

化能自养硫氧化细菌 *Halothiobacillus diazotrophicus* 低氧硫氧化特性及其机制

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

严洪珊, 林炜铁, 罗剑飞. 化能自养硫氧化细菌 *Halothiobacillus diazotrophicus* 低氧硫氧化特性及其机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4358-4370.

YAN Hongshan, LIN Weitie, LUO Jianfei. Characteristics and mechanism of sulfur oxidation of *Halothiobacillus diazotrophicus* exposed to low oxygen[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4358-4370.

摘要: 【目的】探究 *Halothiobacillus diazotrophicus* LS2 在不同氧浓度下的硫氧化特性, 并揭示其低氧适应机制。【方法】通过离子色谱测定 $S_2O_3^{2-}$ 和 SO_4^{2-} 浓度, 平板稀释涂布法跟踪测定菌体生长情况, 转录组测序及生物信息学分析其差异表达基因及相关代谢通路。【结果】菌株 LS2 在氧含量 0.2%–21% 的条件下能够进行硫氧化代谢和生长, 并且在氧含量高于 1.6% 的条件下维持较高的硫氧化活性。比较转录组学分析筛选出 851 个可能与低氧适应相关的差异表达基因, 包括表达上调基因 464 个, 表达下调基因 387 个, 其中硫代硫酸盐硫转移酶(thiosulfate sulfurtransferase, TST)、硫氧化酶/还原酶(sulfur oxidase/reductase, SOR)、硫化物:醌氧化还原酶(sulfide:quinone oxidoreductase, SQR)上调表达, Sox 酶系下调表达, 菌株 LS2 低氧硫氧化代谢途径可能发生改变。低氧组菌株 LS2 上调表达 *cbb₃* 型细胞色素 c 氧化酶, 以增加 O_2 与酶的结合效率, 同时上调表达固氮酶基因 *nifDKH* 和 Fix 复合体基因 *fixA*、*fixB*、*fixC*、*fixX*, 利用 N_2 、 CO_2 为最终电子受体维持胞内氧化还原平衡。【结论】菌株 LS2 是一株在低氧环境中仍能维持较高硫氧化活性的硫氧化细菌, SQR、高氧亲和末端氧化酶及固氮酶对其适应低氧环境有重要作用, 本研究对丰富低氧硫氧化代谢机制认识有积极意义, 为优化含硫废水处理工艺提供一定理论基础。

关键词: 低氧适应; 硫氧化细菌; 固氮酶; 末端氧化酶; 转录组分析

资助项目: 国家自然科学基金(91951118)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (91951118).

*Corresponding authors. E-mail: LIN Weitie, lfwtlin@scut.edu.cn; LUO Jianfei, ljfj2002@scut.edu.cn

ORCID: LUO Jianfei (0000-0002-9570-4224)

Received: 2024-06-05; Accepted: 2024-08-27; Published online:

Characteristics and mechanism of sulfur oxidation of *Halothiobacillus diazotrophicus* exposed to low oxygen

YAN Hongshan, LIN Weitie*, LUO Jianfei*

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

Abstract: [Objective] To study the sulfur oxidation characteristics of *Halothiobacillus diazotrophicus* LS2 under different oxygen levels and to decipher the mechanism of strain LS2 adapting to low-oxygen environments. [Methods] The concentrations of $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ and SO_4^{2-} were measured by ion chromatography. Bacterial growth was determined by plate dilution coating method. The differentially expressed genes and related metabolic pathways were identified and analyzed by transcriptome sequencing and bioinformatics technology. [Results] Strain LS2 oxidized reduced sulfur compounds and grew under 0.2%–21.0% oxygen, and it maintained high sulfur oxidation activity under the oxygen level above 1.6%. Comparative transcriptomic analysis screened out 851 differentially expressed genes that might be related to the adaptation to low oxygen, including 464 up-regulated genes and 387 down-regulated genes. In sulfur metabolism, thiosulfate sulfurtransferase, sulfur oxidase/reductase, and sulfide:quinone oxidoreductase were up-regulated, while the Sox enzyme system was down-regulated, which indicated that strain LS2 might change the sulfur oxidation pathway to adapt to low-oxygen environment. In the low-oxygen group, the *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase was up-regulated to increase the O_2 -binding efficiency. Meanwhile, since less electron could be received by O_2 , the nitrogenase genes *nifDKH* and Fix complex genes *fixA*, *fixB*, *fixC*, *fixX* were up-regulated, making N_2 and CO_2 the alternative electron accepters to maintain redox balance, which explained the higher maximum bacterial growth in low-oxygen environments. [Conclusion] Strain LS2 is a sulfur-oxidizing bacterium that can maintain high sulfur oxidation activity in the low-oxygen environment. Sulfide:quinone oxidoreductase, high-oxygen-affinity terminal oxidases, and nitrogenase play a role in the adaptation to the low-oxygen environment. This study is of positive significance for deciphering the mechanism of sulfur oxidation under low oxygen and provides a theoretical basis for optimizing the treatment process of sulfur-containing wastewater.

Keywords: adaptation to low oxygen; sulfur-oxidizing bacterium; nitrogenase; terminal oxidase; transcriptome analysis

硫化物具有强还原性、强腐蚀性和生物毒性, 常见于石化、制革、粘胶人造丝制造、煤炭气化发电等工业产生的废水, 以及城市污

水、黑臭水体、沼气中, 是废弃物处理中最棘手的问题之一^[1-2]。硫氧化细菌(sulfur-oxidizing bacteria, SOB)在生物法处理含硫废水中发挥了

重要作用。SOB 的含硫废水处理工艺的最终产物通常是硫酸盐或单质硫, 硫酸盐可直接排入海水或咸水接收水, 单质硫可以通过固液分离方法进行分离和回收, 用于生产硫酸、硫肥、杀菌剂和电池阴极材料^[3]。

SOB 在氧化硫化物时首先生成 S^0 , 黄素细胞色素 c 硫化物脱氢酶(flavocytochrome c sulfide dehydrogenase, FCSD)和硫化物:醌氧化还原酶(sulfide:quinone oxidoreductase, SQR)是目前已知能够催化该反应的两种酶, 它们分别将电子传递至细胞色素 c 和醌^[4]。细胞色素 c 与醌的电子随后会进入细胞膜上的电子传递链参与能量代谢。SQR 能够催化 H_2S 与谷胱甘肽(glutathione, GSH)生成谷胱甘肽过硫化物(glutathione persulfide, GSSH)或 H_2S_2 , 并且经过多轮反应可生成长链的 GS_nH 和 H_2S_n ($n \geq 2$), 当 $n=9$ 时, 长链硫烷硫能够自发生成 S_8 形式的单质硫^[5]。GSSH 等过硫化物可进一步被过硫化物氧化酶(persulfide oxidase, PDO)或硫氧化酶/还原酶(sulfur oxidase/reductase, SOR)利用。PDO 催化 GSSH 与 O_2 反应生成 SO_3^{2-} 和 GSH, SOR 则能够催化 GSSH 与 O_2 发生歧化反应生成 H_2S 和 SO_3^{2-} ^[6]。PDO 与 SOR 的反应均需要 O_2 参与, 因而在氧气匮乏的条件下 GSSH 无法被快速消耗, 更有可能被 SQR 催化多轮加硫反应生成长链硫烷硫, 进一步引起 S_8 积累。

