

红树林湿地希瓦氏菌 W3 的分离及腐殖质还原特性研究

吴鹏¹, 洪义国^{2*}, 顾继光¹, 殷波², 段舜山^{1*}

(1. 暨南大学水生生物研究所, 广州 510632; 2. 中国科学院南海海洋研究所热带海洋环境动力学重点实验室, 广州 510301)

摘要: 从红树林湿地沉积物中分离到 1 株具有腐殖质还原能力的菌株 W3, 通过细胞形态、生理生化以及 16S rDNA 的分子生物学亲缘关系分析方法, 确定该菌为希瓦氏菌属, 命名为 *Shewanella* sp. W3. W3 菌能够利用乳酸钠、甲酸钠和丙酮酸钠作为电子供体进行腐殖质还原, 在 48 h 内对 1 mmol/L AQDS 的还原率分别为 96%、40% 和 10%. 另外, 菌体的生长与 AQDS 还原表现出相同的趋势, 菌体数在 60 h 达到最大值, 约为 1.77×10^8 CFU/mL, 比初始接种值约增殖了 100 倍, 而未添加乳酸钠实验组的基本没有观察到 AQDS 的还原和菌体的增长. 该菌进行腐殖质还原的最适 pH 范围为 7~9, 最适的 NaCl 浓度范围为 5~30 g/L, 而最适温度范围为 30~35℃. 实验结果表明, 该菌的腐殖质还原过程是生物化学反应过程, 且能够在还原腐殖质的同时偶联能量的产生, 支持菌体的生长. 推测具有腐殖质还原的希瓦氏菌在元素的生物地球化学循环和环境微生物治理中具有潜在的应用价值.

关键词: 希瓦氏菌 W3; 腐殖质还原; 电子供体; 红树林湿地

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)04-1041-06

Isolation and Characterization of a Humic-Reducing Bacterium *Shewanella* Strain W3 from Mangrove Sediment

WU Peng¹, HONG Yi-guo², GU Ji-guang¹, Yin Bo², DUAN Shun-shan¹

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Key Laboratory of Tropical Marine Environment Dynamics (LED), South China Sea Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: A humus-reducing bacterium strain W3 was isolated from the mangrove sediment. Based on the analysis of morphology, physiobiochemical characteristics and 16S rDNA gene sequence, this strain was identified as *Shewanella* sp. W3. Strain W3 was able to reduce humic with lactate, formate and pyruvate as electron donor and the humic reduction rates to 1 mmol/L AQDS were 96%, 40% and 10% respectively within 48 hours. In addition, the bacteria can grow coupled with the humic reduction. Strain W3 grew to maximal density of 1.77×10^8 CFU/mL after complete reduction of 1 mmol/L AQDS. However, the growth of strain W3 was light increase in the control experiment in the absence of electron donor. The optimal initial pH, NaCl concentration, and temperature for strain W3 reducing humic were pH 7-9, 5-30 g/L, and 30-35℃, respectively. Combined experimental results showed that the humic reduction was a biochemical process and strain W3 could conserve energy to support growth from lactate oxidation coupled to humic reduction. It is suggested that humic reduction by *Shewanella* bacteria may play important roles in biogeochemical circulation of elements and have potential application in the microbial bioremediation to contaminations.

Key words: *Shewanella* sp. W3; humic reduction; electron donor; mangrove sediment

腐殖质是一种具有羰基结构的高分子量的芳香族聚合物, 它普遍存在于环境中, 在一些土壤中腐殖质可以占到总量的 10% 之多^[1]. 原来认为腐殖质在环境中极难被降解, 不能参与微生物的生理代谢过程, 但 Lovley 等^[2] 在 1996 年最早发现 *Geobacter metallireducens* 和 *Shewanella alga* 能够以腐殖质模式物蒽醌-2, 6-二硫酸(anthraquinone-2, 6-disulfonate, AQDS) 为唯一电子受体, 参与细菌的呼吸代谢, 且在电子传递的过程中, 形成跨膜的质子浓度梯度, 偶联能量的形成来支持菌体的生长, 并以此提出腐殖质呼吸(humic respiration) 的概念, 认为主要是醌类

基团起到电子受体的作用.

