

## 研究报告



## 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

郭策 刘贝贝 孙明雪 边佳琪 魏士平\*

中国地质大学(北京)海洋学院 北京 100083

**摘要:**【背景】脱硫细菌对有机硫的脱硫作用在硫的生物地球化学循环以及脱硫工业中都起着重要的作用。【目的】了解海洋沉积物中可分解有机物产生硫化氢的细菌多样性。【方法】对我国北戴河海洋沉积物中可培养的 L-半胱氨酸脱硫细菌进行分离与筛选, 通过对其 16S rRNA 基因序列测定与分析, 构建系统发育树, 并对其脱硫、脱氮能力进行检验。【结果】从海洋沉积物中分离得到 97 株细菌, 从以 L-半胱氨酸为硫源的培养基中筛选出 62 株有机脱硫专一型细菌。根据脱硫细菌的形态及其特征, 从中选取 12 株作为典型代表做进一步分析, 它们分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、动性球菌属(*Planococcus*)和红球菌属(*Rhodococcus*)。结果表明, 这 12 株细菌均可产生半胱氨酸脱硫基酶, 能够将半胱氨酸分解为丙酮酸、硫化氢和氨, 即同时具备脱硫与脱氮的能力。其中有 5 株菌脱硫能力较强, 分别属于赖氨酸芽孢杆菌属、动性球菌属和芽孢杆菌属。【结论】海洋沉积物中存在着丰富的 L-半胱氨酸脱硫细菌, 为进一步研究海洋中硫的生物地球化学循环提供了素材。

**关键词:** 硫循环, 脱硫细菌, L-半胱氨酸, 硫化氢, 半胱氨酸脱硫基酶

## Diversity and characterization of L-cysteine desulfurizing bacteria isolated from marine sediments in Beidaihe

GUO Ce LIU Bei-Bei SUN Ming-Xue BIAN Jia-Qi WEI Shi-Ping\*

School of Marine Sciences, China University of Geosciences, Beijing 100083, China

**Abstract:** [Background] Organic sulfur desulfurization catalyzed by desulfurizing bacteria plays an important role in the biogeochemical cycle of sulfur and the desulfurization industry. [Objectives] In order to investigate the diversity of bacteria using the organic sulfur to produce hydrogen sulfide in marine sediments, this research focused on the isolation and characterization of desulfurizing bacteria. [Methods] The culturable desulfurizing bacteria were isolated from the marine sediments sampled from Beidaihe, which were subjected to the screening by the media containing both lead acetate and L-cysteine. Then, the 16S rRNA gene sequences of desulfurizing bacteria were retrieved against the GenBank database. All of the gene sequences with the reference sequences were used to construct the phylogenetic tree. Finally, the

**Foundation item:** National Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates Project

\*Corresponding author: E-mail: weishiping@cugb.edu.cn

**Received:** 23-08-2018; **Accepted:** 13-02-2019; **Published online:** 19-02-2019

基金项目: 大学生创新创业训练计划项目

\*通信作者: E-mail: weishiping@cugb.edu.cn

收稿日期: 2018-08-23; 接受日期: 2019-02-13; 网络首发日期: 2019-02-19

bacteria were tested for their capabilities for desulfurization and denitrification. [Results] 62 desulfurizing bacteria were screened out from a total of 97 bacterial strains, out of which, 12 desulfurizing bacteria were selected as the representatives to subject to phylogenetic analysis based on their 16S rRAN gene sequences. The results indicated that all the bacterial strains belong to the genus of *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Planococcus* and *Rhodococcus*, respectively. Five strains with strong desulfurization ability were affiliated to three genus of *Lysinibacillus*, *Planococcus* and *Bacillus*. Further test showed that the desulfurizing bacteria can produce cysteine desulfhydrase to catalyze the conversion of L-cysteine to pyruvate, hydrogen sulfide and ammonia, indicating they possess both of the capabilities of desulfurization and denitrification. [Conclusion] There are abundant L-cysteine desulfurization bacteria in marine sediments, which provide materials for further study of biogeochemical cycle of sulfur in the ocean.