O_2 是 SOB 常见的电子受体之一, 筛选能够在低氧条件下具有高硫氧化活性的 SOB 菌株能够削减含硫废水处理的曝气成本。化能自养硫氧化细菌 *Halothiobacillus diazotrophicus* LS2 是盐硫小杆菌属(*Halothiobacillus*)的新种, 能够在 15–40 °C、pH 5.0–9.0 的环境中生长, 可利用硫化物、单质硫、硫代硫酸盐、连四硫酸盐和亚

硫酸盐作为底物, 但无法利用硫氰酸盐作为单一硫源^[7]。根据全基因组测序和基于比对的基因预测结果, 菌株 LS2 的基因组编码了包括 SQR、Sox 酶系等多种硫氧化酶, 以及 4 种催化 O_2 还原反应的末端氧化酶—— aa_3 型细胞色素 c 氧化酶、 bo' 型醌氧化酶、 cbb_3 型细胞色素 c 氧化酶和 bd 型醌氧化酶, 其中 cbb_3 型细胞色素 c 氧化酶和 bd 型醌氧化酶属于高氧亲和氧化酶, 因此菌株 LS2 具有在低氧环境中进行硫氧化的潜能。本研究分析了 LS2 在不同氧浓度条件下的硫氧化及生长特性, 利用比较转录组学发掘了 LS2 与低氧适应相关的基因, 并提出 LS2 低氧适应相关的代谢通路模型。

1 材料与方法

1.1 培养基

液体培养基(g/L): KH_2PO_4 0.40, $MgCl_2$ 0.12, $NaCl$ 1.00, $CaCl_2$ 0.01, Widdel 微量元素溶液^[8] 1.00 mL/L, 121 °C 灭菌 20 min 后加入过滤除菌的 $Na_2S_2O_3$ 0.25, $NaHCO_3$ 0.20, NH_4Cl 0.027, $FeCl_2$ 0.007 9 g/L。

固体培养基(g/L): K_2HPO_4 0.40, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12, KNO_3 0.40, NH_4Cl 0.10, 技术琼脂粉 15.00, 121 °C 灭菌 20 min 后加入过滤除菌的 $Na_2S_2O_3$ 2.48, $NaHCO_3$ 0.20, $FeSO_4$ 0.02 g/L。

1.2 菌株 LS2 的保藏及活化

Halothiobacillus diazotrophicus LS2 (=GDMCC 1.4095^T=JCM 39442^T)是本实验室保存的一株硫氧化细菌, 菌液与 50%甘油 1:1 混匀后冻存于 -70 °C。活化时取冻存于 -70 °C 的菌株 LS2 以 1%接种量接入液体培养基中, 置于 30 °C、150 r/min 摇床培养 2 d, 稀释涂布法接种至固体培养基, 静置于 30 °C 生化培养箱

培养 4 d, 挑取单菌落接入液体培养基即可作为种子液用于后续实验。

1.3 菌株 LS2 在不同氧浓度下的硫氧化及生长特性

1.3.1 不同氧含量顶空的制备

常氧、微氧、低氧条件下菌株 LS2 的硫氧化及生长特性的实验中设置了氧含量为 21%、5.0%、0.2%等 3 个顶空条件, 之后为了进一步探究菌株 LS2 在氧气受限条件下的硫氧化特性, 实验设置了 10.0%、5.0%、3.2%、1.6%、0.8%、0.2%等 6 个不同氧浓度的顶空条件, 其顶空制备方法如下: 高压蒸汽灭菌前, 将 30 mL 培养基分装至容积为 125 mL 的血清瓶中, 丁基胶塞和铝盖封口后置于沸水浴 10 min, 然后利用真空泵与 N₂曝气装置对培养基交替进行抽气 3 min, 曝气 1 min, 重复操作 3 次, 最后向培养基内充入 0.085 MPa 正压的 N₂, 即为顶空含氧量约为 0.2%的低氧培养体系, 在此基础上额外加入 O₂ 制备含氧量为 0.8%、1.6%、3.2%、5.0%、10.0%的微氧培养体系, 顶空含氧量为 21.0%的常氧培养体系中使用空气作为顶空, 不进行抽气处理。顶空氧浓度通过气相色谱测定(浙江福立分析仪器有限公司, Porapak-Q 柱)。

1.3.2 S₂O₃²⁻和 SO₄²⁻的测定

使用离子色谱法(Dionex Aquion RFIC, Dionex IonPac AS19 IC 柱)测定底物 S₂O₃²⁻和产物 SO₄²⁻的浓度, 淋洗液为 18 mmol/L KOH, 淋洗液流速 1 mL/min, 抑制器电流 45 mA, 柱温 30 °C, 进样量 25 μL, 背景电导 4–6 μS/cm。

1.3.3 生长量测定

通过稀释涂布平板和菌落计数跟踪测定菌体生长情况。

1.4 硫氧化动力学实验

1.4.1 菌体培养和收集

菌株 LS2 在含 1 mmol/L Na₂S₂O₃ 的液体培养

基中 30 °C、150 r/min 摇床培养 10–12 h, 500 mL 菌液通过 0.22 μm 滤膜抽滤收集菌体, 在 6 mL 无底物培养基中重悬。

1.4.2 动力学实验方法

实验设置了 3 个氧浓度组(0.2%、1.6%、21.0%), 并选用 Na₂S₂O₃ 和 Na₂S₄O₆ 作为底物, 每种底物设置了多个浓度梯度。菌株 LS2 以高接种量接入未添加底物的培养基中, 并通过稀释涂布平板计数的方法评估实际接种量, 2 h 的适应期后, 按一定顺序逐瓶加入底物起始反应, 待到实验组内含最低浓度底物的样品中检测到硫酸根的生成, 并且底物尚未消耗完全时, 依照加入底物的顺序通过抽滤终止反应。实验通过离子色谱测定其初始和最终硫酸根浓度, 计算其在短时间内的平均反应速率, 通过米氏方程拟合动力学曲线。

1.5 比较转录组分析

1.5.1 菌体培养

设置顶空氧浓度分别为 21.0% (常氧组)和 0.2% (低氧组), 底物 Na₂S₂O₃ 浓度为 1 mmol/L, 30 °C、150 r/min 摇床培养, 常氧组培养约 12–14 h 即可用于 RNA 提取, 低氧组则需培养 10–14 d, 当培养基 pH 5.8–6.1 且底物未消耗完全时, 即可用于 RNA 提取。

