养配方。根据软件预测的最佳变量取值点进行试验,验证模型的准确性。

2 结果与分析

2.1 硫酸根浓度的检测

利用铬酸钡分光光度法测量不同质量硫酸根溶液的 OD₄₂₀,得到拟合的标准曲线方程为: $y=0.2519x-0.0875$, $R^2=0.9982$,其中硫酸根质量-吸光值标准曲线如图 1 所示。

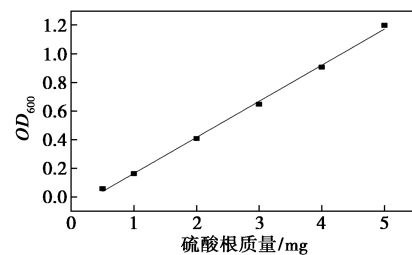


图 1 硫酸根质量-吸光值标准曲线

2.2 单因素实验结果

2.2.1 碳源对菌株降解率的影响

碳源是构成菌体的基本骨架,是菌体生长的能量来源^[10]。碳源的利用情况直接影响菌株的生长发育和硫酸根的降解^[11-13]。在其他成分条件不变的情况下,保持碳源质量浓度为 3 g/L,替换碳源,观察碳源种类对菌株降解率的影响,结果如表 1 所示。

表 1 碳源对降解率的影响

碳源种类	乳酸钠	乙醇	葡萄糖	蔗糖	乳糖
降解率/%	63.22	72.14	55.25	34.56	15.41

由表 1 可知,在测试的 6 种碳源中,以葡萄糖、乙醇、乳酸钠为硫酸盐还原菌碳源的降解率较高,以蔗糖、乳糖为硫酸盐还原菌碳源的降解率较差。因此,在下个阶段的 PB 设计中,将乳酸钠、乙醇和葡萄糖作为考察因素。

2.2.2 氮源对菌株降解率的影响

氮元素是菌体合成蛋白质与核酸不可或缺的成分之一^[14]。在有机、无机氮源质量浓度均为 1 g/L 条件下,替换不同氮源观察氮源种类对菌株降解率

的影响,结果如表 2 所示。

表 2 氮源对降解率的影响

氮源种类	酵母膏	酵母粉	蛋白胨	牛肉膏	尿素	氯化铵
降解率/%	63.22	68.96	60.69	56.18	41.74	63.22

由表 2 可知,不同有机氮源降解效果差别不大,酵母粉作为有机氮源的实验组降解率最高,而尿素作为无机氮源降解效果不佳。因此在下个阶段的 PB 设计中,将酵母膏、酵母粉和 NH₄Cl 作为考察因素。

2.2.3 无机盐对菌株降解率的影响

无机盐具有维持细胞的酸碱平衡、渗透压、氧化还原电位等功能^[15]。保持无机盐质量浓度为 1 g/L,观察无机盐种类对菌株降解率的影响,结果如表 3 所示。由于基础培养基中含有大量维持碱性的碳酸根离子,大多金属离子会与之形成沉淀,故测试的无机盐为 NaCl、KCl、K₂HPO₄。

表 3 无机盐对菌株降解率的影响

无机盐种类	NaCl	KCl	K ₂ HPO ₄
降解率/%	63.22	67.04	63.13

由表 3 可知,添加 KCl 的效果最好,这是由于在 NaCO₃ 较多的体系中,K⁺有利于维持菌株的渗透压平衡。

2.3 Plackett-Burman (PB) 设计试验

选取对降解率影响较大的 8 个主要因素乳酸钠、乙醇、葡萄糖、酵母膏、酵母粉、氯化铵、KCl、NaCl 和 3 个虚拟变量进行 PB 设计。变量的因素水平及实验结果分别如表 4、表 5 所示。使用 D-E 对表 5 进行分析,软件拟合模型的方差分析及因素的影响程度如表 6 所示。

表 4 PB 设计试验因素水平表

编号	变量	水平/(g·L ⁻¹)	
		低(-1)	高(+1)
A	乳酸钠	3	4.5
B	乙醇	3	4.5
C	葡萄糖	3	4.5
D	酵母膏	1	1.5
E	酵母粉	1	1.5
F	NH ₄ Cl	1	1.5
G	NaCl	2	3.0
H	KCl	2	3.0
I、J、K	虚拟变量		

表 5 PB 实验方案及降解率

编号	变量											降解率/%
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	70.92
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	58.20
3	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	57.53
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	46.68
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	58.93
6	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	56.85
7	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	70.29
8	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	76.34
9	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	67.42
10	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	42.36
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	64.66
12	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	49.66