腐殖质还原菌在元素的生物地球化学循环中有着重要的作用, 目前分离出的腐殖质还原菌都能还原 Fe(III) 化合物^[3,4]. 甚至在微生物不能直接作用 Fe(III) 化合物的微小环境空间, 通过腐殖质, 菌体

收稿日期: 2009-06-29; 修订日期: 2009-09-10

基金项目: 中国科学院南海海洋研究所青年人才领域前沿项目(07SC011009); 国家自然科学基金项目(30800032, 40876074); 广东省自然科学基金项目(84510301001692)

作者简介: 吴鹏(1985~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物, E-mail: wupeng980521@163.com

* 通讯联系人, E-mail: yghong@scsio.ac.cn; tssduan@jnu.edu.cn

能够还原 Fe(III) 化合物,而且腐殖质可以作为电子传递体加快 Fe(III) 化合物的还原,这样即使在少量腐殖质存在而电子供体充分的情况下, Fe(III) 化合物可以源源不断地得以还原^[3].在水体及土壤环境中 Fe(III) 的还原是无机化合物生物地球化学循环中最为重要的^[2,5],微生物的 Fe(III) 还原能将结合在 Fe(III) 化合物上的微量金属元素和磷酸根释放出来,并且能进行 Fe(III) 还原的微生物还可以利用其它的物质作为电子受体,例如: Mn(IV) 、 U(VI) 、 Co(III) 、 NO_2^- 、 NO_3^- 等,进而再影响这些物质的生物地球化学循环.

腐殖质还原菌在环境污染物的降解方面也有着重要的作用,腐殖质能够作为电子受体、电子供体和氧化还原中间体参与微生物的呼吸代谢^[6,7],并对多种环境污染物降解,如:酚类化合物^[8]、甲苯^[9,10]、氯乙烯^[11]、偶氮染料^[10,12]、 Cr(VI) 、 U(VI) 和 Te(VII) ^[13]等,所以研究腐殖质还原菌对于认识元素的生物地球化学循环和将腐殖质还原菌用于生物修复与生物治理具有重要的价值^[7].目前,在有机物含量丰富的沉积物、污染的土壤以及污水处理厂的活性污泥中发现多种细菌具有腐殖质还原的能力,主要包括 Fe(III) 还原菌(*Geobacter* spp.)、硝酸还原菌(*Shewanella putrefaciens*)、硫还原菌(*Desulfuromonas* spp.)、费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)、嗜热产甲烷球菌(*Methanococcus thermolithotrophicus*)^[14].

红树林为自然分布于热带、亚热带海岸潮间带的湿地植物群落,它具有重要的生态功能、服务功能、水文和化学功能^[15].其间大量的动植物凋落物中有一部分仍留在群落中,再加上上游有机物的输入,使得红树林沉积物形成高腐殖质的厌氧还原环境^[16,17].然而,关于微生物腐殖质还原在红树林生态系统中的功能鲜见报道.本实验从红树林中分离出 1 株腐殖质还原菌,经鉴定为 *Shewanella* sp.,并对其的腐殖质呼吸特征进行了分析,这将对腐殖质还原菌的认知具有重要的生态学意义,并为该菌的工程运用提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 培养基

APW 液体培养基:每 L 含 5 g NaCl,0.67 g KCl,2.5 g NaHCO_3 ,0.1 g NH_4Cl ,0.01 g KH_2PO_4 ,0.02 g 酵母抽提物,少量维生素和微量元素^[18],并加入定量的电子供体和定量的电子受体. APW 固体

培养基:在上述液体培养基中加入 18 g/L 的琼脂(Difco Lab, Detroit, Michigan, USA). LB 液体培养基:每升含胰蛋白胨 10 g,酵母抽提物 5 g, NaCl 5 g. LB 固体培养基:在上述的 LB 液体培养基中添加 18 g/L 的琼脂.另外,所有的培养基和试剂均采用 121℃ 高压蒸汽灭菌.

