

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2019010408

职亭亭, 吴浩贤, 郭瑛瑛 等. 七株硫酸盐还原菌汞甲基化能力的比较 [J]. 环境化学, 2019, 38(12): 2657-2664.

ZHI Tingting, WU Haoxian, GUO Yingying, et al. Methylation of mercury in seven sulfate-reducing bacteria [J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(12): 2657-2664.

七株硫酸盐还原菌汞甲基化能力的比较*

职亭亭^{1,2} 吴浩贤^{1,2} 郭瑛瑛² 毛宇翔¹ 何 滨²
阴永光² 史建波² 胡立刚^{2**} 江桂斌²

(1. 河南理工大学资源环境学院, 焦作, 454003;

2. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京, 100085)

摘要 目前硫酸盐还原菌汞甲基化的研究集中在 *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 菌株上, 由于 *D. desulfuricans* ND132 并非商业化提供的菌株, 使得国内很多实验室难以获得该菌株开展微生物汞甲基化的相关研究. 本文收集了 7 株商业化的硫酸盐还原菌, 通过系统研究探寻其中可用作替代的汞甲基化模式菌株. 在实验室培养条件下, 通过对甲基化关键基因 (*hgcA* 和 *hgcB*)、生长特性、汞的耐受性以及汞甲基化能力的测试, 结果发现, *Desulfomicrobium escambiense* (CGMCC 1.3481) 生长较快、具有较好的汞甲基化率 ($7.5\% \pm 0.7\%$), 具备作为汞甲基化模式菌株的潜力.

关键词 汞, 甲基化, 硫酸盐还原菌, 甲基汞, 模式菌株.

Methylation of mercury in seven sulfate-reducing bacteria

ZHI Tingting^{1,2} WU Haoxian^{1,2} GUO Yingying² MAO Yuxiang¹ HE Bin²
YIN Yongguang² SHI Jianbo² HU Ligang^{2**} JIANG Guibin²

(1. School of Resource and Environment, Henan Polytechnic University, Jiaozuo, 454003, China;

2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences,

State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Beijing, 100085, China)

Abstract: *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 is most widely used strain for studies on mercury methylation of sulfate-reducing bacteria (SRB). It however is not a commercially available strain, limiting the relevant studies in most of domestic laboratories. In this study, seven commercially available strains of sulfate-reducing bacteria were collected and explored as the potential model for methylation of mercury with SRB. The occurrence of key gene for mercury methylation (*hgcA* and *hgcB*), growth characteristics, tolerance to mercury and mercury methylation ability, were systematically evaluated. The results showed that *Desulfomicrobium escambiense* (CGMCC 1.3481) had a conversion rate of up to $7.5\% \pm 0.7\%$ under the optimized condition, which could serve as a model strain in studies on mercuric methylation with SRB.

Keywords: mercury, methylation, sulfate-reducing bacteria, methylmercury, model strain.

汞作为一种全球性污染物^[1], 其健康效应广受关注. 环境介质中常见的汞形态包括元素汞 (Hg^0)、

2019 年 1 月 4 日收稿 (Received: January 4, 2019).

* 国家自然科学基金 (21777179) 资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21777179).

** 通讯联系人, E-mail: lghu@reces.ac.cn

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net
Corresponding author, E-mail: lghu@reces.ac.cn

无机汞(Hg^{2+})和有机汞等^[2],其中甲基汞形态以其强毒性效应备受关注^[3-4].甲基汞通过生物富集及随食物链逐级放大,可使鱼体内甲基汞的浓度达到水体中浓度的 10^4-10^6 倍,进而对人类造成严重危害^[5-6].

在底泥、水体等自然环境下,无机汞在厌氧条件下可以通过微生物介导转化成甲基汞^[7].1968年,Wood等^[8]发现产甲烷菌可以在甲基钴胺素存在的条件下将无机汞转化为甲基汞,微生物介导的汞甲基化作用开始引起国内外专家学者的注意.1985年,Gilmour等^[9]从切萨皮克海湾的底层沉积物中分离出了具有汞甲基化能力的一株硫酸盐还原菌—脱硫弧菌*D. desulfuricans* ND132,此后它成为研究硫酸盐还原菌汞甲基化的重要菌株,关于汞甲基化机理和途径的工作都在此基础上展开^[10-13].2006年,Fleming等^[14]分离出一株具有较高汞甲基化速率的铁还原菌,其纯培养时的甲基化能力超过了已知具有汞甲基化能力的硫酸盐还原菌.此后,铁还原菌对汞的甲基化作用真正开始受到人们的关注.2013年,Parks等^[15]在脱硫弧菌*D. desulfuricans* ND132和铁还原菌*Geobacter sulfurreducens* PCA中发现了两个基因—*hgcA*和*hgcB*,敲除两者中的任意一种或将两者都敲除都将导致微生物汞甲基化功能的丧失.汞甲基化基因*hgcA*和*hgcB*为广泛评价自然界中微生物的汞甲基化能力提供了基础.