表 6 PB 实验方差表分析表

方差来源	平方和	自由度	均方根	F	P	影响程度
Model	1175.44	8	146.93	47.05	0.0045	significant
乳酸钠	1.47	1	1.47	0.47	0.5419	3
乙醇	765.12	1	765.12	245.00	0.0006	8
葡萄糖	0.68	1	0.68	0.22	0.6722	1
酵母膏	4.39	1	4.39	1.41	0.3210	9
酵母粉	319.09	1	319.09	102.18	0.0021	6
NH ₄ Cl	3.2	1	3.2	1.03	0.3857	2
NaCl	10.23	1	10.23	3.28	0.1680	7
KCl	71.25	1	71.25	22.81	0.0174	5
残差	9.37	3	3.12			
总离差	1184.81	11				

模型 R²=0.992 1,因素 P 值小于 0.05 为显著因素,P 值小于 0.01 为极显著因素。由表 6 可知,8 个主要因素对菌株降解率影响显著性由大到小顺序为:乙醇>酵母粉>KCl>NaCl>酵母膏>NH₄Cl>乳酸钠>葡萄糖,其中乙醇、酵母粉为极显著因素,氯化钾为显著因素。从 8 个因素中选取对菌株降解率影响显著的乙醇、酵母粉、KCl 三个因素进行下一步试验的优化。

2.4 最陡爬坡试验

乙醇、酵母粉、KCl 三个因素的模型方程系数为正值,根据 3 个因素影响值大小设计变化的方向和梯度,进行正向爬坡试验,结果如表 7 所示。由表 7

中可以看出,当乙醇、酵母粉、氯化钾质量浓度分别为 5、2、4 g/L 时获得最大取值。

表 7 最陡爬坡试验设计及结果

编号	乙醇 质量浓度/ (g·L ⁻¹)	酵母粉 质量浓度/ (g·L ⁻¹)	氯化钾 质量浓度/ (g·L ⁻¹)	降解率/ %
1	3	1	2	70.34
2	3.5	1.25	2.5	74.43
3	4	1.5	3	76.30
4	4.5	1.75	3.5	77.38
5	5	2	4	79.21
6	5.5	2.25	4.5	73.89
7	6	2.5	5	70.21

2.5 中心组合实验及其相应面分析

2.5.1 中心组合实验

以最陡爬坡试验获得的最佳值为中心,设计 3 因素 5 水平的中心组合试验,实验的变量、水平和实验结果如表 8、表 9 所示。

表 8 中心组合设计试验因素与水平

水平	因素		
	乙醇质量浓度 (A)/(g·L ⁻¹)	酵母粉质量浓度 (B)/(g·L ⁻¹)	KCl 质量浓度 (C)/(g·L ⁻¹)
-1.68	3.32	1.16	2.32
-1	4	1.5	3
0	5	2	4
+1	6	2.5	5
+1.68	6.68	2.84	5.68

表 9 中心组实验设计及其对应降解率

编号	A	B	C	降解率/%
1	1.682	0	0	74.85
2	0	0	1.682	72.94
3	0	0	0	79.12
4	1	-1	-1	69.54
5	1	-1	1	73.79
6	0	-1.682	0	66.35
7	0	1.682	0	67.84
8	-1	-1	-1	63.90
9	0	0	0	80.70
10	1	1	1	70.07
11	0	0	0	81.24

12	-1.682	0	0	67.52
13	0	0	0	80.92
14	0	0	0	80.72
15	-1	-1	1	68.47
16	1	1	-1	74.09
17	-1	1	-1	71.45
18	0	0	0	80.81
19	-1	1	1	71.03
20	0	0	-1.682	72.52

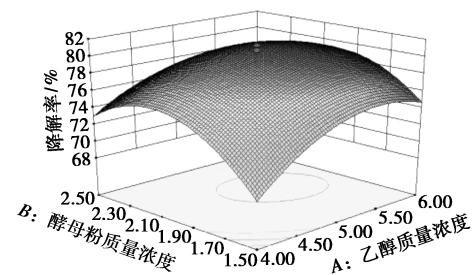
根据表 9 中的实验结果,使用 D-E 拟合模型,结果如表 10 所示。拟合模型的归方程为: $Y = 80.56 + 1.83A + 0.98B + 0.37C - 1.16AB - 0.49AC - 1.66BC - 3.2A^2 - 4.65B^2 - 2.65C^2$, $R^2 = 0.9832$, $P < 0.0001$ 。