1.2 主要试剂和仪器

PCR 扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司,离心柱型(普通)DNA 产物纯化试剂盒购自 TIANGEN 公司.细菌 16S rDNA 通用引物 F27(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')和 R1492(5'-TACGGTTACCTGTACGACTT-3')由 Invitrogen 公司合成. AQDS 为分析纯,购于 SIGMA 公司.其它试剂均为分析纯.

Bugbox 厌氧工作站(Ruskinm),UV2100 型分光光度计(上海尤尼柯公司),ZhJH-C1109B 超净工作台(上海智诚公司),Denville 260D 离心机(Denville Scientific Inc.),PTC-200 thermal cycler(MJ Research),FA1104 电子天平(上海精密科学仪器有限公司).

1.3 厌氧培养法

通过一个装有细菌过滤器(0.20 μm 过滤膜)的塑胶管将 N_2 充入到血清瓶中,通气 5~6 min 后,迅速盖上密封盖,并缠上密封膜后置于 Bugbox 厌氧工作站中,32℃ 静置厌氧培养.

1.4 菌种的富集与分离

取 2 g 红树林泥样(取自香港米埔)加入到装有 25 mL APW 液体培养基的血清瓶中,并加入 5 mmol/L 乳酸钠作为电子供体和 2 mmol/L AQDS 作为唯一电子受体,按上述厌氧培养方法培养.待培养液由浅红色转变为深橙色时,取 0.5 mL 富集的菌液转移到装有 25 mL 新鲜液体 APW 培养基(含 5 mmol/L 乳酸钠,2 mmol/L AQDS)的血清瓶中,32℃ 静置厌氧培养,连续转接 4 次.取最后富集培养的菌液到 APW 固体培养基中,采用涂布平板挑取单菌落的方法获得纯培养菌,涂片镜检后接种于 LB 斜面培养基上.同时分别检测获得的菌落能否还原 1 mmol/L AQDS,最终筛选出 1 株具有腐殖质还原能力的菌株,命名为 W3.

1.5 16S rDNA 序列分析与系统发育树构建

取对数生长期的新鲜菌液,离心收集菌体,按文献[19]方法提取基因组总 DNA.采用细菌 16S rDNA 通用引物 F27 和 R1492 进行 16S rDNA 扩增.扩增体系为:10 × PCR buffer 2.5 μL ,模板 1 μL ,上、下游引物各 0.5 μL ,dNTP 2 μL ,Taq 酶 0.2

μL , 无菌水:18.3 μL , 总体积共 25 μL . PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s;55℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 1 min;共 30 个循环;最后72℃ 终延伸 10 min,4℃ 保存. PCR 产物直接进行测序(ABI Prism 3730 DNA analyzer).在 NCBI 中利用 Blast 软件与 GenBank 中已知的 16S rDNA 序列进行同源性比较,选取同源性较高的序列,利用 MEGA 4.0 系统进化分析软件的邻接法(neighbor joining, NJ)^[20]进行系统发育树构建.

1.6 菌株对不同电子供体的利用分析

取一定量在 LB 培养基中活化并处于对数生长期的 W3 菌,离心(6 000 r/min,10 min),后用 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液(pH=7.4)清洗菌体 2 遍,并重悬于同体积的磷酸缓冲液中,实验中取 0.1 mL 菌液加入到装有 25 mL APW 液体培养基的血清瓶中,并分别加入不同量的电子供体:乳酸钠 5 mmol/L、甲酸钠 5 mmol/L、丙酮酸钠 5 mmol/L、葡萄糖 0.5 mmol/L、酵母粉 1 g/L、甲醇 5 mmol/L、乙酸钠 5 mmol/L,且各添加 1 mmol/L AQDS 为唯一电子受体.通氮气后,在厌氧工作站中 32℃ 静置厌氧培养,隔 48 h 后,测其还原态 AQDS 的转化量,以其最大吸收峰的吸光度值(D_{450})来反映,以不加电子供体的培养基和经过高压灭活的菌体培养基为对照.

