



冲绳海槽热液区可培养硫氧化细菌多样性及其硫氧化特性

杜瑞¹, 于敏^{1,2*}, 程景广¹, 张静静¹, 田晓荣¹, 张晓华^{1,2}

¹中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003

²青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266237

摘要: 冲绳海槽热液区独特的地质环境孕育了特殊的生物群落, 硫氧化细菌作为生物地球化学循环的重要参与者在热液生态系统中发挥着至关重要的作用。【目的】通过硫氧化菌株的分离培养揭示冲绳海槽热液区可培养硫氧化细菌的多样性和硫氧化活性。【方法】采用多种培养基对冲绳海槽热液区不同沉积物样品中的硫氧化细菌进行富集培养和分离纯化; 利用 16S rRNA 基因序列确定硫氧化细菌的分类地位并进行系统发育分析; 采用碘量法对典型硫氧化菌株硫氧化活性进行检测。【结果】本研究从冲绳海槽热液区样品中共分离鉴定 85 株硫氧化细菌, 分属于 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲、放线菌门和厚壁菌门, 优势属为氢弧菌属(*Hydrogenovibrio*)、拉布伦氏菌属(*Labrenzia*)、深海海旋菌属(*Thalassospira*)和海杆状菌属(*Marinobacter*)。硫氧化活性检测结果表明, 7 株典型硫氧化菌株对硫代硫酸钠的降解活性介于 31%–100% 之间, 其中泰坦尼克号盐单胞菌 SOB56 (*Halomonas titanicae* SOB56)、南极海杆状菌 SOB93 (*Marinobacter antarcticus* SOB93)、印度硫氧化粗杆菌 SOB107 (*Thioclava indica* SOB107) 和嗜温氢弧菌 CJG136 (*Hydrogenovibrio thermophiles* CJG136) 可以完全降解硫代硫酸钠。【结论】冲绳海槽热液区可培养硫氧化细菌的多样性丰富, 为研究该热液区的硫循环过程提供了实验材料和理论基础, 多种硫氧化活性菌株的获得极大地丰富了菌种资源, 为探究深海热液区硫循环的能量代谢途径和分子机制奠定基础。

关键词: 冲绳海槽热液区, 硫氧化细菌, 多样性, 硫氧化活性

深海热液区是地球上极端环境之一, 具有独特的地质结构、复杂的物理化学特征和多样的生物群落^[1]。深海热液生物群落包含大型生物和微生物, 前者包括管虫、贻贝、虾蟹、藤壶和海绵等, 后者包括各种细菌、古菌和病毒^[2]。自首次发现居

住着大型生物群落的热液黑烟囱以来^[3], 海底热液系统及其相关的生物群落便受到极大关注。光合生物是地球上大多数生态系统的基础, 而在深海热液生态系统中, 初级生产力的提供则主要依赖于化能自养微生物^[4]。热液喷口喷发出的高温还原

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFA0601303, 2018YFC0310701), 国家自然科学基金(U1706208)

*通信作者。Tel/Fax: +86-532-82032721; E-mail: yumin@ouc.edu.cn

收稿日期: 2018-08-13; 修回日期: 2018-11-16; 网络出版日期: 2018-11-29

热液与冷氧化海水之间的快速混合使该区域形成了活跃的氧化还原环境, 为微生物活动和物质生产提供了丰富的化学能^[5], 而共生和自由生活的化能自养微生物能够从热液流体和海水中的无机氧化还原物质(如 H_2S 、 CO_2 、 H_2 、 CH_4 和 O_2)中获得能量^[2,6], 为整个热液生态系统的物质循环和能量流动提供基础。

深海热液生态系统是海洋中硫元素的重要来源, 热液区的硫氧化细菌在硫循环中发挥着重要作用。许多分子生态学研究表明, 化能自养型硫氧化细菌能够通过氧化单质硫或还原性硫化物产生能量^[7], 主要属于 ϵ -变形菌纲和 γ -变形菌纲细菌^[8]; 异养型硫氧化细菌在热液系统中则能够分解有机物质从而在碳循环中也发挥重要作用。硫氧化微生物至少存在三种硫氧化代谢途径: PSO 途径(paracoccus sulfur oxidation)、 S_4I 途径(tetrathionate intermediate)和分枝硫代硫酸盐氧化途径(branched thiosulfate oxidation), 其中报道最多的两种类型是 PSO 途径和 S_4I 途径。PSO 代谢途径由 *sox* 基因簇编码, 能将硫代硫酸盐氧化为硫酸盐而不形成独立存在的中间产物; 在 S_4I 氧化途径中, 硫代硫酸盐通过硫代硫酸盐脱氢酶的作用产生连四硫酸盐作为中间代谢产物, 两种途径由于参与基因的不同导致氧化产物和 pH 等性质也不同^[8-9]。因此, 研究硫氧化微生物的多样性及硫氧化途径对了解热液生态系统及其硫循环过程具有重要意义。

冲绳海槽位于我国东海陆架以东、琉球岛弧以西、日本九州岛和我国台湾岛之间, 是菲律宾板块相对欧亚板块俯冲形成的弧后盆地。冲绳海槽自北向南分为北部、中部和南部, 北部火山喷发作用较少, 热液区主要集中在中部和南部区

域^[10]。地震剖面显示, 冲绳海槽地质构造复杂, 由于长江和黄河陆源物质的不断供应使得海底覆盖着厚厚的沉积层^[11]。据报道, 热液流的相层分离对气体化合物的丰度和组成有巨大的影响, 而气体化合物是化能自养生物进行自养生活的主要能量来源^[12-13]。冲绳海槽热液流体碱度高, CO_2 、 H_2S 、 CH_4 等含量丰富^[14], 这为许多化能自养型微生物如硫氧化菌、产甲烷菌等提供了能量来源。目前针对冲绳海槽热液区的微生物群落结构及功能已有诸多研究, 但对参与硫循环的硫氧化细菌的多样性及功能等方面的研究较少。本研究利用传统的分离培养法和活性检测对冲绳海槽热液区可培养硫氧化细菌的多样性和硫氧化活性进行了初步研究, 旨在为热液区硫循环机制的研究提供实验材料和理论基础, 丰富硫氧化菌种资源, 为硫氧化菌株的开发利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集: 本研究所采用样品为 2014 年和 2016 年搭载科学号航次以箱式采泥器获得的冲绳海槽热液区沉积物, 采集后的样品直接在船上进行富集和涂布培养或置于无菌密封袋或离心管中, 置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存后带回实验室进行培养。相关样品信息见表 1。

1.1.2 培养基: 本研究采用 3 种不同的选择性培养基对硫氧化细菌进行分离培养。

(1) SOB 培养基(g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5000, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4000, K_2HPO_4 0.5000, KCl 0.7000, 维生素 B12 0.5×10^{-4} g, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4.9600, 硫粉 0.6400, NaHCO_3 1.6800, NH_4Cl 0.2675, 苯酚红 0.004 g, 微量元素溶液 1 mL, 陈海水 1000 mL;

表 1. 冲绳海槽热液区样品信息

Table 1. The information of environmental samples from hydrothermal fields of Okinawa Trough

