



## 海水养殖生境中硫酸盐还原菌活性的抑制机制

赵栩宁<sup>1</sup>, 马冬雪<sup>1</sup>, 赵阳国<sup>1,2\*</sup>

1 中国海洋大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100

2 中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100

赵栩宁, 马冬雪, 赵阳国. 海水养殖生境中硫酸盐还原菌活性的抑制机制. 微生物学报, 2022, 62(8): 3048–3061.

Zhao Xuning, Ma Dongxue, Zhao Yangguo. Sulfide-producing activity inhibition of sulfate-reducing bacteria in mariculture. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(8): 3048–3061.

**摘要:**【目的】海水养殖生境中的硫化物( $H_2S$ )严重损害养殖生物健康, 控制该条件下硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)的代谢活性是有效抑制  $H_2S$  产生的重要途径。【方法】本研究利用稀释涂布-叠皿夹法对海水养殖生境底泥中 SRB 进行富集筛选, 获得 SRB 菌株, 通过投加硝酸盐对菌株产  $H_2S$  的活性进行抑制。【结果】获得的 2 株 SRB *Desulfovibrio* sp. NY-1 和 *Clostridium* sp. NH-1, 能够在 35 °C、pH 为 7.0 及盐度为 20–30 mg/L 条件下, 分别积累高达 435 和 150 mg/L  $H_2S$ 。硝酸盐不能有效抑制 NY-1 产  $H_2S$  的活性, 基因调控作用以及缺乏将硝酸盐作为电子受体的酶体系是其不能被抑制的主要原因。硝酸盐对 NH-1  $H_2S$  产生活性有可逆性抑制, 其具有硝酸盐异化还原成铵(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)的能力, 优先利用硝酸盐作为电子受体。DNRA 作用下的中间代谢产物亚硝酸盐是有效抑制菌株 NH-1 产  $H_2S$  活性的主要原因, 其抑制机理主要为抑制菌株的生长繁殖。【结论】硝酸盐对不同 SRB 菌株具有不同的抑制机制和效果, 在进行硫化物污染控制前需要对产生硫化物的 SRB 菌群进行分析判别。

**关键词:** 硫酸盐还原菌; *Desulfovibrio* 属; *Clostridium* 属; 硝酸盐; 海水养殖

基金项目: 国家自然科学基金(4197070324)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (4197070324)

\*Corresponding author. E-mail: ygzha@ouc.edu.cn

Received: 30 November 2021; Revised: 30 January 2022; Published online: 23 February 2022

# Sulfide-producing activity inhibition of sulfate-reducing bacteria in mariculture

ZHAO Xuning<sup>1</sup>, MA Dongxue<sup>1</sup>, ZHAO Yangguo<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, China

**Abstract:** [Objective] Sulphide (H<sub>2</sub>S) in mariculture seriously damages the health of cultured organisms. Controlling the metabolic activity of sulfate-reducing bacteria (SRB) in mariculture is an effective way to inhibit H<sub>2</sub>S production. [Methods] In this study, SRB strains were enriched and isolated from the mariculture sediments via dilution coating-repeat dish sandwich cultivation method. The H<sub>2</sub>S activity was inhibited by adding nitrate. [Results] Two SRB strains *Desulfovibrio* sp. NY-1 and *Clostridium* sp. NH-1 were isolated, which respectively accumulated up to 435 and 150 mg/L H<sub>2</sub>S at 35 °C, pH 7.0, and salinity of 20–30 mg/L. The H<sub>2</sub>S activity of NY-1 was not effectively inhibited by nitrate, which was related to the gene regulation and the lack of the enzyme system using nitrate as the electron acceptor. Nitrate reversibly inhibited the H<sub>2</sub>S activity of NH-1 which had the ability of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) and preferentially used nitrate as the electron acceptor. Nitrite, the intermediate metabolite of DNRA, was the main factor for inhibiting the H<sub>2</sub>S production activity of NH-1 since it can inhibit the growth and reproduction of the strain. [Conclusion] The inhibition mechanisms and effects of nitrate vary among different SRB strains. Before controlling sulfide pollution, we need to analyze and distinguish the sulfide-producing bacteria.

**Keywords:** sulfate-reducing bacteria; *Desulfovibrio*; *Clostridium*; nitrate; mariculture

硫酸盐还原菌(sulfate reducing bacterium, SRB)是能够利用硫酸盐为电子受体进行代谢产生硫化物的多种微生物类群的统称, *dsrB* 基因(编码亚硫酸还原酶 β 亚基)是硫酸盐还原菌共有的基因<sup>[1]</sup>。16S rRNA 基因比对分析结果显示,该类群分属于 *Deltaproteobacteria*、*Clostridia* 和 *Thermodesulfobacteria* 等 7 个进化分支, 5 个进化支为细菌域, 2 个进化支为古菌域<sup>[2]</sup>。在油藏和沉积物等多种厌/缺氧环境下, SRB 在硫元素的生物地球化学循环中发挥着不可替代作用<sup>[3]</sup>。有研究表明, SRB 是海洋中硫化物的主要来源, 绝大多数硫化物源于 SRB 对硫酸盐的还原代谢作用, 仅有不到 3%的硫化物来源于

有机硫的矿化作用<sup>[4]</sup>。在海水养殖生境中, SRB 能够在一定条件下产生大量的硫化物并向水体扩散,使之成为海水养殖生态系统中危害程度仅次于氨氮的污染物质。通过对我国胶州湾东北、西北部部分站位表层沉积物中溶解性硫化物进行检测, 其浓度最高可达 740 mg/kg<sup>[5]</sup>。Reese 等<sup>[6]</sup>对美国加州索尔顿咸水湖沉积物孔隙水中的硫化物进行检测, 其浓度达到了 179 mg/L。在产生的硫化物中, 有 99%的溶解性硫化物(包含 H<sub>2</sub>S、HS<sup>-</sup>和 S<sup>2-</sup>)将不断向周围介质扩散迁移, 破坏生物肠道微生物结构或直接对养殖生物产生毒性效应, 导致大量鱼类死亡<sup>[7]</sup>。据报道, 日本对虾幼体在不同发育期可忍受的 H<sub>2</sub>S 浓度

小于 0.07 mg/L<sup>[7]</sup>。如硫化物浓度超过 100 mg/kg 这一限度甚至更高时, 文蛤死亡率将高达 50%–80%<sup>[8]</sup>。鲑鱼在硫化物浓度为 7.8 μmol/L 的环境条件下培养 10 周后, 其肝损伤情况已经较为严重, 当培养 18 周左右时, 直接造成鲑鱼的大量死亡<sup>[9]</sup>。我国规定, 养殖沉积物中硫化物的浓度应该低于 300 mg/kg (GB18668—2002), 而养殖水体中硫化氢的浓度应该小于 0.2 mg/L (GB11607—1989)。然而, 大部分养殖环境条件下硫化物的含量已经远远超过这一标准, 这对于海水养殖长远发展而言非常不利。因此, 为了有效防止海水养殖生境进一步恶化, 须采取有效措施控制生境中的硫化物产生。

在海水养殖系统中, 硝酸盐氮相较于亚硝酸盐氮和硫化物等其他污染物毒性较小<sup>[10]</sup>。用于饲养海水鱼的海水硝酸盐标准应为硝酸盐 < 50 mg/L<sup>[11]</sup>。研究表明, 当硝酸盐浓度积累至 75 mg/L 以上时会影响养殖动物的生长<sup>[12]</sup>。研究证实, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>可以促进异养反硝化菌的活性, 大大提高其与 SRB 竞争电子供体(碳源)的能力, 同时提高系统的氧化还原电位, 进而可以实现抑制 SRB 产 H<sub>2</sub>S 活性的目的<sup>[13]</sup>。随着硝酸盐浓度的增加, 其对 SRB 的抑制效果愈发明显<sup>[14]</sup>。可见, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>抑制 SRB 活性具有很好的理论基础。海水养殖生境中, 投加的饲料以及生物代谢粪便等导致氮元素的大量富集<sup>[15]</sup>。受海水养殖业发展影响, 我国每年产生的总氮含量为 2.94 × 10<sup>5</sup> t, 其中人工饲养的生物(如鱼类、甲壳类动物)排放的总氮占 3.9 × 10<sup>4</sup> t<sup>[16]</sup>。与 20 世纪 60 年代相比, 我国莱州湾地区无机氮污染浓度增加近 40 倍<sup>[17]</sup>。可见, 在海水养殖环境中, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>普遍存在且浓度较高。然而, 如何充分利用海水中的硝酸盐抑制 SRB 活性, 以及硝酸盐对不同种属 SRB 菌株是否均存在很强的抑制效果仍需要进一步证实。

