



不同 pH 值条件下硫酸盐还原菌组成及硫酸盐还原机制分析

庞安冉, 张晓丹, 刘森, 刘洪艳*

天津科技大学海洋与环境学院, 天津 300457

庞安冉, 张晓丹, 刘森, 刘洪艳. 不同 pH 值条件下硫酸盐还原菌组成及硫酸盐还原机制分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1081-1094.

PANG Anran, ZHANG Xiaodan, LIU Miao, LIU Hongyan. Dominant sulfate-reducing bacteria at different pH and mechanism of sulfate reduction[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1081-1094.

摘要:【目的】从海洋沉积物中富集获得硫酸盐还原菌群, 改变 pH 值进行培养, 分析 pH 值对硫酸盐还原性质的影响, 明确菌群组成和进行硫酸盐还原功能基因预测, 探究硫酸盐还原机制。

【方法】分析硫酸盐还原菌群在不同 pH 值条件下的硫酸盐还原率, 在此基础上, 利用高通量测序技术和 PICRUSst 软件分析硫酸盐还原菌群优势菌组成及硫酸盐还原相关基因相对丰度。【结果】硫酸盐还原菌群在不同 pH 值培养条件下的生长和硫酸盐还原率出现显著变化($P < 0.01$), 在 pH 5.0 时达到峰值, 分别为 0.34 ± 0.01 和 $96.52\% \pm 0.44\%$ 。高通量测序数据显示, pH 5.0 时菌群丰富度和多样性最高, 优势菌属为假单胞菌(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌(*Bacillus*), 相对丰度较高的基因为同化性硫酸盐还原相关基因。【结论】硫酸盐还原菌富集生长的最适 pH 5.0, 在此条件下的高硫酸盐还原率由同化性硫酸盐还原途径主导, 为揭示硫酸盐还原机制提供了实验支持, 并拓宽了硫酸盐还原菌实践应用方面的种质资源。

关键词: 硫酸盐还原菌; pH 值; 硫酸盐还原率; 菌群组成; 同化性硫酸盐还原

资助项目: 国家自然科学基金(41606157)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41606157).

*Corresponding author. Tel: +86-22-60601458, E-mail: lhy1214@tust.edu.cn

Received: 2023-09-14; Accepted: 2023-12-21; Published online: 2023-12-28

Dominant sulfate-reducing bacteria at different pH and mechanism of sulfate reduction

PANG Anran, ZHANG Xiaodan, LIU Miao, LIU Hongyan*

College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Objective] To analyze the influence of pH on sulfate-reducing properties of sulfate-reducing bacteria enriched from marine sediments, identify the bacterial community composition, predict the key genes of sulfate reduction, and explore the mechanism of sulfate reduction. [Methods] The sulfate reduction rates of sulfate-reducing bacteria at different pH conditions were determined. On this basis, high-throughput sequencing and PICRUSt were employed to analyze the dominant sulfate-reducing bacteria and the relative abundance of sulfate-reducing genes. [Results] The biomass (OD_{600}) and sulfate reduction rate of sulfate-reducing bacteria varied significantly under different pH conditions ($P < 0.01$) and reached their peak values (0.34 ± 0.01 and $96.52\% \pm 0.44\%$, respectively) at pH 5.0. According to the high-throughput sequencing data, the abundance and diversity of bacteria were the highest at pH 5.0. The dominant bacteria were *Pseudomonas* and *Bacillus*, and the assimilatory sulfate reduction-related genes had higher abundance. [Conclusion] Sulfate-reducing bacteria are suitable to be enriched and cultured at pH 5.0. Under this condition, the high sulfate reduction rate is attributed to the assimilatory sulfate reduction pathway. The findings provide experimental support for revealing sulfate reduction mechanism and broaden the germplasm resources of sulfate-reducing bacteria for application.

Keywords: sulfate-reducing bacteria; pH value; sulfate reduction rate; bacterial community composition; assimilatory sulfate reduction

硫酸盐还原是硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) 将硫酸盐 (SO_4^{2-}) 还原为亚硫酸盐 (SO_3^{2-})、硫氧化物 ($S_2O_3^{2-}$) 直至硫化物 (S^{2-}) 的过程。SRB 广泛存在于海水、油井和油气运输管道等厌氧环境中，能够附着于金属表面，利用金属作为电子受体进行生长代谢，从而对钢铁等金属产生腐蚀。Lan 等从铺管土壤中分离到一株脱硫弧菌 (*Desulfovibrio* sp.) Hqm3 菌株，采用电化学法和扫描电镜等测试技术研究了腐蚀对镁合金的影响，发现在 SRB 的影响下，镁合金在滩涂环境中被腐蚀的速率高达 1.31 mm/年^[1]。Zhai 等采用电化学测试方法研究了不锈钢浸泡

在 SRB 溶液中的腐蚀行为，结果表明不锈钢在含 SRB 溶液中的失重率增长了 13 倍^[2]。自然界中 70% 的微生物腐蚀都是 SRB 造成^[3]。

虽然 SRB 进行硫酸盐还原会对金属造成腐蚀，但其产生的硫化物因具有一定的还原性，能够与重金属离子反应，生成金属硫化物沉淀，从而有效地去除重金属污染。Mothe 等采用海藻酸钠固定化的 SRB 可去除 95% 的重金属^[4]。Joo 等在 Fe^{2+} 的促进作用下，利用脱硫弧菌去除了海洋环境中的 Cd、Ni 和 Cr 等重金属离子，发现其能够将 Cd、Ni 几乎全部去除，且对 Cr 也有 74.2% 的去除率^[5]。Hwang 等比较了 SRB 与矿区土样

原生菌对酸性矿井水中重金属的去除效果,发现脱硫弧菌将完全去除重金属的时间缩短了1500%^[6]。由此可见,SRB可利用细胞外的重金属为电子受体,实现有毒金属污染物的转化,在重金属污染的处理方面有一定的应用前景。

为进一步研究SRB,研究者从地下水、废水污泥、沉积物等低氧、厌氧环境中分离出了多种种属不同的SRB。陈秀云等于矿山污染水中分离出菌株YQ-1,属于梭菌科瘤胃解蛋白质菌属^[7];杨丽平等在高浓度硫酸盐废水污泥中分离得到菌株SR3,属于肠杆菌科柠檬酸杆菌属^[8];Takahashi等^[9]和Pérez-Bernal等^[10]在微咸湖沉积物和火山口湖沉积物中分离出2株SRB,分别属于脱硫弧菌科的假脱硫弧菌属和脱硫弧菌属。由此可见,SRB并不是一个分类学意义上的名词,目前已经发现了超过60属220种的SRB^[11],具备硫酸盐还原能力的微生物都可称之为SRB。付坤等将煤化工厌氧污泥菌群富集、分离筛选出7株SRB后发现,不同菌属的SRB的硫酸盐还原性质存在差异,其中柠檬酸杆菌属和丁酸杆菌属的SRB表现了高于其他菌株10%–20%还原能力^[12]。因此,持续研究SRB种属与硫酸盐还原性质的关系,对于拓展硫酸盐还原优势菌株的种质资源有一定的意义。

除SRB种属性质不同产生的影响外,SRB的硫酸盐还原性质同样会受到温度、碳源等多种因素的影响。陈旭等研究发现随着温度增加SRB活性增强,超过40℃的临界值后会影响SRB的正常生命活动^[13]。Zhao等利用硫酸盐还原率作为指标评估微生物对不同碳源的亲和性,研究发现丙酸盐在用作碳源时表现出最高的硫酸盐还原效率,其次是乳酸>乙醇>甲酸盐>D-山梨醇^[14]。pH值同样会影响SRB的硫酸盐还原性质^[15],Kushkevych等发现脱硫弧菌Vib-7的生长及硫酸盐还原能力在pH4.0和pH9.0条件下产生了

