

國立臺灣大學理學院地質科學系暨研究所

碩士論文

Department of Geosciences

College of Science

National Taiwan University

Master Thesis

溫度調控微生物硫酸還原作用之硫同位素分化研究：  
以 *Thermodesulfobacterium* 與 *Desulfovibrio* 菌株為例  
Temperature controls of the sulfur isotope fractionation  
during sulfate reduction by *Thermodesulfobacterium* and  
*Desulfovibrio* strains

孫嘉璘

Chia-Lin Sun

指導教授：林立虹 博士 Li-Hung Lin, Ph.D.

王珮玲 博士 Pei-Ling Wang, Ph.D.

中華民國 101 年 1 月

January, 2012

國立臺灣大學（碩）博士學位論文  
口試委員會審定書

溫度調控微生物硫酸還原作用之硫同位素分化研究：  
以 *Thermodesulfobacterium* 和 *Desulfovibrio* 菌株為例

Temperature controls of the sulfur isotope fractionation  
during sulfate reduction by *Thermodesulfobacterium* and  
*Desulfovibrio* strains

本論文係孫嘉璘君 (R98224207) 在國立臺灣大學地質科學系暨  
研究所完成之碩士學位論文，於民國 101 年 1 月 19 日承下列考試委  
員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

 (指導教授)







系主任、所長

(簽名)

## 致謝

能夠完成一本論文並不容易，開始寫致謝更是千頭萬緒，兩年半的過程中受到太多協助和鼓勵，感謝之意溢於言表。最感謝的莫過於兩位指導教授王珮玲和林立虹老師，不論是在實驗或是生活上遇到的難題，總是給我支持與鼓勵，謝謝老師的耐心與協助，真的很幸運可以成為兩位老師的指導學生。感謝海研所林曉武老師和朱美妃老師抽空參與碩士論文口試，提供許多寶貴建議使論文更加完整。

感謝實驗室的大家，謝謝小靜在寫論文這段時間的陪伴，不但幫助我進行硫同位素的分析，還給我許多論文上的建議，幫我抒發煩悶緊張的心情。謝謝玫錦作為我的趴呢，陪伴我度過許多做實驗的夜晚和不開心的時刻。謝謝婷文、文瑜、永欣、季融、小英學姐、興麟學姐、韻如、劭璿、宛玲、369、韋萱、哲維和哲銘在實驗上和論文過程中給我的幫助和滿滿的關懷。謝謝佳靜、悅婷和光忻在我一開始進入實驗室時帶領我進行實驗。謝謝 Jeff 幫助我進行硫同位素分析，讓我有初步的資料。總之，在實驗室的日子謝謝大家的陪伴與幫助，因為有你們做實驗的時光並不孤單。

感謝在成大認識的大家，謝謝小花做我的室友和在台北奮鬥的戰友，謝謝佩萱、皓安和佩芳等人總是的給我鼓勵和安慰。感謝由聖總是做我情緒的垃圾桶，接受我最直接的情緒，但仍不厭其煩的給我鼓勵和建議。最後感謝我最親愛的家人，謝謝你們不論如何都陪在我身邊，認為我是最好的。因為你們，讓我更加勇敢和堅強。

碩士過程中的收穫和成長也許未必能完全表現在此本論文中，但卻是最值得珍藏的部分。

## 摘要

硫酸還原菌會將海水中硫酸鹽還原成硫化氫，最終形成黃鐵礦被保存在沈積物中，而硫酸鹽還原過程中同時伴隨有機物的氧化分解，因此硫酸還原作用被視為影響碳-硫-鐵循環的重要過程之一。由於硫酸還原菌所進行的硫酸還原作用造成硫同位素的分化，且分化程度與環境因子有關，因此地質記錄中硫酸鹽類礦物沈澱與沈積型黃鐵礦的硫同位素成份可提供重要的地球環境變動訊息。

硫酸還原菌造成硫同位素分化程度差異的原因仍然不清楚，可能與物種差異和細胞硫酸鹽還原速率有關，或是受到溫度、硫酸鹽濃度和電子供應者等因素所影響。為解釋複雜的分化情形，前人提出細胞內部代謝步驟的概念模型，並加入質量流的計算，用以推估微生物代謝過程對硫同位素分化程度的影響，其中硫酸鹽進出細胞的通量與細胞內部硫酸鹽轉換的通量是影響硫同位素分化程度的重要因子。

本研究利用培養嗜熱菌 *Thermodesulfobacterium commune* 接近株與嗜溫菌 *Desulfovibrio gigas* 探討溫度如何影響硫酸還原菌的生理代謝，並進而影響硫同位素的分化程度。*Thermodesulfobacterium commune* 接近株的培養溫度範圍為 34-79 °C，最適生長溫度為 72 °C，而最高細胞硫酸還原速率發生在 77 °C，其同位素分化範圍在 8.2-31.6 ‰ 之間，在大多數培養溫度下硫同位素分化在 8.2—18.9 ‰ 之間上下變動，僅在 68 °C 出現一高值。*Desulfovibrio gigas* 的培養溫度範圍為 10-41 °C，最適生長溫度為 33 °C，而最高細胞還原速率發生在 41 °C，其同位素分化範圍在 10.3-29.7 ‰ 之間，最大分化程度出現在最高溫以及最低溫的培養，而最小分化程度則出現在中間溫度。兩菌株所產生的分化範圍與前人研究相近，但與同種屬菌株相比則其最大分化皆大於前人研究結果，顯然菌株培養的條件不同便會造成同位素分化程度的不同。此外，此二菌株之分化程度隨溫度的變化趨勢並不相同，其變化並不符合前人根據細胞生理特性隨溫度變化之理論分

化模型。將多重硫同位素分析結果與前人模式所建立的多重硫同位素分化網格比較，顯示該網格並無法包絡本研究的分析結果，表示前人模式所建立的多重硫同位素分化網格仍須重新檢討。

綜合上述討論可知，微生物硫酸鹽還原作用造成的硫同位素分化程度雖已有各種實驗觀察和模型加以解釋，但仍有諸多不一致的分析結果，其中溫度雖為單一環境因子，但對菌株的生理學特性可能並無系統性的影響，也因此難以預測其造成硫同位素分化的程度變化。未來若能結合不同菌株之生理學特性對於環境因子的反應與多重硫同位素分析，將可更進一步探討硫同位素分化程度與硫酸還原菌之特定生長條件之間的關係。

關鍵字：硫酸還原菌、硫同位素分化、生長溫度



## Abstract

Microbial sulfate reduction is a major mechanism driving anaerobic mineralization of organic matter in global ocean. While sulfate-reducing prokaryotes are well known to fractionate sulfur isotopes during dissimilatory sulfate reduction, unraveling the isotopic composition of sulfur-bearing minerals preserved in sedimentary records could provide invaluable constraints on the evolution of seawater chemistry and metabolic pathways. Variations in sulfur isotope fractionations are partly due to inherent differences among species and also affected by environmental conditions (e.g. sulfate abundance and temperature). Sulfur isotope fractionations caused by microbial sulfate reduction have been interpreted to be caused by a sequence of enzyme-catalyzed kinetic isotope fractionation steps. The fractionation factor mainly depends on (1) the sulfate flux into and out of the cell, and (2) the flux of sulfur compound transformation between the internal pools.

This study examined the multiple sulfur isotope fractionation patterns catalyzed by a thermophilic *Thermodesulfobacterium*-related strain and a mesophilic *Desulfovibrio gigas* over a wide temperature range. The *Thermodesulfobacterium*-related strain grew between 34 and 79 °C with an optimal temperature at 72 °C and the highest cell-specific sulfate reduction rate at 77 °C. The isotope fractionation ( $\epsilon^{34}\text{S}_{\text{sulfate-sulfide}}$ ) ranges between 8.2 and 31.6‰ with a maximum at 68 °C. The *D. gigas* grew between 10 and 45 °C with an optimal temperature at 30 °C and the highest cell-specific sulfate reduction rate at 41 °C. The isotope fractionation ranges between 10.3 and 29.7 ‰ with higher fractionations at both lower and higher temperatures. The isotope fractionation causing by these two strains is similar to previous reports, but the maximum fractionation is greater than that by the same species. Apparently, the differences in growth conditions may cause the different isotope fractionation. In addition, the change of fractionation with temperature is different for the two strains and cannot be predicted by a standard model considering physiological characteristics of cells. The result of multiple sulfur isotope measurements in this study cannot be described by a sulfate reduction network, which calculated the  $\Delta^{33}\text{S}$  and  $\delta^{34}\text{S}$  values by assuming the equilibrium fractionation among internal steps. Indeed, the sulfate reduction network has to be reevaluated.

Although there are many experiments and several models to study the sulfur isotope fractionation by microbial sulfate reduction, but the result is not conclusive. Temperature is one of the most important environmental factors, but it may not make systemic influence on the physiology of strains and also the isotope fractionation.

Further studies regarding physiological responses to environmental factors with the multiple sulfur isotope analysis may probably offer a linkage between sulfate isotope fractionation and growth conditions by sulfate reducing microorganisms.

Keyword: microbial sulfate reduction, sulfur isotope fractionation, growth temperature



# 目錄

口試委員會審定書.....	i
致謝.....	ii
摘要.....	iii
Abstract.....	v
目錄.....	vii
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xi
附表目錄.....	xii
第一章 緒論.....	1
1.1 硫的地球化學特性.....	1
1.2 海洋環境中硫循環與硫酸鹽異化還原作用.....	1
1.3 硫同位素之地質記錄與其重要性.....	3
1.4 硫酸還原菌造成硫同位素分化程度與其影響因素.....	5
1.4.1 硫酸鹽濃度與硫酸鹽還原速率.....	5
1.4.2 電子供應者.....	6
1.4.3 溫度.....	6
1.5 多重硫同位素分化係數.....	7
1.6 硫酸鹽異化還原作用與其分化模型.....	9
1.6.1 Rees 模型.....	10
1.6.2 Farquhar 模型.....	10
1.6.3 Brunner and Bernasconi 模型.....	12
1.7 研究動機與目的.....	13
第二章 研究方法.....	14
2.1 培養條件.....	14
2.2 溫度梯度反應槽 (thermal gradient block).....	15
2.3 細胞觀察.....	16
2.3.1 血球計數盤 (counting chamber).....	17
2.3.2 分光光度計 (spectrophotometer).....	17
2.4 硫酸鹽濃度測量.....	18
2.5 同位素分析樣本之前處理.....	18
2.5.1 硫酸鋇樣本.....	18
2.5.2 硫化銀轉換.....	19
2.6 氣相同位素比值質譜儀.....	21
2.7 多重硫同位素分析與操作.....	22
2.8 計算使用公式.....	23

2.8.1 細胞硫酸鹽還原速率 (cell-specific sulfate reduction rate).....	23
2.8.2 細胞生長速率 (specific growth rate).....	23
2.8.3 硫同位素分化計算.....	23
第三章 結果.....	24
3.1 細胞濃度與硫酸鹽濃度變化.....	24
3.2 細胞生長速率與細胞硫酸鹽還原速率.....	37
3.3 硫同位素分化.....	39
第四章 討論.....	42
4.1 細胞生理特性與溫度的關係.....	42
4.2 硫同位素分化與前人研究比較.....	42
4.3 細胞硫酸鹽還原速率與硫同位素分化的關係.....	43
4.4 溫度與硫同位素分化的關係.....	45
4.5 硫酸鹽還原作用之多重硫同位素分化模型.....	47
4.5.1 多重硫同位素分化網格計算方法.....	47
4.5.2 多重硫同位素分化網格的限制.....	50
4.5.3 多重硫同位素分化網格的擴充.....	54
4.6 利用多重硫同位素分化網格探討細胞新陳代謝之質量流.....	63
4.7 相關研究與未來工作.....	67
第五章 結論.....	68
參考文獻.....	69
附錄.....	72

## 圖目錄

圖 1-1、海洋沈積物中的硫循環.....	2
圖 1-2、不同時期硫酸鹽類蒸發岩與沈積岩中黃鐵礦的硫同位素成份.....	4
圖 2-1、溫度梯度反應槽.....	15
圖 2-2、細胞生長曲線.....	16
圖 2-3、硫化銀轉換之蒸餾系統.....	20
圖 3-1、 <i>D. gigas</i> 在 41 °C 和 39 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	25
圖 3-2、 <i>D. gigas</i> 在 36 °C 和 33 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	26
圖 3-3、 <i>D. gigas</i> 在 30 °C 和 27 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	27
圖 3-4、 <i>D. gigas</i> 在 24 °C 和 21 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	28
圖 3-5、 <i>D. gigas</i> 在 19 °C 和 16 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	29
圖 3-6、 <i>D. gigas</i> 在 13 °C 和 10 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	30
圖 3-7、 <i>T. commune</i> 接近株在 79 °C 和 77 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	31
圖 3-8、 <i>T. commune</i> 接近株在 72 °C 和 68 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	32
圖 3-9、 <i>T. commune</i> 接近株在 64 °C 和 60 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	33
圖 3-10、 <i>T. commune</i> 接近株在 55 °C 和 51 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	34
圖 3-11、 <i>T. commune</i> 接近株在 47 °C 和 45 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	35
圖 3-12、 <i>T. commune</i> 接近株在 40 °C 和 35 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化.....	36
圖 3-13、兩菌株之細胞生長速率與細胞硫酸鹽還原速率隨溫度的變化.....	38
圖 3-14、兩菌株產生之硫同位素分化 ( $^{34}\epsilon$ ) 隨溫度的變化.....	40
圖 3-15、兩菌株產生之 $\Delta^{33}\text{S}$ 值隨溫度的變化.....	41
圖 4-1、細胞硫酸鹽還原速率與硫同位素分化之間的關係.....	44
圖 4-2、不同 $f_3$ 和 $f_5$ 值與相對應分化大小的模型.....	46
圖 4-3、多重硫同位素分化網格.....	52
圖 4-4、不同溫度下之多重硫同位素分化網格.....	53
圖 4-5、 $^{33}\lambda$ 值改變對於網格的影響.....	58
圖 4-6、亞硫酸鹽轉化硫化物過程之分化大小對多重硫同位素網格的影響.....	59
圖 4-7、硫酸鹽轉化為亞硫酸鹽過程之分化大小對多重硫同位素網格的影響.....	60
圖 4-8、嗜熱菌 <i>T. commune</i> 接近株之多重硫同位素分化網格.....	61
圖 4-9、嗜溫菌 <i>D. gigas</i> 之多重硫同位素分化網格.....	62

- 圖 4-10、嗜溫菌 *D. gigas* 與嗜熱菌 *T. commune* 接近株之作圖結果 .....65
- 圖 4-11、*Desulfobacterium autotrophicum* 與 *Desulfovibrio gigas* 之作圖結果 ...66



## 表目錄

表 4-1、平衡分化作用之分化係數與溫度的關係 .....	51
表 4-2、建構分化網格使用之不同溫度的平衡分化係數 .....	51
表 4-3、不同 $^{33}\lambda$ 值對於 $^{33}\alpha_3$ 和 $^{33}\alpha_4$ 的影響 .....	57
表 4-4、分別調整 $^{34}\alpha_3$ 和 $^{34}\alpha_4$ 建構分化網格使用之分化係數 .....	57



## 附表目錄

附表一、 <i>D. gigas</i> 在不同溫度下之細胞濃度與硫酸鹽濃度隨時間變化.....	72
附表二、 <i>T. commune</i> 接近株在不同溫度下之細胞濃度與硫酸鹽濃度變化.....	80
附表三、兩菌株之細胞生長速率與硫酸還原速率.....	86
附表四、兩菌株之硫同位素分析資料.....	86
附表五、兩菌株之硫同位素分化計算結果.....	89



# 第一章 緒論

## 1.1 硫的地球化學特性

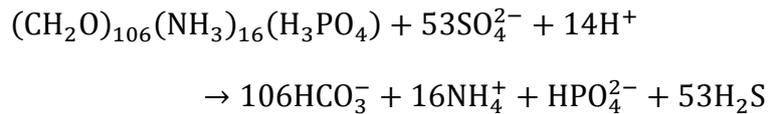
硫在自然界扮演重要的角色，不僅是地殼中重要的成分之一，所合成的蛋白質對所有的植、動物和細菌都相當重要。硫的氧化還原態可從 -2 價的硫化物 (sulfide) 到 +6 價的硫酸鹽 (sulfate)，在自然環境中主要以硫酸根離子 ( $\text{SO}_4^{2-}$ )、聚硫化物 ( $\text{S}_n^{2-}$ )、元素硫 ( $\text{S}_0$ ) 和硫化物 ( $\text{S}^{2-}$ ) 的形態存在，可形成多種有機或無機硫化合物。自然界中硫的儲存庫包括岩石圈、水圈、大氣圈與土壤圈，其中岩石圈與海水為主要的硫存庫。在海洋環境中的缺氧條件下，海水中的硫酸鹽會經由硫酸還原菌作用還原為硫化氫，為重要的生物地球化學作用之一。

## 1.2 海洋環境中硫循環與硫酸鹽異化還原作用

海洋環境為主要的硫儲存庫之一，其中的硫循環主要包含四個步驟：(1) 陸地上岩石與沈積物中的硫化物和硫酸鹽經過風化和淋溶作用形成溶解態的硫酸鹽，硫酸鹽經由河流運輸帶入海洋再進入海洋沈積物的孔隙水中，(2) 沈積物孔隙水中的硫酸鹽經由微生物作用還原形成硫化物，(3) 硫化物可能被氧化形成元素硫或是硫酸鹽而回到海水中，或是 (4) 與鐵氧化物反應形成黃鐵礦被保存在海洋沈積物中 (圖 1-1) (Jørgensen and Fenchel, 1974)。海洋沈積物內進行的微生物硫酸鹽還原作用不僅是轉變海水中硫酸鹽為硫化物的重要方式，海洋沈積物中超過百分之五十的有機碳也會經由微生物硫酸鹽還原作用氧化分解，提供微生物生存所需的能量 (Jørgensen, 1982)。黃鐵礦是微生物硫酸還原作用的產物，當保存在沈積岩中的黃鐵礦經過岩石循環被抬升至地表時，會與氧氣和水作用而被風化，產生硫酸鹽再度輸入海洋，因此微生物硫酸鹽還原作用不僅會影響硫循環，對於碳循環與大氣中的氧氣含量也具有一定程度的影響，所以被視為全球生物地球化學循環中重要的過程之一 (Berner, 1989; Canfield, 2004)。

微生物硫酸鹽還原作用由硫酸還原菌執行，硫酸還原菌廣泛的分布在含有硫

酸鹽的缺氧環境中，對於環境變化有很大的忍耐力，生存的溫度範圍可從 0 °C 到 100 °C 以上 (Jørgensen et al., 1992)，而鹽度則可從淡水 (freshwater) 到高鹽度 (hypersaline) 的環境 (Brandt et al., 2001)。硫酸還原菌的新陳代謝會將硫酸鹽還原形成硫化物並且伴隨有機物的氧化分解，過程中會交換八個電子產生能量，此過程稱為硫酸鹽異化還原作用 (Dissimilatory sulfate reduction)，反應如下式。



硫酸鹽異化還原作用會造成反應物與產物之間硫同位素成分的差異，產生硫同位素分化，因此硫酸鹽異化還原作用造成海洋中的硫酸鹽與沈積物中的黃鐵礦之間硫同位素成份的差異，留在地質記錄中的此一變化被視為了解早期地球環境變化的重要依據。

