



海水养殖生境中柠檬酸杆菌降解半胱氨酸产生硫化物的机制研究

马冬雪¹, 赵栩宁¹, 赵阳国^{1,2*}

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

马冬雪, 赵栩宁, 赵阳国. 海水养殖生境中柠檬酸杆菌降解半胱氨酸产生硫化物的机制研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3026-3040.

MA Dongxue, ZHAO Xuning, ZHAO Yangguo. Mechanism of sulfide production from cysteine degradation by *Citrobacter* in mariculture habitats[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3026-3040.

摘要:【目的】含硫氨基酸的生物降解是造成海水养殖环境中毒性硫化物上升的重要因素, 而微生物降解含硫氨基酸的机制和影响因素解析是控制该系统中硫化物浓度的关键环节。【方法】本研究利用稀释涂布-叠皿夹法自本实验室海水养殖环境的沉积物中分离得到一株产生硫化物的厌氧菌株, 并通过代谢组学研究其以半胱氨酸为底物产生硫化物的机制和途径。【结果】经鉴定, 该菌株为弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*), 能够在厌氧条件下还原硫酸盐, 能够降解半胱氨酸产生硫化物, 投加 L-半胱氨酸可提高其还原硫酸盐的能力。该菌株以 1 g/L 半胱氨酸为底物, 在 35 °C、盐度为 10、pH 8.0 的条件下, 硫化物的最高积累量可达 302.4 mg/L。对菌株中硫化物产生具有重要贡献的半胱氨酸脱巯基酶研究表明, 该酶最适温度为 35 °C, 在 pH 6.0–8.0 有较高的活性, 能够快速降解半胱氨酸产生硫化物。结合代谢组学研究发现, 该菌株中含有的 3-巯基丙酮酸硫酸转移酶、胱硫醚-γ-裂解酶、半胱氨酸脱巯基酶催化半胱氨酸降解是产生硫化氢的主要途径; 亚硫酸盐还原酶还原硫酸盐、亚硫酸盐是其产生硫化氢的次要途径。【结论】通过揭示柠檬酸杆菌降解半胱氨酸产生硫化物的机理, 可为海水养殖环境中毒性硫化物的防控提供理论基础。

关键词: 弗氏柠檬酸杆菌; L-半胱氨酸; 硫化物; 海水养殖

资助项目: 国家自然科学基金(41977315); 中央高校基本科研业务费专项(201964004)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41977315) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (201964004).

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

Received: 2022-11-17; Accepted: 2023-01-18; Published online: 2023-02-22

Mechanism of sulfide production from cysteine degradation by *Citrobacter* in mariculture habitats

MA Dongxue¹, ZHAO Xuning¹, ZHAO Yangguo^{1,2*}

1 College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, China

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

Abstract: [Objective] The biodegradation of sulfur-containing amino acids is an important factor in the rise of toxic sulfides in the mariculture environment, and the analysis of the mechanisms and influencing factors of microbial degradation of sulfur-containing amino acids is a key link to control the sulfide concentration in this system. **[Methods]** This study used the dilution coating-stacked dish clamp method to isolate a sulfide-producing anaerobic strain from the sediment of the mariculture environment in this laboratory, and the mechanism and pathway of sulfide production with cysteine as substrate were investigated by metabolomics. **[Results]** The strain was identified as *Citrobacter freundii*, which reduced sulfate under anaerobic conditions and degraded cysteine to produce sulfide. The addition of L-cysteine improved its ability to reduce sulfate. The maximum accumulation of sulfide in this strain was 302.4 mg/L at 35 °C, salinity 10, and pH 8.0 with 1 g/L L-cysteine as substrate. The study of cysteine desulphydrase, the important contributor to sulfide production in the strain, revealed that the optimum temperature of this enzyme was 35 °C, and it had high activity at pH 6.0–8.0, which could rapidly degrade cysteine to produce sulfide. Combined with the metabolomics study, it was found that the strain contained 3-mercaptopyruvate sulfotransferase, cystathionine gamma-lyase, and cysteine desulphydrase catalyzing the degradation of cysteine was the main pathway to produce hydrogen sulfide, and sulfite reductase reducing sulfate and sulfite was its secondary pathway to produce hydrogen sulfide. **[Conclusion]** By revealing the mechanism of sulfide production from cysteine degradation by *Citrobacter*, this paper provides a theoretical basis for the prevention and control of sulfide in mariculture.

Keywords: *Citrobacter freundii*; L-cysteine; sulfide; mariculture

我国是海水养殖大国，2020年海水养殖产量2 135.3万t，海水养殖单位面积的产量是淡水养殖的1.5倍以上^[1]。海水养殖不仅为国民提供高质量蛋白质，而且对经济的发展有重要的推动作用^[2]。

近年来，由于鱼粉供不应求，高脂饲料成为其替代品被广泛用于水产养殖业中，但高脂

饲料会造成养殖动物脂肪代谢缓慢，对养殖动物的生长带来负面影响^[3]，因此，通过外加含硫氨基酸的方式降低脂肪的积累成为水产养殖必不可少的环节^[4]。含硫氨基酸因其具有活性的硫元素而得名，包括甲硫氨酸、半胱氨酸和胱氨酸，用于体内蛋白质的合成和生命活动。其中，甲硫氨酸被称为“第一限制性含硫氨基

酸”，一部分直接用于蛋白质的合成，另一部分转化为半胱氨酸，当生物体内甲硫氨酸含量不足以满足所需的含硫氨基酸时，半胱氨酸则成为限制性氨基酸^[5]，因此将甲硫氨酸称为半胱氨酸的前体物。含硫氨基酸不仅是生物生长发育必不可少的物质，还能提高海产品的质量、防治病害^[6]。目前，已将含硫氨基酸应用于丝尾鳎(*Hemibagrus wyckioides*)、对虾(*Penaeus vannamei*)、中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)、黄鳝(*Monopterus albus*)等水产动物的养殖中^[7]。

在集约化养殖模式下，过量的饵料、缓慢的水动力循环、生物排泄废物沉降以及含硫蛋白的投加将造成养殖区形成厌氧环境，硫酸盐还原菌(sulfate reducing bacterium, SRB)以丰富的硫酸盐为电子受体，有机物为电子供体通过无氧呼吸产生硫化物^[8]；此外，由于含硫氨基酸(尤其是半胱氨酸)的不稳定性，一部分在自然条件下会分解，另一部分会在含硫氨基酸降解菌的利用下产生硫化氢和氨气，导致养殖生境底泥膨胀、恶化，甚至毒害水生生物。研究表明，大量的硫化物会出现在表层沉积物中^[9]，99%的溶解性硫化物(HS^- 、 H_2S 、 S^{2-})通过沉积物-水界面进入到水环境中，而且季节性变化对其扩散通量有很大的影响^[10]。硫化氢和氨氮对水生生物具有很大的毒性，我国渔业水质标准(GB 11607—1989)规定，养殖水体中硫化物(以 S^{2-} 计)不得高于 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 。研究表明，硫化物含量过高不仅会与血液中的铁结合削弱血红蛋白的携氧能力，而且会损害皮肤和黏膜^[11]。Wang 等^[12]通过观察蛤蜊在高浓度的硫化物($\geq 3.15 \text{ mmol/L}$)环境中的变化，发现硫化物的毒性依次作用于蛤蜊的贝壳、组织、血液，直至死亡；Thompson 等^[13]将海胆置于含硫化氢的沉积物中，发现当硫化氢浓度达到 165.8 $\mu\text{mol/L}$ 时会使海胆的死亡率明显增加，即使硫化氢浓

