

# 深海热液生物共附生可培养硫氧化细菌的多样性及硫氧化特性

李响<sup>1</sup>, 李倩<sup>2</sup>, 高伟<sup>2</sup>, 朱云瑾<sup>2</sup>, 王汐月<sup>1</sup>, 王绪敏<sup>1</sup>, 郑立<sup>\*2,3</sup>

1 烟台大学生命科学学院, 山东 烟台 264005

2 自然资源部第一海洋研究所 自然资源部海洋生态环境科学与技术重点实验室, 山东 青岛 266061

3 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266071

李响, 李倩, 高伟, 朱云瑾, 王汐月, 王绪敏, 郑立. 深海热液生物共附生可培养硫氧化细菌的多样性及硫氧化特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 437-448

Li Xiang, Li Qian, Gao Wei, Zhu Yunjin, Wang Xiyue, Wang Xumin, Zheng Li. Diversity and sulfur oxidation characteristics of culturable sulfur-oxidizing bacteria associated with benthic organisms in deep-sea hydrothermal area[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 437-448

**摘要:**【背景】深海热液环境中存在大量 H<sub>2</sub>S 及含硫化合物, 许多微生物与大型生物形成了紧密的共生体系, 例如硫氧化细菌, 它们利用其独特的代谢体系协助宿主更好地适应极端环境, 但目前尚未对热液底栖生物共附生的硫氧化细菌进行培养鉴定和功能分析。【目的】了解深海热液生物共附生硫氧化细菌的种群特征和功能特征, 筛选出深海热液生物共附生微生物中的硫氧化细菌, 分析其多样性及硫氧化功能, 探讨这类细菌与宿主生物的共生关系。【方法】采用 3 种含硫培养基(M1、SPG、SOB)对热液区生物组织样品中的硫氧化细菌进行富集培养和分离纯化; 利用 16S rRNA 基因序列确定它们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细菌的硫氧化活性进行检测。【结果】从热液底栖生物的鳃中分离得到 169 株硫氧化细菌, 分属于变形杆菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*), 优势菌属为盐单胞菌属(*Halomonas*), 占比为 73%。硫氧化活性检测结果表明, *Thioclava nitratireducens* M1-LQ-LJL-11、*Qipengyuania vulgaris* M1-TC-YB-4 和 *Dietzia cercidiphylli* M1-TC-01-YL-6 对硫化物的氧化率较高, 分别达到了 70.4%、77.7%和 69.8%。【结论】通过培养的方法从热液底栖生物中了解到可培养共附生硫氧化细菌主要以  $\gamma$ -变形杆菌纲(*Gammaproteobacteria*)为主, 并且具有较高的硫氧化能力, 可为宿主解毒热液环境中的 H<sub>2</sub>S 发挥重要作用。

**关键词:** 深海热液; 共附生微生物; 硫氧化细菌; 多样性; 硫氧化活性

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0310701); 自然资源部大洋深海生物资源计划(DY135-B2-11)

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2018YFC0310701); Ocean Deep Sea Biological Resources Program of Ministry of Natural Resources, China (DY135-B2-11)

\*Corresponding author: E-mail: zhengli@fio.org.cn

Received: 2021-08-16; Accepted: 2021-09-19; Published online: 2021-11-24

# Diversity and sulfur oxidation characteristics of culturable sulfur-oxidizing bacteria associated with benthic organisms in deep-sea hydrothermal area

LI Xiang<sup>1</sup>, LI Qian<sup>2</sup>, GAO Wei<sup>2</sup>, ZHU Yunjin<sup>2</sup>, WANG Xiyue<sup>1</sup>, WANG Xumin<sup>1</sup>, ZHENG Li<sup>\*2,3</sup>

1 School of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, Shandong, China

2 Key Laboratory of Marine Eco-Environmental Science and Technology, The First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Qingdao 266061, Shandong, China

3 Marine Ecology and Environmental Science Laboratory, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, Shandong, China

**Abstract:** **[Background]** Microbes in deep-sea hydrothermal vents use the extensive H<sub>2</sub>S and sulfides in the environment to form a close symbiotic relationship with macrofauna. For example, sulfur-oxidizing bacteria use their unique metabolic system to help their hosts better adapt to the extreme conditions in hydrothermal vents. However, there is still no study on the identification and functional analysis of these symbionts of vent fauna. **[Objective]** To investigate the diversity and sulfur oxidation characteristics of culturable sulfur-oxidizing bacteria in hydrothermal benthos, and explore the symbiosis between sulfur-oxidizing bacteria and their animal hosts. **[Methods]** We used three culture media (M1, SPG, SOB) to isolate sulfur-oxidizing bacteria associated with hydrothermal benthos from different areas in the deep-sea hydrothermal vents. 16S rRNA gene sequences were used for phylogenetic analysis. The iodometric method was used to measure the sulfur oxidation activity. **[Results]** In the experiment, we obtained 169 strains of sulfur-oxidizing bacteria, which belong to *Actinobacteria* and *Proteobacteria*. Among them, the genus *Halomonas* was dominant, accounting for 73%. Three isolates showed higher sulfur oxidation activities: *Thioclava nitratireducens* M1-LQ-LJL-11 (70.4%), *Qipengyuania vulgaris* M1-TC-YB-4 (77.7%), and *Dietzia cercidiphylli* M1-TC-01-YL-6 (69.8%). **[Conclusion]** The diversity of culturable sulfur-oxidizing bacteria in hydrothermal benthos was reported for the first time. It was found that *Gammaproteobacteria* was the dominant, which had high sulfur oxidation ability and could detoxify H<sub>2</sub>S for their hosts in the hydrothermal fluids.

