

基于碳代谢的化能自养硫氧化细菌与化能异养细菌的相互作用

于晨晨, 林炜铁*, 罗剑飞*

华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州

于晨晨, 林炜铁, 罗剑飞. 基于碳代谢的化能自养硫氧化细菌与化能异养细菌的相互作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(6): 2667-2677.

YU Chenchen, LIN Weitie, LUO Jianfei. Interactions between chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria and chemoheterotrophic bacteria based on carbon metabolism[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(6): 2667-2677.

摘要: 【目的】从碳代谢角度分析化能自养硫氧化细菌与化能异养细菌共培养时的相互促进作用机制。【方法】采用离子色谱测定 $S_2O_3^{2-}$ 和 SO_4^{2-} 浓度, 平板稀释涂布法跟踪菌体生长情况, 利用总有机碳测定仪和液相色谱-质谱分析胞外碳特性, 扫描电镜观察细胞形态, RT-qPCR 测定相关基因表达量。【结果】硫氧化细菌在生长过程中持续固碳, 为异养细菌生长提供稳定碳源; 异养细菌显著促进了硫氧化细菌的硫氧化和固碳能力, 硫氧化酶基因 *soxB* 和碳固定 RubisCO 酶基因 *cbbL* 表达量显著增加; 同时诱导产生更多的胞外聚合物, 增强整体生物膜的形成。【结论】本研究揭示了硫氧化细菌与异养细菌之间的协同作用机制, 特别是异养细菌对硫氧化细菌固碳能力的显著促进作用。为化能自养细菌的富集培养及理解微生物群落中自养硫氧化细菌的固碳机制提供了新的视角, 并为废水处理的低碳化和高效化提供了理论支持。

关键词: 化能自养硫氧化细菌; 异养细菌; 固碳能力; 共培养

资助项目: 国家自然科学基金(91951118); 广东省自然科学基金(2025A1515011043)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (91951118) and the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2025A1515011043).

*Corresponding authors. E-mail: LUO Jianfei, ljfj2002@scut.edu.cn; LIN Weitie, lfwtl@scut.edu.cn

ORCID: LUO Jianfei (0000-0002-9570-4224)

Received: 2025-02-28; Accepted: 2025-03-14; Published online: 2025-05-06

Interactions between chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria and chemoheterotrophic bacteria based on carbon metabolism

YU Chenchen, LIN Weitie*, LUO Jianfei*

School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To study the mechanisms of mutual promotion between chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria and chemoheterotrophic bacteria under co-culture based on carbon metabolism. [Methods] Ion chromatography was employed to determine the concentrations of $S_2O_3^{2-}$ (thiosulfate) and SO_4^{2-} (sulfate). Bacterial growth dynamics were monitored by the dilution plate method. Extracellular carbon characteristics were analyzed *via* total organic carbon analyzer measurement and LC-MS. Cellular morphology was observed by scanning electron microscopy. The relative mRNA levels of related genes were quantified by RT-qPCR. [Results] During the growth process, sulfur-oxidizing bacteria continuously fixed inorganic carbon and secreted organics, providing a stable carbon source for the growth of heterotrophic bacterium. In return, heterotrophic bacteria significantly enhanced the sulfur-oxidizing and carbon-fixing capabilities of sulfur-oxidizing bacteria. This was evidenced by the significantly up-regulated expression of the enzyme gene *soxB* involved in sulfur oxidation and the RubisCO gene *cbbL* involved in carbon fixation. Additionally, the production of extracellular polymeric substances was induced, which enhanced the biofilm formation. [Conclusion] This study elucidated the interaction mechanisms between sulfur-oxidizing bacteria and heterotrophic bacteria, particularly the significant enhancement of the carbon-fixing capability of sulfur-oxidizing bacteria. The findings provide a new perspective for the enrichment culture of chemolithoautotrophic bacteria and for understanding the carbon fixation mechanisms of autotrophic sulfur-oxidizing bacteria in microbial communities. Additionally, this study offers theoretical support for the low-carbon and efficient treatment of wastewater.

Keywords: chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria; heterotrophic bacteria; carbon-fixing capability; co-culture

化能自养硫氧化细菌通过氧化含硫化合物 (S^{2-} 、 S^0 和 $S_2O_3^{2-}$) 获取能量, 并以 CO_2 作为唯一碳源进行生长^[1]。这一独特的代谢特性使其在环境治理中具有重要意义: 一方面, 硫氧化细菌能够有效去除有毒的硫化物, 降低其对环境的危害; 另一方面, 它们通过固碳作用固定大气中的 CO_2 , 为减缓温室气体排放提供了潜在的解决方案。然而, 与硫氧化细菌在去除硫化物方面的研究相比, 其固碳能力的相关研究相

对较少。实际上, 硫氧化细菌在废水处理和工业废气净化过程中表现出显著的固碳潜力。在废水处理系统中, 它们不仅能够降解高浓度的含硫污染物, 还能固定大量的 CO_2 , 从而为实现“碳负排”提供了重要支持。

硫氧化细菌在氧化底物时产生的电子进入呼吸链并按照一定比例分配给 O_2 和 CO_2 。在细胞代谢活跃的情况下, 氧化的底物越多, 固定的 CO_2 越多^[2-3]; 固定的碳除了用于自身细胞骨

架和胞内大分子合成, 还会释放到胞外。研究表明, 化能自养细菌生长过程中释放到胞外的碳最高可占总固碳量的 20%^[4-7], 且这种胞外碳的释放对其固碳能力具有显著的反馈抑制效应^[6-9]。研究表明, 化能自养硝化微生物与异养细菌共培养时, 异养细菌(如假单胞菌)可以利用硝化细菌释放的胞外有机物进行生长代谢, 从而减少对硝化菌的细胞毒性, 并促进生物膜的形成^[10-11]; 这些研究表明, 化能自养微生物与异养微生物之间的协同作用在提高固碳效率和适应环境变化中起着重要作用。目前文献报道指出, 化能自养菌释放的胞外有机物大分子以蛋白质和多糖为主, 小分子则主要是分泌氨基酸和有机酸。然而, 尚未有明确的研究揭示这些物质的具体分泌时期及规律。此外, 目前共培养方面的研究主要集中在 *cbb* 基因上, 尚未见对其他代谢途径的研究。

