

# 珠江沉积物中硫酸盐还原菌的分离筛选及其性质鉴定

王原, 罗剑飞, 林炜铁

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 由于能够形成可以与重金属反应形成沉淀的硫化物, 硫酸盐还原菌对于改善水体质量、确保食品和饮水安全上有着重要意义。从珠江沉积物中分离出一株硫酸盐还原菌 SCUT-3, 该细菌呈杆状、革兰氏染色为阴性, 能够以乳酸、乙酸、丙酸作为唯一碳源, 以硫酸盐作为电子受体进行生长, 不能以葡萄糖、乙醇等作为唯一碳源, 硫代硫酸盐和亚硫酸盐为电子受体进行生长。对该细菌的 16S rRNA 基因和 *aprA* 基因序列进行分析, 发现其 16S rRNA 基因与 *Desulfovibrio acrylicus* 的 16S rRNA 基因的一致性最高, 达到 87%, 其 *aprA* 基因与 *Desulfovibrio vulgaris* str. Hildenborough 的 *aprA* 基因一致性最高 (通过 blastx 比对), 达到 90%。因此可判断其属于脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*), 但两基因的序列与已知序列同源性均不超过 91%, 判断该细菌属于脱硫弧菌属中的一个新种。

**关键词:** 珠江沉积物; 硫酸盐还原菌; 16S rRNA 基因; *aprA* 基因

文章编号: 1673-9078(2013)7-1586-1590

## Isolation and Identification of Sulfate-reducing Bacteria from Pearl River Sediment

WANG Yuan, LUO Jian-fei, LIN Wei-tie

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China)

**Abstract:** Sulfate-reducing bacteria (SRB) have great significance in improving the quality of water resources and ensuring the safety of food and drinking water, due to their ability in producing sulfides which could precipitate heavy metal ions in the form of metal sulfides. SCUT-3, a rod shaped gram negative sulfate reducing bacterium, was isolated from the Pearl River sediment sample. SCUT-3 can utilize lactate, acetate and propionate as sole carbon source and sulfate as the terminal electron acceptor. Glucose and ethanol could not be utilized as carbon sources. Thiosulfate and sulfite could not be utilized as terminal electron acceptor. Phylogenetic analysis based on *aprA* and 16S rRNA genes slightly differed between each other. SCUT-3 showed the highest similarity on the 16S rRNA genes (87%) to *Desulfovibrio acrylicus*, and the highest similarity on the *aprA* genes (90%, by blastx) to *Desulfovibrio vulgaris* str. Hildenborough, indicating that SCUT-3 belonged to the genus *Desulfovibrio*. But the relative low similarity (91% utmost) indicates that the new isolated strain might belong to a new species of this genus.

**Key words:** pearl river Sediment; sulfate-reducing Bacteria (SRB); 16 S rRNA gene; *aprA* gene

珠江是中国第三长河流, 其流域覆盖了云南、贵州、广西、广东、湖南、江西六省以及越南的一部分地区。在该地区的用水总量中, 各类农业用水占 56.9%, 居民生活用水占 12.5%。目前, 珠江水质 BOD<sub>5</sub>、COD、氨氮、总磷、粪大肠菌群等污染严重, 对径流地区的饮水和食品安全造成威胁<sup>[1]</sup>。

硫酸盐还原细菌 (SRB, *Sulfate Reducing Bacteria*)

收稿日期: 2013-04-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21076090)

通讯作者: 林炜铁 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 环境微生物和发酵工程

是一类以有机物作为电子供体将硫酸盐还原为硫化氢的严格厌氧微生物。硫酸盐还原细菌有 60 余属<sup>[2]</sup>, 典型的 SRB 有 *Desulfovibrio*、*Desulfohalobium*、*Desulfomonas*、*Desulfococcus*、*Desulfobacter*、*Desulfosarcina*、*Desulfonema* 和 *Desulfotomaculum* 等, 它们主要属于 *Deltaproteobacteria* ( $\delta$ -变形菌) 纲的 *Desulfovibrionales* (脱硫弧菌) 目和 *Desulfobacterales* (脱硫杆菌) 目。SRB 的形态结构、生理特征各不相同。还有少数古菌也可以以硫酸盐作为最终电子受体进行生长<sup>[3]</sup>。