1.5.2 RNA 提取和测序

在维持顶空条件的前提下向菌液中注入 5% 苯酚-乙醇溶液使细菌迅速破裂死亡^[9–10], 从而避免在收集过程中低氧组暴露在空气中而导致转录组发生改变。RNA 提取参照 RNAiso Plus 试剂盒(TaKaRa 公司)说明书进行, 总 RNA 样品–70 °C 保存。RNA 测序委托苏州金唯智生物科技有限公司进行。

1.5.3 比较转录组分析方法

差异表达基因分析以常氧组为对照组, 低

氧组为实验组,以测序得到的转录本表达量(read count)为输入数据,使用 Bioconductor 中的 R 语言包 DESeq2 (v1.38.3)^[11] 进行数据处理,筛选 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1.0$, $Q < 0.05$ 的基因,统计基因显著性差异表达情况。基因本体论(gene ontology, GO)富集分析使用 Goseq^[12] 进行分析, $P < 0.05$ 为显著富集。差异表达基因在京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库代谢通路上的可视化映射通过 R 语言包 Pathview (v1.31.3)^[13] 完成。

2 结果与分析

2.1 不同氧浓度下菌株 LS2 的硫氧化及生长特性

2.1.1 常氧、微氧、低氧条件下菌株 LS2 的硫氧化及生长特性

菌株 LS2 在常氧(21.0% O₂)、微氧(5.0% O₂)、低氧(0.2% O₂)环境中的硫氧化特性及生长曲线实验结果如图 1 所示,在初始氧气浓度为 21.0%、5.0%和 0.2%条件下,1 mmol/L Na₂S₂O₃ 可分别在 12、14、191 h 内消耗完毕,细胞数量最大值分别为 1.71×10^7 、 1.63×10^7 、 2.37×10^7 CFU/mL,之后细胞快速死亡。结果表明菌株 LS2 能够在氧含量为 0.2%–21.0%的环境中硫氧化和生长。然而,相比于常氧和微氧培养,在氧气浓度低至 0.2%的培养环境中,菌株 LS2 的硫氧化速度明显减慢,同时菌体生长速度也远低于常氧与微氧培养时的菌体生长速度,说明低氧环境中菌株 LS2 代谢效率有所下降,值得注意的是,低氧环境中菌株 LS2 的最大生长量显然高于常氧与微氧培养,这提示在低氧条件下菌株 LS2 的能量可能更多地被用于与生长量相关的合成代谢中。

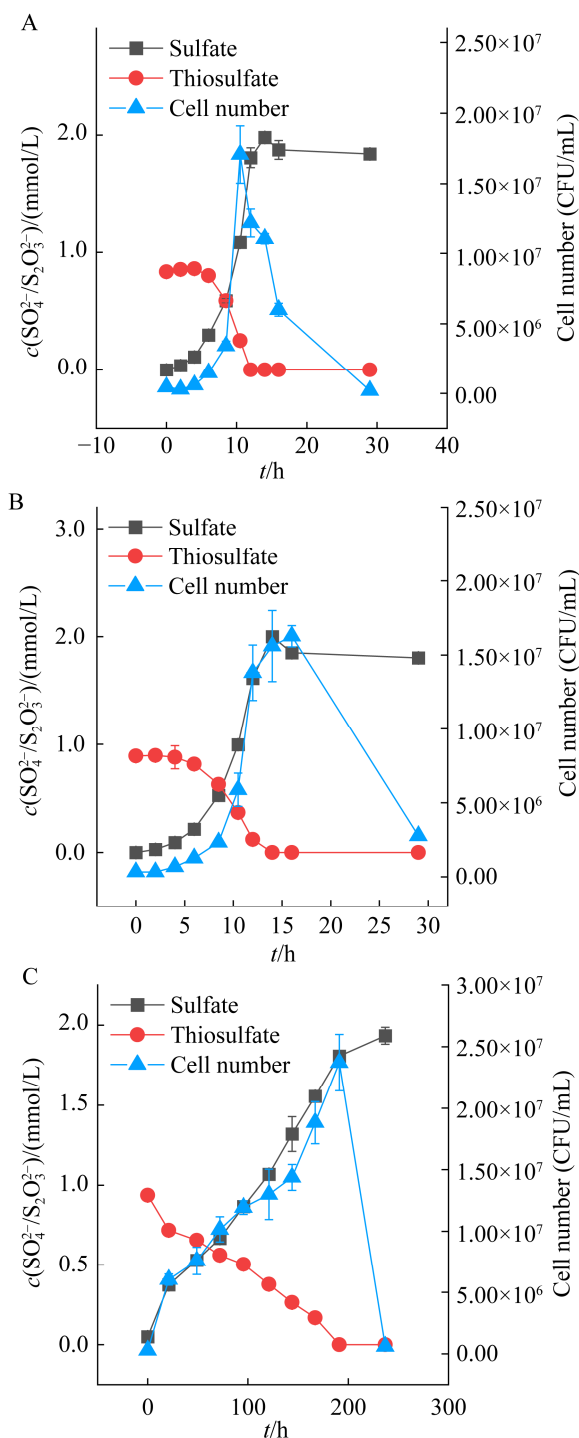


图 1 菌株 LS2 在常氧(A)、微氧(B)、低氧(C)条件下的硫氧化及生长曲线

Figure 1 Sulfur oxidation and growth curves of strain LS2 under normoxic (A), microoxic (B), and low-oxygen (C) conditions. A: 21.0% O₂. B: 5.0% O₂. C: 0.2% O₂. Replicates $n=3$, error bar represents standard deviations.

2.1.2 不同氧浓度下菌株 LS2 的硫氧化特性

为进一步探究菌株 LS2 在不同氧浓度下的硫氧化代谢特性, 设置在顶空氧含量为 0.2%、0.8%、1.6%、3.2%、5.0%、10.0% 条件下以 1 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 培养菌株 LS2。结果如图 2 所示, 在顶空氧气浓度大于 1.6% 的条件下, 菌株 LS2 在 6–8 h 进入对数期, 可以在 14 h 内将 1 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 消耗完全。然而, 在 0.2% O_2 的低氧环境

下, 菌株 LS2 硫氧化速率大幅下降, 未能观察到明显的对数期, 在 191 h 时完全消耗 1 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 。在初始顶空氧气浓度为 0.8% 的条件下, 硫氧化过程分为 2 个阶段, 在 0–24 h 时硫氧化速度较快, 此后由于顶空氧气含量降低, 硫氧化速度明显降低且表现出近似匀速的趋势。结果表明菌株 LS2 能够在氧浓度低至 1.6% 的环境中高效进行硫氧化反应。

