

# 几种土壤的硫酸盐还原菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*) 的研究

吕人豪 苗桂时 扈芝香

(中国科学院微生物研究所, 北京)

硫酸盐还原菌是自然界硫循环中重要的微生物之一。在金属厌氧气腐蚀方面具有重要作用。近来, 对菌腐蚀的调查、菌的生理、生化及腐蚀机理等方面做了一些工作<sup>[1]</sup>。据英、美、荷报道<sup>[2]</sup>, 厌氧气腐蚀中 50—80% 由此菌引起或参与。此菌引起腐蚀的损失在英国估计年达 5 百万英镑, 而美国高至 10 亿美元<sup>[3]</sup>。本文报道几种土壤的硫酸盐还原菌(*D. desulfuricans*)分离鉴定及有关生理、生化特征, 为进一步开展微生物腐蚀和防护及该菌在其他方面的应用提供资料。

## 材料和方法

一、土样来源: 土样采自一米深的自然土, 其中有新疆克拉玛依的荒漠土、甘肃玉门的灰钙土、敦煌的原始灰棕荒漠土、天津的原始褐土及四川巴东紫色土。

二、培养基: 分离及特性试验用斯塔基(Starkey)培养基<sup>[4]</sup>作为基础。视需要补充以下一种或几种物质: 连二亚硫酸钠(1—1.5 克/升)、盐酸半胱氨酸(1—1.5 克/升)、酵母汁(1 克/升)、琼脂(1.5%)。化学药品除分离用化学纯, 其他试验用分析纯。

三、菌的分离: 将稀释土壤悬液接于斯塔基培养基中 30—33℃ 下培养。生长后取管底黑色沉淀转接到加有还原剂的培养基中(Eh\* 约在 -200 毫伏以下)富集。镜检时弧形运动的硫酸盐还原菌占优势, 在斯塔基培养基、肉汁及肉汁葡萄糖平板上无好气菌, 即可用加连二亚硫酸盐的琼脂培养基反复进行单菌落分离。按波斯特盖特<sup>[5]</sup>的纯度检验法检查伴生菌。

四、试验方法: 1. 菌的电子显微镜形态采用无莫尔盐培养基中的悬液制品, 喷铬, 在日本 Hu-11A 型电镜下观察。生长、温度、pH、耐盐等项的试验以 80℃ 下测恒重或 480 毫微米下测光密度来表示。硫化氢测定用碘量法。2. 氧化还原

电位测定: 借高铁氰化钾、硫化钠及连二亚硫酸钠来控制初始电位。用白金电极和甘汞电极在 Polymetron pH 计上测定。3. 给氢体及受氢体试验: 用相当数量的克分子浓度的不同给氢体或受氢体代替原斯塔基培养基的乳酸盐或受氢体正硫酸盐来进行。4. 色素测定: 把菌液于 5000 转/分下离心, 收集细胞并经生理盐水洗涤, 在 0℃ 下研磨成糊状, 加 0.1 克分子磷酸缓冲液(pH 7.2)浸出, 离心(10000 转/分), 取上清液于 Epu-2A 型紫外分光光度计上测定其还原型及氧化型吸收光谱。色素测定按波斯特盖特法<sup>[6]</sup>进行。5. 氢化酶活性测定: 定性测定用 Thunberg 管技术。比活性测定在瓦勃氏气压计上以美蓝为受氢体观察氢吸收。反应瓶主室加 0.2—0.3 毫克干重细胞。中央井加 20% KOH 0.1 毫升。侧臂注入 0.2 毫升美蓝(8 微克分子)。通氢 8—10 分钟后, 加美蓝记录之。

## 实验结果

一、菌株的形态和培养特征: 从天津、敦煌、玉门、克拉玛依、巴东等地五种土壤中分离到分别为 T、D、Y、KT、和 S9 五株菌。它们的细胞形态差别很小, 均为弯曲、端圆弧菌, 单个或成对, 大小 1.0—2.6 × 0.5 微米, 端生单鞭毛, 无孢子革兰氏阴性, 无异染颗粒, 细胞周围有粘膜形成(图 1)。这在淡水菌株还未见报道。硫化氢的产量菌株 KT, 最高, 达 1168.3 毫克/升。起始发育温度在 18℃ 以上, 在 22°—40℃ 生长良好, 最适温度在 30—35℃, 高于 45℃ 停止生长, 85℃ 10 分钟致死, 是中温菌。菌开始发育的 pH 是 5.78, 生长范围为 pH 5.78—8.49, 最适 pH 7.0—7.2。五株菌的耐盐能力是不同的, 从 1.0—3.0%。但都不如在不加盐的培养基中发育好, 系属淡水型菌株。