不同程度的抑制,且酸性条件的抑制更加明显^[16]。Suyasa等从沉积物中筛选出3株SRB,在pH3.0时能够存活,pH4.0–7.0时生长旺盛^[17]。由此可见,不同pH条件对SRB硫酸盐还原性质的影响存在差异^[18–19],对于硫酸盐还原机制的研究比较有限,需进一步探索。

本文以分离自渤海海洋沉积物中的SRB富集菌群为研究对象,通过测定不同pH值下混合菌群的生长情况和硫酸盐还原率,并结合高通量测序数据分析SRB种属特征,探究pH值对SRB种属变化对于硫酸盐还原性质的影响,并通过菌群相对丰度的变化对硫酸盐还原机制进行探索。

1 材料与amp;方法

1.1 培养条件

基本培养基(g/L):乳酸钠3.5, MgSO₄·7H₂O 2.0, NH₄Cl 1.0, Na₂SO₄ 0.5, CaCl₂·7H₂O 0.1, 酵母浸汁1.0, 121℃灭菌20min。1.5g FeSO₄·7H₂O和0.5g抗坏血酸预先制成无菌溶液单独加入上述培养基中。

菌培养条件:菌株按3%接种,厌氧螺口管装满培养基。pH6.0±0.5,培养温度35℃。

1.2 富集与培养

以海洋沉积物作为本研究的菌源,使用基本培养基作为硫酸盐还原菌的富集培养基。准确称取10g沉积物于烧杯中,于80℃热休克10min,然后将其接种于含100mL新鲜培养基的血清瓶中,盖好瓶塞,充氮气10min,放置于35℃、150r/min振荡培养。4d后,测定细胞密度OD₆₀₀和硫酸盐浓度,分析其硫酸盐还原能力。重复富集培养3次。最后以细胞密度的高低及硫酸盐还原能力的大小作为富集硫酸盐还原菌群的指标。

1.3 pH对硫酸盐还原的影响

在以硫酸盐为电子受体的硫酸盐还原培养体系中,分析pH对混合菌群生长和硫酸盐还原

性质的影响。SRB 富集混合菌群接种于含 SO_4^{2-} 的基本培养基中, 预先调整培养液 pH 值分别至 4.0、5.0、7.0、9.0、10.0。培养至对数期, 测定菌群细胞生长数据 OD_{600} 及硫酸盐还原率, 分析硫酸盐还原能力, 每组实验重复 3 次。

1.4 菌群组成分析

准确吸取 1 mL 菌液于 1.5 mL 无菌离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 留沉淀, 弃上清, 重复上述操作 3 次(菌量为覆盖 1.5 mL 离心管底部为佳)。再加入 500 μL TE 缓冲液使其混匀, 并于 12 000 r/min 离心 5 min, 留沉淀, 弃上清, 重复此步骤两次。采用 TIANamp Bacteria DNA Kit 试剂盒提取基因组 DNA, 具体步骤详见试剂盒说明书。确认 DNA 提取量及纯度满足要求后, 使用细菌通用引物对, 27F (5'-AGAGTTTGATC CTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTACCTTGT TACGACTT-3')进 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μL): 27F 引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 1492R 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 6 \times Phusion MasterMix 8 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 39 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

使用 ThermoFisher Scientific 公司的 Ion Plus Fragment Library Kit 文库试剂盒进行文库的构建。文库经 Qubit 定量检测合格后, 基于 Illumina HiSeq 测序平台进行高通量测序。测序得到的原始数据(raw reads)进行质控、过滤、去嵌合体, 得到有效数据(clean reads)^[20]。采用 UPARSE 软件(UPARSE v7.0.1001)将有效序列按照相似性为 97% 的阈值进行可操作性分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类 and 物种分类分析, 并将 OTU 和物种注释结合, 采用 Mothur 方法将 OTU 代表序列与 SSUrRNA 数据库进行比对(设定阈值为 0.8–1.0)^[21], 从而得到样品的 OTUs 和分类谱系在门、纲、目、科和属水平上

的基本分析结果。测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.5 测定方法

利用分光光度计测定菌液在波长 600 nm 处的吸光值, 以此来表示菌液细胞密度。采用 pH 计测定 pH 值。细菌硫酸盐还原能力通过测定培养液中 SO_4^{2-} 浓度的变化计算。使用硫酸钡比浊法测定 SO_4^{2-} 浓度, 菌液 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液 0.4 mL, 加入 4 mL 硫酸盐测定液和 0.6 mL 的重蒸水, 最后加入 3 mL BaCl_2 溶液, 定容至 10 mL 漩涡 40 s, 迅速转移至比色皿测定 420 nm 反应液吸收度, 根据标准曲线计算 SO_4^{2-} 浓度。利用 PICRUST 生物软件信息包, 基于 Greengene 数据库中 OTU 的 tree、OTU 上的基因信息构建古菌和细菌域全谱系的基因功能预测谱, 根据 16S rRNA 基因测序数据进行基于 KEGG 数据库的功能预测。

2 结果与分析

2.1 pH 对 SRB 菌群生长的影响

不同 pH 值下 SRB 菌群的生长和硫酸盐还原率见图 1。在设定的 pH 值范围内, 菌群的生长指标 OD_{600} 和硫酸盐还原率存在差异, 随着 pH 值的增加, 菌群的生长和硫酸盐还原率呈现出先上升后下降的趋势。pH 值为 4.0 时, 硫酸盐还原菌群的生长指标 OD_{600} 和硫酸盐还原率均处于较低水平, 表明菌群在较低 pH 值环境下难以利用硫酸盐作为电子受体进行生长。pH 值为 5.0 时, 细菌数量出现峰值, OD_{600} 相较 pH 4.0 增长 8.97 倍, 达到 0.34 ± 0.01 , 硫酸盐还原率表现出极显著增加 ($P < 0.001$), 由 $11.24\% \pm 1.64\%$ 上升至 $96.52\% \pm 0.44\%$; SRB 菌群在 pH 7.0、pH 9.0 和 pH 10.0 条件下的 OD_{600} 及硫酸盐还原率均显著减少 ($P < 0.01$), 细胞生长指标 OD_{600} 比 pH 5.0 时分别降低 27.73%、49.26% 和 90.86%, 硫酸盐还

原率分别降低 31.54%、74.91%和 83.82%，且硫酸盐还原率呈现与细菌生长相似的变化趋势。由此可见，实验所用 SRB 菌群的 pH 值耐受范围为 5.0–9.0，在 pH 5.0 时，SRB 菌群不仅生长指标 OD_{600} 最高，而且表现出了最佳的硫酸盐还原效率，为 SRB 菌群的最适 pH 值。

不同 pH 值条件下 SRB 菌群的生长与硫酸盐还原率存在一定相关性。如图 2 所示，对不同 pH 值下菌群的生长指标 OD_{600} 和硫酸盐还原率分别进行 Boltzmann 模型拟合、线性拟合和 ExpDec2 模型拟合分析，通过对拟合系数 R^2 进行对比 (图 2)，Boltzmann 模型的精确度 > ExpDec2 模型 > 线性模型。由此可见，菌群生长对硫酸盐还原率的影响符合 S 型曲线方程而非正相关，生长指标 OD_{600} 较低时硫酸盐还原率增长平缓，而生长指标 OD_{600} 较高时会抑制硫酸盐还原过程，这可能是由于细胞密度较低时，硫酸盐并不作为主要的电子受体参与菌体生长，而当细胞密度较高时，培养液中的硫酸盐被大部分消耗，硫酸盐还原受到限制。