目前研究认为硫酸盐还原菌、铁还原菌和产甲烷菌是环境中主要的汞甲基化微生物^[14-19].但硫酸盐还原菌*D. desulfuricans* ND132属于Gilmour实验室,并非商业化的菌株.其使用和相关研究均需向Gilmour实验室申请,获得其许可.这一壁垒使得其研究方法的标准化和使用都带来困难,使得国内很多实验室难以利用*D. desulfuricans* ND132开展微生物汞甲基化的相关研究.

针对上述情况,本文收集了中国普通微生物菌种保藏管理中心及其它实验室的7株硫酸盐还原菌,以铁还原菌*Geobacter sulfurreducens* PCA为阳性对照,在实验室纯培养条件下通过对汞甲基化关键基因(*hgcA*和*hgcB*)、生长特性、汞的耐受性以及汞甲基化能力等系统研究,初步筛选合适的汞甲基化模式菌株.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

实验菌株见表1.硫酸盐还原菌的培养基为:柠檬酸钠 $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、乳酸钠 $3.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $MgSO_4$ $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $CaSO_4$ $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NH_4Cl $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 K_2HPO_4 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Yeast extract $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (美国菌种保藏库ATCC Medium 1249);铁还原菌*Geobacter sulfurreducens* PCA(ATCC 51573)的培养基为: NH_4Cl $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaH_2PO_4 $0.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KCl $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $NaHCO_3$ $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 CH_3COONa $0.82\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、富马酸钠 $8.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Wolfe 微量维生素混合液 $10\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 、微量矿物元素混合液 $10\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ (参照美国菌种保藏库ATCC Medium 1957).

表1 实验菌株一览表

Table 1 List of collected bacteria

| 细菌名称 Strain | 细菌名称缩写 Abbreviation of strain name | 编号 Number |
|---|---------------------------------------|--------------|
| <i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA | <i>G. sulfurreducens</i> PCA | ATCC 51573 |
| <i>Desulfovibrio africanus</i> | <i>D. africanus</i> | ATCC 19996 |
| <i>Desulfomicrobium norvegicum</i> | <i>Dsm. norvegicum</i> | CGMCC 1.3493 |
| <i>Desulfomicrobium escambiense</i> | <i>Dsm. escambiense</i> | CGMCC 1.3481 |
| <i>Desulfotomaculum ruminis</i> | <i>Dtm. ruminis</i> | CGMCC 1.3470 |
| <i>Desulfovibrio fructosivorans</i> | <i>D. fructosivorans</i> | CGMCC 1.3468 |
| <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> subsp. | <i>D. desulfuricans</i> sp. | CGMCC 1.3469 |
| <i>Desulfobacterium macestii</i> | <i>Dbt. macestii</i> | CGMCC 1.3477 |

注: ATCC(American type culture collection) 美国菌种保藏中心; CGMCC(China General Microbiological Culture Collection Center) 中国普通微生物菌种保藏管理中心.

1.2 培养基的配制

按比例称取适量的培养基粉末,倒入20 mm口径的钳口厌氧瓶中,并加入超纯水.待粉末完全溶解

后,使用厌氧混合气 $N_2:H_2:CO_2$ (80%:10%:10%) 吹除瓶中的氧气(通常 100 mL 培养基溶液的通气时间为 10 min) 然后使用丁基胶塞和中空铝盖密封.之后将厌氧瓶放入高压蒸汽灭菌锅中,在 121 °C 条件下灭菌 15 min.不能使用高温高压灭菌的药品(如富马酸二钠) 则使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌.灭菌结束后将培养基转入厌氧手套箱内,待冷却至室温后调节 pH 7.0 备用.

