

# 海水养殖场底泥中转化硫和磷化合物的微生物及其多样性

王亚南<sup>1,2</sup>, 王保军<sup>1</sup>, 戴欣<sup>1</sup>, 焦念志<sup>3</sup>, 彭志英<sup>2</sup>, 刘双江<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080; 2. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510640; 3. 厦门大学海洋环境科学系, 厦门 361005)

**摘要:**对福建某近海养虾场底泥环境中硫和磷 2 种元素的微生物代谢进行了研究。结果表明, 细菌代谢有机硫和无机硫产  $H_2S$  是养殖过程中造成  $H_2S$  污染的主要因素, 利用半胱氨酸和硫代硫酸钠产生硫化氢的细菌数量分别为  $1.6 \times 10^6$  和  $4.35 \times 10^3$  个  $g^{-1}$  底泥; 进一步研究发现, 芽孢杆菌属、盐芽孢杆菌属和微杆菌属等细菌是产  $H_2S$  的优势菌群, 而硫酸盐还原菌的数量较少, 仅为 25 个  $g^{-1}$ , 其产  $H_2S$  的作用不明显。研究还发现, 转化有机磷和无机磷酸盐的优势菌群属于好氧细菌, 其中分解卵磷脂的细菌和产磷酸酯酶细菌的数量分别为  $2.17 \times 10^5$  和  $1.21 \times 10^6$  个  $g^{-1}$ , 转化磷酸钙的细菌数量为  $6.96 \times 10^3$  个  $g^{-1}$ 。本文从微生物学的角度探讨了养殖环境中硫、磷化合物的转化, 提出细菌好氧代谢产  $H_2S$  是养殖环境潜在的污染因素, 给出了一些改善和修复养殖环境生态的建议。

**关键词:**海水养虾场;  $H_2S$ ; 芽孢杆菌; 硫元素代谢; 磷元素代谢

中图分类号: X714 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)02-0157-06

## Bacterial Conversion of Sulfur and Phosphorous Compounds and Microbial Diversity in Sediments from a Near-Shore Marine-Cultural Region

WANG Ya-nan<sup>1,2</sup>, WANG Bao-jun<sup>1</sup>, DAI Xin<sup>1</sup>, JIAO Nian-zhi<sup>3</sup>, PENG Zhi-ying<sup>2</sup>, LIU Shuang-jiang<sup>1</sup>

(1. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 2. South China Science and Technology University, Guangzhou 510640, China; 3. Dept. of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The  $H_2S$ -producing bacteria and the phosphorous-cycling bacteria in sediments from near-shore marine-cultural region were investigated. Results indicate that the bacterial  $H_2S$  production in aerobic condition is the dominating process to produce  $H_2S$  in the sediment of cultural pond. The total counts of  $H_2S$ -producing bacteria utilizing cysteine and  $Na_2S_2O_3$  were  $1.6 \times 10^6$  and  $4.35 \times 10^3$  cells  $g^{-1}$  respectively. The counts of sulfate-reducing bacteria in the sediments were very little, only  $2.5 \times 10^1 g^{-1}$ . Further results show that the bacterial counts of decomposing lecithin and secreting phosphatase were  $2.17 \times 10^5$  and  $1.21 \times 10^6 g^{-1}$  respectively, bacterial counts of dissolving  $Ca_3PO_4$  were  $6.96 \times 10^3 g^{-1}$ . Traditional taxonomy and partial 16S rRNA gene sequencing on the  $H_2S$ -producing and phosphate-cycling bacteria indicate that most isolates could be classified as members of the following Genera: *Bacillus*, *Halobacillus*, *Microbacterium*, etc.

**Key words:** shrimp-culturing pond; hydrogen sulphide; *Bacillus*; sulfur metabolism; phosphorous metabolism

水产养殖中投放的饵料、生物排泄物(如虾贝类的排泄物含有机磷和无机磷)<sup>[1]</sup>和外部环境排入养殖环境的污染物(如酸雨、肥料)等均含有相当量的有机硫化合物和硫酸盐、有机磷化合物和磷酸盐成分, 它们多沉积于养殖池底, 造成底泥环境富营养化, 并在生物(特别是微生物)作用下产生不同的代谢产物, 其中部分代谢产物(如  $H_2S$ 、无机磷酸盐等)对养殖水体造成严重污染并对养殖对象构成危害。以往的研究主要集中在水体中有机污染物在微生物作用下的转化<sup>[2]</sup>、微生物对有机污染物的代谢<sup>[3]</sup>及参与硫、磷元素代谢的微生物生物量等方面<sup>[4,5]</sup>, 对参与硫、磷元素循环代谢的微生物种群结构及其与污染的关系少有报道。本文在调查养殖场底泥环境中代谢含硫化合物产  $H_2S$ 、参与有机磷和无机磷转