**Keywords:** Sulfur cycle, Desulfurizing bacteria, L-cysteine, Hydrogen sulfide, Cysteine desulfhydrase

硫在自然界中分布广泛, 主要以硫酸盐、硫酸盐矿物和硫化物存在于海水、岩石和碎屑沉积物这三大硫库中, 另外还有一小部分硫以单质和有机态的形式存在于自然界和生物体中, 全球硫循环主要受控于三大硫库之间的转换<sup>[1]</sup>。微生物通过对硫的氧化和还原以及脱硫作用, 不但可形成含硫的矿物, 而且还可以调节各分室内硫的转化, 并影响着全球碳和氧的循环<sup>[2]</sup>, 因此在硫的生物地球化学循环中起着重要的作用。

目前对脱硫细菌的研究主要是应用于煤和石油的脱硫工业<sup>[3-5]</sup>, 而半胱氨酸脱硫细菌对有机硫的脱硫作用也是不容忽视的重要部分, 研究表明半胱氨酸脱硫细菌广泛存在于土壤、淡水和海洋环境中<sup>[6-7]</sup>, 在微生物硫循环中起着重要的作用。海洋作为地球上第二大硫库, 其硫酸盐在无氧条件下通过硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)的作用被还原为  $H_2S$ , 继而与沉积物中的铁发生反应生成黄铁矿<sup>[8]</sup>; 而海洋中的有机硫, 包括维生素、氨基酸、缩氨酸和氨基磺酸类等多种物质, 是海洋沉积物中含量仅次于黄铁矿的以结合态硫存在的重要化合物<sup>[9]</sup>, 在有氧条件下, 脱硫细菌可将这些有机态硫在酶的催化作用下转化为  $H_2S$ <sup>[5,10]</sup>, 调节着有机硫向无机硫的转化。

硫酸盐还原细菌被认为主导着海洋中硫酸盐向  $H_2S$  的转化, 但异养细菌对半胱氨酸的酶促脱硫也有助于  $H_2S$  的生成。然而在目前已有的研究中, 对海洋中有机物脱硫细菌的研究仍相对薄弱。

本文对海洋沉积物中半胱氨酸脱硫细菌的多样性进行研究, 对全面认识海洋中硫的生物地球化学具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0, pH 7.0。

半胱氨酸培养基(g/L): L-半胱氨酸 2.0, 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 5.0, 酵母粉 3.0, NaCl 2.0,  $(CH_3COO)_2Pb \cdot 3H_2O$  0.2, 琼脂 15.0, pH 7.5。

$Na_2S_2O_3$  培养基(g/L): 蛋白胨 15.0, 胨蛋白胨 5.0, 葡萄糖 1.0,  $Na_2S_2O_3$  0.08,  $(CH_3COO)_2Pb \cdot 3H_2O$  0.2, 琼脂 15.0, pH 7.0。

以上培养基于  $1 \times 10^5$  Pa 下灭菌 30 min, 备用。L-半胱氨酸和乙酸铅采用过滤除菌的方法, 在上述培养基灭菌后, 待温度降到 50–55 °C 时加入。

### 1.2 主要试剂和仪器

纳氏试剂, 上海植茂环保科技有限公司。立式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 超净工作台, 江苏佳宝净化工程设备有限公司; 细菌培养箱, 宁波市科技园区新江南仪器有限公司; 超低温冰箱, 北京五洲东方科技发展有限公司; 恒温振荡器, 江苏太仓市实验设备厂。

### 1.3 样品收集

本研究所需样品采集于渤海湾北戴河地区潮间带处(N39°83'88.09", E119°52'99.09")的海洋沉积物。采样点的海洋沉积物主要由泥质成分组成,

所有样品均为表层沉积物(深度为 10 cm), 采集后立即转移至 50 mL 无菌离心管, 储存在 4 °C 条件下以备后续分析。

#### 1.4 细菌的分离

将采集于北戴河地区的 10 g 海洋沉积物样品加入 90 mL 无菌水中, 混匀, 梯度稀释至  $10^{-5}$  g/mL。分别取 50、100  $\mu$ L 稀释液涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上, 28 °C 倒置培养 3–5 d。根据细菌菌落颜色、形状、大小、质地等特性, 分别挑取不同的单菌落进行纯培养; 将以上细菌分别悬浮在含有 20% 甘油的 1 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 于 -70 °C 保藏备用。

#### 1.5 L-半胱氨酸脱硫细菌的筛选

将以上保藏的细菌菌株活化, 然后接种在半胱氨酸培养基平板的中央, 以不接种细菌的半胱氨酸培养基平板为对照。由于产物中存在  $H_2S$  气体, 为保证培养皿的密闭性, 需使用 Parafilm 密封, 30 °C 密闭培养 5–10 d。观察并记录接种不同菌株的培养基变黑情况。

#### 1.6 L-半胱氨酸脱硫细菌的多样性

分别选取能使培养基变黑且变黑强度与特征不同的细菌, 提取其基因组 DNA, 然后采用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增<sup>[11]</sup>。PCR 产物经纯化后送至北京康盈创新生物技术公司进行 DNA 双向测序。将所获得的约 1.4 kb 的细菌 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank 以获得登录号, 并且在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上进行 BLAST 分析与比较。选取与提交序列相似性较高的已知菌株的 16S rRNA 基因序列做参比, 与分离筛选得到的脱硫细菌的 16S rRNA 基因序列一并使用 BioEdit 和 MEGA 4.0 等软件构建系统发育树, 以确定各菌株的分类关系与进化信息。