1.3 细菌培养与暴露

在无菌操作条件下,用注射器将菌悬液接种至盛有液体培养基的钳口厌氧瓶内,在 30 °C 厌氧手套箱内避光静置培养.每隔 12 h/24 h 取样,用紫外可见分光光度计测定细菌在波长 600 nm 处的吸光度 OD_{600} 绘制细菌的生长曲线.实验同时设置不同初始氯化汞浓度(0、0.05、0.25、0.5、2.5、5、10、25 $mg \cdot L^{-1}$) 对细菌生长的影响,绘制毒性曲线.

1.4 甲基汞的测定

参照美国环保署标准方法(USEPA Method 1630).样品经 $KBr-H_2SO_4/CuSO_4/CH_2Cl_2$ 体系萃取/反萃取,结合同位素稀释法,使用冷原子荧光测汞仪和 ICP-MS 联用来测定菌液中甲基汞的生成量.

1.5 PCR 测定细菌中的 *hgcA* 基因

取 1 mL 菌液,在 12000 $r \cdot min^{-1}$ 条件下离心 10 min,弃上清液,用水洗涤沉淀后在 12000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min,弃上层水溶液,用 100 μL 水溶液溶解.在 96 °C 金属浴条件下加热 10 min,取 0.5 μL 加入 20 μL PCR 酶反应体系(上游引物 *hgcA*_261F = CGGCATCAAYGTCTGCTGYG,下游引物 *hgcA*_912R = GGTGTAGGGGGTGCAGCCSGTRWARKT^[20]) 在 PCR 扩增仪反应,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶,在电泳仪电压为 140 V 条件下跑 10 min,用凝胶成像系统观察 *hgcA* 条带.

1.6 BLAST 序列比对

根据文献[15],分别找出 *D. desulfuricans* ND132 的 *hgcA* 和 *hgcB* 两个基因片段 DND132_1056 和 DND132_1057,在 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 数据库中,找出对应蛋白质的氨基酸序列.在 NCBI 数据库中找出 6 种细菌的全基因组序列(缺少 *Dbt. macestii* 全基因组序列),使用 NCBI 的 tblastn(蛋白与翻译后的核苷酸序列) 功能将 *D. desulfuricans* ND132 的氨基酸序列与各种细菌的全基因组序列分别进行比对以判断是否存在 *hgcA* 和 *hgcB* 两个基因.

1.7 质量控制

实验室采用包括设置平行样、空白样及加标样分析等手段以保证实验数据的准确性.每个样品均设定 3 个平行样,每批次样品均设定 3 个空白样品.平行样品测定结果的相对标准偏差均小于 20%,加标回收率介于 75%—93% 之间.标准参考物质 DORM-4(鱼蛋白标准参考物质, National Research Council, 加拿大) 作为质量控制措施之一,甲基汞的测试值为 $0.361 \pm 0.020 \mu g \cdot g^{-1}$,与认证值 $0.354 \pm 0.031 \mu g \cdot g^{-1}$ 一致.

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 细菌的生长

在 7 种硫酸盐还原菌中,只有 *D. desulfuricans* sp.、*D. africanus* 和 *Dsm. escambiense* 等 3 株细菌通过优化后,可在本实验条件下快速生长.根据紫外可见分光光度计测定的 OD_{600} 值绘制的细菌的生长曲线如图 1 所示.细菌在实验室纯培养条件下皆展现出 4 个阶段:迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期,但不同细菌进入不同生长阶段的时间不同(表 2): *D. desulfuricans* sp. 在培养 0—6 h 迟缓期,6—36 h 为对数期,36—72 h 为稳定期,72 h 以后进入衰亡期; *Dsm. africanus* 在培养 0—24 h 为迟缓期,24—72 h 为对数期,72—120 h 为稳定期,120 h 以后进入衰亡期; *Dsm. escambiense* 在培养 0—6 h 为迟缓期,6—36 h 为对数期,36—72 h 为稳定期,72 h 以后进入衰亡期. *D. norvegicum*、*Dtm. ruminis*、*D. fructosivorans* 和 *Dbt. macestii* 等 4 株细菌生长缓慢,其生长条件还需进一步探索.

2.2 细菌对氯化汞的毒性响应

在菌液初始 OD_{600} 为 0.01,氯化汞的暴露浓度为 0、0.05、0.25、0.5、2.5、5、10、25 $mg \cdot L^{-1}$,暴露时间为 48 h 实验条件下,不同汞浓度对 3 株硫酸盐还原菌的毒性作用呈现剂量-效应关系,如图 2 所示.