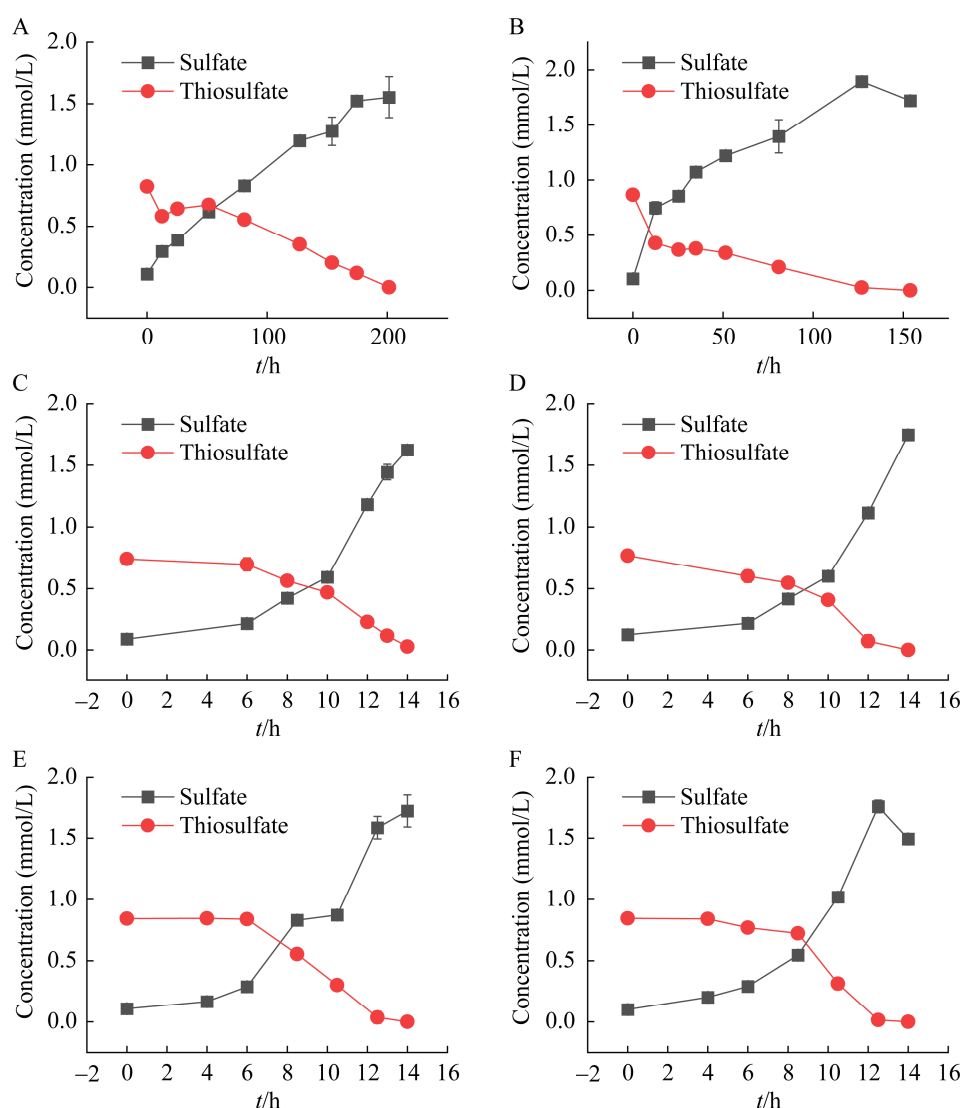


图 2 菌株 LS2 在不同氧气浓度下的硫氧化情况

Figure 2 Sulfur oxidation of strain LS2 under different oxygen content. A: 0.2% O_2 . B: 0.8% O_2 . C: 1.6% O_2 . D: 3.2% O_2 . E: 5.0% O_2 . F: 10.0% O_2 . Replicates $n=3$, error bar represents standard deviations.

2.2 不同氧浓度条件下的硫氧化动力学

硫氧化动力学实验结果如图 3 所示, 以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为底物时, 21.0% O_2 、1.6% O_2 、0.2% O_2 等 3 个实验组的硫氧化最大催化速率 v_{\max} 分别为 0.098、0.051、0.002 1 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot 10^7 \text{ cells})$, 以 $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 为底物时, 21.0% O_2 、1.6% O_2 、0.2% O_2 实验组的 v_{\max} 分别为 0.58、0.049、

0.002 1 $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot 10^7 \text{ cells})$ 。在氧气充足的条件下, 菌株 LS2 氧化 $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 的 v_{\max} 高于氧化 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的 v_{\max} , 菌株 LS2 对 $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 具有更高的氧化效率, 但在限制氧气的条件下, 两种底物的 v_{\max} 接近, 表明在氧含量低于 1.6% 的条件下, 菌株 LS2 的硫氧化效率由环境氧含量决定。