硫酸盐还原细菌广泛分布于土壤、海水、污水等

厌氧环境中, 其对环境中有机的利用发挥着重要的作用, 据报道, 硫酸盐还原细菌对自然界中有机物分解的贡献率高达 50%<sup>[4]</sup>。由于 SRB 在代谢中产生的硫化氢可以与水体中存在的重金属离子(如铁、铜、镉、铅等)形成不溶于水的硫化物沉淀, 从而降低水体中的重金属含量<sup>[2]</sup>。已有研究表明, SRB 处理能够有效去除矿业废水中的铜、铁、锌等重金属离子<sup>[2]</sup>。因此, 有理由相信 SRB 同样可以用来处理自然水体和饮用水源中的重金属污染。

近年来随着部分产业不断向我国西部转移, 在珠江上游地区出现了越来越多的高污染、高能耗的产业, 排放出了越来越多的重金属污染物。珠江下游每年的锰通量约为 15634 吨、铅 2017 吨、铬 1823 吨<sup>[5]</sup>, 而考虑到流域内生物对重金属的吸收以及沉降作用, 全流域区域内所排放的重金属量应当更为可观。其直接结果就是频频发生的重金属污染水体事件, 比如广西龙江镉渣污染事件和韶关的血铅事件, 这带来了公众对饮水质量的极大关切。而由于土壤对水体中重金属存在着富集作用, 使用受污染水体灌溉的农作物也面临着重金属污染的较大风险<sup>[6]</sup>。水产养殖产品的重金属污染风险高于农产品, 这是因为: (1)土壤中的重金属通常以络合物或颗粒物的形式存在, 这使得其难以被水流带走, 但同时也难以被植物利用<sup>[6]</sup>; (2)多数农产品的可食部分有限, 根据研究, 植物对重金属的富集有器官和部位的差别, 其中多数粮食作物的主要富集部位是其根系和茎秆, 而非籽粒<sup>[7]</sup>。在广西北部湾地区海域进行养殖的贝类中, 已经出现了重金属含量超标的现象<sup>[8]</sup>。在这种意义上, 硫酸盐还原细菌对于改善珠江流域的水体质量和该地区的饮水、食品安全有着较为重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 培养基

本实验采用改进后的 Postgate 培养基<sup>[9]</sup>, 其成分如下(单位均为 g/L): 氯化镁 0.4、氯化铵 1.0、硫酸钠 3.0、酵母膏 1.0、磷酸氢二钾 0.5、氯化钙 0.05、抗坏血酸 0.1、巯基乙酸钠 0.1、乳酸钠 3.0。如有必要, 还可以添加 0.05g/L 的硫酸亚铁。在以上培养基成分基础上添加 1.5%的琼脂即得到固体 Postgate 培养基。

#### 1.1.2 试剂

醋酸铅试纸、Tris、EDTA、SDS、CTAB、溶菌酶溶液(50 mg/mL, TAKARA)、蛋白酶 K 溶液(20 mg/μL, TAKARA)、琼脂糖(西班牙产)、厌氧反应袋(三菱化学)、氧气指示剂(三菱化学)。

## 1.2 SRB 的分离纯化

### 1.2.1 样品的采集

样品为珠江河床底部的沉积物, 采集于广州市番禺区穗石村穗石码头, 采样点的水深约为 2 m。样品采集后迅速带回实验室, 保存于 4 °C 冰箱内。

### 1.2.2 SRB 的富集

样品以  $0.1 \times 10^{-2}$  g/mL 的接种量接种至改进的 Postgate 培养基中, 在血清瓶内 30 °C 培养。待培养基底部出现黑色沉淀, 且瓶口气体可以使湿润的醋酸铅试纸变黑时, 表示瓶内已有 SRB 生长, 可以用于进一步分离和纯化。