D. desulfuricans sp.在汞浓度为 0—0.25 mg·L⁻¹时生长不受影响,0.25 mg·L⁻¹后开始逐渐受到抑制;而 *D. africanus*在汞浓度为 0—0.5 mg·L⁻¹时生长不受影响;*Dsm. escambiense* 在汞浓度为 0—25 mg·L⁻¹时生长不受影响.综合以上的实验结果,结合相关文献^[18],选用了 10 μg·L⁻¹的汞暴露浓度进行后续实验,在该暴露浓度下 4 株细菌的生长不受任何抑制.

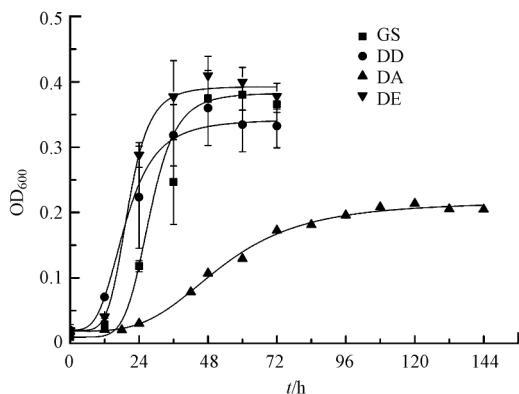


图 1 三株硫酸盐还原菌和铁还原菌的生长曲线
Fig.1 Growth curves of three sulfate-reducing bacteria and iron-reducing bacteria

GS: *G. sulfurreducens* PCA; DD: *D. desulfuricans* sp.;
DA: *D. africanus*; DE: *Dsm. escambiense*

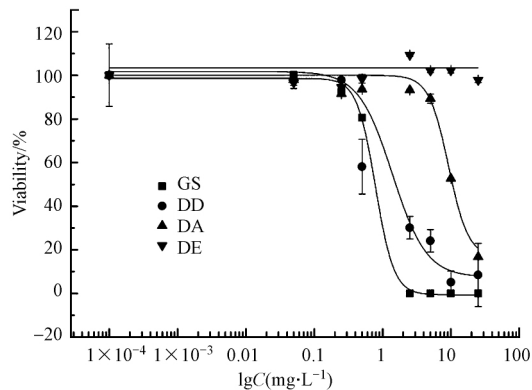


图 2 细菌在不同氯化汞浓度下的剂量-效应曲线
Fig.2 The dose-effect curves of bacteria at different mercury chloride concentrations

GS: *G. sulfurreducens* PCA; DD: *D. desulfuricans* sp.;
DA: *D. africanus*; DE: *Dsm. escambiense*

表 2 三株硫酸盐还原菌和铁还原菌生长曲线的对比

Table 2 Comparison of three sulfate-reducing bacteria and iron-reducing bacteria

| 细菌 Strain | 迟缓期 Lag phase/h | 对数期 Log phase/h | 稳定期 Stationary phase/h | 衰亡期 Death phase/h |
|------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|----------------------|
| <i>G. sulfurreducens</i> PCA | 0—12 | 12—48 | 48—72 | 72 以后 |
| <i>D. desulfuricans</i> sp. | 0—6 | 6—36 | 36—72 | 72 以后 |
| <i>Dsm. africanus</i> | 0—24 | 24—72 | 72—120 | 120 以后 |
| <i>Dsm. escambiense</i> | 0—6 | 6—36 | 36—72 | 72 以后 |

2.3 细菌中 *hgcA* 基因和 *hgcB* 基因

通过 PCR 验证,7 株硫酸盐还原菌中具有 *hgcA* 基因的细菌共有 3 株,分别为 *D. africanus*、*Dsm. escambiense*、*Dsm. norvegicum*.通过使用 NCBI 的 BLAST 序列比对,7 株硫酸盐还原菌中具有 *hgcA* 基因的细菌共有 3 株,与 PCR 验证结果一致;具有 *hgcB* 基因的细菌共有 3 株,分别为 *D. africanus*、*Dsm. escambiense*、*Dsm. norvegicum*,与具有 *hgcA* 基因的菌株一致.