#### 1.7 细菌脱硫能力的检验

取试管若干, 分别加入 10 mL 融化的半胱氨酸培养基, 灭菌后制成斜面。选取上述有代表性的

培养基变黑强度和特征不同的细菌, 分别接种于斜面培养基上<sup>[12]</sup>, 且每株细菌均制备 3 个平行样品, 并以 L-半胱氨酸、乙酸铅和细菌为变量制备对照组。为保证实验环境的密闭性, 试管口用棉塞密封, 30 °C 恒温培养。分别于第 3、5、7 天观察并记录不同试管中半胱氨酸培养基变黑的长度, 以此判断不同细菌脱硫能力的强弱。

#### 1.8 细菌脱氮能力的检验

将已鉴定的脱硫细菌分别接种于装有 5 mL 半胱氨酸液体培养基的试管中, 以不接种细菌的半胱氨酸培养基试管作对照。试管口均用棉塞密封, 30 °C、180 r/min 培养 5 d。分别吸取 2 mL 菌液置入便于观察的小玻璃瓶中, 再加入 100  $\mu$ L 纳氏试剂。静置后与对照组对比, 观察其颜色变化。纳氏试剂与氨反应会生成淡红棕色络合物, 可根据颜色变化强弱判断细菌是否具有脱氮能力<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌的分离与 L-半胱氨酸脱硫细菌的筛选

从海洋沉积物中共分离得到细菌 97 株, 依次编号并保存。脱硫细菌在酶的作用下可将 L-半胱氨酸中的硫脱掉, 产生  $H_2S$ , 继而与半胱氨酸培养基中的乙酸铅反应形成  $PbS$  黑色固体, 以此来筛选脱硫细菌。经筛选, 从 97 株细菌中共获得 62 株脱硫细菌。根据脱硫细菌在平板上的特征与现象, 将其分为四类(图 1): (1) 培养基以接种细菌部位为圆心形成明显黑圈(图 1A), 属于这类的细菌有 6 株, 分别为 SH25、SH35、SH46、SH68、SH69、SH72; (2) 培养基表面完全变黑, 可见明显气体扩散痕迹(图 1B), 属于这类的细菌有 12 株, 分别为 SH14、SH18、SH19、SH23、SH42、SH43、SH44、SH74、SH80、SH86、SH87、SH91; (3) 仅接种细菌部位培养基变黑, 培养基其它位置不变色(图 1C), 属于这类的有 44 株, 以 SH08、SH16、SH78、SH83 等为代表; (4) 培养基和接种部位都不变黑(图 1D), 属于这类的细菌有 35 株, 以 SH34、SH57、SH82、SH90 等为代表。

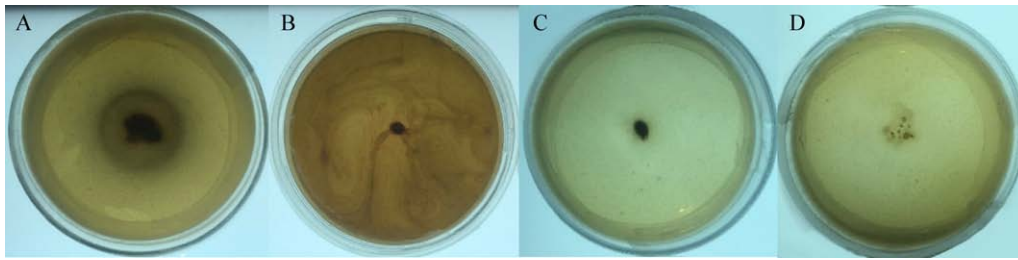


图 1 脱硫细菌在半胱氨酸培养基上的特征

Figure 1 Characteristics of desulfurizing bacteria inoculated on the cysteine medium

Note: A: SH72; B: SH86; C: SH78; D: SH82.