化的细菌数量的基础上, 对不同生理类群的细菌菌株进行了分类鉴定, 研究了它们的种群结构和分布情况, 并对其在养殖环境内源污染中的作用进行了初步探讨, 以期生态养殖和养殖环境修复提供一定的理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 底泥样品来源

样品采自福建东山近海某海水养殖场, 深度为

收稿日期: 2004-03-31; 修订日期: 2004-07-29

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(KZCX1-SW-12- ); 中国科学院百人计划项目。

作者简介: 王亚南(1964~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为食品科学和环境微生物学。

\* 通讯作者, 电话: 010-61652317; E-mail: liusj@sun.im.ac.cn

0~12cm 的底泥样品柱,每 2 cm 为一个样品,即 0~2 cm、2~4 cm、4~6 cm、6~8 cm、8~10 cm、10~12 cm 共 6 个样品。

## 1.2 菌种分离和培养

(1) 细菌基础培养基和培养条件 试验所用基础培养基是依据 Eguchi 等人的人工海水培养基 (artificial seawater, ASW) 配方<sup>[6]</sup>, 固体培养基中加入 15 g/L 琼脂粉。培养温度为 30 ℃。

(2) 细菌分离 用无菌生理盐水分别对 6 个底泥样品进行 10 倍梯度的逐级稀释,在 ASW 平板上涂布分离,于细菌计数的同时,以每个样品为独立单元,从平板上挑取形态各异的单菌落。再经反复纯化和显微镜镜检,最后获得 106 株细菌的纯菌株。

## 1.3 细菌鉴定

(1) 生理生化鉴定实验 细胞形态特征和生理生化特性的测定(除特别注明之外)均参考有关文献<sup>[7]</sup>,主要检测指标有:氧化酶、接触酶、运动性、葡萄糖氧化发酵、利用甘露醇、阿拉伯糖和木糖产酸、淀粉水解、羧甲基纤维素水解、反硝化、硝酸盐还原、柠檬酸盐利用、明胶液化、V-P 和甲基红、吲哚产生、65 ℃ 生长、利用半胱氨酸产硫化氢、卵磷脂酶、磷酸酯酶<sup>[8]</sup>、NaCl 浓度梯度生长范围和 pH 梯度生长范围等。对非芽孢细菌鉴定,除了上述的生理生化指标外,还增加了利用肌醇产酸、乙醇氧化、乙酸氧化、苯丙氨酸脱氢酶和耐 72 ℃ 处理 15min 后的生长实验等。

(2) 16S rDNA 序列扩增及测序 参考文献[7, 9]提取细菌纯菌株的基因组 DNA,并采用 PCR 扩增 16S rDNA 片段,扩增引物为 Pf (8~27) A G A G T T T G A T C C T G G C T C A G, Pr (1495~1514) A C G G C T A C C T T G T T A C G A C T, 扩增产物为约 1500 bp 的近似全长 16S rRNA 基因。测定 5' 端的 500 bp 左右的碱基序列,于 GenBank 中进行序列比对,结合生理生化特征确定菌株的分类地位。

## 1.4 S、P 元素生物地球化学循环中相关微生物的生理生化实验

### 1.4.1 培养基和培养条件

本研究在细菌对硫和磷的转化实验中采用了以下培养基:有机硫化物分解产硫化氢试验采用半胱氨酸培养基<sup>[7]</sup>;无机硫化物分解产生硫化氢的检测采用 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 培养基<sup>[10]</sup>;有机磷化合物分解的检验采用卵磷脂培养基[ASW + (5% V/V 生理盐水 蛋黄液 = 1:1)]<sup>[7]</sup>;不溶性的无机磷化合物转化为可溶性的磷酸盐的检测采用 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 培养