因此, 本文以某海水养殖场底泥为对象, 富集筛选 SRB 菌株, 探究菌株生理特性及产 H<sub>2</sub>S 活性差异。通过投加不同浓度的硝酸盐对菌株进行产 H<sub>2</sub>S 的活性抑制, 研究硝酸盐对不同菌株的抑制作用规律, 为海水养殖生境中硫化物的控制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 硫酸盐还原菌的筛选

取青岛某海水养殖场沉积物为对象, 进行硫酸盐还原菌群的富集。富集及菌株分离应用以乳酸钠为碳源的 Starkey 培养基, 其成分如下 (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5; NH<sub>4</sub>Cl 1.0; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5; 65%乳酸钠 5.0; CaCl<sub>2</sub> 0.076; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5; 抗败血酸 0.1; 酵母粉 1.0, 调节培养基 pH 为 7.0–8.0, 添加 30 g/L 的 NaCl 以模拟海水盐度。其中, 还原剂 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 和抗败血酸分别采用孔径为 0.22 μm 滤膜过滤除菌。将配制好的液体培养基分装至密闭的血清瓶中, 每瓶血清瓶中装 50 mL 培养基, 通入高纯 N<sub>2</sub> 3 min, 随后进行 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。待培养基冷却至室温, 按比例加入灭菌的还原剂。

在厌氧条件下, 每瓶培养基中装入 50 g 沉积物, 然后将血清瓶置于 35 °C 恒温培养箱(珠江 LRH-300-G)中避光静置培养。待上层液体培养基变黑且有臭鸡蛋气味时, 用无菌注射器按照体积比 1%接种富集后的上层菌液于新鲜液体培养基中, 放置于 35 °C 恒温培养箱中避光静置培养。如此重复 3 次, 得到富集的 SRB 菌群。

采用无菌注射器吸取 5 mL SRB 富集产物至 95 mL Starkey 液体培养基中, 然后将血清瓶置于 35 °C 恒温培养箱中避光静置培养。待上层液体培养基变黑且有臭鸡蛋气味时, 在厌氧

条件下, 取 200  $\mu\text{L}$  菌液采用稀释涂布-叠皿夹法进行纯菌株的筛选。将涂布后的平板倒置, 于 35  $^{\circ}\text{C}$  条件下静置培养。待琼脂平板表面生长出肉眼可见且特征明显的黑色单菌落后, 用无菌手术刀切下单菌落, 不碰触其余菌落, 接种到新的液体培养基中, 置于 35  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中避光静置培养。重复 3 次, 得到 SRB 纯菌株。

## 1.2 菌株鉴定

通过扫描电镜(SEM) (蔡司 Gemini300)观察 SRB 纯菌株细胞形态, 样品的制备及电镜扫描方法参考文献[18]。革兰氏染色和芽孢染色后在光学显微镜下观察。

将纯化后的菌株在液体培养基中培养至对数期后进行 PCR 扩增(Bioer TC-96/G/H(b))。扩增引物为细菌 16S rRNA 基因通用引物, 上游引物(27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 下游引物(1492R): 5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3', 各 2  $\mu\text{L}$ , 菌液 2  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ Hieff PCR Master Mix 25  $\mu\text{L}$ , 灭菌超纯水 19  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min 预变性; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s 变性, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s 退火, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s 延伸, 重复 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min 终延伸。

16S rRNA 基因序列分析: 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 通过凝胶成像系统检测到条带相互独立、片段大小在正确范围后, 送至派森诺生物科技有限公司采用相关引物测序。测序结果拼接后, 到 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 以确定菌株的种属信息。根据细菌种属信息, 下载该属标准菌株的 16S rRNA 基因序列, 并利用 Mega 4.0 软件利用邻位加入法(neighbor-joining)进行进化树分析, 确定菌株的分类位置, bootstrap 的值设置为 1 000。

## 1.3 菌株生长特性研究

取对数期纯菌液, 用无菌注射器接种于新

鲜 Starkey 液体培养基中。考察菌株在不同环境条件下的生长特性, 控制单一变量, 分别设置不同温度(25、35、45、55  $^{\circ}\text{C}$ )、初始 pH 值(6.0、7.0、8.0、9.0)、盐度(20、30、40、50 g/L)及接种量(0.5%、1.5%、2.5%、3.5%), 定期取样检测菌液浓度( $OD_{600}$ )。

## 1.4 硝酸盐抑制实验

制备新鲜液体培养基, 加入硝酸钠, 使  $\text{NO}_3^-$  的浓度分别为 1、3、5、7 mmol/L。取对数期 SRB 菌液 4 000 $\times g$  离心 20 min, 弃去上清, 加入等体积的新鲜液体培养基, 重悬菌体。按照体积比 0.5% 将菌液加入到含硝酸钠的新鲜培养基中, 置于 35  $^{\circ}\text{C}$  条件下避光静置培养, 定期取样测定菌液浓度( $OD_{600}$ )及  $\text{H}_2\text{S}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NH}_4^+$  浓度。设未加硝酸盐对照组, 每个处理设置 3 个重复。取  $\text{NO}_3^-$  投加量为 3 mmol/L 抑制组, 分别在第 1 天及第 5 天进行 DNA 的提取, 测定 *dsrB* 基因的丰度及其表达量。

## 1.5 化学分析

采用分光光度法测定  $OD_{600}$  的浓度。样品中  $\text{H}_2\text{S}$  浓度的测定依照亚甲基蓝分光光度法完成<sup>[19]</sup>。准确吸取 9 mL 吸收液及 1 mL 待测样品于 50 mL 比色管中, 盖盖摇匀, 加入 1 mL 对氨基二甲基苯胺使用液和 1-2 滴  $\text{FeCl}_3$  溶液、1-2 滴  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  溶液(以排除  $\text{Fe}^{2+}$  影响), 盖盖摇匀, 避光静置 20-30 min。以相同处理的蒸馏水作为空白对照, 在 665 nm 处测定吸光度, 最后依据标准曲线计算样品中的  $\text{S}^{2-}$  浓度。 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NH}_4^+$  的测定参考文献[20]的方法。 $\text{NH}_4^+$ -N 采用纳氏试剂分光光度法,  $\text{NO}_2^-$ -N 采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法,  $\text{NO}_3^-$ -N 采用紫外分光光度法。使用离子色谱(ICS-2100) (Dionex Sunnyvale CA)测定  $\text{SO}_4^{2-}$  的浓度。pH 的测定使用精密 pH 计(上海雷磁 E-201-C)。

## 1.6 *dsrB* 基因的表达分析

采用 DNA 提取试剂盒(Mobio)提取硝酸盐抑制前、后的 SRB 菌液样品 DNA。采用 Uniq-10 total RNA 提取试剂盒(Sangon Biotech)提取细菌总 RNA。使用反转录试剂盒(TaKaRa RR036A)合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增。

应用 qPCR 技术对样品中的 *dsrB* 基因丰度及表达量进行表征, 扩增体系为: 引物 DSR-p2060F (5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3')和 DSR-4R (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3')<sup>[21-22]</sup>各 1  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L, TB Green 12.5  $\mu$ L, 灭菌后超纯水 8.5  $\mu$ L。扩增程序为两步法 PCR 扩增标准程序: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 重复 40 个循环。以克隆有 *dsrB* 基因片段的质粒作为标准品, 进行荧光定量 PCR 反应(BIO-RAD CFX96), 绘制 *dsrB* 基因定量标准曲线。对 cDNA 样品进行定量 PCR 检测, 反应体系和程序均与建立标准曲线过程中使用的反应体系和程序一致。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SRB 菌株的分离与鉴定