度低至 32.9 $\mu\text{mol/L}$ 时仍会影响雄性性腺的生长。

针对于硫化物的产生，当前的研究主要聚焦于 SRB 的作用^[14]，SRB 不仅能还原无机硫，在含硫氨基酸降解过程中也发挥着重要的作用。王亚南等^[15]在海水养殖底泥中发现，利用半胱氨酸产硫化氢的细菌数量高于利用硫代硫酸盐产硫化物的细菌数量，可能是由于含硫氨基酸的存在，抑制了亚硫酸盐还原酶的活性^[16]；郭策等^[17]在北戴河海洋沉积物中研究 12 株典型的 L-半胱氨酸降解菌，并证明是半胱氨酸脱巯基酶产生了硫化氢、丙酮酸和氨。目前，具有硫酸盐还原功能的柠檬酸杆菌(*Citrobacter spp.*)引起了关注，然而，更多的学者侧重于研究柠檬酸杆菌对硫酸盐的利用情况^[18]，对于柠檬酸杆菌降解半胱氨酸产生硫化氢的机理较少涉及。

因此，本研究以本实验室海水养殖环境的沉积物为对象，富集、驯化半胱氨酸降解菌，研究其生理特性及影响硫化物产生的因素，探究半胱氨酸脱巯基酶的活性及稳定性，通过代谢组学揭示硫化物产生的机制，为海水养殖生境修复提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 L-半胱氨酸降解菌的筛选

以本实验室海水养殖环境的沉积物为研究对象，进行半胱氨酸降解菌菌群的富集。富集及菌株分离应用 Kumagai 培养基，并进行适当修改，成分如下(g/L)：牛肉膏 5.0；蛋白胨 5.0；酵母粉 3.0；三水合乙酸铅 0.2；L-半胱氨酸 2.0；以不添加 L-半胱氨酸的培养基为空白对照，调节培养基 pH 为 7.0–8.0，添加 30.0 g/L 的 NaCl 以模拟海水盐度。其中，L-半胱氨酸和三水合乙酸铅分别用无菌水溶解后，采用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤除菌。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 85 mL 培

培养基, 通入高纯 N_2 3 min, 再进行 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。灭菌后, 待温度降至 50 °C 左右时, 分别用注射器将 10 mL L-半胱氨酸和 5 mL 三水合乙酸铅注入到血清瓶内。

在厌氧条件下, 每瓶装入 5 g 沉积物, 然后将血清瓶置于 25 °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时, 用无菌注射器抽取上层空气, 注入到湿润的乙酸铅试纸上, 当试纸变黑时证明有硫化氢产生, 此时, 用无菌注射器按照 1% (体积分数) 接种量将上层菌液接种于新鲜液体培养基中, 放置于 25 °C 恒温培养箱中避光静置培养。如此重复 3 次, 得到半胱氨酸降解菌菌群。

采用无菌注射器吸取 1 mL 半胱氨酸降解菌富集产物至 99 mL Kumagai 液体培养基中, 然后将血清瓶置于 25 °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 100 μ L 菌液采用稀涂布-叠皿夹法进行纯菌株的筛选。将涂布后的平板倒置于 25 °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, 并注入灭菌的液体石蜡, 于 25 °C 恒温培养箱中避光静置培养。至少重复 3 次, 得到半胱氨酸降解菌纯菌株。

1.2 菌株鉴定

按照文献[19]描述的方法, 应用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM) (蔡司 Gemini300) 观察该菌株细胞形态。

将纯化后的菌株在 Kumagai 液体培养基中培养至对数期, 取 45 mL 在室温下 4 000 \times g 离心 10 min, 采用试剂盒(MoBio)提取总 DNA。采用针对细菌 16S rRNA 基因的通用引物^[14] (正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R: 5'-CTACGGCTACCTTGTTAC

GA-3'), 对该菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增(Bio-Rad)。反应体系为正、反向引物(10 μ mol/L) 各 2 μ L, DNA 模板 2 μ L, PCR Mix 25 μ L, 无菌水 19 μ L。扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保温。

利用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后, 送至派森诺生物科技有限公司采用 27F/1492R 引物测序。测序完成后, 使用 DNASTAR (DNASTAR Inc.) 软件包中的 Seqman 程序处理测序峰图, 进行序列整理、编辑和拼接, 去除引物和重复序列, 最终得到目的序列。目的序列通过 NCBI 网站上的 BLAST 程序进行序列同源性比较。根据细菌种属信息, 下载该属标准菌株的 16S rRNA 基因序列。利用 MEGA 11.0 分析软件内置的 ClustalW 程序进行序列多重比对。采用 neighbor-joining (NJ) 的方法进行系统发育树的构建, 并进行 1 000 次自举分析(bootstrapping) 检验各节点的置信度。

1.3 菌株代谢半胱氨酸产硫化物的特征分析

1.3.1 菌株生长特性及硫化物产生研究

取对数期纯菌液, 用无菌注射器接种于新鲜的 Kumagai 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(5、25、35、45、55 °C)、初始 pH 值(6.0、7.0、8.0、9.0)、盐度(10、20、30)及 L-半胱氨酸浓度(1、2、3 g/L), 使用流式细胞仪(BD Accuri C6 Plus)记录细菌数量(CFU/mL)。

在菌株生长期间采用连续取样方式(即第 1 天每隔 4 h 取样, 第 2 天每隔 12 h 取样, 第 3、4 天每隔 24 h 取样), 每次取 5 mL 样品监测硫化物生成情况。样品中硫化物浓度的测定参照亚甲基蓝分光光度法 GB 13801—1996 方法^[20]。考察不同条件因素对硫化物生成的影响, 遵循单一变量原则, 每一变量重复 3 次以上, 其控制条件同上。

1.3.2 菌株对不同硫源的利用情况

采用 Starkey 培养基分析菌株对有机硫和无机硫的利用情况。对培养基进行适当修改,其成分如下(g/L): K_2HPO_4 0.5; NH_4Cl 1.0; 65% 乳酸钠 5.0; $CaCl_2$ 0.076; 抗坏血酸 0.1; 三水合乙酸铅 0.1; 调节培养基 pH 为 7.5 左右, 添加 30 g/L 的 NaCl 以模拟海水盐度。在培养基中, 分别添加不同浓度的半胱氨酸(有机硫)和硫酸盐(无机硫), 使其硫质量之比(以 S^{2-} 计)分别为 0:2 (L-半胱氨酸 0 g/L: $NaSO_4$ 0.890 g/L)、1:1 (L-半胱氨酸 0.380 g/L: $NaSO_4$ 0.450 g/L)、2:0 (L-半胱氨酸 0.770 g/L: $NaSO_4$ 0 g/L), 监测硫化物的生成情况并采用离子色谱测定硫酸盐浓度(ICS-Aquion RFIC, 赛默飞)。

1.3.3 半胱氨酸脱巯基酶的酶活性分析

半胱氨酸脱巯基酶是细菌体内降解半胱氨酸产生硫化物的关键酶, 其活性对于硫化物的产生具有重要影响。采用 1 g/L L-半胱氨酸为底物的液体 Kumagai 培养基, 在 35 °C、盐度 10、pH 8.0 的条件下培养该菌株进行酶活分析, 半胱氨酸脱巯基酶的分离及活性分析参考文献[21]。

(1) 粗酶液提取: 取对数期新鲜菌液 45 mL 于 50 mL 离心管内, 经 5 000×g 离心 10 min 后倒掉上清液, 用 pH 8.0、0.05 mol/L 甘氨酸缓冲液多次洗涤后向离心管内加入 15 mL pH 8.0、0.05 mol/L 甘氨酸缓冲液, 于细胞破碎仪破壁 5 min, 再加入 4 mL 终浓度为 0.2% 的硫酸链霉素, 最后经 10 000×g 离心 20 min 收集上清。

