



DOI: 10.16108/j.issn1006-7493.2019025

引用格式: 陈亚文, 张朝晖. 2019. 富集培养条件下湖泊和沿海海域水体硫酸盐还原菌的耐氧性特征[J]. 高校地质学报, 25(5): 705–713

## 富集培养条件下湖泊和沿海海域水体 硫酸盐还原菌的耐氧性特征

陈亚文, 张朝晖\*

浙江大学 海洋学院, 舟山 316021

**摘要:** 硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) 是一类兼性厌氧菌, 在湖泊和海洋有机物矿化过程和生物源性黄铁矿的生成过程中都扮演着重要角色。环境溶解氧浓度对硫酸盐还原过程影响较大, 硫酸盐还原菌在水体中的耐氧性是目前的研究热点。文章采集了象山港和水口水库不同溶解氧水平下的水样, 并在相应的溶解氧梯度下进行富集培养, 以探讨不同溶解氧浓度下硫酸盐还原菌的耐氧性特征及硫代谢相关菌的组成。结果显示, 在富集培养条件下湖泊和沿海海域中 *Desulfovibrio* (脱硫弧菌属) 和 *Desulfomicrobium* (脱硫微菌属) 为主要硫酸盐还原细菌, 而 *Shewanella* (希瓦氏菌属) 和 *Sulfurospirillum* (硫小螺体属) 为其硫代谢相关菌。*Desulfovibrio* 的相对丰度与溶解氧水平密切相关, 随溶解氧浓度的减少, 其相对丰度增加。SRB 的耐氧上限为 6.68 mg/L, 明显高于以往纯培养或共培养的耐氧上限值。作者推测这不仅与其高氧环境的适应策略有关, 还可能得益于共存菌的贡献, 后者可能通过消耗环境中的氧为 *Desulfovibrio* 提供生态位, 提高其耐氧水平。

**关键词:** 硫酸盐还原菌; 富集培养; *Desulfovibrio* spp.; 溶解氧; 硫代谢相关菌; 湖泊和沿海海域

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 1006-7493 (2019) 05-705-09

## Oxygen Tolerance of Sulfate Reducing Bacteria in Fresh and Coastal Sea Waters under Enrichment Culture Conditions

CHEN Yawen, ZHANG Zhaozui\*

Ocean College of Zhejiang University, Zhoushan 316021, China

**Abstract:** Sulfate-reducing bacteria (SRB) play an important role in the process of organic matter mineralization and formation of biogenic pyrite in lake and coastal sea sediments. Understanding how SRB respond to dissolved oxygen contents (D.O.) in fresh and coastal sea waters is essential to predict future evolution of mineralization under increased eutrophication and seasonal hypoxia. So far most pure cultures of sulfate reducing bacteria have been conducted under strict hypoxic conditions, in which SRB would gradually lose oxygen tolerance in the original habitat. In order to address how SRB respond to D.O. contents with co-existing bacteria, we collected water samples along the D.O. gradients and incubated them with D.O. concentrations strictly controlled the same as *in situ*. In such enrichment cultures, genera *Desulfovibrio* and *Desulfomicrobium* were the main sulfate-reducing bacteria, and genera *Shewanella* and *Sulfurospirillum* were the sulfur metabolism-related bacteria associated with SRB. The relative abundances of *Desulfovibrio* spp. decreased when D.O. concentration increased. The upper D.O. limit in our enrichment cultures was 6.68 mg/L, significantly higher than those previously reported in pure cultures or co-cultures, most likely resulted from the contribution of coexisting sulfur

收稿日期: 2019-03-19; 修回日期: 2019-03-26

基金项目: 国家自然科学基金 (41473069)

作者简介: 陈亚文, 女, 1993年生, 硕士研究生, 主要从事生物地球化学的研究; E-mail: chenyawen@zju.edu.cn

\*通讯作者: 张朝晖, 男, 教授, 主要从事海洋化学、有机地球化学、稳定同位素地球化学和古气候研究; E-mail: zhaohui\_zhang@zju.edu.cn



metabolism-related bacteria which may provide ecological niches for *Desulfovibrio* spp. by consuming residual oxygen.

**Key words:** sulfate-reducing bacteria; enrichment culture; *Desulfovibrio* spp.; dissolved oxygen; sulfur metabolism-related bacteria; lakes and coastal seas

**Corresponding author:** ZHANG Zhaohui, Professor; E-mail: zhaohui\_zhang@zju.edu.cn

自生硫化物矿物多来源于生物过程或水热活动 (Morse et al., 1987)。微生物可以通过履行生物功能形成多种矿物 (Lowenstam, 1981)，其中硫酸盐还原是生成硫化物矿物 (如黄铁矿, FeS) 的典型方式。硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) 通过还原硫酸盐 ( $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$ ) 和氧化有机物来获取能量 (Muyzer and Stams, 2008)，是其中的主要参与者 (Zhou et al., 2014)。硫酸盐还原菌为地球上最古老的原核生物群落 (Barton and Fauque, 2009)，在全球硫循环和碳循环中至关重要 (Schlegel, 1981)。其广泛分布于海水、海洋沉积物、土壤、温泉、地热田、油气井中 (Cypionka et al., 1985; Fukui and Takii, 1990; Ravenschlag et al., 2000; Rabus et al., 2006)，近年来在生物矿化过程中发挥的作用被不断发掘 (Picard et al., 2017)，例如通过异化硫酸盐还原参与有机物的被矿化过程 (Jørgensen, 1982)，和其他细菌 (如 *Shewanella* 希瓦氏菌属) 协同作用形成生源性黄铁矿 (Park and Kim, 2001; Zhou et al., 2014)。这些产生硫化铁的过程具有重要的生物地球化学应用，如铀的长期固定等 (Zhou et al., 2014)。同时，硫酸盐还原菌细胞表面提供了金属结合位点，和矿物成核和生长位点 (Beveridge et al., 1983; Ferris et al., 1987)，能将自身产生的硫离子 ( $\text{S}^{2-}$ ) 与重金属离子结合，将其还原为低毒性和低溶解度的还原态，从而起到环境保护的作用 (Lovley and Phillips, 1992; Tucker et al., 1998; Gu and Chen, 2003; Barton et al., 2015)。