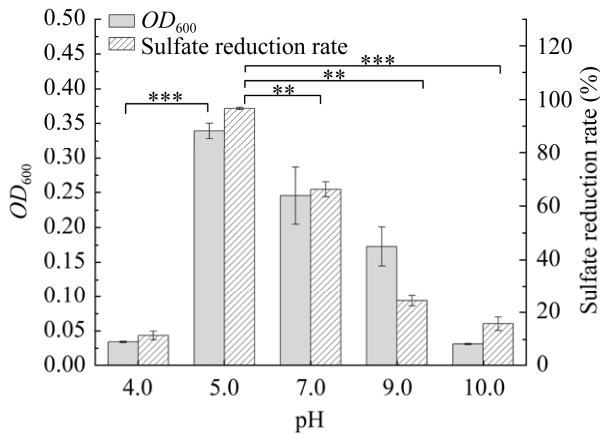


图 1 不同 pH 值对 SRB 菌群生长和硫酸盐还原率的影响

Figure 1 Effects of different pH on SRB flora growth and sulfate reduction rate. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

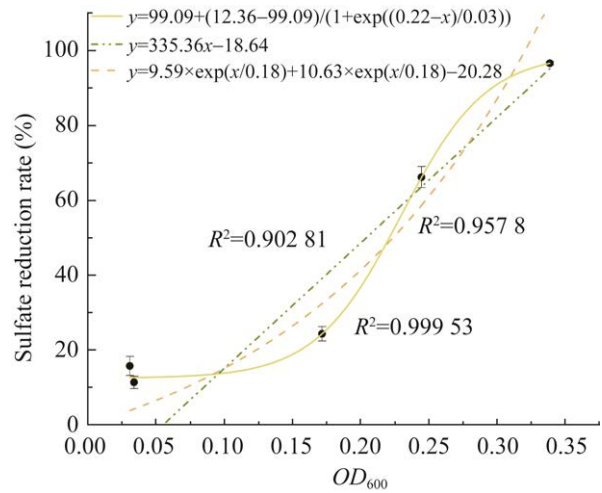


图 2 OD_{600} 与硫酸盐还原率相关性拟合曲线

Figure 2 Fitting curve of correlation between OD_{600} and sulfate reduction rate.

2.2 SRB 菌群硫酸盐还原性质

SRB 菌群生长指标 OD_{600} 、硫酸盐还原率和 pH 值变化量情况见图 3。在以硫酸盐为电子受体的培养体系中，培养的第 2 天，SRB 菌群开始进入对数期，SRB 菌群生长指标 OD_{600} 为 0.06 ± 0.01 ，硫酸盐还原率为 $10.93\% \pm 5.62\%$ ；此时培养液 pH 值出现小幅增长。进入对数期后，硫酸盐还原率随细胞生长逐步增加，培养液 pH 值在第 4 天出现显著增长 ($P < 0.001$)，由 5.0 增长至 6.89 ± 0.11 ，培养至第 5 天，SRB 菌群生长

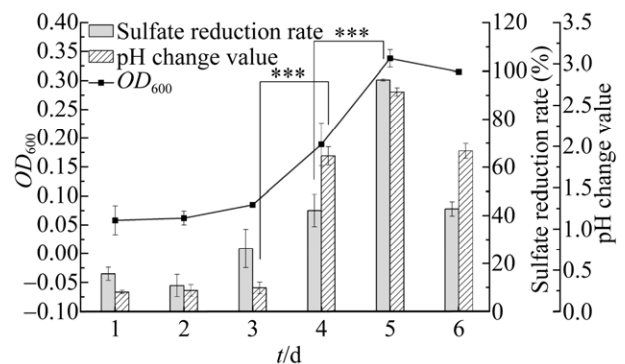


图 3 SRB 菌群生长 OD_{600} 、硫酸盐还原率、pH 值变化量

Figure 3 Growth of SRB bacteria OD_{600} , sulfate reduction rate and pH change value. ***: $P < 0.001$.

已处于稳定期, SRB 菌群生长指标 OD_{600} 达到 0.34 ± 0.02 , 硫酸盐还原率显著增长至 $96.52\% \pm 0.44\%$ ($P < 0.001$), pH 值已经增长至 7.67 ± 0.05 , 培养至第 6 天, 菌群生长、硫酸盐还原率和 pH 值变化量都出现一定程度的下降, 菌群生长进入衰减期。

探究 SRB 菌群的生长与硫酸盐还原率和 pH 值变化量的相关性有助于分析 pH 值对 SRB 菌群生长和硫酸盐还原率的影响。如图 4 所示, SRB 菌群的生长指标 OD_{600} 与硫酸盐还原率和 pH 值变化量的相关性同样符合 Boltzmann 模型。随着菌群生长, pH 值相较于硫酸盐还原率更早实现快速增长, 而 pH 值达到稳定后硫酸盐还原率快速增长。这可能是由于细胞密度较低时细胞维持生命活动消耗大量质子, 使培养液中质子含量快速下降影响菌群的硫酸盐还原过程, SRB 逐渐消耗质子, pH 值就会随之增加, 而当 pH 值趋于稳定后, 硫酸盐还原率因为 OD_{600} 的增长而进入快速生长阶段。

2.3 pH 值 SRB 菌群组成的影响

2.3.1 α 多样性分析

实验选取 pH 5.0、pH 7.0 和 pH 9.0 这 3 种条

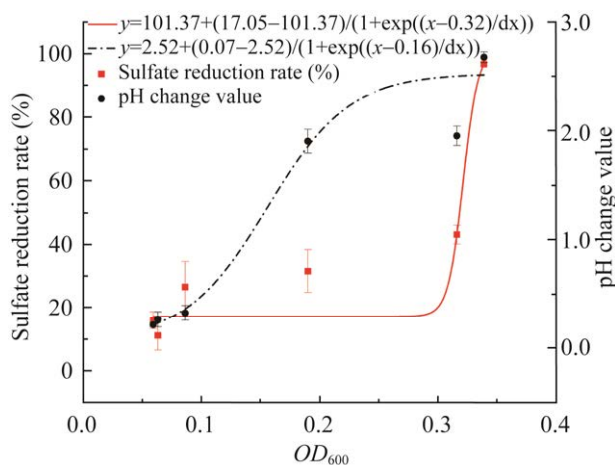


图 4 OD_{600} 与硫酸盐还原率和 pH 值变化量拟合曲线

Figure 4 Fitting curve of OD_{600} with sulfate reduction rate and pH change value.

件, 探究 SRB 菌群在酸性、中性和碱性条件下的菌群组成变化。不同 pH 值条件下 SRB 菌群的物种数量(OTU)、香农多样性(Shannon)、丰富度(Chao1)和均匀度(ACE)指数见表 1。pH 为 5.0 时, SRB 菌群的 OTU、Shannon、Chao1 及 ACE 指数均为较高水平。其中 OTU、Chao1 指数及 ACE 指数为最高; pH 7.0 和 pH 9.0 条件下, SRB 菌群的上述 3 类指标有所下降。Shannon 指数在 pH 5.0 和 pH 7.0 条件下无明显差异但显著高于 pH 9.0。