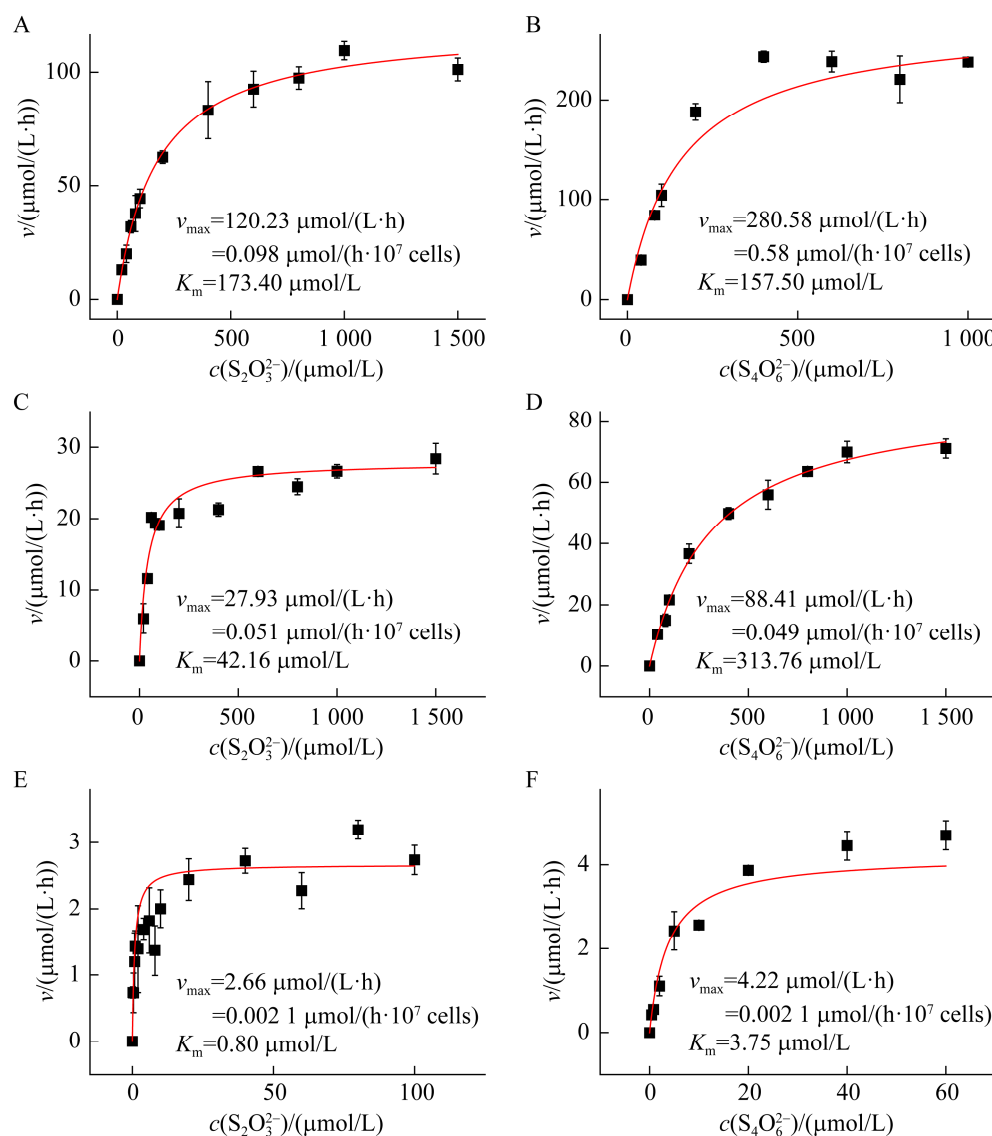


图 3 菌株 LS2 在不同氧浓度条件下硫氧化动力学

Figure 3 Sulfur oxidation kinetics of strain LS2 under different oxygen contents. A: 21.0% O_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. B: 21.0% O_2 , $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$. C: 1.6% O_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. D: 1.6% O_2 , $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$. E: 0.2% O_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. F: 0.2% O_2 , $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$. Replicates $n=3$, error bar represents standard deviations.

2.3 比较转录组学分析

2.3.1 差异表达基因分析

为进一步研究菌株 LS2 适应低氧环境的能量代谢机制, 对常氧(21.0% O₂)和低氧(0.2% O₂)条件下的菌株 LS2 转录组进行分析。设置常氧组为对照, 低氧组为实验组, 以 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1.0$, $Q < 0.05$ 的条件筛选差异表达基因, 在比对到的 2 599 个基因中共筛选出 851 个差异表达基因, 其中表达上调基因 464 个, 表达下调基因 387 个(图 4A)。

2.3.2 差异表达基因 GO 富集分析

菌株 LS2 常氧与低氧条件下的差异表达基因 GO 富集结果如图 4B 所示。其中在分子功能类目中, 有 10 个差异表达基因与电子传递活性(GO:0009055)相关, 8 个基因与醌结合(GO:0048038)相关, 5 个基因与固氮酶活性(GO:0016163)相关, 4 个基因与乙酰辅酶 A 羧化酶活性(GO:0003989)相关; 在细胞组分类目

中, 有 3 个基因与乙酰辅酶 A 羧化酶复合体(GO:0009317)相关, 3 个基因与钼铁固氮酶复合体(GO:0016612)相关; 在生物过程类目中, 有 25 个差异基因与氮固定(GO:0009399)相关, 有 10 个基因与脂肪酸生物合成过程(GO:0006633)相关, 5 个基因与 O 抗原生物合成过程(GO:0009243)相关, 4 个基因与胞外多糖生物合成过程(GO:0045226)相关, 3 个基因与丙二酰辅酶 A 生物合成过程(GO:2001295)相关。结果表明在低氧条件下, 菌株 LS2 中与电子传递、氮固定、脂肪酸合成、胞外多糖合成等功能相关的基因的转录表达发生显著变化。

2.3.3 特定代谢通路中的差异表达基因

能量代谢、电子传递相关通路中差异表达基因如表 1 所示。结果显示在硫代谢途径中, Sox 酶系中 SoxA、SoxB、SoxC、SoxD 编码基因表达下调, 硫代硫酸盐硫转移酶(thiosulfate sulfurtransferase, TST)、SOR、SQR 等硫氧化酶

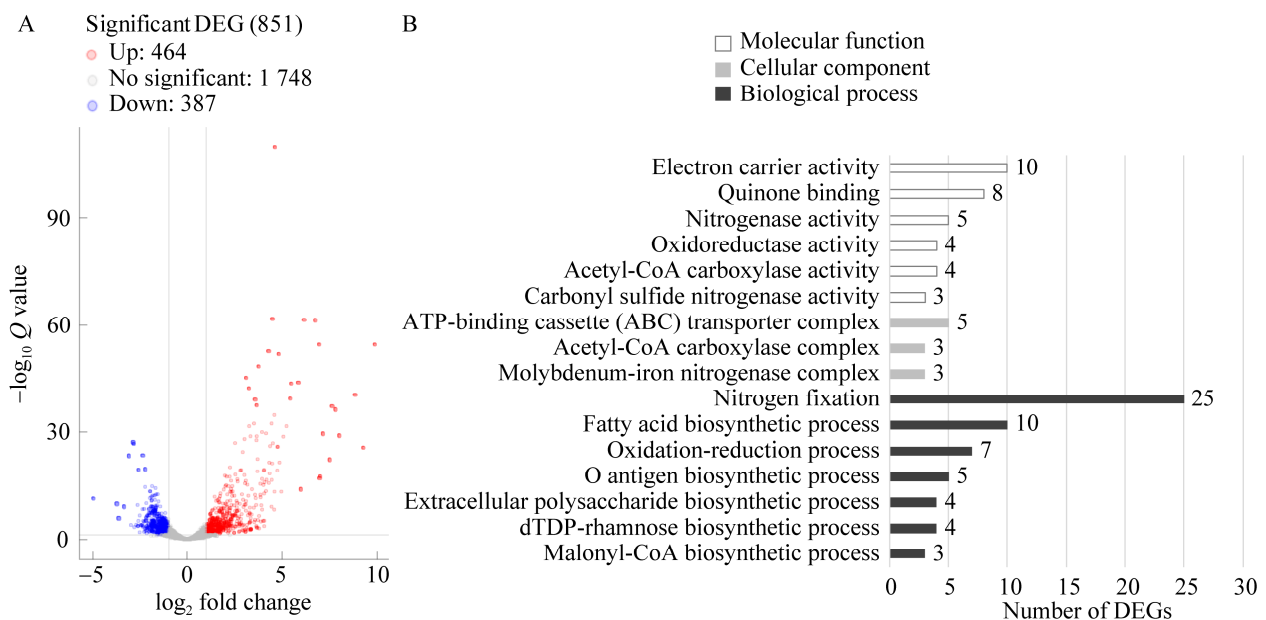


图 4 差异表达基因功能分布统计

Figure 4 Function distribution of differentially expressed genes. A: Volcano plot of differentially expressed genes. B: GO term enrichment of differentially expressed genes.