\* Eh: 氧化还原电位。

本文 1973 年 1 月 25 日收到。

表 1 *D. desulfuricans* 菌株对给氢体的利用

给氢体	T	D	Y	KT <sub>3</sub>	S <sub>9</sub>	给氢体	T	D	Y	KT <sub>3</sub>	S <sub>9</sub>
葡萄糖	+	+	+	+	+	棕 铝 酸	-	-	-	-	-
果 糖	+	+	+	+	+	丙 酮 酸	++	++	++	++	++
麦 芽 糖	++	+	+	++	++	乙 醇	+	+	+	+	+
半 乳 糖	+	+	++	+	+	丙 醇	+	+	+	+	+
乳 糖	-	-	-	±	-	甘 油	++	+	+	++	++
蔗 糖	+	+	+	++	+	丁 醇	-	-	-	-	-
乙 酸	-	-	-	-	-	丙 氨 酸	++	++	++	++	++
丙 酸	-	-	-	-	-	甘 氨 酸	++	++	++	++	++
丁 酸	-	-	-	-	-	天冬氨酸	++	++	++	++	++
戊 酸	-	-	-	-	-	天冬酰胺	++	++	++	++	++
乳 酸	++	++	++	++	++	H <sub>2</sub>	+	+	+	+	+
苹 果 酸	±	±	±	±	±	胆 碱	±	±	±	±	±
琥 珀 酸	-	-	-	-	-	胆 碱*	+	+	+	+	+
硬 脂 酸	-	-	-	-	-	丙 酮 酸*	+	+	+	+	+

注：“-”无生长；“±”菌生长光密度 0.03—0.05；“+”光密度 0.05—0.1；

“++”光密度 0.1—0.2 或 0.2 以上。

\* 试验在无硫酸盐培养基中进行。

二、菌生长过程中 Eh 的变化及其最适 Eh 条件：环境的氧化还原电位(Eh)对硫酸盐还原菌发育关系密切。斯塔基等<sup>[7,8]</sup>报道测定土壤的 Eh 可以指示该菌在土壤中引起的腐蚀性。我们对五株纯菌在培养过程中 Eh 变化的测定结果(图 2a、2b)表明,起始 Eh 在近 +400 毫伏菌都可以开始发育,但是随着菌的繁殖,起始 Eh 在 -300 毫伏以下时, Eh 最初是稍微下降,然后很快回升;开始 Eh 在 50 毫伏以上, Eh 先以不同速度下降,而 48 小时内菌数无明显增多,潜伏期比之起始 Eh 在 -100 毫伏以下延长 28 小时。在我们的试验条件下最后 Eh 值都稳定在 -300 毫伏左右。菌繁殖的最适起始 Eh 在 -100 毫伏以下。对照试验 Eh 值几乎没有变化。

三、给氢体和受氢体试验：硫酸盐还原菌对给氢体和受氢体的利用是菌的特征之一。我们所得的结果(表 1)与以往报道<sup>[9]</sup>及伯基(Bergey)细菌分类手册<sup>[10]</sup>只利用葡萄糖的结果不同,而相同于麦克费森(Macpherson)<sup>[11]</sup>的结果。菌能以氢为给氢体这同它引起阴极氢去极化促进腐蚀相吻合。在受氢体试验中,除元素硫利用较差外,硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐、连二亚硫酸盐都能很好利用而尤以后者为佳。

四、色素测定：硫酸盐还原菌的色素是鉴别种或变种重要特征之一。它参与菌代谢中电子传

递。它的活性抑制剂可以有效地抑制该菌引起的腐蚀<sup>[12]</sup>。从图 3 的结果看到,还原型光谱在 420、525、555、630 毫微米处都有吸收峰。前三个峰是细胞色素 C, 630 毫微米处是不受氧化还原影响的绿色蛋白——desulfoviridin。说明这五株菌都具有硫酸盐还原菌的典型色素系统。