Station	Longitude	Latitude	Depth/m	Sampling date	Sample description
TVG4-2	126°54'13.060"E	27°45'58.538"N	1092	2016/6/14	Hydrothermal sediments
TVG11-2	122°34'51.235"E	25°03'58.905"N	1170	2016/6/17	Hydrothermal sediments
R10-P1	122°42'17.554"E	24°50'39.920"N	1333	2016/6/8	Hydrothermal sediments
R10-P2	122°42'18.179"E	24°50'39.383"N	1327	2016/6/8	Hydrothermal sediments
R11	122°34'52.021"E	25°03'59.859"N	1164	2016/6/6	Hydrothermal sediments
R11a	122°34'39.915"E	25°04'14.468"N	1253	2016/6/16	Hydrothermal sediments
T1	122°34'41.965"E	25°4'14.674"N	1206	2014/5/1	Hydrothermal sediments
T3	122°35'18.919"E	25°4'15.074"N	1200	2014/5/1	Hydrothermal sediments

用 NaOH 调节培养基 pH 至 7.6, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 维生素 B_{12} , NaHCO_3 , K_2HPO_4 单独配制并过滤除菌; 硫粉采用隔水蒸煮法灭菌 3 次, 每次 30 min。

(2) SPG 培养基(g/L): PIPES 6.5000, NaCl 25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.7000, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4.3000, NH_4Cl 0.2500, KCl 0.5000, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1400, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1400, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0020, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.48, 微量元素溶液 1 mL, 苯酚红 0.003 g, 维生素溶液 10 mL, 蒸馏水 1000 mL; 用 NaOH 调节 pH 至 7.6, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

(3) ASC 培养基(g/L): NaCl 23.4000, Na_2SO_4 3.9760, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 11.5900, NH_4Cl 1.0700, KCl 0.6300, CaCl_2 1.1100, KH_2PO_4 0.5000, NH_4Cl 1.0700, Na_2HCO_3 0.2016, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.4800, 苯酚红 0.004 g, 维生素 B_{12} 微量, 蒸馏水 1000 mL; 用 NaOH 调节培养基 pH 至 7.6, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min; KH_2PO_4 调节 pH 为 7.1 后过滤除菌。该培养基更改自 ASW 培养基^[15]。

相对应的固体培养基中琼脂粉浓度为 20 g/L。

1.2 硫氧化细菌的富集培养

取少量沉积物样品于含有液体 SOB、SPG 或 ASC 培养基的血清瓶中, 置于 28 °C 避光静置培

养。在富集过程中, 当培养基颜色由红色变为黄色或深红色后按 1% 接种量进行转接继续富集培养。

1.3 样品涂布与分离纯化

平板涂布分为富集样品涂布和原位海水现场涂布两种方式。

1.3.1 富集样品涂布: 根据培养基的颜色变化, 10 d 后将第 3 次转接的富集样品用生理盐水 (0.85% NaCl, W/V) 进行梯度稀释, 稀释倍数为 10^1 、 10^2 、 10^3 , 取原液和各稀释梯度的样品涂布于相应的固体培养基, 每个梯度 2 个平行, 置于 28 °C 培养箱培养。

1.3.2 原位海水涂布: TVG4-2、TVG11-2、R10-P1、R10-P2、R11、R11a 六个站位进行海上原位涂布, 使用无菌药匙挑取适量沉积物样品于 0.85% 生理盐水中, 稀释倍数为 10^1 、 10^2 、 10^3 , 将各稀释梯度的样品涂布于 ASC 固体培养基, 每个梯度 2 个平行, 置于 28 °C 培养箱培养。

1.4 菌株的分离、纯化与保藏

根据菌落形态、大小等特征挑取单菌落, 在相应的培养基中划线分离纯化 3 次获得纯菌。纯化后的菌株接种于斜面, 用 15% 甘油保种液进行保种并置于 -80 °C 进行低温保藏。

1.5 基因组 DNA 提取和 16S rRNA 基因序列扩增

采用煮沸法或酚-氯仿抽提法提取菌株的基因组 DNA^[16]。采用细菌通用引物 B8F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')和 B1510R (5'-GGTTACC TTGTTACGACTT-3')^[17]对菌株的 16S rRNA 基因序列进行扩增。PCR 反应体系(30 μ L): 10 \times buffer 3 μ L, dNTPs (2 mmol/L) 3 μ L, B8F (20 μ mol/L) 0.3 μ L, B1510R (20 μ mol/L) 0.3 μ L, 模板 0.5 μ L, *rTaq* 0.15 μ L, ddH₂O 22.75 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 以限制性核酸内切酶 *Hae* III 进行酶切, 将酶切图谱不同的 PCR 产物送至华大基因科技有限公司进行测序。

1.6 基于 16S rRNA 基因的分类鉴定及系统发育分析

采用 Chromas 软件分析测序所得的 16S rRNA 基因序列, 去除低质量的测序碱基后得到的有效序列长度约 700 bp, 将序列提交至 EZbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) 数据库进行 BLAST 分析, 以 16S rRNA 基因序列相似性大于等于 98% 作为同种菌株的划分标准^[18]。将目的序列与近缘菌株的 16S rRNA 基因序列用 MEGA 7.0 软件以邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树, 1000 次自展(Bootstrap)评估发育树的准确性。

1.7 菌株硫氧化途径的鉴定及硫氧化活性的检测

硫氧化细菌由于氧化途径的差异会对培养基 pH 产生不同的影响^[19], 若细菌将底物直接氧化生成硫酸盐会使培养基 pH 下降, 培养基颜色变黄, 此时则鉴定该菌为产酸硫氧化菌(acid-producing bacteria); 若细菌产生中间代谢物(如多聚硫化物)会使培养基 pH 升高, 培养基颜色变为深红, 此时则

鉴定该菌为产碱硫氧化菌(base-producing bacteria)。

本研究选取代谢类型不同的部分硫氧化细菌, 通过检测硫代硫酸钠的氧化情况和菌株培养过程中的 pH 值变化来初步评估菌株的硫氧化能力, 检测周期设定为 2 d。硫代硫酸钠检测方法采用碘量法: 100 mL 碘量瓶中加入 20 mL 煮沸的蒸馏水, 向其中加入 1 mL 培养基, 摇匀; 加入 17.5 mol/L 的冰醋酸 1 mL, 混匀; 加入 1 mL 37% 的中性甲醛溶液, 摇匀后静置 2 min; 加入 1 mL 淀粉指示剂, 混匀; 用 0.01 mol/L 碘液进行标定。pH 值的测定采用 pH 计。实验选取 7 株细菌, 即 3 株产酸硫氧化菌、3 株产碱硫氧化菌、1 株非硫氧化菌株作为对照。

2 结果和分析

2.1 硫氧化细菌的分离鉴定结果

采用 3 种培养基并以硫代硫酸钠或硫粉作为唯一硫源对冲绳海槽热液区 8 个站位的沉积物样品进行硫氧化细菌的富集及分离培养, 共获得 313 株细菌。根据培养基颜色变化对硫氧化细菌的氧化途径进行初步鉴定, 共获得 143 株硫氧化细菌, 占热液区分离获得总菌株数目的 45.7%, 冲绳海槽热液区不同站位沉积物中菌株的分离结果统计见表 2。