**Keywords:** deep-sea hydrothermal; symbiotic microorganisms; sulfur-oxidizing bacteria; diversity; sulfur oxidation ability

深海热液区是地球上最极端的环境之一,具有高/低温、高压、高硫含量等环境特点,造就了有别于浅海和陆地热液的特殊生态系统。热液区的生物群落中遍布着数十种管状蠕虫、以甲壳类动物为食的鱼类、依靠共附生微生物获取营养的软体动物及一些虾和螃蟹等,具有很高的生物多样性<sup>[1]</sup>。

多种证据表明,海底热液生态系统呈现出明显的大型生物与化学自养细菌、古菌等微生物共生的特征,特别是这种大型的底栖生物会通过与其共生以摄取营养<sup>[2]</sup>。已知一种无消化系统的管状蠕虫(*Riftiapachyptila*)<sup>[3]</sup>获取养分的唯一途径即是利用体内的硫氧化细菌,这些硫氧化细菌利用火山口释放的硫化氢气体作为

地热能源进行化能自养生长,将二氧化碳转化为有机物,为热液群落中的共生生物提供食物来源。对冲绳海槽伊平屋热液活动区热液伴溢蛤(*Calyptogena magnifica*)的研究发现<sup>[4]</sup>,其鳃组织内充满了共生的细菌,在显微镜下可观察到大量的无机硫磺晶体,经证实这些共生细菌中存在着硫氧化细菌,它们通过化能自养将热液环境中的硫化氢等还原性物质氧化而产生能量,为宿主提供营养。以上研究表明,硫氧化细菌在深海热液生物的生长中扮演着重要角色,基本所有的热液区无脊椎动物都需要通过与硫氧化细菌共生来获得营养<sup>[5]</sup>,但热液环境中关于可培养硫氧化细菌的报道较少,多数是从附近的沉积物中分离,徐鈇绣等<sup>[6]</sup>从南大西洋深海热液硫化物及其附近的沉积物中分离纯化硫氧化细菌,结果表明硫氧化细菌多样性丰富且不同站位存在差异,主要隶属于 *Alphaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria* 和 *Actinobacteria*。杜瑞等<sup>[7]</sup>从冲绳海槽热液区沉积物中分离的硫氧化细菌,主要隶属于 *Actinobacteria*、*Firmicutes* 和 *Proteobacteria*。目前还未见从深海热液生物中分离获得可培养共附生硫氧化细菌的报道,而开展这类细菌多样性和相关的能量代谢的研究对理解深海热液生态系统的维持具有重要的科学意义。

2019年4月,我国大洋科考第52航次在龙旂和天成2个活动热液区观测到大量底栖生物,通过海龙三号遥控无人潜水器(remote

operated vehicles, ROV)采集到深海贻贝、芋螺、巨佩托螺和鳞脚螺等生物样本。本研究首次对这些生物样本鳃中的硫氧化细菌进行富集与分离,并对可培养共附生硫氧化细菌多样性进行分析,对不同属硫氧化细菌的硫氧化能力进行检测,探讨其在热液生物对极端环境硫化物解毒过程中发挥的作用及可能参与的代谢类型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品的采集

研究所用样品为2019年3月-5月大洋科考第52航次采集的西南印度洋中脊龙旂和天成2个热液区的生物样品,经鉴定分别为深海贻贝(*Bathymodiolus platifrons*)、芋螺(*Phymorhynchus* sp. *Tiancheng*)、巨佩托螺(*Gigantopelta aegis*)和鳞脚螺(*Chrysomallon squamiferum*)。取1g采集样品生物的鳃组织用无菌海水振荡清洗3遍,去掉非紧密附生的微生物研磨成匀浆,用10mL含30%甘油的海水重悬后置于-80℃冰箱保存,待航次结束后带回实验室进行富集培养。样品信息见表1。

#### 1.1.2 培养基

M1<sup>[6]</sup>(g/L): 氯化钠 25.00, 酚红 0.30, 二水合氯化钙 0.42, 七水合硫酸镁 1.50, 硫酸铵 1.00, 微量元素(DSM141) 10.00 mL, pH调至7.0, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min, 加入过滤除菌的终

表1 热液区生物样品采集信息

Table 1 Sampling information of organisms collected in hydrothermal area

Sample No.	Sample type	Depth (m)	Longitude (E, °)	Latitude (S, °)	Area of hydrothermal vent
LQ-YB	<i>Bathymodiolus platifrons</i>	2 792	49.650 26	37.784 04	Longqi
TC-YB	<i>Bathymodiolus platifrons</i>	2 756	63.923 10	27.850 81	Tiancheng
TC-01-YL	<i>Phymorhynchus</i> sp. <i>Tiancheng</i>	2 756	63.923 10	27.850 81	Tiancheng
LQ-JPL	<i>Gigantopelta aegis</i>	2 768	49.650 00	37.783 06	Longqi
LQ-LJL	<i>Chrysomallon squamiferum</i>	2 768	49.650 00	37.783 06	Longqi
TC-LJL	<i>Chrysomallon squamiferum</i>	2 762	63.923 15	27.850 78	Tiancheng

浓度为 15  $\mu\text{g/L}$  的  $\text{VB}_{12}$  溶液, 五水合硫代硫酸钠 5.00, 磷酸氢二钾 0.50, 最后调节 pH 值至 7.0; SPG<sup>[7]</sup> (g/L): 酚红 0.003, 1,4-哌嗪二乙磺酸 6.500, 氯化钠 25.000, 七水合硫酸镁 2.700, 氯化钾 0.500, 氯化铵 0.250, 五水合硫代硫酸钠 2.480, 二水合氯化钙 0.140, 六水合氯化镁 4.300, 磷酸氢二钾 0.140, 六水合硫酸亚铁铵 0.002, 微量元素(DSM141) 1 mL, 维生素溶液 10 mL; pH 值调至 7.6,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min; SOB<sup>[7]</sup> (g/L): 酚红 0.004, 微量元素 1 mL, 碳酸氢钠 1.680, 氯化钾 0.700, 磷酸氢二钾 0.500, 五水合硫代硫酸钠 4.960, 七水合硫酸镁 1.500, 二水合氯化钙 0.400, 氯化铵 0.267 5,  $\text{VB}_{12}$  溶液 1 mL, 单质硫 0.640, 海水 1 L, pH 值调至 7.6,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

## 1.2 硫氧化细菌的富集和筛选<sup>[6-7]</sup>

### 1.2.1 硫氧化细菌的富集

取 2 mL 样品分别加入 50 mL M1、SPG、SOB 培养基中, 于 100 mL 锥形瓶中 180 r/min、25 °C 进行避光好氧富集, 当培养基颜色发生变化后, 将 1 mL 的培养液转至新的培养基中, 连续富集 3 次。

### 1.2.2 硫氧化细菌的分离、纯化与保藏

根据培养基的颜色变化, 30 d 后将第 3 次转接的菌液做梯度稀释, 稀释倍数为  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  和  $10^{-4}$ , 吸取 100  $\mu\text{L}$  菌液涂布到相应的平板培养基上, 每个梯度 2 个平行, 25 °C 培养; 待菌落长出后, 用牙签挑取形态、颜色有差异的单菌落, 划线分离纯化 3 次得到纯菌, 经相应液体培养基培养后, 用 30% 甘油保种液进行保种并置于 -80 °C 低温保藏。