1.7 腐殖质还原偶联菌体生长的动力学分析

按上述操作,取 0.1 mL 的 W3 菌液分别接入到 7 瓶 APW 培养基(含 5 mmol/L 乳酸钠,1 mmol/L AQDS)中,通氮气后,在厌氧工作站中 32℃ 静置厌氧培养,每隔 12 h 取样,一部分测其还原态 AQDS 的转化量,以其最大吸收峰的吸光度值来反映,一部分采用梯度稀释平板计数法计算血清瓶中菌体的浓度(CFU/mL).同样的操作,以不加电子供体乳酸钠做为对照.

1.8 不同条件对 W3 腐殖质还原的影响

在 APW 培养基中接入 W3 菌,以 5 mmol/L 乳酸钠为电子供体,1 mmol/L AQDS 为唯一电子受体,实验设定不同 pH、NaCl 浓度及温度对腐殖质还原的影响,隔 48 h 测其腐殖质还原的量以考察菌体腐殖质还原的最适条件.

2 结果与讨论

2.1 W3 菌的分离、鉴定和系统进化分析

通过富集和反复分离培养后,取菌液涂布在 APW 固体培养基上,待平板长出菌落后,挑取数个菌落,分别进行检测,最终分离出 1 株具有腐殖质还

原能力的菌株,命名为 W3.该菌经革兰氏染色为阴性菌,在 LB 固体培养基平板上培养 24 h 后,菌落形态为圆形,表面光滑,边缘齐整,初期无色,后期转变为淡黄色,半透明,表面有光泽,菌落直径约为 2~3 mm.采用 BLAST 将菌株 W3 1405 bp 的 16S rDNA 基因序列(GenBank 登录号:GQ280385)与典型的希瓦氏菌种在 GenBank 中的基因序列进行比对,结果发现菌株 W3 的 16S rDNA 与已鉴定各种希瓦氏菌有较高的同源性,其中与 *Shewanella haliotis*、*Shewanella alga*、*Shewanella sairae*、*Shewanella marinintestina* 和 *Shewanella decolorationis* 的同源性分别为 100.0%、98.8%、94.6%、94.6% 和 94.7%.根据菌株 W3 的 16S rDNA 序列与希瓦氏菌属其它菌株的 16S rDNA 序列做出系统进化树,结果如图 1.可以看出,W3 菌株与 *Shewanella haliotis* 关系最近.综合上述的形态、生理生化与 16S rDNA 分析,鉴定该菌株为希瓦氏菌属细菌,命名为 *Shewanella* sp. W3.

2.2 电子供体对 W3 菌的腐殖质还原的影响

图 2 的实验结果表明:与未加电子供体的实验组相比较,经 t 检验,发现 W3 菌能显著利用乳酸钠、甲酸钠、丙酮酸钠、酵母粉($p < 0.01$),而仅能少量利用乙酸钠($0.01 < p < 0.05$),但不能利用葡萄糖和甲醇($p > 0.05$),这说明 W3 菌的腐殖质还原是一个依赖电子供体存在的过程.在 48 h 内,乳酸钠、甲酸钠和丙酮酸钠作为电子供体 W3 菌对 1 mmol/L AQDS 的还原率分别达到 96%、40% 和 10%.其中 W3 菌能少量利用乙酸钠作为电子供体的发现与 Coates 等^[4]认为的希瓦氏菌属不能利用乙酸钠作为电子供体有所不同.实验还发现,加入通过高压灭活的菌体,即使存在电子供体的情况下,AQDS 仍然不发生还原,这说明 W3 菌的腐殖质还原是一个生物化学反应过程,而不是纯化学过程.不同的腐殖质还原菌对电子供体的利用情况不同. Coates 等^[4]从海洋底泥分离出的 4 种 *Desulfuromonas* spp. 菌都能利用乙酸钠作为电子供体,而不能利用乳酸钠.一些腐殖质还原菌甚至能利用环境污染物作为电子供体,Bradley 等^[11]最先发现有机污染物氯乙烯和二氯乙烯可以作为电子供体偶联腐殖质的还原.