对分离获得的 143 株硫氧化细菌进行 16S rRNA 基因扩增, 根据 PCR 产物酶切图谱的差异共选择 85 株硫氧化细菌进行 16S rRNA 基因测序, 占热液区分离硫氧化菌株总数的 59.40%。根据菌株培养过程中培养基颜色的变化对硫氧化细菌进行鉴定, 85 株测序菌株中产酸硫氧化菌为 69 株, 占测序硫氧化菌株的 81.20%, 产碱硫氧化菌 16 株, 占测序硫氧化菌株的 18.80%。不同类型的硫氧化菌株在培养过程中培养基的颜色变化见图 1。

表 2. 冲绳海槽热液区不同站位分离菌株的数目统计

Table 2. Number of isolated strains in different hydrothermal sites in Okinawa Trough

Station	ASC <i>in-situ</i> spread	ASC enrichment culture	SPG enrichment culture	SOB enrichment culture	Total number
TVG4-2	9(3)	16(5)	16(13)	–	41(21)
TVG11-2	10(6)	0(0)	16(8)	–	26(14)
R10-P1	18(6)	12(9)	18(6)	–	48(21)
R10-P2	19(10)	20(2)	8(7)	–	47(19)
R11	5(2)	9(6)	20(10)	–	34(18)
R11a	18(9)	41(15)	45(18)	–	104(42)
T1	–	–	–	1(1)	1(1)
T3	–	–	–	12(7)	12(7)
Total number	79(36)	98(37)	123(62)	13(8)	313(143)

The values outside the brackets in the table represent the number of all isolated strains at the corresponding station. The numbers in parentheses represent the number of sulfur-oxidizing strains at the corresponding station, and the horizontal lines represent no test.

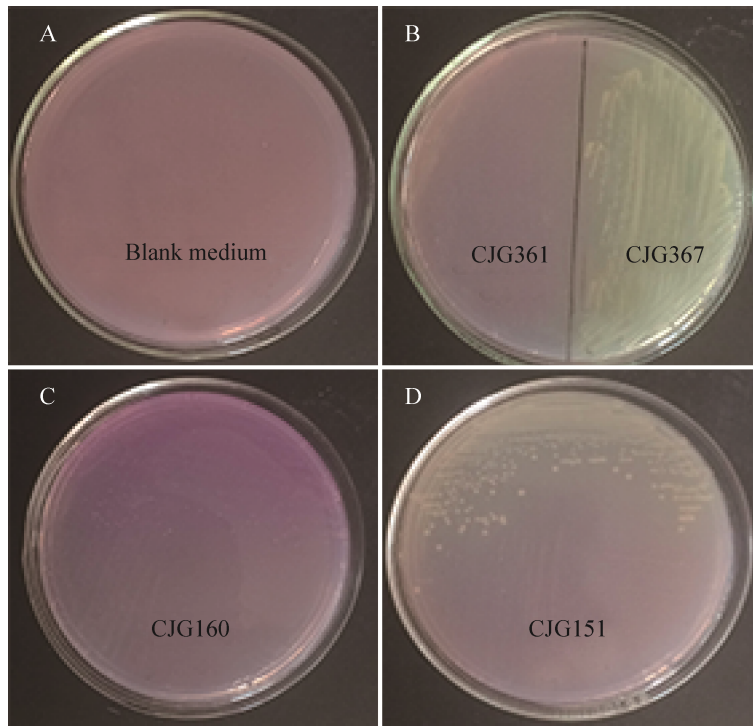


图 1. 含有苯酚红的 SPG 固体培养基在不同类型硫氧化菌培养过程中的颜色变化

Figure 1. The color change of SPG solid medium containing phenol red during culture of different types of sulfur-oxidizing bacteria. A: Blank control medium; B: CJK361 represents non-sulfur oxidizing bacteria, CJK367 represents acid-producing bacteria; C: CJK160 represents base-producing bacteria; D: CJK151 represents acid-producing bacteria.

2.2 冲绳海槽热液区沉积物可培养硫氧化细菌的多样性

将测序所得的 16S rRNA 基因序列提交至韩国标准菌数据库(<https://www.ezbiocloud.net/>)和

actamicro@im.ac.cn

NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析,根据比对分析结果用 MEGA 7.0 构建系统发育树(图 2)。

85 株已测序菌株中,共包含 3 个门、28 个属和 45 个种。3 个门为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌

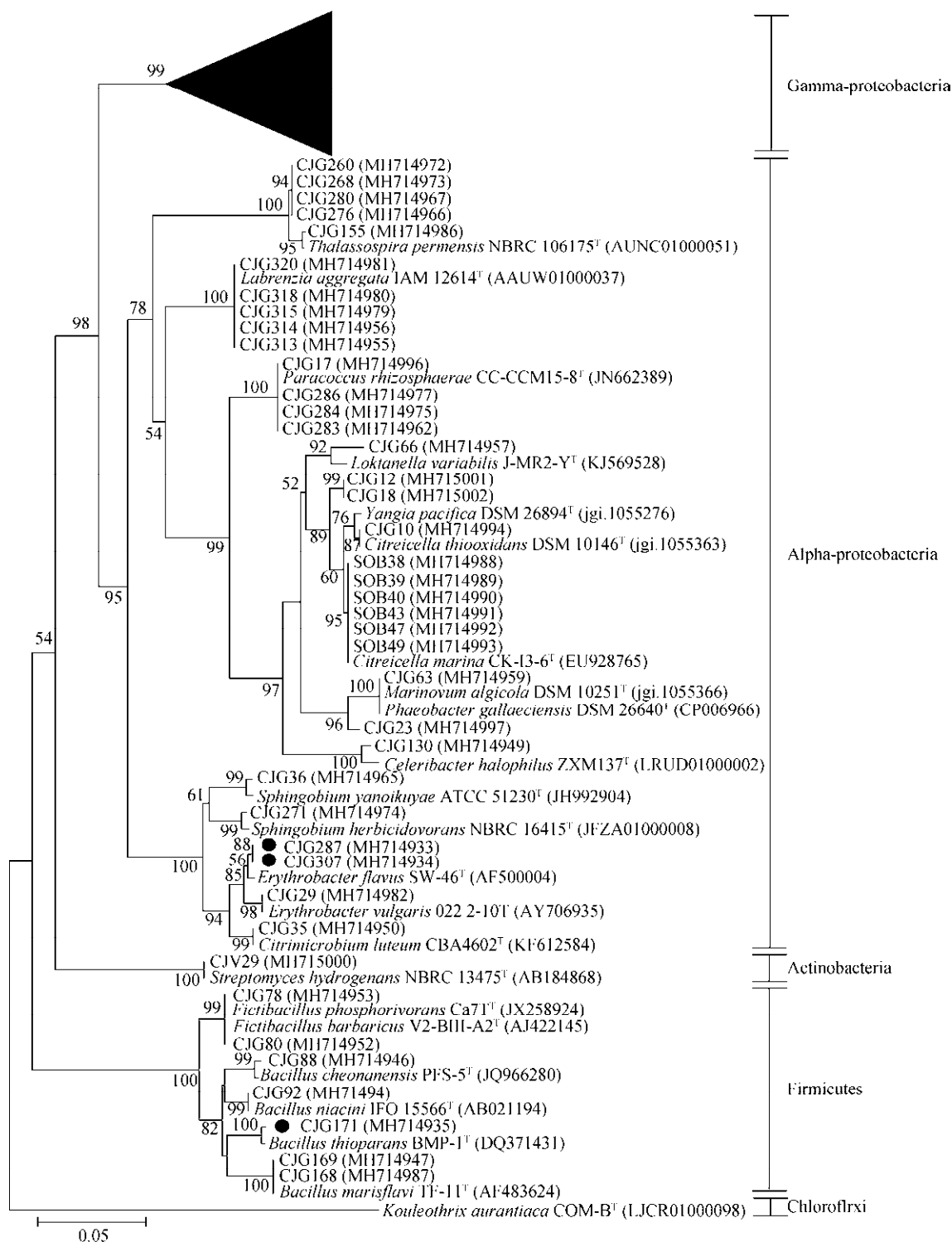


图 2. 冲绳海槽热液区可培养硫化细菌的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of cultivable sulfur-oxidizing bacteria isolated from hydrothermal fields of Okinawa Trough. *Kouleothrix aurantiaca* COM-B is used as out-group in the phylogenetic tree, black circles represent base-producing bacteria, others represent acid-producing bacteria. Numbers at each branch point indicate the bootstrap values (>50%) based on a Neighbor-Joining analysis of 1000 resampled datasets. GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequences are given in parentheses.

门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria),其中变形菌门(Proteobacteria)包括 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)和 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)细菌。在变形菌门中, α -变形菌纲共分离获得11个属、15个种、33株,占测序菌株总数的38.82%;将 γ -变形菌纲单独构建系统发育树(图3), γ -变形菌纲共分离获得14个属、21个种、44株,占测序菌株总数的51.76%;放线菌门共有2个属、6个种、7株;厚壁菌门细菌来自链霉菌属(*Streptomyces*),共1株。

将所有测序菌株按照硫氧化类型进行归类分析(图4),产酸硫氧化菌的总数明显高于产碱硫氧化菌,且多样性丰富。在69株产酸硫氧化菌中, α -变形菌纲和 γ -变形菌纲细菌各分离获得31株,均占产酸硫氧化菌总数的44.93%,此外还获得6株厚壁菌门细菌和1株放线菌门细菌,分别占产酸硫氧化菌总数的8.70%和1.45%;在属水平上,产酸硫氧化菌共分属于25个属,优势属为氢弧菌属(*Hydrogenovibrio*),拉布伦氏菌属(*Labrenzia*)和深海螺旋菌属(*Thalassospira*),各分离获得5株,占产酸硫氧化菌总数的7.25%;优势种为嗜温氢弧菌(*Hydrogenovibrio thermophiles*),聚集拉布伦氏菌(*Labrenzia aggregata*)和*Thalassospira permensis*。在16株产碱硫氧化菌中, γ -变形菌纲细菌分离获得13株,占产碱硫氧化菌总数的81.25%;此外, α -变形菌纲细菌获得2株,厚壁菌门细菌获得1株,分别占产碱硫氧化菌总数的12.50%和6.25%;在属水平上,产碱硫氧化菌分属于8个属,其中优势属为海杆状菌属(*Marinobacter*),分离获得7株,占产碱硫氧化菌总数的43.75%;优势种为除烃海杆状菌(*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*)。

2.3 不同培养方法分离获得的硫氧化细菌多样性

将85株测序菌株按照SOB富集培养、ASC原位涂布、ASC富集培养和SPG富集培养4种不同的分离方法在属水平上进行分析比较。SOB富集培养站位仅T1和T3两个,共获得硫氧化菌株8株,分属于盐单胞菌属(*Halomonas*)和柠檬形胞菌属(*Citricella*)。ASC原位涂布共获得25株硫氧化细菌,分属于19个属;ASC富集培养分离获得20株硫氧化细菌,分属于8个属;SPG富集培养分离获得32株硫氧化细菌,分属于14个属。将以上3种培养方法分离获得的菌株构建Venn图(图5)进行分析,获得的菌株多样性最高的培养方法是ASC原位涂布,该方法共获得9个特有属,其次是SPG富集培养,获得特有属6个。

2.4 不同硫氧化菌株的硫氧化活性检测

硫氧化活性检测采用的代表菌株为:非硫氧化菌株——黄海海杆状菌SOB45(*Marinobacter flavimaris* SOB45);产碱硫氧化菌——非凡海杆状菌SOB25(*Marinobacter excellens* SOB25),泰坦尼克号盐单胞菌SOB56(*Halomonas titanicae* SOB56)和南极海杆状菌SOB93(*Marinobacter antarcticus* SOB93);产酸硫氧化菌——海洋柠檬形胞菌属SOB39(*Citricella marina* SOB39),印度硫氧化粗杆菌SOB107(*Thioclava indica* SOB107)和嗜温氢弧菌CJG136(*Hydrogenovibrio thermophiles* CJG136)。

对以上7株菌在培养过程中培养液的pH值变化进行检测发现,非硫氧化菌SOB45在培养过程中的pH没有显著变化。产碱硫氧化菌SOB25、SOB93和SOB56在培养过程中呈现pH先升高后稍降低的趋势,其中SOB25终点pH(12d)较初始pH升高约0.90个单位,SOB93升高约0.56个单

