



化能自养硫氧化细菌 *Halothiobacillus* sp. LS2 介导的以乙炔为电子受体的硫氧化反应

曲珊珊, 严洪珊, 林炜铁*, 罗剑飞*

华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

摘要:【目的】探究化能自养硫氧化细菌 *Halothiobacillus* sp. LS2 介导的以乙炔为电子受体的厌氧硫氧化反应。【方法】稀释涂布法测定细胞生长情况, 离子色谱仪测试硫氧化动力学中 SO_4^{2-} 和 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 以及基于相对荧光定量法的基因表达分析。【结果】尽管菌株 LS2 在以氧气为电子受体时的最大反应速率 V_{\max} 更高, 但在厌氧条件下且以乙炔为电子受体时, 菌株 LS2 的生长量是氧气为电子受体时的 2 倍, 且硫氧化酶基因 *soxB* 的表达量显著高于氧气作为电子受体时。【结论】菌株 LS2 不仅可以以乙炔为电子受体完成厌氧硫氧化反应, 且这一代谢过程的产能效率较有氧硫氧化过程更高。本研究首次发现了微生物介导的以乙炔为电子受体的厌氧硫氧化反应, 对丰富硫的生物地球化学循环理论有积极意义。

关键词: 厌氧硫氧化, 动力学, 乙炔, *soxB*

硫的生物氧化反应是一种古老的生化反应, 可追溯至 25 亿年前的太古宙时期^[1-2]。自然界中硫氧化相关酶系和微生物种类繁多, 从而导致了硫氧化途径的多样性^[3]。好氧条件下, 硫氧化细菌 (sulfur-oxidizing bacteria, SOB) 以硫化物、单质硫和硫代硫酸盐等还原态硫为底物进行硫氧化反应, 产生的电子通过呼吸链复合体 (respiratory complex IV) 传递给氧气并将质子 H^+ 泵出以驱动 ATP 合成; 厌氧条件下, 基于 Complex IV 的电子传递链被阻断, 硫氧化反应产生的电子最终传递

给 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 、 Fe^{3+} 、 Mn(IV) 、 N_2 和 CO_2 。这些厌氧硫氧化细菌中, 除了新发现的以 Mn (IV) 为电子受体的 *Sulfurimonas marisnigri*^[4], 其他细菌的厌氧硫氧化机制已基本明确。例如: (1) 光能营养型的硫氧化细菌以 CO_2 为主要电子受体, 利用不产氧的光合作用驱动环式电子流连续泵出 H^+ , 并通过光合磷酸化作用生成 ATP 进行厌氧硫氧化^[5-7]。(2) 嗜酸硫氧化细菌 *Acidithiobacillus* 以 Fe^{3+} 为电子受体, 将硫氧化作用产生的电子通过醌库 (Ubiquinone/Ubiquinol, Q/QH₂) 传递给细胞膜上的

基金项目: 国家自然科学基金(91951118)

*通信作者。E-mail: 林炜铁, lfwtlin@scut.edu.cn; 罗剑飞, ljfj2002@scut.edu.cn

收稿日期: 2021-03-03; 修回日期: 2021-04-24; 网络出版日期: 2021-05-07

泛醌细胞色素氧化还原酶复合体(cytochrome bc_1 complex), 经由细胞色素复合体(cytochrome complex I, Cyt c_1)→铜蓝蛋白(rusticyanin, Rus)→Cyt c_2 传递给外膜上的细胞色素 c , 并将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ; 在此过程中, bc_1 complex 每传递 1 个电子即泵出 1 个 H^+ 并通过 ATP 合成酶产生能量^[8-9]。

(3) 与反硝化偶联的硫氧化细菌以 NO_3^-/NO_2^- 为电子受体, 通过周质 NO_3^- 还原酶(periplasmic nitrate reductase, Nap)、cd1 型 NO_2^- 还原酶(cd1 nitrite reductase, NirS)、细胞质 NO_3^- 还原酶(membrane bound nitrate reductase, Nar)、铜离子型 NO_2^- 还原酶(copper-type nitrite reductase, NirK)、NO 还原酶(nitric oxide reductase, Nor)和 N_2O 还原酶(nitrous oxide reductase, Nos)等反硝化酶的作用, 每传递 1 个电子可泵出 1-2 个 H^+ 用于能量生成^[10]。此外, 一些具有固氮能力的 SOB 也可以 N_2 为电子受体部分接收硫氧化产生的电子, 但该过程不能驱动胞内质子外排, 必须通过与反硝化、铁还原或锰还原作用才能促使跨膜质子梯度差的形成, 进而驱动 ATP 的合成。除了上述物质可作为厌氧硫氧化的电子受体, 自然界中还可能存在其他物质或能量代谢途径, 以维持厌氧条件下硫氧化作用的进行。