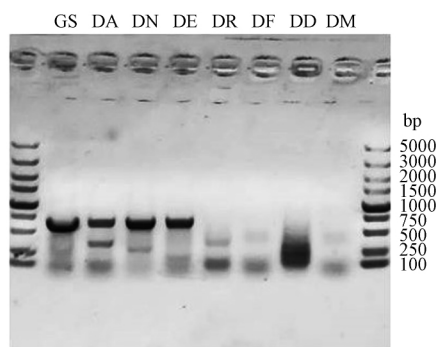


图 3 七株硫酸盐还原菌 *hgcA* 基因 DNA 电泳图

Fig.3 Electrophoresis of *hgcA* genes from seven sulfate-reducing bacteria

GS: *G. sulfurreducens* PCA; DA: *D. africanus*; DN: *Dsm. norvegicum*; DE: *Dsm. escambiense*;
DR: *Dim. ruminis*; DF: *D. fructosivorans*; DD: *D. desulfuricans* sp.; DM: *Dot. macestrii*

表 3 七株硫酸盐还原菌和铁还原菌 *hgcA* 和 *hgcB* 基因Table 3 Results of *hgcA* and *hgcB* genes in seven sulfate-reducing bacteria and iron-reducing bacteria

| 细菌名称 Strain | PCR 验证 <i>hgcA</i> PCR validation | <i>hgcA</i> 基因序列 ^a <i>hgcA</i> gene sequence | <i>hgcB</i> 基因序列 ^a <i>hgcB</i> gene sequence |
|------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| <i>G. sulfurreducens</i> PCA | + | + | + |
| <i>D. desulfuricans</i> sp. | - | - | - |
| <i>D. africanus</i> | + | + | + |
| <i>D. fructosivorans</i> | - | - | - |
| <i>Dsm. escambiense</i> | + | + | + |
| <i>Dsm. norvegicum</i> | + | + | + |
| <i>Dtm. ruminis</i> | - | - | - |
| <i>Dbt. macestii</i> | - | - ^b | - ^b |

注: a: 通过全基因组序列比对得出 (By whole genome sequence alignment); b: 缺少全基因组序列 (Missing whole genome sequence)

2.4 不同细菌中甲基汞的转化率

3 种硫酸盐还原菌 *D. desulfuricans* sp.、*D. africanus* 和 *Dsm. escambiense* 在初始 OD600 为 0.01, 氯化汞的暴露浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、温度为 30°C 、pH 7.0 的严格厌氧实验条件下培养 72 h 后, 取出样品用于测量菌液中甲基汞的转化率 (图 4)。3 株细菌中, *Dsm. desulfuricans* sp. 中甲基汞的转化率仅为 0.03%。*D. africanus* 中的转化率仅为 $0.5\% \pm 0.03\%$; *Dsm. escambiense* 的甲基汞转化率为 $7.5\% \pm 0.7\%$ 。

2.5 基因对汞甲基化的影响

hgcA 和 *hgcB* 基因对于细菌介导的无机汞甲基化至关重要。*D. africanus*、*Dsm. escambiense* 和 *G. sulfurreducens* PCA 都含有 *hgcA* 和 *hgcB* 基因 (表 3); 在这 3 株细菌的培养实验中, 均可以观测到相当量的无机汞转化成甲基汞 (图 4)。尽管在 72 h 培养条件下 *D. africanus* 中甲基汞转化率仅有 0.5%, 但通过用同位素稀释法准确测定其甲基汞的转化率随时间变化趋势, 证明的确存在甲基汞的生成 (图 5)。值得注意的是, *Dsm. escambiense* 和 *D. africanus* 均可将无机汞转化为甲基汞, 但两者在本实验条件下其甲基汞的转化率上存在很大差异, *Dsm. escambiense* 生成的甲基汞远高于 *D. africanus* 生成的甲基汞, 说明在同时具有 *hgcA* 和 *hgcB* 基因的前提下, 还有其它条件会显著影响细菌的汞甲基化能力。

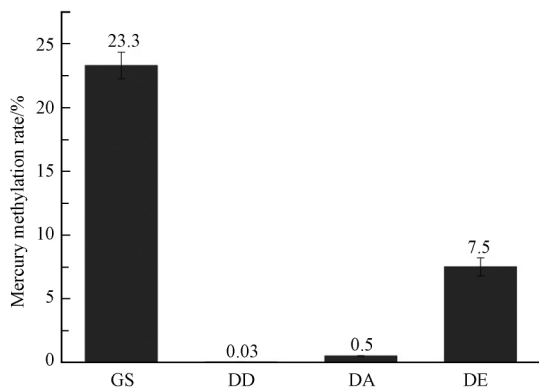


图 4 不同细菌中甲基汞的转化率

Fig.4 The conversion rate of methylmercury in different bacteria

GS: *G. sulfurreducens* PCA; DD: *D. desulfuricans* sp.;
DA: *D. africanus*; DE: *Dsm. escambiense*