(2) 酶活测定: 采用 2,4-二硝基苯肼法^[22]。L-半胱氨酸降解产生丙酮酸, 在碱性条件下丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼生成棕红色物质, 通过每分钟生成 1 μ mol 产物丙酮酸所需的酶量作为一个酶活力单位。取 1 mL 底物(0.75 mL 0.05% L-半胱氨酸, 0.25 mL 6% K_2HPO_4), 加入 0.5 mL 粗酶液后, 37 °C 反应 2 h, 取 0.5 mL 反应液加

入 2,4-二硝基苯肼溶液 0.5 mL, 37 °C 水浴 20 min, 然后加入 5 mL 0.4 mol/L NaOH, 混匀, 10 min 后使用紫外可见分光光度计(UV-5200)测波长 500 nm 处的吸光度。蛋白质测定采用 Folin-蛋白质试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

(3) 酶学性质: 遵循单一变量原则, 考察不同温度(5、25、35、45、55 °C)和 pH (6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)在 8 h 内的酶活。

1.4 菌株降解半胱氨酸的代谢组学分析

采用 1 g/L L-半胱氨酸为底物的液体 Kumagai 培养基, 在 35 °C、盐度 10、pH 8.0 的条件下培养该菌株, 分别取不同时期(迟缓期 XF1、对数期 XF2、衰亡期 XF3)的菌液研究半胱氨酸代谢产物的情况。主要步骤为: 分别取 XF1、XF2、XF3 时期的菌液 45 mL 于 50 mL 离心管中, 经 8 000×g 离心 10 min 后倒掉上清液(每组至少 3 个平行), 再经无菌 1×PBS 清洗后将菌液放置 -80 °C 冰箱保存, 并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行代谢组学分析。

(1) 代谢产物预处理: 将样品转移到 2 mL EP 管, 4 °C、100×g (半径为 8.6 cm)离心 5 min, 弃上清; 向样品中加入 1 000 μ L 提取液[甲醇:乙腈:水=2:2:1 (体积比), 含同位素标记内标混合物], 35 Hz 研磨处理 4 min, 超声 5 min (冰水浴), 重复该操作 3 次, 冰水浴超声 10 min 后在 -40 °C 静置 1 h; 将样品 4 °C、12 000×g 离心 15 min, 取上清于进样瓶中上机检测。

(2) 上机测试: 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析是采用超高效液相色谱(ultra high performance liquid chromatography, UHPLC)仪(Vanquish, Thermo Fisher Scientific)串联 Orbitrap Exploris 120 质谱仪(Orbitrap MS, Thermo)组成的液质联用系统。色谱条件: Waters ACQUITY UPLC BEH 酰胺色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m);

流动相流动相包括 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氢氧化铵水溶液(pH 9.75) (A)-乙腈(B), 自动进样温度为 4 °C, 体积为 2 μ L; Orbitrap Exploris 120 质谱仪能够在控制软件(Xcalibur4.4, Thermo)控制下进行一级、二级质谱数据采集, 电喷雾离子源条件: 鞘内气体流速为 50 Arb, 辅助气体流速为 15 Arb, 毛细管温度为 320 °C, 全 MS 分辨率为 60 000, MS/MS 分辨率为 15 000, 在 NCE 模式下碰撞能量为 10/30/60, 喷雾电压分别为 3.8 kV 或-3.4 kV。

(3) 数据分析: 原始数据经 ProteoWizard 软件转成 mzXML 格式后, 进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理, 然后与二级质谱数据库匹配进行物质注释, 算法打分的 Cutoff 值设为 0.3; 结合代谢组学数据处理软件 Progenesis QI 对质谱信息进行解析, 应用 Origin 2022 对鉴定到的代谢物根据化学分类归属信息进行分类统计; 采用 Clustvis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>)绘制热图, 表征迟缓期和对数期、衰亡期之间代谢物水平的变化。此外, 采用 KEGG 数据库用于分析半胱氨酸的代谢及硫化物的产生途径。

2 结果与讨论

2.1 半胱氨酸降解菌株的分离和鉴定

将富集的 L-半胱氨酸降解菌液经稀释涂布-叠皿夹分离培养后, 得到 1 株纯菌株, 该菌株菌落表面光滑, 边缘透明, 球状, 整体嵌入琼脂培养基内部, 厌氧。由于半胱氨酸降解菌代谢 L-半胱氨酸生成 H₂S, 培养基中所含的 Pb²⁺与 H₂S 结合产生 PbS 沉淀, 使得菌落呈现黑色。扫描电镜结果如图 1 所示, 该菌株呈短杆状, 细胞长度约为 1.5 μ m, 宽约为 0.5 μ m。

对菌株进行 16S rRNA 基因序列分析, 将序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对。该菌株与弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)序列



图 1 半胱氨酸降解菌株的扫描电镜照片

Figure 1 Scanning electron micrograph of cysteine degrading bacterium.

相似度大于 99%, 可以认为是同种菌株, 命名为 *C. freundii* XF (GenBank 登录号为 OP 535973); 该菌株系统发育树如图 2 所示。

2.2 菌株生长特性及硫化物生成分析

菌株 *C. freundii* XF 在不同温度下生长差异显著。如图 3A 所示, 45 °C 时生长量较低, 且快速进入衰亡期, 55 °C 时几乎停止生长, 表明高温不利于 *C. freundii* XF 菌株生长, 但该菌株对低温具有一定的适应性, 5 °C 初期菌株具有一定的活性, 生长缓慢, 12 h 后, 进入快速生长阶段, 72 h 时达到对数期的最大值, 其数量为 4.06×10^6 CFU/mL; 25 °C 和 35 °C 时该菌株活性较高, 生长迅速, 尤其是 35 °C, 在 4 h 达到对数期的峰值 9.24×10^6 CFU/mL, 表明该菌株最适温度为 35 °C。Zhang 等^[23]对一株还原硫酸盐和铈的 *C. freundii* 研究中, 也发现该温度最适宜其生长。35 °C 时, 该菌株对 L-半胱氨酸的利用率最高, 有利于硫化物生成, 硫化物在 24 h 积累达到 138.66 mg/L。结合该菌的生长曲线可知, 对数期细菌主要利用半胱氨酸进行生长繁殖, 硫化物积累量较低, 仅为 6.34 mg/L, 并不是硫化物生成的主要时期; 而进入衰亡期后, 细菌内源呼吸, 从而产生大量毒性物质。

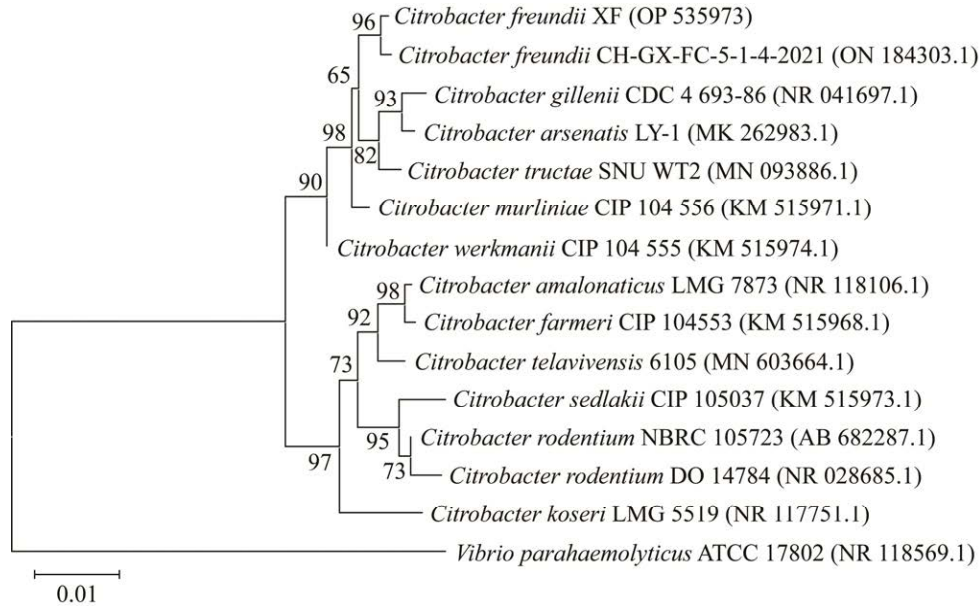


图 2 半胱氨酸降解菌株 *Citrobacter freundii* XF 的 16S rRNA 基因系统发育树分析

Figure 2 Phylogenetic tree of *Citrobacter freundii* XF 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. Scale is for evolutionary distance.