### 1.2.3 SRB 的分离与纯化

取 1 mL 富集培养液进行梯度稀释, 稀释梯度从不稀释到稀释  $10^5$  倍, 每个梯度取 100 μL 稀释液在固体 Postgate 培养基平板上涂布均匀, 将平板装入厌氧袋中进行 30 °C 厌氧培养。在平板上出现菌落后, 将其挑取到新的平板上继续培养, 重复培养直至菌落形态均一。

## 1.3 SRB 生理生化特性的初步鉴定

### 1.3.1 菌落与细菌个体的形态与特征

在得到分离菌单菌落后, 观察该菌落在含有硫酸亚铁的培养基和不含亚铁盐的培养基上的形状与颜色。将分离菌用草酸铵-结晶紫染液染色后, 在显微镜下观察其大小、形态并拍照。随后对细菌进行革兰氏染色观察。

### 1.3.2 测定分离菌的硫源谱与碳源谱

将分离菌接种入液体培养基中 30 °C 过夜培养后, 取 0.5 mL 菌液接种入装有 10 mL 液体培养基的试管中, 用胶塞塞紧。在测定硫源谱的时候, 原培养基中的硫酸钠被替代为硫代硫酸钠和亚硫酸钠, 其余成分不变; 在测定碳源谱的时候, 原培养基中的乳酸钠被替代为碳酸钠、乙酸钠、丙酸钠、葡萄糖和乙醇, 其余成分不变。30 °C 进行恒温培养, 通过观察培养基是否变黑和试管内气体是否能使湿润的醋酸铅试纸变黑来判定 SRB 是否能利用瓶中硫源或碳源进行硫酸盐还原作用<sup>[10]</sup>。

### 1.3.3 SRB 分子生物学鉴定

本实验使用 SDS-CTAB 法提取细菌总 DNA。取 1 mL 菌液, 加入 1 mL TE 缓冲液混匀后, 加入 20 μL 溶菌酶(50 mg/mL), 小心混匀, 37 °C 水浴 30 min。再加入 140 μL 10% (m/V) SDS 溶液, 6 μL 蛋白酶 K 溶液(20 mg/μL), 15 μL 5 M NaCl 溶液, 小心混匀, 37 °C 水浴 30 min。然后加入 140 μL 4.1% (m/V) CTAB 溶液, 小心混匀, 65 °C 水浴 30 min。接着加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1, V/V)溶液, 小心混匀后冰浴 5 min, 12000

r/min 离心 5 min, 将上清液转移至新离心管。离心时注意温度不可过低。重复上一步直到两相交界面处无白色混浊物。加入等体积异丙醇和 1/10 体积的 3 M 醋酸钠溶液, 轻轻混匀, -20 °C 过夜。加入 1 mL 70% (V/V) 预冷乙醇, 12000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。最后在无菌洁净处晾干, 加入 30  $\mu$ L TE 缓冲液, 轻轻吹打使 DNA 充分溶解<sup>[11]</sup>。

提取结束后, 用 1% 琼脂糖电泳进行检测。电泳条件为 100 V 30 min, 电泳结束后用 EB 染色, 在凝胶成像仪下拍照。

本实验采用 27 F/1492R 引物对 16S rRNA 基因进行扩增, 扩增程序如下: 先在 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 30 s, 48 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 以上三步重复 20 次, 最后在 72 °C 延伸 10 min<sup>[12]</sup>。使用 aprA-1-FW/aprA-5-RV 引物对 aprA(腺苷磷酸硫酸还原酶  $\alpha$  亚基)基因进行扩增, 扩增程序如下: 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 以上三步重复 10 个循环, 每次退火温度降低 1 °C; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 以上三步重复 20 个循环, 最后在 72 °C 延伸 10 min<sup>[12]</sup>。扩增产物经电泳检测后, 直接送交华大基因进行测序。

序列信息用 BLAST 工具在 NCBI 数据库内进行比对, 并用 Mega 的建树功能构建系统进化树(16S rRNA 基因依据核苷酸比对结果建树, aprA 基因依据氨基酸比对结果建树)。本实验中所得的序列均已上传到 GenBank 数据库。