基<sup>[10]</sup>;细菌磷酸酯酶的检测采用磷酸酯培养基<sup>[8]</sup>;硫酸盐还原成为硫化氢的细菌计数采用硫酸盐还原菌计数培养基<sup>[10]</sup>。这些培养基的 pH 均调整为 7.5~8.0,根据培养基组分不同,分别在 112 或 121 蒸汽灭菌 20 或 30min。好氧细菌液体生长培养基在调好 pH 后,先分装到玻璃试管中,液层高度 4~5cm,然后蒸汽灭菌;细菌厌氧生长培养基在配制好后,先灭菌,然后无菌操作,分装到已灭菌的玻璃试管中,接种后,再用已灭菌的液体石蜡和凡士林混合液(质量比 1:1),密封。普通固体培养基配制完毕后先进行灭菌,然后无菌操作倒平板。细菌磷酸酯酶培养基的制备:在已熔化的普通牛肉汁营养琼脂中,加入过滤除菌的 1% 的酚酞二磷酸溶液,使其最终浓度达 0.01%。细菌利用半胱氨酸和 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 产 H<sub>2</sub>S 通常培养 3~10d,分解卵磷脂和产磷酸酯酶培养 3~5d,转化 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 培养 15d,所有生物样品均在恒温培养箱内 30 ℃ 静止培养。

### 1.4.2 不同生理类群细菌的计数方法

底泥样品中参与 S、P 化合物代谢的细菌计数,采用最大可能数计数法 (MPN) 和平板计数法 (CFU) 进行<sup>[10]</sup>。在 MPN 法计数中,先将泥样做一系列的 10 倍稀释,至最后一级稀释液接种后,不出现菌的生长为临界级数。取后 5 种稀释液,每个稀释度样品液各吸 1mL,接入到相应的液体培养基中,通常做 3 管平行实验,此种 MPN 计数法也称 3 管法;平板计数法 (CFU) 也采用上述的样品系列稀释液,每个稀释度做 3 个平行,每个平板加 0.1mL 稀释液,均匀涂布。所有生物样品的培养温度均为 30 ℃,培养时间同前相应指标。利用半胱氨酸和 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 产 H<sub>2</sub>S 的细菌计数,是在细菌培养到一定时间后,观察培养管中夹带的醋酸铅滤纸条的颜色,如纸条变黑的则为生长阳性;硫酸盐还原细菌计数,是观察细菌培养试管底部有黑色沉淀出现的即判定为生长阳性。产磷酸酯酶的细菌计数,是观察并计数酚酞二磷酸盐培养基上生长的、能与从氨水中挥发的氨气反应,使菌落变红或者菌落周围变红的阳性细菌数;分解卵磷脂细菌计数,则是观察并计数卵磷脂平板上生长的、使菌落周围培养基出现浑浊圈的阳性细菌数;转化 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 细菌计数,是观察并计数在 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 培养基平板上生长的、能使菌落周围的培养基出现溶磷透明圈的阳性菌数。

## 2 结果

### 2.1 底泥中参与硫、磷元素代谢循环的细菌数量及

纵向分布

养殖投放的饵料中含有硫酸盐和磷酸盐,这些物质沉积于养殖池底,引起养殖池底质的富营养化,是造成养殖环境生态失衡的重要原因之一.微生物能代谢含硫、磷化合物,使其进入地球化学循环.这些代谢产物有的能被其它生物利用(如可溶性的磷酸盐),有的不能被利用(如硫代谢产生的 H<sub>2</sub>S).因此,检测了利用有机硫(半胱氨酸)和无机硫(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)产 H<sub>2</sub>S 的细菌类群及其在底泥中的分布,以及分解有机磷和转化无机磷的细菌及其在底泥中的分布.表 1 是底泥中参与硫、磷化合物相关代谢的细菌生理类群的计数结果.图 1 是不同生理类群细菌数量在底泥不同深度的分布情况.表 1 表明,底泥中利用半胱氨酸产 H<sub>2</sub>S 的细菌数量 > 利用 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 产 H<sub>2</sub>S 的细菌数量 > 硫酸盐还原菌数量;图 1A 可以看出,自底泥表面向底泥深处的纵向分布特征是利用 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 产 H<sub>2</sub>S 的细菌生物量和硫酸盐还原菌数量呈逐渐减少的趋势,利用半胱氨酸产 H<sub>2</sub>S 的细菌数量分布没有明显的变化规律.表 1 还可以看出,产磷酸酯酶的细菌数量 > 分解卵磷脂的细菌数量 > 转化 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 的细菌数量,图 1B 显示,参与磷循环细菌数量在底泥的纵向分布上没有明显的变化规律.