pH 是影响细菌生长及活性的重要因素。该菌株对 pH 适应性强, pH 为 6.0–8.0 时, 细菌生长迅速, 均在 8 h 左右达到对数期的最大值, 偏酸性及偏碱性对其生长影响较小; 当 pH 7.0 时, 细菌数量为 9.45×10^6 CFU/mL; pH 9.0 时, 生长较为缓慢且数量较低, 在 12 h 达到 3.04×10^6 CFU/mL, 该菌株对于 pH 有较高的忍耐性。由图 3B 硫化物生成分析可知, pH 8.0 时, 硫化物生成最快且含量最高, 在第 20 小时含量高达 250.18 mg/L, 主要是因为该条件下的溶解性硫化物主要赋存形态为 HS^- , 与 H_2S 相比, 对细菌的毒性较小, 对其活性影响较小。结果表明, *C. freundii* XF 中性及碱性条件更有利于硫化物的生成。

盐度会改变细胞膜渗透压, 从而影响菌株的活性。由图 3C 可知, 低盐度有利于菌株生长,

该菌株盐度为 10 和 20 时, 细菌数量分别达到 1.71×10^7 CFU/mL 和 1.60×10^7 CFU/mL, 相比之下, 较高的盐度会对其生长起一定的抑制作用。低盐条件下, 硫化物生成量更高, 能达到 255.49 mg/L。杨世平等^[24]发现盐度与硫化物的毒性呈负相关性, 与本研究结论一致。

底物 L-半胱氨酸浓度在菌株生长过程中的影响相对较小, 菌株数量和生长速度与底物浓度呈正比, 当 L-半胱氨酸浓度为 3 g/L 时, 该菌株快速生长繁殖, 在 4 h 左右数量为 1.20×10^7 CFU/mL, 但 L-半胱氨酸含量在 1–3 g/L 时菌株数量无显著差异; 但底物浓度对硫化物的产生有很大的影响, 如图 3D 所示, 当 L-半胱氨酸为 3 g/L 时, 硫化物在 12 h 左右达到最值, 底物 L-半胱氨酸浓度越高, 细菌摄入体内的有机硫越多, 代谢产生的硫化物含量也就越高。

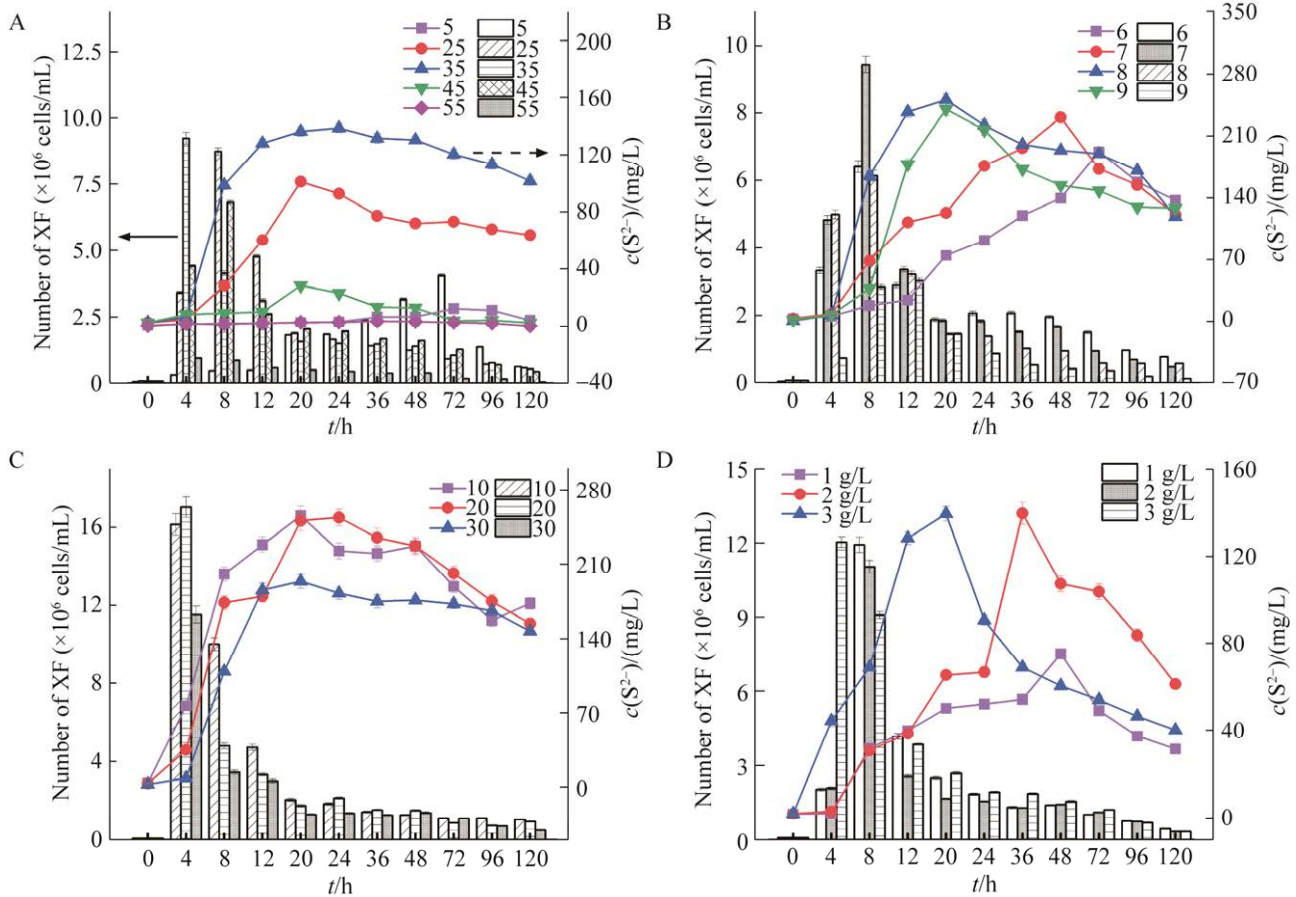


图3 温度(A)、pH(B)、盐度(C)及L-半胱氨酸浓度(D)对 *Citrobacter freundii* XF 生长活性的影响及硫化物的生成情况

Figure 3 Effect of temperature (A), pH (B), salinity (C) and L-cysteine concentration (D) on the growth activity of *Citrobacter freundii* XF and production of sulfide. The strain growth and sulfide production over 120 h is monitored simultaneously. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

综上所述, 温度为 35 °C、pH 8.0、盐度 10、L-半胱氨酸浓度为 1 g/L 条件为该菌积累硫化物最佳条件, 在该条件下, 观察 *C. freundii* XF 的生长及硫化物产生情况。由图 4A 可知, *C. freundii* XF 在 4 h 数量达到对数期的最大值, 硫化物产生量为 302.4 mg/L; 监测 60 h 内 pH 的变化发现, pH 在对数期下降最快, 由 7.48 降低为 5.36, 进入衰亡期后, 下降速率逐渐缓慢, 在第 60 小时降为 4.98, 整体而言, 随着细菌的生长, pH 呈下降的趋势, 可能是 *C. freundii*