表 10 回归方程方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
Model	571.30	9	63.48	64.85	<0.0001
乙醇(A)	45.65	1	45.65	46.64	<0.0001
酵母粉(B)	13.24	1	13.24	13.53	0.0043
KCl(C)	1.89	1	1.89	1.94	0.1943
AB	10.76	1	10.76	11.00	0.0078
AC	1.92	1	1.92	1.96	0.1915
BC	21.98	1	21.98	22.46	0.0008
A ²	147.61	1	147.61	150.81	<0.0001
B ²	311.13	1	311.13	317.88	<0.0001
C ²	101.52	1	101.52	103.72	<0.0001
残差	9.79	10	0.98		
失拟项	7.02	5	1.40	2.54	0.1646
自然误差	2.76	5	0.55		
总离差	581.09	19	63.48	64.85	<0.0001

2.5.2 响应面优化结果的分析

乙醇与酵母粉交互影响降解率的响应面图和等高线图如图 2 所示。



(a) 响应面图

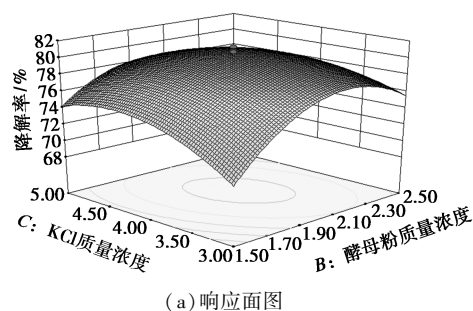
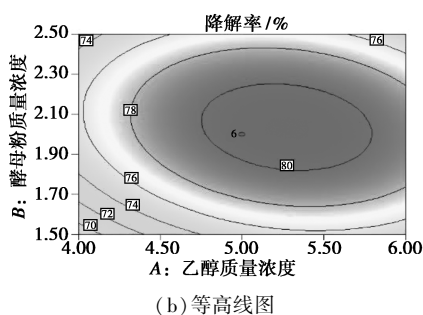


图 2 乙醇与酵母粉交互影响降解率的响应面图和等高线图

从图 2 中可以看出,当 KCl 质量浓度为 4.00 g/L 时,乙醇与酵母粉的交互作用对菌株降解率影响显著,随着乙醇和酵母粉质量浓度的增加,降解率均呈先上升后降低的变化趋势。

乙醇与 KCl 交互影响降解率的响应面图和等高线图如图 3 所示。

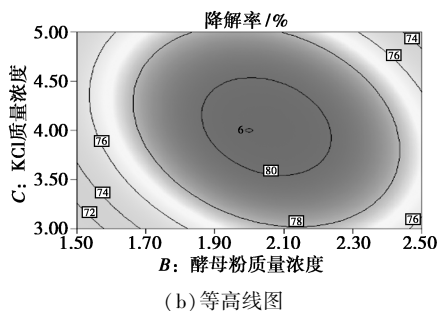


图 4 酵母粉与 KCl 交互影响降解率的响应面图和等高线图

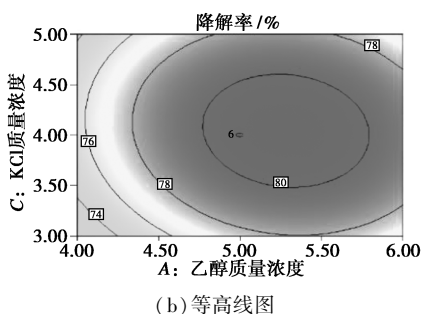
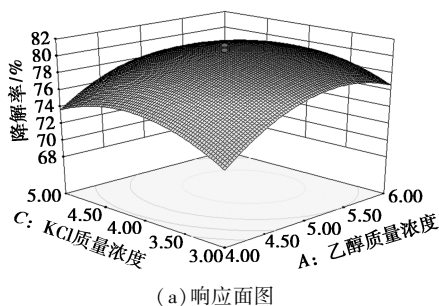


图 3 乙醇与 KCl 交互影响降解率的响应面图和等高线图

从图 3 中可以看出,酵母粉质量浓度固定为 2 g/L 时,乙醇与 KCl 的交互作用对菌株降解率影响显著,随着乙醇和 KCl 浓度的增加,降解率均呈先上升后降低的变化趋势。乙醇对菌株降解率的影响较大;KCl 质量浓度过高或过低都会影响细胞的渗透压,导致细胞水分变化,进而影响细胞的正常代谢。