## 1.3 细菌 16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析

分离得到的菌株交由擎科生物(青岛)公司进行 16S rRNA 基因序列测定, 测序结果经剪

接得到有效长度约 1 500 bp 的基因序列, 经 EzBioCloud 数据库进行比对, 模式菌株和目的菌株的 16S rRNA 基因序列采用 MEGA 6.0 构建系统发育树, 方法参照文献[6]。

## 1.4 细菌硫氧化能力的初步检测

将鉴定出来的代表菌株接种到 SOB 培养基中, 选择在含硫培养基中长势较好的不同属的代表菌株, 包括 *Dietzia cercidiphylli* M1-TC-01-YL-6、*Thioclava nitratireducens* M1-LQ-LJL-11、*Qipengyuania vulgaris* M1-TC-YB-4、*Halomonas axialensis* SPG-TC-01-YL-7、*Salipiger bermudensis* SOB-TC-01-YL-5、*Alteromonas abrolhosensis* SOB-LQ-YB-5 和 *Acinetobacter venetianus* M1-TC-01-YL-12, 大肠杆菌作为阴性对照, 同时设置空白对照, 每组 3 个平行, 25 °C 条件下进行培养。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, 检测周期为 2 d。由于菌株氧化途径的差异会使培养基的 pH 产生不同变化, 若培养基颜色变红为产碱硫氧化细菌, 氧化过程中产生中间代谢产物使 pH 升高; 若培养基颜色变黄为产酸硫氧化细菌, 氧化过程中将底物氧化生成硫酸盐使 pH 下降。硫代硫酸钠浓度采用碘量法进行检测<sup>[8]</sup>, 硫氧化能力以硫氧化率来表示, 计算公式为: 硫氧化率=(初始硫代硫酸钠浓度-剩余硫代硫酸钠浓度)/初始硫代硫酸钠浓度 $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离与鉴定

通过 3 种含硫培养基(M1、SPG、SOB)的富集和筛选, 从 2 个热液区站点的 6 个生物样品中分离得到 169 株硫氧化细菌。

经过测序和 EzBioCloud 数据库的比对, 169 株硫氧化细菌属于 2 个门 7 个属, 2 个门分

别为放线菌门 (*Actinobacteria*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*), 其中变形菌门 (*Proteobacteria*) 为优势菌门, 占有菌株的 97%, 变形菌门中的  $\gamma$ -变形菌纲 (*Gammaproteobacteria*) 是优势菌纲, 占 84%。7 个属包括迪茨氏菌属 (*Dietzia*)、袁其鹏属 (*Qipengyuania*)、粘液盐懒惰菌属 (*Salipiger*)、硫克拉瓦属 (*Thioclava*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和交替单胞菌属 (*Alteromonas*), 可培养的细菌中占比最多的是盐单胞菌属 (*Halomonas*), 占 75%。所有菌株经 16S rRNA 基因序列比对, 确定不同菌株有 33 株, 其中来自龙旗 18 株、天成 15 株, 细菌的 16S rRNA 基因比对结果见表 2。

## 2.2 系统发育树的构建

将鉴定出的 33 株不同硫氧化细菌和模式菌株的 16S rRNA 基因序列用 MEGA 6.0 构建系统发育树 (图 1), 方法参照文献 [6], 从系统发育树中可以看到这 33 株不同的硫氧化细菌主要属于  $\gamma$ -变形菌纲 (*Gammaproteobacteria*), 其中盐单胞菌属 (*Halomonas*) 是主要的属且亲缘关系较近, 次优势的属是交替单胞菌属 (*Alteromonas*)。然而  $\alpha$ -变形菌纲 (*Alphaproteobacteria*) 中的属多样性较高, 包括袁其鹏属 (*Qipengyuania*)、粘液盐懒惰菌属 (*Salipiger*)、硫克拉瓦属 (*Thioclava*) 和红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 的细菌; 而属于放线菌门 (*Actinobacteria*) 的 5 株可培养硫氧化细菌都属于迪茨氏菌属 (*Dietzia*)。

## 2.3 硫氧化细菌多样性的分析

### 2.3.1 不同样品中获得的硫氧化细菌多样性的比较

从 6 个样品 TC-01-YL、TC-LJL、TC-YB、LQ-JPL、LQ-LJL 和 LQ-YB 中分别获得 30、25、26、32、22 和 34 株菌株 (表 3)。经过统计, *Halomonas* 在 6 个样品中的分离率均为第一, 分别占比为 72%、74%、76%、81%、85% 和 62%。

统计同一站点不同样品中获得菌株种水平的差异。结果显示, 在天成站点中 (图 2), 不同生物样品中相同种的硫氧化细菌共有 2 种, 属于 *Salipiger*; 鳞脚螺中特有的种有 1 种, 属于 *Salipiger*, 芋螺中特有的种有 4 种, 属于 *Halomonas*、*Dietzia* 和 *Thioclava*, 贻贝中特有的种有 2 种, 属于 *Dietzia* 和 *Qipengyuania*; 龙旗站点中 (图 3), 不同生物样品中相同种的硫氧化细菌共有 3 种, 属于 *Halomonas*, 贻贝中特有的种有 1 种, 属于 *Alteromonas*; 鳞脚螺中特有的种有 2 种, 属于 *Dietzia* 和 *Thioclava*; 巨佩螺中特有的种有 2 种, 属于 *Dietzia* 和 *Halomonas*。

### 2.3.2 不同站点生物样品分离的硫氧化细菌聚类分析

以每个样品获得的不同种的硫氧化细菌为聚类指标, 使用 Origin 8.0 对热液区的 6 个样品进行系统聚类分析, 聚类树状图如图 4 所示。从聚类分析结果中可以看出, TC-LJL 和 TC-01-YL 及 LQ-JPL 和 LQ-LJL 的物种分别聚为一类, 而 LQ-YB 和 TC-YB 各自聚为一类。这说明可培养硫氧化细菌种类和采样站位相关, 尽管龙旗和天成都采集到鳞脚螺这一物种, 但从 2 个样品中筛选获得的硫氧化细菌却与相同站位的其他物种聚为一类。作为深海热液贻贝来说, 由于其鳃体占整个组织的 2/3, 所以其中的可培养硫氧化细菌不同于其他种类, 但来源于 2 个站点深海热液贻贝的硫氧化细菌也未聚在一起。