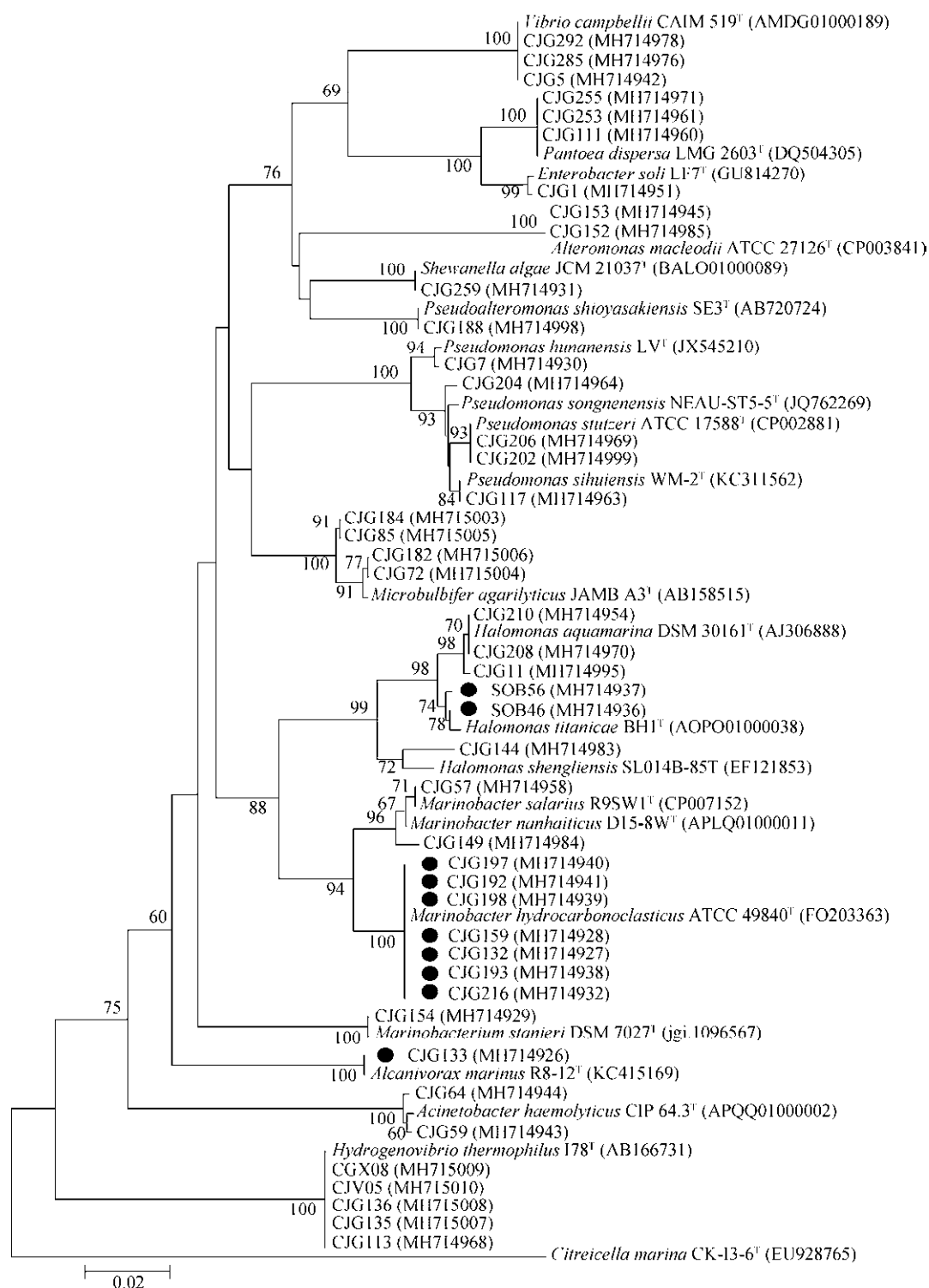


图 3. 冲绳海槽热液区可培养硫氧化细菌中 γ -变形菌纲的系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of cultivable Gammaproteobacteria sulfur-oxidizing bacteria isolated from hydrothermal fields of Okinawa Trough. *Citricella marina* CK-I3-6 is used as out-group in the phylogenetic tree, black circles represent base-producing bacteria, others represent acid-producing bacteria. Numbers at each branch point indicate the bootstrap values (>50%) based on a Neighbor-Joining analysis of 1000 replications. GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequences are given in parentheses.

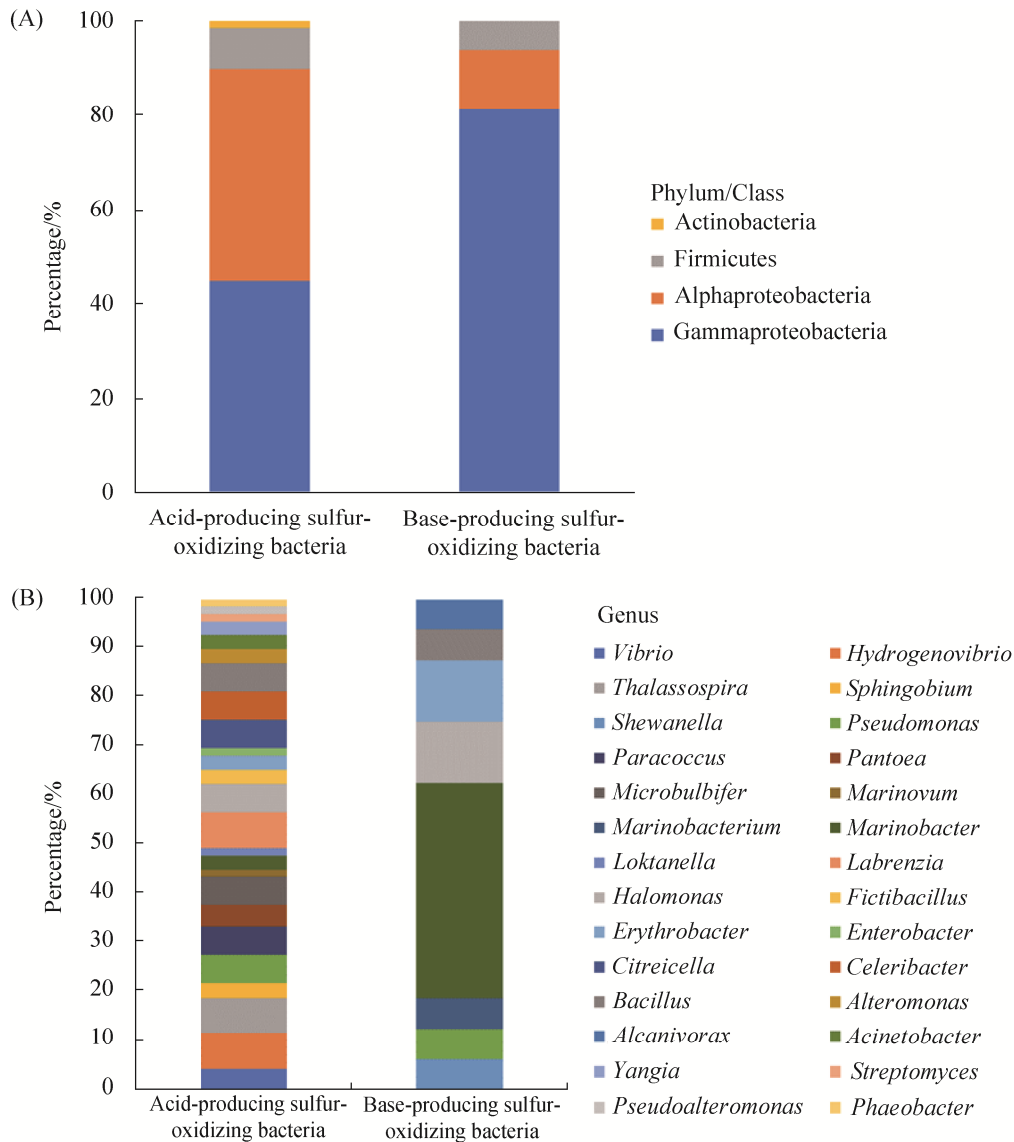


图 4. 冲绳海槽热液区产酸硫氧化菌和产碱硫氧化菌在门/纲/属水平上的比较

Figure 4. Comparison between acid-producing and base-producing sulfur-oxidizing bacteria isolated from hydrothermal fields of Okinawa Trough at phylum/class/genus level. A: Comparison at phylum and class level. B: Comparison at genus level.