酵母粉与 KCl 交互影响降解率的响应面图和等高线图如图 4 所示。

从图 4 中可以看出,乙醇质量浓度固定为 5 g/L 时,酵母粉与 KCl 的交互作用对菌株降解率影响显著,随着酵母粉和 KCl 质量浓度的增加,降解率均呈先上升后降低,其中酵母粉的影响较大。

根据 D-E 预测,当乙醇质量浓度为 5.27 g/L、酵母粉质量浓度为 2.03 g/L、KCl 质量浓度为 4.02 g/L 时,降解率取得最大值 80.849%。实验验证降解率为 81.14%,软件预测准确度较高。

3 结论与展望

利用 D-E 对耐碱性硫酸盐还原菌培养配方中关键因素进行优化,关键因素乙醇、酵母粉、KCl 的质量浓度分别为 5.27、2.03、4.02 g/L 时,降解率获得最大值 81.21%,与未优化的培养基初始降解率 63.22% 相比增加 17.99%。碱性培养基配方改为: Na_2CO_3 5 g/L、 Na_2SO_4 2 g/L、乙醇 5.27 g/L、 NH_4Cl 1 g/L、酵母粉 2.03 g/L、KCl 4.02 g/L、硫酸亚铁铵 0.5 g/L、抗坏血酸 0.5 g/L、pH=10。