## 2.2 L-半胱氨酸脱硫细菌的多样性

根据 L-半胱氨酸脱硫细菌在平板上的筛选结果, 得到第一类脱硫细菌(SH25、SH35、SH46、SH68、SH69、SH72)、第二类脱硫细菌(SH16、SH74、SH86)、第三类脱硫细菌(SH08、SH42、SH78)共 12 株, 将其序列提交至 GenBank, 获得登录号 MH778136–MH778147。连同它们在 GenBank 中相似性达到 99% 以上的 16S rRNA 基因参比序列共同构建系统发育树(图 2)。由图 2 可知, 以上 L-半胱氨酸脱硫细菌分别属于 4 个属, SH08 属于红球菌属(*Rhodococcus*); SH25、SH68、SH72、SH74 属于赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*), SH46、SH69 属于动性球菌属(*Planococcus*), SH16、SH35、SH42、SH78、SH83、SH86 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。由此可见, 分离得到的 L-半胱氨酸脱硫细菌在细菌分类上分布广泛, 主要以芽孢杆菌科为主; 另外, 对在平板上脱硫特征相似的菌株进一步分析表明, 它们在属种上没有特异性, 如: 脱硫出现明显黑圈的第一类脱硫细菌在赖氨酸芽孢杆菌属、动性球菌属和芽孢杆菌属都有分布。

## 2.3 细菌的脱硫能力

为了精确评价各个菌株对 L-半胱氨酸脱硫的能力, 排除其它因素的干扰, 分别以接种菌株和不接种菌株(SH72)、加入 L-半胱氨酸和不加 L-半胱氨酸、加乙酸铅和不加乙酸铅 6 个组合进行了实验(表 1)。结果显示: 6 种实验组合都没有出现培养基变黑的现象, 因此, 培养基变黑可以排除其它因

素的影响, 从而有效地判断是否有 L-半胱氨酸脱去的硫与醋酸铅发生了反应。

将 12 株脱硫细菌分别接种在含有乙酸铅的 L-半胱氨酸培养基斜面中, 经 30 °C 培养, 分别于第 3、5、7 天观察记录结果(表 2), 由表中可以看出, 实验所选择的 12 株细菌的脱硫能力可分为强、中、弱三类(图 3)。SH68、SH72、SH78、SH74、SH69 脱硫能力较强, 培养至第 7 天时, 整个培养基几乎全部变黑。SH46、SH86、SH16、SH25 脱硫能力中等, 培养至第 7 天时, 培养基变黑深度达到整个培养基长度的 2/3。SH83、SH42、SH35、SH08 脱硫能力较弱, 培养至第 7 天时, 培养基变黑深度只限于表层的 1/5 培养基长度。培养结束后, 拔出棉塞, 所有接种脱硫细菌的试管均有明显的臭鸡蛋气味, 使用湿润的乙酸铅试纸检验均可观察到试纸变黑现象, 由此断定试管产生了 H<sub>2</sub>S 气体。

## 2.4 细菌脱氮能力的检测

根据文献可知, 微生物对半胱氨酸的脱硫可分为两类, 一是在半胱氨酸脱硫酶的作用下生成丙氨酸和过硫化物中间体, 继而与其它硫受体相结合转化为不同含硫辅因子<sup>[10,14]</sup>; 二是在半胱氨酸脱硫基酶的作用下生成丙酮酸、硫化氢和氨<sup>[15]</sup>。为进一步确认以上脱硫细菌脱硫的代谢类型, 用脱硫细菌的发酵产物采用纳氏试剂进行游离氨的检测。结果显示: 这 12 株脱硫细菌均产生淡红棕色络合物(图 4), 由此断定其产物中存在代谢所产生的氨, 因此, 该菌株中催化脱硫的酶均为半胱氨酸脱硫基酶。