2.3 W3 腐殖质还原与菌体生长偶联动力学特征

将 W3 菌接入到只有 AQDS 为唯一电子受体和乳酸钠为唯一电子供体的 APW 液体培养基中厌氧培养,每隔 12 h 取样,测其菌体生长及 AQDS 还原

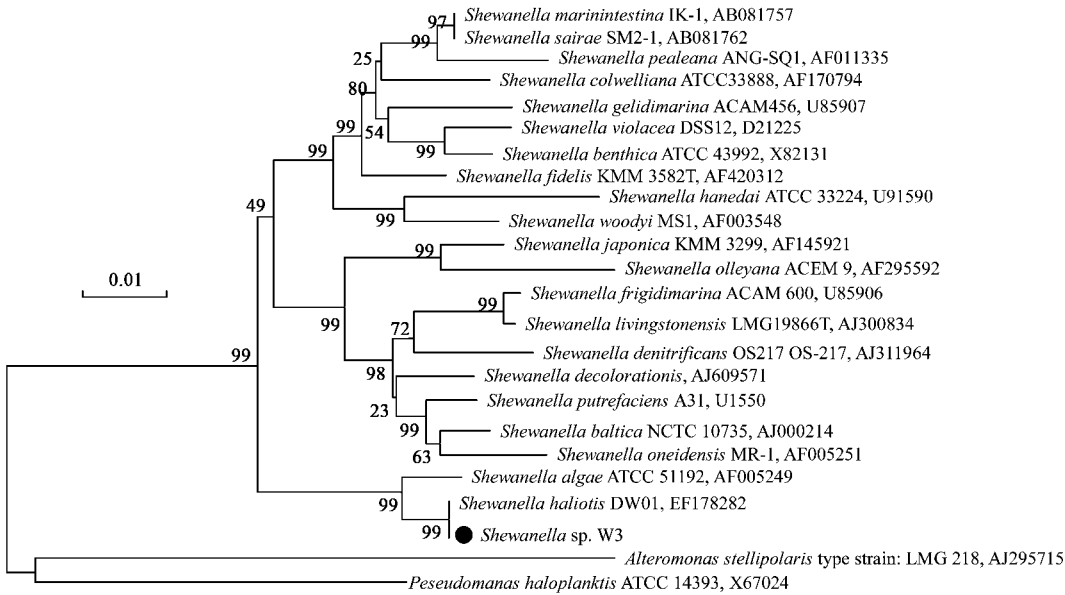


图 1 基于 16S rDNA 为基础的菌株 W3 的系统进化树分析
Fig. 1 Phylogenetic analysis of strain W3 based on 16S rDNA

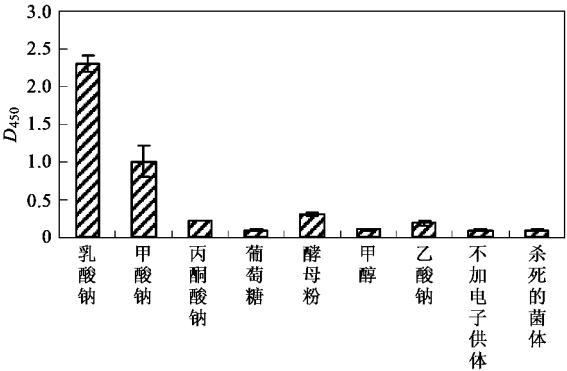


图 2 菌株 W3 的腐殖质还原对不同电子供体的利用情况
Fig. 2 Electron donors used by strain W3 for humic reduction

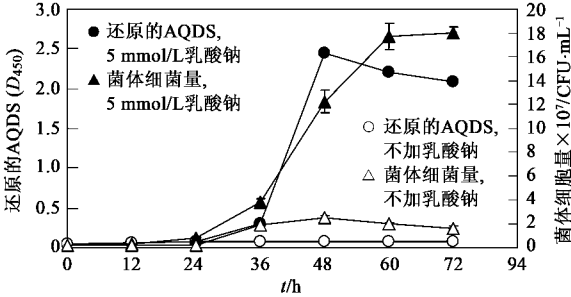


图 3 菌株 W3 腐殖质还原偶联菌体生长的动力学分析
Fig. 3 Kinetics of the growth of strain W3 coupled to the AQDS reduction