本研究以典型硫氧化细菌 *Halothiobacillus diazotrophicus* LS2^[12]为研究对象, 通过与伴生菌假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) Y4 共培养, 偶联硫氧化与碳固定, 分析 LS2 分泌的胞外碳的组成形式及规律; 联合基因组与代谢组分析多种代谢途径的功能基因, 系统探究二者之间基于碳代谢的作用机制。本研究为化能自养细菌的富集培养提供了新视角, 有助于理解微生物群落中自养硫氧化细菌的固碳机制, 同时为含硫废水处理的低碳化和高效化提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

1.1.1 硫氧化细菌

Halothiobacillus diazotrophicus LS2 (= GDMCC 1.4095^T=JCM 39442^T)是本实验室保存的一株硫氧化细菌。菌液与甘油按 1:1 体积比混匀后, 冻存于-70 °C。活化时, 取冻存于-70 °C 的菌株, 以 1% 的接种量接入液体培养基中, 置于 30 °C、150 r/min 摇床培养 2 d; 随后采用稀

释涂布法接种至固体培养基上, 静置于 30 °C 生化培养箱培养 5 d, 挑取单菌落接入液体培养基, 即作为种子液用于后续实验。

LS2 液体培养基(g/L): MgSO₄·7H₂O 0.12, NaCl 1.00, CaCl₂ 0.01; Widdel 微量元素溶液^[13]: 1.00 mL/L, 121 °C 灭菌 20 min 后, 加入过滤除菌的 NaHCO₃ 0.84 g/L、NH₄Cl 0.11 g/L、K₂HPO₄ 5.23 g/L、KH₂PO₄ 2.72 g/L、FeCl₂ 0.005 1 g/L, 底物 Na₂S₂O₃·5H₂O 的添加量设置浓度梯度分别为 0.25、0.50、1.00、2.00 g/L 对应浓度 1.00、2.00、4.00、8.00 mmol/L, 固体培养基在此基础上加入琼脂粉 15.00 g/L。

1.1.2 异养细菌

异养细菌假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) Y4 是本实验室从硫氧化细菌富集物中分离获得。其保存和活化条件与 LS2 相同, 液体和固体培养基均采用 LB 培养基。在后续的共培养实验及其纯培养对照组实验中, 均采用 LS2 培养基。共培养中 LS2 和 Y4 的接种量比为 10:1 (约 10⁵:10⁴ CFU/mL)。Y4 接种前需经 8 000 r/min 离心 5 min, 采用无菌水重悬清洗菌体, 重复 3 次。

1.2 硫氧化菌生长特性测定

1.2.1 S₂O₃²⁻和 SO₄²⁻的测定

采用离子色谱法(Dionex Aquion RFIC, Dionex IonPac AS19 IC 柱)测定底物 S₂O₃²⁻和产物 SO₄²⁻的浓度。淋洗液为 18 mmol/L KOH, 流速 1 mL/min, 抑制器电流 45 mA, 柱温 30 °C, 进样量 25 μL, 背景电导 4-6 μS/cm。

1.2.2 生长量测定

通过稀释涂布平板法和菌落计数法跟踪测定菌体生长情况。

1.3 胞外碳测定

1.3.1 胞外可溶性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)测定

DOC 浓度测定采用总有机碳测定仪(岛津公司)。以高纯氧为载气, 电炉温度 680 °C, 进样量 9 mL, 加酸量 1.5%, 载气流量 150 mL/min。

前处理步骤如下：样品过 0.45 μm 滤膜，添加 1% 的 1 mol/L 盐酸调节 pH 至 2.0–3.0，氮气吹扫 20–25 min，直至测定空白培养基中 C 浓度小于 1 mg/L。DOC 中物质种类测定委托武汉迈特维尔生物科技有限公司采用 LC-MS 对细菌胞外代谢物进行代谢组学分析，以对数生长期后期种子液刚接种时取样过膜的样品作为对照组(CK)，培养至对数生长期后期的样品作为实验组(LS2)，并设置 4 次生物学重复。

1.3.2 胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)测定

采用改良后的热提法^[14-15]提取胞外 EPS，再分别采用 BCA 法测定蛋白(PN)和硫酸-蒽酮法测定糖类(PS)^[16]。采用 NanoDrop 测定提取 EPS 前后溶液中 DNA 浓度，以确保提取 EPS 过程中细胞未破裂^[17]。所有测定重复 3 次。

1.4 基因表达分析

1.4.1 RNA 提取

抽滤过膜收集菌体，用高温灭菌的超纯水重悬，8 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 2 min，弃上清；加入 1 mL RNAiso Plus，室温静置 5 min，提取 RNA；加入 200 μL 氯仿，手摇混匀使充分乳

化，静置 3 min 后 12 000 r/min 离心 2 min；收集上清液至新的离心管中，加入等体积异丙醇和 1 μL 核酸助沉剂，充分混匀，静置 10 min 后 12 000 r/min 离心 5 min，弃上清；加入 1 mL 75% 乙醇，充分混匀后 12 000 r/min 离心 5 min，弃上清，室温干燥至沉淀透明色，加入适量 RNase-free 水溶解沉淀，得到菌株的 RNA，用于下一步实验操作或置于 -80°C 冰箱保存^[18]。

1.4.2 荧光定量 PCR

提取的 RNA 按照 Trans Start[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)进行反转录。将得到的 cDNA 按照 Trans Start[®] Tip Green qPCR SuperMix 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)进行反应液配制及反应程序设置，并在 Light Cycler 96 序列检测系统(Roche 公司)中运行。引物设计采用 Primer 5.0 软件(表 1)，引物合成由广州天一辉远基因科技有限公司完成。

1.5 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)

收集处于对数生长期的 LS2 菌体和共培养混合菌体，使用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)