破译微生物在硫化铁矿物形成中的作用对于重建现代和古代的Fe和S生物地球化学循环至关重要 (Picard et al., 2017)。然而，生源黄铁矿的同位素组成显示，现代和古代全球地球化学硫循环在生物和非生物组分之间存在相互作用 (Wilkin et al., 1997; Schieber, 2002; Wacey et al., 2015; Fike et al., 2015; Gregory et al., 2015, 2016)。硫酸盐还原菌参与的生物矿化活动易受多种环境因素的制约，如溶解氧、硫代谢相关菌等 (Lowenstam, 1981;

Abdollahi and Wimpenny, 1990; Bozo-Hurtado et al., 2013)。因此，探讨硫酸盐还原菌生物功能影响因素对进一步了解其在生物地球化学循环中的行为至关重要。

硫酸盐还原菌能在 3.5~75°C (Barton, 1995; Robador et al., 2009) 和 pH 为 5~9 范围内的环境中生长 (Lespinat et al., 1986; Reis et al., 1992)。尽管硫酸盐还原菌传统上常被认为是严格厌氧菌，但新的研究不断证实它能在有氧环境下生存，具有耐氧性 (Devereux et al., 1990; Fournier et al., 2004; Wildschut et al., 2006; Ramel et al., 2013, 2015)。硫酸盐还原菌在低氧或缺氧沉积物中的存在被广泛研究 (Hadas and Pinkas, 1992; Parkes et al., 1993; Ravenschlag et al., 2000; Orphan et al., 2001; Purdy et al., 2002)，但对其在水体中的研究较少，特别是水体溶解氧含量对其影响鲜有报道。与沉积物中相对稳定的环境相比，水体的物化参数变化更大，例如在湖泊和边缘海，表层和底层水体之间往往有着较大的溶解氧跨度，更易对硫酸盐还原菌的生物行为造成影响 (Čanković et al., 2017)，例如催化硫酸盐还原过程的酶的活动与溶解氧水平密切相关 (Abdollahi and Wimpenny, 1990; Labrenz, 2000)。因此研究水体中不同溶解氧环境下硫酸盐还原菌的行为对理解和预测它们在湖泊和沿海海域富营养化和缺氧条件下的演变及所参与的矿化过程十分重要。

目前，硫酸盐还原菌的纯培养几乎都是严格缺氧条件下进行的 (Hardy and Hamilton, 1981; Cypionka et al., 1985)，但经多次传代，其在原生环境中拥有的耐氧能力可能会逐渐丧失 (Hastings and Emerson, 1988)。*Desulfovibrio* 是较为普遍的一类硫酸盐还原菌，在硫循环中扮演主要角色 (Castro et al., 2000)。van de Ende 等 (1997) 和 Sigalevich 等 (2000) 进行了 *Desulfovibrio* 与其他单一细菌的共培养实验，表明共存菌能够消耗环境中的氧帮助 *Desulfovibrio* 在较高的溶解氧环境下生存。

自然生境中硫酸盐还原菌通常和多种微生物



共同存在，而上述两种细菌的共培养缺乏其它细菌组成信息，无法排除其它细菌对硫酸盐还原菌耐氧性能的影响。为探讨自然水体中与硫酸盐还原菌共存菌的组成，Bozo-Hurtado等（2013）首次尝试了对委内瑞拉北部卡里亚科盆地水体中的硫酸盐还原菌进行富集培养，并检测到了诸多共存菌，如 *Shewanella*（希瓦氏菌属），*heterotrophs Vibrio*（异养弧菌属），*Enterobacter*（肠杆菌属），*Fusobacterium*（梭菌属）等，但因其富集实验也是在严格厌氧条件下开展的，所以无法提供硫酸盐还原菌在溶解氧耐受方面的信息。

本研究尝试探讨自然界不同含氧水体中硫酸盐还原菌在硫的生物地球化学循环中的行为特征。我们在福建水口水库和浙江象山港采集不同溶解氧浓度下的硫酸盐还原菌进行富集培养，培养过程中严格控制培养基中溶解氧浓度。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

淡水样品采自水口水库：水口水库位于中国福建省闽清县，属狭窄型山谷河道型水库，位于闽江干流，平均水深50 m，溶解氧分层明显。样品采集于2017年11月份。样品采自S1、S2和S3站位表层和底层水体，其中S1位于坝前（样品编号：S1-表，S1-底，即表层5 m和底层50 m），S2位于主流中部（样品编号：S2-表，S2-底，即表层5 m和底层50 m），S3位于上游（样品编号：

S3-表，S3-底，即表层5 m和底层30 m）（图1a）。

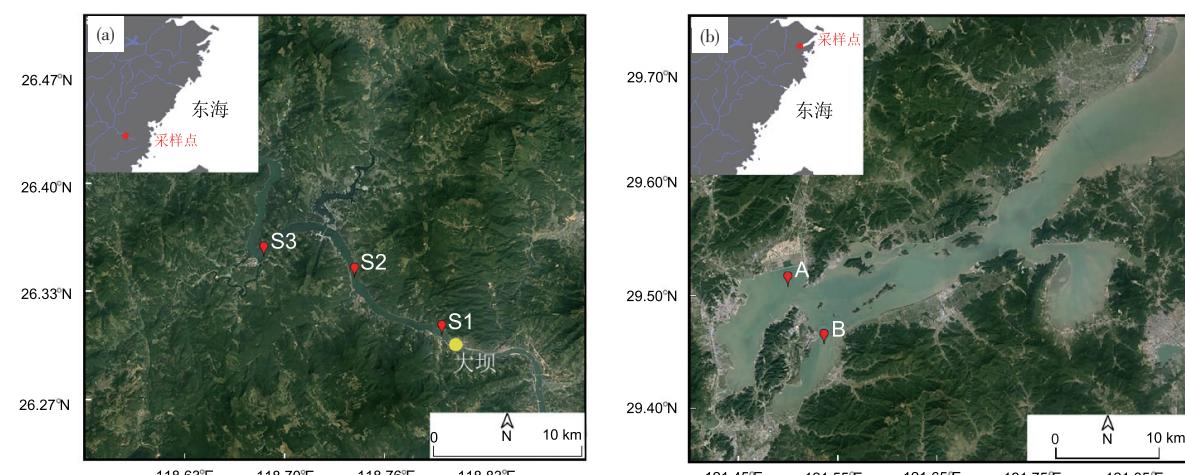
海水样品采自象山港：象山港位于浙江省宁波市东部，沿西南方向楔入内陆，平均水深10 m（图1b）。港内主要由与潮汐相关的重力环流主导（董礼先和苏纪兰，1999）。样品分别采自A、B站位表层和底层水体（样品编号：A-表，A-底，即表层2 m和底层8.4 m；B-表，B-底，即表层2 m和底层9.9 m），两站位均位于主流与支流交汇处（图1b）。使用Niskin采水器（5 L，General Oceanics）采集水样，每份样品采集三份平行样。样品采集于2017年10月份。各站位样品信息见表1。