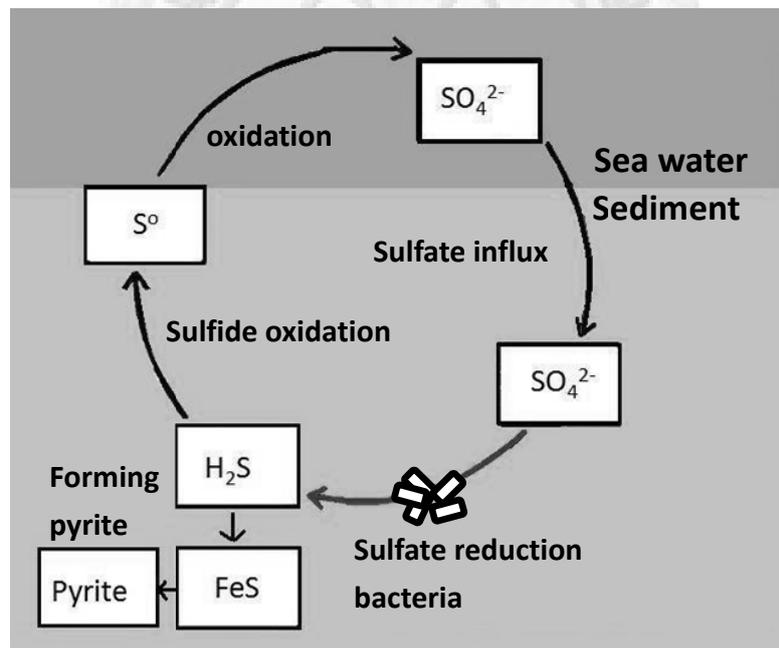


圖 1-1、海洋沈積物中的硫循環。說明請見內文 (修改自 Jørgensen and Fenchel, 1974)。

### 1.3 硫同位素之地質記錄與其重要性

沈積岩中含硫礦物的硫同位素組成與地球環境的氧化還原狀態有關，因此利用長時間尺度的硫同位素地質記錄可以推測早期地球環境的變動 (Canfield and Teske, 1996; Habicht et al., 2002)。圖 1-2 為不同時期沈積的硫酸鹽與沈積岩中黃鐵礦的硫同位素成份紀錄，依照硫同位素的變化情形可以將過去的地球環境分為三個時期(圖中以虛線將三時期分隔)，分別為 24 億年前、24 億年到 9 億年之間和 9 億年前到現今。

第一時期沈積型黃鐵礦的硫同位素組成變化很小，硫酸鹽和黃鐵礦的硫同位素成份的最大差異小於 10‰，此時地表環境的硫主要來自火山噴發與熱液作用所釋出進入大氣與海洋中的硫化氫 (H<sub>2</sub>S) 和二氧化硫 (SO<sub>2</sub>)，硫同位素的分化可能受控於無機作用或是微生物硫酸還原作用。若是無機作用導致的同位素分化則發生溫度需要高於 200 °C，顯然與沈積環境中的溫度條件不同，此外有證據顯示在 3450 百萬年前硫酸還原菌就已經出現，因此推測此時期的硫同位素分化與微生物作用有關 (Shen et al., 2001)。經由微生物作用若僅產生 10‰ 的硫同位素分化，表示當時硫酸鹽異化還原作用是在低硫酸鹽濃度下進行 (硫酸鹽濃度小於 200 μM) (Habicht et al., 2002)，因此藉由太古宙記錄的硫同位素變化範圍可推論當時海洋中的硫酸鹽濃度遠低於現代，也隱含此時大氣中含氧量很低，不利於硫酸鹽的形成。

第二時期黃鐵礦的硫同位素組成變化程度增加，與同時沈積硫酸鹽之硫同位素組成的最大差異從 10‰ 增加到 40‰，硫同位素分化程度的增加可能受到當時全球氧化事件影響 (Holland et al., 2006)，當時大氣中的氧氣濃度上升使得保存在沈積岩中的硫化物經由風化作用氧化形成硫酸鹽進入海水中，提高海水中硫酸鹽的濃度，硫酸鹽異化還原作用若在硫酸鹽濃度較高時進行，其硫同位素分化程度較大，因此硫同位素分化程度的增加反映當時海水中硫酸鹽濃度 (>200 μM) 與大氣中氧氣含量的增加。

第三時期黃鐵礦的硫同位素組成變化可達 55%，代表地表環境與現今地球類似，硫酸鹽異化還原作用仍為硫循環中主要的過程，而微生物對硫的自身氧化還原作用 (sulfur disproportionation) 也參與其中，因而增大了硫酸鹽與黃鐵礦的硫同位素組成差異 (Canfield and Thamdrup, 1994)。

沈積岩中含硫礦物的硫同位素組成不僅紀錄著地球環境的變動，從上述資料我們也可發現即使同時期所沈積的黃鐵礦其分化大小也會有所不同，因此是什麼因素調控硫酸鹽異化還原作用所造成的分化大小，值得被進一步的探討與研究。

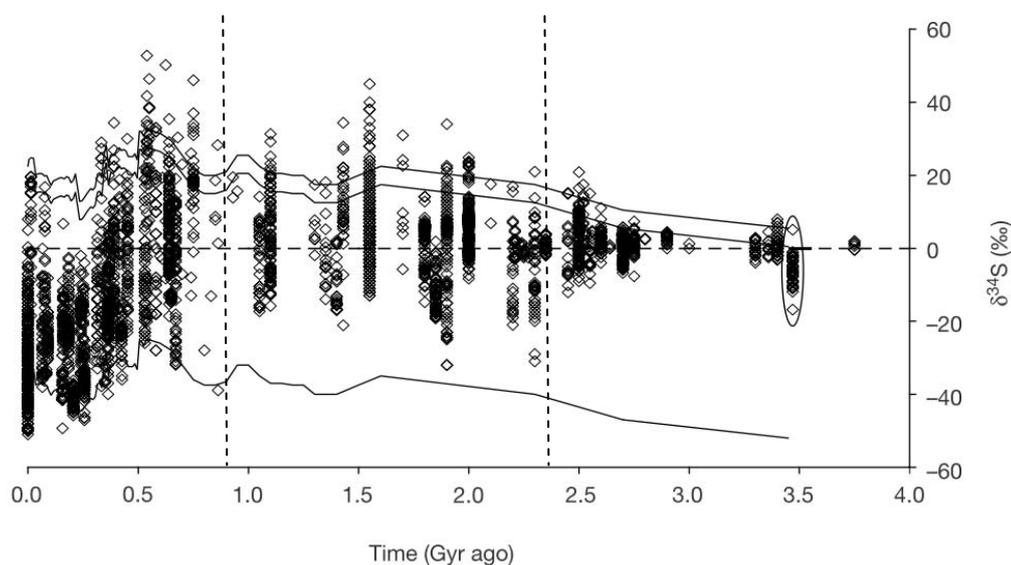


圖 1-2、不同時期硫酸鹽類蒸發岩與沈積岩中黃鐵礦的硫同位素成份 (修改自 Shen et al., 2001)。每個菱形表示各時期沈積岩中黃鐵礦的硫同位素成份，上方的兩條線段表示當時海水中硫酸鹽的硫同位素成份，而下方線段則表示與海水中硫酸鹽硫同位素成份差距 55%，以虛線區分三個階段，分別為 24 億年以前、24 億年前到 9 億年前和 9 億年前到現今地球。

## 1.4 硫酸還原菌造成硫同位素分化程度與其影響因素

關於硫酸還原菌造成的硫同位素分化程度，前人已經進行過相當多的研究，主要利用嗜溫菌 *Desulfovibrio* spp. 和 *Desulfotomaculum* spp. 進行硫同位素分化實驗 (Canfield et al., 2006; Detmers et al., 2001; Johnston et al., 2005; Kaplan and Rittenberg, 1964; McCready, 1975)，發現在純菌培養過程中，硫同位素分化程度可從 3 ‰到 46 ‰。造成不同分化程度的原因仍不清楚，可能受到不同菌種之間的差異、細胞硫酸鹽還原速率、溫度、硫酸鹽濃度或是電子供應者的類型等因素影響 (Canfield et al., 2006; Detmers et al., 2001; Habicht et al., 2002; Harrison and Thode, 1958; Hoek et al., 2006; Johnston et al., 2007; Kaplan and Rittenberg, 1964; McCready, 1975; Mitchell et al., 2009)，但是除了硫酸鹽濃度的影響較為明確之外，其他因素如何系統性的影響硫同位素分化仍不清楚或仍有爭議，以下將分節說明各種因素對於硫酸還原菌造成硫同位素分化程度的影響研究。

### 1.4.1 硫酸鹽濃度與硫酸鹽還原速率

研究顯示當硫酸鹽濃度很小時 (<200 $\mu$ M)，不論是嗜高溫或中溫的純菌株或是自然環境的群落，這些硫酸還原菌造成硫同位素的分化程度會因此受到抑制而變小 (Habicht et al., 2002)。在多數的研究結果中硫酸鹽還原速率與硫同位素分化程度之間具有反比的關係，當硫酸鹽還原速率低時，會造成較大的硫同位素分化，相反的若是硫酸鹽還原速率快時，產生的硫同位素分化程度較小，而此關係通常存在於對於特定菌株的研究，在改變培養溫度、電子提供者種類或濃度時，同時造成硫酸鹽還原速率的改變，因而產生分化程度與還原速率之間的負相關性 (Hoek et al., 2006; Kaplan and Rittenberg, 1964; Sim et al., 2011)。然而此一關係未必存在於所有硫酸鹽還原菌株當中，在部分研究結果中兩者之間並未具有相關性 (Canfield et al., 2006; Detmers et al., 2001; Johnston et al., 2007)。

### 1.4.2 電子供應者

硫酸還原菌進行硫酸還原作用所使用的電子供應者與其造成硫同位素分化的關係，可能與該電子供應者是否進行完全氧化有關。前人研究發現當電子供應者若被完全氧化（有機碳氧化產生二氧化碳）產生的硫同位素分化較大（>15%），若是進行不完全氧化（有機碳氧化形成醋酸）產生的硫同位素分化則較小（<18.7%），但其機制為何仍需要進一步的研究（Detmers et al., 2001）。除此之外，部分電子供應者對於硫同位素分化的影響與硫酸鹽還原速率有連帶相關性，若電子供應者為較複雜的有機碳則會造成較慢的反應速率，使得硫同位素分化程度增大（Sim et al., 2011）。顯然電子接受者為影響硫同位素分化重要因素之一，然而大部分研究中所提供的電子供應者多為較易分解的有機碳，包括乳酸、醋酸、丙酮酸鹽、葡萄糖和酵母萃取物，但是複雜的有機碳（如：醇類）同樣可作為硫酸還原菌的電子供應者（Laanbroek et al., 1982）卻很少在實驗中被使用。雖然特定菌種可以使用的電子接受者不同，但特定環境可提供的電子接收者可能也有所限制，因此分析硫酸還原菌利用不同種類電子供應者進行的硫同位素分化，可幫助我們進一步了解電子供應者對於硫同位素分化的影響。

### 1.4.3 溫度

溫度被視為影響硫同位素分化程度的重要因素之一，對單一菌株而言，細胞生長速率與硫酸還原速率隨溫度都有特定的變化，細胞生長速率在最適生長溫度下達到最大值，硫酸鹽還原速率則會大致隨溫度上升而上升，但硫同位素分化程度隨溫度的變化則無規律性的變化。前人實驗中利用溫度梯度反應槽進行溫度對於硫同位素分化程度影響，使用的菌種包括嗜溫菌（*Desulfovibrio desulfuricans* 和 *Desulfobacterium autotrophicum*）與嗜熱菌（*Thermodesulfatator indicus* 和 *Archaeoglobus fulgidus*），電子供應者包括氫氣、乳酸鹽和醋酸。培養結果顯示硫同位素分化隨溫度變化具有不同的趨勢，

*Thermodesulfatator indicus* 和 *Desulfovibrio desulfuricans* 產生的較大程度分化發生在最低溫和最高溫培養，最小則發生在中間溫度 (Canfield et al., 2006; Hoek et al., 2006)，*Archaeoglobus fulgidus* 和 *Desulfobacterium autotrophicum* 產生的硫同位素分化程度雖然會有小幅的上下跳動，但大致上會隨著溫度升高而下降 (Johnston et al., 2007; Mitchell et al., 2009)。

綜合前人研究可知硫酸還原菌產生的硫同位素分化程度受到許多因素所影響，因此需要藉由細胞分化模型配合微量硫同位素 ( $\Delta^{33}\text{S}$ ) 的測量才能夠進一步討論分化程度改變的原因，以及這些變化的控因。

### 1.5 多重硫同位素分化係數

早期硫酸鹽異化還原作用的硫同位素分化的研究中僅使用兩種主要硫同位素 ( $^{32}\text{S}$  和  $^{34}\text{S}$ ) 進行分析討論 (Rees., 1973)，後期研究顯示利用多重硫同位素分析 ( $^{32}\text{S}$ 、 $^{33}\text{S}$  和  $^{34}\text{S}$ ) 配合硫酸鹽異化還原作用的分化模型，可提供更多關於細胞內部質量流變化的資訊 (Farquhar et al., 2003)。下文將簡介多重硫同位素分析使用的符號與各符號之間的關係。

硫具有四種穩定同位素 ( $^{32}\text{S}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ )，在自然界的豐度分別為  $^{32}\text{S}$  佔 94.93%、 $^{33}\text{S}$  佔 0.76%、 $^{34}\text{S}$  佔 4.29% 和  $^{36}\text{S}$  佔 0.02%，物質中硫同位素組成以  $\delta^{3x}\text{S}$  表示 (如下式)，其中  $3x$  為 33、34 或 36，標準品為美國亞利桑那州代阿布洛峽谷 (Canyon Diablo) 鐵隕石中的隕硫鐵，簡稱 CDT。

$$\delta^{3x}\text{S} = \left[ \left\{ \frac{(^{3x}\text{S}/^{32}\text{S})_{\text{sample}}}{(^{3x}\text{S}/^{32}\text{S})_{\text{CDT}}} \right\} - 1 \right] \times 1000$$

物質間硫同位素分化的程度以分化係數  $\alpha$  (fractionation factor) 表示，為物質之硫同位素比值的比值，下式為分化係數的定義，其中  $3x$  亦可為 33、34 或 36。

$${}^{3x}\alpha_{\text{A-B}} = \frac{{}^{3x}\text{R}_{\text{A}}}{{}^{3x}\text{R}_{\text{B}}}, \quad {}^{3x}\text{R} = \frac{{}^{3x}\text{S}}{{}^{32}\text{S}}$$

分化大小也會以  $\varepsilon$  表示， $\varepsilon$  與  $\alpha$  之間的關係式為：

$$\varepsilon_{\text{A-B}} = 1000 \times (\alpha_{\text{A-B}} - 1)$$

同位素之間質量的差異為產生分化的主要原因，含硫的化合物經歷同位素分化作用時，會受控於硫同位素之間質量的差異，因此  $\delta^{33}\text{S}$ 、 $\delta^{34}\text{S}$  和  $\delta^{36}\text{S}$  之間具有一定比值關係。 $\lambda$  (dependency factor) 值用以描述分化反應造成反應物與產物之  $\delta^{33}\text{S}$ 、 $\delta^{34}\text{S}$  和  $\delta^{36}\text{S}$  之間的相關性(如下式)， $\lambda$  值會因不同反應過程而改變，但是變化通常很小 (Johnston et al., 2007)。

$${}^{34}\lambda = \frac{\ln\left(1 + \frac{\delta^{33}\text{S}_A}{1000}\right) - \ln\left(1 + \frac{\delta^{33}\text{S}_B}{1000}\right)}{\ln\left(1 + \frac{\delta^{34}\text{S}_A}{1000}\right) - \ln\left(1 + \frac{\delta^{34}\text{S}_B}{1000}\right)}$$

$${}^{36}\lambda = \frac{\ln\left(1 + \frac{\delta^{36}\text{S}_A}{1000}\right) - \ln\left(1 + \frac{\delta^{36}\text{S}_B}{1000}\right)}{\ln\left(1 + \frac{\delta^{34}\text{S}_A}{1000}\right) - \ln\left(1 + \frac{\delta^{34}\text{S}_B}{1000}\right)}$$

將地球上絕大多數樣品的  $\delta^{34}\text{S}$  分別對其  $\delta^{33}\text{S}$  和  $\delta^{36}\text{S}$  作圖則會呈現良好的線性關係，關係大約如下式，此線性關係被定義為參考分化線 (RFL, Reference Fractionation Line)，而此線性的斜率則被選定為 0.515 和 1.90。

$$\delta^{33}\text{S} \approx 0.515 \times \delta^{34}\text{S}$$

$$\delta^{36}\text{S} \approx 1.90 \times \delta^{34}\text{S}$$

由於有些測量樣本中微量硫同位素的分析結果與 RFL 有些微的偏差，此種微小的偏差來自分化過程中涵蓋了動力學和平衡分化的過程(如：微生物作用)(Farquhar and Wing, 2003)，使得  $\lambda$  值不恰好為 0.515 或 1.90，或是產生分化的反應為光化學反應，因此為了方便描述這偏差，以  $\Delta^{3x}\text{S}$  (capital delta) 表示  $\delta^{33}\text{S}$  或  $\delta^{36}\text{S}$  與 RFL 之間的偏差，之間的關係如下式：

$$\Delta^{33}\text{S} = \delta^{33}\text{S} - 0.515 \times \delta^{34}\text{S}$$

$$\Delta^{36}\text{S} = \delta^{36}\text{S} - 1.90 \times \delta^{34}\text{S}$$

也可使用下式表示，其中  ${}^{33}\lambda$  和  ${}^{36}\lambda$  設定為 0.515 和 1.90。

$$\Delta^{33}\text{S} = \delta^{33}\text{S} - 1000 \times \left[ \left\{ 1 + \frac{\delta^{34}\text{S}}{1000} \right\}^{{}^{33}\lambda} - 1 \right]$$

$$\Delta^{36}\text{S} = \delta^{36}\text{S} - 1000 \times \left[ \left\{ 1 + \frac{\delta^{34}\text{S}}{1000} \right\}^{{}^{36}\lambda} - 1 \right]$$

## 1.6 硫酸鹽異化還原作用與其分化模型

不同的外在條件會影響細胞內部的質量流，藉由硫酸鹽異化還原作用的概念模型，能夠幫助我們了解外在因素如何影響硫酸還原菌細胞內部質量流與最終產生的同位素分化大小之間的關係。早期認為硫酸鹽異化還原作用僅包含兩個步驟，分別為硫酸鹽進入細胞內與硫酸鹽還原成硫化物，兩步驟可產生的分化程度差異很大，因此藉由兩步驟反應速率的差異可產生不同程度的分化 (Thode et al., 1951)。

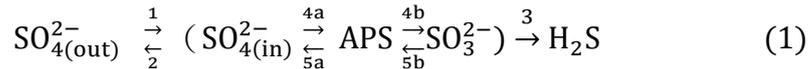
Harrison and Thode (1958) 提出硫酸鹽異化還原作用可分為三步驟，每個步驟的同位素分化程度不同，其中步驟一和步驟二為可逆反應。步驟一為硫酸鹽進入細胞的過程，可以經由擴散作用或是由細胞主動吸收，皆會造成些微的同位素分化。當硫酸鹽經由擴散作用進入細胞體內，較輕的硫同位素 ( $^{32}\text{S}$ ) 擴散速度較快，造成細胞內部的硫酸鹽會富集較輕的硫同位素，產生硫同位素分化。另一方面，當硫酸鹽不斷進入細胞內部會使得細胞內部電荷轉為負值，造成硫酸鹽無法再自由通過細胞，因此細胞會開始主動吸收陽離子 (例如：鈉離子)，同時會產生複合體 (complex)，複合體形成時偏向使用較重的硫同位素 ( $^{34}\text{S}$ ) 產生硫同位素的分化。硫酸鹽以不同方式進入細胞會造成細胞內部硫酸鹽硫同位素數值變大或變小，但不論硫酸鹽以何種方式進入細胞，其所造成硫同位素分化較其他步驟小。步驟二為細胞內部硫酸鹽還原形成亞硫酸鹽的過程，當硫酸鹽進入細胞當中，細胞內的硫酸鹽會經由酵素作用還原形成亞硫酸鹽 ( $\text{SO}_3^{2-}$ )，過程中造成硫同位素分化的主要原因來自於  $^{32}\text{S}$  與  $^{34}\text{S}$  與氧原子之間鍵結力的不同，氧原子與  $^{32}\text{S}$  之間的鍵結力比起與  $^{34}\text{S}$  之間的弱，因此酵素作用時， $^{32}\text{S}-\text{O}$  之間的鍵結較易被破壞，造成產物亞硫酸鹽富集  $^{32}\text{S}$ ，反應物硫酸鹽則會富集  $^{34}\text{S}$ 。步驟三為亞硫酸鹽還原形成硫化氫並排出細胞體外，細胞體內的亞硫酸鹽和氫分子作用被還原形成硫化氫，並將硫化氫排出細胞體外。