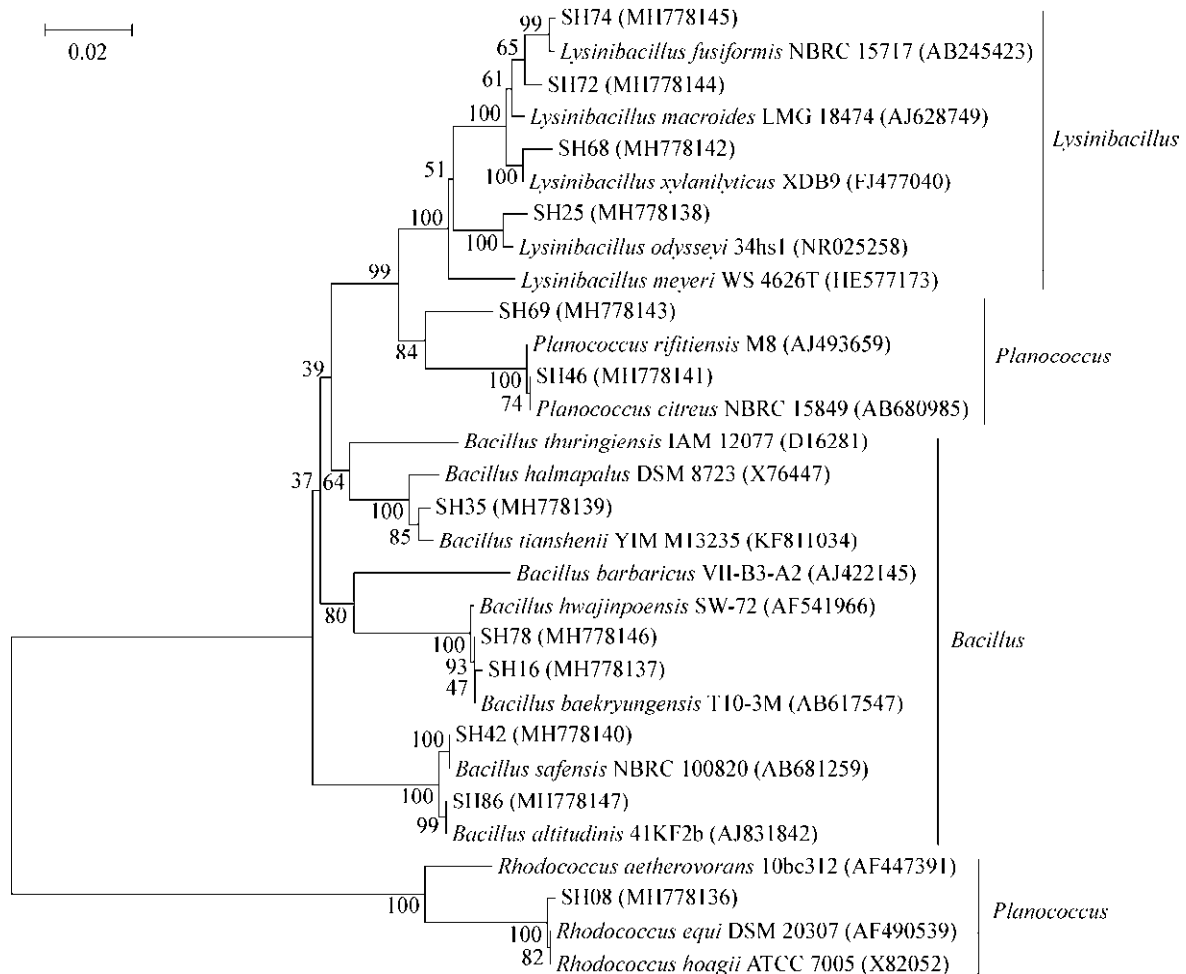


图 2 脱硫细菌和参照菌株的 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences from desulfurizing bacteria and reference strains

注: 括号内序号为序列的 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示 1 000 次重复后得到的置信值; 标尺表示 100 个核苷酸中有 2 个被替换。

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Numbers at the branch points indicates bootstrap values obtained after 1 000 replicates; The scale bar corresponds to 0.02 substitutions per nucleotide position.

表 1 不同因子对培养基颜色变化的影响

Table 1 Effect of different factors on the medium discoloration

试验 Test	L-半胱氨酸 L-Cysteine	乙酸铅 Lead acetate	菌株 Strain	培养基颜色变化 Medium discoloration
C1	+	+	-	-
C2	+	-	-	-
C3	+	-	+	-
C4	-	+	+	-
C5	-	+	-	-
C6	-	-	+	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

表 2 接种不同细菌的斜面培养基变黑长度的变化情况(cm)

Table 2 Blacken length of slope culture medium inoculated with different bacteria (cm)

菌株编号 Strain number	培养时间(天) Incubation time (d)		
	3	5	7
SH68	2.65±0.06	3.50±0.02	5.50±0.00
SH72	2.34±0.03	3.26±0.05	5.50±0.00
SH78	2.18±0.01	3.20±0.02	5.50±0.00
SH74	2.12±0.02	3.14±0.05	4.80±0.03
SH69	2.04±0.02	3.18±0.02	4.52±0.02
SH46	1.81±0.00	2.62±0.01	3.68±0.01
SH86	1.70±0.01	2.47±0.04	3.35±0.08
SH16	1.67±0.01	2.65±0.02	3.61±0.01
SH25	1.50±0.02	2.50±0.03	3.58±0.04
SH42	0.78±0.01	1.02±0.01	1.50±0.05
SH35	0.76±0.01	0.90±0.01	1.18±0.01
SH08	0.76±0.00	0.90±0.01	0.90±0.01

注: 每根试管中培养基长度为 5.5 cm.

Note: The length of medium in each tube was 5.5 cm.