SRB 富集菌液经稀释涂布-叠皿夹分离培养后, 共得到 15 株纯菌株。所有单菌落形状相似, 均为球状, 嵌于培养基内。SRB 代谢  $\text{SO}_4^{2-}$  生成  $\text{H}_2\text{S}$ , 培养基中所含的  $\text{Fe}^{2+}$  与  $\text{H}_2\text{S}$  结合产生  $\text{FeS}$  沉淀, 使得菌落呈现黑色。

通过对 15 株纯菌株进行 16S rRNA 基因序列分析, 测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对。15 株纯菌株中有 13 株与 *Desulfovibrio salexigens* DSM 2638 相似度大于 99%, 可以认为是同种菌株, 命名为 *Desulfovibrio* sp. NY-1, 其 16S rRNA 基因序列提交 NMDC 获得正式

编号 NMDCN0000R24, 革兰氏反应为阴性, 无芽孢; 2 株菌株与 *Clostridium* sp. R1 相似度大于 99%, 可以认为是同种菌株, 命名为 *Clostridium* sp. NH-1, 其 16S rRNA 基因序列提交 NMDC 获得正式编号 NMDCN0000R25, 革兰氏反应为阳性。菌株 NY-1 及 NH-1 的系统发育树如图 1 所示。根据扫描电镜(图 2)观察显示, 2 株 SRB 纯菌株细胞形态差异性较大, NY-1 呈弧状, 而 NH-1 呈短杆状, 表面相对粗糙。

### 2.2 菌株生长特性

菌株 NY-1 及 NH-1 在不同温度下的生长活性差异显著。如图 3A、3E 所示, 当 T 为 45 和 55  $^{\circ}$ C 时, 2 株菌均未出现明显生长, 表明高温不利于其生长。有研究表明, 37  $^{\circ}$ C 是 SRB 最适宜生长的温度<sup>[23]</sup>。与此结果相似, 本研究中 35  $^{\circ}$ C 是最利于菌株生长的温度, 结合图 3A 和 3E, 在此条件下, 菌株 NY-1 数量在 16 h 左右达最大值, 而菌株 NH-1 在 40 h 左右达丰度最大值, 并且两株菌的丰度最大值差异明显, 菌株 NY-1 明显多于 NH-1。

pH 是影响微生物生长的重要因子, 绝大多数细菌适宜在中性偏碱环境下生长<sup>[24]</sup>。考虑到实际海水养殖环境, 梯度设置 pH 值为 6.0、7.0、8.0 和 9.0。菌株 NY-1 适宜生长的 pH 范围较广, 当 pH 值为 6.0–8.0 时, 16 h 左右  $OD_{600}$  即可达到最大值。当 pH 为 9 时, 菌株迟缓期较长, 在 25 h 后出现了明显的增长, 40 h 时瓶内菌液已经变黑, 并含有臭鸡蛋气味。菌株 NY-1 最适宜的 pH 值为 7.0,  $OD_{600}$  最值可达 1.652。菌株 NH-1 适应的 pH 范围相对较窄, 当 pH 值为 6.0 和 9.0 时, 50 h 内未出现明显增长, 菌液较为澄清, 无明显气味。当 pH 值为 7.0 和 8.0 时,  $OD_{600}$  在 40 h 左右达最大值 1.140。

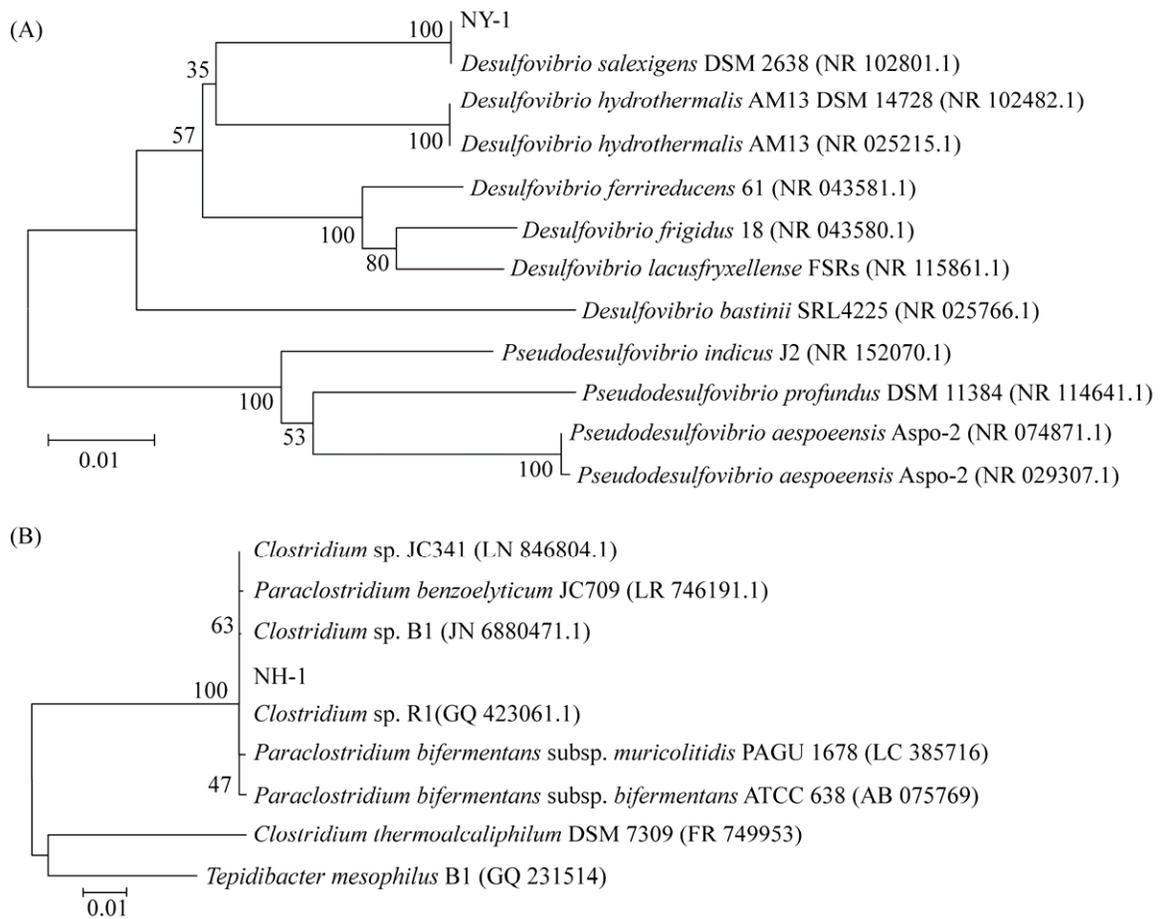


图 1 基于 16S rRNA 基因的菌株 NY-1 (A)及 NH-1 (B)系统发育树

Figure 1 Phylogenetic trees of strains NY-1 (A) and NH-1 (B) based on 16S rRNA gene. The tree rooted was constructed by neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 1 000 resampling. The numbers at each node indicate the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets after each bacterial name are 16S rRNA gene sequence accession numbers in GenBank. Bar, 1% sequence divergence.

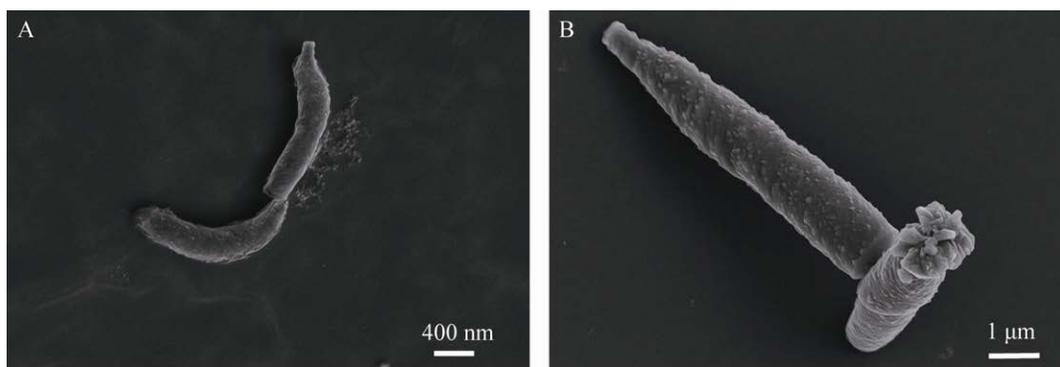


图 2 菌株 NY-1 (A)及 NH-1 (B)的扫描电镜图

Figure 2 SEM images of strains NY-1 and NH-1. A: NY-1; B: NH-1.