根據 Harrison and Thode (1958) 所提出概念，陸續有更加詳盡與量化的模型

被提出，以下分節敘述之。

### 1.6.1 Rees 模型

Rees (1973) 根據 Harrison and Thode (1958) 所提出的模型，經過修改提出詳細的硫酸鹽異化還原作用在細胞內部的反應路徑及其相對應的分化係數 ( $^{34}\alpha$ ) :

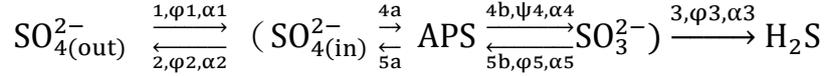


括弧表示細胞膜，數字表示不同的步驟。此模型中包含四個主要步驟：(1) 硫酸鹽穿過細胞膜進入細胞，硫酸鹽進出細胞為可逆反應 (Cypionka, 1995)，此步驟產生的硫同位素分化較小，約 3‰ 到 0‰，(2) 細胞內部的無機硫酸鹽經由三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 活化形成腺苷-5'-磷酸硫酸酐 (adenosine-5'-phosphosulfate, APS)，(3) APS 中硫與氧鍵結斷裂，APS 還原形成亞硫酸鹽，(4) 經由酵素作用使亞硫酸鹽還原形成硫化氫。步驟 (2) 和 (3) 皆為可逆反應，雖然硫酸鹽活化成為腺苷-5'-磷酸硫酸酐的過程沒有硫同位素分化產生，但仍有 -22‰ 到 -25‰ 的硫同位素分化分別發生在 APS 還原形成亞硫酸鹽和亞硫酸鹽還原為硫化物的過程中。由 Rees 模型可得知最終硫同位素分化的大小與哪一步驟是限制步驟有關，若硫酸鹽進入細胞成為限制步驟，則會表現出最小的硫同位素分化，相反的最大同位素分化則發生在限制步驟為細胞內部硫酸鹽還原的可逆反應 (Canfield et al., 2006; Hoek et al., 2006)。

### 1.6.2 Farquhar 模型

由於 Rees 模型僅可定性去推測細胞新陳代謝步驟對硫同位素分化的影響，因此 Farquhar 模型便將 Rees 模型加入了質量流 (mass flow) 與多重硫同位素的概念，定量考慮反向反應的分流對同位素分化的影響，幫助我們了解微生物作用對硫同位素分化的影響 (Farquhar et al., 2003)。此模型假設微生物硫酸鹽還原反應為一連串熱力學平衡的分化反應的組合， $^{33}\lambda$  值設定為

0.5145，分化係數則為溫度函數。



括弧表示細胞膜，數字表示不同的步驟， $\varphi$  為質量流， $\alpha$  為分化係數，根據此模型定義了兩個主要影響分化結果的過程，分別為硫酸鹽進出細胞質量流的通量與細胞內部硫酸鹽轉換的通量 (Canfield et al., 2006)。硫酸鹽進入細胞為可逆反應，因此硫酸鹽進入細胞質量流的通量等於最後產生硫化氫的通量加上反向流出細胞外硫酸鹽的通量，關係式如下：

$$\varphi_1 = \varphi_2 + \varphi_3$$

$f_3$  為硫酸鹽經由微生物作用形成硫化氫的比例：

$$f_3 = \frac{\varphi_3}{\varphi_2 + \varphi_3}$$

當  $f_3$  趨近於 1 時，表示進入細胞當中的硫酸鹽大部分還原形成亞硫酸鹽，僅有少部分再以硫酸鹽的形式離開細胞 ( $\varphi_2 \doteq 0$ )，當  $f_3$  相當小時，表示大部分進入細胞當中的硫酸鹽都以硫酸鹽的形式反向離開細胞 ( $\varphi_2$  很大)，或是最終產生硫化氫的通量很小 ( $\varphi_3$  很小)。由於硫酸鹽形成 APS 不會產生硫同位素分化，因此將 APS 省略直接以硫酸鹽還原形成亞硫酸鹽代表細胞內部硫酸鹽轉換的通量，此為第二個主要影響硫同位素分化的過程，這過程同樣為可逆反應，因此形成亞硫酸鹽的通量會等於亞硫酸鹽再氧化為硫酸鹽的通量加上最後產生硫化氫的通量，關係式如下：

$$\varphi_4 = \varphi_5 + \varphi_3$$

$f_5$  表示在細胞內部的亞硫酸鹽形成硫化氫的比例：

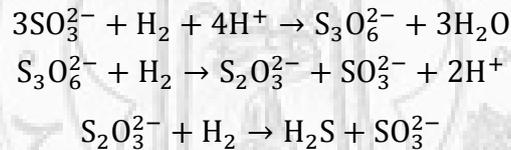
$$f_5 = \frac{\varphi_3}{\varphi_5 + \varphi_3}$$

當  $f_5$  相當大時，表示亞硫酸鹽大部分還原形成硫化氫 ( $\varphi_5 \doteq 0$ )，當  $f_5$  趨近於 0 時，表示大部分的亞硫酸鹽又再氧化形成硫酸鹽，僅少量形成硫化氫 ( $\varphi_3$  很小)。設定  $f_3$  和  $f_5$  並採用適當的分化係數，即可建立多重硫同位素分化網格，

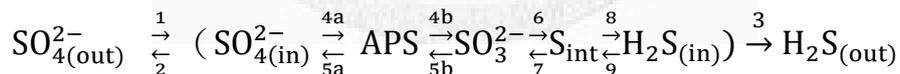
測量分化作用產生的多重硫同位素組成，便可依此網格推測微生物硫酸鹽還原作用中不同微生物內部步驟作用如何表現出不同微量硫同位素組成的特色。

### 1.6.3 Brunner and Bernasconi 模型

部分研究發現硫酸鹽異化還原作用產生的分化可大於前人模型中所預估的最大值 46‰ (Rudnicki et al., 2001; Sim et al., 2011)，而較大的硫同位素分化被認為與三硫磺酸鹽的產生有關，因此 Brunner and Bernasconi (2005) 再次修正模型，考慮亞硫酸鹽還原時的其他複雜路徑。當亞硫酸鹽還原時並非直接形成硫化氫，而是經由許多中間物質 ( $S_3O_6^{2-}$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ) 變化所產生，這些反應被稱為「trithionate pathway」(Akagi, 1995)，trithionate pathway 會使得硫同位素分化增大，但亞硫酸鹽還原過程究竟是單一反應或是由多個反應組合形成，仍無法確定 (Rabus et al., 2006)。Trithionate pathway 共有三個反應式：



雖然反應更加複雜，但整體的微生物硫酸鹽還原模型仍與前人相近，模型如下：



牽涉 trithionate pathway 的步驟皆假設為可逆反應，硫化氫可同時存在於細胞內外，在細胞內部的硫化氫可再氧化形成中間物質或是運輸出細胞體外 (Brunner et al., 2005)。上述不同步驟具有不同的分化係數： $^{34}\alpha_1 = 1.003$ 、 $^{34}\alpha_{4b} = 0.975$ 、 $^{34}\alpha_6 = 0.947$  和  $^{34}\alpha_7 = 1.005$ ， $\alpha_7$  定義為亞硫酸鹽轉變為中間物質 ( $S_2O_3^{2-}$ 、 $S_3O_6^{2-}$ ) 與中間物質氧化為亞硫酸鹽過程中所產生的硫同位素分化 (Brunner and Bernasconi, 2005)。根據此模型推導最大硫同位素分化可達 75‰，超過純菌培養得到的同位素分化結果，能夠解釋環境和地質記錄中所觀察到的變化 (Johnston et al., 2007)，但由於生物體內的中間物質是否存在或者是否

每種硫酸鹽還原菌都含有此中間物質仍無法確定，因此此模型仍需要更多的驗證。

### 1.7 研究動機與目的

溫度不僅會影響硫酸鹽還原中酵素的反應速率，也能夠影響硫酸鹽在細胞內外的交換速率，因此被認為扮演硫同位素分化的重要角色，但以往研究對於溫度如何系統性的影響硫同位素分化仍無一致的看法，因此本研究利用培養嗜熱菌 *Thermodesulfobacterium commune* 接近株與嗜溫菌 *Desulfovibrio gigas* 進行代謝反應物的多重硫同位素測量，並配合硫酸鹽異化還原的分化模型和質量流計算，希望建立溫度與硫同位素分化之間的關係，以了解硫酸鹽還原菌對硫同位素分化程度影響的機制。



## 第二章 研究方法

### 2.1 培養條件

本研究進行培養的兩菌株為生長在不同溫度範圍下的硫酸鹽還原菌，分別為 *Desulfovibrio gigas* 和 *Thermodesulfobacterium commune* 接近株，皆為絕對厭氧菌。*Desulfovibrio gigas* 由瀉湖環境中純化出來，最適生長溫度在 30-35 °C (Gall, 1963)，*Thermodesulfobacterium commune* 接近株特性與 *Thermodesulfobacterium commune* 相似，後者生長的溫度範圍在 45-85 °C，最適生長溫度為 70 °C (Zeikus et al., 1983)。

兩者使用相同的培養基，培養基的配方為每公升溶液中加入：1.17 g 氯化鈉 (NaCl)、0.4 g 氯化鎂 ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )、0.3 g 氯化鉀 (KCl)、0.15 g 氯化鈣 ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )、0.27 g 氯化銨 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )、0.1 g 磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、3 g 硫酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、1 g 酵母萃取 (yeast extract)、10 ml 微量元素 (TES) 溶液和 10 ml 1 M 乳酸 (Lactic acid)。將其混合均勻以 121 °C 滅菌 20 分鐘，冷卻前放入厭氧箱靜置一夜除去氧氣，最後加入 20 ml 2% 硫化鈉 ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) 和 20 ml 1 M 碳酸氫鈉 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 並且利用經由 0.22  $\mu\text{m}$  過濾後的鹽酸與氫氧化鈉調整培養基的酸鹼值 (pH) 至 7.5。

每次進行溫度與硫同位素分化大小實驗前，會先將兩菌株分別以 60 °C 和 30 °C 培養至指數生長期使細胞具有最大活性，再以 1:10 的比例將菌液混入全新培養基中，最後將其放入溫度梯度反應槽內開始進行培養。進行培養時，監測菌株的細胞數目和硫酸鹽濃度隨時間的變化，當細胞進入指數生長期時，終止細胞生長並進行同位素分析樣品取樣。

## 2.2 溫度梯度反應槽 (thermal gradient block)

溫度梯度反應槽為長方形鋁塊所製成，反應槽兩端分別為加熱與冷卻系統，藉此產生溫度梯度，冷卻系統所使用的冷凝機可設定溫度為  $-2$  到  $20^{\circ}\text{C}$ ，若設定溫度過高，會使冷凝機水管破裂，造成系統故障，加熱系統則無條件限制 (圖 2-1)。溫度梯度反應槽共有 65 個孔洞 (橫向 13 孔、縱向 5 孔)，縱向的 5 個孔洞為相同溫度，5 管菌株培養，5 管培養中包含管用來監測細胞與硫酸鹽濃度、同位素取樣的二重覆和備用取樣，橫向的每個孔洞之間溫度差距約  $4-5^{\circ}\text{C}$ ，因此利用溫度梯度反應槽進行不同溫度下的菌株培養，可提高對溫度的解析度。

*Thermodesulfobacterium commune* 接近株培養溫度範圍為  $35-83^{\circ}\text{C}$ ，進行實驗時加熱器與冷卻器分別設定為  $88^{\circ}\text{C}$  與  $15^{\circ}\text{C}$ ，*Desulfovibrio gigas* 培養溫度範圍為  $10-43^{\circ}\text{C}$ ，進行實驗時加熱器與冷卻器分別設定為  $47^{\circ}\text{C}$  和  $3^{\circ}\text{C}$ 。使用溫度梯度反應槽前，需將反應槽提前一天開啟，使溫度達到平衡，使用前需再次確認各孔洞溫度。



圖 2-1、溫度梯度反應槽。為長方形鋁塊所製成，反應槽兩端分別為加熱 (圖中左側) 與冷卻 (圖中右側) 系統藉此產生溫度梯度，提高對於溫度的解析度。

## 2.3 細胞觀察

細胞數量計算的目的在於建立菌株的生長曲線，當菌株被移到新鮮培養基時，細胞濃度隨時間的變化可被畫成一曲線，稱為生長曲線 (圖 2-2)，生長曲線包括延滯期 (lag phase)、指數生長期 (log phase)、停滯期 (stationary phase) 和死亡期 (death phase)。本研究建立生長曲線的目的除了要計算菌株在不同溫度下的生長速度之外，也便於決定何時要終止細胞生長，進行同位素分析。

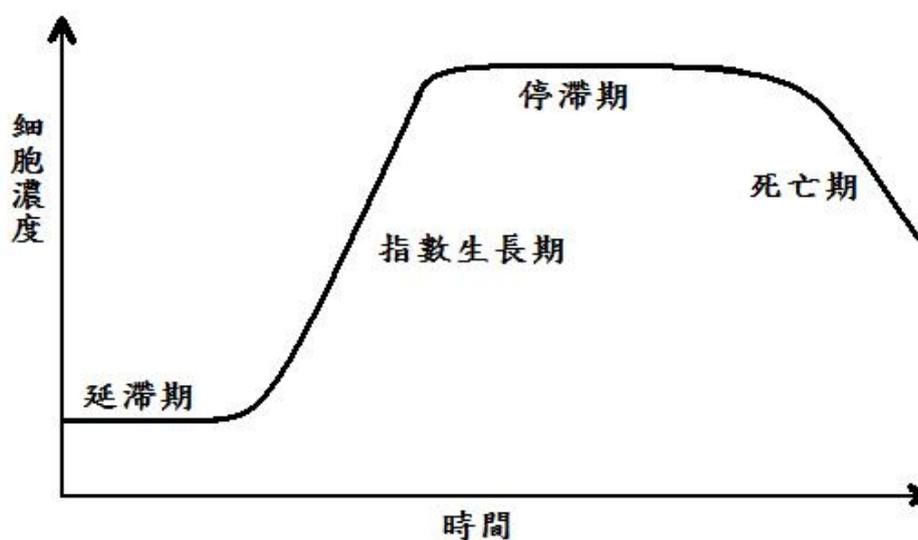


圖 2-2、細胞生長曲線。細胞生長曲線共分為四期，分別為延滯期、指數生長期、停滯期和死亡期，表示細胞生長狀況。延滯期 (Lag phase) 時細胞尚未進行分裂，細胞數沒有增加。指數生長期 (Log phase) 時大部分之細胞都已做好分裂之準備，開始進行分裂，因此產生細胞濃度快速增加之情形。停滯期 (Stationary phase) 時進行分裂之細胞與死亡之細胞數目達成平衡，或大部分之細胞為維持本身之新陳代謝而停止分裂，故整體看來，細胞數目並無增加。死亡期 (Death phase) 時環境變成對細胞有害，例如培養基的養分用盡，或因細胞本身之代謝廢物排出而使環境出現毒素時，細胞便會大量死亡，細胞數目減少，進入死亡期。

### 2.3.1 血球計數盤 (counting chamber)

利用血球計數盤配合光學相位差顯微鏡可在固定體積下直接計算細胞數目。血球計數盤由厚玻璃所製成，通常血球計數盤有二個計數槽 (chamber)，每個計數槽中細刻 9 個  $1\text{ mm}^2$  之大正方形，其中位於 4 個角落之正方形再細刻 16 個小格，深度均為  $0.1\text{ mm}$ 。利用血球計數盤進行細胞數目的計算，所觀察的菌液細胞濃度不可過高或過低，若細胞濃度過低則計數統計時的誤差加大，若細胞濃度過高則會造成數菌不易，因此進行細胞計數前需將菌液稀釋至適當濃度。

將適當濃度的細胞菌液滴在血球計數盤上，覆上蓋玻片並輕微按壓蓋玻片四周，使多餘的溶液能流到方格之外，靜置 1-2 分鐘待細胞不隨著溶液流動，就可用光學相位差顯微鏡計算方格範圍內細胞數目。細胞濃度 (cn, 單位為 cells/ml) 的計算為 方格範圍內細胞數目 ( $X_{\text{cell/square}}$ )，乘以稀釋倍率 (DF)，除以計數範圍方格體積 ( $V_{\text{square}}$ )，算式如下：

$$\text{cn} = (X_{\text{cells/square}} \times \text{DF}) \div V_{\text{square}}$$

### 2.3.2 分光光度計 (spectrophotometer)

分光光度計可產生特定波長的光源，光源透過測試樣品會有部分被吸收，即為樣本的吸光值，由於樣本的濃度會與吸光值成正比，因此藉由分光光度計測量樣本的吸光值就可得知樣本的濃度。實驗過程中，分光光度計為觀察細胞濃度最快速的方法，因此本實驗進行菌株培養時以分光光度計監測細胞濃度隨時間的變化，最初需要先建立吸光值與細胞數目之間的檢量線，利用血球計數盤計算不同細胞濃度下確切的細胞數目與分光光度計所測得的吸光值對照，可得知細胞數目與吸光值之間的關係。

分光光度計開機前需暖機 15 分鐘，待光源穩定後，波長設定為  $660\text{ nm}$ ，取  $1\text{ ml}$  的樣本加入  $0.1\text{ ml}$  的  $6\text{ N}$  鹽酸裝入比色管中，操作時手握比色管非透明處，測量前需先將比色管中的氣泡除去，避免影響測量值，每次測量為

每 2 秒測一次重複 5 次後取平均值，最後將測量到的吸光值換算為細胞數目。

## 2.4 硫酸鹽濃度測量

測量樣品中硫酸鹽濃度，需先將樣品中的微生物與硫化氫去除，再使用離子層析儀進行分析。培養終止時樣本中加入 20% 醋酸鋅，使樣本中的硫化物沈澱形成硫化鋅，如此可以避免硫化物再氧化形成硫酸鹽而影響測量值，待硫化鋅完全沉澱後，離心並過濾除去硫化鋅與細胞，將上清液稀釋至適當濃度，利用離子層析儀進行分析，求得硫酸鹽的濃度。離子層析儀 (ion chromatography) 的原理為當樣本通過離子交換管柱時，利用不同離子和管柱之間的正負交換吸引力不同，來達到各離子間分離的效果，將各離子經由交換管柱所分離出來的時間差和得到的訊號值與標準品比對，藉此可得知樣本中所含的離子種類與其濃度大小。

## 2.5 同位素分析樣本之前處理

本研究利用氣相同位素比值質譜儀 (gas isotope ratio mass spectrometer) 進行多重硫同位素分析，由於氣相同位素比值質譜儀分析使用六氟化硫作為進樣氣體，因此我們需先將硫同位素樣本進行前處理轉換為硫化銀，以便與氟氣反應產生六氟化硫。硫同位素樣本的前處理，以下分節進行詳細的介紹。

### 2.5.1 硫酸鋇樣本

進行同位素樣本取樣時，將 20% 醋酸鋅以 1:10 的比例加入其中，使樣本中的硫化氫沈澱形成硫化鋅，接著離心過濾除去硫化鋅與細胞，離心過濾後的樣本再加入鹽酸酸化使酸鹼值低於 4，以確保無硫化氫殘留，最後加入過量的氯化鋇與樣本中的硫酸鹽進行反應形成硫酸鋇沈澱，清洗烘乾後的硫酸鋇再轉化為硫化銀。

## 2.5.2 硫化銀轉換

依照 Thode et al (1961) 所提出的操作方法將硫酸鋇轉換為硫化銀，其原理是利用蒸餾系統 (圖 2-3) 在高溫下使還原溶液 (Thode 溶液) 與硫酸鹽反應將硫酸鹽還原形成氣態硫化氫，再將硫化氫導入醋酸鋅溶液當中產生硫化鋅沈澱，最後硫化鋅再與硝酸銀反應製成硫化銀。實驗步驟如下：