我们对化能自养硫氧化细菌 *Halothiobacillus* sp. LS2 进行全基因组测序, 发现其基因组中含有多种用于硫氧化的酶系基因以及固氮作用所需的基因簇, 并能在好氧条件下通过固氮作用获得氮源^[11], 同时, 我们发现该菌在好氧或厌氧条件下, 也可以乙炔为电子受体进行硫氧化反应。为了阐明菌株 LS2 以乙炔为电子受体时的硫氧化动力学特征, 本研究对其以氧气和乙炔为电子受体时的细胞生长、硫氧化动力学、硫氧化酶基因表达等

进行了比较分析, 以此描述了一种以乙炔为电子受体的厌氧硫氧化反应。

1 材料和方法

1.1 微生物培养

1.1.1 液体培养基(g/L): KH_2PO_4 0.40; $MgCl_2$ 0.12; NaCl 10; NH_4Cl 0.05; A5 元素液 1 mL/L; pH 6.5-7.0。待灭菌完毕, 加入 $NaHCO_3$ 0.20; $FeCl_2$ 0.008; $Na_2S_2O_3$ 2.48 (试剂进行过滤除菌); 厌氧培养时, 培养基中加入 2.0 mmol/L 抗坏血酸为除氧剂。

1.1.2 固体培养基(g/L): KH_2PO_4 0.40; $MgSO_4$ 0.12; KNO_3 0.40; NH_4Cl 0.10; pH 6.5-7.0; 1.5% 琼脂。待灭菌完毕, 加入 $NaHCO_3$ 0.20; $FeSO_4$ 0.02; $Na_2S_2O_3$ 2.48 (试剂进行过滤除菌)。

1.1.3 菌种活化: 取保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 的菌株 LS2, 按 1% 接种量接入液体培养基三角瓶中, 置于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 振荡培养箱(ZQLY-180G)培养 2 d, 设置摇床转速 150 r/min; 梯度稀释后平板涂布至固体培养基中, 置于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 的生化培养箱(LRH-150)培养至菌落形成, 挑单菌落进行液体培养, 并作为种子液用于好氧或厌氧培养。

1.2 菌株 LS2 在不同气体条件下的生长曲线及硫氧化情况

在血清瓶中, 分别设置顶空气体条件为 5% O_2 、20% O_2 、5% O_2 +20% C_2H_2 、20% C_2H_2 , 其余气体用氩气补齐; 加入 5.0×10^{-4} mol/L NH_4Cl 为氮源, 以 1.0×10^{-3} mol/L $Na_2S_2O_3$ 为底物, 置于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 振荡培养箱(ZQLY-180G)培养 2 d, 设置摇床转速 150 r/min, 采用稀释涂布法跟踪测定每组

细菌的生长量,采用离子色谱测定硫酸根的生成和底物硫代硫酸根的消耗情况(3个平行)。

1.3 以氧气和乙炔为电子受体的硫氧化动力学

通过抽滤(SHZ-D(III)循环真空泵)收集种子液的菌体,用不含底物的新鲜培养基清洗并重悬,分装至12 mL血清瓶中(装液量为6 mL,每个底物浓度设置3个平行),分别用于好氧(20% O₂)和厌氧(20% C₂H₂)的硫氧化动力学分析;静置1 h后,分别加入终浓度为0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5 mmol/L的S₂O₃²⁻为底物,反应20 min后取样,用0.22 μm滤膜过滤取得的培养液,以终止反应,用离子色谱测定初始和反应终了的硫酸根浓度,稀释涂布平板法对初始菌体数量进行计数。

1.4 硫氧化酶 *soxB* 基因表达分析

1.4.1 菌株培养:收集的菌体用不含底物的液体培养基重悬,转移至血清瓶中,顶空气体中加入20% O₂、5% C₂H₂、20% C₂H₂和30% C₂H₂,其余用氩气补齐;加入1.0 mmol/L的S₂O₃²⁻为底物,置于30 °C恒温培养箱进行培养。