2.3.2 门水平组成分析

使用 UniFrac 算术平均的非加权分析法 (non-weighted analysis of arithmetic mean, UPGMA) 来分析不同 pH 值条件下 SRB 菌群组成的差异。如图 5 所示, 99.00% 以上的 reads 被聚类为变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、软壁菌门 (*Tenericutes*)、热孢菌门 (*Thermotogae*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、互养菌门 (*Synergistetes*)、阴沟单胞菌门 (*Cloacimonetes*)、纤细菌门 (*Gracilibacteria*)、蓝藻门 (*Cyanobacteria*) 和疣微菌门 (*Verrucomicrobia*)。门水平上的系统发育相对分析显示, 随着 pH 的变化, SRB 菌群中优势门不同。当 pH 值为 5.0 时, SRB 菌群中厚壁菌门丰度最高 (62.25%), 其次为变形菌门 (32.88%), 覆盖 SRB 菌群中 95.13% 的物种; 当 pH 值为 7.0 时, 变形菌门的丰度显著升高至 84.09% ($P < 0.01$), 同时厚壁菌门丰度显著降低为 7.44% ($P < 0.01$); 当 pH 值为 9.0 时, 变形菌门的丰度进一步增加 (90.91%)。由此可见, 变形菌门和厚壁菌门为

表 1 SRB 菌群 α 多样性相关数据

Table 1 Related data of alpha diversity of SRB flora

Sample name	Number of OTU	Chao1 index	ACE index	Shannon index
pH 5.0	256	310.67	284.29	3.82
pH 7.0	253	273.71	273.82	4.00
pH 9.0	183	199.53	208.30	0.97

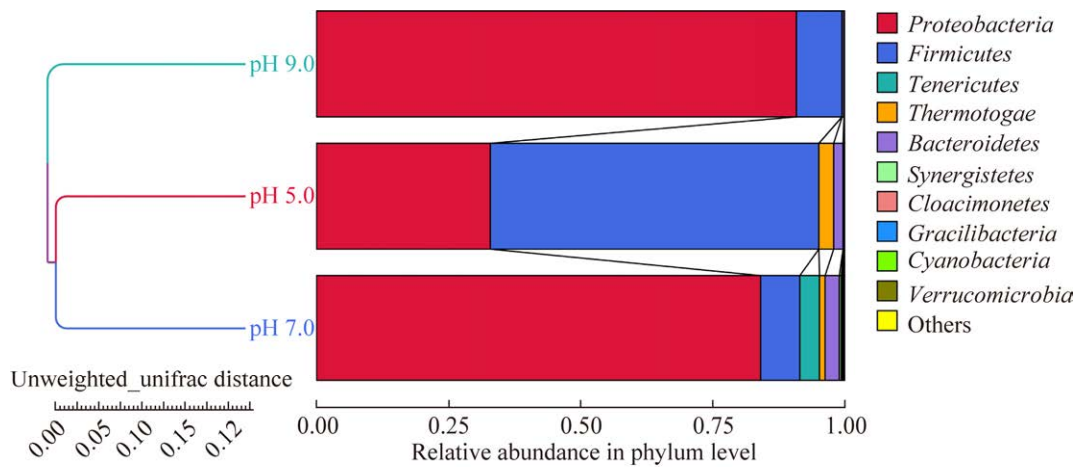


图 5 SRB 菌群门水平 UMPG 聚类分析图

Figure 5 UMPG cluster analysis diagram of SRB flora phylum level.

SRB 菌群的优势门类。随着 pH 值的增大，变形菌门的丰度逐渐增加，厚壁菌门的丰度下降，SRB 菌群组成在门水平上产生了显著变化。

2.3.3 属水平组成分析

基于进化图中的属级丰度分布进一步分析 SRB 菌群的前 15 个优势属的特征。如图 6 所示，

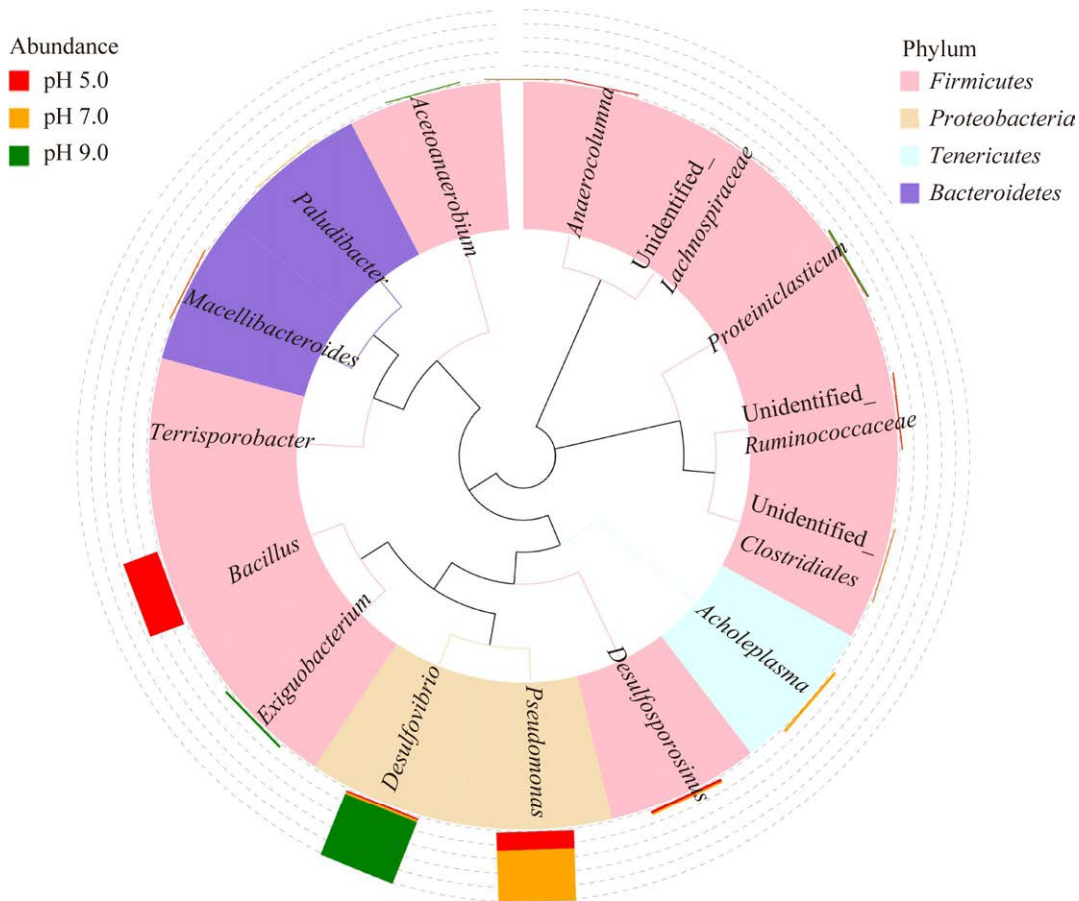


图 6 属水平物种聚类分析图

Figure 6 Cluster analysis diagram of genus level species.