表 1 参与硫、磷元素循环的各类群细菌数量<sup>1)</sup>

Table 1 Population of sulfur-cycling & phosphorus-cycling bacteria

细菌类群	数量 / 个 g <sup>-1</sup>	占细菌总数的比例 / %
好氧细菌	5.86 × 10 <sup>7</sup>	99.7
厌氧细菌	1.52 × 10 <sup>5</sup>	0.3
利用半胱氨酸产 H <sub>2</sub> S 细菌	1.61 × 10 <sup>6</sup>	2.7
利用 Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 产 H <sub>2</sub> S 细菌	4.35 × 10 <sup>3</sup>	< 0.1
硫酸盐还原菌	25	< 0.1
产磷酸酯酶细菌	1.21 × 10 <sup>6</sup>	2.06
分解卵磷脂细菌	2.17 × 10 <sup>5</sup>	0.37
转化 Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 细菌	6.96 × 10 <sup>3</sup>	0.12

1)表中数据为 0~12cm 深度采集的 6 个底泥样品细菌计数结果的平均值,百分比计算以好氧细菌和厌氧细菌数量之和为 100%.

2.2 底泥中与硫、磷化合物代谢相关细菌的生理特性和种群丰度

对底泥中分离纯化的 106 株细菌也分别测定了它们利用半胱氨酸和 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 产 H<sub>2</sub>S,以及产磷酸酯酶、分解卵磷脂、转化 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 的能力,其目的在于了解相关代谢生理类群的细菌种群结构和分布,结果见表 2.表 2 结果表明:底泥中分离的细菌菌株绝大多数能代谢有机或无机硫化物产 H<sub>2</sub>S,占分离总株数的 90.6%,其中利用半胱氨酸产 H<sub>2</sub>S

的细菌占总数的 82.1%,利用 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 产 H<sub>2</sub>S 的细菌占总数的 40.6%;而底泥中分离的参与磷化合物代谢的细菌明显少于硫化物代谢的细菌,其菌株数量占总数的 43.4%,其中产磷酸酯酶的细菌占总数的 38.7%,分解卵磷脂和转化 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 的细菌均占总数的 3.8%.这一结论与表 1 中对沉积物的细菌总数测定结果相对应.

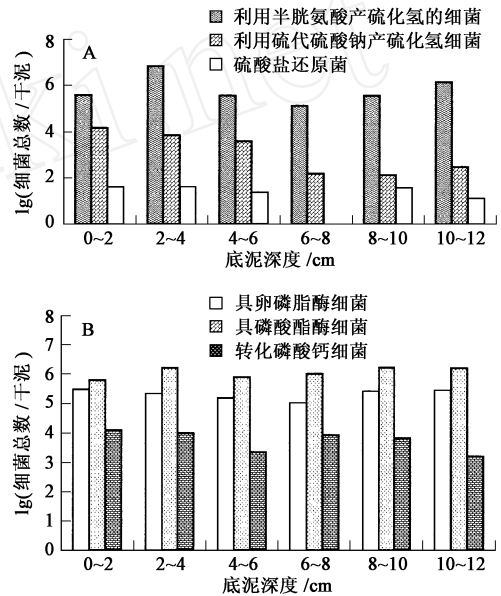


图 1 底泥中与硫(A)和磷(B)代谢相关细菌种群数量的纵向分布

Fig. 1 Distribution of sulfur- (A) and phosphorus- (B)-metabolizing bacterial populations in sediment

2.3 相关生理类群细菌的鉴定及种群结构分析

2.3.1 分离菌株的分类鉴定结果

对上述已经确定与硫、磷化合物代谢有关的 97 株细菌进行了综合分类鉴定,首先对所试的 97 株细菌进行常规的生理生化特征鉴定,在此基础上,从中选择出 33 株细菌,进行 16S rDNA 序列测定及序列比对,结果见表 3.