1.4.2 菌体 RNA 的提取:将细菌培养液以12000 r/min的转速离心3 min (CP-80MX超高速离心机),弃上清,收集菌体至2 mL离心管中,加入1 mL RNAiso PLUS(TaKaRa),室温静置5 min后加入200 μL氯仿(大茂化学试剂)振荡混匀,12000 r/min离心2 min;收集上清液至新的离心管中,加入等体积异丙醇和1 μL核酸助沉剂(北京庄盟生物),充分混匀后于室温静置10 min;12000 r/min离心5 min,弃上清,加入1 mL 75%乙醇,充分混匀后12000 r/min离心5 min,弃上清;移除离心管中残余液体,室温干燥2 min,加入适量的RAase-free水溶解沉淀得到菌株的

RNA,置于-80 °C冰箱保存。

1.4.3 荧光定量 PCR:提取的总RNA用TransStart® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(北京全式金)试剂盒进行反转录,将得到的cDNA稀释10倍用于定量分析,菌株LS2的硫氧化酶 *soxB* 基因和内参基因16S rRNA引物的合成工作由广州天一辉远基因科技有限公司进行^[11]。荧光定量PCR反应程序为:94 °C 1 min; 94 °C 10 s, 60 °C 34 s,重复40个循环。荧光标准曲线的扩增效率为92.3%–97.8%,标准曲线的相关系数为0.999,并采用2^{-ΔΔCT}相对定量方法对得到的数据进行分析。

1.5 离子色谱检测 S₂O₃²⁻和 SO₄²⁻含量

本研究采用离子色谱法测定培养液中的S₂O₃²⁻和SO₄²⁻含量。仪器:Dionex AQUION RFIC型离子色谱仪,AS16 IC分离柱,Dionex EGC III KOH RFIC™淋洗液发生器,AS-DV自动进样器,Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™色谱数据系统(CDS)软件(Thermo公司)。实验参数:淋洗液(KOH)1.5×10⁻² mol/L,流速为1 mL/min,进样量25 μL,柱温为30 °C,背景电导0.5 μs/cm。

2 结果和分析

2.1 菌株 LS2 在不同气体条件下的生长情况

菌株LS2在5% O₂、20% O₂、5% O₂+20% C₂H₂、20% C₂H₂条件下的硫氧化和生长情况如图1所示,菌株LS2在有氧或厌氧以乙炔为电子受体时,12 h内均可将1.0 mmol/L硫代硫酸根完全氧化为硫酸根,14 h细胞数达到最大。好氧条件下,当氧气浓度为5%时,菌株LS2的最大细胞数为1.7×10⁷ CFU/mL;当氧气浓度为20%时,

菌株 LS2 的最大细胞数为 1.4×10^7 CFU/mL; 当气体条件为 5% $O_2 + 20\%$ C_2H_2 时, 最大细胞数为 2.1×10^7 CFU/mL。厌氧条件下, 当乙炔浓度为 20% 时, 菌株 LS2 的最大细胞数为 3.3×10^7 CFU/mL。由此可见, 乙炔为电子受体既有利于有氧条件下的菌

体生长, 又保证了厌氧条件下硫氧化反应的顺利发生。厌氧条件下, 以乙炔为电子受体时, 菌体生长量是以氧气为单一电子受体时的 2 倍。说明乙炔为电子受体更有利于菌体生长, 它的能量代谢方式可能比氧气为电子受体时更高效。