### 2.3.3 不同培养基获取的硫氧化细菌多样性比较

将 6 个样品按照硫底物浓度的不同将培养基分为 M1、SPG 和 SOB, M1 培养基硫底物浓度为 5 g/L 硫代硫酸钠; SPG 培养基硫底物浓度为 2.48 g/L 硫代硫酸钠; SOB 培养基硫底物浓度为 4.96 g/L 硫代硫酸钠和 0.64 g/L 的硫粉, 3 种培养基共获得 33 种不同的硫氧化细菌, 获得菌株数量及种类占比如图 5 所示, 在 M1 中,

表 2 热液底栖生物鳃中可培养硫氧化细菌的 16S rRNA 基因信息

Table 2 16S rRNA gene information of culturable sulfur oxidizing bacteria isolated from the hydrothermal benthic organisms gill

站点 Sites	菌株 Strains	登录号 Accession No.	相似菌株 Closest strains in GenBank	相似度 Similarity (%)	
LQ	SOB-LQ-YB-1	MZ292945	<i>Alteromonas abrolhosensis</i> PEL67E	99.85	
	SOB-LQ-YB-3	MZ292946	<i>Alteromonas abrolhosensis</i> PEL67E	100.00	
	SOB-LQ-YB-5	MZ292937	<i>Alteromonas abrolhosensis</i> PEL67E	98.52	
	SPG-LQ-YB-6	MZ292960	<i>Alteromonas abrolhosensis</i> PEL67E	99.36	
	SPG-LQ-YB-1	MZ292938	<i>Alteromonas abrolhosensis</i> PEL67E	99.51	
	SOB-LQ-YB-10	MZ292939	<i>Alteromonas abrolhosensis</i> PEL67E	99.64	
	M1-LQ-YB-11	MZ292950	<i>Halomonas axialensis</i> Althf1	100.00	
	M1-LQ-YB-8	MZ292947	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425	99.93	
	SPG-LQ-LJL-6	MZ292957	<i>Halomonas axialensis</i> Althf1	99.51	
	M1-LQ-LJL-3	MZ292962	<i>Dietzia cercidiphylli</i> YIM 65002	99.22	
	M1-LQ-JPL-11	MZ292942	<i>Dietzia lutea</i> YIM 80766	98.85	
	M1-LQ-JPL-13	MZ292963	<i>Halomonas axialensis</i> Althf1	99.44	
	SOB-LQ-JPL-9	MZ292936	<i>Halomonas axialensis</i> Althf1	98.95	
	M1-LQ-JPL-1	MZ292948	<i>Salipiger bermudensis</i> HTCC 2601	99.26	
	M1-LQ-JPL-3	MZ292949	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425	99.78	
	SOB-LQ-JPL-2	MZ292935	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 30161	99.93	
	M1-LQ-LJL-2	MZ571942	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425	99.93	
	M1-LQ-LJL-11	MZ642312	<i>Thioclava nitratireducens</i> 25B10_4	99.27	
	TC	SOB-TC-01-YL-5	MZ292964	<i>Salipiger bermudensis</i> HTCC 2601	98.32
		M1-TC-01-YL-10	MZ292958	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425	98.74
M1-TC-01-YL-11		MZ292959	<i>Halomonas axialensis</i> Althf1	98.88	
SPG-TC-01-YL-7		MZ292940	<i>Halomonas axialensis</i> Althf1	99.58	
M1-TC-01-YL-4-1		MZ292941	<i>Halomonas axialensis</i> Althf1	98.33	
M1-TC-01-YL-7		MZ292951	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 30161	99.85	
SOB-TC-01-YL-8		MZ292956	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425	99.85	
M1-TC-01-YL-6		MZ292955	<i>Dietzia cercidiphylli</i> YIM 65002	100.00	
M1-TC-YB-2		MZ292954	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672	100.00	
M1-TC-YB-4		MZ292953	<i>Qipengyuania vulgaris</i> 0222-10	99.92	
M1-TC-YB-10		MZ292952	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672	98.92	
SOB-TC-YB-3		MZ292943	<i>Salipiger bermudensis</i> HTCC 2601	99.45	
SOB-TC-LJL-5		MZ292944	<i>Salipiger pacificus</i> DSM 26894	99.70	
M1-TC-LJL-8		MZ292961	<i>Halomonas axialensis</i> Althf1	98.96	
M1-TC-01-YL-12	MZ642310	<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1	99.24		