### 1.2 水体参数测定

分别使用YSI多参数水质探头（EXO2）和便携式硫化物分析仪（YODP）现场测定温度、pH、盐度、溶解氧、深度和样品H<sub>2</sub>S含量（表1）。

### 1.3 培养基制备

使用改良的Starkey培养基（mg/L）（Balows et al., 1992; 穆军等, 2006; 娄虎等, 2015）： $K_2HPO_4$ ，50 mg， $NH_4Cl$ ，100 mg， $Na_2SO_4$  100 mg， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  200 mg，乳酸钠（60%）6.5 mL，酵母提取物100 mg， $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  100 mg， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  500 mg，硫代乙醇酸钠100 mg，抗坏血酸100 mg（用0.2 μm PES针头过滤器灭菌）。用1 mol/L NaOH溶液将培养基调节至pH 7.2~7.4，将培养基置于带胶塞的250 mL葡萄糖培养瓶中，在121℃高压蒸汽灭菌20 min。



(a) 水口水库；(b) 象山港 红点为采样站位，黄点为大坝

图1 采样站位

Fig. 1 Location of sampling sites



表1 水口水库与象山港水体参数及富集培养情况

Table 1 Physical and Chemical parameters of water quality in the Shuikou Reservoir and Xiangshan Bay, and the status of enriched cultures

采样地点与时间	站位	深度/m	样品类型	编号	温度/℃	盐度/psu	pH	溶解氧 mg/L	H <sub>2</sub> S mg/L	富集结果
水口水库 2017年 11月18日	S1	50.0	表层	S1-表	24.19	0.06	7.13	3.71	0.17	成功
			底层	S1-底	22.88	0.07	6.69	1.84	0.18	成功
	S2	50.0	表层	S2-表	24.39	0.05	7.13	5.00	0.14	成功
			底层	S2-底	22.72	0.07	6.91	2.33	0.88	成功
	S3	30.0	表层	S3-表	24.52	0.06	7.06	3.45	0.11	成功
			底层	S3-底	23.14	0.07	6.93	2.30	0.16	成功
象山港 2017年 11月28日	A	8.4	表层	A-表	24.34	11.73	7.97	8.38	未检出	未成功
			底层	A-底	23.65	26.07	7.96	6.68	1.09	成功
	B	9.9	表层	B-表	21.92	19.99	7.87	7.30	未检出	未成功
			底层	B-底	22.68	23.38	7.87	6.67	0.71	成功

#### 1.4 硫酸盐还原菌富集培养

在厌氧操作箱（上海杰汉实验室设备有限公司YQX-II）中将20 mL水样接种到盛有230 mL液体培养基的250 mL葡萄糖培养瓶中，培养基顶部空间用液体石蜡补足，每份水样接种三份平行样，室温30℃下富集培养，每4 h调节培养基的溶解氧浓度。为保证实验过程中培养基溶解氧浓度稳定，将经过0.22 μm膜过滤器过滤灭菌的高纯N<sub>2</sub>或O<sub>2</sub>（99.99%）通入培养基，通过控制气体流速调节溶解氧浓度，并用溶解氧传感器随时监测浓度变化来及时调整。通入的气体也同时稀释了硫酸盐还原菌产生的H<sub>2</sub>S气体，阻止了其对硫酸盐还原菌生长的抑制（Cypionka et al., 1985; Abdollahi and Wimpenny, 1990; Bejarano Ortiz et al., 2013）。

待培养基散发出臭鸡蛋气味和形成黑色沉淀时，表明还原剂硫酸亚铁与硫酸盐还原菌产生的H<sub>2</sub>S形成黑色FeS，硫酸盐还原菌富集成功。利用紫外分光光度计（Thermo Fisher, Evolution 300, USA）所测OD<sub>600</sub>值确定菌体生长阶段。当培养菌液OD<sub>600</sub>达到0.4~0.6，表明硫酸盐还原细菌处于对数生长期，可进行菌液收集（罗亚楠等，2013）。所有培养基培养时间相同，在待菌体均进入对数生长期后，将菌液置于4℃，以5000 r/min离心20分钟，离心收集至2 mL离心管，-80℃保存。

#### 1.5 DNA提取

使用DNA提取试剂盒（TIANamo Soil DNA Kit, 天根生化科技有限公司）提取基因组DNA，并通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测回收DNA片段的浓度和纯度。

#### 1.6 文库制备和测序

使用荧光定量仪Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 检测DNA样品浓度 (Maor-Landaw et al., 2017)。使用MetaVxTM文库制备试剂盒 (Genewiz Inc., South Plainfield, New Jersey, USA) 构建测序文库。高通量测序文库构建和 Illumina MiSeq 平台测序 Genewiz Inc (中国苏州) 进行。使用针对细菌V3和V4的高变区的专门引物进行扩增。上游引物：5'-CCTACGGRRBGCASCAGKVRVGAAT-3'；下游引物：5'-GGACTACNVGGGTWTCTAACCC-3'。使用Agilent 2100生物分析仪 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) 检测DNA文库，荧光定量仪Qubit 2.0 Fluorometer 检测文库质量。DNA文库混合后，按 Illumina Miseq (Illumina, San Diego) 仪器使用说明书进行2×300bp/2×250bp 双端测序 (PE)，由MiSeq自带MiSeq Control Software (MCS) 读取序列信息。