1. 秤重約 20-30 毫克的乾燥硫酸鋇樣本，將其顆粒磨細後放入圓底反應瓶中，加入 20 ml 的 Thode 溶液，開啟排煙櫃。
2. 組裝蒸餾系統，磨砂頭塗矽凝膠 (silicon gel) 並加上磨砂接頭夾，旋轉接頭確定其密合度。玻璃管 (b) 和 (c) 中分別加入適量的去離子水和 5 ml 1 M 的醋酸鋅，經由反應所產生的氣態硫化氫用外徑 1/8 英吋之鐵氟龍 (PTFE) 管通氣導入玻璃管 (c) 中，使其與醋酸鋅反應產生沈澱。
3. 連接氮氣瓶，開啟氮氣並以較高流速通氣至少 20 分鐘，通氣 20 分鐘後，將氣流量調整至每秒產生 2-3 顆氣泡。開啟加熱包和冷卻水，觀察並調整氣泡速度，直到溶液開始沸騰冒泡 (約 100 °C)，繼續觀察直到確定通氣的速度穩定沒有變化。
4. 反應完畢約需 12-14 小時，確定圓底反應瓶內沒有殘餘任何硫酸鋇粉末。結束反應前，增加通氣速度持續 20 分鐘，讓殘留在系統中的硫化氫能夠全部帶出。
5. 通氣 20 分鐘後，利用原有醋酸鋅溶液沖洗吸附在玻璃管壁上的硫化鋅，加入 0.1 N 硝酸銀數毫升產生硫化銀，所需體積視反應的硫酸鋇重量而定 (1 mg 硫酸鋇需要 0.1 mL 1 N 硝酸銀，再增加 1-2 倍)，關緊蓋子使用強力震盪器 (vortex) 幫助反應完全，此時白色沈澱物變成黑色，溶液變成淡棕色。
6. 將玻璃管蓋子打開，放進乾浴槽加熱至沸騰，維持五分鐘，此時硫化銀顆粒會增大，溶液變的透明，代表加熱已經足夠。冷卻後待硫化銀顆粒沈澱，

用塑膠滴管盡量吸出多餘的澄清液。

- 待多餘澄清液移除後，加入 1-2 mL 的濃氨水，關緊蓋子使用強力震盪器讓氨水與硫化銀顆粒混和均勻，靜置一晚後，在排煙櫃內盡量吸出多餘氨水，加入去離子水離心至少清洗三次 (3000 rpm、5 分鐘)，使氨水氣味完全清除。最後將硫化銀放入烘箱烘乾，秤重並計算回收率。
- Thode 溶液的配製：取 816 mL 的濃鹽酸、48% 的氫碘酸 500 mL 和 50% 的次磷酸 245 mL 混合，放入攪拌子與蓋上裱玻璃後置於加熱板上加熱至沸騰，持續沸騰 1.5 個小時使任何含硫物質揮發，待冷卻後儲存於暗色玻璃瓶中。

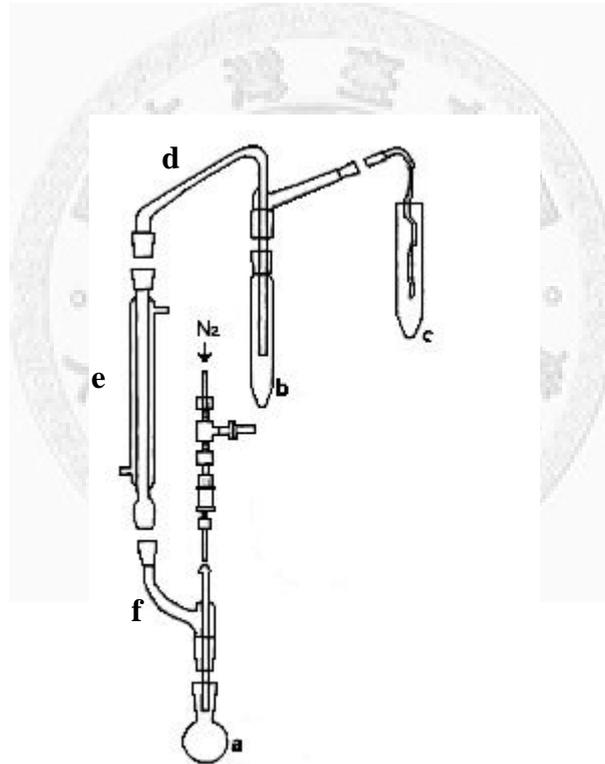


圖 2-3、硫化銀轉換之蒸餾系統。蒸餾系統包括：圓底反應瓶 (a)、分別裝去離子水和醋酸鋅的玻璃管 (b 和 c)、T 型管 (d)、冷凝管 (e) 和 Y 型管 (f)。

## 2.6 氣相同位素比值質譜儀

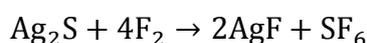
質譜儀的基本原理是將樣本離子化後通過一磁場，帶電離子運動方向會受磁場的影響而產生偏轉，偏轉的程度受離子運動的速度、離子質量和磁場強度這三種因素所影響，如下列公式：

$$r = \sqrt{\frac{2Vm}{B^2q}}$$

上式中  $r$  為離子偏轉軌跡的半徑， $V$  為離子加速器之電壓， $B$  為磁場強度， $m$  為離子質量， $q$  為帶電數目。進行同位素分析時，將加速電壓與磁場強度固定，所以若離子的質量越輕，偏轉會越大，相反的若質量越重則會偏轉越小，利用不同質量具有不同的偏轉程度並設定接收器就可以測出樣品中同位素之間的比例。

本研究中所使用的為氣相同位素質譜儀，待測樣本需先轉換成氣體再進入質譜儀進行分析，目前硫同位素測量所使用的氣體有六氟化硫 ( $\text{SF}_6$ ) 與二氧化硫 ( $\text{SO}_2$ ) 兩種，其中六氟化硫中的氟氣僅有一個穩定同位素 ( $^{19}\text{F}$ )，不同於二氧化硫中的氧具有三個穩定同位素 ( $^{16}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$  和  $^{18}\text{O}$ )，因此使用六氟化硫可以直接測得  $^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$ 、 $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  和  $^{36}\text{S}/^{32}\text{S}$  等比值而免去校正的困難與誤差，因此本研究使用六氟化硫做為進樣氣體，以便進一步分析微生物硫酸鹽還原作用對多重硫同位素分化的影響。

將待測樣本轉化為六氟化硫需要經過高溫氟化系統，使樣本與氟氣反應，反應方程式如下：



接著使用氣相層析儀將六氟化硫氣體純化，收集後利用氣相同位素質譜儀進行多重硫同位素分析。在同位素質譜儀分析方面，本研究所使用的氣相質譜儀 (MAT253) 為雙進樣系統 (dual-inlet system)，重複分析國際標準品以求得參考氣體 (reference gas) 的同位素組成，未知組成樣品的同位素組成便可透過與參考氣體比較求得，儀器對於  $\delta^{34}\text{S}$  的分析誤差為 0.01‰。

## 2.7 多重硫同位素分析與操作

多重硫同位素分析的實驗步驟如下：

1. 取出 2.5-3 毫克的硫化銀樣本包入錫囊當中，確認硫化銀樣本不會從錫囊中掉出，防止樣本丟入錫管中時會有掉落的硫化銀吸附在錫管壁中，以及避免氟氣剛進入錫管中時與硫化銀樣本反應過於激烈而分散，導致反應不完全。
2. 將包好的硫化銀樣本放入乾淨的鎳管中，鎖回反應系統上，開始抽真空並進行測漏，待真空度降至 0.002 torr，加熱鎳管至 100 °C，放置隔夜，此步驟是為了將樣本中的水氣移除。
3. 反應隔夜後，關掉加熱包，待溫度降為室溫，進行測漏後將鎳管抽至真空。達到真空後，使用液態氮將鎳管冷凝，接著放氟氣進入鎳管中，關閉反應管待壓力穩定，加熱鎳管至 200 °C，反應放置隔夜，使氟氣與硫化銀樣本能夠反應完全。
4. 反應隔夜後，關掉加熱包，待溫度降為室溫，清除多餘的氟氣，將產生的六氟化硫氣體通過氣相層析儀 (gas chromatography)，利用分離管柱將六氟化硫與氟化過程中產生的雜氣分離，並將六氟化硫氣體濃縮收集在玻璃管中，以便進行硫同位素分析。
5. 六氟化硫進樣前需先進行質譜儀系統穩定度測試，並將質譜儀內管路抽至真空，之後將裝有六氟化硫的玻璃管連接上質譜儀進樣端，開啟閥門，靜置 10 分鐘，待玻璃管連接質譜儀的管路抽至真空，再開啟玻璃管的開關。
6. 六氟化硫進樣至質譜儀內時，每個閥門的開啟與關閉，都需靜置 3-5 分鐘，讓氣體能夠達到平衡，避免產生分化。進行分析前需先利用可壓縮的風箱 (bellow) 將樣本氣體與參考氣體的氣壓調整至相似，才開始進行分析。最後經過校正計算得到樣本相較於國際標準品的硫同位素比值。

## 2.8 計算使用公式

### 2.8.1 細胞硫酸鹽還原速率 (cell-specific sulfate reduction rate)

本實驗計算的細胞硫酸還原速率為細胞在生長指數期時，兩時間點 ( $t_1$  和  $t_2$ ) 之間每個細胞消耗硫酸鹽的速率。計算公式如下：

$$\text{csSRR}(\text{fmol} \cdot \text{day}/\text{cell}) = \frac{[\text{SO}_4^{2-}]_{(2)} - [\text{SO}_4^{2-}]_{(1)}}{\frac{(\text{cn}_{(1)} + \text{cn}_{(2)})}{2} \cdot (T_{(2)} - T_{(1)})}$$

$[\text{SO}_4^{2-}]$  為硫酸鹽濃度， $\text{cn}$  為細胞濃度， $t$  為時間

### 2.8.2 細胞生長速率 (specific growth rate)

細胞在指數生長期的生長速率為複製時間的倒數，此數值越大表示細胞生長速率越快，此環境越適合生長。計算公式如下：

$$\mu = \frac{\ln(\text{cn}_0) - \ln(\text{cn})}{t}$$

$\text{cn}_0$  為指數生長期開始時的細胞濃度 (cells/ml)， $\text{cn}$  為指數生長期任一點的細胞濃度 (cells/ml)， $t$  為時間 (hr)。

### 2.8.3 硫同位素分化計算

微生物在密封的血清瓶 (serum vial) 中進行硫酸鹽還原作用，產物不會流失減少，可以視為一封閉系統，因此利用瑞利分化模型 (Rayleigh fractionation model) 計算微生物硫酸鹽還原過程中所產生的硫同位素分化 ( $^{34}\epsilon_{\text{sulfate-sulfide}}$ ):

$$\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4^{2-}}^{\text{T}_1} = -\epsilon \ln f + \delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4^{2-}}^{\text{T}_0}$$

$$f = \frac{[\text{SO}_4^{2-}]_{\text{T}_1}}{[\text{SO}_4^{2-}]_{\text{T}_0}}$$

$\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4^{2-}}^{\text{T}_1}$  為進行取樣時硫酸鹽的硫同位素組成， $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4^{2-}}^{\text{T}_0}$  為初始硫酸鹽的硫同位素組成， $[\text{SO}_4^{2-}]_{\text{T}_1}$  為進行取樣時硫酸鹽的濃度， $[\text{SO}_4^{2-}]_{\text{T}_0}$  為初始硫酸鹽的濃度。

## 第三章 結果

### 3.1 細胞濃度與硫酸鹽濃度變化

*Desulfovibrio gigas* 和 *Thermodesulfobacterium commune* 接近株在大部分培養溫度下細胞濃度隨時間的變化符合典型生長曲線，但延滯期與指數期的時間長短卻不相同 (圖 3-1 至圖 3-12)，此外由於本研究探討指數生長期硫酸還原菌所造成的硫同位素分化，因此並無持續紀錄細胞生長進入死亡期的細胞濃度變化。以 *Desulfovibrio gigas* 在 39 °C 的培養為例，細胞濃度的增加會伴隨硫酸鹽濃度減少，當細胞生長由延滯期進入指數生長期時，硫酸鹽濃度會大幅的減少，而當細胞生長進入停滯期時，硫酸鹽濃度變化的幅度也會減小 (圖 3-1b)。本研究結果中在大部分培養溫度之間的細胞濃度與硫酸鹽濃度變化與上述舉例相同，然而在 *Desulfovibrio gigas* 的 10 °C 和 13 °C 培養雖然細胞濃度有隨時間增加 (圖 3-6)，但是生長曲線缺乏明確的指數期，*Thermodesulfobacterium commune* 接近株在 35 °C 和 40 °C 培養則不見細胞數量的增加和硫酸鹽濃度的明顯下降 (圖 3-12)。

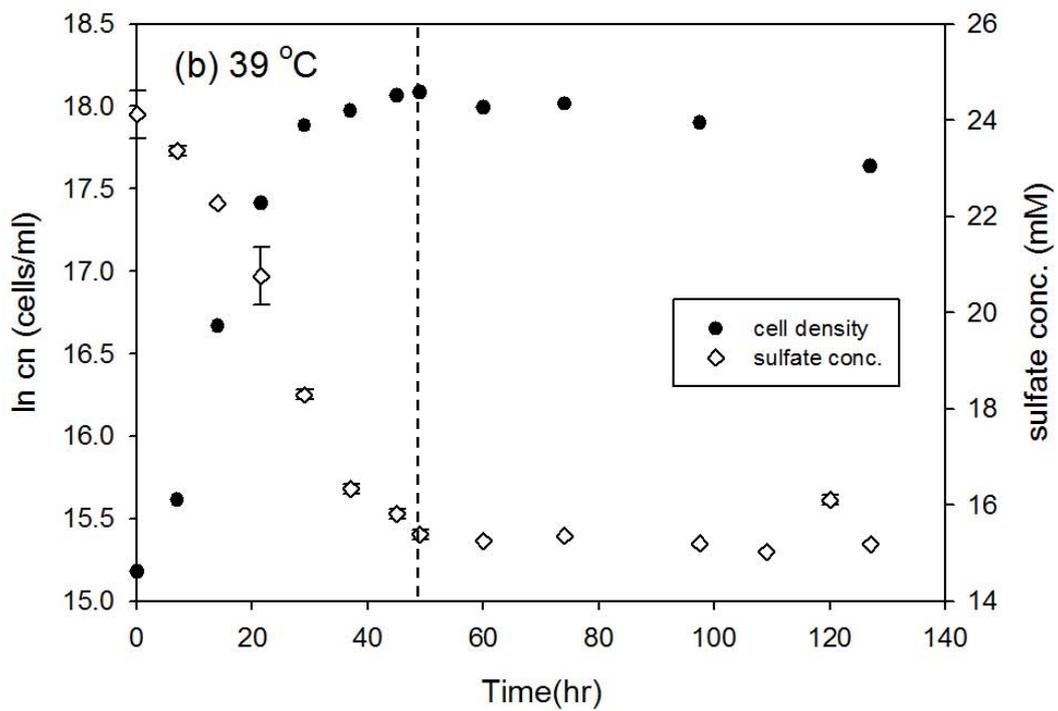
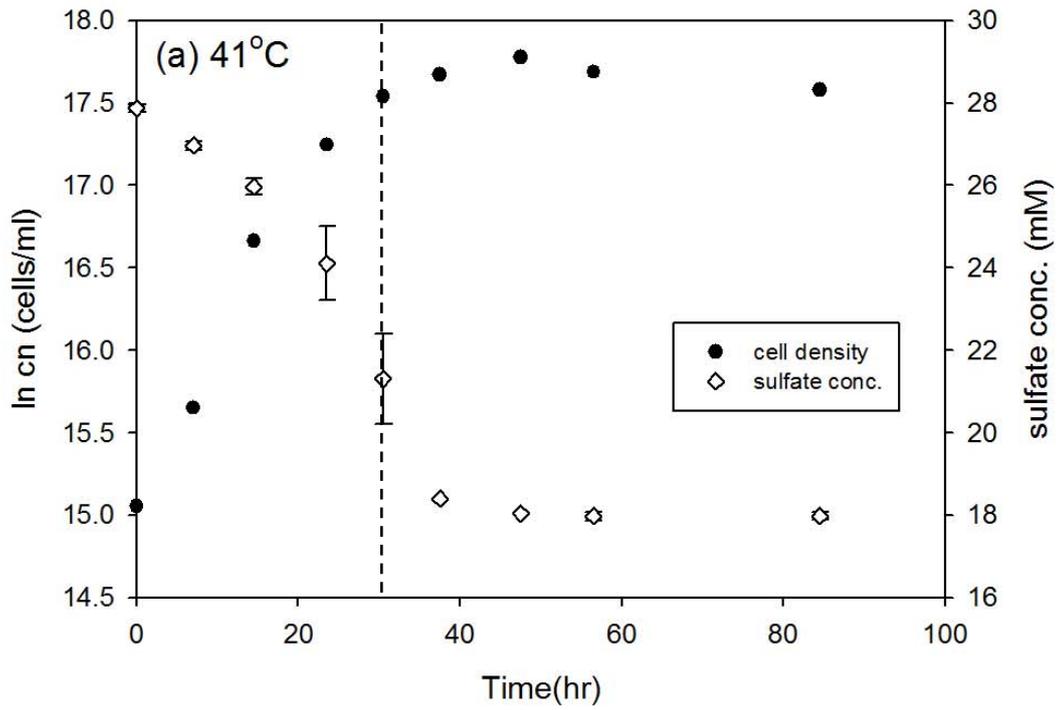


圖 3-1、*D. gigas* 在 41 °C 和 39 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 41 °C 和 39 °C 的同位素分析取樣時間分別為 30.5 和 49 小時 (以虛線表示)。