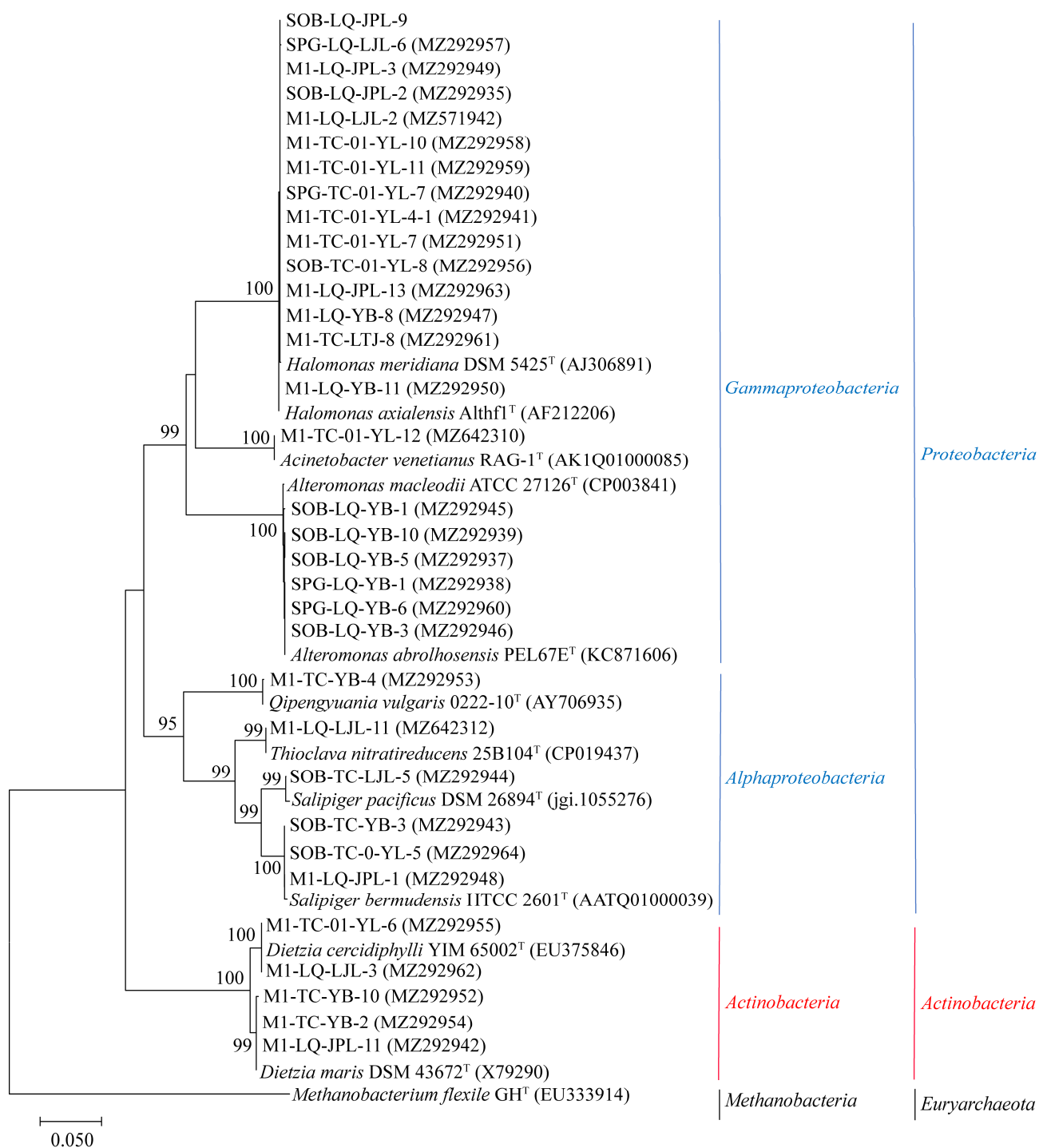


图 1 可培养硫氧化细菌的系统发育树 括号中的序号代表菌株的序列登录号; 分支点数字代表亲缘关系的置信度; 标尺长度代表遗传距离

Figure 1 The phylogenetic tree of culturable sulfur oxidizing bacteria. The contents in parentheses are accession numbers of the strain; Branch point number represents the confidence level of kinship; Scale length represents genetic distance.

表 3 不同样品中分离的硫氧化细菌的数量和种类  
Table 3 Number and species of sulfur-oxidizing bacteria isolated from different samples

样品 Samples	数量 Numbers	属 Genera
TC-01-YL	30	<i>Dietzia</i> (1) <i>Halomonas</i> (22) <i>Salipiger</i> (5) <i>Thioclava</i> (1) <i>Acinetobacter</i> (1)
TC-LJL	25	<i>Halomonas</i> (18) <i>Salipiger</i> (7)
TC-YB	26	<i>Dietzia</i> (2) <i>Qipengyuania</i> (1) <i>Halomonas</i> (20) <i>Salipiger</i> (3)
LQ-JPL	32	<i>Dietzia</i> (1) <i>Halomonas</i> (26) <i>Salipiger</i> (5)
LQ-LJL	22	<i>Dietzia</i> (1) <i>Halomonas</i> (18) <i>Salipiger</i> (2) <i>Thioclava</i> (1)
LQ-YB	34	<i>Alteromonas</i> (11) <i>Halomonas</i> (21) <i>Salipiger</i> (2)

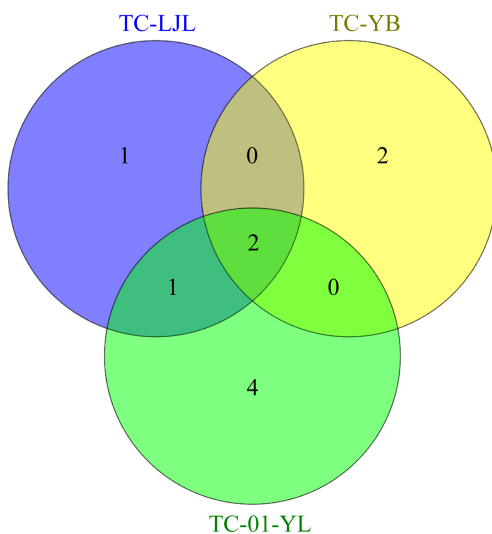


图 2 天成站点不同生物样品分离硫氧化细菌的种数量

Figure 2 Species number of sulfur-oxidizing bacteria isolated from different samples in the Tiancheng hydrothermal area.

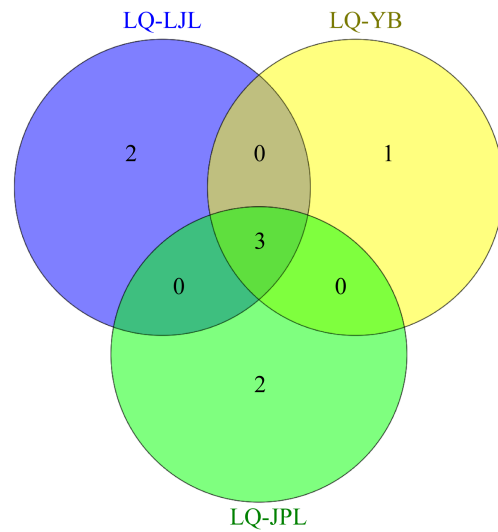


图 3 龙旗站点不同生物样品分离硫氧化细菌的种数量

Figure 3 Species number of sulfur-oxidizing bacteria isolated from different samples in the Longqi hydrothermal area.

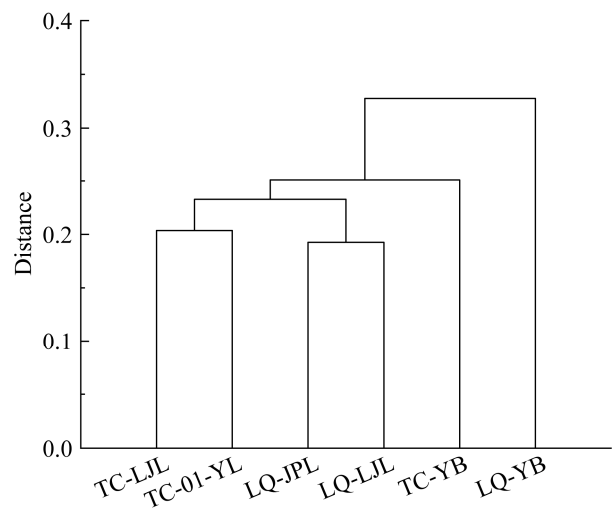


图 4 不同站点样品硫氧化细菌物种聚类分析

Figure 4 Clustering analysis of sample species from different sites.