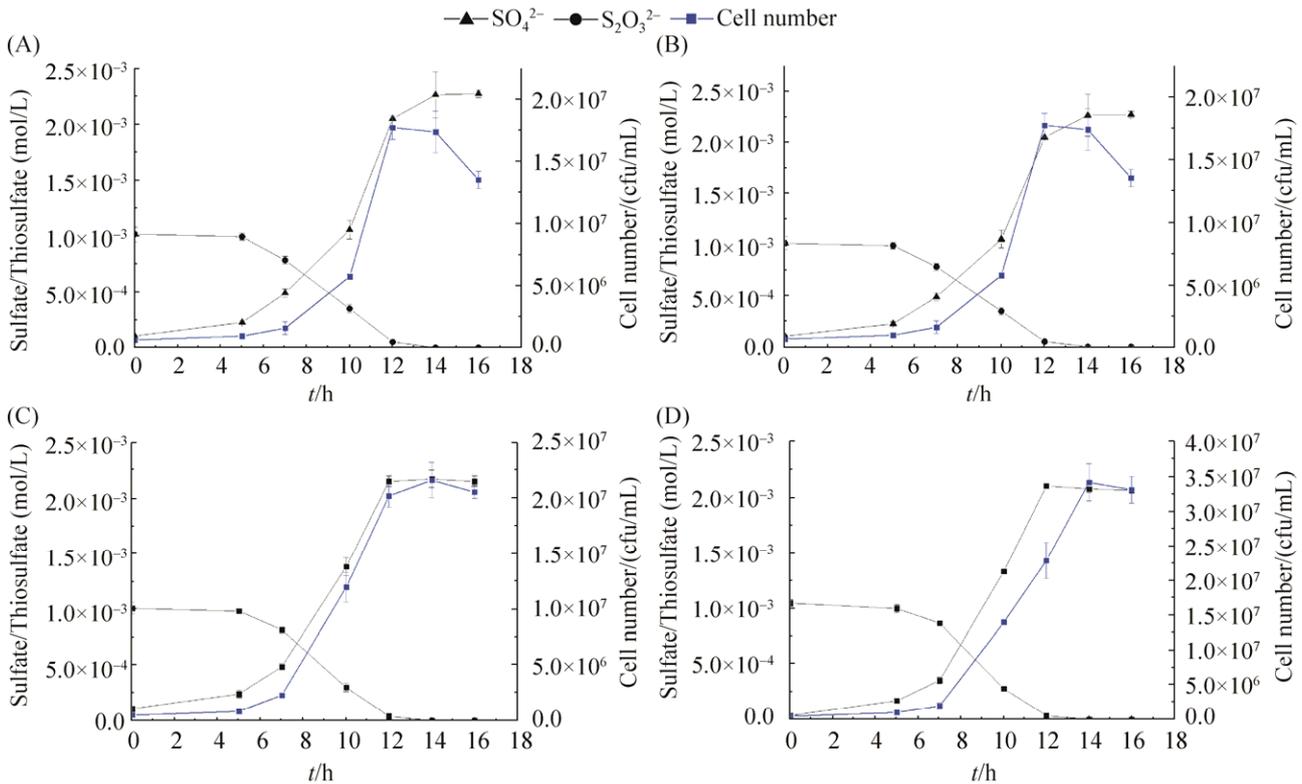


图 1. 菌株 LS2 在 5% O_2 A、20% O_2 B、5% O_2 与 20% C_2H_2 C、20% C_2H_2 D 条件下的硫氧化和生长情况
 Figure 1. Sulfur oxidation and growth of strain LS2 under 5% O_2 A, 20% O_2 B, 5% O_2 & 20% C_2H_2 C and 20% C_2H_2 D. Error bars represent the standard deviation of the mean ($n=3$).

2.2 以氧气和乙炔为电子受体的硫氧化动力学分析

以氧气和乙炔为电子受体的硫氧化动力学分析如图 2 所示, 菌株 LS2 以氧气作为电子受体时, 最大反应速率 V_{max} 为 1.9×10^{-5} mol/L SO_4^{2-}/h (10^7 cells) $^{-1}$, K_m 为 3.0×10^{-5} mol/L $S_2O_3^{2-}$; 乙炔为电子受体时, 最大反应速率 V_{max} 为 1.7×10^{-5} mol/L SO_4^{2-}/h (10^7 cells) $^{-1}$, K_m 为 3.0×10^{-5} mol/L

$S_2O_3^{2-}$ 。可见, 菌株 LS2 在以氧气或乙炔为电子受体时所进行的硫氧化反应具有相同的底物亲和性(K_m), 但厌氧硫氧化(C_2H_2 为电子受体)速率略小于好氧硫氧化(O_2 为电子受体)速率。然而, 相较于氧气, 菌株 LS2 在以乙炔电子受体时有更高的生长量(图 1); 可以推测, 相对于有氧硫氧化反应, 菌株 LS2 以乙炔的厌氧硫氧化过程具有更高的产能效率。