表 1 低氧条件下菌株 LS2 的显著差异表达基因

Table 1 Significant differentially expressed genes under low-oxygen condition in strain LS2

Pathway	Gene ID	Putative Function	log ₂ fold change	Significance
Sulfur metabolism	A9404_05555	SoxA, sulfur oxidation <i>c</i> -type cytochrome	-1.48	*
	A9404_05595	SoxB, thiosulfohydrolase	-1.98	***
	A9404_12910	SoxC, sulfane dehydrogenase subunit	-1.89	***
	A9404_12905	SoxD, S-disulfanyl-L-cysteine oxidoreductase	-1.17	*
	A9404_11335	Thiosulfate sulfurtransferase	1.70	***
	A9404_02545	Sulfur oxygenase/reductase	3.35	***
	A9404_02540	Sulfide:quinone oxidoreductase	3.28	***
Oxidative phosphorylation	A9404_06580	Cytochrome <i>c</i> oxidase <i>cbb</i> ₃ -type subunit I	1.75	***
	A9404_06575	Cytochrome <i>c</i> oxidase <i>cbb</i> ₃ -type subunit II	1.66	**
	A9404_06565	Cytochrome <i>c</i> oxidase <i>cbb</i> ₃ -type subunit III	1.92	***
	A9404_08670	F-type H ⁺ /Na ⁺ -transporting ATPase subunit alpha	-2.60	***
	A9404_08660	F-type H ⁺ /Na ⁺ -transporting ATPase subunit beta	-2.22	**
	A9404_08685	F-type H ⁺ -Transporting ATPase subunit c	-1.53	*
	A9404_06480	Plasma membrane proton efflux P-type ATPase	2.64	***
Carbon fixation in photosynthetic organisms	A9404_06275	Ribulose-bisphosphate carboxylase large chain	-3.62	***
	A9404_07175	Type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-1.89	**
	A9404_07180	Transketolase	-1.41	*
	A9404_03755	Ribose 5-phosphate isomerase A	-1.48	***
	A9404_07335	Fructose-1,6-bisphosphatase I	-1.39	**
	A9404_07065	Triosephosphate Isomerase	-2.26	***
	A9404_09970	Ribulose-phosphate 3-epimerase	-1.30	*
Nitrogen metabolism	A9404_01615	Nitrogenase molybdenum-iron protein subunit beta	4.47	***
	A9404_01620	Nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	6.73	***
	A9404_01625	Nitrogenase iron protein	6.96	***
	A9404_01790	FixX, ferredoxin-like protein	4.62	***
	A9404_01795	FixC, dehydrogenases (flavoproteins)	4.80	***
	A9404_01800	FixB, electron transfer flavoprotein, alpha subunit	5.26	***
	A9404_01805	FixA, electron transfer flavoprotein, beta subunit	5.47	***

*: $Q < 0.05$; **: $Q < 0.01$; ***: $Q < 0.001$.

基因表达上调。在氧化磷酸化途径中, *cbb*₃ 型氧化酶显著上调, 表明菌株 LS2 通过上调表达高氧亲和氧化酶提高酶对 O₂ 的结合效率。同时, F₁F₀ 型 ATP 酶下调表达和 P 型 ATP 酶的上调表达, 说明菌株 LS2 在低氧条件下可能处于能量受限的状态, 需要通过消耗 ATP 维持膜两侧的质子浓度梯度。在卡尔文循环途径中, 核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)、5-磷酸核糖异构酶 (ribose-5-phosphate isomerase, RPI)、3-磷

酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase, TPI) 等酶均表达下调。在氮代谢途径中, 固氮酶和 FixA、FixB、FixC、FixX 均上调表达。

3 讨论与结论

3.1 菌株 LS2 的低氧硫氧化特性

末端氧化酶与微生物的低氧适应能力密切相关, 末端氧化酶冗余的现象在 SOB 中较为常

见, 许多 SOB 都含有至少 1 种高氧亲和氧化酶^[14-18]。菌株 LS2 的基因组中编码了 4 种末端氧化酶: aa_3 型细胞色素 c 氧化酶、 bo' 型氢醌氧化酶、 cbb_3 型细胞色素 c 氧化酶、 bd 型氢醌氧化酶, 其中包括 2 种高氧亲和氧化酶, 因而能够耐受一定程度的低氧环境。van den Ende 等^[19]研究表明, 产硫硫杆菌(*Thiobacillus thioarous*)能够在顶空氧浓度约为 4% 的条件下氧化硫化物, 但氧化效率在顶空氧浓度低于 6% 时开始降低。与之相比, 菌株 LS2 能够适应氧含量更低的环境, 即顶空氧浓度 1.6% 的环境。类似地, 与菌株 LS2 同属的那不勒斯盐硫小杆菌(*Halothiobacillus neapolitanus*)在输入氧浓度为 1.1%–1.3% 的条件下可达到 78.57 g/(m³·h) 的除 H₂S 效率^[20]。除此之外, 菌株 LS2 的基因组编码了较为完整的固氮酶及相关调控系统的基

因, 能够通过固氮作用获取自身生长所需的氮源, 可以在缺氮条件下进行含硫废水治理。

3.2 菌株 LS2 的低氧适应机制

根据生长实验及转录组学分析结果, 从硫氧化、氮固定、碳固定和电子传递链等代谢途径进行分析并提出菌株 LS2 的低氧适应机制模型(图 5)^[21-22]。

3.2.1 硫氧化代谢

Sox 酶系是 SOB 中常见的将硫代硫酸盐氧化成硫酸盐的代谢途径。菌株 LS2 的基因组中编码了完整的 SoxXYZABCD 酶系, 以及 TST、SOR、SQR、PDO 等硫氧化相关酶。在常氧条件下, 硫氧化反应由 Sox 酶系主导, S₂O₃²⁻ 的 8 个电子均由间质中游离的细胞色素 c 接收。在低氧条件下, 由 TST、SOR、SQR、PDO 催化的硫氧化反应则占主导。低氧条件下, 菌株