生物脱硫技术操作条件温和,能够产生可回收的硫单质,实现变废为宝,具有广阔的应用前景。焦磷酸酶、APS 还原酶以及亚硫酸盐还原酶是微生物还原硫化物过程中的关键酶^[16]。对于用于二氧化硫脱除的硫酸盐还原菌,初始代谢底物为 SO_3^{2-} ,代谢过程中关键酶为亚硫酸盐还原酶^[17-19]。如何提高关键酶的表达量及改善其构型^[20],对提高菌株效率具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 姜晓娟.煤炭行业二氧化硫的危害及防治[J].煤炭加工与综合利用,2010,(1):47-49.
- [2] 郭玉华,刘巧琳,张学勤.关注烟气脱硫工程的二次污染[J].内蒙古石油化工,2005,(10):50-51.
- [3] 殷宇飞,张洛璋,张司扬.酸雨气象成因以及对农作物的危害与防御措施[J].乡村科技,2020,11(34):113-114.
- [4] 徐海宏,李满.环境工程微生物学[M].北京:煤炭工业出版社,2005.
- [5] Pandey R A, Biswas R, Chakrabarti T, *et al.* Flue gas desulfurization; physicochemical and biotechnological approaches [J]. *Critical Reviews in Environmental Science & Technology*, 2005, 356(6):571-622.
- [6] Luis Q A, Domínguez-Aguilar Yureel, Avelino-Jiménez, *et al.* Analysis of the physicochemical, mechanical, and electrochemical parameters and their impact on the internal and external SCC of carbon steel pipelines[J]. *Materials*, 2020, 13(24):5771-5806.
- [7] Cui Yanyu, Qin Yongxiang, Ding Qingmiao, *et al.* Study on corrosion behavior of X80 steel under stripping coating by sulfate reducing bacteria[J]. *BMC Biotechnology*, 2021, 21(1):1-12.
- [8] 周琴,周良.铬酸钡分光光度法测定水中硫酸盐含量[J].四川环境,2019,38(6):125-127.
- [9] 孙广垠,节梦瑞,张会宁,等.铬酸钡法测定硫酸根的干扰因素研究[J].能源环境保护,2020,34(1):25-29.
- [10] 何伟,李菁菁,包可翔,等.高效表达淀粉酶 *Bacillus koreensis* 的培养基响应面优化[J].天然产物研究与开发,2019,31(8):1425-1433.
- [11] Zhou Jiemin, Xing Jianmin. Effect of electron donors on the performance of haloalkaliphilic sulfate-reducing bioreactors for flue gas treatment and microbial degradation patterns related to sulfate reduction of different electron donors [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 96:14-22.
- [12] B W E M A, B C S A, C K R A. Global co-occurrence of acid mine drainage and organic rich industrial and domestic effluent; Biological sulfate reduction as a co-treatment-option-science [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2020, 38:101650-101661.
- [13] A R B C, B L A G G, B A F M B, *et al.* Sulfate removal rate and metal recovery as settling precipitates in bioreactors; Influence of electron donors [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 403:123622-123670.
- [14] 王婷,周俊,徐为中,等.生长因子对SRB处理硫酸盐废水的影响研究[J].工业水处理,2016,36(6):38-42.
- [15] 桑建伟,黄家榜,杨宏星,等.不同无机盐对市政厌氧污泥脱水性能的影响[J].环境科学导刊,2020,39(5):60-65.
- [16] 闫亮,赵辉.硫酸盐还原菌酶学性质及应用的研究进展[J].中国农学通报,2020,36(31):13-19.
- [17] 王敏.嗜酸氧化亚铁硫杆菌亚硫酸还原酶的 α,β 亚基的表达纯化及相互作用[D].长沙:中南大学,2008.
- [18] 常磊峰.硫酸盐还原分离菌APS还原酶和亚硫酸盐还原酶的纯化及性质研究[D].呼和浩特:内蒙古师范大学,2008.
- [19] 杨宇,赵晶,王玉桥,等.西太平洋“暖池”深海沉积物中异化型亚硫酸盐还原酶基因多样性分析[J].海洋学报(中文版),2009,31(4):78-86.
- [20] 孟平平,李媛媛,高蕊,等.Neuritin原核表达载体构建及高表达菌株筛选[J].石河子大学学报(自然科学版),2020,38(4):491-495. ■
- [12] Kim H G, Borse P H, Jang J S, *et al.* Engineered nanorod perovskite film photocatalysts to harvest visible light [J]. *Adv Mater*, 2011, 23:2088-2092.
- [13] Abe T, Nagai K, Kabutomori S, *et al.* An organic photoelectrode working in the water phase; visible-light-induced dioxygen evolution by a perylene derivative/cobalt phthalocyanine bilayer [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45:2778-2781.
- [14] Sadale S B, Neumann-Spallart M. Drop-cast tungsten trioxide semi-conducting films in photoelectrocatalysis [J]. *J Electroanal Chem*, 2020, 877:114502-114506.
- [15] 李文章,李洁,王旋,等.立方相 WO_3 薄膜的制备与表征[J].无机材料学报,2010,25(2):1319-1324.
- [16] Kong Y Q, Sun H G, Zhao X, *et al.* Fabrication of hexagonal/cubic tungsten oxide homojunction with improved photocatalytic activity [J]. *Appl Catal A: Gen*, 2015, 505:447-455.
- [17] 陈涛,李欣,欧珊珊,等.不同晶相三氧化钨纳米晶粒光降解性能研究[J].功能材料,2018,6(49):06029-06034.
- [18] 尹翔.立方相三氧化钨的制备及光催化性能研究[D].长沙:中南大学,2011.
- [19] Cora F, Patel A, Harrison N M, *et al.* An ab initio hartree-fock study of the cubic and tetragonal phases of bulk tungsten trioxide [J]. *Am Chem Soc*, 1996, 118:12174-12182.
- [20] Chatten R, Chadwick A V, Rougier A, *et al.* The oxygen vacancy in crystal phases of WO_3 [J]. *J Phys Chem B*, 2005, 109:3146-3156.
- [21] Gonzalez-Borrero P P, Sato F, Medina A N, *et al.* Optical band-gap determination of nanostructured WO_3 film [J]. *Appl Phys Lett*, 2010, 96:061909.
- [22] 肖永昊.三氧化钨纳米结构光阳极的制备及其光电化学性能研究[D].广州:华南理工大学,2018.
- [23] Li D, Takeuchi R, Chandra D, *et al.* Visible light-driven water oxidation on an in situ N_2 -intercalated WO_3 nanorod photoanode synthesized by a dual-functional structure-directing agent [J]. *ChemSusChem*, 2018, 11(7):1151-1156.
- [24] Sohani T, Tayyebi A, Hong H, *et al.* A novel growth control of nanoplates WO_3 photoanodes with dual oxygen and tungsten vacancies for efficient photoelectrochemical water splitting performance [J]. *Sol Energy Mat Sol C*, 2019, 191:39-49.
- [25] 王振兴.三氧化钨复合薄膜的制备及其光电性能研究[D].长春:吉林大学,2019.
- [26] Gu Y J, Zheng W Q, Bu Y Y. Facile preparation of nanoflower structured WO_3 thin film on etched titanium substrate with high photoelectrochemical performance [J]. *J Electroanal Chem*, 2019, 833(15):54-62. ■

(上接第153页)