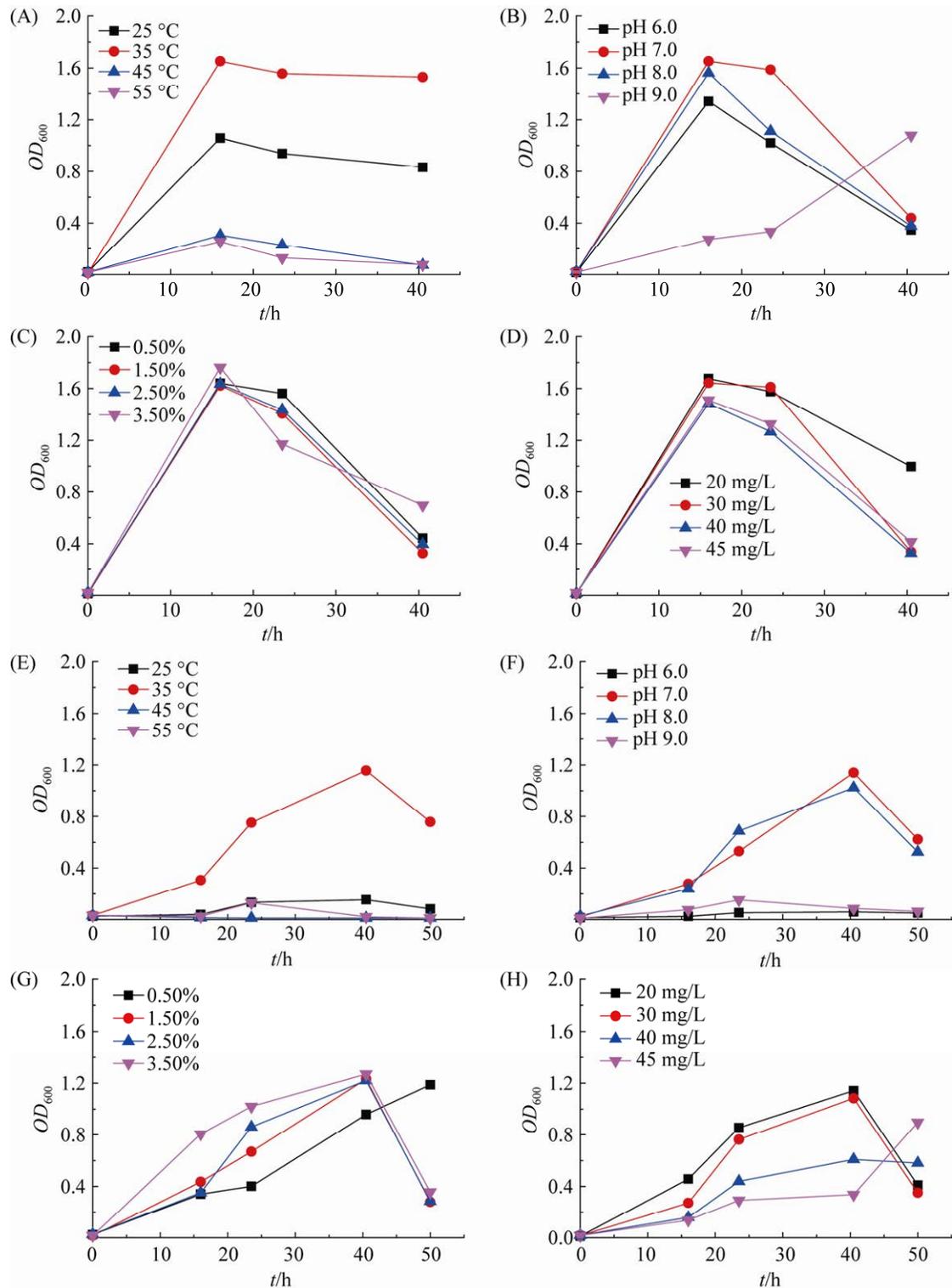


图3 温度、pH、接种量及盐度对菌株 NY-1 (A-D)和 NH-1 (E-H)生长活性的影响

Figure 3 Effects of temperature, pH, inoculation ratio and salinity on the growth activities of strains NY-1 (A-D) and NH-1 (E-H). A, E: temperature; B, F: pH; C, G: inoculation ratio; D, H: salinity. Data are shown as the mean of three replicates.

相较于温度和 pH, 菌株生长活性受接种量及盐度影响相对较小。根据图 3C、3D、3G、3H, 在不同接种量及盐度范围下, 2 株菌均有一定的生长。当接种量为 0.5% 时, 其生长曲线与 3.5% 相似; 当盐度值在 20 和 30 mg/L 时, 其生长曲线也呈现相似规律。

菌株 NY-1 与 NH-1 的最佳生长条件相似, 即  $T$  为 35 °C、pH 为 7.0–8.0、接种量为 0.5%、盐度为 20–30 mg/L。然而, 2 株菌株在相同生长条件下的生长差异较为明显。菌株 NY-1 增殖速率较快, 在 16 h 左右  $OD_{600}$  即可达到最大值, 而菌株 NH-1 在 40 h 左右数量才达峰值, 且 2 株菌  $OD_{600}$  最大值相差 0.4 左右。

考虑到海水养殖生境, 确定最终培养条件:  $T$  为 35 °C、pH 为 8.0、接种量为 0.5%、盐度为 30 mg/L。在此最优生长条件培养下, 2 株菌产  $H_2S$  的活性也出现显著差异。如图 4 所示, 菌株 NY-1 产  $H_2S$  活性更强, 在 16 h 左右开始,  $H_2S$  产量快速增加, 在 40 h 时, 培养基中  $H_2S$  积累浓度可达 435 mg/L。菌株 NH-1 产  $H_2S$  活性相对较弱, 在相同时间内, 培养基中  $H_2S$  积累浓度仅为 150 mg/L 左右。陈亚文等<sup>[25]</sup>曾在水口水库淡水及象山港海水水体富集样品中检测出 SRB, 且 *Desulfovibrio* 属相对丰度占比较高。杨春璐等<sup>[18]</sup>在渤海湾某高温油田采出水中分离筛选出 1 株耐高温、耐盐的 SRB 菌株, 经鉴定为 *Desulfovibrio* 属, 在最佳生长条件下, 其可利用硫酸盐为电子受体产生 150 mg/L 的  $H_2S$ 。有研究曾在黑臭河道水体中检测出 *Clostridium* 属, 浓度约 20 000 cell/mL 以上, 占比 64.09%, 为黑臭核心微生物种<sup>[26]</sup>。付坤等<sup>[27]</sup>从煤化工废水中分离出 *Clostridium* 属菌株, 当  $SO_4^{2-}$  浓度为 1 360 mg/L 时, 其能将 95% 的  $SO_4^{2-}$  转化为硫化物。由于菌株筛选来源不同, 本研究中所筛选的 *Desulfovibrio* 属纯菌株 NY-1 代谢产  $H_2S$  更

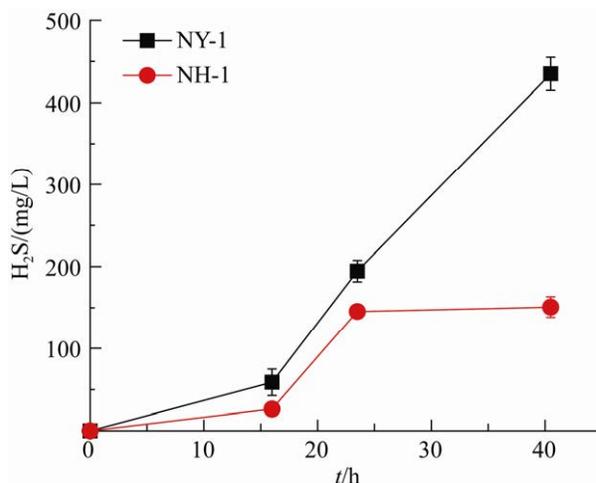


图 4 菌株 NY-1 和 NH-1 产  $H_2S$  活性  
Figure 4  $H_2S$  production activity of strains NY-1 and NH-1. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing  $\pm$ standard error.