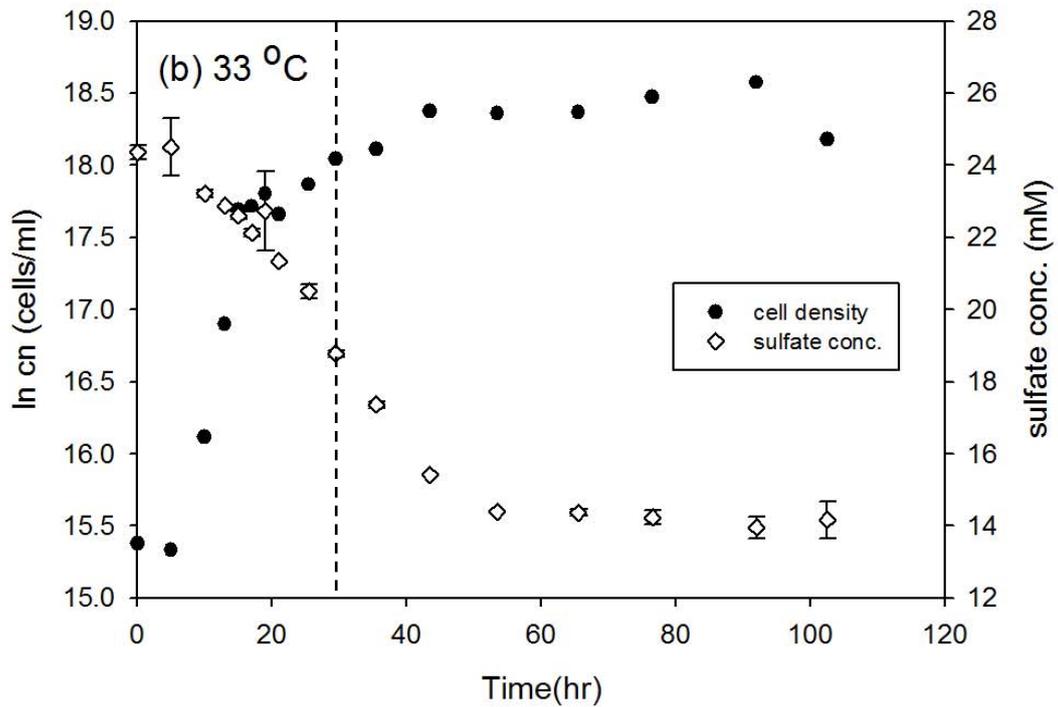
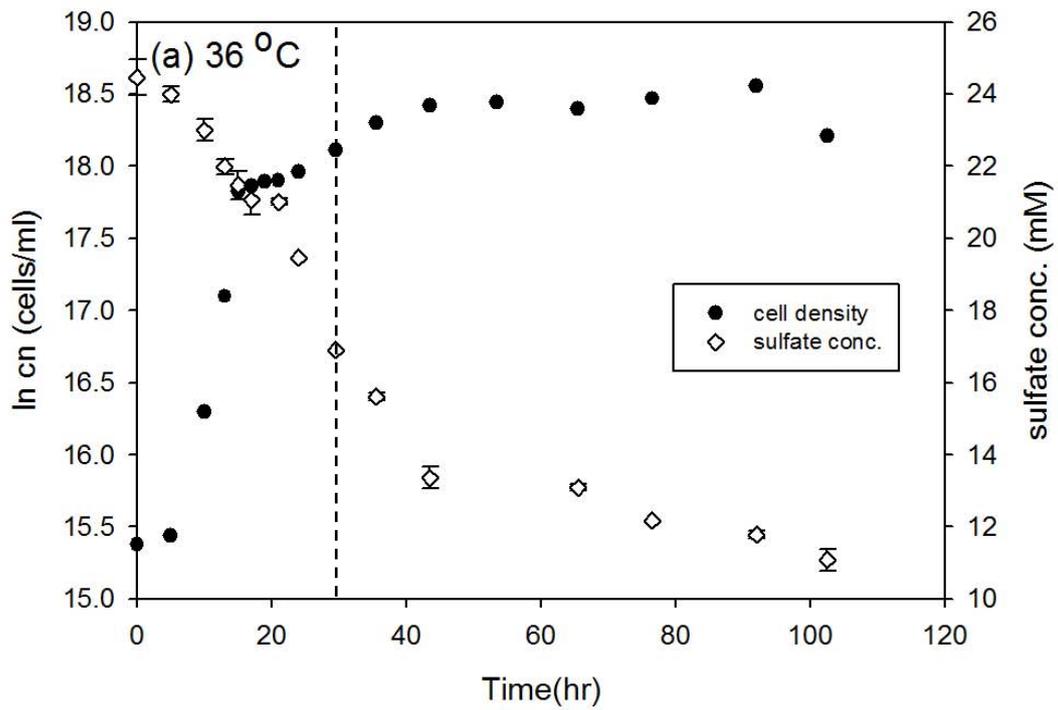


圖 3-2、*D. gigas* 在 36 °C 和 33 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 36 °C 和 33 °C 的同位素分析取樣時間分別為 24 和 29.5 小時 (以虛線表示)。

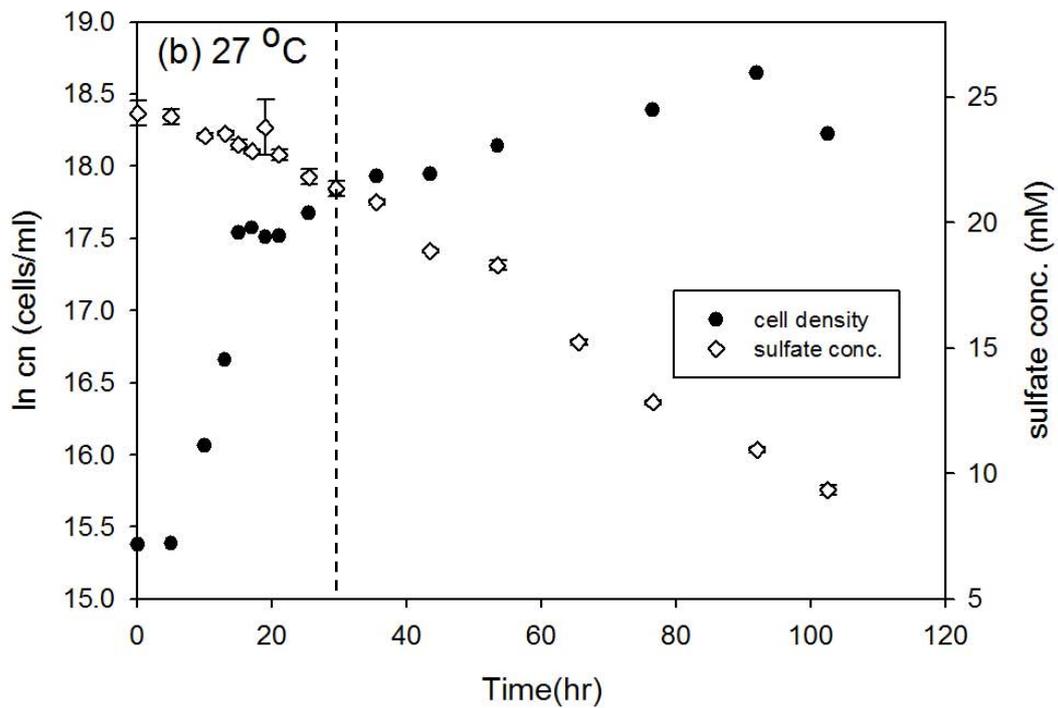
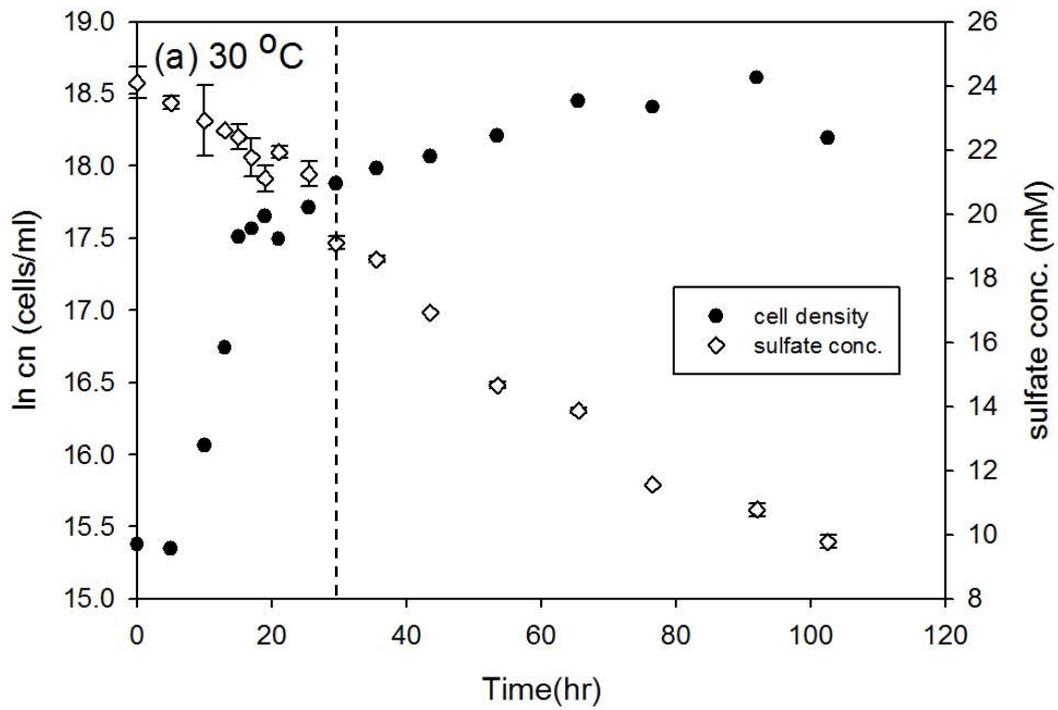


圖 3-3、*D. gigas* 在 30 °C 和 27 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 30 °C 和 27 °C 的同位素分析取樣時間分別為 29.5 和 29.5 小時 (以虛線表示)。

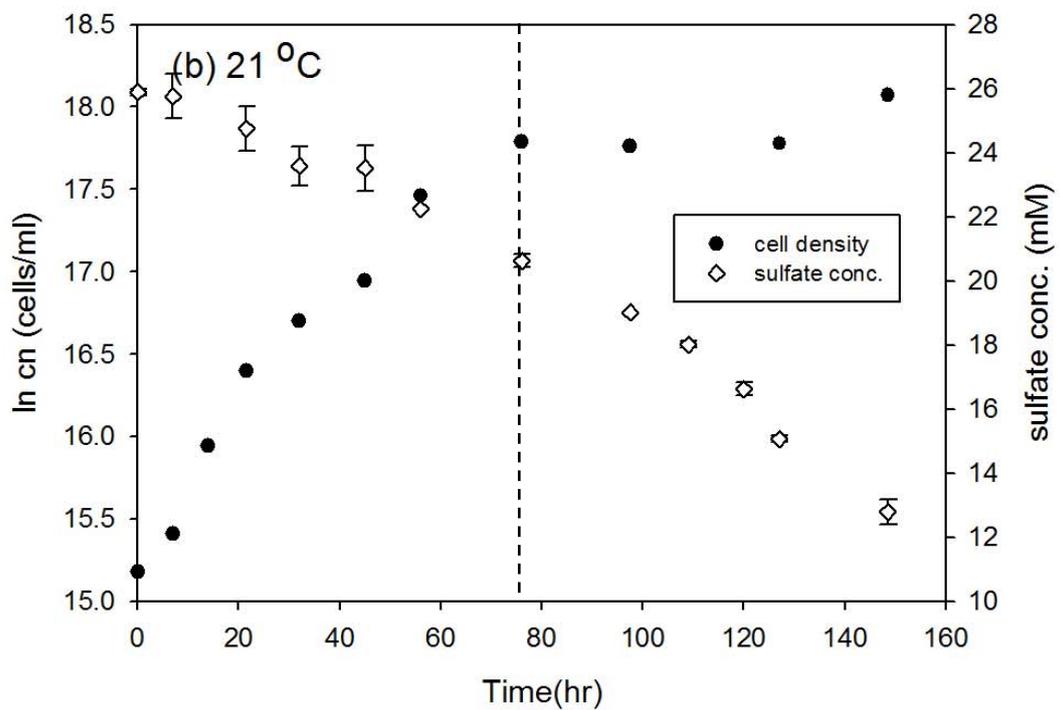
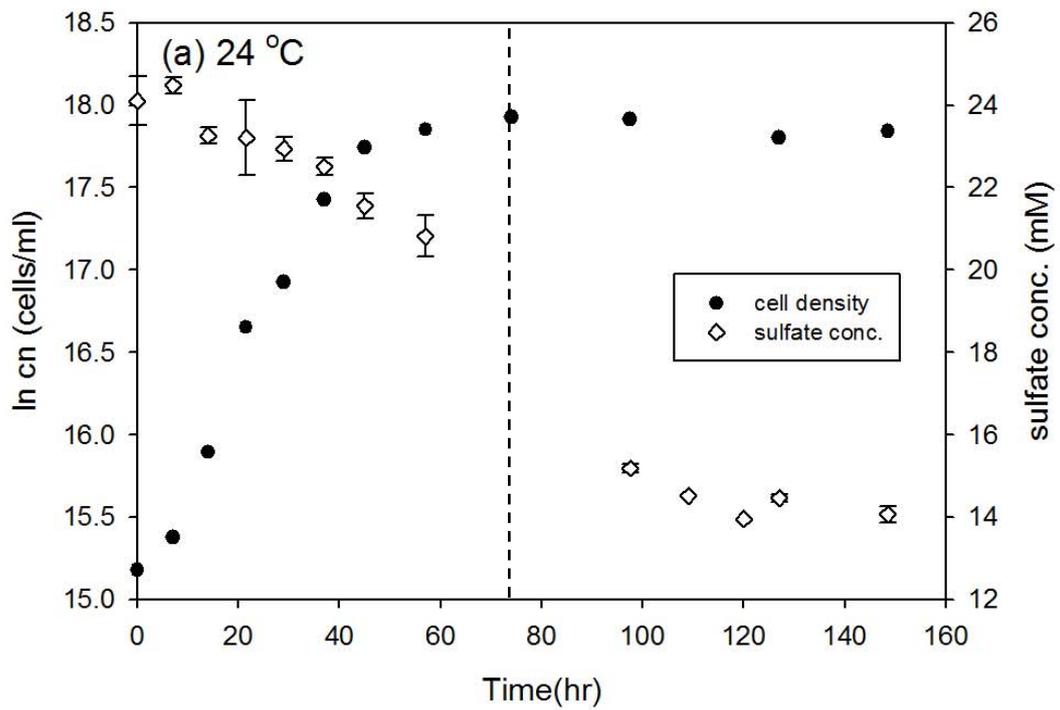


圖 3-4、*D. gigas* 在 24 °C 和 21 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 24 °C 和 21 °C 的同位素分析取樣時間分別為 74 和 76.5 小時 (以虛線表示)。

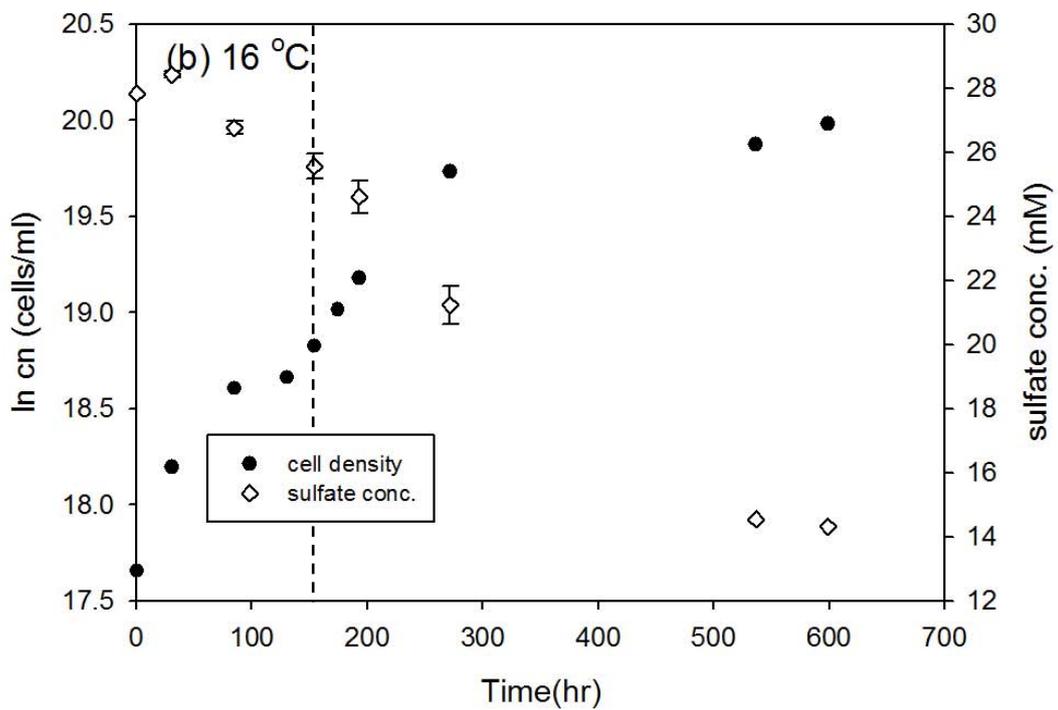
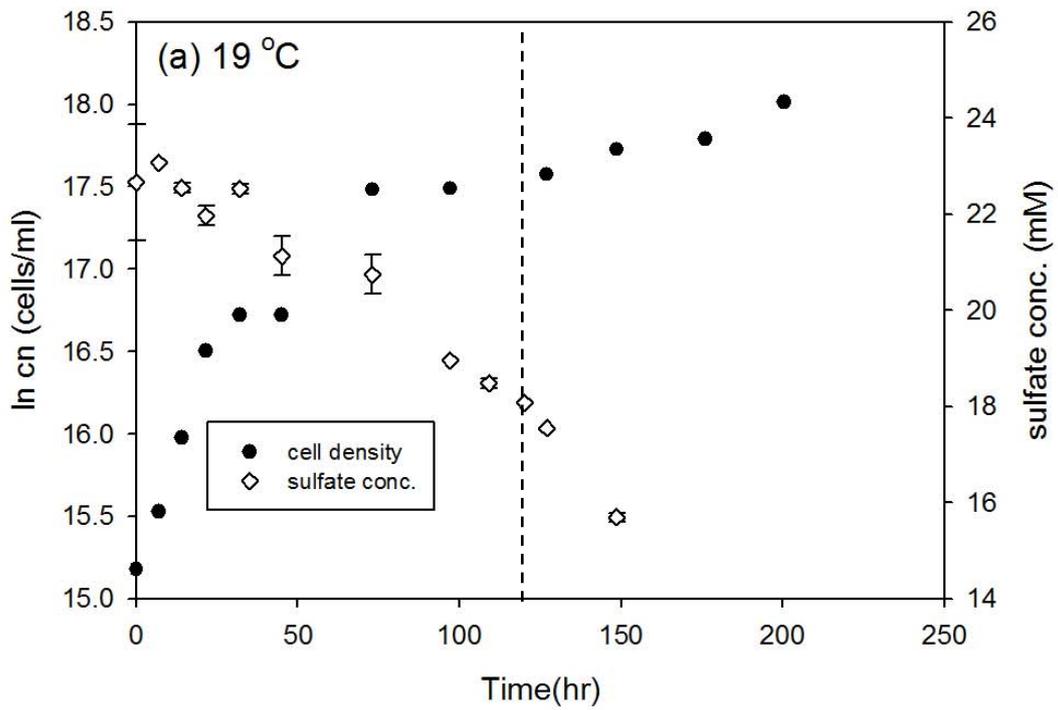


圖 3-5、*D. gigas* 在 19 °C 和 16 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 19 °C 和 16 °C 的同位素分析取樣時間分別為 121 和 130.5 小時 (以虛線表示)。