在 pH 值为 5.0 时, SRB 菌群主要由厚壁菌门的芽孢杆菌属(*Bacillus*, 49.57%)和变形菌门的假单胞菌属(*Pseudomonas*, 24.77%)组成。pH 值增加为 7.0 时, 假单胞菌属丰度显著增加至 70.83% ($P<0.05$); pH 增加至 9.0, 变形菌门的脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)表现极显著增长, 数量达到 SRB 菌群总量的 90.12% ($P<0.01$)。由此可见, 不同 pH 值培养条件下, SRB 菌群在属水平上发生显著变化, pH 5.0 时优势菌属为芽孢杆菌属和假单胞菌属。

2.4 硫酸盐还原相关基因预测

探究不同 pH 值条件下硫酸盐还原过程相关基因的相对丰度有助于分析硫酸盐还原机制。如图 7 所示, 根据生成产物的不同可将硫酸盐还原过程分为同化性硫酸盐还原(assimilatory sulfate reduction, ASR)和异化性硫酸盐还原(dissimilatory sulfate reduction, DSR)。胞外硫酸盐(SO_4^{2-})在硫酸盐转运系统底物结合蛋白的介导下进入胞内, DSR 途径中, SO_4^{2-} 在硫酸腺苷转移酶的作用下生成腺嘌呤磷酰硫酸盐

(adenosine 5'-phosphosulfate, APS), 生成的 APS 被还原为 H_2S 排出胞外; 而 ASR 途径中 APS 首先被活化为 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS), PAPS 被还原为硫化物并与丝氨酸合成半胱氨酸。

根据 16S rRNA 基因测序数据, 利用 PICRUST 软件对硫酸盐还原相关基因进行筛选, SRB 菌群内硫酸盐还原相关基因稳定表达。筛选出 ASR 相关基因(*cysPUMA*、*sat*、*cysND*、*cysC*、*cysJI*、*cysH*、*cysE* 和 *cysK*)和 DSR 相关基因(*cysPUMA*、*sat*、*aprAB* 和 *dsrAB*)。SRB 菌群不同 pH 值条件下 ASR 和 DSR 基因的相对丰度如图 8 所示。不同 pH 值条件下 ASR 基因和 DSR 基因相对丰度存在差异。pH 值为 5.0 和 7.0 时, ASR 基因相对丰度显著高于异化型还原基因相对丰度($P<0.01$); pH 值为 9.0 时, DSR 基因的相对丰度高于 ASR 基因。由此可见, 在酸性或中性条件下, SRB 菌群主要由 ASR 主导还原硫酸盐, 而在碱性条件下, SRB 菌群主要由 DSR 主导还原硫酸盐。

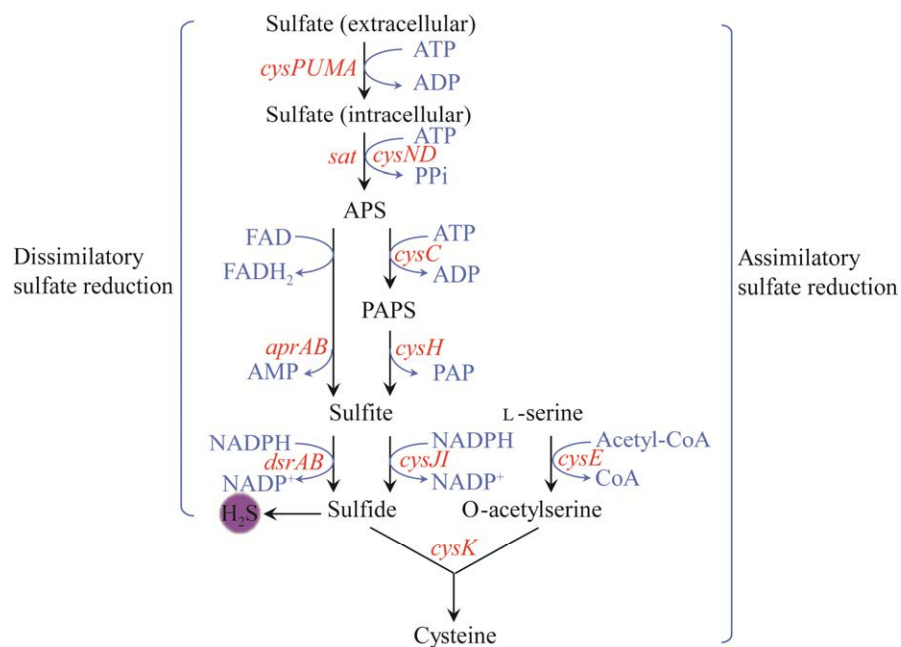


图 7 两种硫酸盐还原代谢途径

Figure 7 Two sulfate reduction metabolic pathways.

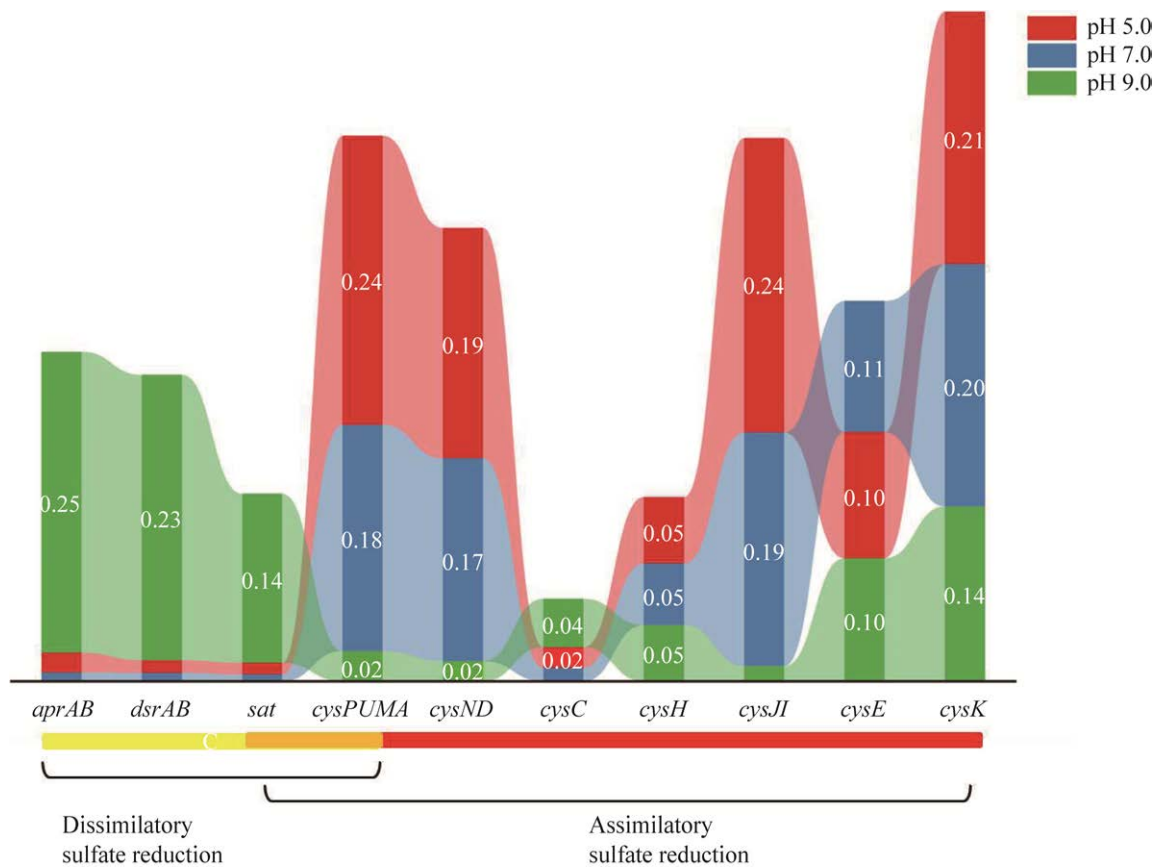


图 8 硫酸盐还原基因丰度变化图

Figure 8 Variation diagram of sulfate reduction gene abundance.