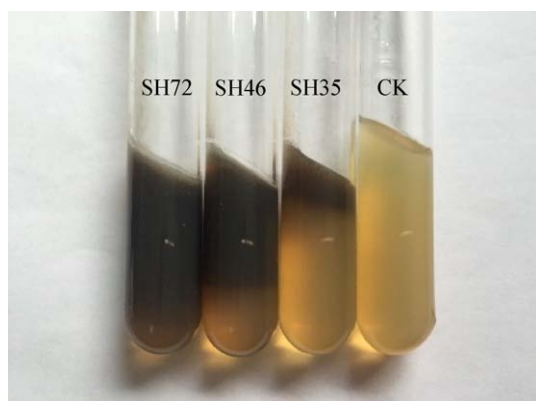


图 3 脱硫细菌脱硫能力的比较

Figure 3 Comparison of the abilities of desulfurizing bacteria

注: CK: 未接种细菌的培养基.

Note: CK: The medium without inoculation.

### 3 讨论与结论

本研究利用牛肉膏蛋白胨培养基从海洋沉积物中共分离得到 97 株细菌, 利用半胱氨酸培养基从中筛选出脱硫细菌 62 株, 占细菌总数的 63.92%。根据 L-半胱氨酸脱硫细菌在平板上的特征, 选了

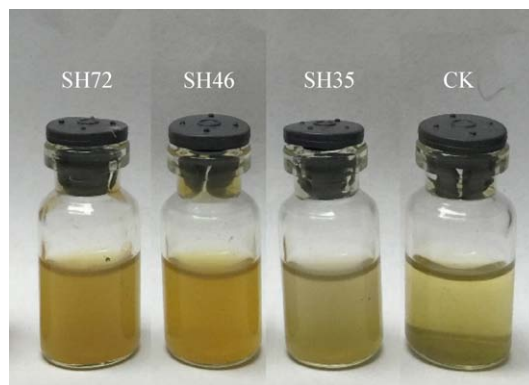


图 4 纳氏试剂对释放的氨的检测

Figure 4 Assay of released ammonia by Nessler's reagent

注: CK: 未接种细菌的培养基.

Note: CK: The medium without inoculation.

有代表性的 12 株细菌进行 16S rRNA 基因序列的分析, 结果显示: 这 12 株细菌分别属于赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、动性球菌属(*Planococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和红球菌属(*Rhodococcus*)。其中属于芽孢杆菌属中的细菌数量与种类最多, 包含 5 株细菌, 但此类细菌的脱硫能力不一致; 其次为赖氨酸芽孢杆菌属, 包含 4 株细菌, 且其脱硫能力都比较强; 动性球菌属包含 2 株细菌, 脱硫能力均处于中等; 红球菌属仅有 1 株细菌, 且脱硫能力较弱。在研究过程中, 曾尝试使用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  斜面培养基对以上株细菌进一步检验, 结果显示培养基不变色。由此可见, 以上细菌均可分解有机硫, 但不能还原无机态硫。据 Clarke<sup>[16]</sup>报道, 相比于以无机硫为底物的培养基, 在含有机硫的培养基中产生  $\text{H}_2\text{S}$  的细菌种类更为丰富。但考虑到硫酸盐还原细菌大多属于厌氧菌, 只有少部分为兼性厌氧菌, 且与无机硫反应产生  $\text{H}_2\text{S}$  的过程需要还原环境。而在本研究中, 分离细菌以及无机物脱硫实验的过程并未提供厌氧环境。这也是分离的细菌中缺乏无机脱硫细菌的重要原因。

本研究筛选得到的 12 株细菌均为革兰氏阳性菌。分析其生物学分类可以发现, 除 SH08 隶属于放线菌门(*Acfinobacteria*)外, 其他 11 株细菌均隶属于厚壁菌门(*Firmicutes*), 这与北戴河地区



微生物分布有关。北戴河沉积物中存在丰富的细菌类群,其中以变形菌门(*Proteobacteria*)为优势种, $\alpha$ -变形杆菌亚门(*Alphaproteobacteria*)、 $\gamma$ -变形杆菌亚门(*Gammaproteobacteria*)、 $\delta$ -变形杆菌亚门(*Deltaproteobacteria*)以及厚壁菌门(*Firmicutes*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、绿藻门(*Chlorobi*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)皆有分布<sup>[17]</sup>。目前尚未在蓝藻门、绿藻门和拟杆菌门中发现脱硫细菌。而变形菌门中发现脱硫细菌多为无机脱硫细菌,如: $\delta$ -变形杆菌亚门中的脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、除硫单胞菌属(*Desulfuromonas*); $\gamma$ -变形杆菌亚门中的柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)等。因此本研究中筛选得到的半胱氨酸脱硫细菌主要为厚壁菌门。