该种检测结果与常规细菌鉴定结果大体接近,例如,分离菌株 2-8 染色后镜检观察是一株芽孢杆菌,与已知的巨大芽孢杆菌 16S rDNA 的序列相似性达到 99%,菌株 6-9,4-13 以及 5-12 与已知的芽孢杆菌属和盐芽孢杆菌属中相关种的序列相似性均在 99%,菌株 1-15 是一株革兰氏阳性球菌,与 *Planococcus maritimus* 菌(一种动性球菌属中的细菌)的序列相似性为 98.2%.菌株 1-5、1-19、2-2、2-16、3-3、3-12、4-15、5-10、6-16 等,虽然目前已将它们初步归类到相应的属中,但它们的 16S rDNA 序列与 GenBank 中已知细菌序列的相似性比较低,例

表 2 底泥细菌对含硫、磷化合物的转化

Table 2 Conversions of sulfur or phosphorous containing compounds by bacteria from sediments

生理特性	菌株编号
利用半胱氨酸产 H <sub>2</sub> S (89 株)	1-1、1-3、1-4、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-11、1-13、1-14、1-18、1-19、1-20、2-1 2-2、2-4、2-5、2-6、2-8、2-9、2-10、2-11、2-12、2-13、2-14、2-15、2-16、2-17 2-18、3-1、3-2、3-3、3-4、3-5、3-7、3-8、3-9、3-10、3-11、3-12、3-15、4-1、4-2 4-3、4-4、4-5、4-6、4-7、4-10、4-11、4-12、4-13、4-14、4-15、4-16、4-17、4-18 4-19、4-20、4-21、4-22、4-24、5-1、5-2、5-3、5-4、5-5、5-7、5-8、5-9、5-13、5-15 5-16、5-17、6-1、6-2、6-3、6-4、6-6、6-9、6-10、6-11、6-12、6-13、6-14、6-15 6-16、6-17
利用 Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 产 H <sub>2</sub> S (43 株)	1-1、1-2、1-6、1-7、1-11、1-13、1-14、1-15、1-17、1-18、1-20、2-3、2-4、2-5、2-6 2-8、2-12、2-13、2-14、2-15、3-1、3-2、3-5、3-6、3-7、3-9、3-11、3-12、3-15、4-2 5-1、5-8、5-9、5-10、5-17、6-2、6-6、6-10、6-11、6-12、6-13、6-14、6-1
产磷酸酯酶(41 株)	1-3、1-5、1-9、1-16、2-1、2-3、2-4、2-5、2-6、2-10、2-12、2-13、2-16、3-1、3-3 3-5、3-6、3-7、3-10、3-15、4-1、4-2、4-4、4-7、4-12、4-15、4-16、4-17、4-21 4-22、5-2、5-8、5-9、5-15、5-16、5-17、6-2、6-3、6-13、6-14、6-16
分解卵磷脂(4 株)	1-1、1-18、1-19、5-2
转化 Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (4 株)	1-18、3-8、5-15、6-3

如菌株 1-19,它与 GenBank 中已知细菌序列的最大相似性仅有 94%,这些细菌与之相应的生理生化鉴定指标也有差异.由此认为,这些菌株有可能是一些新种,有些甚至可能是一些新的属,最终确立它们的分类地位,需要做更详细和更全面的鉴定分析.有关菌株的综合鉴定结果见表 4.从表 4 中可以看出,97 株细菌可大致分为 9 个类群,分别为芽孢杆菌属类群(40 株)、盐芽孢杆菌属类群(21 株)、短芽孢杆菌属类群(6 株)、其他产芽孢细菌类群(16 株)、微杆菌属类群(4 株)、动性球菌属类群(1 株)、其他革兰氏阳性菌类群(4 株)、发酵型革兰氏阴性菌类群(4 株)和非发酵型革兰氏阴性菌类群(1 株).

### 2.3.2 代谢硫、磷化合物的细菌种群结构

结合表 2 和表 4 可以看出,代谢硫、磷化合物的细菌种群结构及其在底泥中的分布情况.利用半胱氨酸产 H<sub>2</sub>S 的细菌主要是产芽孢细菌,特别是芽孢杆菌属(38 株)和盐芽孢杆菌属(19 株)的菌株,革兰氏阳性微杆菌属(6 株)的菌株也参与这一作用,尽管其在分离的细菌总株数中所占比例很小;利用 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 产 H<sub>2</sub>S 的细菌种群明显少于利用有机硫化物半胱氨酸产 H<sub>2</sub>S 的细菌种群,这些细菌包括:芽孢杆菌属(17 株)、盐芽孢杆菌属(8 株)和微杆菌属(4 株)的菌株;代谢硫化物的细菌从底泥表面至 12 cm 深处均有菌株检出.参与磷元素循环的细菌种群明显少于代谢硫化物的细菌种群,其中产磷酸酯酶的细菌种群较多,主要有芽孢杆菌属(15 株)、盐芽孢杆菌属(12 株)和微杆菌属(3 株);能分