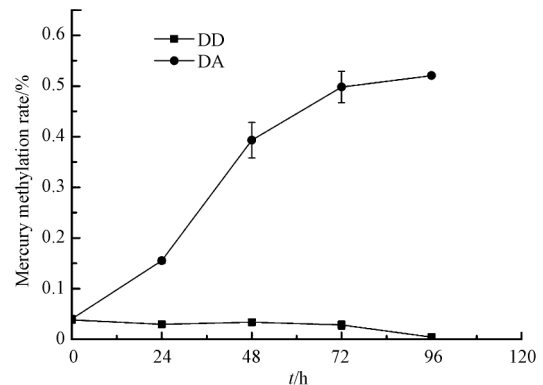


图 5 甲基汞的转化率随时间变化曲线

Fig.5 Curves of the conversion rate of methylmercury over time

DD: *D. desulfuricans* sp.; DA: *D. africanus*

2.6 实验条件对汞甲基化的影响

实验发现, 完全厌氧对于细菌生长至关重要。本实验中的细菌只有在 20 mm 钳口厌氧瓶、丁基胶塞和中空铝盖 (图 6) 组合的条件下才能生长, 螺纹瓶即使通过胶带密封瓶口仍然无法实现实验中所有可培养细菌的厌氧生长, 说明其不能满足实验的气密性要求。



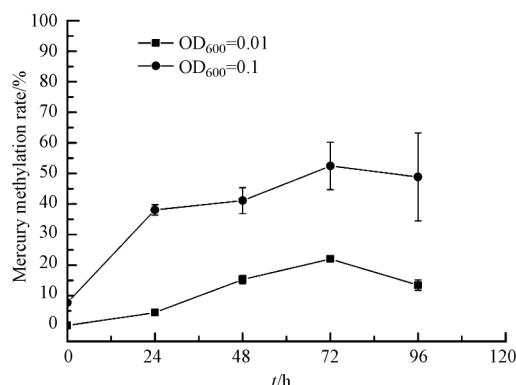
图 6 培养瓶

Fig.6 Culture vessel

在本实验条件下, *D. africanus* 的汞甲基化能力较低, 72 h 培养下仅有 $0.5\% \pm 0.03\%$ 的转化率; Ekstrom 等^[21]的之前的研究中, *D. africanus* 在 $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HgCl}_2$ 条件下暴露 5 h, 汞甲基化速率高到 $64.4 \pm 28.1 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 与本实验结果存在明显差异. 比较实验条件发现两者培养条件不同, 在 Ekstrom 等^[21]的文章中硫酸盐还原菌的培养基中含有 $3.6 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Fe}^{2+}$. 之前研究表明, Fe^{2+} 可以促进硫酸盐还原菌的生长^[22]. 根据 Han 等^[23]的研究结论, 在一定范围内 ($0\text{--}6.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 增加培养体系中 Fe^{2+} 浓度, 可以增加厌氧河口沉积物浆中甲基汞的转化率. Mehrotra 等^[24]同样观察到在黑暗中条件下, 添加低浓度的 Fe^{2+} 时可以促进缺氧湿地沉积物浆中甲基汞的生成.

2.7 初始细菌数量和细菌生长阶段对汞甲基化的影响

G. sulfurreducens PCA 在菌液初始 OD600 为 0.1 ($10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 0.01 ($10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的条件下同样暴露 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HgCl_2 , 生成的甲基汞产量却有明显的差异 (图 7). 在菌液初始 OD600 为 0.01 条件下, *G. sulfurreducens* PCA 中甲基汞的生成量远远低于菌液初始 OD600 为 0.1 时, 说明细菌初始的细菌数量会影响甲基汞的生成. 在相同的培养条件下, 初始细菌数量不同, 甲基汞的生成量不同. 虽然两者在生成的甲基汞含量上存在差异, 但是两者在汞暴露后的趋势一致, 从 0—72 h 皆表现出甲基汞含量随时间而逐渐增大的趋势, 在 72 h 后甲基汞含量逐渐降低. 根据 Lin 等^[25]的研究发现, 在 *G. sulfurreducens* PCA 的汞甲基化过程中伴随着汞的吸收还原和氧化过程, 这几个过程相互竞争, 在初始细菌数量不同的条件下不同的过程占主导. 为了研究细菌的汞甲基化作用, 还需要进一步探索最适宜的初始细菌数量.