#### 1.7 数据分析

双端测序得到正反向 reads 首先进行两两组装连接，过滤拼接结果中含有N的序列，保留序列长度大于200bp的序列。经过质量过滤，去除嵌合体序列，最终得到的序列用于OTU分析（序列相似性≥97%的基因，定义为同一操作分类单元 Operational Taxonomic Units, OTU），使用VSEARCH (1.9.6) 进行序列聚类，比对的16S rRNA参考数据库为Silva 128。用RDP(Ribosomal Database Program) 分类器贝叶斯算法对OTU代表性序列进行物种分类学分析，在不同物种分类水平下统计每个样本群落组成。通过层次聚类 (Hierarchical clustering) 中

的非加权组平均法构建UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) 进化树。通过物种注释统计 (Qiime 1.9.1) 获得富集培养物所在属的百分比, 即相对丰度统计结果。通过分组和聚类分析绘制热图, 用以展示各样品中不同属细菌的相对丰度。

## 2 结果与讨论

基于硫酸盐还原菌种类的多样性及其在种分类水平上和氧气相互作用信息缺乏的考虑, 本研究选择细菌所在的属分类水平上进行讨论 (Le Gall and Xavier, 1996)。

### 2.1 水口水库与象山港水质参数与特征

采样时 (2017年11月18日) 水口水库整体缺氧, 分层明显, 这与水库体积大而来自河流的输入量较少且停留时间较长有关。近年来, 水口水库爆发频繁大面积缺氧事件, 造成鱼类大规模死亡 (高山等, 2010), 最严重的缺氧事件通常发生在11月的中旬 (崔利峰, 2016)。水口水库所有站位水体表层水pH值为7.06~7.13, 底层降至6.69~6.93 (表1)。盐度为0.5~0.7 psu (表1)。表层水中S2站位溶解氧 (5.00 mg/L) 高于S1 (3.71 mg/L) 和S3 (3.45 mg/L) 站位, 底层降至1.84~2.33 mg/L (表1)。水口水库水体溶解氧明显低于象山港 (表1)。

象山港为半日潮海域, 水体无分层。采样时 (2017年11月28日) 以偏北风为主, 水体垂直涡旋混合 (董礼先和苏纪兰, 1999), 底层水溶解氧高达6.68 mg/L (表1)。象山港A、B站位水体表面盐度分别为11.73和19.99 psu, 水体底部盐度增加到23.38~26.07 psu (表1)。A站位pH略高于B站位 (表1)。A站位表层水体溶解氧为8.38 mg/L, 底部降至6.68 mg/L。B站位底部溶解氧与A站位相同。A、B站位仅在底层水检测到H<sub>2</sub>S, 浓度分别为1.09和0.71 mg/L, 硫酸盐还原菌富集培养成功 (表1)。

### 2.2 主要硫酸盐还原菌及硫代谢相关菌

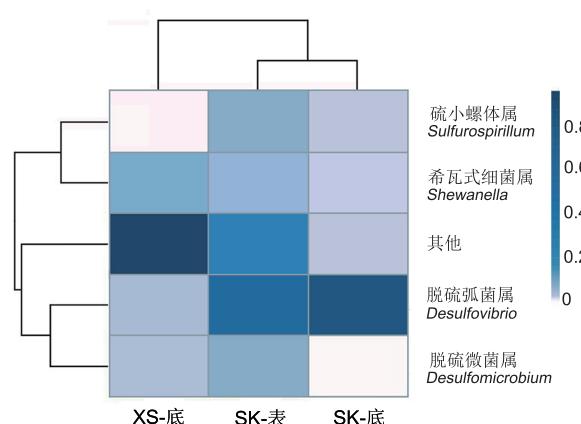
XS-底: 象山港底层水富集样品; SK-表: 水口水库表层水富集样品; SK-底: 水口水库底层水富集样品。列名为分组信息, 行名为属名。图上方的树为分组聚类树, 图左侧为物种聚类树。中间热图每一个方格不同颜色对应的值为每一行对

应属的相对丰度值

在每份样品包含的所有群落中, 硫酸盐还原菌和硫代谢相关菌选自相对丰度靠前的30个属, 其余所有属归为“其他” (图2)。其中“XS-底”包括象山港A、B站位底层水富集样品; “SK-表”包括水口水库S1、S2和S3站位表层水富集样品; “SK-底”包括水口水库S1、S2和S3站位底层水富集样品。每份富集样品所包含细菌的相对丰度平均值与标准差见表2。

由表2和图2分组和聚类结果可知, 水口水库及象山港主要硫酸盐还原菌富集类型为*Desulfovibrio* (脱硫弧菌属) 和*Desulfomicrobium* (脱硫微菌属), 伴随硫酸盐还原菌检出的硫代谢相关菌为*Shewanella* (希瓦氏菌属) 和*Sulfurospirillum* (硫小螺体属)。

XS-底、SK-表和SK-底三组*Desulfovibrio*相对丰度分别为0.016, 0.630和0.926, 且各组之间存在显著性差异 ( $p<0.05$ )。三组对应的溶解氧范围分别为6.67~6.68, 3.37~5.00和1.84~2.33 mg/L, 随溶解氧浓度的减小, 其相对丰度增加, 指示着低溶解氧环境更利于其生存 (van de Ende et al., 1997)。*Desulfovibrio*普遍分布于象山港海水环境和水口水库的淡水环境, 但是象山港溶解氧含量明显高于水口水库, 使得富集培养下菌体的相对丰度较低; 而水口水库水体溶解氧低, 使得富集培养下*Desulfovibrio*的相对丰度明显高于其他菌, 成为富集培养下的优势



XS-底: 象山港底层水富集样品; SK-表: 水口水库表层水富集样品; SK-底: 水口水库底层水富集样品; 列名为分组信息, 行名为属名; 图上方的树为分组聚类树, 图左侧为物种聚类树; 中间热图每一个方格不同颜色对应的值为每一行对应属的相对丰度值