表 1 本实验所使用的引物

Table 1 Primers used in this paper

引物名	序列
AprA-1-FW	5'-TGG CAG ATC ATGATY MAY GG-3'
AprA-5-RV	5'-GCG CCAACY GGR CCR TA-3'
27F	5'-AGAGTTTGATCC TGG CTC A-3'
1492R	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

## 2 结果与分析

### 2.1 分离菌菌落和个体的形态结构

分离结束后, 分离菌菌落在平板培养基上形成形态大小较为一致、表面突起的圆形菌落, 在添加了硫酸亚铁的固体培养基平板上, 其菌落呈黑色; 而在未添加硫酸亚铁的固体培养基平板上其菌落呈乳白色。菌落的直径约为 2 mm。

分离菌个体在光学显微镜下形态为杆状, 革兰氏染色后显红色, 因此可判断其属于革兰氏阴性菌。SCUT-3 在光学显微镜下的照片见图 1。



图 1 SCUT-3 在显微镜下的个体形态(1000 倍放大)

Fig.1 Individual shapes of SCUT-3 under microscope (amplified 1000 times)

### 2.2 分离菌的硫源谱和碳源谱

分离菌的硫源谱和碳源谱的鉴定结果见表 2。结果表明, 该分离菌可以以乳酸、乙酸、丙酸等作为唯一碳源进行生长, 而不能利用葡萄糖和乙醇。SRB 的碳源利用范围很广泛, 包括单糖(果糖、葡萄糖等)、氨基酸、其他有机酸、醇类和芳香族化合物等。一般认为, SRB 按照能否将有机酸完全分解可以分为两类——一类只能将乳酸等有机酸底物分解为乙酸, 而另一类可以将乙酸进一步完全分解<sup>[2]</sup>。由于 SCUT-3 可以利用乙酸等进行硫酸盐呼吸, 因此认为该菌可以将有机酸等底物完全分解。

表 2 SCUT-3 的硫源谱和碳源谱

Table 2 Spectra of carbon sources and sulfur sources for SCUT-3

SCUT-3			
硫源	结果	碳源	结果
硫酸盐	+	乳酸	+
硫代硫酸盐	-	乙酸	+
亚硫酸盐	-	丙酸	+
		葡萄糖	-
		乙醇	-

SCUT-3 只能利用硫酸盐作为电子受体, 当培养基中的硫酸盐被硫代硫酸盐或亚硫酸盐代替时, 该菌不能生长。但研究表明, SRB 对硫酸盐的还原作用分为两步, 首先将硫酸盐还原成亚硫酸盐, 此后再将亚硫酸盐还原为硫化物。以上两步分别由磷酸腺苷硫酸还原酶和亚硫酸盐还原酶催化<sup>[2]</sup>。因此 SRB 应当都具备还原亚硫酸盐的能力, SCUT-3 不具备该能力的原因还有待进一步研究。

### 2.3 分离菌的分子生物学鉴定

分离菌的 16S rRNA 基因序列与 *Desulfovibrio acrylicus* 的 16S rRNA 基因的一致性达到 87%。与 *Desulfovibrio desulfuricans* G20 和 *Desulfovibrio vulgaris* str. Hildenborough 的 16S rRNA 基因均有 85% 的一致性。通过 Blastx 比对, 分离菌的 aprA 基因与 *Desulfovibrio vulgaris* str. Hildenborough 的该基因一致

性达到 90%，与 *Desulfovibrio desulfuricans* G20 和 *Desulfovibrio acrylicus* 的 *aprA* 基因也有 88% 的一致性。而 Blastn 比对结果显示，SCUT-3 与 *Desulfovibrio desulfuricans* G20 的一致性可以达到 91%。SCUT-3 的 16S rRNA 基因序列和 *aprA* 基因序列的 GenBank 登录号为 KC887061、KC887062。