XF 在代谢过程中产生了酸性物质导致的。

2.3 菌株对不同硫源的利用能力分析

从表 1 可知, 当硫源仅为 L-半胱氨酸时, 硫酸盐生成浓度不高于 60 mg/L, 硫化物的产生全部来源于 L-半胱氨酸的降解, 最高浓度达到 200.62 mg/L; 当硫源仅为硫酸盐时, 硫酸盐浓度从第 1 天到第 5 天降低了 18.70%, 硫化物浓度逐渐升高, 最高浓度为 13.72 mg/L; 当 L-半胱氨酸与硫酸盐比例为 1:1 时, 从第 4 天起, 硫酸盐开始降低, 第 5 天降低更加明显, 表明菌株

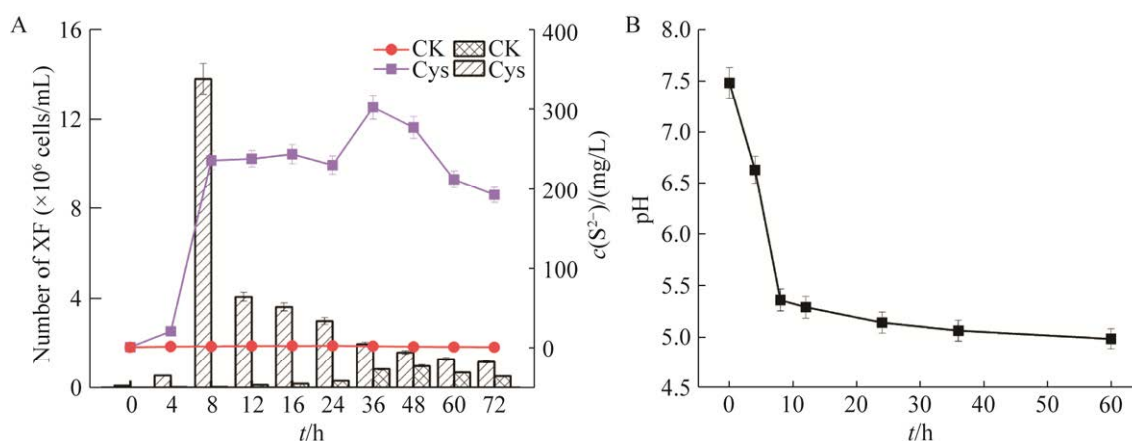


图 4 最佳条件下细菌活性和硫化物产生量(A)及 pH 变化趋势(B)

Figure 4 Trends in bacterial activity and sulfide production (A), and pH (B) under optimum conditions. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

表 1 *Citrobacter freundii* XF 对不同硫源的利用及硫化物生成情况

Table 1 Utilization of different sulfur sources and sulfide production by *Citrobacter freundii* XF

t/d	Organic sulfur:Inorganic sulfur=2:0		Organic sulfur:Inorganic sulfur=1:1		Organic sulfur:Inorganic sulfur=0:2	
	$c(\text{sulfate})/(\text{mg/L})$	$c(\text{sulfide})/(\text{mg/L})$	$c(\text{sulfate})/(\text{mg/L})$	$c(\text{sulfide})/(\text{mg/L})$	$c(\text{sulfate})/(\text{mg/L})$	$c(\text{sulfide})/(\text{mg/L})$
1	16.56	200.62	1 021.30	175.24	2 006.52	0.59
2	24.64	159.31	1 028.68	146.33	1 927.12	1.04
3	33.72	135.12	1 174.74	137.48	1 832.14	2.66
4	58.56	116.83	1 067.70	129.22	1 734.64	10.74
5	18.56	106.80	790.56	107.38	1 631.34	13.72

对硫酸盐还原能力逐渐增强, 且在第 4 天硫化物浓度比仅含有 L-半胱氨酸的多 12.39 mg/L。对比分析可见, 该菌株主要通过降解 L-半胱氨酸产硫化物, 对硫酸盐的利用率较低。

2.4 半胱氨酸脱巯基酶活性

半胱氨酸脱巯基酶主要在肠菌科细菌的细胞内由 L-半胱氨酸和胱氨酸诱导, 在细胞生长早期和稳定期达到最大丰度^[25]。如图 5A 所示, 本研究菌株的半胱氨酸脱巯基酶属于中温酶, 在 5–55 °C 均具有活性, 最适温度为 35 °C; 图 5B 表明, 该酶在弱酸性条件下 (pH 6.0) 活性最高, 酶活为 0.12 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, 随着碱性的增强, 酶活性逐渐降低, 当 pH 10 时, 酶活为 0.028 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, 相对酶活力降低了 80%。

该酶在衰亡期仍具有很高的活性, 这也是 *C. freundii* XF 在衰亡期仍旧产生大量硫化物的原因。

2.5 代谢组学分析

由图 6 可知, *C. freundii* XF 从迟缓期到衰亡期降解 L-半胱氨酸代谢产物主要为生物碱及衍生物、苯环型化合物、脂质和类脂分子、有机酸及其衍生物、有机含氮化合物、有机含氧化合物、有机杂环化合物、糖类及多酮类化合物等, 其中有机酸及其衍生物、脂质及类脂分子、有机杂环化合物分别高达 28.7%、23.5%、18.1%。其中, 丙酮酸、牛磺酸、赖氨酸等有机酸性代谢物质可能是导致该菌株在降解 L-半胱氨酸过程中 pH 降低的主要原因。

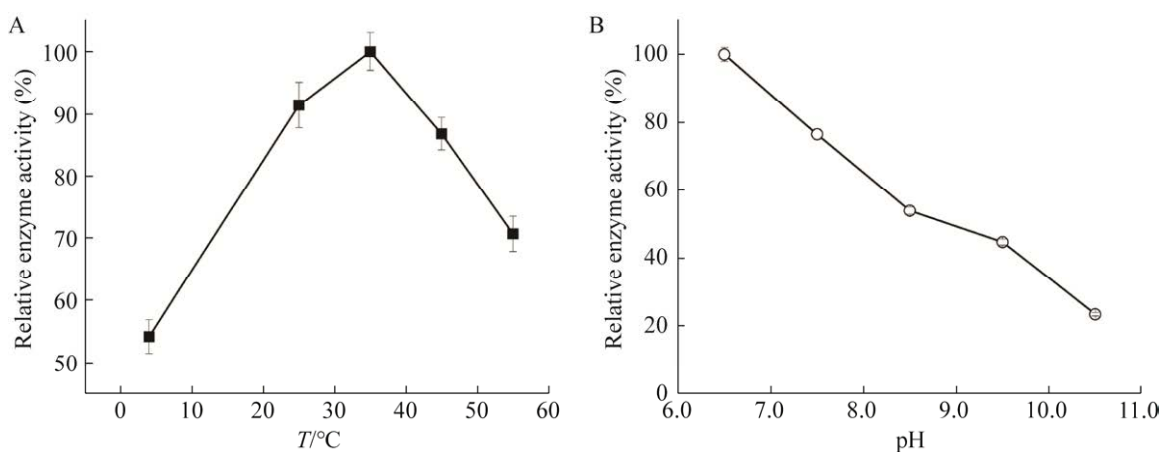


图 5 脱巯基酶活性随温度的变化(A)和 pH 对酶活性的影响(B)

Figure 5 Variation of desulfhydrase activity with temperature (A) and effect of pH on enzyme activity (B). Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