的情况(图 3)。结果发现:添加乳酸钠实验组,在反应开始的 24 h 内菌体对 AQDS 没有明显还原;但在 24 ~ 48 h 内,培养液中的 AQDS 迅速被还原,并且在 48 h 时还原态的 AQDS 在其最大吸收峰 450 nm 处的吸光值达到最大为 2.45;在随后的时间基本保持在 2.0 ~ 2.5 的范围内变化。与此同时,在添加乳酸钠的培养液中,菌体的生长与 AQDS 还原表现出相同的趋势,菌体在前 24 h 内没有表现出明显的增长;在 24 ~ 60 h 内,菌体处于对数生长期,菌体数在 60 h 达到最大值,约为 1.77×10^8 CFU/mL,比初始接种值约增殖了 100 倍。相比未添加乳酸钠的实验组,在 72 h 内,培养液中的 AQDS 均没有观察到被还原。并且未添加乳酸钠实验组的菌体增值也较小,最大只有 2.46×10^7 CFU/mL,只比初始接种数增

殖了 13.8 倍,这可能与培养液中添加少量的酵母粉有关。以上结果表明,在厌氧条件下 W3 菌在还原 AQDS 的同时,偶联电子供体的氧化获得能量,支持了菌体生长。

而以往一些研究发现,有些菌可能能够还原腐殖质但不能支持菌体的生长^[6],如: *Archaea*、*Deinococcus radiodurans*、*Propionibacterium freudenreichii*、*Enterococcus cecorum* 以及 *Lactococcus lactis* 等。细菌之所以能还原腐殖质的同时支持菌体生长的原因是:腐殖质模式物(AQDS)作为末端电子受体接受电子供体提供的电子,该电子通过呼吸电子传递链在菌体细胞膜上传递给腐殖质物质,腐殖质接受电子被还原,而电子在细胞膜传递的过程中,形成跨膜的质子浓度电势梯度,从而偶联能量的形成来支持菌体的生长^[2,10]。许志诚等^[14]通过典型

呼吸链抑制剂,诸如抑制 Fe-S 中心的 Cu^{2+} 、甲基萘醌类似物标桩菌素、抑制甲基萘醌氧化型向还原型转化的双香豆素和细胞色素 P_{450} 的专一抑制物甲吡酮,发现这些呼吸抑制剂对腐殖质的还原有着显著的抑制作用,进一步说明腐殖质呼吸与呼吸电子传递链密切相关。

该菌的腐殖质还原偶联菌体生长的特性结合上述所说的能够利用多种电子供体的特性,为开发以该菌电子传递链为基础的生物降解有重要的实践意义。

2.4 影响 W3 菌腐殖质还原的环境条件因素

在 NaCl 浓度为 5 g/L,温度为32℃的条件下,用 1 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L 的 HCl 调节培养液 pH,

通过实验发现,W3 菌进行腐殖质还原的最适 pH 为 9.0。W3 菌在 pH 为 6.0~9.0 范围都能很好地还原腐殖质[图 4(a)];在 pH = 5.0 和 pH = 10.0 时,腐殖质基本不还原。在 5~30 g/L NaCl 浓度范围内(pH 8.5,温度32℃),培养 48 h 后,W3 菌均对腐殖质的还原很好;当 NaCl 浓度 > 30 g/L 时,随着 NaCl 浓度的增加,W3 菌对腐殖质的还原效果大大降低[图 4(b)]。在 NaCl 浓度为 15 g/L,pH 为 8.5 的条件下,腐殖质还原的最适温度范围为 30~35℃[图 4(c)];当温度为 25℃和 40℃时,W3 菌都基本不能还原腐殖质。该菌的最适温度范围较小,这可能与它的生境——在香港红树林终年在 25~30℃的水温中长期适应有关。