解卵磷脂的细菌种群最少,仅分离到芽孢杆菌属和微杆菌属各 2 株,共 4 株细菌;转化 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 的细菌也分离 4 株,它们分别归属于芽孢杆菌属、盐芽孢杆菌属、短芽孢杆菌属和微杆菌属.由于分离的能代谢有机磷和无机磷的菌株数量较少,该生理类群的细菌种群在底泥中分布的实际情况和功能还有待进一步研究.

## 3 讨论

### 3.1 底泥中产 H<sub>2</sub>S 的细菌种群对养殖环境的影响

海洋环境中硫元素循环的研究具有重要的理论和经济意义<sup>[16]</sup>,其中硫化氢(H<sub>2</sub>S)污染是致使养殖环境恶化,造成虾病频繁发生的重要原因之一<sup>[11]</sup>.H<sub>2</sub>S 释放会使养殖环境水体的 pH 值降低,而偏低的 pH 条件又使细菌代谢有机硫或无机硫产 H<sub>2</sub>S 的作用加剧<sup>[12,13]</sup>,从而形成一种恶性循环,因此,研究细菌代谢硫化物产 H<sub>2</sub>S 的细菌种群、生物量、代谢能力和条件,对维护养殖环境的生态平衡、控制甚至消除 H<sub>2</sub>S 污染非常重要.由本文上述实验结果可见,养虾池底泥环境中细菌代谢硫化物产 H<sub>2</sub>S 的能力很强,大多数的细菌能利用有机硫产 H<sub>2</sub>S,同时相当数量的细菌具有代谢无机硫产 H<sub>2</sub>S 的能力.尤为重要的是上述细菌可以在好氧条件下利用有机硫或无机硫产 H<sub>2</sub>S,而人工养虾通常密度较高,需要保证充足的溶解氧,为此类细菌的生长繁殖和产 H<sub>2</sub>S 创造了有利条件.实验数据还表明,该底泥环境中硫酸盐还原菌很少(见表 1),这是由于硫酸盐还原菌

表 3 33 株底泥分离细菌的 16S rDNA 测序比对结果

Table 3 Results of blasted sequence of PCR-amplified 16S rDNA fragment of 33 bacterial strains from the sediment

菌株编号	比对序列长度	GenBank 收录号	Blast 相似性最高菌株种群及其在 GenBank 收录号	相似性/ %
1-1	347bp	AJ784160	<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579 (AE017013)	99
1-5	644bp	AJ781721	<i>Halobacillus karajiensis</i> DSM14948 (AJ486874)	96
1-6	547bp	AJ781696	<i>Bacillus firmus</i> 10v2 (AF526919)	99
1-8	612bp	AJ781695	<i>Bacillus jeotgali</i> YKJ-10 <sup>T</sup> (AF221061)	99
1-15	644bp	AJ781718	<i>Planococcus maritimus</i> TF-9 (AF500007)	98
1-19	823bp	AJ783958	<i>Sanguibacter suarezii</i> ST50 (X79451)	94
2-2	1500bp	A Y523411	<i>Bacillus</i> sp. YY (AF414443)	98
2-3	631bp	AJ781697	<i>Bacillus</i> sp. TP1.1 (AF440439)	99
2-8	647bp	AJ781698	<i>Bacillus megaterium</i> KL-197 (A Y030338)	99
2-9	629bp	AJ781699	<i>Bacillus</i> sp. PL-12 (AF326366)	99
2-16	644bp	AJ781722	<i>Halobacillus karajiensis</i> DSM14948 (AJ486874)	95
3-3	644bp	AJ781724	<i>Halobacillus karajiensis</i> DSM14948 (AJ486874)	95
3-8	644bp	AJ781713	<i>Halobacillus trueperi</i> DSM10404 <sup>T</sup> (AJ31014)	97
3-12	552bp	AJ697862	<i>Planococcus</i> sp. JG07AF (AF144750)	95
3-15	552bp	AJ781723	<i>Halobacillus karajiensis</i> DSM14948 (AJ486874)	95
4-7	844bp	AJ781709	<i>Bacillus</i> sp. YKJ-11 (AF221062)	98
4-10	552bp	AJ781714	<i>Halobacillus trueperi</i> DSM10404T (AJ310149)	99
4-12	537bp	AJ781701	<i>Bacillus baekryungens</i> SW-93 (AF541965)	98
4-13	726bp	AJ781700	<i>Bacillus aquaemaris</i> TF-12 (AF483625)	99
4-14	632bp	AJ781702	<i>Bacillus</i> sp. PL-12 (AF326366)	98
4-15	647bp	AJ781725	<i>Halobacillus karajiensis</i> DSM14948 (AJ486874)	96
4-20	552bp	AJ781707	<i>Bacillus</i> sp. (AF218243)	99
4-21	669bp	AJ781720	<i>Halobacillus</i> sp. D-8 (A Y351395)	98
5-8	843bp	AJ781706	<i>Bacillus</i> sp. TP1.1 (AF440439)	99
5-16	630bp	AJ781710	<i>Marine bacterium</i> SE105 (A Y038902)	99
5-17	658bp	AJ781711	<i>Marine bacterium</i> SE105 (A Y038902)	99
6-2	565bp	AJ781703	<i>Bacillus firmus</i> 10v2 (AF526919)	98
6-3	565bp	AJ781704	<i>Bacillus anthracis</i> Str. AME (AE017024)	98
6-9	845bp	AJ781705	<i>Bacillus pumilus</i> TUT1009 (AB098578)	99
6-13	552bp	AJ781712	<i>Marine bacterium</i> SE105 (A Y038902)	99
6-14	851bp	AJ781708	<i>Bacillus</i> sp. TP1.1 (AF440439)	99
6-15	658bp	AJ781719	<i>Halobacillus salinus</i> stains HSL-3 (AF500003)	96
6-15	1492bp	AJ783959	<i>Salegentibacter salegens</i> DSM5424 <sup>T</sup> (M92279)	97