强, 而 *Clostridium* 属菌株 NH-1 产  $H_2S$  活性相对较弱。

### 2.3 硝酸盐对菌株产 $H_2S$ 活性的影响

设置  $NO_3^-$  的投加浓度为 1、3、5、7 mmol/L, 探讨不同浓度的  $NO_3^-$  对不同菌株产  $H_2S$  活性的抑制作用。结果表明, 不同菌株对硝酸钠的耐受性呈显著差异。如图 5A、5D 所示, 当硝酸盐与硫酸盐同时存在时, 菌株 NY-1 只利用硫酸盐进行生理代谢活动, 并产生一定浓度的  $H_2S$ , 培养基中硝酸盐含量不变。与空白对照组相比, 投加硝酸盐抑制后生长曲线及代谢  $SO_4^{2-}$  产  $H_2S$  趋势也无明显变化。可见, 菌株 NY-1 能在富含硝酸盐环境下生存, 其生理代谢活性不受硝酸盐抑制。有研究曾利用硝酸盐对 *Desulfovibrio* 属纯菌株进行抑制, 结果显示硝酸盐对菌株产  $H_2S$  活性无明显抑制效果<sup>[18]</sup>, 这一结论与本研究结果一致。Haveman 等<sup>[28]</sup>曾利用普通脱硫弧菌 (*Desulfovibrio vulgaris*) 进行研究, 结果证实其缺乏将硝酸盐作为电子受体或者氮源的酶体系, 因此不能利用硝酸盐。在此基础上, 吴波<sup>[29]</sup>

进一步研究证实,该菌株对硝酸盐存在较强的适应机制,这一适应机制受多方面的调控机制组成,其中发挥主要作用的是趋化蛋白基因 *cheB* 以及与其互作的基因(*DVU3022*、*DVU1862* 以及 *DVU2394–DVU2396* 基因簇)、硝酸盐适应基因簇(*DVU0251–0245*)和应对亚硝酸应激的 Crp 全局转录因子(*DVU2547*) HcpR 以及其调控的基因。因此,基因调控作用以及自身缺乏将硝酸盐作为电子受体的酶体系是导致硝酸盐无法有效抑制 *Desulfovibrio* 属菌株产  $H_2S$  活性的重要因素。在海水养殖生境中,针对 *Desulfovibrio* 属,可利用铁盐控制硫化物的产生及扩散<sup>[30]</sup>。张玲等<sup>[31]</sup>通过以污水处理厂初沉污泥和生物污泥为研究对象,投加  $FeCl_3$  来抑制硫酸盐还原菌

的活性,结果表明当  $FeCl_3$  的投加量为 150 mg/L 时,硫酸盐还原菌还原  $SO_4^{2-}$  的能力明显降低,产生的  $H_2S$  含量可降至 0。苗宗成等<sup>[32]</sup>应用高铁酸钾( $K_2FeO_4$ )对养殖废水处理净化的研究结果表明,高铁酸钾对养殖废水中菌落总数和硫化物的去除效果良好,当  $K_2FeO_4$  使用量为 8 mg/L 时,菌落总数及硫化物的去除率分别为 98.80%和 98.78%。Sun 等<sup>[33]</sup>应用颗粒氢氧化铁、颗粒氧化铁以及生锈的碎铁屑对水溶液中的硫化物进行去除,结果表明在控制沉积物水界面中的硫化物时,颗粒氢氧化铁对硫化物的去除量可达  $(92.0\pm 4.2)$  mg/g,是在水溶液中的 3 倍以上,少量的铁氧化物便可在较长时间内将硫化物控制在较低水平。

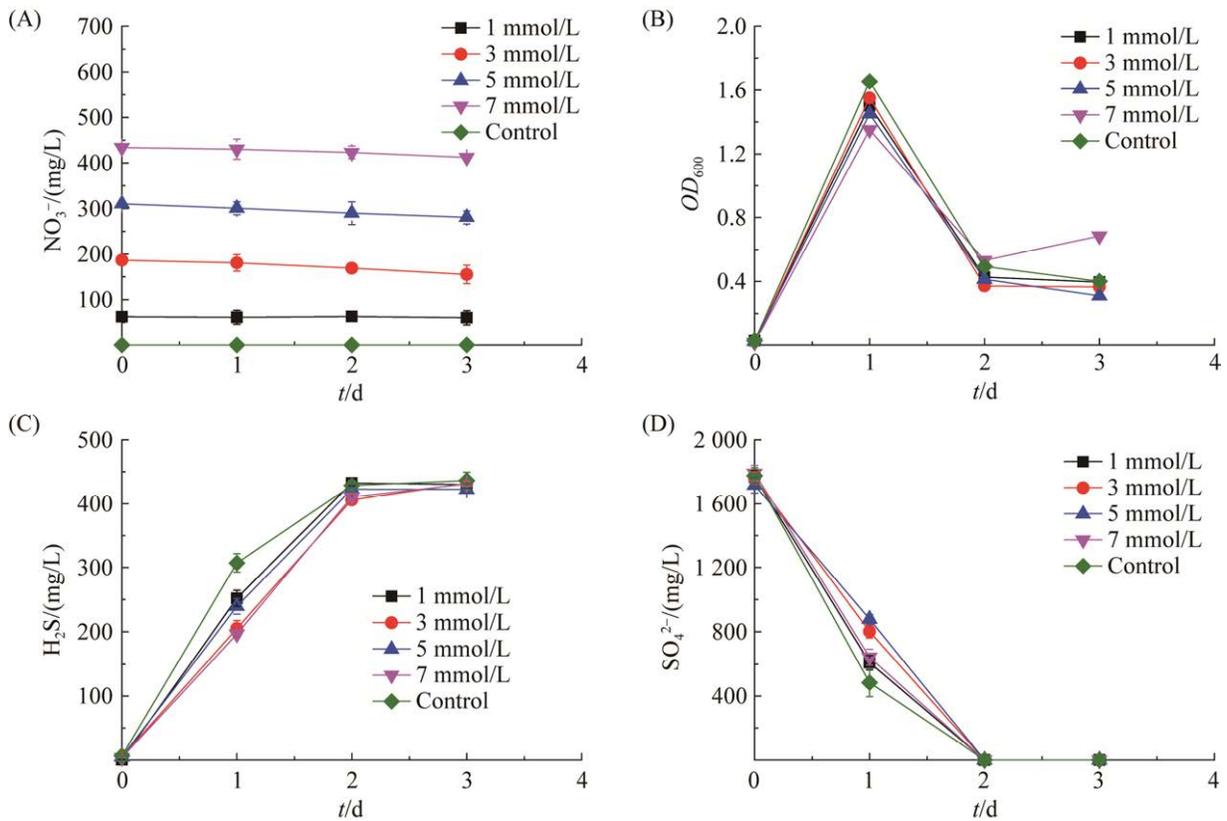


图 5 添加硝酸盐对菌株 NY-1 产  $H_2S$  活性影响

Figure 5  $H_2S$  production activity inhibition of strain NY-1 by dosing nitrate. A:  $NO_3^-$ ; B:  $OD_{600}$ ; C:  $H_2S$ ; D:  $SO_4^{2-}$ . Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing  $\pm$ standard error.