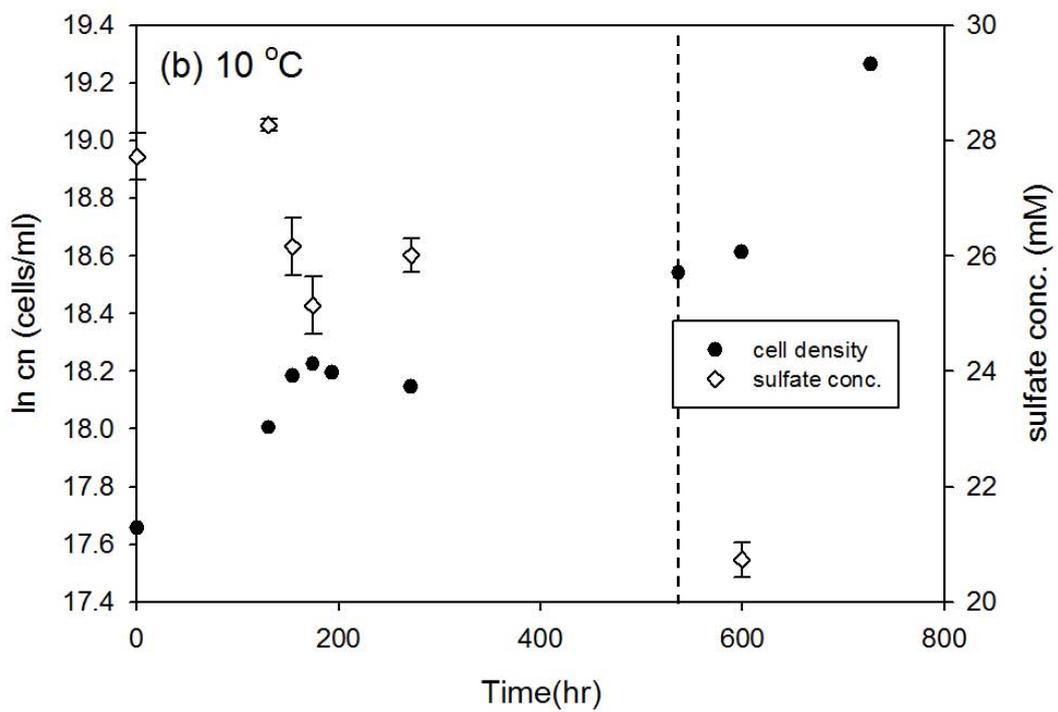
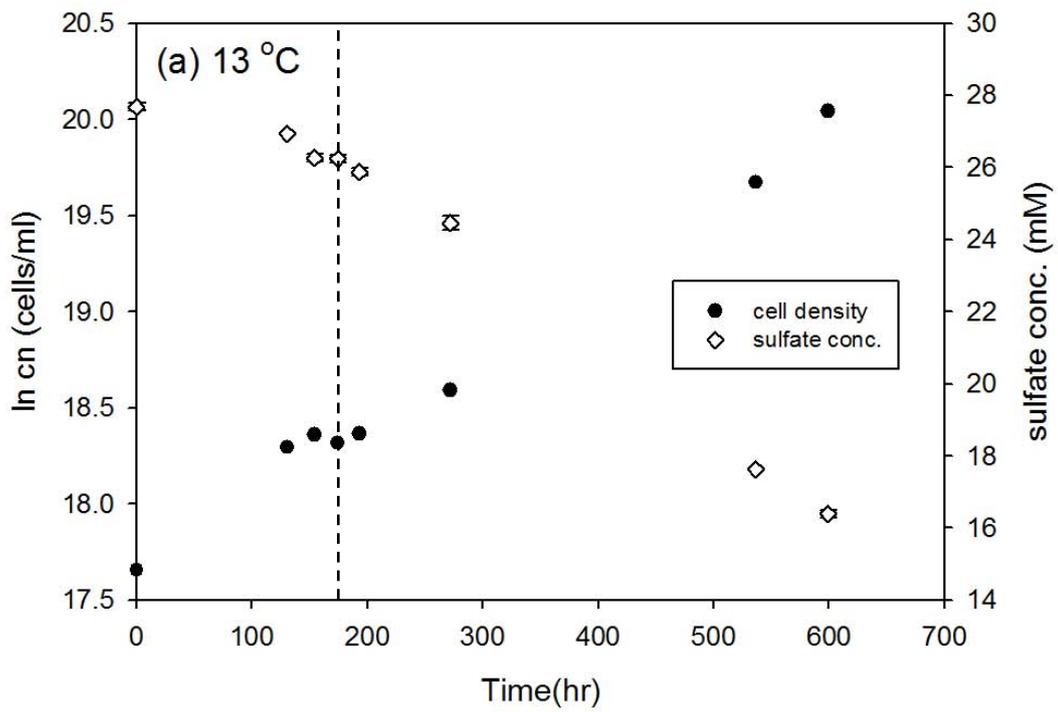


圖 3-6、*D. gigas* 在 13 °C 和 10 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 13 °C 和 10 °C 的同位素分析取樣時間分別為 174.5 和 536.5 小時 (以虛線表示)。

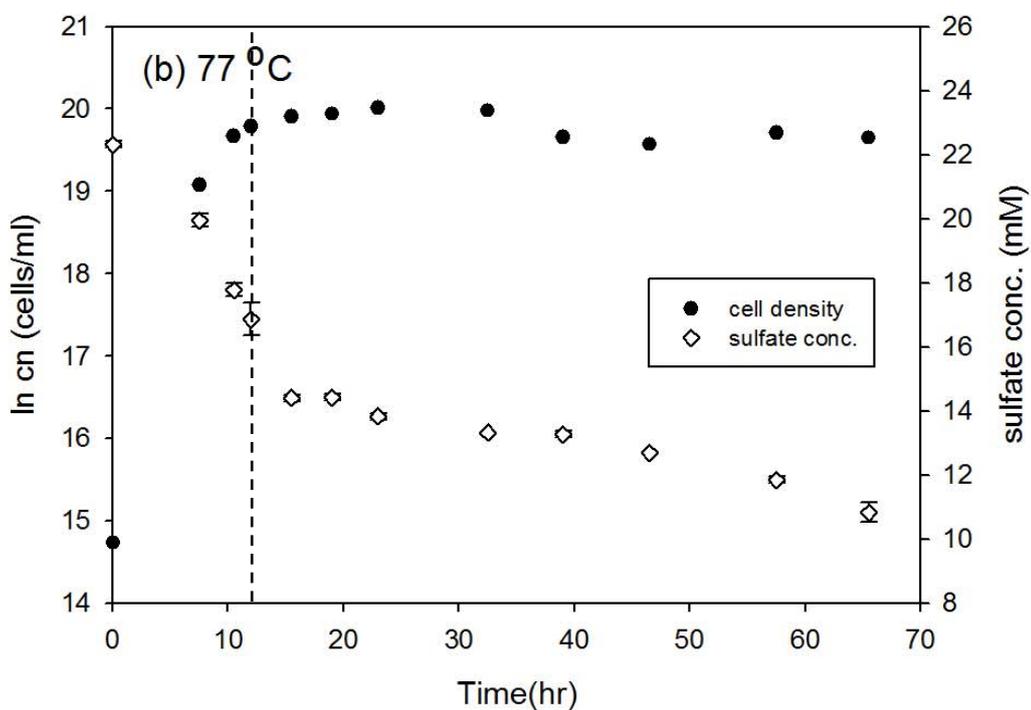
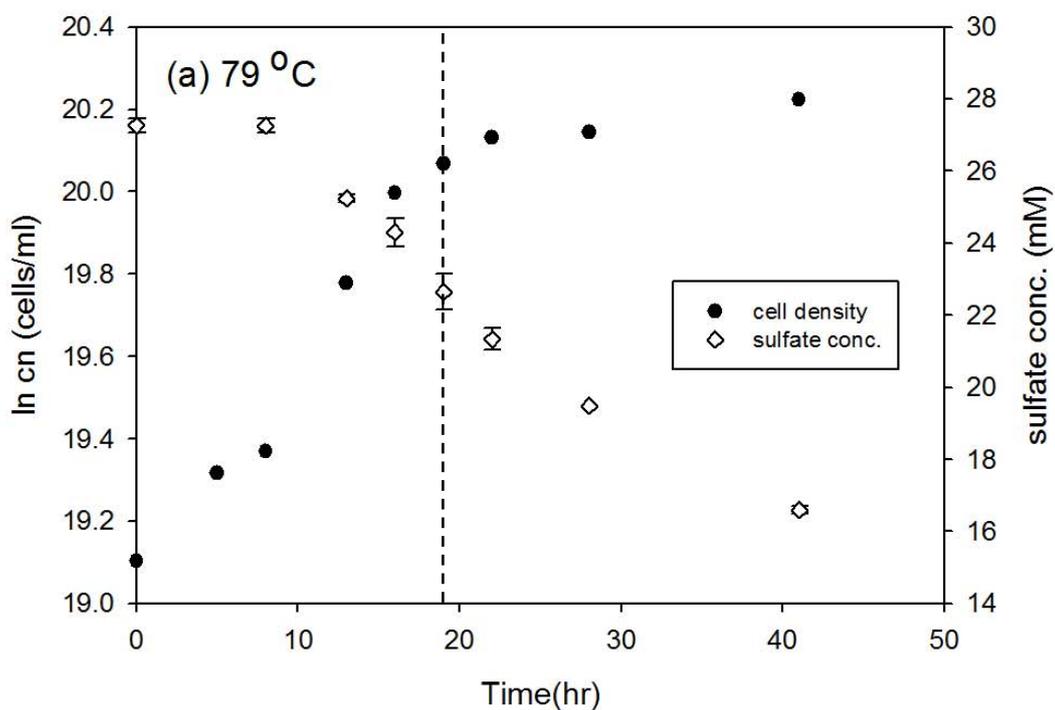


圖 3-7、*T. commune* 接近株在 79 °C 和 77 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 79 °C 和 77 °C 的同位素分析取樣時間分別為 19 和 12 小時 (以虛線表示)。

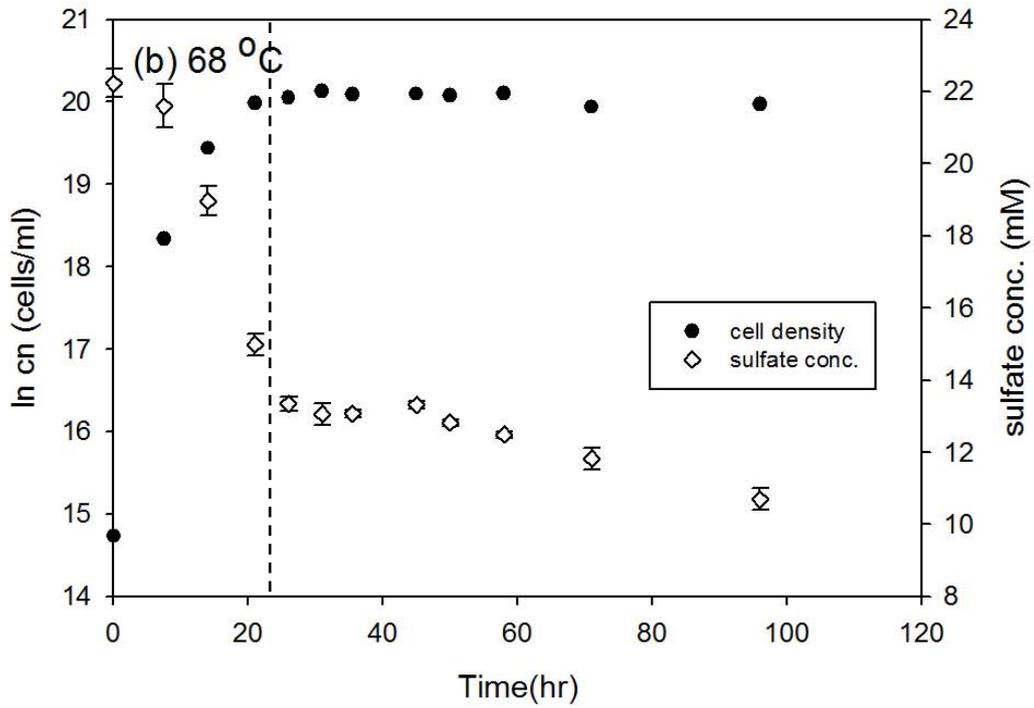
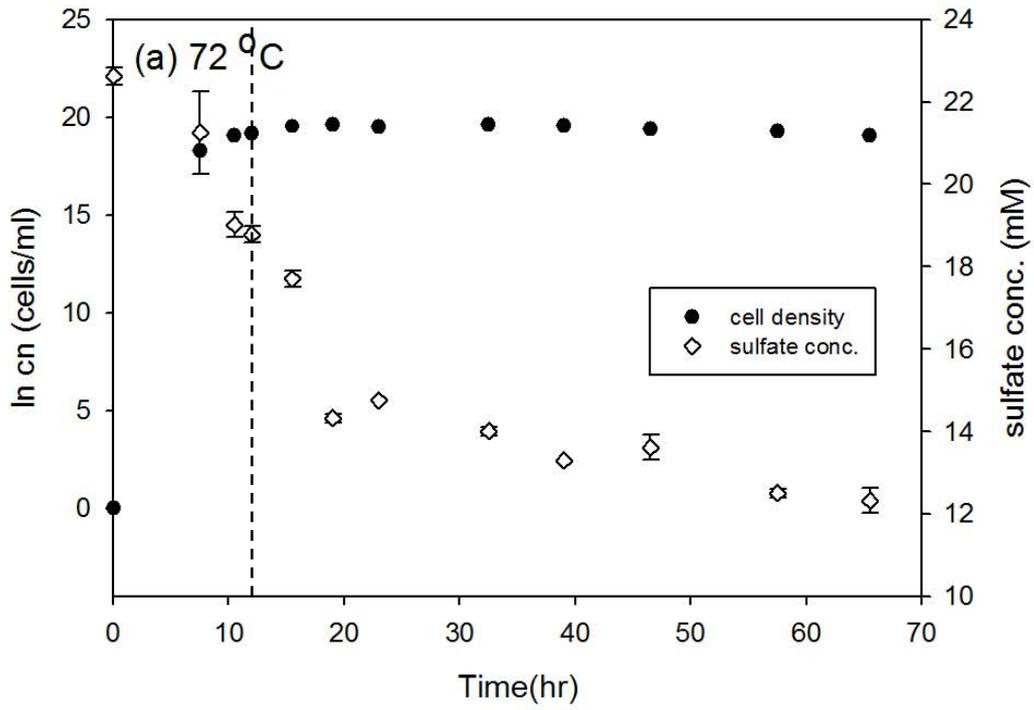


圖 3-8、*T. commune* 接近株在 72 °C 和 68 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 72 °C 和 68 °C 的同位素分析取樣時間分別為 12 和 23.5 小時 (以虛線表示)。

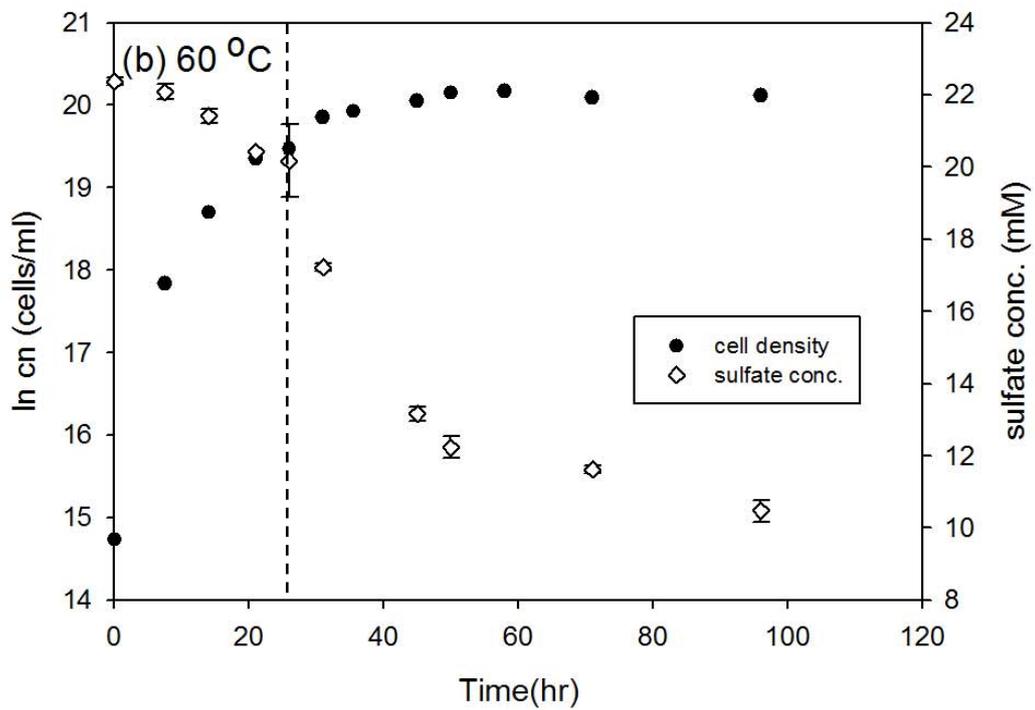
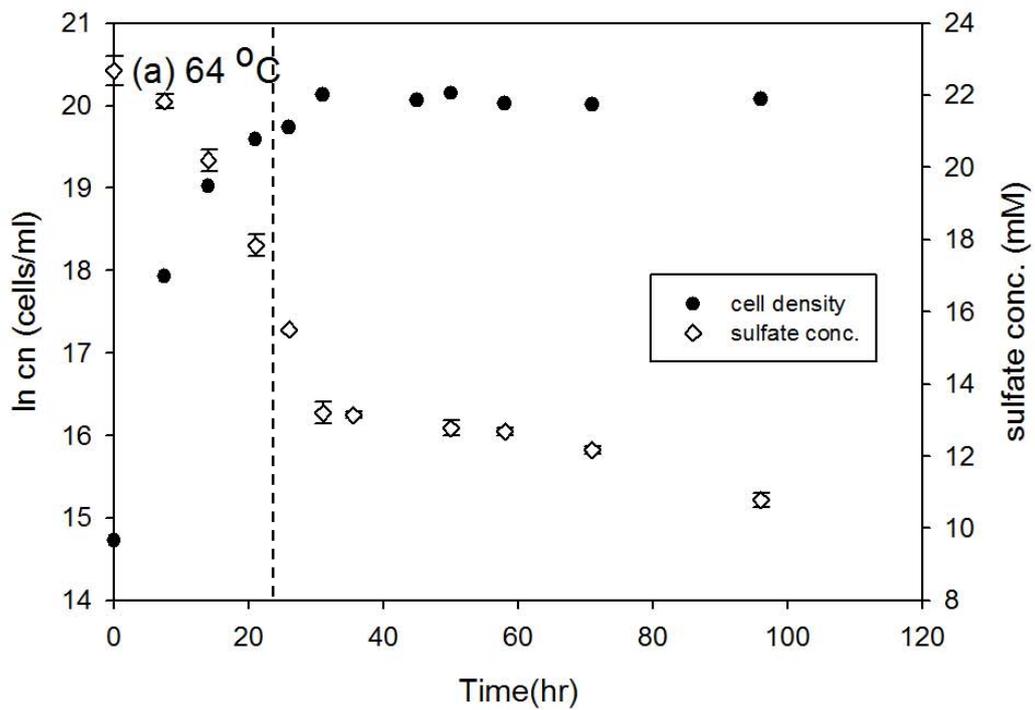


圖 3-9、*T. commune* 接近株在 64 °C 和 60 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 64 °C 和 60 °C 的同位素分析取樣時間分別為 23.5 和 26 小時 (以虛線表示)。

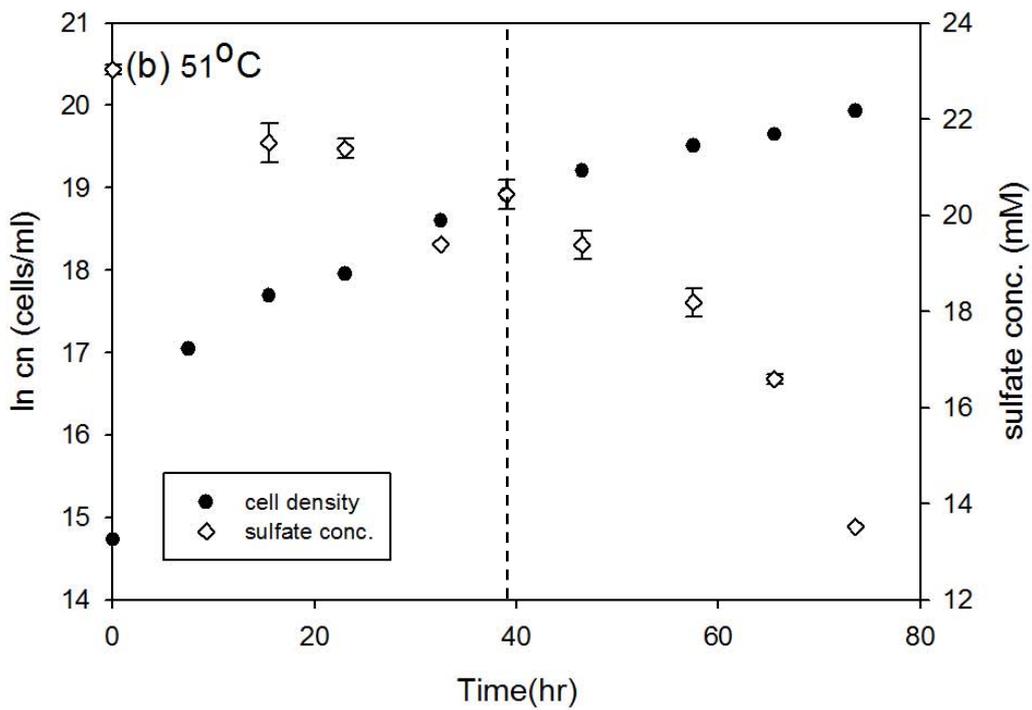
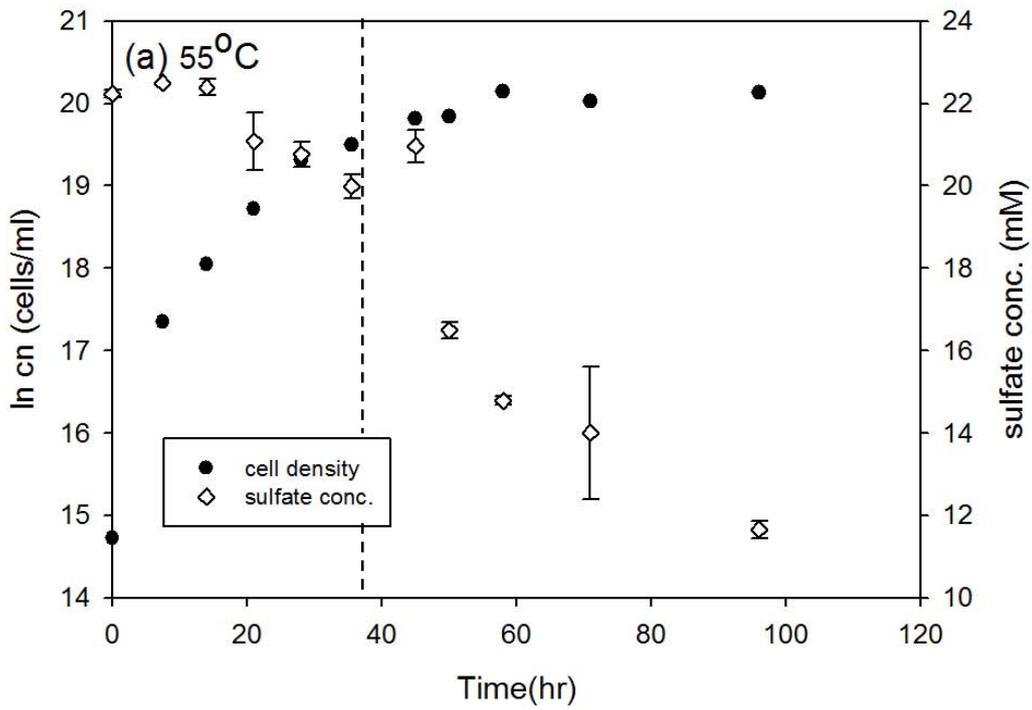