表1 目的片段的引物序列

Table 1 Primer sequences for the target fragments

基因名称 Gene name	序列 Sequence (5'→3')	蛋白名称 Protein name
16S (LS2)	GTGTCAGTCCAGTGTGG ACCTCGTGCCAAAGGATGAG	
<i>soxB</i>	TGTGGGACAGAACGATGACG TGGATGGTTGAAGGCTGGAC	Thiosulfohydrolase SoxB
<i>cbbL</i>	CCGTGCGACTTCATTCTC TGGTAGTGCAGGTAAGGCTGCTC	Ribulose biphosphate carboxylase
<i>tadA</i>	CGCTTCCCTGCGGTTCA CCTTCTTGTTCGGCGTTGC	Type II secretion system F domain-containing protein
<i>secA</i>	TTTCTGGGCGAAGAGTCCG GCGTCCCTGGTATTCAAGC	Preprotein translocase, SecA subunit
<i>lptB</i>	GCAGGAGGCATCGGTGTT CCAGCAGGCTTCCAGTGTG	Lipopolysaccharide ABC transporter ATP-binding protein
<i>pgsA</i>	CGTTGTTGGTCTGGTGTCTT ACGATCAGCTTGCCGCTAC	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate-3-phosphatidyltransferase
<i>icd</i>	AAGGTGGCTTCAAGAACTGGG GCCGTTCAAGTTGAGGGTG	Isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent
<i>puuE</i>	TCGAGGATCAGCTCAAGCG TCGTCCGACCGTGAAAGC	4-aminobutyrate aminotransferase

润洗 3 遍, 加入 2.5% 戊二醛溶液置于 4 °C 冰箱中固定 12 h, 随后 10 000 r/min 离心 5 min 弃上清; 使用 30%、50%、70%、90%、100% 乙醇溶液进行梯度脱水, 最后将 100% 乙醇脱水后的菌块包裹在滤纸中, 置于无水乙醇中 4 °C 保存; 加入过膜的 100% 叔丁醇, 振荡, 并静置 20 min, 再以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 样品经冷冻干燥 36 h 后, 将干燥后的样品粉末粘在导电胶上, 放置于载物台上, 用镀膜仪喷金, 最后使用 Merlin 场发射型 SEM 进行形态观察, 加速电压为 10.0 kV。

1.6 数据统计分析

所有实验(除非特别说明)均进行了 3 次重复。图表使用 OriginPro 2025 绘制, 实验数据首先通过方差分析(analysis of variance, ANOVA)分析判断组间是否存在显著差异, 若存在差异,

则进一步采用 Tukey HSD 检验进行多重比较, 以确定具体组间差异。统计结果中, $P < 0.05$ 表示显著差异, $P < 0.01$ 表示极显著差异。

2 结果与分析

2.1 不同底物浓度下 LS2 与 Y4 共培养的硫氧化及生长特性

在常氧且碳源充足条件下, 不同底物浓度下菌株 LS2 与 Y4 共培养与纯培养的硫氧化及生长特性如图 1 所示。与纯培养相比, 除 1 mmol/L 底物浓度外, 共培养中硫代硫酸盐的平均氧化速度在其他底物浓度下均显著提高($P < 0.05$), 且随着底物浓度的升高, 硫氧化速率呈极显著的促进趋势($P < 0.01$)。例如, 8 mmol/L 的底物 $S_2O_3^{2-}$ 在 LS2 正常代谢情况下需要 32–36 h 消耗

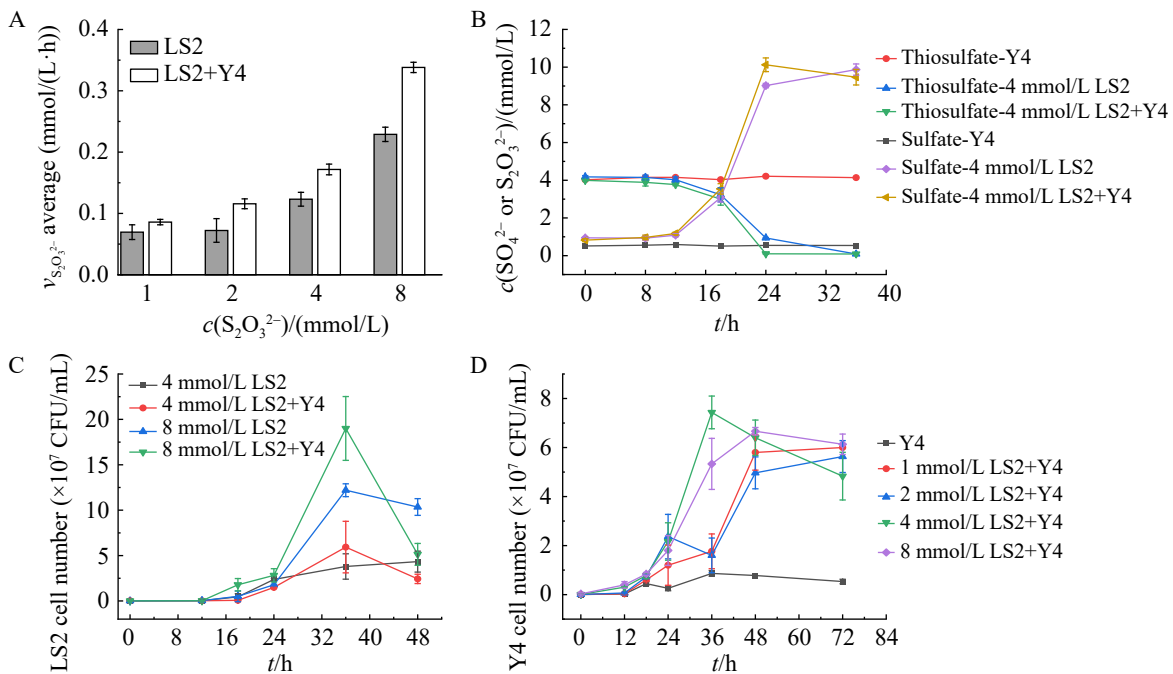


图1 不同底物浓度下LS2纯培养或与Y4共培养时的硫氧化及生长特性。A: 不同底物浓度下 $S_2O_3^{2-}$ 平均消耗速率; B: LS2纯培养与共培养下 $S_2O_3^{2-}$ 与 SO_4^{2-} 变化; C: 不同底物浓度共培养中LS2生物量变化; D: 不同底物浓度共培养中Y4的生物量变化。

Figure 1 Sulfur oxidation and growth characteristics of LS2 and Y4 co-culture under different substrate concentrations. A: Average consumption rate of $S_2O_3^{2-}$ at different substrate concentrations; B: Changes in $S_2O_3^{2-}$ and SO_4^{2-} under pure culture and co-culture conditions of LS2; C: Biomass changes of LS2 in co-culture at different substrate concentrations; D: Biomass changes of Y4 in co-culture at different substrate concentrations.