获得 10 种菌株, 属于 *Dietzia*、*Qipengyuania*、*Halomonas*、*Salipiger*、*Thioclava* 和 *Acinetobacter* 6 个属; 在 SPG 中, 获得 3 种菌株, 属于 *Alteromonas* 和 *Halomonas* 2 个属; 在 SOB 中,



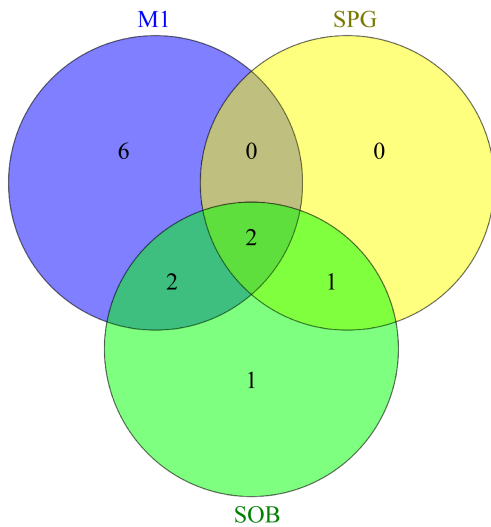


图 5 不同培养基(M1、SPG、SOB)分离硫氧化细菌的种类及数量

Figure 5 The genera and quantities of sulfur-oxidizing bacteria isolated from different media (M1, SPG, SOB).

获得 6 种菌株, 属于 *Halomonas*、*Salipiger* 和 *Halomonas* 3 个属。在 3 种培养基中细菌占比最多的是 *Halomonas*, 占有菌株的 22%, 占比最少的是 *Qipengyuania* 和 *Acinetobacter*, 占有菌株的 0.6%, 从数量和多样性结果来看, 利用 M1 培养基筛选出来的细菌数量和属多样性是最高的。

## 2.4 硫氧化活性的检测

硫氧化活性检测采用的代表菌株为: 非硫氧化细菌大肠杆菌(*Escherichia coli*); 硫氧化细菌 *Salipiger bermudensis* SOB-TC-01-YL-5、*Alteromonas abrolhosensis* SOB-LQ-YB-5、*Dietzia cercidiphylli* M1-TC-01-YL-6、*Qipengyuania vulgaris* M1-TC-YB-4、*Halomonas axialensis* SPG-TC-01-YL-7、*Thioclava nitratireducens* M1-LQ-LJL-11 和 *Acinetobacter venetianus* M1-TC-01-YL-12, SOB 培养基作为空白对照。对以上硫氧化细菌在培养过程中培养液 pH 的变化进行检测发现, 菌株 *Alteromonas abrolhosensis* SOB-LQ-YB-5 和 *Acinetobacter*

*venetianus* M1-TC-01-YL-12 在培养过程中的 pH 值无明显变化; 剩余硫氧化细菌在培养过程中的 pH 值呈现下降趋势, 其中 *Salipiger bermudensis* SOB-TC-01-YL-5 终点 pH 值从最初的 8.32 下降到 6.27, *Thioclava nitratireducens* M1-LQ-LJL-11 下降到 4.50, *Halomonas axialensis* SPG-TC-01-YL-7 下降到 5.12, *Dietzia cercidiphylli* M1-TC-01-YL-6 下降到 4.36, 降低程度最大(图 6)。通过对以上 7 株菌培养过程中菌液硫代硫酸钠浓度的检测发现(图 7), 它们在培养过程中对硫代硫

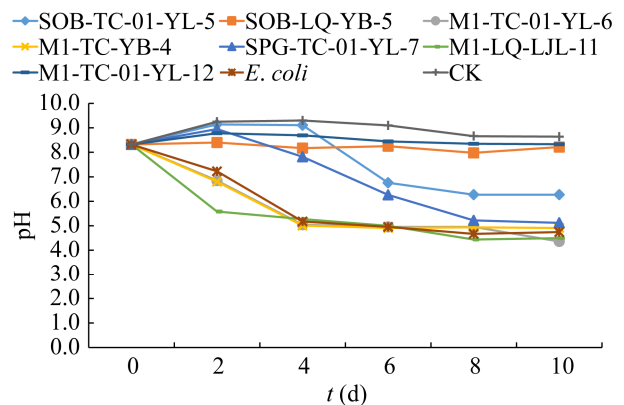


图 6 不同硫氧化细菌在培养过程中的 pH 值的变化

Figure 6 Changes in pH values of different sulfur-oxidizing strains during culture.

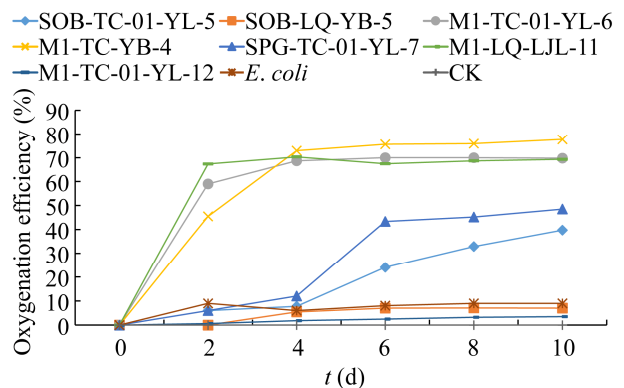


图 7 不同硫氧化细菌在培养过程中硫氧化率的变化趋势

Figure 7 Changes in sulfur oxidation rate of different sulfur-oxidizing strains during culture.