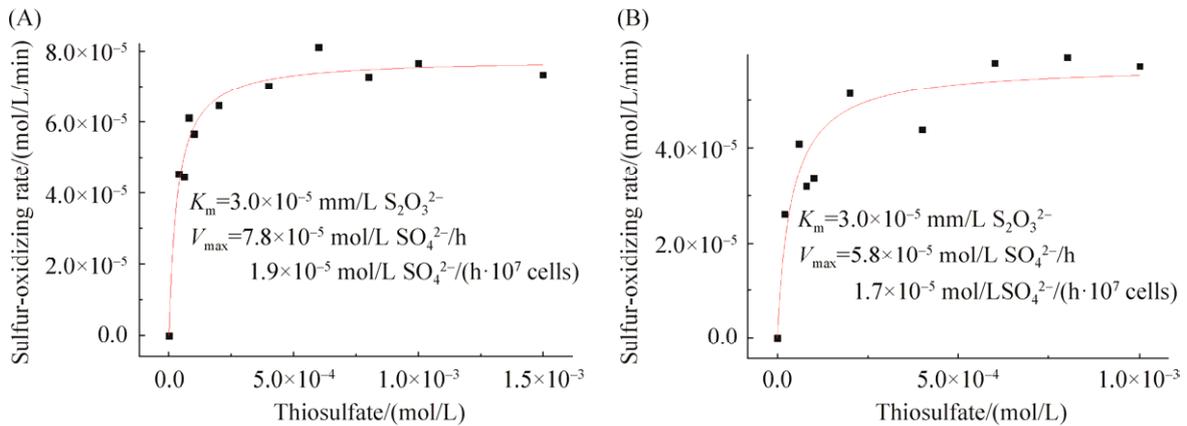


图 2. 菌株 LS2 以氧气(A)和乙炔(B)为电子受体的硫氧化动力学

Figure 2. Sulfur oxidation kinetics of strain LS2 with oxygen (A) and acetylene (B) as electron acceptors.

2.3 硫氧化酶 *soxB* 基因表达分析

菌株 LS2 硫氧化酶 *soxB* 基因在 20% O_2 和 20% C_2H_2 , 5%、20%、30% C_2H_2 培养条件下的表达情况如图 3 所示, 硫氧化酶 *soxB* 基因的表达量在 20% C_2H_2 条件下比 20% O_2 条件下高

10.3%。当乙炔浓度分别为 5%、20%、30% 时, 硫氧化酶 *soxB* 基因的表达情况随着乙炔浓度的增加而上升, 在 30% 的实验组中表达量最高, 较之 5% 乙炔组提高了 31%, 说明乙炔可能促进菌株 LS2 的硫氧化反应。

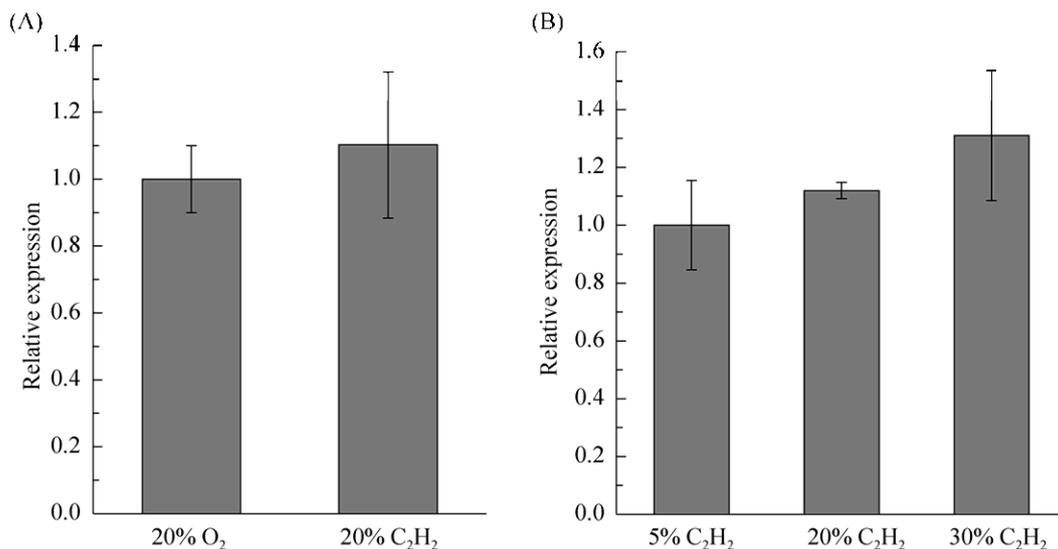


图 3. 硫氧化酶 *soxB* 基因在 20% 氧气和 20% 乙炔(A), 5%、20%、30% 乙炔(B) 的表达情况

Figure 3. The expression of sulfur oxidase *soxB* gene in 20% oxygen and 20% acetylene (A), 5%, 20% and 30% acetylene (B). Error bars represent the standard deviation of the mean ($n=3$).