图2 不同属分布热图

Fig. 2 Heatmap of taxonomy



表2 硫酸盐还原菌及硫代谢相关属相对丰度和溶解氧范围

Table 2 Relative abundances of sulfate reducing bacteria and associated sulfur metabolism-related bacteria at genus level, and ranges of corresponding dissolved oxygen

富集样品	硫酸盐还原菌及硫代谢相关属	平均相对丰度	标准差	溶解氧范围/(mg/L)
XS-底:	脱硫弧菌属 <i>Desulfovibrio</i>	0.016	0.0060	
A-底	脱硫微菌属 <i>Desulfomicrobium</i>	0.016	0.0067	6.67~6.68
B-底	希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	0.032	0.0167	
SK-表:	脱硫弧菌属 <i>Desulfovibrio</i>	0.630	0.0114	
S1-表	脱硫微菌属 <i>Desulfomicrobium</i>	0.050	0.0088	
S2-表	希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	0.029	0.0069	3.37~5.00
S3-表	硫小螺体属 <i>Sulfurospirillum</i>	0.053	0.0032	
SK-底:	脱硫弧菌属 <i>Desulfovibrio</i>	0.926	0.0011	
S1-底	脱硫微菌属 <i>Desulfomicrobium</i>	0.001	0.0001	
S2-底	希瓦氏菌属 <i>Shewanella</i>	0.004	0.0008	1.84~2.33
S3-底	硫小螺体属 <i>Sulfurospirillum</i>	0.016	0.0012	

硫酸盐还原菌(表2, 图2)。

XS-底、SK-表和SK-底三组 *Desulfomicrobium* 相对丰度分别为0.016, 0.050和0.001, 在象山港海水环境与水口水库淡水环境均有分布, 但它不是富集培养下的优势硫酸盐还原菌属。它在象山港和水口水库表层水富集样品中的相对丰度明显高于水口水库底层水, 这可能跟其对碱性生长环境的偏好有关。研究表明, *Desulfomicrobium* 在碱性环境中能表现出较强的硫酸盐利用能力(Zheng et al., 2014), 象山港与水口水库表层水pH均高于7, 而水口水库底层水体呈酸性, 这可能是造成富集样品中菌体分布差异的原因(表2, 图2)。

XS-底、SK-表和SK-底三组 *Shewanella* 相对丰度分别为0.032, 0.029和0.004。希瓦氏菌属为兼性厌氧异养菌, 常与硫酸盐还原菌共存(Herrera and Videla, 2009; Bozo-Hurtado et al., 2013)。它能将Fe<sup>3+</sup>还原为Fe<sup>2+</sup>, 协助硫酸盐还原菌进行生物源性黄铁矿FeS的生成(Park and Kim, 2001; Zhou et al., 2014)。二者在代谢上拥有共同的电子受体, 如硫酸盐、亚硫酸盐和富马酸盐(Barton et al., 1970; Burns and DiChristina, 2009; Pinchuk et al., 2011)。此外, *Shewanella* 可作为兼性厌氧菌消耗多余氧气(Serres and Riley, 2006) 为 *Desulfovibrio* 的生长提供生态位(Bozo-Hurtado et al., 2013)(表2, 图2)。以上可能是二者出现较强共存现象的原因。

在SK-表和SK-底组 *Sulfurospirillum* 相对丰度分别为0.053和0.016, 而在象山港则未检出。*Sulfurospirillum* 是生活在淡水和海洋环境中参与硫循环的微生物种类之一, 与 *Desulfovibrio* 能共享部

分相同的代谢底物, 如硫代硫酸盐(Finster et al., 1997)等。它可以在微氧条件下使用富马酸盐、乳酸盐或丙酮酸盐进行呼吸氧化, 在缺氧条件下进行富马酸盐发酵(Stolz et al., 2015)。水口水库表层(5.00 mg/L, 微氧环境)到底层(缺氧环境, 1.84 mg/L)的水体环境为其生存创造了空间, 使其能够通过发酵或呼吸氧化获得能量。而象山港的水体溶解氧浓度过高(大于6.67 mg/L), 使其无法存活, 这可能是造成其在象山港和水口水库富集样品中分布差异的原因(表2, 图2)。

### 2.3 富集培养下 *Desulfovibrio* 可能的耐氧机制

*Desulfovibrio* 通常被认为是在异化硫酸盐还原过程获得能量, 进行厌氧生长。然而本研究中, 其在溶解氧1.84~6.68 mg/L间的富集样品中均被检出(表1, 图2)。研究发现它们与好氧菌的rRNA序列之间存在密切关系, 从而有了推测它们从好氧细菌进化而来的证据(Devereux et al., 1990)。所以, 我们推测在高溶解氧水体, *Desulfovibrio* 可以凭借自身已进化出的氧存活策略去适应环境。此观点与以往的研究一致, 如在 *Desulfovibrio desulfuricans* (脱硫脱硫弧菌) 对氧的特异性诱导反应的实验中(Abdollahi and Wimpenny, 1990), 厌氧生长的细菌细胞中超氧化物歧化酶的活性很低, 当环境pO<sub>2</sub>从0增加到0.48 mg/L时, 胞内超氧化物歧化酶的活性增加了10倍。

研究证实, 除超氧化物歧化酶外, *Desulfovibrio* 的耐氧性涉及到多种酶系统及其机制, 其中包括NADH氧化酶、过氧化氢酶、红氧还原蛋白还原酶(ROO)、丙酮酸—铁氧还蛋白氧化还原酶(PFOR)



和膜结合氧还原酶等 (Hardy and Hamilton, 1981; Lemos et al., 2001; Silaghi-Dumitrescu et al., 2005; Machado et al., 2006; Wildschut et al., 2006; Santana, 2008; Vita et al., 2008; Lamrabet et al., 2011; Pieulle et al., 2011; Ramel et al., 2013, 2015)。本富集培养实验中 *Desulfovibrio* 能生存的溶解氧浓度 (6.68 mg/L) 显著高于以往纯培养实验水平 (0.48 mg/L), 耐氧性明显增强。我们推测这可能与其胞内多种酶的单一或协同作用有关, 它们帮助 *Desulfovibrio* 在较高溶解氧环境中利用细胞膜和胞内酶来启动体内的响应机制, 积极应对高氧环境获得生存。