五、氢化酶活性的测定：我们以美蓝为受氢体测定了五株菌的氢吸收速度,并从氢吸收初速度计算出酶活性(表 2)。结果表明,菌株 D 酶活性最高, S<sub>9</sub> 次之, 菌株 T 最低。由于菌利用腐蚀电池中阴极所放出的氢引起去极化是加速腐蚀的重要机理之一, 菌的氢吸收系数 ( $-Q_{H_2}^{SO_4}$ ) 可做为评价硫酸盐还原菌腐蚀活性强度的指标<sup>[13,14]</sup>。按氢化酶活性以及用 KT<sub>3</sub>, S<sub>9</sub> 二菌株室内腐蚀试验表明,该菌有相当高的腐蚀性,说明这些菌对地下金属构件都可以引起或促进厌氧腐蚀。

表 2 五株 *D. desulfuricans* 菌株的氢化酶活性

菌 号	$-Q_{H_2}^{SO_4}$ (微升/毫克干重/小时)
T	887.3
D	1551.3
Y	1026.5
KT <sub>3</sub>	1155.6
S <sub>9</sub>	1437.8

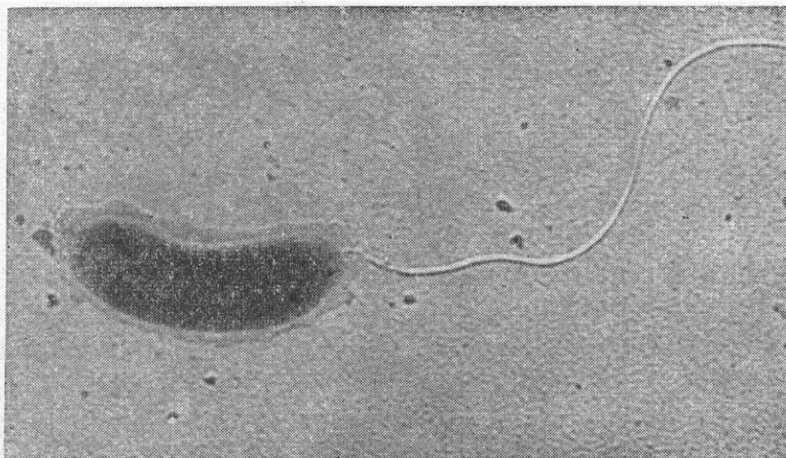


图1 硫酸盐还原菌 (*D. desulfuricans*) 形态 (菌株 T)  
电子显微镜, 放大 20000 倍

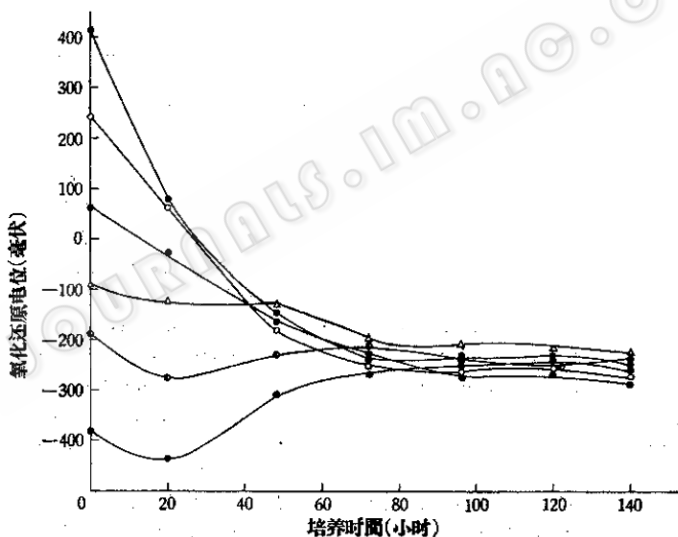


图2a 不同原始氧化还原电位下 *D. desulfuricans* (菌株 T) 的电位变化情况

六、小结：从五种不同土壤中分离到五株硫酸盐还原菌。按其形态、培养、生理、生化特征，参考分类手册<sup>[9, 10, 15]</sup>及波斯特盖特<sup>[16]</sup>对该类菌分类的建议，经鉴定都属于去磺弧菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*)，其生长最适温度 30—35℃，最适 pH 7.0—7.2，耐盐不超过 3.0%，最适 Eh—100 毫伏以下。含细胞色素 C 及 desulfovibrin。其氢化酶活性 (—QH<sub>2</sub>；微升/毫克干重/小时) 为 887.3—1557.3。这些菌株具有较强的腐蚀性。

### 参 考 资 料

- [1] Miller, J. D. A.: Microbial Aspects of Metallurgy. MTP, Chiltern House Aylesbury England. 61—106, 1971.
- [2] Minchin, L. T.: *Coke and Gas*, 18:495—497, 504, 1956.
- [3] Butler, N. M. and Eggins, H.: *New Scientist*, 26:184—186, 1965.
- [4] Starkey, R. L.: *Arch. Mikrobiol.*, 9:268—304, 1938.