3 讨论

固氮酶作为催化乙炔还原的关键酶, 在介导以乙炔为电子受体的厌氧硫氧化中发挥了核心作用。固氮酶所需电子均来源于还原态的铁氧还蛋白(ferredoxin, Fd)或黄素氧还蛋白(flavodoxin, Fld)。当前已知有 6 种 Fd/Fld 还原途径, 包括 Fix 复合体、Rnf (*Rhodobacter nitrogen fixation*)复合体、丙酮酸-黄素/铁氧还蛋白氧化还原酶、FeFe 氢酶、NiFe 氢酶和铁氧还蛋白-NADP⁺氧化还原酶^[12-16]。其中, Fix 复合体由 *fixABCX* 基因编码, Rnf 复合体由 *rnfABCDEG* 基因编码, 两种复合体均可以通过 NADH 的氧化来还原 Fd/Fld^[12-14]; 根据文献报道, 严格厌氧菌主要通过丙酮酸-黄素/铁氧还蛋白氧化还原酶、FeFe 氢酶、NiFe 氢酶的 Fd/Fld 还原途径, 而好氧和兼性厌氧菌为 Fd/Fld 还原提供电子则需要通过 NADH/NADPH 的氧化。但是, Fd/Fld ($E_o' = -420$ mV)的电势低于 NADH/NADPH ($E_o' = -320$ mV), NADH/NADPH 所携带的能量无法为 Fd/Fld 的还原提供电子而导致无法驱动固氮作用^[15]。因此, 好氧或兼性厌氧的化能细菌和不产氧光合细菌必须依赖于 Fix 或 Rnf 复合体介导的电子分叉(electron bifurcation)作用才能实现 Fd/Fld 的还原, 并以此驱动固氮作用^[12,15]。

厌氧条件下, 硫氧化生成的电子一般传递给 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 、 Fe^{3+} 、 Mn(IV) 等, 并通过偶联的反硝化、铁还原、锰还原等作用驱动能量生成。但菌株 LS2 不能进行反硝化或铁还原, 也无法通过这些耦合反应获得能量。基于全基因组分析, 菌株 LS2 基因组中同时发现了 *fixABCX* 和 *rnfABCDEG* 基因, 是目前唯一同时含有 Fix 和 Rnf 复合体基因的硫氧化菌^[11]; 根据目前的文献报道, 基因组中同时含有 Fix 复合体和 Rnf 复合体编码基因的

细菌只有 7 株化能异养固氮菌以及 2 株互营生长的乙/丙酸氧化细菌^[17-20]。菌株 LS2 的细胞在厌氧条件下仍可将 H^+ 泵出胞质并驱动 ATP 合成, 其动力可能源于两种具有 Electron Bifurcation 功能的 Fix 和 Rnf 复合体。它们均可利用 NADH($E_m' = -320$ mV)将铁氧还蛋白(ferredoxin, Fd)或黄素氧还蛋白(flavodoxin, Fld)还原为更低电势的 Fd^-/Fld^- ($E_m' = -420$ mV), 从而为固氮作用提供电子。同时, Rnf 复合体具有产生跨膜 H^+/Na^+ 梯度的功能, 电子从 Fd^- 反向传递给 NAD^+ 时可将胞质内 H^+/Na^+ 泵出从而用于驱动 ATP 合成, 是一些化能自养产乙酸、产乙醇、产甲烷等厌氧微生物核心的能量生成方式^[21-22]。此外, Rnf 基因的表达与 Nif 基因的表达具有相关性, Rnf 复合体基因对固氮酶成熟及固氮功能具有调控作用^[23-25]。因此, 两种 electron bifurcatases 不仅与能量代谢有关, 还可能与固氮酶活性的激活息息相关。