完,而在共培养下只需 24–28 h,其硫代硫酸盐的平均氧化速率约增加了 41.5%。同时,LS2 生物量测定结果(图 1C)表明,共培养中 LS2 的生物量积累显著高于纯培养,最高可达纯培养的 1.5 倍。此外,如图 1D 所示,Y4 在 LS2 培养基中仅能从 1×10^4 CFU/mL 生长到 7×10^5 CFU/mL,而共培养中 Y4 利用硫氧化细菌 LS2 产生的胞外碳可生长到 8×10^7 CFU/mL。

2.2 硫氧化细菌胞外 DOC 分析

为探究硫氧化细菌在不同生长时期胞外碳产生的特性及其规律,以 4 mmol/L 底物培养 LS2 并从中提取不同时期的无菌滤液,测定其中的 DOC 含量,结果如图 2A 所示。LS2 从对数期到衰退期产生的 DOC 浓度呈逐步下降趋势,范围为 6.96–9.15 mg/L,进一步将异养细菌 Y4 以 10^4 CFU/mL 的初始浓度接入其中,其生物量变化如图 2B 所示。Y4 在 LS2 对数期滤液中表现出最高的生长量,细胞浓度可达 2×10^8 CFU/mL,这一结果与图 2A 中 DOC 的测定结果一致,表明对数期的 LS2 为 Y4 提供最为丰富的胞外碳源,供其生长代谢。此外,图 2B 进一步揭示硫氧化细菌在其整个生长周期中不断产生 DOC,供 Y4

实现有效增殖,表明硫氧化细菌的自养固碳过程是持续性的。如图 2C 所示,随着底物浓度的升高,LS2 纯培养体系的 DOC 含量从 6.78 mg/L 显著升高到 10.64 mg/L ($P < 0.05$)。共培养体系的 DOC 含量则显著低于纯培养(纯培养 vs. 共培养: 6.78→3.77 mg/L, 8.97→4.31 mg/L, 10.64→5.86 mg/L, $P < 0.01$),表明其产生的 DOC 可被 Y4 利用。通过计算发现,Y4 对 LS2 产生的 DOC 利用率分别为 44.3%、51.9%、44.9%。上述结果表明,底物浓度对硫氧化细菌胞外 DOC 释放及异养细菌的利用均具有一定影响,且二者并不呈简单的线性相关。

2.3 硫氧化细菌胞外碳 LC-MS 分析

对 LS2 对数生长期后期产生胞外 DOC 进行基于 LC-MS 的代谢组学分析。LC-MS 共检测出 1 240 种物质,基于 OPLS-DA 模型得到的变量重要性投影(VIP),结合单变量分析的 P -value/FDR。选取 VIP>1 且 P -value<0.05 的代谢物,认为其差异显著。检测出差异代谢物 228 种,其中上调的有 131 种。构成生物膜成分的甘油磷脂(glycerophosphatide, GP)、甘油酯(glyceride, GL)和脂肪酸(fatty acid, FA)所占比例最高,达

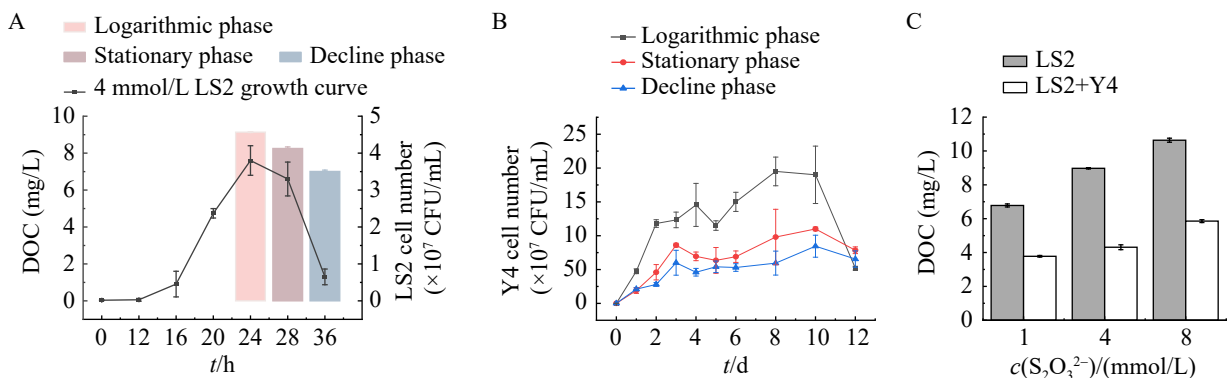


图2 不同培养时期或条件下胞外DOC含量及对Y4生长的影响。A: LS2不同生长时期胞外DOC含量; B: Y4利用LS2不同生长时期胞外DOC的生物量变化; C: 不同底物浓度下LS2纯培养和共培养中胞外DOC含量。

Figure 2 Extracellular DOC content at different cultivation periods or conditions and its effects on the growth of Y4. A: Extracellular DOC content of LS2 at different growth stages; B: Biomass changes of Y4 utilizing extracellular DOC from LS2 at different growth stages; C: Extracellular DOC content in pure culture and co-culture of LS2 under different substrate concentrations.