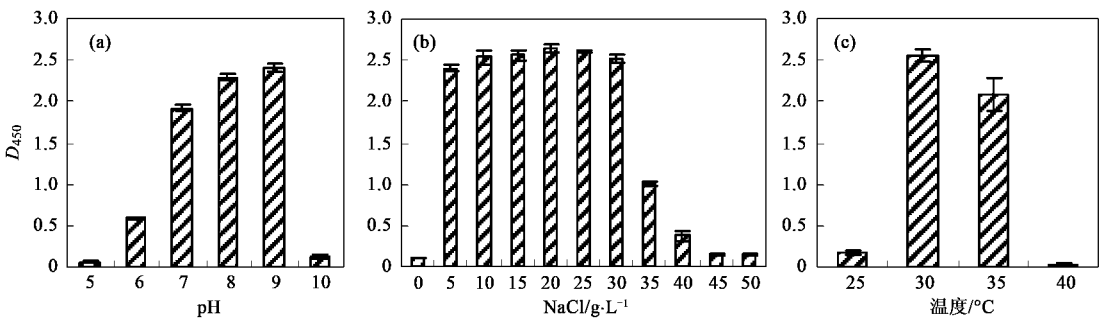


图 4 影响 W3 菌腐殖质还原的环境条件因素
Fig. 4 Effects of environmental factors on the humic reduction of strain W3

除了本研究分离的 W3 菌外,*Shewanella cinica* D14^{T101}、*Shewanella baltica* DSM939^{T101}、*Shewanella putrefaciens* DSM6067^{T101}、*Shewanella alga*^[2]、*Shewanella saccharophila*^[3]、*Shewanella putrefaciens* DK-1^[21]、*Shewanella olleyana*^[22]都能进行腐殖质还原,因而推测希瓦氏菌属是一类普遍具有腐殖质还原能力的菌属。而在红树林中,希瓦氏菌属的分离报道很少。但是红树林沉积物高腐殖质的厌氧环境却为希瓦氏菌的生长和腐殖质还原过程创造了必要的环境条件。腐殖质具有容易结合疏水和亲水的物质的能力^[7],这对于探讨希瓦氏菌利用腐殖质进行转化重金属离子和降解疏水性环境污染物有着非常重要的作用,这也将对进一步认识红树林在污染物修复方面发挥着重要的生态功能提供重要信息。未来的研究可以探讨红树林中细菌的腐殖质还原过程与 Fe(Ⅲ)还原、硝酸还原、亚硝酸还原、脱卤还原之间的相互作用关系,这对于认识细菌呼吸在红树林生态系统物质的生物地球化学循环有重要的

生态意义。

3 结论

- (1)首次从红树林泥样中分离到 1 株具有腐殖质还原能力的菌株 W3。综合其形态特征、生理生化特征以及 16S rDNA 的分子生物学亲缘关系分析,确定该菌为希瓦氏菌属成员,定名为 *Shewanella* sp. W3。
- (2)在厌氧条件下,W3 菌能够利用乳酸钠、甲酸钠和丙酮酸钠做为电子供体进行腐殖质还原,并且 W3 菌能够在还原腐殖质的同时偶联能量的产生,支持菌体的生长,表明 W3 菌以腐殖质物质做为电子受体进行呼吸是一个生物化学反应过程。
- (3)该菌进行腐殖质还原的最适 pH 范围为 7~9,最适的 NaCl 浓度范围为 5~30 g/L,而最适温度范围为 30~35℃。推测希瓦氏菌属是一类普遍具有腐殖质还原能力的菌属,其腐殖质还原在红树林生态系统的物质循环和有毒污染物的降解中发挥一定作用。

参考文献：

[1] Coates J D , Cole K A , Chakraborty R , *et al.* Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration[J]. Appl Environ Microbiol ,2002 ,**68**(5) :2445-2452.

[2] Lovley D R , Coates J D. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration[J]. Nature ,1996 ,**382** :445-448.

[3] Lovley D R , Fraga J L , Blunt-Harris E L , *et al.* Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction [J]. Acta Hydrochim Hydrobiol ,1998 ,**26** (3) :152-157.