为进一步探究不同 pH 值条件下 SRB 菌群硫酸盐还原基因相对丰度变化的原因,将硫酸盐还原相关基因丰度与优势菌属 (*Bacillus*、*Pseudomonas*) 丰度进行相关性分析。如图 9 所示,根据相关系数,优势菌属丰度与大部分 ASR 相关基因(*cysPUMA*、*sat*、*cysND*、*cysJI*、*cysH*、*cysE* 和 *cysK*) 丰度呈正相关,而与 DSR 相关基因(*sat*、*aprAB* 和 *dsrAB*) 丰度呈负相关。这说明 pH 值为 5.0 的条件下, *Bacillus*、*Pseudomonas* 的富集是 ASR 途径较为活跃的原因。

3 讨论

将菌群置于不同 pH 值的培养条件下,从细胞生长指标 OD_{600} 和硫酸盐还原率可以看出,菌

群的生长和硫酸盐还原性受到 pH 值不同程度的影响。相关研究表明,在低 pH 值条件下,天然嗜酸或驯化群体能有效去除硫酸盐^[22-23]。Panova 等^[15]于金矿开采的微生物群落中分离出一株脱硫孢子菌属 SRB, 将其在 pH 4.0–7.0 条件下进行培养, 结果表明在 pH 5.5 培养条件下生长和硫酸盐还原率达到最高。Frolov 等^[24]研究 pH 值对菌株 SRB 菌株生长的影响, 随着 pH 值的增加, 菌株的生长呈现先增长后下降的趋势, pH 4.5 是菌株的最适 pH 值。张艳梅等^[25]采用低 pH 冲击实验探究混合菌群在酸胁迫条件下的脱硫性能, 随着 pH 值的降低, 6 种菌株按照一定比例形成的混合菌群在生长和硫酸盐还原率等方面均优于各单菌体系, 当 pH 值降至 4.5 时, 混

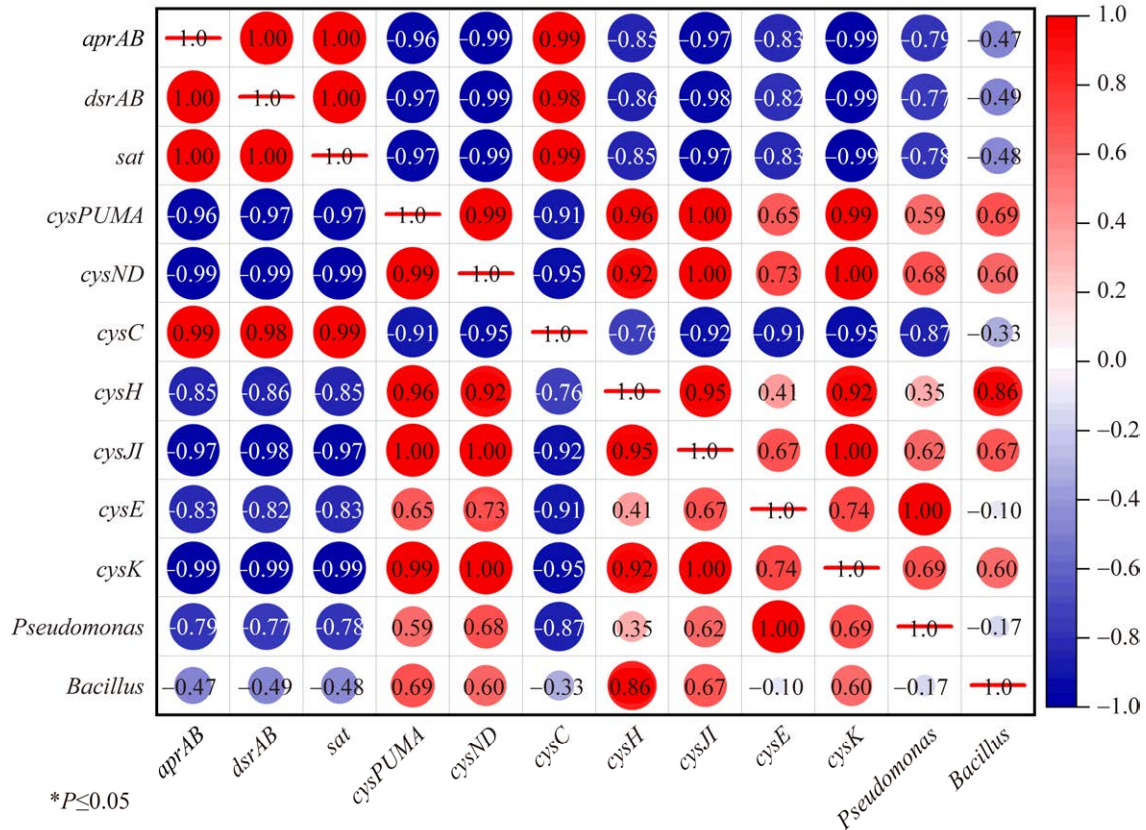


图9 硫酸盐还原基因丰度与优势菌属丰度相关性分析

Figure 9 Correlation analysis of sulfate reduction genes and dominant bacteria.

合菌群能够达到 90%的硫酸盐还原率，而单个菌株的硫酸盐还原受到抑制甚至无法生长。在本研究中，菌群在 pH 5.0 的培养条件下生长和硫酸盐还原率达到最高，表明沉积物中的菌群经过硫酸盐还原体系的富集培养后具备一定的耐酸性。

Tran 等^[26]检测 pH 5.0、pH 6.0 和 pH 7.4 培养条件下 SRB 的硫酸盐还原率，SRB 在 pH 5.0 和 pH 6.0 时保持着较高的硫酸盐还原率，而在 pH 7.4 时，硫酸盐还原率最大值是其他培养条件下的一半。在菌群耐受范围之内，硫酸盐还原速率受环境的质子浓度的影响。根据硫酸盐还原途径， SO_4^{2-} 首先消耗 ATP 被激活为 APS，反应见公式(1)。

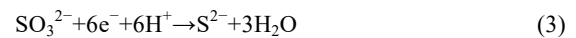


生成的 APS 在 APS 还原酶的作用下继续转

化成 SO_3^{2-} 和 AMP，反应见公式(2)。



SO_3^{2-} 中硫原子拥有自由电子对，失去 6 个电子被还原为 S^{2-} ，反应见公式(3)。



由此可见，硫酸盐还原是一个消耗质子的过程^[27]，较低的 pH 值或较高的质子浓度下，硫酸盐还原速率较高，消耗培养液中的质子使 pH 值上升。实验采用 Postgate 改良硫酸盐还原培养体系，加入抗坏血酸抗氧化剂防止培养液中 SO_3^{2-} 被氧化影响反应结果的判断。抗坏血酸属于己糖醛基酸，解离常数 pK_1 为 4.17，在酸性条件下稳定而遇碱中和分解。张慧等^[28]探究不同 pH 值对抗坏血酸稳定性的影响，抗坏血酸在 pH 3.0 时溶液中含量最高，随着 pH 值的增加，抗坏血

酸的含量逐渐降低,表明抗坏血酸在 pH 3.0 稳定性最高。由此可见,在 pH 5.0 的硫酸盐还原体系的培养下,抗坏血酸保持稳定性促进了硫酸盐还原的正向进行。因此,在 pH 值低的情况下,将更有利于硫酸盐还原过程的进行。但 SRB 菌群对于 pH 值存在耐受范围。Tran 等^[26]将含有 SRB 物种的富营养人工海水培养基在 37 °C、pH 值为 4.0–7.4 的条件下进行培养,发现 pH 为 4.0 时细菌由于环境 pH 过低生长极缓,且硫产量几乎为零。本实验中,pH 4.0 的培养条件下,菌群生长和硫酸盐还原都受到抑制。这表明,pH 值过低会使部分细菌受到冲击而无法正常地利用硫酸盐作为电子供体进行生长代谢。