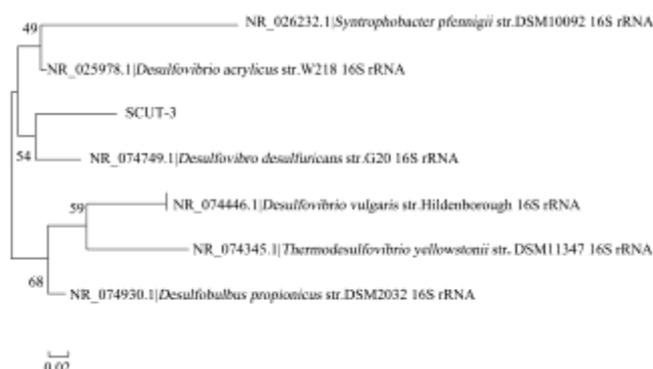


图 2 基于 16S rRNA 基因构建的 SCUT-3 系统进化树

Fig.2 Phylogeny of SCUT-3 based on 16S rRNA gene sequence

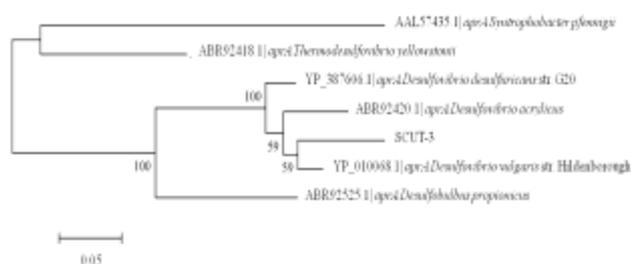


图 3 基于 *aprA* 基因构建的 SCUT-3 系统进化树 (基于 Blastx 比对结果)

Fig.3 Phylogeny of SCUT-3 based on *aprA* gene sequence (according to Blastx alignment)

基于以上两个基因的序列，将分离菌与其他相近序列在 GenBank 上在线构建系统进化树，如图 2、3 所示。结合该结果以及测序比对的结果，可以初步判断分离菌属于脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)。但该菌与属内其他各种的相似度最高仅为 91%，因此推测 SCUT-3 应为脱硫弧菌属内的一个新种。

### 3 结论

3.1 硫酸盐还原细菌广泛存在于各类环境中，在国内外均有大量关于 SRB 筛选、分离的报道。但多数集中于从恶劣、极端环境 (如深海环境<sup>[13]</sup>、矿山尾矿<sup>[14]</sup>、受污染的土壤和水体<sup>[15]</sup>) 中筛选硫酸盐还原菌，从水体底泥中直接进行分离的报道并不多见。一般认为，硫酸盐还原细菌生长缓慢且需要严格厌氧环境，但本实验从较浅的水底成功的分离到一株硫酸盐还原细菌。可见，硫酸盐还原细菌的分布可能远比通常推测的要广泛。

3.2 结果显示，该细菌可以利用低级脂肪酸或其他有机酸 (如乙酸、乳酸等) 并以硫酸盐作为电子受体进行呼吸作用，产生硫化氢作为代谢产物。结合以上两点，该细菌可能在水体环境中与其他化能异养细菌共同作用，利用其他细菌代谢产生的有机酸作为碳源而还原硫酸盐获取能量。SRB 可以利用某些不能将有机底物完全降解的微生物所产生的小分子有机物质进行能量代谢，有助于降低水体中的 BOD、COD。此外，在这一过程中所产生的硫化氢可与多种重金属离子形成硫化物沉淀，显示了 SRB 可能在受到重金属污染的水体的自净过程中起到重要作用。考虑到珠江流域地区内重金属污染的风险不断提高和重金属污染事件频频发生的事实，本实验对进一步研究水体对重金属污染的自净能力，从而探明水体环境中微生物与重金属污染物相互作用的机理、探索降低水体中重金属含量的技术方法，最终改善居民和农业用水的质量，保障食品和饮水的安全有一定的指导意义。