酸钠的氧化程度不同,氧化率为7%–80%,其中硫氧化细菌 *Qipengyuania vulgaris* M1-TC-YB-4 对硫代硫酸钠的氧化率接近80%,而对照组大肠杆菌 *E. coli* 的硫代硫酸钠浓度基本无变化。研究发现,硫氧化性较好的几株菌均为产酸硫氧化细菌,随着pH值的逐渐降低,对硫代硫酸钠的氧化率也越来越高。

### 3 讨论与结论

本文以中国大洋科考第52航次获得的热液区生物样品为实验对象,分离得到可培养硫氧化细菌169株,分别属于 *Proteobacteria* 和 *Actinobacteria*, 其中优势门为 *Proteobacteria*, 占有菌株的97%,其中 *Gammaproteobacteria* 是优势纲,占84%,可培养的细菌中占比最多的属是 *Halomonas*, 占有菌株的75%,本研究结果与徐鈇绣等<sup>[6]</sup>的研究结果较为相近,他们以大洋科考第22航次中获得的沉积物为对象,研究了南大西洋热液区可培养硫氧化细菌的多样性,获得48株硫氧化细菌,分别属于 *Alphaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria* 和 *Actinobacteria*, 优势菌属为 *Thalassospira*、*Martelex* 和 *Microbacterium*, 杜瑞等<sup>[7]</sup>从冲绳海槽热液区样品中分离得到85株硫氧化细菌,分别属于 *Firmicutes*、*Actinobacteria* 和 *Proteobacteria*, 优势属为 *Hydrogenovibrio*、*Labrenzia*、*Thalassospira* 和 *Marinobacter*。本研究结果显示,可培养硫氧化细菌的优势属为 *Halomonas*, 这种在属水平上的差异,猜测可能是由于热液区站点、样品和培养方法不同造成的。对于热液底栖生物共附生硫氧化细菌的分离鉴定工作还未见报道,前人都是通过基因分析的方法证实热液生物中含有大量硫氧化细菌。Zbinden等<sup>[8]</sup>分析了热液盲虾虾鳃附生菌16S rRNA 基因多样性,结果表明虾鳃附生菌中的主要类群属于 *Epsilonproteobacteria* 和 *Gammaproteobacteria*,

多数为不可培养菌株。侯佳林<sup>[9]</sup>基于宏基因组的组装方法从深海热液烟囱体中构建了 *Epsilonproteobacteria* 和 *Thermotogae* EM3 的高质量基因组,分析显示 *Epsilonproteobacteria* 具有化能自养的能力,可以将还原性硫和氢气转化为自身所需要的营养物质。我们的实验结果发现,优势硫氧化细菌为 *Gammaproteobacteria*, 并未培养出 *Epsilonproteobacteria* 的细菌,这主要是因为 *Epsilonproteobacteria* 的细菌多为难培养细菌。

对不同样品中分离得到的硫氧化细菌进行为期10d的硫氧化能力的检测实验,结果发现3株菌有明显的硫氧化能力,分别为 *Thioclava nitritireducens* M1-LQ-LJL-11、*Qipengyuania vulgaris* M1-TC-YB-4 和 *Dietzia cercidiphylli* M1-TC-01-YL-6, 对硫化物的氧化率分别达到了70.4%、77.7%和69.8%。3株菌中 *Qipengyuania* 的硫氧化能力最高, *Qipengyuania*<sup>[10]</sup>是2015年首次发现的一个新属,分离自青藏高原羌塘盆地,在赤杆菌科中的种类较少,近年来在海洋环境中也曾发现<sup>[11]</sup>。在此前尚未见国内外关于 *Qipengyuania* 对硫氧化能力的实验研究, Gao等<sup>[12]</sup>通过全基因组测序分析其具有与硫酸盐代谢相关的基因,但无实验论证。本研究首次通过可培养的方法发现了 *Qipengyuania* 具有较强的硫氧化性,并通过碘量法研究表明其对硫代硫酸钠的氧化率接近80%。*Thioclava* 有报道<sup>[13]</sup>具有硫氧化功能,可以以硫代硫酸盐为能量源自养生长或以有机酸和糖为能量异养生长。杜瑞等<sup>[7]</sup>从冲绳海槽热液中分离出 *Thioclava indica* SOB107, 通过碘量法研究发现,该菌株可以完全氧化硫代硫酸钠,本研究也发现生物共附生细菌中的 *Thioclava* 细菌具有较高的硫氧化能力。值得注意的是,本研究发现 *Dietzia* 的放线菌对硫代硫酸盐的氧化率也接

近 70%，此前尚无研究发现 *Dietzia* 具有硫氧化能力。蔡波波<sup>[14]</sup>从印度洋深海热液区沉积物中分离到一株砷抗性菌 *Dietzia maris* AS-13-3，研究发现该菌具有在烷烃诱导下产生物表面活性物质的能力；谢燕荣<sup>[15]</sup>从东太平洋热液烟囱中分离到了一株 *Dietzia*，研究证明其具有重金属抗性；Rahman 等<sup>[16]</sup>从深海中分离到 *Dietzia* 的细菌，研究发现其可以产生生物表面活性剂，同时具有降解石油和烷烃的能力；而本研究首次发现 *Dietzia* 具有较好的硫氧化能力。这些研究结果说明这类细菌具有多种生态学功能以适应极端或胁迫环境。

深海热液环境中大量的硫氧化细菌与海洋生物的共生具有密不可分的关系，Goffredi<sup>[17]</sup>通过对热液环境中化能合成菌与无脊椎动物之间共生关系的研究发现，共生微生物自养代谢的能量来源于对环境中无机硫的氧化过程，细菌和无脊椎动物的共生关系促进了水生和陆生环境的生物多样性和高生产力。Cavanaugh 等<sup>[3]</sup>通过对深海热液底栖生物的研究发现，这些群落食物链的主要或唯一能量来源是通过细菌的化能自养氧化从喷口排放的硫化氢获取能量。Nakagawa 等<sup>[18]</sup>从日本冲绳县附近的热液沉积物中分离到一株硫氧化细菌 *Sulfurovum* sp. strain NBC37-1，发现其不仅能将热液环境中的盐离子和气体作为合成其生长所需的电子受体和供体，还能够转移环境中毒性较强的重金属(砷酸盐、镉、铜等)，据此他们认为该菌在热液沉积环境中大量存在，对底栖生物适应极端环境具有一定的解毒作用。Zbinden 等<sup>[8]</sup>在大西洋无眼裂缝虾(*Rimicaris exoculata*)的鳃中发现了丰富的微生物群落，通过扫描电镜观察以及对功能基因如甲烷氧化酶基因 *pmoA* 和硫氧化酶(Aps)基因的分析表明，铁氧化、硫氧化和甲烷氧化这