32.82%，可能参与能量代谢的有机酸及其衍生物占比 14.50%，氨基酸及其代谢物和碳水化合物共占比 11.45% (图 3A)。表 2 展示了不同代谢途径的表达量以及参与该途径的差异代谢物 (图 3A 中字母编号与表中相对应)。其中表达量占比最高的为甘油磷脂代谢，主要功能是参与群体感应或生物膜的合成，参与表达的差异代谢物类别多为磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PE) 和磷脂酸 (phosphatidic acid, PA)，且大多数为上调表达，相对定量趋势如图 3B；其次是氨基酸的代谢和合成，参与的差异代谢物多为氨基酸衍生物和小肽分子；此外，还有同样参与生物膜和能量合成的甘油酯代谢和脂肪酸代谢，参与的差异代谢物类别分别为甘油二酯 (diglyceride, DG) 和甘油三酯 (triglyceride, TG)，以及有机酸、脂肪酸等；最后，碳代谢、糖代谢以及辅因子合成也有一定表达量，参与的差

异代谢物较少。例如，阿拉伯糖 5-磷酸可能参与核苷酸和辅酶 (如 NAD^+ 、 FAD) 的合成；2-羟基戊二酸可能与 TCA 循环中间体 α -酮戊二酸的合成相关；琥珀酸半醛可能转化为琥珀酸间接参与 TCA 循环或参与谷氨酸代谢合成血红素。

2.4 硫氧化细菌 EPS 分析

以 4 mmol/L 底物浓度培养 LS2，从中提取不同时期的 EPS，测定其中的 PN 与 PS 含量，结果如图 4A 所示。与 DOC 分泌规律不同，EPS 产生最多的时期是稳定期，PN 浓度约为 4.34 mg/L，PS 浓度约为 0.73 mg/L。进一步分别测定稳定期的纯培养 LS2 与共培养的 EPS 分泌情况，结果如图 4B 所示。在低底物浓度下，共培养 EPS 中的 PN 浓度显著增加，约为纯培养的 1.62 倍；在高底物浓度下，共培养 EPS 中的 PS 浓度显著增加，约为纯培养的 1.15 倍，表明异养细菌的存在可能增强了整体的生物膜形成。结合图 4C (纯培养 LS2) 和图 4D (LS2 与 Y4 共培

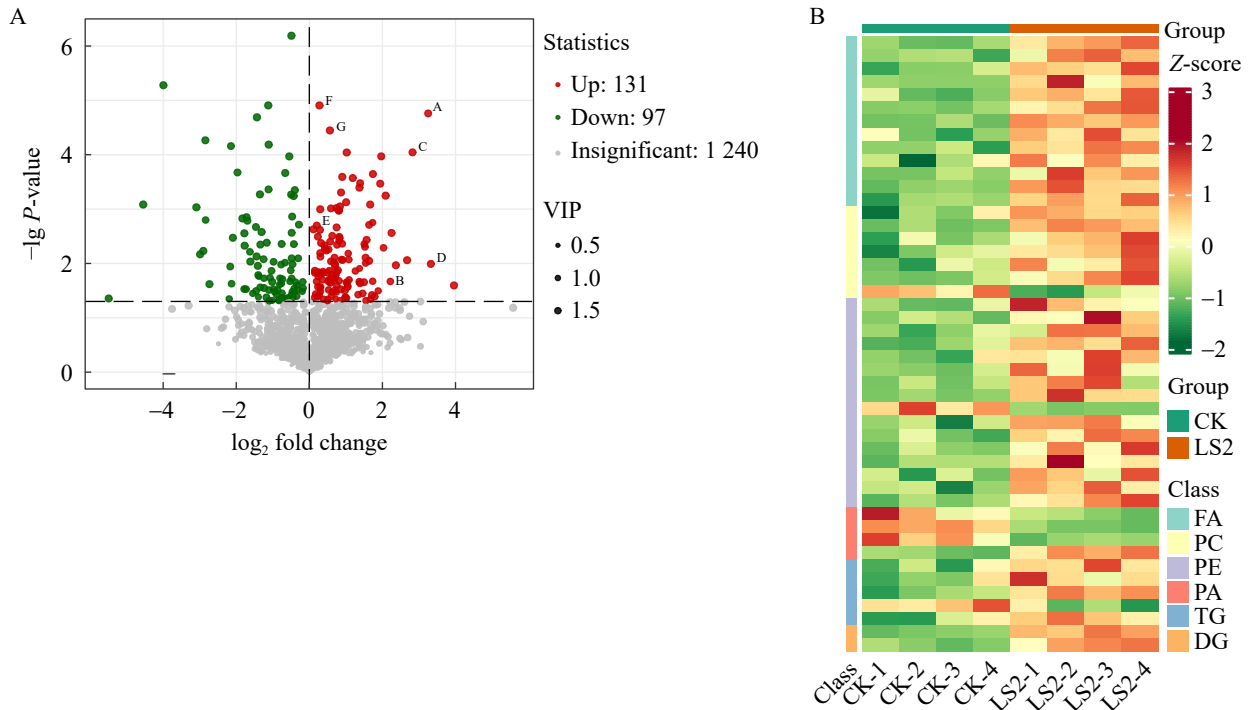


图3 差异代谢物火山图(A)与关键差异代谢物聚类热图(B)

Figure 3 Volcano plot of differential metabolites (A) and clustered heatmap of key differential metabolites (B).