半胱氨酸脱硫细菌是有机物脱硫细菌中的一类,在自然界中常见于生物体内和土壤、河流、湖泊、地下水及它们相应的沉积物中。目前研究最多的是来源于生物体内的病原菌或其粪便中的半胱氨酸脱硫细菌,Guarneros等<sup>[18]</sup>发现肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的大肠杆菌(*Escherichia coli*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),以及Basicl等<sup>[19]</sup>发现人体口腔中大多数梭杆菌属(*Fusobacterium*)细菌都能够分解半胱氨酸产生 $H_2S$ 。Morra等<sup>[6]</sup>在土壤中添加加富的L-半胱氨酸,结果显示半胱氨酸在土壤微生物的作用下可产生明显的 $H_2S$ ,但未明确其脱硫细菌的种类。Stilinović等<sup>[20]</sup>通过平板计数法,发现在多种淡水环境及其对应沉积物中存在大量能产生 $H_2S$ 的半胱氨酸脱硫细菌;Ekimova等<sup>[7]</sup>通过构建半胱氨酸脱硫基酶基因文库的方法,分别从淡水、海洋和土壤等环境中发现大量的半胱氨酸脱硫细菌,其中以甲基杆菌属(*Methylobacterium*)为主,另外还包括了部分芽孢杆菌属(*Bacillus*)。而本研究从海洋沉积物也发现大量半胱氨酸脱硫细菌的存在,但与前人在不同环境下分离的半胱氨酸脱硫细菌有所不同,主要包括了赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、动性球菌属(*Planococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和红球

菌属(*Rhodococcus*)。Bahugunal等<sup>[21]</sup>的研究表明,赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和红球菌属(*Rhodococcus*)中的某些细菌均可脱去石油中的有机硫,而本研究中所获得的这些菌株均能脱去半胱氨酸中的硫,至于能否脱去石油中的有机硫还有待于进一步研究。