#### 2.4 富集培养下 *Desulfovibrio* 的耐氧生长特征

象山港和水口水库的富集培养表现出明显的不同。水口水库 (溶解氧: 1.84~5.00 mg/L) 样品硫酸盐还原菌均富集成功, 而象山港仅底层水 (溶解氧: 6.67~6.68 mg/L) 样品富集成功 (表1), 这与其耐氧水平有关。

在 *Desulfovibrio* 对氧气的特异性诱导纯培养实验中, 它耐受的溶解氧水平达到 0.72 mg/L (Abdollahi and Wimpenny, 1990), 这打破了我们以往对它严格厌氧的认识。van de Ende 等 (1997) 进一步将 *Desulfovibrio desulfuricans* PA2805 (脱硫脱硫弧菌) 和 *Thiobacillus thioparus* T5 (无色硫细菌) 连续共培养, 发现在 *Thiobacillus thioparus* T5 将培养基氧气消耗到较低值时, *D. desulfuricans* PA2805 得到生长。Sigalevich 等 (2000) 接着建立的 *Desulfovibrio oxyclinae* (脱硫脱硫弧菌) 与兼性好氧异养 *Marinobacter* sp. strain MB (海洋杆菌) 的恒化共培养实验也发现在氧气供应高达 5% 的情况下, 共培养菌能有效地消耗氧气帮助硫酸盐还原菌生存。可见, 共培养菌能够帮助提高 *Desulfovibrio* 的溶解氧耐受水平, 尽管此溶解氧水平仍旧较低。

本研究中, 在溶解氧 1.84~6.68 mg/L 的范围内, *Desulfovibrio* 均富集成功 (表1)。因本实验溶解氧水平与原位相同, 说明在原自然水体中该属细菌就有着较高的耐氧生存能力, 使得它们可以在较高溶解氧水体中得以生存。无论是在富集样品还是自然界水体中, 与 *Desulfovibrio* 共存的细菌除了它的硫代谢相关菌外, 还包括多种类型的共存菌, 它们可能是该属得以在高氧环境下生存的贡献者。本实验结果表明, 在多种共存菌存在时 *Desulfovibrio* 的耐氧上限比两种菌的共培养实验有

了明显提高。象山港底层水的溶解氧 (6.67~6.68 mg/L) 高于水口水库 (1.84~5.00 mg/L), 但得益于多种共存菌的贡献, *Desulfovibrio* 也能在此较高溶解氧环境下存活。基于本实验及以往研究结果, 我们推测这些共存菌消耗环境中多余溶解氧的效率要远高于单个共存菌, 从而能更有效地为硫酸盐还原菌 *Desulfovibrio* 提供生态位, 使它们能在高氧水体中长时间生存。虽然这些共存菌的耐氧性贡献的机制尚不清楚, 但本研究的结果让我们对 *Desulfovibrio* 的耐氧性有了新的认识, 有助于进一步理解硫酸盐还原菌参与的生物矿化过程的生物与非生物间的相互影响。

值得注意的是, 虽然共存菌的存在有助于 *Desulfovibrio* 在较高溶解氧环境下生存, 但当溶解氧超过 6.68 mg/L 时, 该属细菌却未能富集成功。这说明共存菌的贡献存在一定的上限值。

### 3 结论

(1) 水口水库淡水与象山港海水水体富集样品中, *Desulfovibrio* 和 *Desulfomicrobium* 为主要硫酸盐还原菌, 且 *Desulfovibrio* 为水口水库低氧环境的优势属。

(2) *Shewanella* 和 *Sulfurospirillum* 为富集条件下 *Desulfovibrio* 的硫代谢相关菌, 二者均与 *Desulfovibrio* 有着相同的电子供体或代谢底物。其中, *Shewanella* 能参与 *Desulfovibrio* 生源性黄铁矿的生成。

(3) 富集培养条件下, 随溶解氧浓度的减少, *Desulfovibrio* 相对丰度增加, 且其耐氧上限 (6.68 mg/L) 明显高于以往纯培养或共培养。这一方面可能与其自身的高氧环境适应策略有关; 另一方面可能得益于共存菌的贡献, 它们可能通过消耗环境中的氧为 *Desulfovibrio* 提供生态位, 提高其耐氧水平。

虽然富集条件下这些共存菌对 *Desulfovibrio* 耐氧性的贡献所涉及的复杂机制尚不清楚, 但它为未来的培养实验提供了方向, 也为我们进一步了解硫酸盐还原菌的生物地球化学行为奠定了基础。

### 参考文献 (References):

- 崔利峰. 2016. 水口水库主要养殖水域水体溶解氧时空分布规律[J]. 福建农业科技, 47(1): 28~31.  
董礼先, 苏纪兰. 1999. 象山港潮波响应和变形研究 II. 象山港潮波数值研究[J]. 海洋学报, 21(2): 1~8.