表2 差异代谢物分类

Table 2 Differential metabolites and their metabolic pathways

Metabolic pathway	Metabolic pathway expression levels (%)	Differential metabolites involved in the pathway	Metabolite category
Glycerophospholipid metabolism	36.78	PC(O-16:0/20:3(8Z,11Z,14Z)) (A); PE-NMe(20:1(11Z)/20:1(11Z)) [(2R)-1-[(Z)-docos-13-enoyl]oxy-3-phosphonooxypropan-2-yl] docosanoate; etc.	PC; PE; PA
Amino acids metabolism	12.65	His-Gln-Val-Lys; Leu-Ile (B); etc.	Small peptide
Glycerolipid metabolism	9.20	TG(14:0/15:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)); [(2S)-1-hydroxy-3-icosanoyloxypropan-2-yl] 19-methylcosanoate 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (C); etc.	DG; TG
Biosynthesis of cofactors	8.05	Niacinamide; Arabinose-5-phosphate; etc.	Alcohol or carbohydrates and amines
Biosynthesis of amino acids	5.75	Dimethylglycine; Cys-Cys histidinol (D); etc.	Amino acid derivatives; Small peptide
Carbon metabolism	5.75	2-methylene-3-methylsuccinic acid; 2-hydroxyglutarate; Glucaric acid; etc.	FA; Sugar acids; Organic acid and its derivatives
TCA cycle	2.30	Succinic acid semialdehyde (E); 2-hydroxyglutarate; Glucaric acid	FA; Organic acid and its derivatives
Fatty acid metabolism or degradation	2.30	Carnitine C13:0 (F); 3-hydroxydecanoic acid (G); Yuzu-lactone; etc.	Organic acid and its derivatives; FA; Esters
Glycolysis/Gluconeogenesis/ Biosynthesis of nucleotide sugars	2.30	D-ribose; 2-deoxy-D-ribofuranose 5-phosphate; etc.	Carbohydrates; Organic acid and its derivatives

养)的 SEM 图像,可以明显看到共培养条件下会产生较多的胞外物质。

2.5 共培养中硫氧化细菌基因表达分析

根据 2.3 节 LC-MS 测定结果,结合本课题组在 NCBI 数据库中上传的 LS2 基因组信息,对生物膜形成、氨基酸代谢、糖代谢以及能量代谢过程中的关键酶基因设计了特异性引物进行进一步分析。以内参基因 16S rRNA 为对照,在共培养条件下,LS2 中多个关键基因表达水平显著上调($P < 0.05$)。如图 5 所示,硫氧化过程关键基因 *soxB* (硫氧化酶)上调 11.75%,固碳过程关键基因 *cbbL* (核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶)上调 28.04%,参与蛋白质跨膜转运的基因 *secA* (蛋白转移酶)上调 261.26%,革兰氏阴性菌细胞外膜脂

多糖运输基因 *lptB* (脂多糖转移酶)^[19]上调 54.17%,磷脂合成的肯尼迪途径中关键基因 *pgsA* (磷脂酰甘油磷酸合成酶)上调 91.24%,三羧酸循环中参与能量代谢和碳骨架合成的基因 *icd* (异柠檬酸脱氢酶)上调 22.65%,参与氨基酸代谢与转化的基因 *puuE* (氨基转移酶)上调 18.40%。这些结果表明在共培养条件下, Y4 通过多种途径促进了 LS2 的生物合成及代谢反应,包括硫氧化、固碳以及生物膜形成等重要生理过程。

3 讨论与结论

化能自养微生物因其独特的代谢策略和环境适应性,在 CO₂减排与资源化方面具有重要意义。作为典型的自养硫氧化细菌,菌株 LS2 通

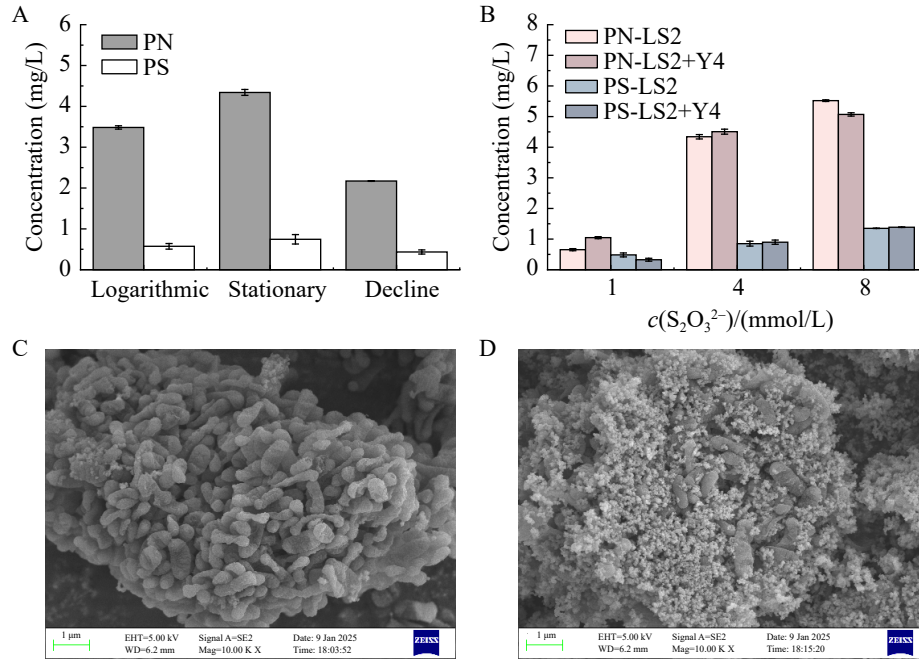


图4 纯培养与共培养的EPS与SEM分析。A: LS2不同生长时期EPS含量; B: 不同底物浓度下稳定期纯培养与共培养中EPS成分变化; C: LS2纯培养SEM图像; D: LS2与Y4共培养SEM图像。

Figure 4 Analysis of EPS and SEM in pure culture and co-culture. A: EPS of LS2 at different growth stages; B: Changes in EPS components in pure culture and co-culture during the stationary phase under different substrate concentrations; C: SEM of LS2 pure culture; D: SEM of LS2 and Y4 co-culture.

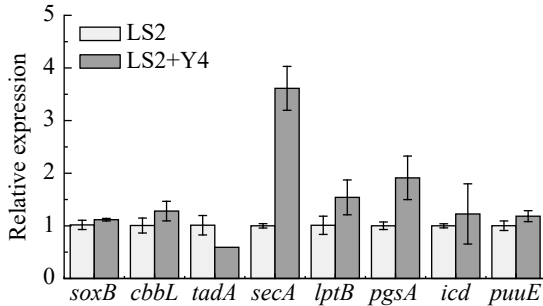


图5 纯培养与共培养条件下LS2功能基因的相对表达情况

Figure 5 Relative expression of functional genes of LS2 under pure culture and co-culture conditions.