表 4 参与硫、磷元素循环的 97 株细菌的鉴定结果

Table 4 Identification and 97 strains of sulfur-cycling &amp; phosphorous-cycling bacteria

细菌属、种	菌株编号
芽孢杆菌属 ( <i>Bacillus</i> sp.)	1-1 <sup>*</sup> 、1-2、1-6 <sup>*</sup> 、1-10、1-11、2-2 <sup>*</sup> 、2-3 <sup>*</sup> 、2-8 <sup>*</sup> 、2-9 <sup>*</sup> 、2-10、2-12、2-14 2-15、2-17、3-4、3-10、4-3、4-6、4-12 <sup>*</sup> 、4-13 <sup>*</sup> 、4-16、4-17、4-19、4-22 4-24、5-1、5-2、5-5、5-7、5-9、5-13、5-16 <sup>*</sup> 、5-17 <sup>*</sup> 、6-2 <sup>*</sup> 、6-3 <sup>*</sup> 、6-6 6-9 <sup>*</sup> 、6-11、6-12、6-13 <sup>*</sup>
盐芽孢杆菌属 ( <i>Halobacillus</i> sp.)	1-4、1-5 <sup>*</sup> 、1-7、2-1、2-5、2-11、2-13、2-16 <sup>*</sup> 、3-2、3-3 <sup>*</sup> 、3-5、3-6、3-7 3-8 <sup>*</sup> 、3-15 <sup>*</sup> 、4-4、4-10 <sup>*</sup> 、4-11、4-21 <sup>*</sup> 、5-3、6-15 <sup>*</sup>
短芽孢杆菌属( <i>Bevibacillus</i> sp.)	2-6、3-11、5-4、5-15、6-1、6-4
其它产芽孢细菌 (Other spore-forming Bacteria)	1-3、1-8 <sup>*</sup> 、1-9、1-13、3-1、3-9、4-1、4-2、4-5、4-7 <sup>*</sup> 、4-14 <sup>*</sup> 、 4-18、4-20 <sup>*</sup> 、5-8 <sup>*</sup> 、6-10、6-14 <sup>*</sup>
微杆菌属( <i>Microbacterium</i> sp.)	1-14、1-18、2-4、4-15 <sup>*</sup>
动性球菌属( <i>Planococcus</i> sp.)	1-15 <sup>*</sup>
其它革兰氏阳性菌	1-20、3-12 <sup>*</sup> 、5-10、1-19 <sup>*</sup>
发酵型革兰氏阴性菌	1-16、2-18、6-17、6-16 <sup>*</sup>
非发酵型革兰氏阴性菌	1-17