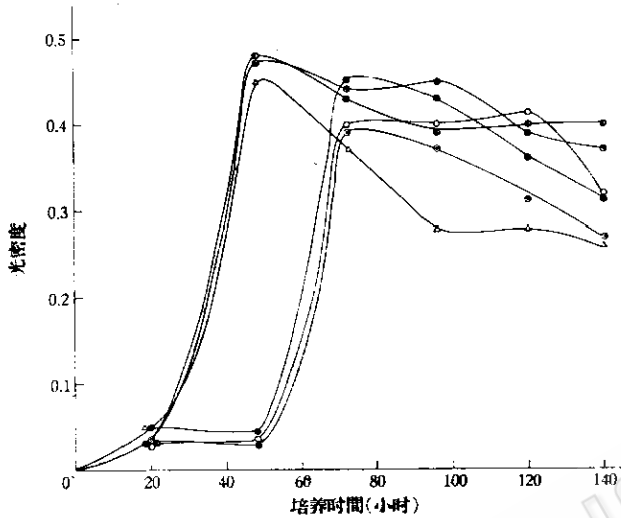


图 2b 不同原始氧化还原电位下 *D. desulfuricans* (菌株 T) 的生长情况

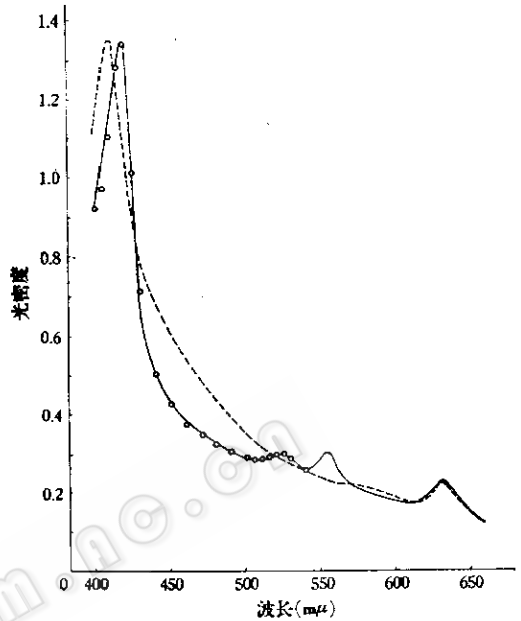


图 3 *D. desulfuricans* (菌株 T) 无细胞浸出液的吸收光谱测定液浓度 3.84 毫克蛋白/毫升  
○——○ 还原型(测定前加入少量连二亚硫酸钠)  
----- 氧化型

- [ 5 ] Postgate, J. R.: *J. Gen. Microbiol.*, 9: 440—444, 1953.
- [ 6 ] Postgate, J. R.: *Nature*, 183:481—482, 1959.
- [ 7 ] Starkey, R. L. and Wight, K. M.: Final Report of the Am. Gas Assoc. Iron Corrosion Research Fellowship, 3—108, 1945.
- [ 8 ] Booth, G. H., Cooper, A. W. and Cooper, P. M.: *Br. Corros. J.*, 2(3):109—113, 1967.
- [ 9 ] Prevot, A. R.: *Manual de Classification et de Determination des Bacteries Anaerobies*, Masson et, Editions Paris. 1948.
- [ 10 ] Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Smith, N. R.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th. ed. Baltimore the

- Williams and Williams CO., 1957.
- [ 11 ] Macpherson, R. and Miller, J. P. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 31:365—373, 1963.
- [ 12 ] Trautenberg, G. A.: *Materials Protection*, 3:30—34, 1964.
- [ 13 ] Booth, G. H. and Wormwell, F.: First International Congress on Metallic Corrosion, London. 341—344, 1961.
- [ 14 ] Oppenheimer, E. H.: *Corros. Abst.*, 7(1): 28, 1968.
- [ 15 ] Krassinikov, N. A.: *Deagnostik der Bakterien und Actinomyceten*. VEB. Gustav Fisher Verlag., Jena. 1959.
- [ 16 ] Postgate, J. R. and Campbell, L. L.: *Bacteriol. Rev.*, 30:732—738, 1966.