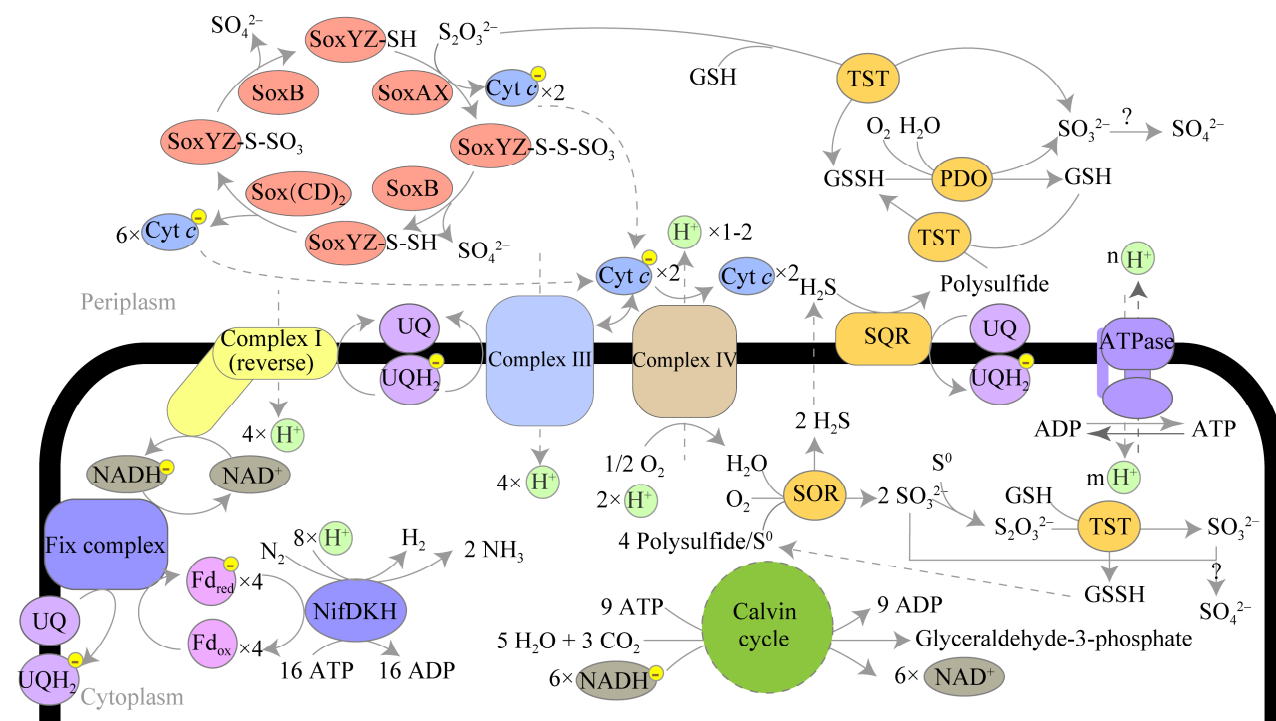


图 5 菌株 LS2 的低氧代谢通路及关键酶

Figure 5 Pathways and critical enzymes of strain LS2 in low-oxygen environment (modified from^[21-22]). The solid arrows represent chemical reactions, and the dash arrows represent the same substance or transmembrane transport process.

LS2 下调表达 SoxC 和 SoxD。当 Sox 酶系中缺乏 Sox(CD)₂ 时, Sox 酶系难以将 S₂O₃²⁻ 完全氧化为 SO₄²⁻, 而可能通过某种途径反应生成硫烷硫 (R-S_nH 或 H-S_n⁻)^[23-24]。硫烷硫则进一步通过 TST、SOR、SQR、PDO 被氧化。由于 SOR 和 PDO 催化反应时需要 O₂ 直接参与反应, 这部分电子不参与电子传递链上的能量转化, 因此相比于 Sox 酶系, 经 TST、SOR、SQR、PDO 的硫氧化途径对 S₂O₃²⁻ 提供的电子的利用效率相对更低。然而, SQR 催化 H₂S 氧化生成零价硫的过程伴随着醌的还原, 醌相对于细胞色素 c 具有更低的氧化还原电势, 因此当还原态的氢醌将电子反向传递至 NADH 时能够消耗更少的质子动力势, 而当氢醌正向传递电子用于 O₂ 还原时则提供更多的质子动力势, 这是能量缺乏条件下 TST-SOR-SQR-PDO 途径的优势。

3.2.2 电子传递链

菌株 LS2 在应对低氧环境时, 通过选择性表达具有更高氧亲和度的 *cbb₃* 型细胞色素 c 氧化酶, 以提高酶结合 O₂ 的效率。高氧亲和氧化酶在多种微生物中, 如大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)、海洋硝化螺菌 (*Nitrospira marina*) 等, 已被报道为一种主导的低氧适应策略^[25-27]。然而相比于低氧亲和氧化酶, 高氧亲和氧化酶的 H⁺/e⁻ 通常更低, *cbb₃* 型氧化酶的 H⁺/e⁻ 只有 0.2–0.5^[28-29]。低含氧量限制了 O₂ 与复合体 IV 结合的效率, 同时高氧亲和氧化酶作为质子泵的效率较低, 导致有氧呼吸提供质子动力势的效率受限, F₁F₀ 型 ATP 合酶的下调表达也表明菌株 LS2 在低氧环境中能量转化效率有所降低。

低氧条件下能量转化效率降低导致固碳途径受到限制。在生长实验中, 低氧条件下菌株 LS2 的硫氧化速率和生长速率显著低于常氧组, 但其最大生长量高于常氧培养组, 因此从

低氧培养中的某个时间点的角度, 菌株 LS2 的硫氧化速率降低, 因而维持细胞快速生长的能量不足, 导致固碳速率降低, 表现为固碳途径的表达下调。然而从整个培养周期看, 低氧条件下用于固碳的能量和电子的比例上升, 使得最大生长量高于常氧组。

在不缺乏氮源的情况下, 固氮酶基因 *nifDKH*、Fix 复合体基因 *fixA*、*fixB*、*fixC*、*fixX* 均显著上调表达, 表明固氮也可能是低氧条件下电子去向之一。菌株 LS2 基因组中同时编码了 Rnf 复合体和 Fix 复合体, 但低氧条件下仅有 Fix 复合体的基因被上调表达。Rnf 复合体与 Fix 复合体均能够将 NADH 的电子传递至铁氧还蛋白 (ferredoxin, Fd) 或黄素氧化还原蛋白 (flavodoxin, Fld), Rnf 复合体通过质子动力势驱动该需能反应^[30], 而后者则通过电子分叉驱动, 无需消耗离子的渗透势能或 ATP 就能生成势能更低的还原态 Fd^[31], 这意味着 Fix 复合体对于膜内外的质子浓度梯度的要求较低, 即使在能量缺乏的低氧条件下也能为固氮反应提供还原态 Fd。Alleman 等^[32]的研究表明, 同时编码 Fix 复合体和 Rnf 复合体的瓦恩兰德固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 在低氧的环境中也更适应利用 Fix 复合体驱动生成还原态 Fld。在 N₂、CO₂ 均可作为电子受体维持氧化还原平衡的情况下, 虽然 Fix 复合体能减少部分启动固氮反应所需的能量成本, 但固氮途径所消耗的能量 (2 ATP/e⁻) 仍高于固碳途径所消耗的能量 (0.75 ATP/e⁻), 通过固氮作用维持氧化还原平衡并非是能量最优选择, 因此氮固定可能在低氧环境中存在某种优势, 是菌株低氧适应的关键机制之一。