[4] Coates J D , Ellis D R , Roden E , *et al.* Recovery of humics-reducing bacteria from a diversity of sedimentary environments [J]. Appl Environ Microbiol ,1998 ,**64**(4) :1504-1509.

[5] Finneran K T , Forbush H M , Gaw VanPraagh C V , *et al.* *Desulfitobacterium metallireducens* sp. nov. , an anaerobic bacterium that couples growth to the reduction of metals and humic acids as well as chlorinated compounds[J]. Int J Syst Evol Microbiol ,2002 ,**52** :1929-1935.

[6] Perminova I V , Hatfield K , Hertkorn N. Use of humic substances to remediate polluted environments :from theory to practice[M]. Amsterdam :Springer ,2005. 343-352.

[7] Hong Y G , Gu J D. Bacterial anaerobic respiration and electron transfer relevant to the biotransformation of pollutants[J]. Intern Biodeter Biodegrad ,2009 ,**63**(8) :973-980.

[8] Cervantes F J , Van der Velde S , Lettinga G , *et al.* Quinones as terminal electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of phenolic compounds[J]. Biodegradation ,2000 ,**11** :313-321.

[9] Cervantes F J , Dijkstra W , Duong-Dac T , *et al.* Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors [J]. Appl Environ Microbiol ,2001 ,**67**(10) :4471-4478.

[10] Hong Y G , Guo J D , Xu Z , *et al.* Humic substances act as electron acceptor and redox mediator for microbial dissimilatory azoreduction by *Shewanella decolorationis* S12[J]. J Microbiol Biotech ,2007 ,**17**(3) :428-437.

[11] Bradley P M , Chapelle F H , Lovley D R. Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloromethane[J]. Appl Environ Microbiol ,1998 ,**64**(8) :3102-3105.

[12] Van der Zee F P , Bouwman R H M , Strik D P , *et al.* Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors [J]. Biotechnol Bioeng ,2001 ,**75**(6) :691-701.

[13] Fredrickson J K , Kostandarites H M , Li S W , *et al.* Reduction of Fe(III) , Cr(VI) , U(VI) and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1[J]. Appl Environ Microbiol ,2000 ,**66**(5) :2006-2011.

[14] 许志城 ,洪义国 ,罗微 ,等. 中国希瓦氏菌 D 14^T 的厌氧腐殖质呼吸[J]. 微生物学报 ,2006 ,**46**(6) :973-978.

[15] 辛琨 ,黄星 ,洪美玲 ,等. 红树林生态系统服务功能价值分析与评价[J]. 生态经济 ,2009 ,**3** :140-142.

[16] 林鹏 ,陈荣华. 九龙江口红树林对汞的循环和净化作用[J]. 海洋学报 ,1989 ,**11**(2) :242-247.

[17] Lyimo T J , Pol A , Op den Camp H J M , *et al.* *Methanosarcina semesiae* sp. nov. , a dimethylsulfide-utilizing methanogen from mangrove sediment[J]. Int J Syst Evol Microbiol ,2000 ,**50** :171-178.

[18] Wolin E A , Wolin M J , Wolfe R S. Formation of methane by bacterial extracts[J]. J Biol Chem ,1963 ,**238**(8) :2882-2886.

[19] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual[M]. (3rd ed). New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,2001.

[20] Tamura K , Dudley J , Nei M , *et al.* MEGA4 : Molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution ,2007 ,**24** :1596-1599.

[21] Lee I G , Kim S J , Ahn T Y. Inhibitory effect of nitrate on Fe (III) and humic acid reduction in *Shewanella putrefaciens* DK-1 [J]. J Microbiol ,2000 ,**38**(3) :180-182.

[22] Skerratt J H , Bowman J P , Nichols P D. *Shewanellaolleyana* sp. nov. , a marine species isolated from a temperate estuary which produces high levels of polyunsaturated fatty acids[J]. Int J Syst Evol Microbiol ,2002 ,**52** :2101-2106.