- 高山, 邹丽珍, 崔利峰, 等. 2010. 水口水库养殖库湾季节性低溶解氧成因浅析[J]. 渔业研究, 6(2): 55-58.
- 娄虎, 王娇, 崔明岐, 等. 2015. 一种简易而有效的培养厌氧菌的方法[J]. 黑龙江畜牧兽医, 12(24): 95-97.
- 罗亚楠, 蔡昌凤, 黄志. 2013. 耐酸性硫酸盐还原菌的驯化及处理硫酸盐的研究[J]. 安徽工程大学学报, 28(1): 9-12.
- 穆军, 韦华生, 焦炳华, 等. 2006. 一株抗菌海洋硫酸盐还原菌的筛选和鉴定[G]. 全国海洋生物技术与海洋药物学术会议论文集, 532-535.
- Abdollahi H and Wimpenny J W T. 1990. Effects of oxygen on the growth of *Desulfovibrio desulfuricans* [J]. Journal of General Microbiology, 136(6): 1025-1030.
- Balows A, Truper H G and Dworkin M. 1992. The Prokaryotes [M]. New York: Springer-Verlag: 352-378.
- Barton L L, Le Gall J and Peck H D Jr. 1970. Phosphorylation coupled to oxidation of hydrogen with fumarate in extracts of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 41(4): 1036-1042.
- Barton L L. 1995. Biotechnology Handbooks [M]. Boston: Springer-Verlag: 217-241.
- Barton L L and Fauque G D. 2009. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria [C]// Laskin A I, Sariaslani S and Gadd G M, Advances in Applied Microbiology, San Diego: Elsevier: 41-98.
- Barton L L, Tomei-Torres F A, Xu H, et al. 2015. Metabolism of metals and metalloids by the sulfate-reducing bacteria [C]// Saffarini D, Bacteria-Metal Interactions. Milwaukee: Springer: 57-83.
- Bejarano Ortiz D I, Thalasso F, Cuervo Lopez F d M, et al. 2013. Inhibitory effect of sulfide on the nitrifying respiratory process [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 88(7): 1344-1349.
- Beveridge T J, Meloche J D, Fyfe W S, et al. 1983. Diagenesis of metals chemically complexed to bacteria: laboratory formation of metal phosphates, sulfides, and organic condensates in artificial sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 45(3): 1094-108.
- Bozo-Hurtado L, García-Amado M A, Chistoserdov A, et al. 2013. Identification of bacteria in enrichment cultures of sulfate reducers in the Cariaco Basin water column employing denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal RNA gene fragments [J]. Aquatic Biosystems, 9(1): 17.
- Burns J L and DiChristina T J. 2009. Anaerobic respiration of elemental sulfur and thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires *psrA*, a homolog of the *pshA* gene of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 75(16): 5209-5217.
- Čanković M, Petrić I, Marguš M, et al. 2017. Spatio-temporal dynamics of sulfate-reducing bacteria in extreme environment of Rogoznica Lake revealed by 16S rRNA analysis [J]. Journal of Marine Systems, 172: 14-23.
- Castro H F, Williams N H and Ogram A. 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacterial [J]. FEMS Microbiology Ecology, 31: 1-9.
- Cypionka H, Widdel F and Pfennig N. 1985. Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients [J]. FEMS Microbiology Letters, 31(1): 39-45.
- Devereux R, He S H, Doyle C L, et al. 1990. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family [J]. Journal of Bacteriology, 172(7): 3609-3619.
- van de Ende F P, Meier J and van Gemerden H. 1997. Syntrophic growth of sulfate-reducing bacteria and colorless sulfur bacteria during oxygen limitation [J]. FEMS Microbiology Ecology, 23(1): 65-80.
- Ferris F G, Fyfe W S and Beveridge T J. 1987. Bacteria as nucleation sites for authigenic minerals in a metal-contaminated lake sediment [J]. Chemical Geology, 63(3-4): 225-232.
- Fike D A, Bradley A S and Rose C V. 2015. Rethinking the ancient sulfur cycle [J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 43(1): 593-622.
- Finster K, Liesack W and Tindall B J. 1997. *Sulfurospirillum arcachonense* sp. nov., a new microaerophilic sulfur-reducing bacterium [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 47(4): 1212-1217.
- Fournier M, Dermoun Z, Durand M C, et al. 2004. A new function of the *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough [Fe] hydrogenase in the protection against oxidative stress [J]. Journal of Biological Chemistry, 279(3): 1787-1793.
- Fukui M and Takii S. 1990. Survival of sulfate-reducing bacteria in oxic surface sediment of a seawater lake [J]. FEMS Microbiology Letters, 73 (4): 317-322.
- Gregory D D, Large R R, Halpin J A, et al. 2015. Trace element content of sedimentary pyrite in black shales [J]. Economic Geology, 110 (6): 1389-1410.
- Gregory D D, Large R R, Bath A B, et al. 2016. Trace element content of pyrite from the Kapai Slate, St. Ives Gold District, Western Australia [J]. Economic Geology, 111(6): 1297-1320.
- Gu B H and Chen J. 2003. Enhanced microbial reduction of Cr (VI) and U (VI) by different natural organic matter fractions [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 67(19): 3575-3582.
- Hadas O and Pinkas R. 1992. Sulfite-reduction process in sediments of Lake Kinneret, Israel [J]. Hydrobiologia, 235-236(1): 295-301.
- Hardy J A and Hamilton W A. 1981. The oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea waters [J]. Current Microbiology, 6(5): 259-262.
- Hastings D and Emerson S. 1988. Sulfate reduction in the presence of low oxygen levels in the water column of the Cariaco Trench [J]. Limnology and Oceanography, 33(3): 391-396.
- Herrera L K and Videla H A. 2009. Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 63(7): 891-895.
- Jørgensen B B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed—the role of sulphate reduction [J]. Nature, 296(5858): 643-645.
- Labrenz M, Druschel G K, Thomsen-Ebert T, et al. 2000. Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria [J]. Science, 290(5497): 1744-1747.
- Lamrabet O, Pieulle L, Aubert C, et al. 2011. Oxygen reduction in the strict anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: characterization of two membrane-bound oxygen reductases [J]. Microbiology, 157(9): 2720-2732.
- Le Gall J and Xavier A V. 1996. Anaerobes response to oxygen: the sulfate-reducing bacteria [J]. Anaerobe, 2(1): 1-9.
- Lemos R S, Gomes C M, Santana M, et al. 2001. The ‘strict’ anaerobe *Desulfovibrio gigas* contains a membrane-bound oxygen-reducing respiratory chain [J]. FEBS Letters, 496(1): 40-43.
- Lespinat P A, Berlier Y, Fauque G, et al. 1986. The pH dependence of proton-deuterium exchange, hydrogen production and uptake catalyzed by hydrogenases from sulfate-reducing bacteria [J]. Biochimie, 68(1): 55-61.
- Lovley D R and Phillips E J. 1992. Reduction of uranium by *Desulfovibrio*