圖 3-10、*T. commune* 接近株在 55°C 和 51°C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 55°C 和 51°C 的同位素分析取樣時間分別為 36 和 39.5 小時 (以虛線表示)。

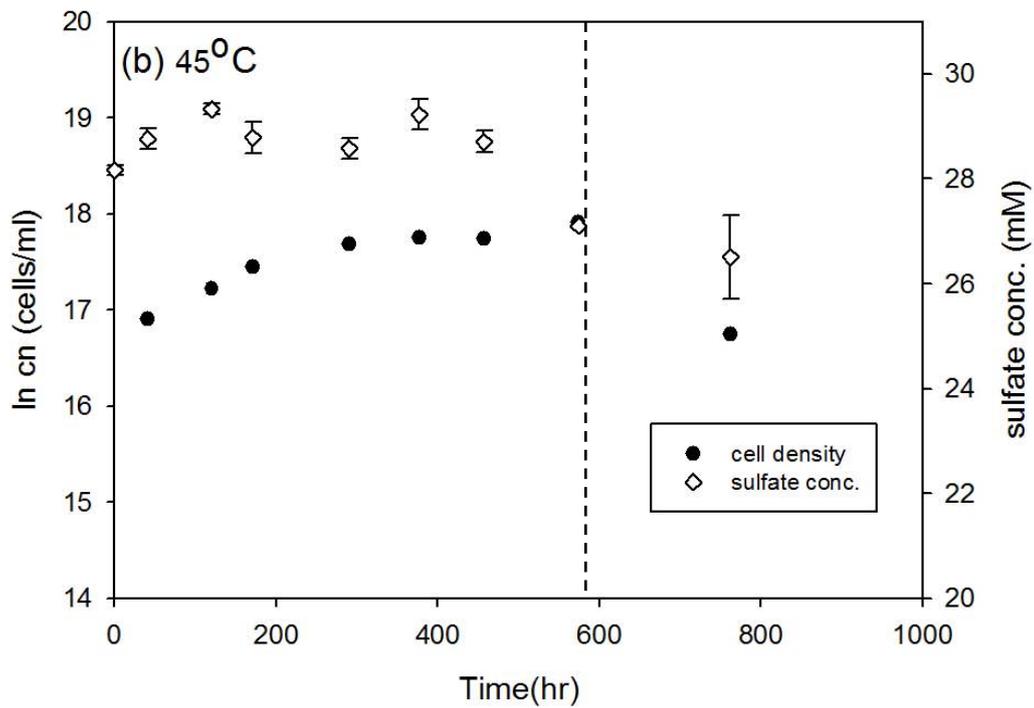
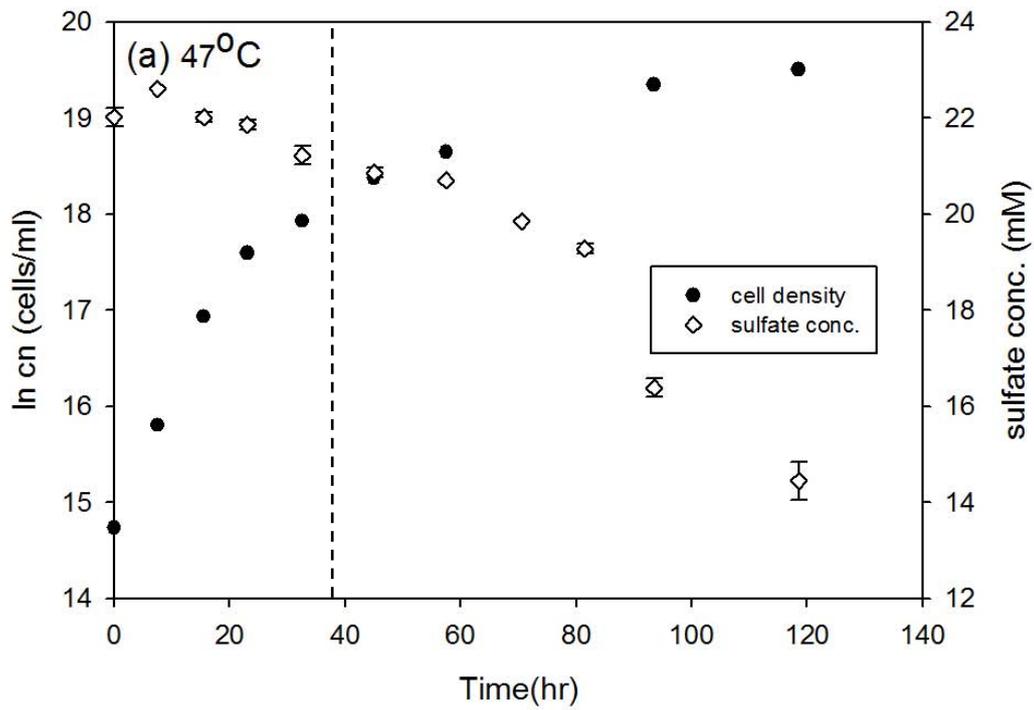


圖 3-11、*T. commune* 接近株在 47°C 和 45°C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 47°C 和 45°C 的同位素分析取樣時間分別為 39.5 和 575 小時 (以虛線表示)。

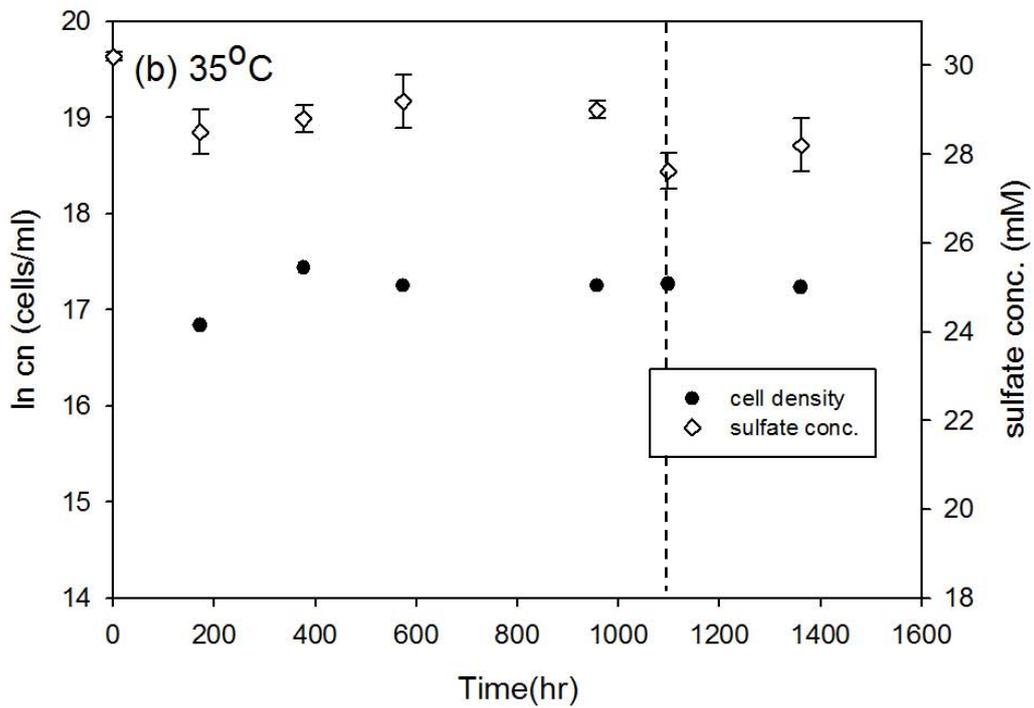
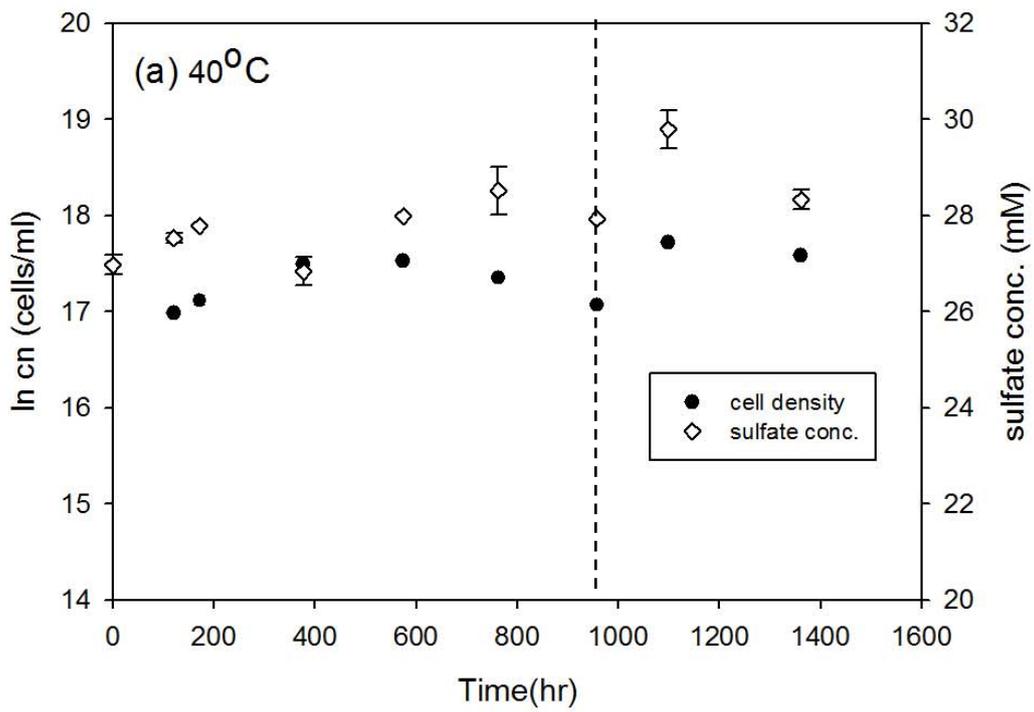


圖 3-12、*T. commune* 接近株在 40 °C 和 35 °C 之細胞生長曲線與硫酸鹽濃度變化。實驗中細胞濃度的誤差為 10%，在 40 °C 和 35 °C 的同位素分析取樣時間分別為 957 和 1098 小時（以虛線表示）。

### 3.2 細胞生長速率與細胞硫酸鹽還原速率

藉由觀察細胞濃度與硫酸鹽濃度隨時間的變化可以求得細胞生長速率與細胞硫酸鹽還原速率。*Desulfovibrio gigas* 在 30-36°C 的細胞生長速率相近 ( $\mu=0.20-0.22 \text{ h}^{-1}$ )，最大值出現在 33°C，即為 *Desulfovibrio gigas* 的最適生長溫度，高於或低於 33°C 的培養溫度，其細胞生長速率則會隨著溫度的變化而下降。*Desulfovibrio gigas* 細胞硫酸鹽還原速率則隨溫度升高而增加，10°C 和 13°C 培養的還原速度非常緩慢 (圖 3-13a)。

*Thermodesulfovibrio commune* 接近株的細胞生長速率隨溫度變化的趨勢與 *Desulfovibrio gigas* 相似，最大值出現在 72°C ( $\mu=0.15 \text{ h}^{-1}$ )，即為

*Thermodesulfovibrio commune* 接近株的

最適生長溫度，當溫度大於 72°C 時，細胞生長速率則會隨著溫度上升而下降，在 45-72°C 之間會隨溫度上升而上升，而當培養溫度在 40°C 和 35°C 時，生長十分緩慢而無法辨識。細胞硫酸鹽還原速率則在 45-72°C 之間隨溫度上升而上升，最大值出現在 77°C (56.1 fmol · day/cell)，但在 79°C 硫酸鹽還原速率下降至 29.9 fmol · day/cell (圖 3-13b)。

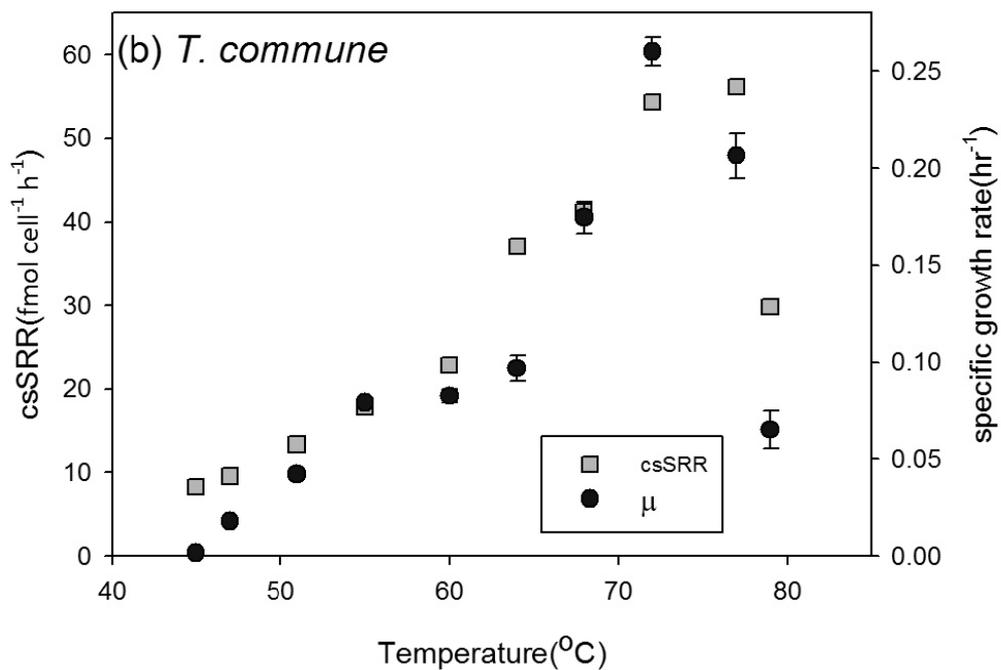
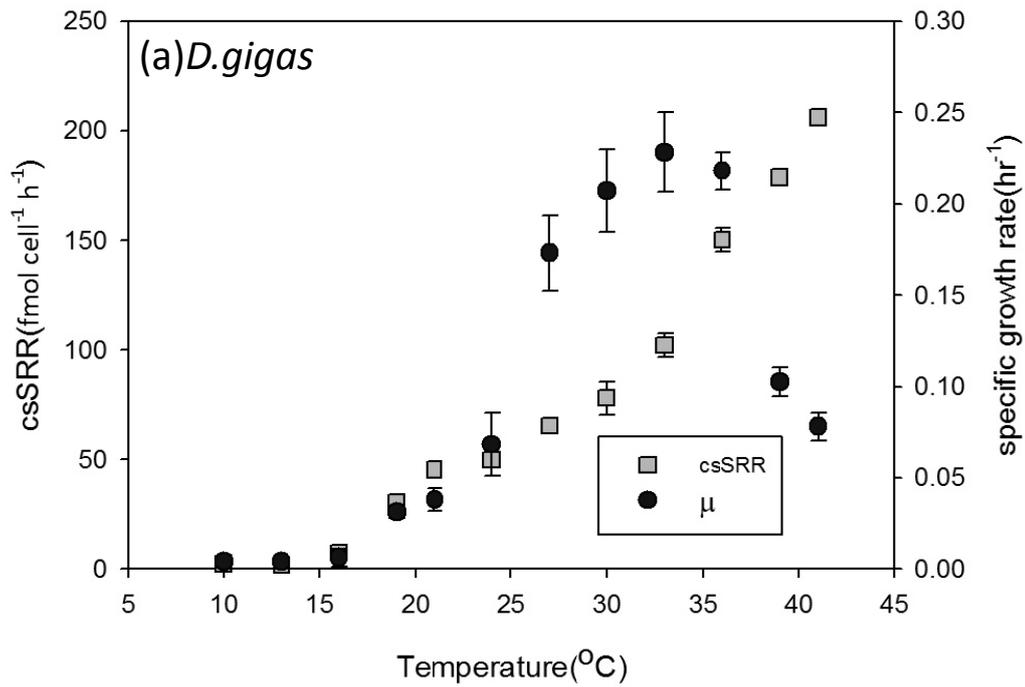


圖 3-13、兩菌株之細胞生長速率與細胞硫酸鹽還原速率隨溫度的變化。(a) *Desulfovibrio gigas* 之最適溫度為 33 °C，硫酸還原速率會隨著溫度上升而上升。(b) *Thermodesulfobacterium commune* 接近株之最適溫度為 72 °C，細胞硫酸還原速率大致會隨著溫度上升而上升，但在 79 °C 時下降。

### 3.3 硫同位素分化

同位素的分化為二重覆平均的結果，*Desulfovibrio gigas* 產生的硫同位素分化 ( $^{34}\epsilon_{\text{sulfate-sulfide}}$ ) 範圍從 10.3‰ 到 29.7‰，隨溫度的變化可分為兩個部分，以 27 °C 作為分界點，當溫度低於 27 °C 時，除了在 13 °C 出現一個相對稍高值 (29.7‰) 外，其餘的溫度產生的硫同位素分化隨溫度上升而下降，當溫度在 27 °C 以上時，硫同位素分化則會隨溫度上升而上升 (圖 3-14a)。

*Thermodesulfobacterium commune* 接近株產生的硫同位素分化範圍從 8.2 ‰ 到 31.6 ‰，硫同位素分化大小隨溫度沒有明顯的變化趨勢，大部分培養溫度產生的硫同位素分化在 8.2 和 18.9 ‰ 之間變動，僅在 68 °C 出現一特殊高值 (31.6 ‰) (圖 3-14b)。

多重硫同位素分析的分析結果顯示 *Desulfovibrio gigas* 和 *Thermodesulfobacterium commune* 接近株產生的  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{sulfate-sulfide}}$  值範圍分別為 0.05‰ 到 0.31‰ 和 0.00‰ 到 0.29‰ 之間，隨溫度的變化趨勢與硫同位素分化相近 (圖 3-15)