过化能自养代谢实现 CO₂固定，并分泌胞外碳作为异养菌的碳源，避免了传统废水处理系统中外部碳源的添加，从而降低了碳排放。LS2 主要通过分泌 DOC 作为 Y4 的碳源供其生长，并在整个生长周期中持续提供碳源，表现出其作为

初级生产力的特性。分泌的 DOC 不仅用于招募异养细菌，还可解除小分子有机物(如氨基酸、有机酸)对自身的细胞毒性^[20-23]。此外，底物浓度(S₂O₃²⁻)对 LS2 的固碳效率也有显著影响。在低底物浓度下，游离有机碳的负反馈抑制作用更为显著^[22]。本研究中，提高底物浓度后分泌的 DOC 和 EPS 量显著增加，但 Y4 对 DOC 的利用率与底物浓度之间并不呈正线性相关，可能是由于 Y4 对高 SO₄²⁻环境存在阈值限制，或者由于 EPS 的增加阻碍了其内部 DOC 的摄取。此外，在共培养中，Y4 可以反哺 LS2，促进其硫氧化速率、生物量积累、固碳效率以及 EPS 的形成。EPS 可以解除金属离子毒性^[24]，实现对污染物的有效去除，并作为生物膜的结构基质增强微生物的耐受性，帮助其在极端环境下生存^[25]。

LS2 分泌的 DOC 主要成分是甘油酯和磷脂类物质，其表达量最高的代谢通路也是甘油酯

与甘油磷脂代谢。这些物质对解除小分子有机物的抑制作用较弱，其主要功能更可能是促进生物膜的形成。研究表明在氨氧化细菌与假单胞菌的共培养中，氨氧化细菌的生物膜处于下层，而异养细菌的生物膜在上层且占 95%^[10]。因此，Y4 可能会产生更多的生物膜并将 LS2 包裹在内部，形成保护屏障，避免其受到毒害作用，从而使其生长代谢正常进行。从分子层面来看，结合基因组针对各个代谢过程的关键酶设计特异性引物，进行相对基因表达分析，在共培养中不仅 *soxB*、*cbbL* 基因上调，与生物膜中蛋白转运 *secA*、多糖运输 *lptB* 以及磷脂形成 *pgsA* 相关的基因表达量也显著增加。这表明代谢协同性可能是微生物细胞之间物质交换的增加导致某种代谢重排^[26]。研究表明异养生物与厌氧氨氧化细菌通过群体感应(quorum sensing, QS)系统相互作用^[27]。细菌生物膜的形成依赖于 QS 信号调控，大部分革兰氏阴性菌的 QS 系统为 LuxI/LuxR 型系统，LuxI 编码合成酰基高丝氨酸内酯(acyl-homoserine lactones, AHL)信号分子。假单胞菌中的 LasI 与 LuxI 具有同源性，其编码的 N-3-氧十二烷酰-高丝氨酸内酯是典型的生物膜调控信号^[28]。因此，在 LS2 与 Y4 的共培养中，代谢重排很可能由 QS 信号分子驱动，而非简单的物质交换。即可能是 Y4 产生的 AHL 类代谢物作为 QS 系统的信号分子，激活了硫氧化细菌相关基因的表达。此外，*icd* 基因的上调表明，充足的能量供给也有利于 LS2 的自养生长及 CO₂ 同化^[22]。

自养菌分泌胞外碳具有种间特异性，不同细菌分泌的 DOC 成分和含量可能会有所不同。然而，与异养菌相比，自养菌的共同特点是生长缓慢，生物膜发育缓慢，而异养菌因其代谢特性会产生比自养细菌更多的胞外物质形成生物膜，并聚集在外层形成保护。这种生物膜的保护机制理论可以广泛应用于所有化能自养细菌。这可能是化能自养细菌与异养菌相互作用的普遍机制，也解释了为什么化能自养细菌难

以富集纯化。此外，自养-异养共培养体系在处理高硫废水时能够实现硫化物的高效氧化和有机物的同步降解，同时减少了对外加碳源的依赖。未来可以进一步聚焦其在动态环境下的菌群互作机制，并开发三维电极生物膜反应器等新型装置，以强化硫氧化效率与碳固定能力，为工业废水低碳化处理提供依据，助力实现碳负排。

作者贡献声明

于晨晨：研究设计、数据处理和论文撰写；林炜铁：研究构思、论文修改；罗剑飞：研究构思、论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] WANG YN, WANG L, TSANG YF, FU XH, HU JJ, LI H, LE YQ. Response of *cbb* gene transcription levels of four typical sulfur-oxidizing bacteria to the CO₂ concentration and its effect on their carbon fixation efficiency during sulfur oxidation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 92: 31-40.
- [2] 何晓敏, 林炜铁, 罗剑飞. 基于电子分配的化能自养细菌培养策略[J]. *微生物学报*, 2025, 65(2): 698-714. HE XM, LIN WT, LUO JF. Culture strategy of chemoautotrophic bacteria based on electron distribution[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(2): 698-714 (in Chinese).
- [3] ZHANG SW, WANG YN, WANG L, TSANG YF, LI H, FU XH. Role of electron donor in CO₂ fixation of chemoautotrophic bacteria and its preconditions: verification in *Alcaligenes hydrogenophilus*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 118: 37-43.
- [4] BAYER B, McBEAIN K, CARLSON CA, SANTORO AE. Carbon content, carbon fixation yield and dissolved organic carbon release from diverse marine nitrifiers[J]. *Limnology and Oceanography*, 2023, 68(1): 84-96.
- [5] MEADOR TB, SCHOFFELEN N, FERDELMAN TG, REBELLO O, KHACHIKYAN A, Könneke M. Carbon recycling efficiency and phosphate turnover by marine nitrifying archaea[J]. *Science Advances*, 2020, 6(19): eab1799.
- [6] ZHANG SW, FU XH, HAN YL, WEI LW, LIU MN, WANG YN, WANG L. Main components of free organic carbon generated by obligate chemoautotrophic bacteria that inhibit their CO₂ fixation[J]. *iScience*, 2022, 25(12): 105553.