与菌株 NY-1 不同, 硝酸盐的投加对菌株 NH-1 产  $\text{H}_2\text{S}$  活性体现出较强的抑制作用。当硝酸盐与硫酸根同时存在时, 菌株 NH-1 优先利用硝酸盐作为电子受体进行生理代谢活动。如图 6 所示, 菌株 NH-1 具有将硝酸盐异化还原成铵(dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)的能力。DNRA 过程可分为 2 个阶段: 第一阶段是异化硝酸还原酶(nitrate reductase, Na R)将  $\text{NO}_3^-$  还原成  $\text{NO}_2^-$ <sup>[34]</sup>, 第二阶段是亚硝酸还原酶(nitrite reductase, Ni R)将  $\text{NO}_2^-$  还原成  $\text{NH}_4^+$ <sup>[35]</sup>。本研究中, 在菌株 NH-1 的作用下,

不同浓度的硝酸盐在 1 d 内能被转换成亚硝酸盐以及氨氮, 且亚硝酸盐浓度的降低伴随着氨氮浓度的升高。亚硝酸盐存在时, 培养基中菌株 NH-1 的数量、 $\text{SO}_4^{2-}$  以及  $\text{H}_2\text{S}$  浓度均无明显提高; 而亚硝酸盐全部转换为氨氮时, 菌株数量显著提高, 并能利用  $\text{SO}_4^{2-}$  产生一定浓度的  $\text{H}_2\text{S}$  积累。亚硝酸盐浓度越高, 对菌株 NH-1 产  $\text{H}_2\text{S}$  活性抑制时间越长。可见, DNRA 作用下的中间代谢产物亚硝酸盐对细菌的毒性作用是有效抑制菌株 NH-1 产  $\text{H}_2\text{S}$  活性的主要原因, 其存在的时长直接影响着抑制作用时效。

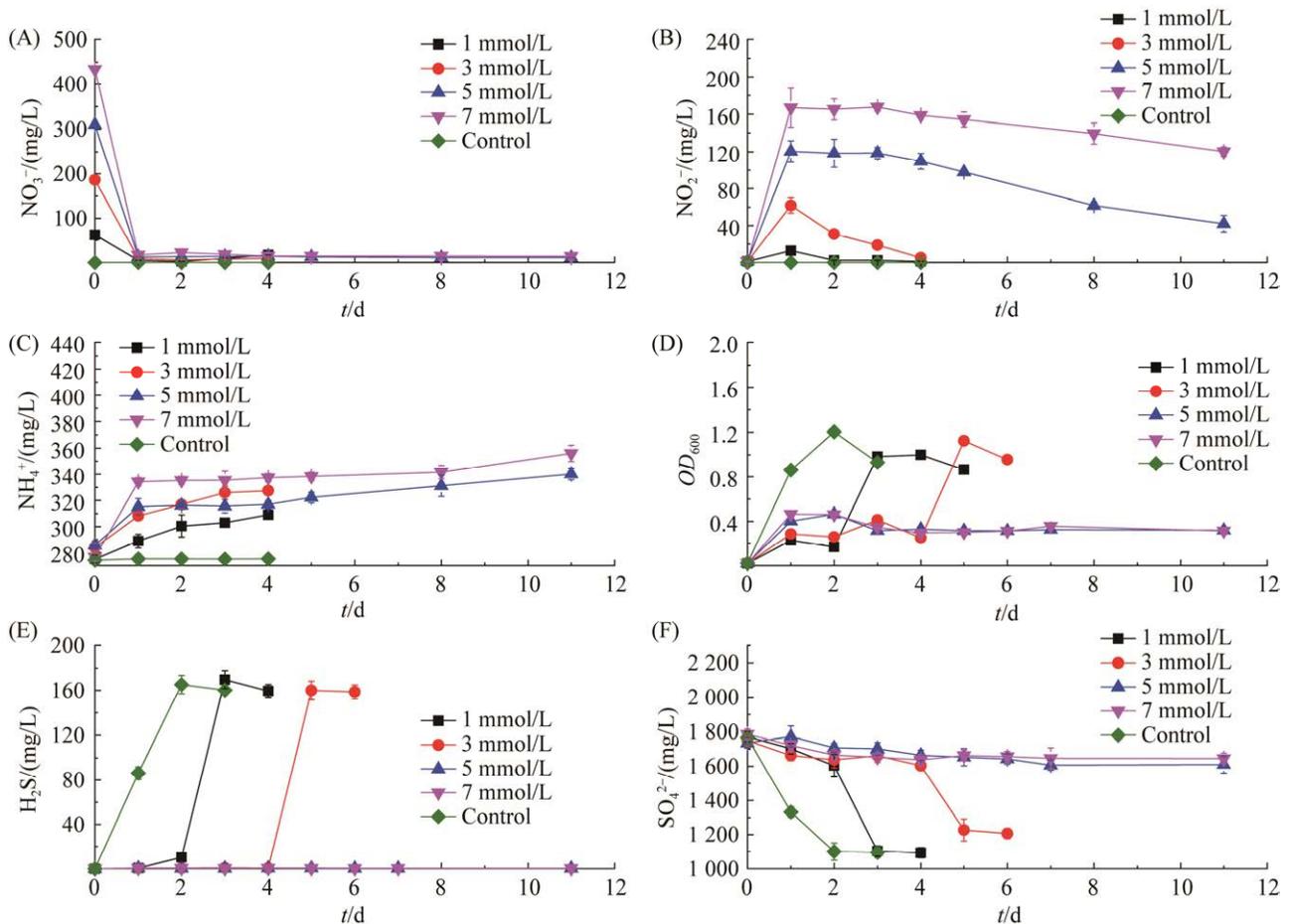


图 6 添加硝酸盐对菌株 NH-1 产  $\text{H}_2\text{S}$  活性影响

Figure 6  $\text{H}_2\text{S}$  production activity inhibition of strain NH-1 by dosing nitrate. A:  $\text{NO}_3^-$ ; B:  $\text{NO}_2^-$ ; C:  $\text{NH}_4^+$ ; D:  $OD_{600}$ ; E:  $\text{H}_2\text{S}$ ; F:  $\text{SO}_4^{2-}$ . Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing  $\pm$ standard error.

与空白对照组相比,当硝酸盐投加量为 1 和 3 mmol/L 时,抑制时长增加 2–4 d。当培养基中亚硝酸盐全部消耗时,菌株 NH-1 即可恢复硫酸盐还原活性,利用  $\text{SO}_4^{2-}$  转化为  $\text{H}_2\text{S}$ 。如图 6E–F 所示,当硝酸盐投加量为 3 mmol/L 时,体系中  $\text{SO}_4^{2-}$  的去除率为 29.41%,约有 500 mg/L 的  $\text{SO}_4^{2-}$  被代谢利用,  $\text{H}_2\text{S}$  的实际生成量约为 160 mg/L,而根据硫质量平衡计算,  $\text{H}_2\text{S}$  的理论生成量为 177 mg/L,理论与实际值有所偏差。硫酸盐至硫化氢的还原过程由一系列酶促反应组成,在这一过程中,硫得到 8 个电子,可产生多个中间产物,如  $\text{SO}_3^{2-}$ 、 $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$  及  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  等<sup>[36]</sup>。早期文献报道,酸性亚硫酸盐是还原为硫化氢的真正前体<sup>[36]</sup>。因此,中间代谢产物是造成  $\text{H}_2\text{S}$  实际生成量低于理论值的主要原因。当硝酸盐投加量为 1 和 3 mmol/L 时,体系中  $\text{H}_2\text{S}$  的积累浓度与空白对照组差异不显著。这表明,硝酸盐抑制菌株 NH-1 还原硫酸盐活性为可逆性抑制。当硝酸盐投加量为 5 和 7 mmol/L 时,抑制时长增加 10 d 以上,且第 11 天时培养基中仍存在一定浓度亚硝酸盐残留。此时培养基中菌液澄清,无黑色浑浊物及臭鸡蛋气味产生。同时,培养基中的硫酸盐未被利用,也未检测到  $\text{H}_2\text{S}$  的生成。因此在一定条件下,菌株 NH-1 对于亚硝酸盐的利用存在一定的临界值,当其浓度超过一定值时,不能被完全利用转换为氨氮,抑制时间得以延长。有研究曾对渤海湾海域某油藏采出井井口采出液中的 SRB 进行活性

抑制,当亚硝酸盐投加量为 4.6 mmol/L 时,其有效抑制时长大于 39 d<sup>[37]</sup>。在本研究中,硝酸盐投加量为 5 mmol/L (即硝酸盐为 120 mg/L) 时,即可实现对菌株 NH-1 产  $\text{H}_2\text{S}$  的长效抑制。