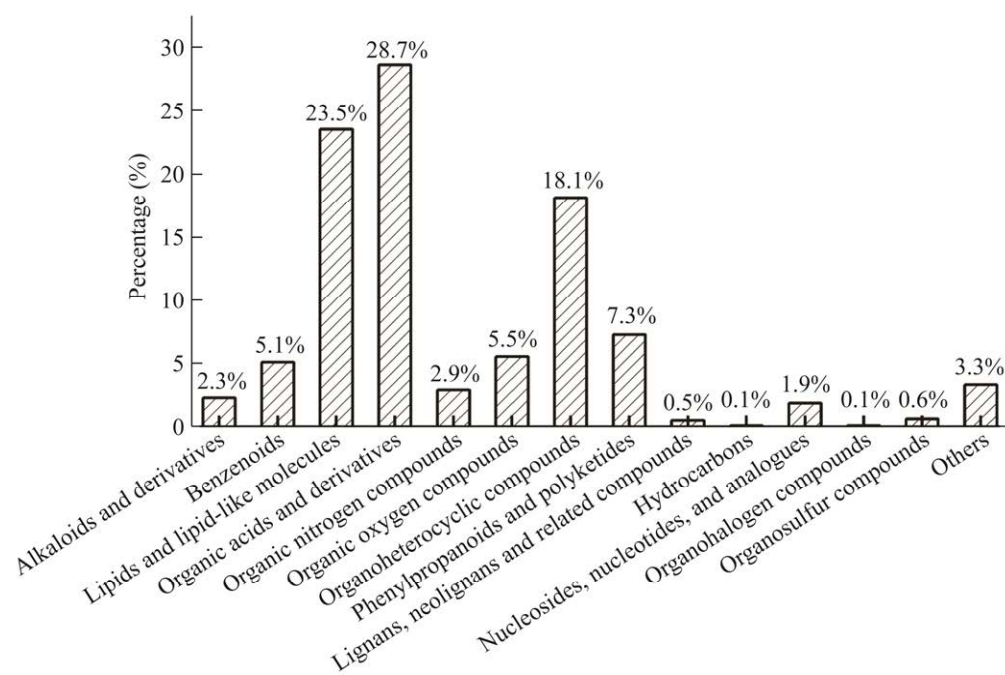


图 6 *Citrobacter freundii* XF 降解半胱氨酸代谢产物种类及比例图

Figure 6 Metabolite classification and percentage diagram, differential metabolite volcano diagram.

如图 7A 所示, 对数期与迟缓期的代谢物相比, 5-甲硫腺苷、维生素 B2 上调; 甘氨酸、牛磺酸、四氢叶酸、谷胱甘肽、半胱氨酸下调, 下调的代谢物可能与硫化氢的前体物-甲硫氨酸的合成有关。而图 7B 表明, 与迟缓期相比,

衰亡期时 L-丝氨酸、甘氨酸上调; 半胱氨酸、芸苔葡萄糖硫苷、萝卜硫素、2(3H)-苯并噻唑硫酮、S-丙烯基半胱氨酸下调, 其中, 下调产物均为含硫小分子内源物。通过差异代谢物分析可知, 在对数期, 主要是初生代谢物向机体提

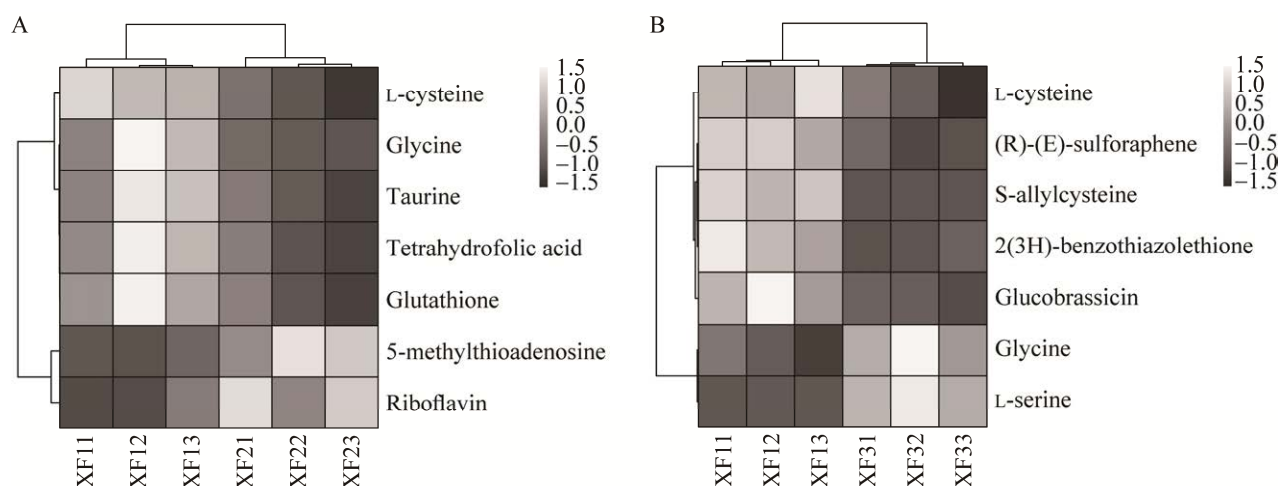


图 7 迟缓期与对数期(A)、衰亡期(B)差异代谢物聚类热图(浅色表示与迟缓期相比代谢产物上调, 深色表示代谢产物下调)

Figure 7 Cluster heat maps of differential metabolites in sluggish and logarithmic stages (A) and decay stages (B). Light color indicates upregulation of metabolites compared to retarded phase, and dark color indicates downregulation of metabolites.

供营养和能量, 以及硫化氢前体物的生成, 此时硫化氢积累量并不高, 而衰亡期代谢物在酶的作用下更有利于向硫化氢转化。

通过衰亡期与对数期相比较的 KEGG 通路分析硫化氢在不同时期的产生情况。衰亡期时, L-丝氨酸、S-磺基-L-半胱氨酸含量降低, 主要是因为 L-丝氨酸转化为 O-乙酰-L-丝氨酸, 在半胱氨酸合酶催化下产生 S-磺基-L-半胱氨酸, 并转化为硫酸盐。此外, L-磺基丙氨酸在脱羧酶(GAD、CSAD)作用下产生牛磺酸, 并由 *TauD* 催化为亚硫酸盐。亚硫酸盐通过硫代硫酸盐还原酶 B 亚基(*phsB*)发生歧化反应产生硫化氢; 硫酸盐、亚硫酸盐在硫酸盐还原酶(*dsrA*)催化下也产生硫化氢。但结合柠檬酸杆菌对不同硫源的利用发现, 该过程并不是硫化物产生的主要途径, 可能是这 2 种酶并未发挥主要作用。

半胱氨酸的降解是硫化氢产生的主要途径。L-胱硫醚在胱硫醚- β -裂解酶下转化为 L-高半胱氨酸, L-高半胱氨酸可在胱硫醚- γ -裂解酶

(CBS)下产硫化氢; 也可先转化成 L-蛋氨酸, 蛋氨酸- γ -裂解酶催化生成甲硫醇, 在氧化酶的作用下产生硫化氢, 也可能是硫代半胱氨酸与巯基化合物(甲硫醇、半胱氨酸)生成硫化氢^[26]。由图 8 可知, 与对数期相比, 丙酮酸盐上调, 表明衰亡期 L-半胱氨酸降解程度高于对数期, 硫化氢的积累量也会随之增加。在柠檬酸杆菌降解半胱氨酸产生丙酮酸和硫化物的过程中, 半胱氨酸脱巯基酶(LCD)和 3-巯基丙酮酸硫酸转移酶(3-MST)是关键性酶, 尤其是 LCD 具有重要的贡献。通过 LCD 酶活特征发现, LCD 不仅与底物半胱氨酸有很高的亲和力, 而且对温度、pH 有较广的适应性, 其在胞体外长时间发挥作用是衰亡期硫化物产生的主要原因。研究也发现, 硫化氢浓度的升高会影响酶活, 3-巯基丙酮酸硫酸转移酶与其浓度成正比, 而对半胱氨酸脱巯基酶几乎无影响^[27]; Qiao 等^[28]结合代谢组学和转录组学发现细菌在适应期主要进行功能性代谢物的合成, 如 L-胱氨酸、牛磺酸、