可见, 菌株 LS2 可能通过 Fix 和 Rnf 复合体架设的桥联通硫氧化反应和能量产生并将电子传递给乙炔, 而乙炔作为电子受体, 有氧时促进了硫氧化反应, 厌氧时保障了硫氧化反应。其中, 在有氧条件下, 产生跨膜质子梯度的 Rnf 复合体是除 Complex IV 之外驱动 ATP 合成的动力, 同时是厌氧条件下唯一的能量合成途径; 而 Fix 复合体的主要作用可能是驱动 Fd 还原, 还原态 Fd 将一部分电子传递给固氮酶用于乙炔还原, 另一部分电子传递给 Rnf 复合体产生跨膜质子梯度驱动 ATP 的合成; 根据菌株 LS2 以乙炔为电子受体时的生长情况和 *soxB* 基因表达情况, Fix 和 Rnf 复合体配合介导的能量生成, 不仅保证了厌氧条件下细胞生长, 还有利于厌氧条件下的生长代谢。本研究首次提出了以乙炔为电子受体的厌氧硫氧化反应, 说明自然界中除 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 、 Fe^{3+} 、 Mn(IV)

等外, 乙炔也可以作为 SOB 介导厌氧硫氧化的电子受体, 可能还存在其他物质作为电子受体驱动厌氧硫氧化作用。因而本研究对丰富硫的生物地球化学循环理论、推动硫循环研究有积极意义。

参考文献

- [1] Stüeken EE, Buick R, Guy BM, Koehler MC. Isotopic evidence for biological nitrogen fixation by molybdenum-nitrogenase from 3.2 Gyr. *Nature*, 2015, 520(7549): 666–669.
- [2] Trail D, Watson EB, Tailby ND. The oxidation state of Hadean magmas and implications for early Earth's atmosphere. *Nature*, 2011, 480(7375): 79–82.
- [3] 罗剑飞. 硫氧化菌群落结构分析及其特性研究. 华南理工大学博士学位论文, 2011.
- [4] Henkel JV, Dellwig O, Pollehne F, Herlemann DPR, Leipe T, Schulz-Vogt HN. A bacterial isolate from the Black Sea oxidizes sulfide with manganese (IV) oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(25): 12153–12155.
- [5] Eisen JA, Nelson KE, Paulsen IT, Heidelberg JF. The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. *PNAS*, 2002, 99: 9509–9514.
- [6] Bryant DA, Liu ZF. Green bacteria. *Advances in Botanical Research*. Amsterdam: Elsevier, 2013: 99–150.
- [7] Feniouk BA, Junge W. Proton translocation and ATP synthesis by the FoF1-ATPase of purple bacteria. *The Purple Phototrophic Bacteria*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009: 475–493.
- [8] Kucera J, Pakostova E, Lochman J, Janiczek O, Mandl M. Are there multiple mechanisms of anaerobic sulfur oxidation with ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans*? *Research Microbiology*, 2016, 167(5): 357–366.
- [9] Osorio H, Mangold S, Denis Y, Nancucheo I, Esparza M, Johnson DB, Bonnefoy V, Dopson M, Holmes DS. Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(7): 2172–2181.
- [10] Chen JW, Strous M. Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Bioenergetics*, 2013, 1827(2): 136–144.
- [11] 韩佳桐. 化能自养细菌 *Halothiobacillus* sp. LS2 硫氧化和固氮作用的研究. 华南理工大学硕士学位论文. 2019
- [12] Poudel S, Colman DR, Fixen KR, Ledbetter RN, Zheng YN, Pence N, Seefeldt LC, Peters JW, Harwood CS, Boyd ES. Electron transfer to nitrogenase in different genomic and metabolic backgrounds. *Journal Bacteriology*, 2018, 200: e00757–17.
- [13] Buckel W, Thauer RK. Flavin-based electron bifurcation, A new mechanism of biological energy coupling. *Chemical Reviews*, 2018, 118(7): 3862–3886.
- [14] Boyd ES, Costas AMG, Hamilton TL, Mus F, Peters JW. Evolution of molybdenum nitrogenase during the transition from anaerobic to aerobic metabolism. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(9): 1690–1699.
- [15] Müller V, Chowdhury NP, Basen M. Electron bifurcation: a long-hidden energy-coupling mechanism. *Annual Review of Microbiology*, 2018, 72(1): 331–353.
- [16] Greening C, Biswas A, Carere CR, Jackson CJ, Taylor MC, Stott MB, Cook GM, Morales SE. Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H₂ is a widely utilised energy source for microbial growth and survival. *The ISME Journal*, 2016, 10(3): 761–777.
- [17] Nishizawa T, Tago K, Oshima K, Hattori M, Ishii S, Otsuka S, Senoo K. Complete genome sequence of the denitrifying and N₂O-reducing bacterium *Azoarcus* sp. strain KH32C. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(5): 1255.
- [18] Robson RL, Jones R, Robson RM, Schwartz A, Richardson TH. *Azotobacter* genomes: the genome of *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 (ATCC 4412). *PLoS One*, 2015, 10(6): e0127997.
- [19] Nobu MK, Narihiro T, Rinke C, Kamagata Y, Tringe SG, Woyke T, Liu WT. Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *The ISME Journal*, 2015, 9(8): 1710–1722.
- [20] Hidalgo-Ahumada CAP, Nobu MK, Narihiro T, Tamaki H, Liu WT, Kamagata Y, Stams AJM, Imachi H, Sousa DZ. Novel energy conservation strategies and behaviour of *Pelotomaculum schinkii* driving syntrophic propionate catabolism. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(12): 4503–4511.
- [21] Buckel W, Thauer RK. Flavin-based electron bifurcation, a new mechanism of biological energy coupling. *Chemical Reviews*, 2018, 118: 3862–3886.
- [22] Schuchmann K, Müller V. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(12): 809–821.
- [23] Curatti L, Brown CS, Ludden PW, Rubio LM. Genes required for rapid expression of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*. *PNAS*, 2005, 102(18): 6291–6296.
- [24] Barney BM, Plunkett MH, Natarajan V, Mus F, Knutson CM, Peters JW. Transcriptional analysis of an ammonium-excreting strain of *Azotobacter vinelandii* deregulated for nitrogen fixation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(20): e01534–e01517.
- [25] Sarkar A, Köhler J, Hurek T, Reinhold-Hurek B. A novel regulatory role of the Rnf complex of *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(2): 408–422.