\*表示菌株已经测序(500bp 左右的碱基序列), 共计 33 株。

为严格厌氧生长,只有当环境趋于缺氧条件时,其产  $H_2S$  的作用才会逐渐提高,在养殖阶段溶氧比较充足的情况下,细菌代谢有机硫和无机硫产  $H_2S$  的作用均明显强于硫酸盐还原菌,因此认为,至少在养殖阶段,硫酸盐还原菌不是产  $H_2S$  的主要菌群。

### 3.2 底泥中参与磷元素循环的细菌种群分布及其作用

环境中磷元素循环不同于其它元素,是完全的沉积性循环<sup>[14]</sup>,不溶性无机磷酸盐主要依赖微生物,特别是细菌,将其转化为可溶的磷酸盐后,才能被其他的生物利用<sup>[15]</sup>。在养殖水体中的磷酸盐主要有 2 个来源,其一是饵料的添加成分,其二是农用化肥。磷酸盐在水体和底泥中积累,不仅给养殖带来危害,同时还会随换水流入附近海域,污染海洋环境。因此,研究细菌对磷酸盐转化状况是改善养殖环境富营养化、进行生态修复的重要方面。从底泥样品的实验结果发现,多种细菌能分解有机的二磷酸盐,而环境中分解卵磷脂和转化磷酸钙的细菌能检测到具有一定的数量,但分离到的相应生理类群的细菌菌株很少,这可能与实验采用的分离培养方法有关。因此,通过进一步实验,筛选代谢和转化磷元素能力强的细菌菌株,用于改善底泥和水体的磷元素循环通量,将是今后的主要研究内容之一。

通过本项研究,表明一方面应严格控制投饵量及清除养殖动物排泄物,控制内源污染;另一方面应研究有效、安全的代谢  $H_2S$  和磷酸盐的细菌菌群,将其投放到养殖环境中进行生态修复,此举对控制养殖环境的污染具有积极的意义。

致谢:本研究在细菌分类过程中,得到了中国科学院微生物研究所菌种保藏中心周宇光老师的指导,在实验过程中,得到了本实验室刘志培老师的指导,特此致谢!

### 参考文献:

- [1] 周毅,杨红生,等. 海水双壳贝类的 N、P 排泄及生态效应[J]. 中国水产科学,2003,10(2):165~168.
- [2] 俞勇,李会荣,等. 虾池养殖环境有机污染物降解细菌的筛选[J]. 青岛海洋大学学报,2003,33(1):65~70.
- [3] 李霞. 微生物对水体主要有有机碎屑的循环作用[J]. 松辽学刊,1997,4:34~36.
- [4] 孔祥平,包木太,等. 油田水中细菌群落分析[J]. 油田化学,2003,20(4):372~376.
- [5] 林启美,赵小蓉,等. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布[J]. 土壤与环境,2000,9(1):34~37.
- [6] Eguchi M, Nishikawa T, Macdonald K. Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(4):1287~1294.
- [7] 东秀珠,蔡妙英,等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001. 370~386.
- [8] Philipp Gerhardt [美],苏文金[译]. 普通细菌学方法手册[M]. 厦门:厦门大学出版社,1989.
- [9] 卢圣栋,等. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2001,458~477.
- [10] 许光辉,郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京:农业出版社,1986. 129~131.
- [11] 王桂春,张兆琪,等. 无机物对河蟹和罗氏沼虾毒性的研究进展[J]. 水利渔业,2003,20(6):21~23.
- [12] 张晋华,王雷,等. 水稻土中半胱氨酸分解产生含硫气体的研究[J]. 环境化学,2001,20(4):356~361.
- [13] Minami K, Kanda K, Tsurute H, Emission of biogenic sulfur gases from rice paddies in japan, in biogeochemistry and global change, edited by oremland R S, New York, USA: Chapman & Hall, 1993. 405~419.
- [14] 王光华,赵英,等. 解磷菌的研究现状与展望[J]. 生态环境,2003,12(1):96~101.
- [15] 刘志恒. 现代微生物学[M]. 北京:科学出版社,2002. 422~424.
- [16] Turchyn A V, Schrag D P. Oxygen isotope constraints on the sulfur cycles over the past 10 million years[J]. Science, 2004, 303:2004~2007.