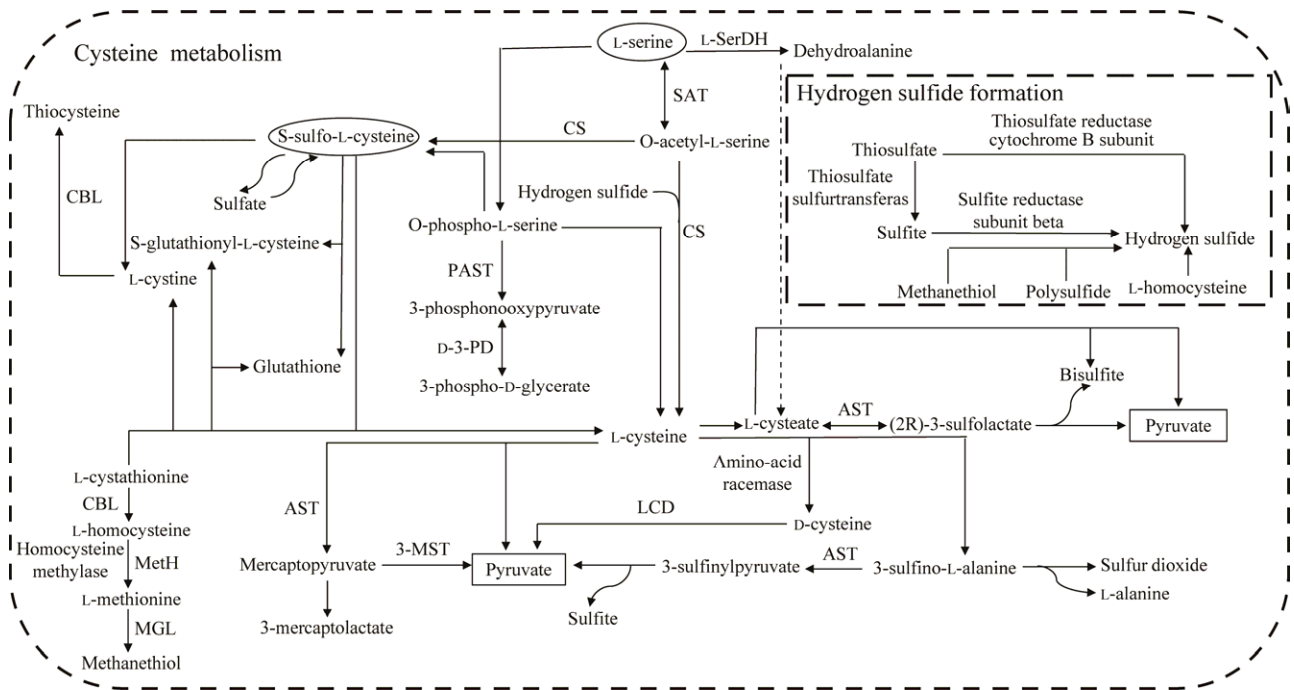


图 8 *Citrobacter freundii* XF 代谢 KEGG 通路及硫化氢产生路径示意图 长方形表示衰亡期与对数期相比代谢产物上调、椭圆形代表代谢产物下调

Figure 8 Schematic diagram of the *Citrobacter freundii* XF metabolism KEGG pathway and hydrogen sulfide production pathway. Rectangle represents up-regulated metabolites, and oval shape represents down-regulated metabolites. CBL: Cystathionine beta-lyase; MGL: Methionine gamma-lyase; AST: Aspartate aminotransferase; 3-MST: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase; LCD: Cysteine desulfhydrase; CS: Cysteine synthase; SAT: Serine acetyltransferase; PAST: Phosphoserine aminotransferase; D-3-PD: D-3-phosphoglycerate dehydrogenase; L-SerDH: Serine dehydratase; Meth: B12-dependent methionine synthase.

L-高半胱氨酸和 D-半胱氨酸，在对数期主要合成 3-巯基丙酮酸硫酸转移酶；Soutourina 等^[29]在 D-半胱氨酸对大肠杆菌生长抑制研究中发现，*yedO* 基因促进半胱氨酸脱巯基酶降解半胱氨酸产生丙酮酸、硫化氢和氨气。

3 结论

本研究经稀释涂布-叠皿夹法筛选到 1 株降解 L-半胱氨酸的弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) XF，分析了该菌株对 L-半胱氨酸降解的影响因素，并通过酶活特性和代谢组学分析硫化物产生的机制，结论如下：

(1) 当温度为 35 °C、pH 8.0、盐度 10 时，L-半胱氨酸降解产硫化物程度最高，其中衰亡期降解 L-半胱氨酸产硫化物的能力高于对数期；此外，该菌株能利用硫酸盐，当 L-半胱氨酸存在时，提高对硫酸盐利用能力。

(2) 分析了半胱氨酸降解的关键酶半胱氨酸脱巯基活性，该酶属于中温酶，最适温度为 35 °C，在 pH 6.0–8.0 有较高的活性，该酶与底物浓度具有较高的亲和力，且在衰亡期依旧具有一定的活性，这也是衰亡期硫化物积累量高于对数期的重要原因。

(3) 菌株 *C. freundii* XF 以 L-半胱氨酸为底

物时, 其代谢产物主要为生物碱及衍生物、苯环型化合物、脂质和类脂分子、有机酸及其衍生物、有机含氮化合物、有机含氧化合物、有机杂环化合物、糖类及多酮类化合物等。通过差异代谢物分析表明, 对数期主要是酶及硫化物前体物的合成, 而衰亡期才是含硫物质转化为硫化氢的主要时期。

(4) 代谢通路分析表明该菌株主要通过两大途径生成硫化物: 一是在 3-巯基丙酮酸硫酸转移酶(3-MST)、胱硫醚- γ -裂解酶(CBS)、半胱氨酸脱巯基酶(LCD)催化下诱导中间产物产生硫化氢、丙酮酸和氨; 二是在亚硫酸盐还原酶催化下还原硫酸盐、亚硫酸盐产生硫化氢。