Anaerobic sulfur oxidation with acetylene as electron acceptor mediated by chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium *Halothiobacillus* sp. LS2

Shanshan Qu, Hongshan Yan, Weitie Lin*, Jianfei Luo*

School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] The study aims to investigate the acetylene as electron acceptor anaerobic sulfur oxidation mediated by the chemoautotrophic sulfur oxidizing bacterium *Halothiobacillus* sp. LS2. [Methods] Cell growth was measured by dilution coating method, SO_4^{2-} and $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ in sulfur oxidation kinetics were measured by ion chromatograph, and gene expression was analyzed based on relative fluorescence quantitative method. [Results] Although strain LS2 obtained high maximum reaction rate V_{\max} with O_2 as electron acceptor, its growth with acetylene as electron acceptor under anaerobic condition was twice that with O_2 as electron acceptor, and the expression of *soxB* gene was significantly higher than that with O_2 as electron acceptor. [Conclusion] These results indicated that strain LS2 can not only complete anaerobic sulfur oxidation with acetylene as electron acceptor, but also has higher productivity efficiency than aerobic sulfur oxidation. In this study, an anaerobic sulfur oxidation reaction using acetylene as electron acceptor was proposed for the first time, which is of positive significance to the sulfur biogeochemical cycle.

Keywords: anaerobic sulfur oxidation, dynamics, acetylene, *soxB*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China Major Research Program (91951118)

*Corresponding authors. E-mail: Weitie Lin, lfwtl@scut.edu.cn; Jianfei Luo, ljfj2002@scut.edu.cn

Received: 3 March 2021; Revised: 24 April 2021; Published online: 7 May 2021

罗剑飞, 副教授, 硕士生导师。研究方向为: 环境微生物学、微生物生态学、环境微生物技术。研究兴趣: (1) 推动多元素耦合生物地球化学循环的微生物及其循环途径; (2) 隐藏于自然界中未知微生物类群的发现、富集和培养; (3) 修复受污染环境的微生物技术; (4) 替代化石燃料的生物能源。承担国家自然科学基金和中央高校基本科研课题等多项。