针对菌株 NH-1 及 NY-1,选取硝酸盐投加量为 3 mmol/L 抑制组,在第 1 和 5 天对菌液进行 DNA 和 mRNA 的提取,运用 qPCR 技术检测 *dsrB* 基因丰度与表达量,进一步研究亚硝酸盐的存在对菌株硫酸盐还原活性的抑制机制。如表 1 所示,对于菌株 NY-1,体系中不存在亚硝酸盐,因此抑制组与空白对照组差异不显著,菌数量随着生长周期自然衰减。对于菌株 NH-1 而言,当亚硝酸盐存在时(第 1 天),*dsrB* 基因丰度与表达量均低于检测阈值;而当亚硝酸盐被完全代谢后(第 5 天),该基因丰度及表达量显著提高。这证明,亚硝酸盐的存在大大降低了菌株数量,有效抑制了其生长繁殖,这与图 6D 中生长曲线所得结论一致。当亚硝酸盐完全消耗后,菌株 NH-1 数量迅速增长,且 *dsrB* 基因的丰度与表达量均有所提高,证实亚硫酸盐抑制为可逆性抑制,其抑制机制主要为抑制菌株生长繁殖,而非仅影响其硫酸盐还原酶的表达,与前文所得结论一致。

### 3 结论

本研究利用稀释涂布-叠皿夹法对海水养殖沉积物中的 SRB 进行富集筛选,采用硝酸盐对菌株进行了产  $\text{H}_2\text{S}$  的活性抑制,结论如下:

表 1 2 株纯菌 *dsrB* 基因丰度与表达量变化

Table 1 Changes of *dsrB* gene abundance and expression in two strains

<i>dsrB</i> gene	1st day				5th day			
	NY-1	Y-control	NH-1	H-control	NY-1	Y-control	NH-1	H-control
Abundance ( $\log(c/c_0)$ )	9.206	9.315	–	8.848	4.925	5.129	7.620	5.167
Expression ( $\log(c/c_0)$ )	8.108	8.165	–	6.165	4.035	4.603	6.045	4.242

–: indicates the value was not detectable.

(1) 获得 2 株 SRB, 分别为 *Desulfovibrio* sp. NY-1 和 *Clostridium* sp. NH-1。菌株 NY-1 呈弧状, 革兰氏阴性菌, 无芽孢; 菌株 NH-1 呈短杆状, 革兰氏阳性菌。2 株菌最佳生长条件:  $T$  为 35 °C、pH 为 7.0–8.0、盐度为 20–30 mg/L。

(2) 2 株菌生长活性差异显著。在最佳生长条件下, 菌株 NY-1 数量在 16 h 能达最大值; 而菌株 NH-1 在 40 h 左右达最大值。菌株 NY-1 在 40 h 时,  $H_2S$  积累浓度可达 435 mg/L; 菌株 NH-1 积累浓度为 150 mg/L。

(3) 硝酸盐不能有效抑制菌株 NY-1 产  $H_2S$  活性, 且基因调控作用以及自身缺乏将硝酸盐作为电子受体的酶体系是不能发挥抑制作用的主要因素。硝酸盐不适宜应用于抑制以 *Desulfovibrio* 属为优势菌群产硫化物的活性。

(4) 硝酸盐对菌株 NH-1 存在很强的抑制作用。菌株 NH-1 存在硝酸盐异化还原成铵 (DNRA) 的能力, 优先利用硝酸盐作为电子受体。DNRA 作用下的中间代谢产物亚硝酸盐是有效抑制菌株 NH-1 产  $H_2S$  活性的主要原因, 其抑制机理主要为抑制菌株的生长繁殖。

## 参考文献

- [1] 魏利, 王艳君, 马放, 张建祺. 反硝化抑制硫酸盐还原菌活性机理及应用. 哈尔滨工业大学学报, 2009, 41(4): 85–88.  
Wei L, Wang YJ, Ma F, Zhang JQ. Mechanism and application of denitrification inhibition to activity of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2009, 41(4): 85–88. (in Chinese)
- [2] 杨春璐, 闫鹏举, 魏宠, 史荣久, 韩斯琴, 张颖, 万传明. 一株源自渤海海域高温酸败油井采出水的硫酸盐还原菌筛选与活性抑制. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1332–1341.  
Yang CL, Yan PJ, Wei C, Shi RJ, Han SQ, Zhang Y, Wan CM. Isolation and activity inhibition of a sulfate-reducing bacterium in produced water from an offshore high-temperature soured oilfield in the Bohai Sea area, China. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1332–1341. (in Chinese)
- [3] Muyzer G, Stams AJM. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(6): 441–454.
- [4] Jørgensen BB. The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnology and Oceanography*, 1977, 22(5): 814–832.
- [5] 陈敏. 胶州湾养殖区硫酸盐还原菌的群落结构与功能特征研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2013.
- [6] Reese BK, Anderson MA, Amrhein C. Hydrogen sulfide production and volatilization in a polymictic eutrophic saline lake, Salton Sea, California. *Science of the Total Environment*, 2008, 406(1/2): 205–218.
- [7] 李建, 姜令绪, 王文琪, 杨宁, 王仁杰, 隋义先. 氨氮和硫化氢对日本对虾幼体的毒性影响. 上海水产大学学报, 2007, 16(1): 22–27.  
Li J, Jiang LX, Wang WQ, Yang N, Wang RJ, Sui YX. The toxic effect of ammonia nitrogen and sulfurated hydrogen on the larvae of *Penaeus japonicus*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, 16(1): 22–27. (in Chinese)
- [8] 姚国兴, 陈爱华, 孙国铭. 江苏海域滩涂底泥中硫化物含量与文蛤死亡关系的探讨. 水产养殖, 2005, 26(4): 8–10.  
Yao GX, Chen AH, Sun GM. Studies on the relationship between the sulphuret concentration in the substratum and the mortality of the hard clam (*Meretrix meretrix*) in Jiangsu sea area. *Journal of Aquaculture*, 2005, 26(4): 8–10. (in Chinese)
- [9] Kiemer MCB, Black KD, Lussot D, Bullock AM, Ezzi I. The effects of chronic and acute exposure to hydrogen sulphide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 1995, 135(4): 311–327.
- [10] 谭洪新, 赖才胜, 罗国芝, 孙大川, 阮赞杰, 周炜. 以可生物降解聚合物为碳源去除海水闭循环养殖系统中的硝酸盐. 海洋科学, 2010, 34(6): 22–27.  
Tan HX, Lai CS, Luo GZ, Sun DC, Ruan YJ, Zhou W. Using biodegradable polymers as carbon source for nitrate removal in marine recirculated aquaculture systems. *Marine Sciences*, 2010, 34(6): 22–27. (in Chinese)
- [11] 潘一峰, 陈花, 黄献培, 卢雄程. 海水鱼养殖水质要求与控制(上). 科学养鱼, 2019(1): 62–63.  
Pan YF, Chen H, Huang XP, Lu XC. Requirement and control for water quality in marine fish culture (continued). *Scientific Fish Farming*, 2019(1): 62–63. (in Chinese)
- [12] Van Bussel CGJ, Schroeder JP, Wuertz S, Schulz C.