位, SOB56 升高约 1.30 个单位。产酸硫氧化菌 SOB39、CJG136、SOB107 在培养过程中的 pH 值呈现先下降后保持相对平稳的趋势, 其中 SOB39 终点 pH (12 d) 较初始 pH 降低约 1.63 个 pH 单位, CJG136 降低约 2.00 个单位, SOB107 终点 pH (12 d) 较初始 pH 降低最显著, 达到 4.08 个 pH 单位(图 6-A)。

通过碘量法检测以上 7 株菌的硫代硫酸钠降解活性(图 6-B), 结果显示非硫氧化菌 SOB45 在培养过程中硫代硫酸钠浓度保持不变, 而硫氧化菌株培养液中的硫代硫酸钠呈现不同程度的氧化, 其降解率为 31%–100%, 其中产碱硫氧化菌 SOB56 和 SOB93 对硫代硫酸钠的降解达到 100%,

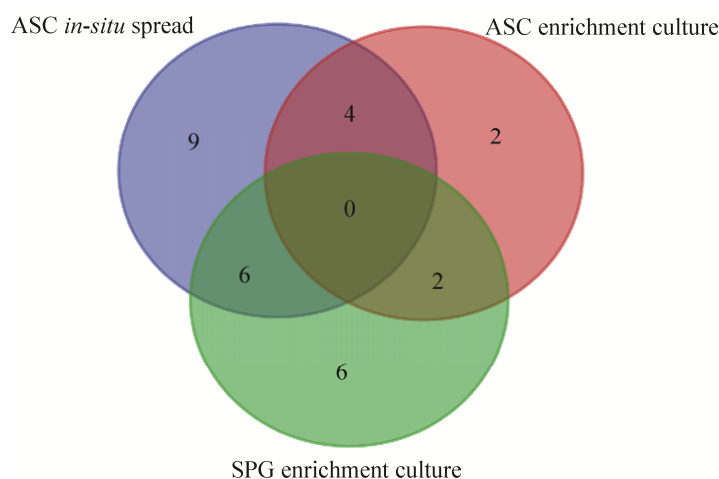


图 5. 不同培养方法分离出的硫氧化细菌在属水平上的 Venn 分析

Figure 5. Venn diagram analysis of Sulfur-oxidizing bacteria isolated from different methods in genus level.

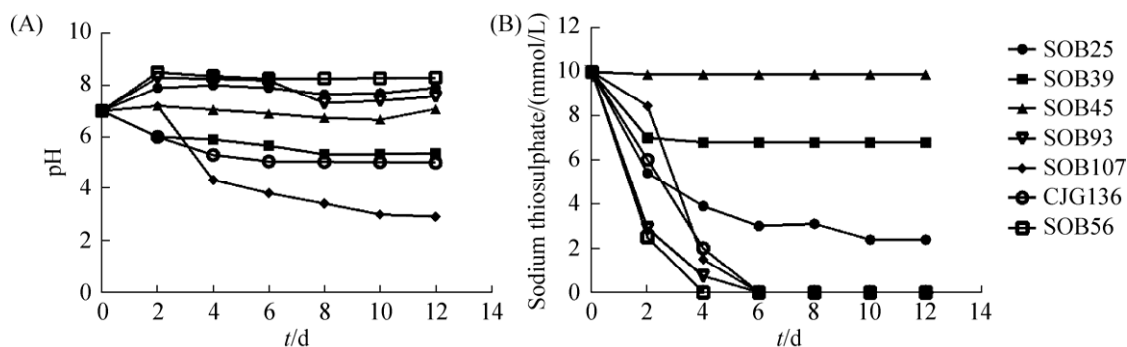


图 6. 不同硫氧化菌株在培养过程中的 pH 值和硫代硫酸钠浓度的变化

Figure 6. Change of pH and sodium thiosulfate concentration over time from different species of sulfur-oxidizing bacteria. A: The change of pH. B: The change of sodium thiosulfate concentration.

产酸硫氧化菌 SOB107 和 CJG136 也可以完全降解硫代硫酸钠。

3 讨论

硫氧化菌参与生物地球化学硫循环, 是海洋环境中的重要生物类群。本研究基于可培养方法, 利用三种不同选择性培养基对冲绳海槽热液区环境样品中的硫氧化菌进行了多样性分析, 样品的采集站位涉及冲绳海槽的多个热液区, 包括伊平屋北热液区(T3)、伊平屋脊热液区(T1)、唐印热液区(R11 和 TVG11-2)和第四与那国热液区(R10)等,

丰富的热液沉积物样品为国内首次获得。

冲绳海槽热液区沉积物样品所分离测序的菌株中, γ -变形菌纲的细菌数量最多, 占有测序菌株的 51.76%, 其次是 α -变形菌纲, 占测序菌株总数的 38.82%。在所有测序菌株中的优势属为氢弧菌属(*Hydrogenovibrio*)、拉布伦氏菌属(*Labrenzia*)、深海海旋菌属(*Thalassospira*)和海杆状菌属(*Marinobacter*)。徐鈺绣等^[20]对南大西洋深海热液区进行可培养硫氧化菌的分离培养, 共分离得到 48 株硫氧化菌, 优势类群为 α -变形菌纲细菌 (58.30%), 优势属为深海螺旋菌属(*Thalassospira*)、

Marteella 和微杆菌属(*Microbacterium*)。Durand 等^[21]对西南太平洋热液区的两个弧后盆地——北斐济盆地和劳盆地进行可培养硫氧化菌的研究中,共分离获得 161 株细菌,其优势属为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和弧菌属(*Vibrio*)。由此可知,不同热液区通过不同分离方法所获得的可培养硫氧化微生物具有丰富的多样性,优势类群也有所差异。

有报道指出,拉布伦氏菌^[22]、深海螺旋菌和海杆菌^[23]都具有石油降解活性,在本研究分离获得的菌株中,3 个属均占优势地位,而深海海底尤其是热液区在地热活动中常伴随着烃类物质的产生,这些微生物可能具有一定的代谢优势并且代谢途径多样,不仅参与硫的物质循环同时也与碳循环紧密相关。许多报道指出化能自养的 ϵ -变形菌纲细菌在深海热液或地表下岩石等硫化环境中占主导地位^[24-26]。Meier 等^[4]对马努斯盆地的 6 个不同热液喷口处的 23 个烟囱、岩石和动物样品和 33 个扩散流体和水体样品进行了 16S rRNA 基因高通量测序、宏基因组和实时原位测量地球化学参数的组合分析,他们发现 ϵ -变形菌纲的硫单胞菌属(*Sulfurimonas*)和硫卵菌属(*Sulfurovum*)相关的 ϵ -变形菌纲细菌占绝对优势并且具有丰富的多样性。然而 ϵ -变形菌纲细菌对生长环境和培养条件的要求苛刻,普通的培养方法很难获得相关菌株^[8],化能自养的 ϵ -变形菌纲细菌的分离筛选还有待进一步研究。本研究采用的 ASC 培养基修改自自养硫氧化细菌培养基 ASW^[15],但本实验分离的菌株多为异养或兼性营养型硫氧化菌,分析原因可能由于样品或培养过程中含有有机质,使异养菌或混合营养型细菌成为富集产物中的优势类群^[27]。