本实验中,对 SRB 菌群在 pH 5.0、pH 7.0 和 pH 9.0 下的菌群组成变化进行分析,根据高通量测序数据显示,pH 5.0 培养条件下的 SRB 菌群物种数量最多,并呈现较高的丰富度和多样性。SRB 菌群在 pH 5.0 的培养条件下优势菌属为厚壁菌门芽孢杆菌属和变形菌门假单胞菌属。相关研究表明,两类菌属具有硫酸盐还原能力和酸性环境的适应性。Akinpelu 等^[29]利用以芽孢杆菌为主的微生物群落处理硫酸盐含量较高的酸性矿山废水,在 pH 5.6 培养条件下的生物反应器中硫酸盐还原率达到 85%,实验结果表明,芽孢杆菌对于极端酸性 pH 环境具有足够的适应性。Nguyen 等^[30]从酸性硫酸盐土壤中分离出 VNW02、TLS06、VNW64 和 VNS89 四株沼泽红假单胞菌,在 pH 4.5 和 pH 5.0 的培养条件下能够以硫酸盐作为电子受体保持硫酸盐的还原性质,且能还原 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 等重金属。

硫酸盐还原途径根据生成产物的不同,一般可分为 DSR 和 ASR 还原两种^[31]。DSR 以硫酸盐为电子受体,将硫酸根还原为 H_2S 气体;ASR 以硫酸盐为电子受体,生成亚硫酸盐后与胞内色氨酸结合形成半胱氨酸并固定在蛋白质中,相

于异化还原途径减少了 H_2S 有毒气体的排出^[3]。许多研究发现,ASR 在不同环境下往往是较为活跃的硫酸盐还原途径^[32-33]。Li 等^[34]对不同 pH 值条件下油藏中微生物的硫酸盐还原相关基因进行预测后发现,cys 基因即 ASR 途径基因丰度较高,ASR 相关基因在所有 pH 值培养条件下均可表达,而 DSR 相关基因在酸性条件下表达量较低。Li 等^[35]发现,在低硫酸盐环境下,DSR 占优势,随着硫酸盐的增加,在高硫酸盐环境下,ASR 最终取代 DSR 成为主要的硫酸盐还原途径。本研究中,对硫酸盐还原有关基因进行预测注释,结果表明在 pH 5.0 的培养条件下,ASR 基因丰度高于 DSR 基因,SRB 菌群在 pH 5.0 条件下的高硫酸盐还原效率的形成是由 ASR 途径所主导。ASR 最终产物半胱氨酸为抗氧化剂谷胱甘肽的前体,谷胱甘肽对于维持细菌中的氧化还原稳态是至关重要的^[36],同时酸性条件更有利于保持谷胱甘肽的稳定性^[37],这可能是 SRB 菌群在 pH 5.0 培养条件下 ASR 途径突出和生长量最高的原因,在 pH 5.0 的培养条件下,SRB 菌群主要进行 ASR 生成谷胱甘肽前体物质半胱氨酸维持氧化还原稳态,并为菌群的生长提供良好条件。

在硫酸盐还原培养体系中,SRB 菌群能够在 pH 5.0 条件下保持较高的生长量和硫酸盐还原率,这为利用硫酸盐还原解决如酸性矿山废水等重金属污染问题提供了新型解决方案。实验所用 SRB 菌群在酸性条件下以 ASR 为主要硫酸盐还原途径,在保持高硫酸盐还原效率的同时能够减少 H_2S 的排出,拓宽了环境友好型环境微生物的种质资源,经过驯化后具有一定的环境微生物生物制剂的应用前景。

4 结论

SRB 菌群分离自海洋沉积物,在硫酸盐还

原培养体系中,菌群能够以硫酸盐为电子受体进行硫酸盐还原。SRB 菌群在不同 pH 值培养条件下生长和硫酸盐还原率呈现先增长后下降的趋势, pH 5.0 时生长和硫酸盐还原率均极显著增长 ($P < 0.001$) 并达到峰值, 分别为 0.34 ± 0.01 和 $96.52\% \pm 0.44\%$ 。菌群生长和硫酸盐还原率、pH 值变化量之间符合 Boltzmann 模型, pH 值先于硫酸盐还原率实现快速增长。根据高通量测序数据分析, 菌群在 pH 5.0 培养条件下的丰富度和多样性最高, 优势菌属为厚壁菌门的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和变形菌门的假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。利用 PICRUSt 软件对硫酸盐还原相关基因进行预测, 不同 pH 值培养条件下, SRB 菌群硫酸盐还原相关基因的相对丰度有所差别。pH 5.0 时 ASR 相关基因的活跃表达是硫酸盐还原率最高的重要原因。研究结果可拓宽 SRB 种质资源, 为 SRB 在微生物环境治理方面的应用提供实验支持, 进一步推动微生物硫酸盐还原机制研究进程。