柠檬酸杆菌降解半胱氨酸机制的研究为海水养殖生境中硫化物的生成提供新思路, 为硫化物的防控及养殖生境的修复提供理论指导。

参考文献

- [1] 张灿, 孟庆辉, 初佳兰, 柳志泽, 王传珺, 赵媛媛, 赵建华. 我国海水养殖状况及渤海养殖治理成效分析[J]. 海洋环境科学, 2021, 40(6): 887-894.
ZHANG C, MENG QH, CHU JL, LIU GZ, WANG CJ, ZHAO YY, ZHAO JH. Analysis on the status of mariculture in China and the effectiveness of mariculture management in the Bohai Sea[J]. *Marine Environmental Science*, 2021, 40(6): 887-894 (in Chinese).
- [2] 张守都, 李友训, 姜勇, 田敬云, 刘学庆, 赵喜喜, 马健, 苏文, 胡建廷. 海洋强国背景下我国发展现代海水养殖业路径分析[J]. 海洋开发与与管理, 2021, 38(11): 18-26.
ZHANG SD, LI YX, JIANG Y, TIAN JY, LIU XQ, ZHAO XX, MA J, SU W, HU JT. Pathway analysis for developing modern mariculture under the background of oceanic great power strategy[J]. *Ocean Development and Management*, 2021, 38(11): 18-26 (in Chinese).
- [3] 胡亚军, 胡毅, 石勇, 戴振炎, 钟蕾. 不同形式蛋氨酸对黄鳝生长、血清生化、血清游离氨基酸含量及肌肉品质的影响[J]. 水生生物学报, 2019, 43(6): 1155-1163.
- [4] 霍雅文, 曾雯婷, 金敏, 黎明, 谢奉军, 周歧存. 凡纳滨对虾幼虾的蛋氨酸需要量[J]. 动物营养学报, 2014, 26(12): 3707-3716.
HUO YW, ZENG WP, JIN M, LI M, XIE FJ, ZHOU QC. Methionine requirement of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(12): 3707-3716 (in Chinese).
- [5] 杨乾龙, 王静, 南韦肖, 王晓旭, 李光玉, 王凯英. 半胱氨酸的合成代谢及其生物学作用研究进展[J]. 饲料工业, 2022, 43(7): 19-22.
YANG QL, WANG J, NAN WX, WANG XX, LI GY, WANG KY. Research progress on the synthesis, metabolism and biological function of cysteine[J]. *Feed Industry*, 2022, 43(7): 19-22 (in Chinese).
- [6] 朱中胜, 李吕木. 蛋氨酸研究进展[J]. 饲料博览, 2015(7): 11-17.
ZHU ZS, LI LM. Research progress on methionine[J]. *Feed Review*, 2015(7): 11-17 (in Chinese).
- [7] 周凡, 贝亦江, 李诗言, 王鼎南, 丁雪燕, 周万华. 不同蛋氨酸剂型对中华鳖生长性能和肝脏基因表达的影响[J]. 水产科技情报, 2019, 46(2): 73-80.
ZHOU F, BEI YJ, LI SY, WANG DN, DING XY, ZHOU WH. Effects of different dietary methionine sources on growth performance and hepatic genes expression of Chinese soft-shell turtle, *Pelodiscus sinensis*[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2019, 46(2): 73-80 (in Chinese).
- [8] 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研究进展[J]. 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[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2020, 50(3): 37-43 (in Chinese).
- [9] BRÜCHERT V, JØRGENSEN BB, NEUMANN K, RIECHMANN D, SCHLÖSSER M, SCHULZ H. Regulation of bacterial sulfate reduction and hydrogen

- sulfide fluxes in the central Namibian coastal upwelling zone[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2003, 67(23): 4505-4518.
- [10] REESE BK, ANDERSON MA, AMRHEIN C. Hydrogen sulfide production and volatilization in a polymictic eutrophic saline lake, Salton Sea, California[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 406(1/2): 205-218.
- [11] 孙清华, 耿英慧. 水产养殖过程中潜在硫化物风险预判[J]. *当代水产*, 2021, 46(3): 73-74.
SUN QH, GENG YH. Prediction of potential sulfide risk in aquaculture[J]. *Current Fisheries*, 2021, 46(3): 73-74 (in Chinese).
- [12] WANG YH, ZHENG YQ, DONG JY, ZHANG XM. Two-sided effects of prolonged hypoxia and sulfide exposure on juvenile ark shells (*Anadara broughtonii*) [J]. *Marine Environmental Research*, 2021, 169: 105326.
- [13] THOMPSON B, BAY S, GREENSTEIN D, LAUGHLIN J. Sublethal effects of hydrogen sulfide in sediments on the Urchin *Lytechinus pictus* [J]. *Marine Environmental Research*, 1991, 31(4): 309-321.
- [14] 赵翔宁, 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[J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 3048-3061.
ZHAO XN, MA DX, ZHAO YG. Sulfide-producing activity inhibition of sulfate-reducing bacteria in mariculture[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3048-3061 (in Chinese).
- [15] 王亚南, 王保军, 戴欣, 焦念志, 彭志英, 刘双江. 海水养殖场底泥中转化硫和磷化合物的微生物及其多样性[J]. *环境科学*, 2005, 26(2): 157-162.
WANG YN, WANG BJ, DAI X, JIAO NZ, PENG ZY, LIU SJ. Bacterial conversion of sulfur-and phosphorous-compounds and microbial diversity in sediments from a near-shore marine-cultural region[J]. *Environmental Science*, 2005, 26(2): 157-162 (in Chinese).
- [16] DOTT W, HEINZEL M, TRPER HG. Sulfite formation by wine yeasts[J]. *Archives of Microbiology*, 1977, 112(3): 283-285.
- [17] 郭策, 刘贝贝, 孙明雪, 边佳琪, 魏士平. 北戴河海洋沉积物中 L-半胱氨酸脱硫细菌的多样性及其特性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1582-1589.
GUO C, LIU BB, SUN MX, BIAN JQ, WEI SP. Diversity and characterization of L-cysteine desulfurizing bacteria isolated from marine sediments in Beidaihe[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(7): 1582-1589 (in Chinese).
- [18] ARULMANI SRB, DAI JX, LI H, CHEN ZX, SUN WM, ZHANG HG, YAN J, KANDASAMY S, XIAO TF. Antimony reduction by a non-conventional sulfate reducer with simultaneous bioenergy production in microbial fuel cells[J]. *Chemosphere*, 2022, 291: 132754.
- [19] 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[J]. *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[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(10): 4783-4792 (in Chinese).
- [20] 中国石油化工总公司环境监测总站. 水质硫化物的测定: 亚甲基蓝分光光度法[S]. 国家环境保护局, GB/T 16489-1996.
China Petroleum and Chemical Corporation General Environmental Monitoring Station. Determination of sulfide in water: methylene blue spectrophotometric method[S]. National Environmental Protection Agency, GB/T 16489-1996 (in Chinese).
- [21] 金永杰, 杨文博, 刘忠, 白钢, 孙丹. 假单胞菌 TS-1138 L-半胱氨酸脱硫酶的纯化和性质研究[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2004, 37(4): 100-104.
JIN YJ, YANG WB, LIU Z, BAI G, SUN D. Purification and the properties of L-cysteine desulfhydrase *Pseudomonas* sp. Ts1138[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2004, 37(4): 100-104 (in Chinese).
- [22] COLLINS JM, MONTY KJ. The cysteine desulfhydrase of *Salmonella typhimurium* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1973, 248(17): 5943-5949.
- [23] ZHANG HG, LI M, YANG ZQ, SUN YQ, YAN J, CHEN DY, CHEN YH. Isolation of a non-traditional sulfate reducing-bacteria *Citrobacter freundii* sp. and bioremoval of thallium and sulfate[J]. *Ecological Engineering*, 2017, 102: 397-403.
- [24] 杨世平, 阮德雄, 陈兆明, 王成桂, 孙成波. 不同盐度条件下硫化物对斑节对虾的毒性试验[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(15): 4673-4675.
YANG SP, RUAN Dexiong, CHEN Zhaoming, WANG

- Chenggui, SUN Chengbo. Toxicity of sulfide on different salinity conditions to *Penaeus monodon*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42(15): 4673-4675 (in Chinese).
- [25] KUMAGAI H, CHOI YJ, SEJIMA S, YAMADA H. Formation of cysteine desulfhydrase by bacteria[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1975, 39(2): 387-392.
- [26] YIN J, REN WK, YANG G, DUAN JL, HUANG XG, FANG RJ, LI CY, LI TJ, YIN YL, HOU YQ, KIM SW, WU GY. L-cysteine metabolism and its nutritional implications[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, 60(1): 134-146.
- [27] RIEMENSCHNEIDER A, NIKIFOROVA V, HOEFGEN R, de KOK LJ, PAPENBROCK J. Impact of elevated H₂S on metabolite levels, activity of enzymes and expression of genes involved in cysteine metabolism[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(5): 473-483.
- [28] QIAO YL, LIU GF, LENG C, ZHANG YJ, LV XP, CHEN HY, SUN JH, FENG Z. Metabolic profiles of cysteine, methionine, glutamate, glutamine, arginine, aspartate, asparagine, alanine and glutathione in *Streptococcus thermophilus* during pH-controlled batch fermentations[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 12441.
- [29] SOUTOURINA J, BLANQUET S, PLATEAU P. Role of D-cysteine desulfhydrase in the adaptation of *Escherichia coli* to D-cysteine[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(44): 40864-40872.