异养硫氧化菌在海洋环境中分布广泛,可以依据 pH 变化的不同和氧化产物的差异分为两种

类型,产酸硫氧化菌和产碱硫氧化菌^[27]。本实验所分离的大部分硫氧化菌株(69 株)均为产酸硫氧化菌,在培养过程中使培养基 pH 值下降。本研究选取了 7 株菌进行了硫氧化活性检测,结果显示柠檬形胞菌属(*Citricella*)、硫氧化粗杆菌属(*Thioclava*)和氢弧菌属(*Hydrogenovibrio*)的 3 株菌在培养过程中 pH 值显著降低,硫代硫酸钠降解活性分别为 31%、100%和 100%,推测这些菌株可以利用 PSO 途径将硫代硫酸盐氧化为硫酸盐,这 3 个属的硫氧化特性已有相关报道^[28-30]。产碱硫氧化菌一般利用 S₄I 途径产生连四硫酸盐作为中间代谢产物,在培养过程中使培养基 pH 值升高,该途径在异养硫氧化菌中多见于盐单胞菌属(*Halomonas*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*),本研究中泰坦尼克号盐单胞菌 SOB56 在培养过程中使培养基 pH 升高 1.30 个单位且能够完全降解硫代硫酸盐,推测其在硫氧化过程中产生了连四硫酸盐,该结果与相关报道^[9]一致。根据图 6-A 可知,3 株产碱硫氧化菌在培养过程中 pH 呈先升高后稍降低的趋势,Sorokin 等^[31]认为原因是连四硫酸盐在自然环境中发生了降解。此外,本研究对海杆菌属(*Marinobacter*)的 3 株菌进行了硫氧化活性的检测,SOB25 和 SOB93 在培养过程中能够使培养基 pH 升高,且对硫代硫酸钠的降解率分别达到 76%和 100%,具有产碱硫氧化菌的典型特征,而同属菌株 SOB45 为非硫氧化菌,说明同属不同种的菌株可能具有不同的硫氧化特性。

嗜温氢弧菌原属于硫微螺菌属(*Thiomicrospira*),普遍存在于全球深海热液喷口中,是一种典型的化能自养硫氧化细菌,2017 年 Boden 等^[32]根据该菌的 16S rRNA 基因的系统发育关系、生理学和形态学特征将其重新划分为氢弧菌属(*Hydrogenovibrio*)。Brazelton^[33]等和 Cao 等^[34]基于

非培养方法揭示了氢弧菌属细菌是西南印度洋中脊(SWIR)失落之城的碳酸盐烟囱和硫化物烟囱样品中的主要类群。本研究共分离获得 5 株嗜温氢弧菌, 占测序菌株总数的 5.88%, 为冲绳海槽热液区沉积物样品中的优势类群, 因此, 该属细菌可能在冲绳海槽热液系统中扮演重要角色。在本研究的硫氧化活性检测结果中, 嗜温氢弧菌 CJG136 在 pH 5–7 范围内都可生长, 并且经过 2 d 的培养硫代硫酸钠含量便有显著降低, 第 6 天时硫代硫酸钠降解率便达到 100%, 具有较强的硫氧化能力, 该结果与 Takai 等^[35]的研究结果一致。Jiang 等^[30]在系统发育、能量代谢和比较基因组分析等方面发现嗜温氢弧菌能够利用多种硫化物作为能量来源, 并且其基因组中含有更多的硫代谢系统, 各方面的证据表明嗜温氢弧菌在硫循环中发挥着重要作用, 然而其适应这种恶劣环境的机制仍不明确, 对于该菌的深入研究将有助于发现其潜在的理论和应用价值。

本实验对冲绳海槽热液区的硫氧化细菌进行了分离培养, 并对硫氧化菌株的代谢类型和活性进行了初步探究, 极大丰富了热液区硫氧化微生物的菌种资源库, 为研究深海热液系统的硫循环机制奠定了基础。高活性硫氧化菌株的获得可能在生物浸矿、环境保护等领域具有潜在的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Anderson RE, Sogin ML, Baross JA. Evolutionary strategies of viruses, bacteria and archaea in hydrothermal vent ecosystems revealed through metagenomics. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109696.
- [2] Sun QL, Wang MQ, Sun L. Characteristics of the cultivable bacteria from sediments associated with two deep-sea hydrothermal vents in Okinawa Trough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(12): 2025–2037.
- [3] Spiess FN, Macdonald KC, Atwater T, Ballard R, Carranza A, Cordoba D, Cox C, Garcia VMD, Francheteau J, Guerrero J, Hawkins J, Haymon R, Hessler R, Juteau T, Kastner M, Larson R, Luyendyk B, Macdougall JD, Miller S, Normark W, Orcutt J, Rangin C. East pacific rise: hot springs and geophysical experiments. *Science*, 1980, 207(4438): 1421–1433.
- [4] Meier DV, Pjevac P, Bach W, Hourdez S, Girguis PR, Vidoudez C, Amann R, Meyerdierks A. Niche partitioning of diverse sulfur-oxidizing bacteria at hydrothermal vents. *The ISME Journal*, 2017, 11(7): 1545–1558.
- [5] Nakamura K, Takai K. Theoretical constraints of physical and chemical properties of hydrothermal fluids on variations in chemolithotrophic microbial communities in seafloor hydrothermal systems. *Progress in Earth and Planetary Science*, 2014, 1(1): 5.
- [6] Karl DM. Ecology of free-hydrothermal vent microbial communities//Karl DM. *The Microbiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents*. Boca Raton: CRC Press Inc, 1995.
- [7] Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A, Fischer J. Prokaryotic sulfur oxidation. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(3): 253–259.
- [8] Yamamoto M, Takai K. Sulfur metabolisms in epsilon- and gamma-Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 192.
- [9] Ghosh W, Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(6): 999–1043.
- [10] 陈晨. 两株冲绳海槽热液细菌的研究. 中国科学院大学硕士学位论文, 2017.
- [11] Sibuet JC, Letouzey J, Barbier F, Charvet J, Foucher JP, Hilde TWC, Kimura M, Chiao LY, Marsset B, Muller C, Stéphan JF. Back arc extension in the Okinawa trough. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 1987, 92(B13): 14041–14063.
- [12] Konno U, Tsunogai U, Nakagawa F, Nakaseama M, Ishibashi JI, Nunoura T, Nakamura KI. Liquid CO₂ venting on the seafloor: Yonaguni Knoll IV hydrothermal system, Okinawa Trough. *Geophysical Research Letters*, 2006, 33(16): L16607.
- [13] Takai K, Nunoura T, Ishibashi JI, Lupton J, Suzuki R, Hamasaki H, Ueno Y, Kawagucci S, Gamo T, Suzuki Y, Hirayama H, Horikoshi K. Variability in the microbial communities and hydrothermal fluid chemistry at the newly discovered Mariner hydrothermal field, southern Lau Basin. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 2008, 113(G2): G02031.
- [14] Ishibashi J, Sano Y, Wakita H, Gamo T, Tsutsumi M, Sakai H. Helium and carbon geochemistry of hydrothermal fluids from the Mid-Okinawa Trough Back Arc Basin, southwest