- desulfuricans* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 58(3): 850–856.
- Lowenstam H A. 1981. Minerals formed by organisms [J]. Science, 211 (4487): 1126–1131.
- Machado P, Félix R, Rodrigues R, et al. 2006. Characterization and expression analysis of the cytochrome *bd* oxidase operon from *Desulfovibrio gigas* [J]. Current Microbiology, 52(4): 274–281.
- Maor-Landaw K, Ben-Asher H W, Karako-Lampert S, et al. 2017. Mediterranean versus Red sea corals facing climate change, a transcriptome analysis [J]. Scientific Reports, 7: 42405.
- Morse J W, Millero F J, Cornwell J C, et al. 1987. The chemistry of the hydrogen sulfide and iron sulfide systems in natural-waters [J]. Earth-Science Reviews, 24(1): 1–42.
- Muyzer G and Stams A J M. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria [J]. Nature Reviews Microbiology, 6(6): 441–454.
- Orphan V J, Hinrichs K U, Ussler W III, et al. 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 67(4): 1922–1934.
- Park D H and Kim B H. 2001. Growth properties of the iron-reducing bacteria, *Shewanella putrefaciens* IR-1 and MR-1 coupling to reduction of Fe(III) to Fe(II) [J]. Journal of Microbiology, 39(4): 273–278.
- Parkes R J, Dowling N J E, White D C, et al. 1993. Characterization of sulphate-reducing bacterial populations within marine and estuarine sediments with different rates of sulphate reduction [J]. FEMS Microbiology Letters, 102(3–4): 235–250.
- Picard A, Gartman A, Clarke D R, et al. 2018. Sulfate-reducing bacteria influence the nucleation and growth of mackinawite and greigite [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 220: 367–384.
- Pieulle L, Stocker P, Vinay M, et al. 2011. Study of the thiol/disulfide redox systems of the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* points out pyruvate:ferredoxin oxidoreductase as a new target for thioredoxin 1 [J]. The Journal of Biological Chemistry, 286(10): 7812–7821.
- Pinchuk G E, Geydebekht O V, Hill E A, et al. 2011. Pyruvate and lactate metabolism by *Shewanella oneidensis* MR-1 under fermentation, oxygen limitation, and fumarate respiration conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 77(23): 8234–8240.
- Purdy K J, Embley T M and Nedwell D B. 2002. The distribution and activity of sulphate reducing bacteria in estuarine and coastal marine sediments [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 81(1–4): 181–187.
- Rabus R, Hansen T A and Widdel F. 2006. Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes [C]//Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al., The Prokaryotes, New York: Springer: 659–768.
- Ramel F, Amrani A, Pieulle L, et al. 2013. Membrane-bound oxygen reductases of the anaerobic sulfate-reducing *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: roles in oxygen defense and electron link with periplasmic hydrogen oxidation [J]. Microbiology, 159: 2663–2673.
- Ramel F, Brasseur G, Pieulle L, et al. 2015. Growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough under continuous low oxygen concentration sparging: impact of the membrane-bound oxygen reductases [J]. PloS One, 10(4): e0123455.
- Ravenschlag K, Sahm K, Knoblauch C, et al. 2000. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine arctic sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 66 (8): 3592–3602.
- Reis M A M, Almeida J S, Lemos P C, et al. 1992. Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria [J]. Biotechnology and Bioengineering, 40(5): 593–600.
- Robador A, Brücher V and Jørgensen B B. 2009. The impact of temperature change on the activity and community composition of sulfate-reducing bacteria in arctic versus temperate marine sediments [J]. Environmental Microbiology, 11(7): 1692–1703.
- Santana M. 2008. Presence and expression of terminal oxygen reductases in strictly anaerobic sulfate-reducing bacteria isolated from salt-marsh sediments [J]. Anaerobe, 14(3): 145–156.
- Schieber J. 2002. Sedimentary pyrite: A window into the microbial past [J]. Geology, 30(6): 531–534.
- Schlegel H G. 1981. Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur [M]. Berlin: Springer-Verlag: 3–12.
- Serres M H and Riley M. 2006. Genomic analysis of carbon source metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1: predictions versus experiments [J]. Journal of Bacteriology, 188(13): 4601–4609.
- Sigalevich P, Baev M V, Teske A, et al. 2000. Sulfate reduction and possible aerobic metabolism of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxydyclinae* in a chemostat coculture with *Marinobacter* sp. strain MB under exposure to increasing oxygen concentrations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 66(11): 5013–5018.
- Silaghi-Dumitrescu R, Kurtz J D, Ljungdahl L G, et al. 2005. X-ray crystal structures of *Moorella thermoacetica* FprA, novel diiron site structure and mechanistic insights into a scavenging nitric oxide reductase [J]. Biochemistry, 44(17): 6492–6501.
- Stolz J F, Oremland R S, Paster B J, et al. 2015. *Sulfurospirillum* Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [M]. New York: John Wiley and Sons Ltd.
- Tucker M D, Barton L L and Thomson B M. 1998. Reduction of Cr, Mo, Se and U by *Desulfovibrio desulfuricans* immobilized in polyacrylamide gels [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 20(1): 13–19.
- Vita N, Hatchikian E C, Nouailler M, et al. 2008. Disulfide bond-dependent mechanism of protection against oxidative stress in pyruvate-ferredoxin oxidoreductase of anaerobic *Desulfovibrio* bacteria [J]. Biochemistry, 47 (3): 957–964.
- Wacey D, Kilburn M R, Saunders M, et al. 2015. Uncovering framboidal pyrite biogenicity using nano-scale CNorg mapping [J]. Geology, 43(1): 27–30.
- Wildschut J D, Lang R M, Voordouw J K, et al. 2006. Rubredoxin: oxygen oxidoreductase enhances survival of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough under microaerophilic conditions [J]. Journal of Bacteriology, 188(17): 6253–6260.
- Wilkin R T, Arthur M A and Dean W E. 1997. History of water-column anoxia in the Black Sea indicated by pyrite framboid size distributions [J]. Earth and Planetary Science Letters, 148(3–4): 517–525.
- Zheng Y, Xiao Y, Yang Z H, et al. 2014. The bacterial communities of bioelectrochemical systems associated with the sulfate removal under different pHs [J]. Process Biochemistry, 49(8): 1345–1351.
- Zhou C, Vannella R, Hayes K F, et al. 2014. Effect of growth conditions on microbial activity and iron-sulfide production by *Desulfovibrio vulgaris* [J]. Journal of Hazardous Materials, 272(272): 28–35.