三类代谢均存在于盲虾鳃中并由相关微生物参与。Akerman 等<sup>[19]</sup>通过对热液喷口流体中硫氧化细菌 *Epsilonproteobacteria* 的研究发现，它们以单质硫和硫化物的氧化作为主要的化能合成作用，为更高等的生物提供能量来源。本实验从深海热液底栖生物鳃组织样品中获得了大量的硫氧化细菌，也说明这些大型生物与硫氧化细菌通过硫的代谢作用形成了紧密的共生体系。

本研究对热液区底栖生物样品中的硫氧化细菌进行分离鉴定，结果发现这些可培养硫氧化细菌主要以变形菌门的 *Gammaproteobacteria* 为主，其中 *Thioclava*、*Qipengyuania* 和 *Dietzia* 这 3 个属的细菌具有较高的硫氧化能力，该研究加深了人们对深海热液生物共附生硫氧化细菌的了解和认识，为进一步研究深海热液共生菌群的功能及其对宿主在极端环境中的解毒作用奠定基础。

致谢: 本次研究感谢中国大洋科考第 52 航次的支持，感谢自然资源部第二海洋研究所周亚东博士对生物样品的鉴定，感谢中国海洋大学孙进博士提供生物鳃组织样品。

## REFERENCES

- [1] 李筱. 深海中的黑暗生物群落: 热液生物[N]. 中国矿业报, 2020-07-14(4): 1-2  
Li Y. Hydrothermal organisms, a dark community of organisms in the deep sea[N]. China Mining News, 2020-07-14(4): 1-2 (in Chinese)
- [2] Kelley DS, Baross JA, Delaney JR. Volcanoes, fluids, and life at mid-ocean ridge spreading centers[J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2002, 30(1): 385-491
- [3] Cavanaugh CM, Gardiner SL, Jones ML, Jannasch HW, Waterbury JB. Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: possible chemoautotrophic symbionts[J]. Science, 1981, 213(4505): 340-342
- [4] 马军英, 翟世奎. 冲绳海槽伊平屋海底热液活动区的生物群[J]. 海洋科学, 1996, 20(2): 30-34

- Ma JY, Zhai SK. Biological communities of the hydrothermal area on the Iheya Bideg of Okinawa Trough[J]. *Marine Sciences*, 1996, 20(2): 30-34 (in Chinese)
- [5] 张亮, 秦蕴珊. 深海热液生态系统特征及其对极端微生物的影响[J]. *地球科学进展*, 2017, 32(7): 696-706
- Zhang L, Qin YS. The characteristic of deep sea hydrothermal ecosystem and their impact on the extreme microorganism[J]. *Advances in Earth Science*, 2017, 32(7): 696-706 (in Chinese)
- [6] 徐铤绣, 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[J]. *微生物学报*, 2016, 56(1): 88-100
- Xu HX, Jiang LJ, Li SN, Zhong TH, Lai QL, Shao ZZ. Diversity and sulfur oxidation characteristics of culturable sulfur-oxidizing bacteria in deep-sea hydrothermal vent environments of the South Atlantic[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(1): 88-100 (in Chinese)
- [7] 杜瑞, 于敏, 程景广, 张静静, 田晓荣, 张晓华. 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[J]. *微生物学报*, 2019, 59(6): 1036-1049
- Du R, Yu M, Cheng JG, Zhang JJ, Tian XR, Zhang XH. Diversity and sulfur oxidation characteristics of cultivable sulfur oxidizing bacteria in hydrothermal fields of Okinawa Trough[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(6): 1036-1049 (in Chinese)
- [8] Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, De Villardi De Montlaur C, Roussel E, Guyot F, Gaill F, Cambon-Bonavita MA. New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2008, 359(2): 131-140
- [9] 侯佳林. 基于宏基因组学方法探究深海热液烟囱体微生物的群落结构, 演替和代谢潜能[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2018
- Hou JL. Metagenomic study of the structure, evolution and metabolic potential of microbial communities inhabiting deep sea hydrothermal chimneys[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiaotong University, 2018 (in Chinese)
- [10] Feng XM, Mo YX, Han L, Nogi Y, Zhu YH, Lü J. *Qipengyuania sediminis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Erythrobacteraceae* isolated from subterrestrial sediment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt\_10): 3658-3665
- [11] Kristyanto S, Lee SD, Kim J. *Porphyrobacter algicida* sp. nov., an algalytic bacterium isolated from seawater[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(11): 4526-4533
- [12] Gao Y, Wu YH, Xu L, Cheng H, Wang CS, Xu XW. Complete genome sequence of *Qipengyuania sediminis* CGMCC 1.12928<sup>T</sup>, shed light on its role in matter-cycle and cold adaption mechanism of the genus *Qipengyuania*[J]. *Current Microbiology*, 2019, 76(9): 988-994
- [13] 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[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1069-1075
- [14] 蔡波波. 深海热液区来源细菌 *Dietzia maris* AS-13-3 产表面活性剂研究及基因组的初步分析[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2014
- Cai BB. Biosurfactant production and genome analysis of *Dietzia maris* AS-13-3 isolated from deep sea hydrothermal field[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2014 (in Chinese)
- [15] 谢燕荣. 东太平洋热液烟囱硫化物中重金属抗性微生物及南大西洋跨洋中脊表层海水中微生物种群结构分析[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2014
- Xie YR. Diversity of heavy-metal resistant microorganisms in the hydrothermal sulfide of the eastern Pacific Ocean and the microbial community structures of the surface seawater across the south mid-Atlantic ridge[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2014 (in Chinese)
- [16] Rahman PKSM, Sekhon Randhawa KK. Commentary: oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium *Dietzia maris* AS-13-3[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1557
- [17] Goffredi SK. Indigenous ectosymbiotic bacteria associated with diverse hydrothermal vent invertebrates[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2010, 2(4): 479-488
- [18] Nakagawa S, Takaki Y, Shimamura S, Reysenbach AL, Ken TK, Horikoshi K. Deep-sea vent epsilon-proteobacterial genomes provide insights into emergence of pathogens[J]. *PNAS*, 2007, 104(29): 12146-12150
- [19] Akerman NH, Butterfield DA, Huber JA. Phylogenetic diversity and functional gene patterns of sulfur-oxidizing seafloor *Epsilonproteobacteria* in diffuse hydrothermal vent fluids[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 185