脱硫细菌对有机硫的脱硫作用是在酶的催化下进行的,目前有关脱硫细菌对石油的脱硫机制的研究较多,主要有还原C-S键断裂、氧化C-C键断裂和氧化C-S键断裂3种途径<sup>[3-4]</sup>。还原C-S键断裂类型是在厌氧条件下,通过脱硫细菌(*Desulfovibrio* sp.)还原石油中含硫化合物的C-S键生成 $H_2S$ ;而氧化C-S键断裂类型是在有氧条件下,通过对C-S键的氧化生成硫酸盐,采用此途径脱硫的细菌有红球菌属(*Rhodococcus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、黄单胞杆菌属(*Xanthomonas*)和分枝杆菌属(*Mycobacterium*)等脱硫细菌<sup>[3]</sup>。而细菌对半胱氨酸的脱硫作用主要受两种酶的催化,分别为半胱氨酸脱硫酶(Cysteine desulfurase)和半胱氨酸脱硫基酶(Cysteine desulfhydrase)。半胱氨酸脱硫酶分子中具有保守的赖氨酸和半胱氨酸残基,在催化半胱氨酸脱硫时,赖氨酸和半胱氨酸残基攻击L-半胱氨酸上的巯基,形成与酶结合的半胱氨酸过硫化物中间物,该过硫化物中间物可作为供硫体转化为含硫辅因子,继而参与多种生命活动<sup>[10,14]</sup>。半胱氨酸脱硫基酶则是催化L-半胱氨酸生成丙酮酸,并伴随 $H_2S$ 和氨的释放<sup>[14]</sup>。经检验,本实验从海洋沉积物中所分离得到的脱硫细菌均为含半胱氨酸脱硫基酶细菌,L-半胱氨酸在该酶的作用下生成 $H_2S$ 。经后续实验检验SH08、SH42、SH68、SH72、SH74、SH86均有较好的重金属离子耐受性,可与环境中存在的Pb、Cd等重金属离子发生沉淀反应,不但可去除水体环境中的重金属离子<sup>[22]</sup>,而且生成的PbS和CdS可作为纳米颗粒材料应用于光电化学领域<sup>[23-24]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Lei LD. Review of studies on sulfur circulation in P-T [J]. Chinese Petroleum and Chemical Standards and Quality. 2011, 31(10): 61 (in Chinese)  
雷丽丹. P-T 之交硫循环研究综述[J]. 中国石油和化工标准与质量. 2011, 31(10): 61
- [2] Hurtgen MT. The marine sulfur cycle, revisited[J]. Science, 2012, 337(20): 305-306
- [3] Gupta N, Roychoudhury PK, Deb JK. Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges[J]. Applied Microbiology and Biotechnology. 2005, 66(4): 356-366
- [4] Sohrabi M, Kamyab H, Janalizadeh N, et al. Bacterial desulfurization of organic sulfur compounds exist in fossil fuels[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2012, 6(2): 717-729
- [5] Ma T, Li GQ, Li J, et al. Desulfurization of dibenzothiophene by *Bacillus subtilis* recombinants carrying *dszABC* and *dszD* genes[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(14): 1095-1100
- [6] Morra MJ, Dick WA. Mechanisms of H<sub>2</sub>S production from cysteine and cysteine by microorganisms isolated from soil by selective enrichment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(5): 1413-1417
- [7] Ekimova GA, Fedorov DN, Tani A, et al. Distribution of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and D-cysteine desulfhydrase genes among type species of the genus *Methylobacterium*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2018, 111(3): 1-12
- [8] Zhang XR, Sun ZL, Wei HL, et al. Micro-biomineralization of authigenic pyrite and its implications for seafloor cold seeps[J]. Marine Geology & Quaternary Geology, 2017, 37(2): 25-32 (in Chinese)  
张现容, 孙治雷, 魏合龙, 等. 自生换铁矿的微生物成矿机理及对冷泉泄漏的指示意义[J]. 海洋地质与第四纪地质, 2017, 37(2): 25-32
- [9] Qian ZG, Sun KM. Methyl sulfide in the ocean and its effect on atmospheric sulfur cycle[J]. Marine Science, 1984, 8(2): 55-59 (in Chinese)  
钱佐国, 孙昆明. 海洋中的甲基硫化物及其对大气硫循环的影响[J]. 海洋科学, 1984, 8(2): 55-59
- [10] Mihara H, Esaki N. Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 60(1-2): 12-23
- [11] Chen L, Zhang H, Liu G, et al. First report on the bacterial diversity in the distal gut of dholes (*Cuon alpinus*) by using 16S rRNA gene sequences analysis[J]. Journal of Applied Genetics, 2016, 57(2): 275-283
- [12] Küster E, Williams ST. Production of hydrogen sulfide by streptomycetes and methods for its detection[J]. Applied Microbiology, 1964, 12(1): 46-52
- [13] Feng YP, Qiu HN, Sun ZJ. Research progress in determination of ammonia nitrogen in water by Nessler's reagent spectrophotometer[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 39(S2): 348-352 (in Chinese)  
封跃鹏, 邱赫男, 孙自杰. 纳氏试剂分光光度法测定水中氨氮研究进展[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(S2): 348-352
- [14] Black KA, Dos Santos PC. Shared-intermediates in the biosynthesis of thio-cofactors: mechanisms and functions of cysteine desulfurases and sulfur acceptors[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1853(6): 1470-1480
- [15] Oguri T, Schneider B, Reitzer L. Cysteine catabolism and cysteine desulfhydrase (CdsH/STE0458) in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(16): 4366-4376
- [16] Clarke PH. Hydrogen sulphide production by bacteria[J]. Journal of General Microbiology, 1953, 8(3): 397-407
- [17] Fan JF, Zhang L, Ming HX, et al. PCR-RFLP analysis of bacteria 16S rDNA in marine sediment of Beidaihe[J]. Marine Environmental Science, 2008, 27(5): 409-413 (in Chinese)  
樊景凤, 张兰, 明红霞, 等. 北戴河近岸沉积物中微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(5): 409-413
- [18] Guarneros G, Ortega MV. Cysteine desulfhydrase activities of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1970, 198(1): 132-142
- [19] Basicl A, Blomqvist M, Dahlén G, et al. The proteins of *Fusobacterium* spp. involved in hydrogen sulfide production from L-cysteine[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 61-71
- [20] Stilić B, Hrenović J. Plate method for counting proteolytic sulphide-producing bacteria[J]. Acta Botanica Croatica, 2009, 68(1): 57-66
- [21] Bahugunal A, Lilyl MK, Munjal A, et al. Desulfurization of dibenzothiophene (DBT) by a novel strain *Lysinibacillus sphaericus* DMT-7 isolated from diesel contaminated soil[J]. Journal Environmental Sciences, 2011, 23(6): 975-982
- [22] Bai HJ, Zhang ZM, Yun N, et al. Studies on removal and transformation mechanism of lead by *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(4): 608-614 (in Chinese)  
白红娟, 张肇铭, 袁妮, 等. 球形红细菌去除和转化铅的机理研究[J]. 环境科学学报, 2007, 27(4): 608-614
- [23] Bai HJ, Zhang ZM. Microbial synthesis of semiconductor lead sulfide nanoparticles using immobilized *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Materials Letters, 2009, 63(9): 764-766
- [24] Yang Z, Lu L, Kiely CJ, et al. Biomineralized CdS quantum dot nanocrystals: optimizing synthesis conditions and improving functional properties by surface modification[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2016, 55(43): 11235-11244