图 7 *G. sulfurreducens* PCA 在 OD600 不同的条件下甲基汞生成量随时间的变化曲线Fig.7 Methylmercury production-time curves in *G. sulfurreducens* PCA under different OD600 conditions

另外, 细菌的生长阶段也会影响甲基汞的生成, 但目前的研究结论尚有争议. Ramamoorthy 等^[26]认为甲基汞是由处于死亡状态的细菌产生, 处于对数期的细菌更容易促进 Hg^0 的生成. 而 Biswas 等^[27]通过对 *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 的研究发现, 甲基汞主要是由稳定期晚期的细菌产生, 其甲基化效率是对数期中期和晚期细菌的 3 倍. Hu 等^[28]发现, 对数期是细菌进行汞甲基化的主要阶段, 稳定期时甲基

汞的产量反而会降低. 本实验中, *G. sulfurreducens* PCA 的汞甲基化实验全是在迟缓期开始暴露无机汞, 观察发现两者甲基汞生成量随时间的变化趋势一致: 从迟缓期至稳定期, 菌液中的甲基汞含量持续增加, 而进入衰亡期后, 菌液中的甲基汞含量逐渐降低. 说明处于稳定期的细菌仍具备良好的汞甲基化能力, 这与 Hu 等^[28]的研究存在差异, 而与 Biswas 等^[27]的研究结论存在相似性. 为明确稳定期在细菌汞甲基化过程中的作用, 处于稳定期的细菌对汞甲基化速率的影响仍需要进一步探究.

3 结论(Conclusion)

通过系统研究发现, 中国普通微生物菌种保藏管理中心的硫酸盐还原菌 *Desulfomicrobium escambiense*(CGMCC 1.3481) 具有汞甲基化的关键基因 *hgcA* 和 *hgcB*, 实验室纯培养条件下生长状态良好, 在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化汞暴露条件下, 在 72 h 内甲基汞产率可达 $7.5\% \pm 0.7\%$, 适合作为后续研究微生物汞甲基化过程的模式菌株. 本实验中由于 *Desulfomicrobium norvegicum*、*Desulfotomaculum ruminis*、*Desulfovibrio fructosivorans* 和 *Desulfobacterium macestii* 等 4 株细菌生长缓慢, 其汞甲基化能力未能予以充分评估, 但是 *Desulfomicrobium norvegicum* 具有 *hgcA* 和 *hgcB* 基因, 将会在未来优化生长条件后进一步研究.

参考文献(References)