- of Japan. *Chemical Geology*, 1995, 123(1/4): 1-15.
- [15] Ruby EG, Wirsén CO, Jannasch HW. Chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria from the Galapagos rift hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, 42(2): 317-324.
- [16] Yin Q. Microbial communities of the surface seawater in the South Pacific Gyre. Master Dissertation of Ocean University of China, 2012. (in Chinese)
尹琦. 南太平洋环流区表层海水微生物群落结构研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2012.
- [17] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [18] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64: 346-351.
- [19] Javor BJ, Wilmot DB, Vetter RD. pH-Dependent metabolism of thiosulfate and sulfur globules in the chemolithotrophic marine bacterium *Thiomicrospira crunogena*. *Archives of Microbiology*, 1990, 154(3): 231-238.
- [20] Xu HX, Jiang LJ, Li SN, Zhong TH, Lai QL, Shao ZZ. Diversity of culturable sulfur-oxidizing bacteria in deep-sea hydrothermal vent environments of the South Atlantic. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(1): 88-100. (in Chinese)
徐钰绣, 姜丽晶, 李少能, 钟添华, 赖其良, 邵宗泽. 南大西洋深海热液区可培养硫氧化微生物多样性及其硫氧化特性. *微生物学报*, 2016, 56(1): 88-100.
- [21] Durand P, Benyagoub A, Prieur D. Numerical taxonomy of heterotrophic sulfur-oxidizing bacteria isolated from southwestern Pacific hydrothermal vents. *Canadian Journal of Microbiology*, 1994, 40(8): 690-697.
- [22] Wu BQ, Liu SJ, Chen FM, Zhou CY. Screening of marine crude oil-degrading bacteria and construction of microbial consortium. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(8): 184-193. (in Chinese)
吴秉奇, 刘淑杰, 陈福明, 周楚莹. 海洋石油降解菌的筛选及复合菌系的构建. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 184-193.
- [23] Wu YH. Isolation and classification of marine oil degrading bacteria and the analysis of related degradation genes. Master Dissertation of Xiamen University, 2007. (in Chinese)
吴业辉. 海洋石油降解菌的分离鉴定及其降解酶基因的研究. 厦门大学硕士学位论文, 2007.
- [24] Campbell BJ, Engel AS, Porter ML, Takai K. The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(6): 458-468.
- [25] Takai K, Gamo T, Tsunogai U, Nakayama N, Hirayama H, Nealson KH, Horikoshi K. Geochemical and microbiological evidence for a hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLiME) beneath an active deep-sea hydrothermal field. *Extremophiles*, 2004, 8(4): 269-282.
- [26] Nakagawa S, Takai K. Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(1): 1-14.
- [27] Teske A, Brinkhoff T, Muyzer G, Moser DP, Rethmeier J, Jannasch HW. Diversity of thiosulfate-oxidizing bacteria from marine sediments and hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8): 3125-3133.
- [28] Sorokin DY, Tourova TP, Muyzer G. *Citricella thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a novel lithoheterotrophic sulfur-oxidizing bacterium from the Black Sea. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(8): 679-687.
- [29] Sorokin DY, Tourova TP, Spiridonova EM, Rainey FA, Muyzer G. *Thioclava pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively autotrophic, marine, sulfur-oxidizing bacterium from a near-shore sulfidic hydrothermal area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1069-1075.
- [30] Jiang LJ, Lyu J, Shao ZZ. Sulfur metabolism of *Hydrogenovibrio thermophilus* strain S5 and its adaptations to deep-sea hydrothermal vent environment. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2513.
- [31] Sorokin DY. Oxidation of inorganic sulfur compounds by obligately organotrophic bacteria. *Microbiology*, 2003, 72(6): 641-653.
- [32] Boden R, Scott KM, Williams J, Russel S, Antonen K, Rae AW, Hutt LP. An evaluation of *Thiomicrospira*, *Hydrogenovibrio* and *Thioalkalimicrobium*: reclassification of four species of *Thiomicrospira* to each *Thiomicrothabdis* gen. nov. and *Hydrogenovibrio*, and reclassification of all four species of *Thioalkalimicrobium* to *Thiomicrospira*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1140-1151.
- [33] Brazelton WJ, Baross JA. Metagenomic comparison of two *Thiomicrospira* lineages inhabiting contrasting deep-sea hydrothermal environments. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13530.
- [34] Cao HL, Wang Y, Lee OO, Zeng X, Shao ZZ, Qian PY. Microbial sulfur cycle in two hydrothermal chimneys on the Southwest Indian Ridge. *mBio*, 2014, 5(1): e00980-13.
- [35] Takai K, Hirayama H, Nakagawa T, Suzuki Y, Nealson KH, Horikoshi K. *Thiomicrospira thermophila* sp. nov., a novel microaerobic, thermotolerant, sulfur-oxidizing chemolithomixotroph isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the TOTO caldera, Mariana Arc, Western Pacific. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(6): 2325-2333.

Diversity and sulfur oxidation characteristics of cultivable sulfur oxidizing bacteria in hydrothermal fields of Okinawa Trough

Rui Du¹, Min Yu^{1,2*}, Jingguang Cheng¹, Jingjing Zhang¹, Xiaorong Tian¹, Xiaohua Zhang^{1,2}

¹ College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

² Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, Shandong Province, China

Abstract: The unique geological environment in the hydrothermal fields of Okinawa Trough has formed special biological communities. Sulfur-oxidizing bacteria play an important role in the hydrothermal ecosystem as a key participant in the biogeochemical cycle. **[Objective]** To study the diversity and sulfur oxidation activity of cultivable sulfur-oxidizing bacteria in the hydrothermal fields of the Okinawa Trough. **[Methods]** Sulfur-oxidizing bacteria in sediment samples from different sites in the hydrothermal fields of Okinawa Trough were enriched, cultured and isolated using different culture media. The 16S rRNA sequence was used to identify sulfur-oxidizing bacteria and to carry out phylogenetic analysis. Sulfur oxidation activity was measured using the iodometric method. **[Results]** In total 85 strains of sulfur-oxidizing bacteria were isolated and identified, belonging to Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes. The dominant genera of culturable sulfur-oxidizing bacteria were *Hydrogenovibrio*, *Labrenzia*, *Thalassospira* and *Marinobacter*. Seven typical sulfur-oxidizing strains showed different degradation activity on sodium thiosulfate that ranged from 31% to 100%. *Halomonas titanicae* SOB56, *Marinobacter antarcticus* SOB93, *Thioclava indica* SOB107 and *Hydrogenovibrio thermophiles* CJG136 could completely degrade sodium thiosulfate. **[Conclusion]** The sulfur-oxidizing bacteria in the hydrothermal fields of Okinawa Trough are abundant in diversity, providing experimental materials and theoretical basis for studying the sulfur cycle in hydrothermal regions. A variety of sulfur oxidizing strains have greatly enriched the bacterial species resources and laid the foundation for exploring the energy pathways and molecular mechanisms of sulfur cycle.

Keywords: hydrothermal fields of Okinawa Trough, sulfur-oxidizing bacteria, diversity, sulfur oxidation activity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key R&D Program of China (2016YFA0601303, 2018YFC0310701), National Natural Science Foundation of China (U1706208)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-82032721; E-mail: yumin@ouc.edu.cn

Received: 13 August 2018; Revised: 16 November 2018; Published online: 29 November 2018

于敏, 主要围绕海洋微生物的生态生理功能及其环境适应机制开展研究, 主持国家自然科学基金青年基金(31502171)、中国博士后科学基金面上一等资助基金、中国海洋大学青年教师科研专项基金各 1 项, 承担国家自然科学基金重点基金、山东联合基金、国家重点研发计划项目、国家 973 等多项国家级科研课题。主要成果有: (1) 探究了金丽假交替单胞菌的抑菌、密度感应淬灭与环境适应机制; (2) 分析了冲绳海槽热液区微生物的群落结构及其在热液硫、铁循环中的功能; (3) 建立了硫氧化菌、氨氧化古菌等难培养微生物的分离培养技术; (4) 近 5 年发表 SCI 论文 20 篇, 其中第一作者(或共同第一作者)和通讯作者 13 篇。