本研究发现菌株 LS2 在低氧条件下具有较高的硫氧化活性, 并通过转录组学分析揭示其低氧适应机制, 主要依赖于 *cbb₃* 型氧化

酶、SQR、固氮酶。本研究为菌株 LS2 在含硫废水处理的应用及相关工艺的优化提供一定理论基础。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] KRAYZELOVA L, BARTACEK J, DÍAZ I, JEISON D, VOLCKE EIP, JENICEK P. Microaeration for hydrogen sulfide removal during anaerobic treatment: a review[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2015, 14(4): 703-725.
- [2] MAHMOOD Q, ZHENG P, CAI J, HAYAT Y, HASSAN MJ, WU DL, HU BL. Sources of sulfide in waste streams and current biotechnologies for its removal[J]. *Journal of Zhejiang University: Science A*, 2007, 8(7): 1126-1140.
- [3] LIM J, PYUN J, CHAR K. Recent approaches for the direct use of elemental sulfur in the synthesis and processing of advanced materials[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(11): 3249-3258.
- [4] SOUSA FM, PEREIRA JG, MARREIROS BC, PEREIRA MM. Taxonomic distribution, structure/function relationship and metabolic context of the two families of sulfide dehydrogenases: SQR and FCSD[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2018, 1859(9): 742-753.
- [5] WANG TQ, RAN MX, LI XJ, LIU YQ, XIN YF, LIU HL, LIU HW, XIA YZ, XUN LY. The pathway of sulfide oxidation to octasulfur globules in the cytoplasm of aerobic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(3): e0194121.
- [6] WANG R, LIN JQ, LIU XM, PANG X, ZHANG CJ, YANG CL, GAO XY, LIN CM, LI YQ, LI Y, LIN JQ, CHEN LX. Sulfur oxidation in the acidophilic autotrophic *Acidithiobacillus* spp.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9: 3290.
- [7] DAI CM, LI JH, YAN HS, LIN WT, LUO JF. *Halothiobacillus diazotrophicus* sp. nov., a chemolithoautotrophic sulphur-oxidizing and nitrogen-fixing bacterium isolated from freshwater[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2023, 73(12). DOI: 10.1099/ijsem.0.006202.
- [8] WIDDEL F, BAK F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria[M]//BALOWS A, TRÜPER HG, DWORKIN M, HARDER W, SCHLEIFER KH. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. New York, NY: Springer, 1992: 3352-3378.
- [9] KHODURSKY AB, BERNSTEIN JA, PETER BJ, RHODIUS V, WENDISCH VF, ZIMMER DP. *Escherichia coli* spotted double-strand DNA microarrays: RNA extraction, labeling, hybridization, quality control, and data management[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2003, 224: 61-78.
- [10] FEIKE J, JÜRGENS K, HOLLIBAUGH JT, KRÜGER S, JOST G, LABRENZ M. Measuring unbiased metatranscriptomics in suboxic waters of the central Baltic Sea using a new *in situ* fixation system[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(2): 461-470.
- [11] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [12] YOUNG MD, WAKEFIELD MJ, SMYTH GK, OSHLACK A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(2): R14.
- [13] LUO WJ, BROUWER C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(14): 1830-1831.
- [14] NARAYAN KD, SABAT SC, DAS SK. Mechanism of electron transport during thiosulfate oxidation in an obligately mixotrophic bacterium *Thiomonas bhubaneswarensis* strain S10 (DSM 18181^T)[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(3): 1239-1252.
- [15] GLEISNER M, HERBERT RB, FROGNER KOCKUM PC. Pyrite oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* at various concentrations of dissolved oxygen[J]. *Chemical Geology*, 2006, 225(1/2): 16-29.
- [16] YIN HQ, ZHANG X, LI XQ, HE ZL, LIANG YL, GUO X, HU Q, XIAO YH, CONG J, MA LY, NIU JJ, LIU XD. Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfur oxidation in the extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 179.

- [17] BODEN R. Reclassification of *Halothiobacillus hydrothermalis* and *Halothiobacillus halophilus* to *Guyparkeria* gen. nov. in the *Thioalkalibacteraceae* fam. nov., with emended descriptions of the genus *Halothiobacillus* and family *Halothiobacillaceae*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(10): 3919-3928.
- [18] BELLER HR, CHAIN PSG, LETAIN TE, CHAKICHERLA A, LARIMER FW, RICHARDSON PM, COLEMAN MA, WOOD AP, KELLY DP. The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(4): 1473-1488.
- [19] van den ENDE FP, van GEMERDEN H. Sulfide oxidation under oxygen limitation by a *thiobacillus thioparus* isolated from a marine microbial mat[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1993, 13(1): 69-77.
- [20] VIKROMVARASIRI N, CHAMPREDA V, BOONYAWANICH S, PISUTPAISAL N. Hydrogen sulfide removal from biogas by biotrickling filter inoculated with *Halothiobacillus neapolitanus*[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2017, 42(29): 18425-18433.
- [21] 张宏, 李颖杰, 王文颖, 王禄山. 微生物硫循环网络的研究进展[J]. *微生物学报*, 2021, 61(6): 1567-1581. ZHANG H, LI YJ, WANG WY, WANG LS. Research progress of the microbial sulfur-cycling network[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(6): 1567-1581 (in Chinese).
- [22] ZHANG L, QIU YY, ZHOU Y, CHEN GH, van LOOSDRECHT MCM, JIANG F. Elemental sulfur as electron donor and/or acceptor: mechanisms, applications and perspectives for biological water and wastewater treatment[J]. *Water Research*, 2021, 202: 117373.
- [23] FRIGAARD NU, DAHL C. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2008, 54: 103-200.
- [24] 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(6): 999-1043.
- [25] SPIRO S, GUEST JR. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1991, 16(8): 310-314.
- [26] SWEM DL, BAUER CE. Coordination of ubiquinol oxidase and cytochrome *cbb₃* oxidase expression by multiple regulators in *Rhodobacter capsulatus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(10): 2815-2820.
- [27] BAYER B, SAITO MA, McILVIN MR, LÜCKER S, MORAN DM, LANKIEWICZ TS, DUPONT CL, SANTORO AE. Metabolic versatility of the nitrite-oxidizing bacterium *Nitrospira marina* and its proteomic response to oxygen-limited conditions[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(4): 1025-1039.
- [28] PITCHER RS, WATMOUGH NJ. The bacterial cytochrome *cbb₃* oxidases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2004, 1655: 388-399.
- [29] LYONS JA, HILBERS F, CAFFREY M. Structure and function of bacterial cytochrome *c* oxidases[M]//CRAMER WA, KALLAS T, eds. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016: 307-329.
- [30] KUHNS M, TRIFUNOVIĆ D, HUBER H, MÜLLER V. The Rnf complex is a Na⁺ coupled respiratory enzyme in a fermenting bacterium, *Thermotoga maritima*[J]. *Communications Biology*, 2020, 3(1): 431.
- [31] LEDBETTER RN, GARCIA COSTAS AM, LUBNER CE, MULDER DW, TOKMINA-LUKASZEWSKA M, ARTZ JH, PATTERSON A, MAGNUSON TS, JAY ZJ, DUAN HD, MILLER J, PLUNKETT MH, HOBEN JP, BARNEY BM, CARLSON RP, MILLER AF, BOTHNER B, KING PW, PETERS JW, SEEFELDT LC. The electron bifurcating FixABCX protein complex from *Azotobacter vinelandii*: generation of low-potential reducing equivalents for nitrogenase catalysis[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(32): 4177-4190.
- [32] ALLEMAN AB, GARCIA COSTAS A, MUS F, PETERS JW. Rnf and fix have specific roles during aerobic nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(17): e0104922.