- [7] LI X, KAPPLER U, JIANG GM, BOND PL. The ecology of acidophilic microorganisms in the corroding concrete sewer environment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 683.
- [8] WANG YN, KAI Y, WANG L, TSANG YF, FU XH, HU JJ, XIE YJ. Key internal factors leading to the variability in CO₂ fixation efficiency of different sulfur-oxidizing bacteria during autotrophic cultivation[J]. *Journal of Environmental Management*, 2020, 271: 110957.
- [9] WANG YN, TSANG YF, WANG L, FU XH, HU JJ, LI H, LE YQ. Inhibitory effect of self-generated extracellular dissolved organic carbon on carbon dioxide fixation in sulfur-oxidizing bacteria during a chemoautotrophic cultivation process and its elimination[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 252: 44-51.
- [10] PETROVICH M, WU CY, ROSENTHAL A, CHEN KF, PACKMAN AI, WELLS GF. *Nitrosomonas europaea* biofilm formation is enhanced by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(5): fix047.
- [11] MURAKAMI C, MACHIDA K, NAKAO Y, KINDAICHI T, OHASHI A, AOI Y. Mutualistic relationship between *Nitrospira* and concomitant heterotrophs[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2022, 14(1): 130-137.
- [12] DAI CM, LI JH, YAN HS, LIN WT, LUO JF. *Halothiobacillus diazotrophicus* sp. nov., a chemolithoautotrophic sulphur-oxidizing and nitrogen-fixing bacterium isolated from freshwater[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2023, 73(12): 006202.
- [13] WIDDEL F, BAK F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria[M]//*The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. New York, NY: Springer New York, 1992: 3352-3378.
- [14] 殷柏轩, 孙水裕, 黄宇, 廖小健, 刘敬勇, 卢明敏, 曾刘婷, 李寿朋. *Pseudomonas putida* 胞外聚合物吸附重金属镍的空间差异性及其作用机理[J]. *环境科学学报*, 2024, 44(5): 25-36.
- YIN BX, SUN SY, HUANG Y, LIAO XJ, LIU JY, LU MM, ZENG LT, LI SP. Spatial differences and mechanism of Ni(II) adsorption by extracellular polymers of *Pseudomonas putida*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2024, 44(5): 25-36 (in Chinese).
- [15] ZHENG SK, LI JG, YAN WL, ZHAO WY, YE CS, YU X. Biofilm formation and antioxidation were responsible for the increased resistance of *N. eutropha* to chloramination for drinking water treatment[J]. *Water Research*, 2024, 254: 121432.
- [16] FENG Y, ZHAO YP, GUO YZ, LIU ST. Microbial transcript and metabolome analysis uncover discrepant metabolic pathways in autotrophic and mixotrophic anammox consortia[J]. *Water Research*, 2018, 128: 402-411.
- [17] D'ABZAC P, BORDAS F, van HULLEBUSCH E, LENS PN, GUIBAUD G. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85: 1589-1599.
- [18] 曲珊珊, 严洪珊, 林炜铁, 罗剑飞. 化能自养硫氧化细菌 *Halothiobacillus* sp. LS2 介导的以乙炔为电子受体的硫氧化反应[J]. *微生物学报*, 2021, 61(6): 1488-1495.
- QU SS, YAN HS, LIN WT, LUO JF. Anaerobic sulfur oxidation with acetylene as electron acceptor mediated by chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium *Halothiobacillus* sp. LS2[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(6): 1488-1495 (in Chinese).
- [19] SCHMID J, SIEBER V, REHM B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 496.
- [20] ZHAO XD, ZHANG Y, CHEN L, ZHANG SW, FU XH, WANG L. Continuous-flow membrane bioreactor enhances enrichment and culture of autotrophic nitrifying bacteria by removing extracellular free organic carbon[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(14): 42378-42389.
- [21] ZHAO XD, LI LY, ZHANG SW, FU XH, XIE L, WANG L. Efficient chemoautotrophic carbon fixation in controlled systems: Influencing factors, regulatory strategies and application prospects[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2025, 55(11): 757-782.
- [22] WANG YN, TSANG YF, WANG L, FU XH, LI H, HU JJ, LE YQ. Influence of reduced sulfur on carbon fixation efficiency of *Halothiobacillus neapolitanus* and its mechanism[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 326: 249-256.
- [23] NAZ S, LIU P, FAROOQ U, MA HW. Insight into de-regulation of amino acid feedback inhibition: a focus on structure analysis method[J]. *Microbial Cell Factories*, 2023, 22(1): 161.
- [24] LIU BC, LIN WT, HUANG SX, SUN QY, YIN H, LUO JF. Removal of Mg²⁺ inhibition benefited the growth and isolation of ammonia-oxidizing bacteria: an inspiration from bacterial interaction[J]. *Science of The Total Environment*, 2022, 838: 155923.
- [25] PINHEIRO Y, FARIA DA MOTA F, PEIXOTO RS, van ELSAS JD, LINS U, MAZZA RODRIGUES JL, ROSADO AS. A thermophilic chemolithoautotrophic bacterial consortium suggests a mutual relationship between bacteria in extreme oligotrophic environments[J]. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 230.
- [26] CHARUBIN K, PAPOUTSAKIS ET. Direct cell-to-cell exchange of matter in a synthetic *Clostridium* syntrophy enables CO₂ fixation, superior metabolite yields, and an expanded metabolic space[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 52: 9-19.
- [27] SUN YP, GUAN YT, WANG HY, WU GX. Autotrophic nitrogen removal in combined nitrification and Anammox systems through intermittent aeration and possible microbial interactions by quorum sensing analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 272: 146-155.
- [28] WANG YS, BIAN ZR, WANG Y. Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(19): 6365-6381.