参考文献

- [1] LAN X, ZHANG J, WANG ZF, ZHANG RY, SAND WG, ZHANG L, DUAN JZ, ZHU QJ, HOU BR. Corrosion of an AZ31B Magnesium Alloy by Sulfate-Reducing Prokaryotes in a Mudflat Environment[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(5): 839.
- [2] WAN HH, ZHANG TS, XU ZX, RAO Z, ZHANG GA, LI GF, LIU HF. Effect of sulfate reducing bacteria on the galvanic corrosion behavior of X52 carbon steel and 2205 stainless steel bimetallic couple[J]. *Corrosion Science*, 2023, 212: 110963.
- [3] ZENG Q, HAO T, HAMISH RM, MARK CM, CHEN G. Recent advances in dissimilatory sulfate reduction: from metabolic study to application[J]. *Water Research*, 2019, 150: 162-181.
- [4] MOTHE GK, KANNAN P, GOPAL D. Heavy metal removal from aqueous solution using sodium alginate immobilized sulfate reducing bacteria: mechanism and process optimization[J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 218: 486-496.
- [5] JOO JO, CHOI JH, KIM IH, KIM YK, OH BK. Effective bioremediation of cadmium (II), nickel (II), and chromium (VI) in a marine environment by using *Desulfovibrio desulfuricans*[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2015, 20(5): 937-941.
- [6] HWANG SK, JHO EH. Heavy metal and sulfate removal from sulfate-rich synthetic mine drainages using sulfate reducing bacteria[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 635: 1308-1316.
- [7] 陈秀云, 冯杰, 王红梅, 刘邓, 窦艳芳, 张江华, 马丽媛. 山西阳泉老窑水硫酸盐还原菌的分离鉴定及其还原功能驯化[J]. *微生物学报*, 2022, 62(6): 2104-2118.
CHEN XY, FENG J, WANG HM, LIU D, DOU YF, ZHANG JH, MA LY. Isolation and identification of sulfate-reducing bacteria in goaf water in Yangquan of Shanxi Province and domestication for the reduction[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(6): 2104-2118 (in Chinese).
- [8] 杨丽平, 郑小红, 曾国驱, 许玫英, 孙国萍. 1 株具硫酸盐还原功能的柠檬酸杆菌的分离及其生理特性研究[J]. *环境科学*, 2010, 31(3): 815-820.
YANG LP, ZHENG XH, ZENG GQ, XU MY, SUN GP. Isolation and characterization of a sulfate reducing *Citrobacter* sp. strain SR3[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2010, 31(3): 815-820 (in Chinese).
- [9] TAKAHASHI A, KOJIMA H, WATANABE M, FUKUI M. *Pseudodesulfovibrio sediminis* sp. nov., a mesophilic and neutrophilic sulfate-reducing bacterium isolated from sediment of a brackish lake[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(6): 1-6.
- [10] PÉREZ-BERNAL MF, BRITO EMS, BARTOLI M, AUBÉ J, OLLIVIER B, GUYONEAUD R, HIRSCHLER-RÉA A. *Desulfobotulus mexicanus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from the sediment of an alkaline crater lake in Mexico[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(5): 3219-3225.
- [11] 黄焯, 刘双江, 姜成英. 微生物腐蚀及腐蚀机理研究进展[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(7): 1699-1713.
HUANG Y, LIU SJ, JIANG CY. Microbiologically influenced corrosion and mechanisms[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(7): 1699-1713 (in Chinese).
- [12] 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[J]. *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[J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2018, 38(4): 408-412 (in Chinese).
- [13] 陈旭, 马炯, 李鑫, 吴明, 宋博. 温度与SRB协同作用下X70钢在海泥模拟溶液中应力腐蚀行为研究[J]. *中国腐蚀与防护学报*, 2019, 39(6): 477-483. CHEN X, MA J, LI X, WU M, SONG B. Synergistic effect of SRB and temperature on stress corrosion cracking of X70 steel in an artificial sea mud solution[J]. *Journal of Chinese Society for Corrosion and Protection*, 2019, 39(6): 477-483 (in Chinese).
- [14] ZHAO CR, CHEN N, LIU T, FENG CP. Effects of adding different carbon sources on the microbial behavior of sulfate-reducing bacteria in sulfate-containing wastewater[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 392: 136332.
- [15] PANOVA IA, IKKERT O, AVAKYAN MR, KOPITSYN DS, MARDANOV AV, PIMENOV NV, SHCHERBAKOVA VA, RAVIN NV, KARNACHUK OV. *Desulfosporosinus metallidurans* sp. nov., an acidophilic, metal-resistant sulfate-reducing bacterium from acid mine drainage[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2021, 71(7): 004876.
- [16] KUSHKEVYCH I, DORDEVIĆ D, VÍTEŽOVÁ M. Analysis of pH dose-dependent growth of sulfate-reducing bacteria[J]. *Open Medicine*, 2019, 14(1): 66-74.
- [17] SUYASA WB, SUPRIHATIN IE, SUASTUTI GDA, PANCADEWI GSK. Deposition of heavy metals on sulphate reducing bacteria bioreactor treatment[J]. *Nature Environment & Pollution Technology*, 2019, 18(2): 395-402.
- [18] SÁNCHEZ-ANDREA I, van der GRAAF CM, HORNUNG B, BALE NJ, JARZEMBOWSKA M, SOUSA DZ, RIJPSTRA WIC, SINNINGHE DAMSTÉ JS, STAMS AJM. Acetate degradation at low pH by the moderately acidophilic sulfate reducer *Acididesulfobacillus acetoxydans* gen. nov. sp. nov.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 816605.
- [19] DONG YR, WANG JB, GAO ZQ, DI JZ, WANG D, GUO XY, HU ZY, GAO XL, WANG YF. Study on growth influencing factors and desulfurization performance of *Sulfate reducing bacteria* based on the response surface methodology[J]. *ACS Omega*, 2023, 8(4): 4046-4059.
- [20] MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [21] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, GERKEN J, SCHWEER T, YARZA P, PEPLIES J, GLÖCKNER FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [22] WANG F, PENG SQ, FAN L, LI Y. Improved sulfate reduction efficiency of sulfate-reducing bacteria in sulfate-rich systems by acclimatization and multiple-grouting[J]. *Alexandria Engineering Journal*, 2022, 61(12): 9993-10005.
- [23] MOOSA S, HARRISON STL. Product inhibition by sulphide species on biological sulphate reduction for the treatment of acid mine drainage[J]. *Hydrometallurgy*, 2006, 83(1): 214-222.
- [24] FROLOV EN, ZAYULINA KS, KOPITSYN DS, KUBLANOV IV, BONCH-OSMOLOVSKAYA EA, CHERNYH NA. *Desulfothermobacter acidiphilus* gen. nov., sp. nov., a thermoacidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(3): 871-875.
- [25] 张艳梅, 袁涛, 李江, 刘亚洁, 孙占学. 高效SRB混合菌群构建及其在酸胁迫条件下的性能研究[J]. *化工学报*, 2023, 74(6): 2599-2610. ZHANG YM, YUAN T, LI J, LIU YJ, SUN ZX. Study on the construction of high-efficient SRB mixed microflora and its performance under acid stress[J]. *CIESC Journal*, 2023, 74(6): 2599-2610 (in Chinese).
- [26] TRAN TTT, KANNOORPATTI K, PADOVAN A, THENNADIL S. Effect of pH regulation by sulfate-reducing bacteria on corrosion behaviour of duplex stainless steel 2205 in acidic artificial seawater[J]. *Royal Society Open Science*, 2021, 8(1): 200639.
- [27] LU J, CHEN TH, WU J, WILSON PC, HAO XY, QIAN JZ. Acid tolerance of an acid mine drainage bioremediation system based on biological sulfate reduction[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(22): 10401-10406.
- [28] 张慧, 夏厚林, 杨孟妮, 徐庆凯, 邓放. 不同pH值对维生素C注射液的影响研究[J]. *中药与临床*, 2016, 7(1): 34-36. ZHANG H, XIA HL, YANG MN, XU QK, DENG F. Influence of different pH on vitamin C injection[J].

- Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica, 2016, 7(1): 34-36 (in Chinese).
- [29] AKINPELU EA, NTWAMPE SKO, FOSSO-KANKEU E, NCHU F, ANGADAM JO. Performance of microbial community dominated by *Bacillus* spp. in acid mine drainage remediation systems: a focus on the high removal efficiency of SO_4^{2-} , Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , and Sr^{2+} [J]. *Heliyon*, 2021, 7(6): e07241.
- [30] NGUYEN KQ, KANTACHOTE D, ONTHONG J, SUKHOM A. Al^{3+} and Fe^{2+} toxicity reduction potential by acid-resistant strains of *Rhodopseudomonas palustris* isolated from acid sulfate soils under acidic conditions[J]. *Annals of Microbiology*, 2018, 68(4): 217-228.
- [31] YU H, SUSANTI D, McGLYNN SE, SKENNERTON CT, CHOUREY K, IYER R, SCHELLER S, TAVORMINA PL, HETTICH RL, MUKHOPADHYAY B, ORPHAN VJ. Comparative genomics and proteomic analysis of assimilatory sulfate reduction pathways in anaerobic methanotrophic archaea[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2917.
- [32] ZHENG Y, BU NS, LONG XE, SUN J, HE CQ, LIU XY, CUI J, LIU DX, CHEN XP. Sulfate reducer and sulfur oxidizer respond differentially to the invasion of *Spartina alterniflora* in estuarine salt marsh of China[J]. *Ecological Engineering*, 2017, 99: 182-190.
- [33] ZHU P, WANG YP, SHI TT, ZHANG XL, HUANG GQ, GONG J. Intertidal zonation affects diversity and functional potentials of bacteria in surface sediments: a case study of the Golden Bay mangrove, China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2018, 130: 159-168.
- [34] LI Y, ZHANG YY, XUE S. pH mediated assemblage of carbon, nitrogen, and sulfur related microbial communities in petroleum reservoirs[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 952285.
- [35] LI J, LI AM, LI Y, CAI MH, LUO G, WU YP, TIAN YC, XING LQ, ZHANG QX. PICRUST2 functionally predicts organic compounds degradation and sulfate reduction pathways in an acidogenic bioreactor[J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2022, 16(4): 47.
- [36] HELBIG K, BLEUEL C, KRAUSS GJ, NIES DH. Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(15): 5431-5438.
- [37] 邓张双, 黄蓉, 刘秀继, 李知洪, 姚鹃, 李啸, 杜维力, 邹坤, 龚大春. 酵母产还原型谷胱甘肽制备过程中的稳定性研究[J]. *三峡大学学报(自然科学版)*, 2020, 42(6): 97-102.
- DENG ZS, HUANG R, LIU XJ, LI ZH, YAO J, LI X, DU WL, ZOU K, GONG DC. Study on the stability of reduced glutathione in preparation from yeast[J]. *Journal of China Three Gorges University (Natural Science)*, 2020, 42(6): 97-102 (in Chinese).