- [1] LINDQVIST O, JOHANSSON K, BRINGMARK L, et al. Mercury in the Swedish environment—recent research on causes, consequences and corrective methods[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1991, 55(1/2) : 1-261.
- [2] FITZGERALD W F, LAMBORG C H, HAMMERSCHMIDT C R, et al. Marine biogeochemical cycling of mercury[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(2) : 641-662.
- [3] FITZGERALD W F, CLARKSON T W. Mercury and monomethylmercury: Present and future concerns [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1991, 96: 159-166.
- [4] JOAUDIMIR Castro, KENNETH Neubauer, 张 桢. 利用 GC-ICP-MS 分析生物组织中的汞形态[J]. *环境化学*, 2017, 36(10) : 2295-2296.
JOAUDIMIR Castro, KENNETH Neubauer, ZHANG Z. The analysis of mercury speciation in biological tissue by GC-ICP-MS [J]. *Environmental Chemistry*, 2017, 36(10) : 2295-2296(in Chinese) .
- [5] SUN R G, WANG D Y, MAO W, et al. Photodegradation of methylmercury in Jialing River of Chongqing, China [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2015, 27(6) : 8-14.
- [6] MERGLER D, ANDERSON H A, CHAN L H M, et al. Methylmercury exposure and health effects in humans: A worldwide concern [J]. *Ambio*, 2007, 36(1) : 3-11.
- [7] 毕丽, 贺纪正, 张丽梅, 等. 环境中汞微生物转化研究进展[J]. *环境化学*, 2018, 37(11) : 2359-2367.
BI L, HE J Z, ZHANG L M, et al. Microbial transformations of mercury in the environment [J]. *Environmental Chemistry*, 2018, 37(11) : 2359-2367(in Chinese) .
- [8] WOOD J M, KENNEDY F S, ROSEN C G. Synthesis of methyl-mercury compounds by extracts of a methanogenic bacterium [J]. *Nature*, 1968, 220: 173-174.
- [9] GILMOUR C C, TUTTLE J H, MEANS J C. *Marine and estuarine geochemistry* [M]. Chelsea, Lewis Publishers, 1985: 239-258.
- [10] PAK K, BARTHA R. Products of mercury demethylation by sulfidogens and methanogens [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1998, 61: 690-694.
- [11] PAK K R, BARTHA R. Mercury methylation and demethylation in anoxic lake sediments and by strictly anaerobic bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(3) : 1013-1017.
- [12] PAK K R, BARTHA R. Mercury methylation by interspecies hydrogen and acetate transfer between sulfidogens and methanogens [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(6) : 1987-1990.
- [13] SCHAEFER J K, ROCKS S S, ZHENG W, et al. Active transport, substrate specificity, and methylation of Hg(II) in anaerobic bacteria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(21) : 8714-8719.
- [14] FLEMMING E J, MACK E E, GREEN P G, et al. Mercury methylation from unexpected sources: molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1) : 457-464.
- [15] PARKS J M, JOHS A, PODAR M, et al. The genetic basis for bacterial mercury methylation [J]. *Science*, 2013, 339(6125) : 1332-1335.
- [16] COMPEAU G C, BARTHA R. Sulfate-reducing bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50(2) : 498-502.

- [17] KING J K , KOSTKA J E , FRISCHER M E , et al. Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2000 , 66(6) : 2430-2437.
- [18] KERIN E J , GILMOUR C C , RODEN E , et al. Mercury methylation by dissimilatory iron-reducing bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2006 , 72(12) : 7919-7921.
- [19] HAMELIN S P , AMYOT M , BARKAY T , et al. Methanogens: Principal methylators of mercury in Lake Periphyton [J]. *Environmental Science & Technology* , 2011 , 45(18) : 7693-7700.
- [20] SCHAEFER J K , KRONBERG R M , MOREL F M M , et al. Detection of a key Hg methylation gene , *hgcA* , in wetland soils [J]. *Environmental Microbiology Reports* , 2014 , 6(5) , 441-447.
- [21] EKSTROM E B , MOREL F M M , BENOIT J M. Mercury methylation independent of the acetyl-coenzyme a pathway in sulfate-reducing bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2003 , 69(9) : 5414-5422.
- [22] 蓝世明. Fe(II) 对硫酸盐还原菌处理锑污染的影响[D]. 长沙: 湖南大学, 2018.
LAN S M. Bio-precipitation of antimony from wastewater by sulfate-reducing bacteria: effect of coexisting ferrous ion [D]. Changsha: Hunan University , 2018: 31(in Chinese) .
- [23] HAN S , OBRAZTSOVA A , PRETTO P , et al. Sulfide and iron control on mercury speciation in anoxic estuarine sediment slurries [J]. *Marine Chemistry* , 2008 , 111(3-4) : 214-220.
- [24] MEHROTRA A S , SEDLAK D L. Decrease in net mercury methylation rates following iron amendment to anoxic wetland sediment slurries [J]. *Environmental Science & Technology* , 2005 , 39(8) : 2564-2570.
- [25] LIN H , MORRELL-FALVEY J L , RAO B , et al. Coupled mercury-cell sorption , reduction , and oxidation affecting methylmercury production by *Geobacter sulfurreducens* PCA [J]. *Environmental Science & Technology* , 2014 , 48 , 11969-11976.
- [26] RAMAMOORTHY S , CHENG T C , KUSHNER D J. Effect of microbial life stages on the fate of methylmercury in natural waters [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* , 1982 , 29(2) : 167-173.
- [27] BISWAS A , BROOKS S C , MILLER C L , et al. Bacterial growth phase influences methylmercury production by the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 [J]. *Science of the Total Environment* , 2011 , 409(19) : 3943-3948.
- [28] HU H Y , LIN H , ZHENG W , et al. Oxidation and methylation of dissolved elemental mercury by anaerobic bacteria [J]. *Nature Geoscience* , 2013 , 6(9) : 751-754.