- The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 2012, 326: 163–167.
- [13] Lai RQ, Li Q, Cheng CK, Shen H, Liu SQ, Luo YJ, Zhang ZZ, Sun SS. Bio-competitive exclusion of sulfate-reducing bacteria and its anticorrosion property. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 2020, 194: 107480.
- [14] Zhou JM, Xing JM. Haloalkaliphilic denitrifiers-dependent sulfate-reducing bacteria thrive in nitrate-enriched environments. *Water Research*, 2021, 201: 117354.
- [15] Thomas Y, Courties C, El Helwe Y, Herbland A, Lemonnier H. Spatial and temporal extension of eutrophication associated with shrimp farm wastewater discharges in the New Caledonia Lagoon. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 61: 387–398.
- [16] 宗虎民, 袁秀堂, 王立军, 于丽敏, 胡莹莹, 霍传林, 张志锋. 我国海水养殖业氮、磷产出量的初步评估. *海洋环境科学*, 2017, 36(3): 336–342.
- Zong HM, Yuan XT, Wang LJ, Yu LM, Hu YY, Huo CL, Zhang ZF. Preliminary evaluation on the nitrogen and phosphorus loads by mariculture in China. *Marine Environmental Science*, 2017, 36(3): 336–342. (in Chinese)
- [17] 曲克明, 崔毅, 幸福言, 陈民山, 宋云利, 袁有宪. 莱州湾东部养殖水域氮、磷营养盐的分布与变化. *海洋水产研究*, 2002, 23(1): 37–46.
- Qu KM, Cui Y, Xin FY, Chen MS, Song YL, Yuan YX. The plane distributions and seasonal variations of nutrients in the East of Laizhou Bay. *Oceanic Fisheries Research*, 2002, 23(1): 37–46.
- [18] 杨春璐, 苑美玉, 史荣久, 闫鹏举, 赵峰, 韩斯琴, 张颖. 海域高温油田 1 株耐高温耐盐硫酸盐还原菌的筛选与生理特性及活性抑制. *环境科学*, 2018, 39(10): 4783–4792.
- Yang CL, Yuan MY, Shi RJ, Yan PJ, Zhao F, Han SQ, Zhang Y. A thermotolerant and halotolerant sulfate-reducing bacterium in produced water from an offshore high-temperature oilfield in Bohai Bay, China: isolation, phenotypic characterization, and inhibition. *Environmenta Science*, 2018, 39(10): 4783–4792. (in Chinese)
- [19] 苑美玉. 渤海湾高温油藏采出水中硫酸盐还原菌的筛选鉴定及抑制研究. 辽宁大学硕士学位论文, 2018.
- [20] 郑冰冰, 吴怡伟, 李云辉, 周弋铃, 王欣雨, 赵阳国. 不同碳氮比对海水养殖废水脱氮效果的影响. *环境科学研究*, 2020, 33(8): 1848–1856.
- Zheng BB, Wu YW, Li YH, Zhou YL, Wang XY, Zhao YG. Effect of different C/N ratio on nitrogen removal of mariculture wastewater. *Research of Environmental Sciences*, 2020, 33(8): 1848–1856. (in Chinese)
- [21] Geets J, Borremans B, Diels L, Springael D, Vangronsveld J, Van Der Lelie D, Vanbroekhoven K. *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66(2): 194–205.
- [22] Kumar N, Omoregie EO, Rose J, Masion A, Lloyd JR, Diels L, Bastiaens L. Inhibition of sulfate reducing bacteria in aquifer sediment by iron nanoparticles. *Water Research*, 2014, 51: 64–72.
- [23] 李俊叶, 黄伟波, 王筱兰, 邹峥嵘. 硫酸盐还原菌的筛选及生理特性研究. *安徽农业科学*, 2010, 38(29): 16092–16093, 16123.
- Li JY, Huang WB, Wang XL, Zou ZR. Research on screening and physiological characteristics of sulfate reducing bacteria. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(29): 16092–16093, 16123. (in Chinese)
- [24] 陈一鸣, 吴雁, 马远荣, 许国超, 曲韵滔, 史素青. 硫酸盐还原菌的分离纯化及生长特性研究. *河南化工*, 2011, 28(2): 29–32.
- Chen YM, Wu Y, Ma YR, Xu GC, Qu YT, Shi SQ. Isolation, purification and growth characteristics of sulfate reducing bacteria. *Henan Chemical Industry*, 2011, 28(2): 29–32. (in Chinese)
- [25] 陈亚文, 张朝晖. 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. *高校地质学报*, 2019, 25(5): 705–713.
- Chen YW, Zhang ZH. Oxygen tolerance of sulfate reducing bacteria in fresh and coastal sea waters under enrichment culture conditions. *Geological Journal of China Universities*, 2019, 25(5): 705–713. (in Chinese)
- [26] 王鹏, 刘梅, 翁益松, 郑海宏, 孙静亚. 河道水体黑臭前后微生物种群变化研究. *安徽农业科学*, 2019, 47(22): 47–51.
- Wang P, Liu M, Weng YS, Zheng HH, Sun JY. Study on change of microbial population before and after black and odorous in river water. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2019, 47(22): 47–51. (in Chinese)
- [27] 付坤, 李多, 贾荣利. 煤化工废水中硫酸盐还原菌的分离及鉴定. *化工环保*, 2018, 38(4): 408–412.
- Fu K, Li D, Jia RL. Isolation and identification of sulfate-reducing bacteria from coal chemical

- wastewater. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2018, 38(4): 408–412. (in Chinese)
- [28] Haveman SA, Greene EA, Voordouw G. Gene expression analysis of the mechanism of inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough by nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(9): 1461–1465.
- [29] 吴波. *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough 的硝酸盐适应机制及抗压全局转录因子功能研究. 华中农业大学博士学位论文, 2016.
- [30] 赵阳国, 汤海松, 周弋铃, 高孟春, 郭亮, 王君鹏. 海水养殖生境中硫化物污染及控制技术进展. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(3): 37–43. Zhao YG, Tang HS, Zhou YL, Gao MC, Guo L, Wang JP. Research progress of sulfide pollution and control technology in mariculture habitat. *Periodical of Ocean University of China*, 2020, 50(3): 37–43. (in Chinese)
- [31] 张玲, 郑西来, 余宗莲, 杨居园, 谢经良. FeCl<sub>3</sub> 及 AlCl<sub>3</sub> 对中温厌氧消化系统产生 H<sub>2</sub>S 的抑制作用. 环境工程学报, 2015, 9(12): 5907–5914. Zhang L, Zheng XL, She ZL, Yang JY, Xie JL. Inhibition effect of FeCl<sub>3</sub> and AlCl<sub>3</sub> on H<sub>2</sub>S from sludge mesotherm anaerobic digestion system. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(12): 5907–5914. (in Chinese)
- [32] 苗宗成, 王蕾, 王登武, 李仲谨. 高铁酸钾对水产养殖废水净化作用的研究. 湖北农业科学, 2013, 52(7): 1518–1521. Miao ZC, Wang L, Wang DW, Li ZJ. The purification effect of potassium ferrate to aquaculture wastewater. *Hubei Agricultural Sciences*, 2013, 52(7): 1518–1521. (in Chinese)
- [33] Sun JL, Shang C, Kikkert GA. Hydrogen sulfide removal from sediment and water in box culverts/storm drains by iron-based granules. *Water Science and Technology*, 2013, 68(12): 2626–2631.
- [34] 李小平, 方涛, 敖鸿毅, 刘剑彤. 东湖沉积物中 dNaR 活性和硝酸盐还原菌的垂向分布. 中国环境科学, 2010, 30(2): 228–232. Li XP, Fang T, Ao HY, Liu JT. Vertical variation of dissimilatory nitrate reductase activity and nitrate reducer in the sediments of Lake Donghu. *China Environmental Science*, 2010, 30(2): 228–232. (in Chinese)
- [35] 陶怡乐, 温东辉. 细菌硝酸盐异化还原成铵过程及其在河口生态系统中的潜在地位与影响. 微生物学通报, 2016, 43(1): 172–181. Tao YL, Wen DH. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium: the potential and impacts in estuarine regions. *Microbiology China*, 2016, 43(1): 172–181. (in Chinese)
- [36] 蔡靖, 郑平, 张蕾. 硫酸盐还原菌及其代谢途径. 科技通报, 2009, 25(4): 427–431. Cai J, Zheng P, Zhang L. Sulfate-reducing bacteria and their metabolic pathway. *Bulletin of Science and Technology*, 2009, 25(4): 427–431. (in Chinese)
- [37] 刘洪玉, 史荣久, 张颖, 史振国, 张滢月, 于亮, 张小波, 谈涛. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>对渤海湾油藏中硫酸盐还原菌 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>还原活性的抑制效应. 应用生态学报, 2014, 25(8): 2369–2376. Li HY, Shi RJ, Zhang Y, Shi ZG, Zhang YY, Yu L, Zhang XB, Tan T. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> inhibits sulfate-reducing activity of the enrichment culture of sulfate-reducing prokaryotes from an off-shore oil reservoir at Bohai Bay, China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(8): 2369–2376. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)