3.3 本实验从珠江底泥中分离出了一株硫酸盐还原细菌 SCUT-3，SCUT-3 为杆状革兰氏阴性菌，在固体培养基上能长出大小约为 2 mm、表面有突起的圆形菌落。SCUT-3 能够利用乳酸、乙酸、丙酸作为唯一碳源和能源进行生长。该细菌能利用硫酸盐作为最终电子受体。对 SCUT-3 的 DNA 序列进行分析后，初步判断该细菌可能是脱硫弧菌属的一个新种。

### 参考文献

- [1] 珠江水利委员会. 珠江片水资源公报 (2011 年) [EB]. <http://www.pearlwater.gov.cn> 2012.10  
Pearl River Water Resources Commission of the Ministry of Water Resources, PR China. Gazette of Water Resources in Pearl River Area (2011 ver.) [EB]. <http://www.pearlwater.gov.cn> 2012.10
- [2] Barton LL, Fauque GD. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria [J]. Adv Appl Microbiol, 2009, 68: 41-98.
- [3] Beeder J, Nilsen RK, Rosnes JT et al. *Archeoglobus fulgidus* isolated from hot north sea oil field waters [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(4): 1227-1231
- [4] Jørgensen BB. Mineralization of organic matter in the seabed - The role of sulfate reduction [J]. Nature, 1982, 269: 643-645
- [5] 王益平. 珠江流域广东段河水水质和重金属污染特征研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012  
Wang YP. Characteristics of water quality and heavy metals in Guangdong section of the Pearl River [D]. South China University of Technology, Guangzhou, 2012

- [6] 王贵玲, 蔺文静. 污水灌溉对土壤的污染及其整治[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(2): 163-166  
Wang GL, Lin WJ. Contamination of soil from sewage irrigation and its remediation [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2003, 22(2): 163-166
- [7] 张潮海, 华村章, 邓汉龙, 等. 水稻对污染土壤中镉、铅、铜、锌的富集规律的探讨[J]. 福建农业学报, 2003, 18(3): 147-150  
Zhang CH, Hua CZ, Deng HL, et al. Investigation on the enrichment of Cd, Pb, Cu and Zn by rice in the field near a smelting plant [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2003, 18(3): 147-150
- [8] 姜元欣, 王伟涛, 陈德慰, 等. 广西北部湾水域贝类重金属污染分析与南宁市市民贝类食用风险分析[J]. 食品工业科技, 优先出版  
Jiang YX, Wang WT, Chen DY, et al. Heavy metals contamination of bivalve harvested from Guangxi Beibu Gulf and potential health risk assessment for Nanning consumers [J]. Science and Technology of Food Industry, Online Version Prior to Publish, 2013
- [9] Campbell LL, Postgate JR. Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria [J]. Bacteriol Rev, 1966, 30(4): 732-738
- [10] 陈效, 孙立苹, 徐盈, 等. 硫酸盐还原菌的分离和生理特性研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 29(9): 38-40  
Chen X, Sun LP, Xu Y, et al. Isolation and physiology characteristics of sulfate-reducing bacteria [J]. Environmental Science and Technology, 2009, 29(9): 38-40
- [11] Luo JF, Lin WT, Guo Y. Method to detect only viable cells in microbial ecology [J]. Appl Microbiol Biot, 2010, 86: 377-384
- [12] Meyer B, Kuever J. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (*aprBA*) among sulfur-oxidizing prokaryotes [J]. Microbiology, 2007, 153: 3478-3498.
- [13] Lazar CS, Dinasquet J, L'Haridon S et al. Distribution of anaerobic methane-oxidizing and sulfate-reducing communities in the G11 Nyegga pockmark, Norwegian Sea [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 100: 639-653
- [14] Ramamoorthy S, Pritronski JS, Langner HW, et al. Ecology of Sulfate-Reducing Bacteria in an iron-dominated, mining-impacted freshwater sediment [J]. J Environ Qual, 2009, 38: 675-684
- [15] 张双月, 吴秀娟, 任洪强, 等. 垃圾渗滤液污染地下水中硫酸盐还原菌种群结构多样性分析[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 395-400  
Zhang SY, Wu XJ, Ren HQ, et al. Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater polluted by landfill leachate and seawater [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2007, 13(3): 395-400