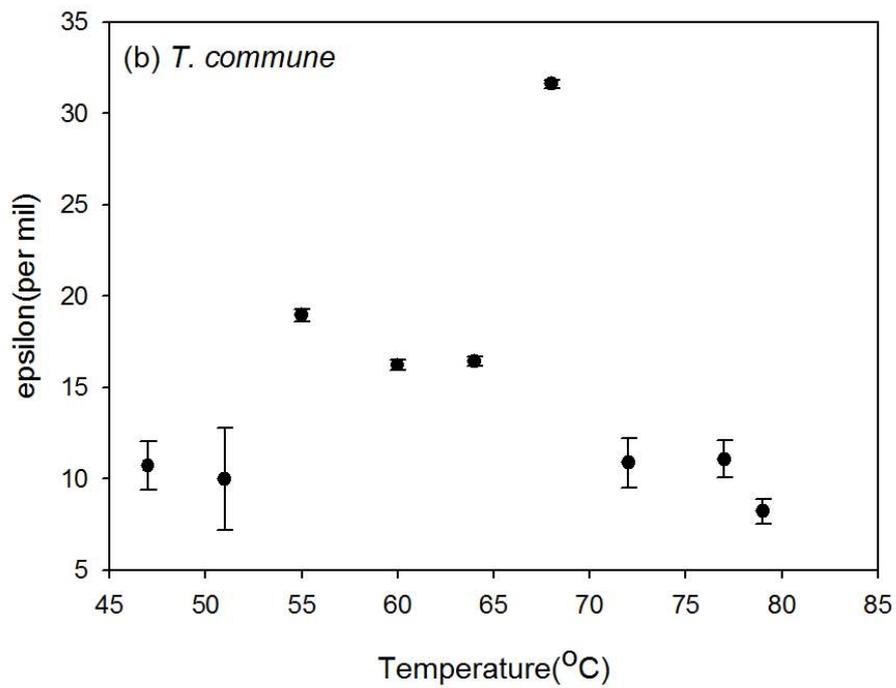
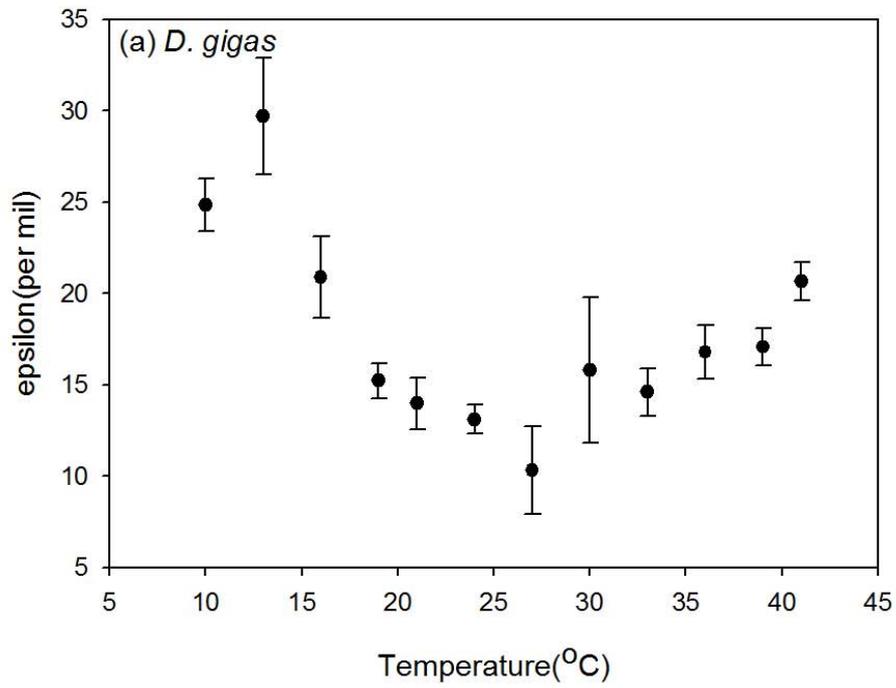


圖 3-14、兩菌株產生之硫同位素分化 ( $^{34}\epsilon$ ) 隨溫度的變化。(a) *Desulfovibrio gigas* 硫同位素分化隨溫度大致呈 V 字型的變化。(b) *Thermodesulfobacterium commune* 接近株產生之硫同位素分化隨溫度無明顯規律性變化，僅在 68°C 出現一高值。

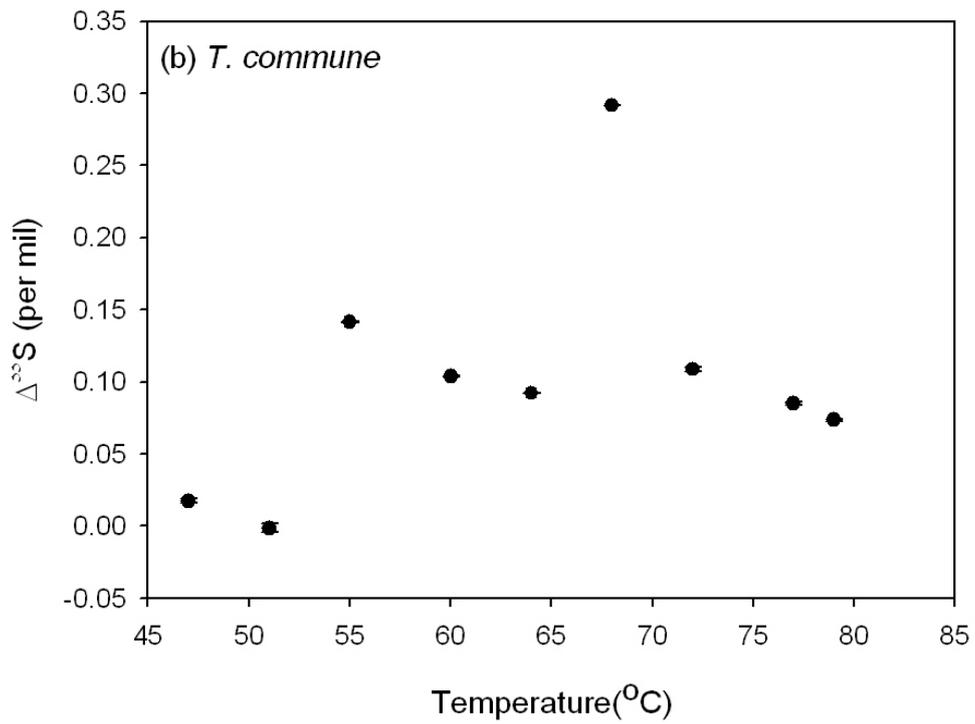
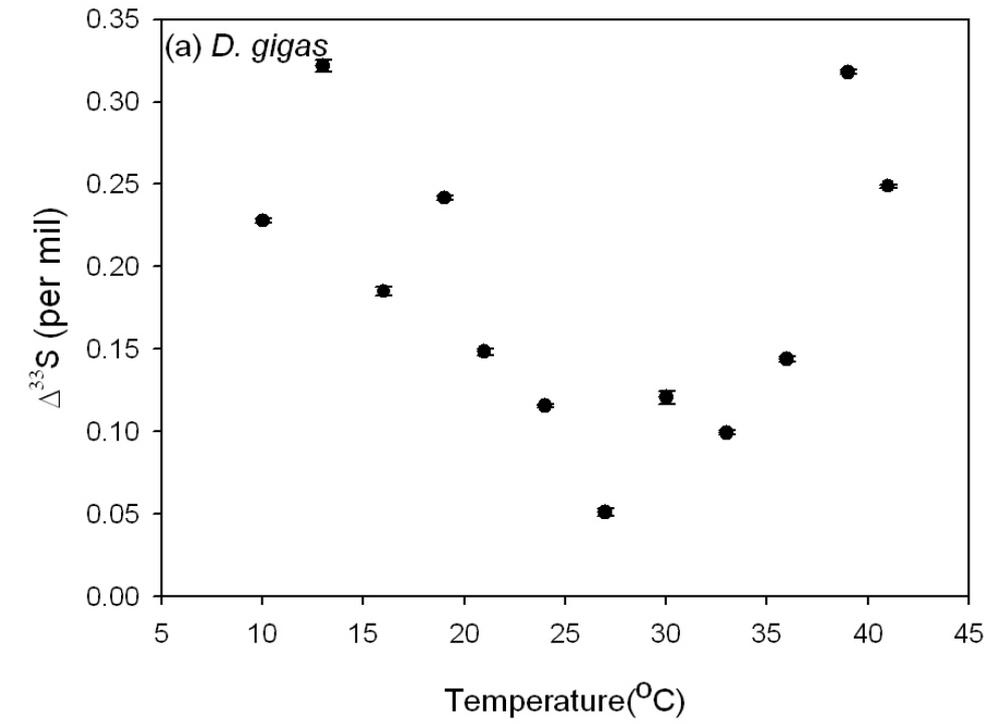


圖 3-15、兩菌株產生之  $\Delta^{33}\text{S}$  值隨溫度的變化。兩菌株產生之  $\Delta^{33}\text{S}$  值隨溫度的變化趨勢與硫同位素分化相近。

## 第四章 討論

### 4.1 細胞生理特性與溫度的關係

溫度是影響微生物代謝反應的重要因素之一，細胞生長速率隨溫度的變化反應溫度對於細胞生理特性的影響，細胞生長速率最快的溫度即為最適生長溫度，當溫度高於或低於最適生長溫度時，細胞內部營養物質的運輸與蛋白質的運作會開始無法正常運作使得細胞生長速率下降。硫酸鹽還原速率隨溫度增高有增加的趨勢，反應當溫度升高反應速率也會隨著增加。根據兩菌株在不同溫度下的生長曲線，可以計算出細胞生長速率，得知 *Desulfovibrio gigas* 和 *Thermodesulfobacterium commune* 接近株的最適生長溫度分別為 33 °C 和 72 °C，前者與前人研究結果相同，後者則稍高於同屬菌株 (Rabus, 2006)。比較細胞生長速率與細胞硫酸鹽還原速率隨溫度的變化，發現兩菌株之細胞硫酸鹽還原速率最快的溫度會高於細胞最適生長溫度，許多前人研究結果中也可發現此現象 (Canfield et al., 2006; Hoek et al., 2006; Mitchell et al., 2009)，表示當溫度高於最適生長溫度時，大部分經由硫酸鹽還原所產生能量會用於修補細胞而不是繼續增加細胞數目。

### 4.2 硫同位素分化與前人研究比較

*Desulfovibrio gigas* 和 *Thermodesulfobacterium commune* 接近株在不同溫度培養產生之硫同位素分化的變化範圍分別為 19.3‰ 和 23.4‰，此變化範圍未超過前人同樣以溫度反應槽進行純菌株之硫同位素分化的實驗結果 (Canfield et al., 2006; Hoek et al., 2006; Johnston et al., 2007; Mitchell et al., 2009)。兩菌株產生的最大硫同位素分化分別為 29.7 ‰ 和 31.6 ‰，符合前人研究硫酸還原菌純菌株的硫同位素分化大小的範圍 (Canfield, 2001a)。雖然本研究符合純菌培養之硫同位素分化情形，但經過仔細比較也發現本研究培養的菌株與前人研究之同種菌株所產生的分化大小與分化範圍並不相同。*Desulfovibrio* 在最適生長溫度產生的同位素分化介於 2.0‰ 和 5.4‰ 之間，使用溫度梯度反應槽的多溫度培養則可產生

大約 8‰ 的分化大小變化，明顯小於本研究培養的 *D. gigas* 之分化結果；*Thermodesulfobacterium commune* 在最適生長溫度產生的同位素分化為 5.0‰，也小於本研究培養的 *Thermodesulfobacterium commune* 接近株 (Canfield et al., 2006; Detmers et al., 2001)。造成結果不同的原因可能是由於不同菌株的培養條件並不完全相同，或是即使為相同種的菌株對於硫同位素分化的能力仍不相同。

#### 4.3 細胞硫酸鹽還原速率與硫同位素分化的關係

有些研究發現細胞硫酸鹽還原速率與硫同位素分化大小為反比關係，推測此關係來自於當硫酸鹽還原速率越快時，表示細胞內部 APS 還原為亞硫酸鹽與亞硫酸鹽還原為硫化氫步驟中電子的提供速度也越快，使得大部分細胞內部的亞硫酸鹽直接形成硫化物而不會在細胞內部反覆作用，造成硫同位素分化較小 (Hoek et al., 2006; Kaplan and Rittenberg, 1964; Sim et al., 2011)，但是許多研究結果中此關係未必存在 (Canfield et al., 2006; Detmers et al., 2001; Johnston et al., 2007)。本研究結果顯示兩菌株的硫同位素分化與細胞硫酸鹽還原速率之間無明顯的關係 (圖 4-1)。

細胞硫酸鹽還原速率的改變是硫酸還原過程中各個步驟綜合產生的結果，因此各種環境因子的變化、不同菌種之間生理特性的差異、有機碳供應速度造成電子提供速度的差異，或者使用不同的培養方式 (如：批次式培養和連續培養槽) 等，都有可能改變細胞硫酸鹽還原速率。以上這些差異對細胞內部各步驟的反應速率也會產生不同影響，而硫同位素分化程度可以根據模型由內部質量流的改變情形加以推估，但是內部質量流的變化卻未必會對細胞硫酸鹽還原速率產生相同的系統性影響，因此細胞硫酸鹽還原速率的變化無法對硫同位素分化程度產生一致的影響，而是與造成細胞硫酸鹽還原速率變化的因子如何影響細胞內部質量流有關。

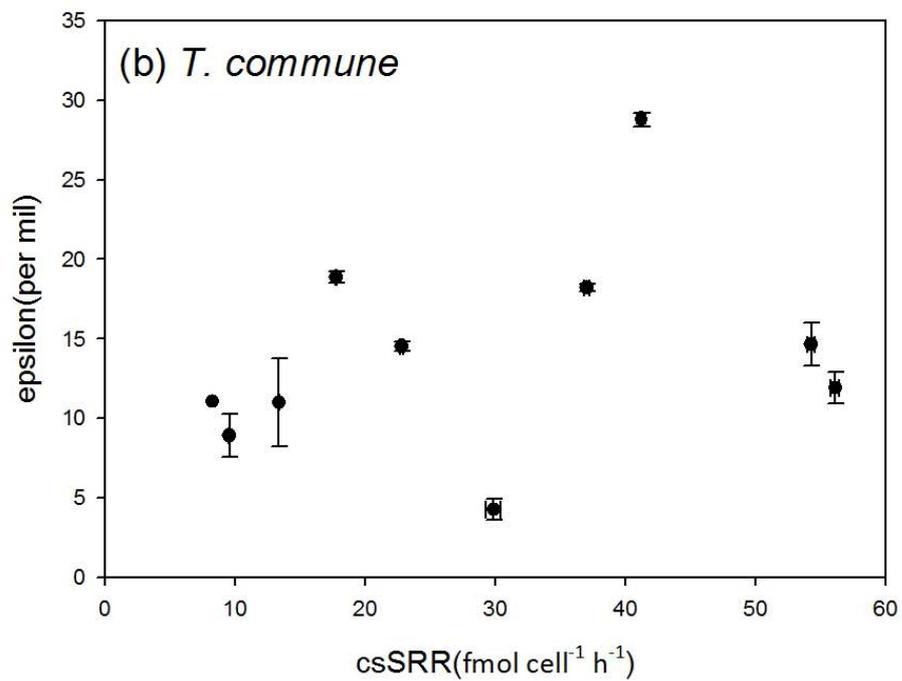
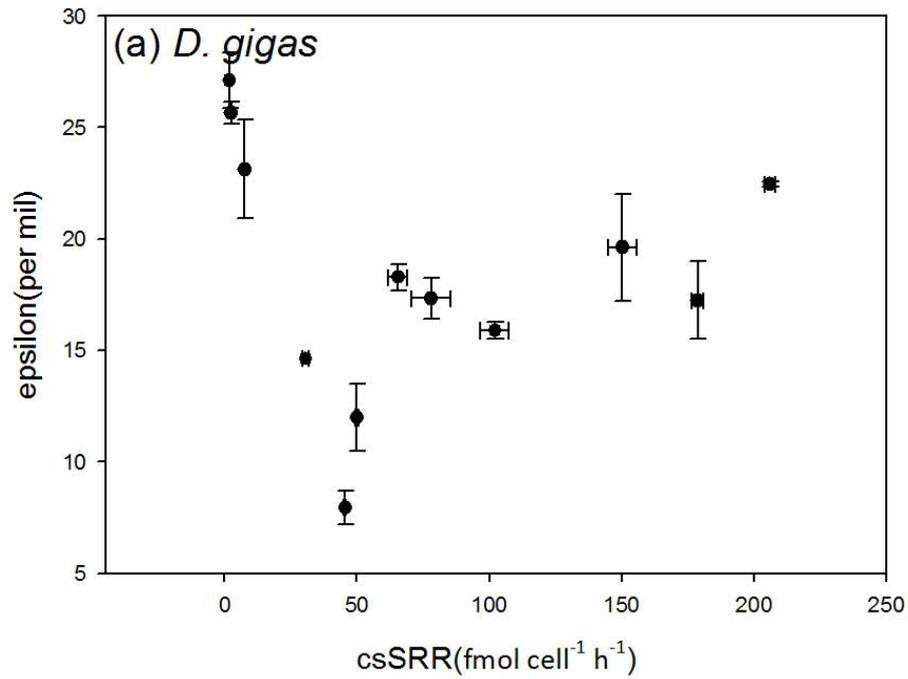


圖 4-1、細胞硫酸鹽還原速率與硫同位素分化之間的關係。本研究結果顯示兩菌株的硫同位素分化與細胞硫酸鹽還原速率之間無明顯的關係。

#### 4.4 溫度與硫同位素分化的關係

根據 Farquhar 模型，若僅考慮細胞膜生理特性對於溫度的反應，則可推估溫度對於硫同位素分化的影響，為兩者之間建立理論模型。菌株的細胞膜對於溫度十分敏感，當溫度過低時會使得細胞膜上的運輸蛋白質無法作用造成細胞膜的通透性降低，隨著溫度增加細胞膜的通透性與細胞體內酵素作用也會跟著增加，但是當溫度過高時會使細胞膜變得十分不穩定造成細胞膜裂解 (lyse) (Scherer and Neuhaus, 2006)。因此當溫度升高細胞膜通透性增加會使得反向質量流增加 ( $f_3$  變小)，使得硫同位素分化程度會隨著溫度的上升而增加，但是當溫度持續上升，細胞體內酵素作用變得更加活躍，造成細胞體內亞硫酸鹽大部分會直接還原形成硫化物 ( $f_3$  變大) 造成硫同位素分化程度變小，形成最大分化出現在中間溫度，最小分化則出現在最高與最低溫度。

硫同位素分化與溫度之間的理論模型在自然環境中卻未必存在，前人研究環境中的硫酸還原菌族群，發現以醋酸和乙醇作為電子提供者時，硫同位素分化程度與溫度之間的關係會符合理論模型，但若以乳酸作為電子提供者，硫同位素分化隨溫度變化並無明顯改變 (Canfield, 2001b)。本研究的兩菌株均使用乳酸為電子提供者，在其生長溫度範圍內隨著溫度的改變具有不同的硫同位素分化變化趨勢 (圖 3-3)，兩者都與理論模式不同，*Thermodesulfobacterium commune* 接近株無特定變化趨勢，*Desulfovibrio gigas* 分化趨勢則與理論模型趨勢相反，硫同位素分化隨溫度的變化為最小分化出現在中間溫度，較大分化則出現在最高溫與最低溫。前人純菌實驗中分別以乳酸與氫氣作為電子提供者的培養結果，也發現相似的結果，並不符合理論模型中硫同位素分化隨溫度變化的趨勢，卻有與其相反的變化趨勢存在 (Canfield et al., 2006; Hoek et al., 2006)。Hoek (2006) 培養嗜高溫菌 *Thermodesulfatator indicus* 並且利用 Farquhar 模型配合兩個主要影響分化結果的過程 ( $f_3$  和  $f_5$ ) 得到不同  $f_3$  和  $f_5$  值與相對應分化大小的模型，討論不同溫度之硫同位素分化可能對應的  $f_3$  和  $f_5$  值 (圖 4-2)，推測當溫度由低溫到

中溫時， $f_3$  值不變  $f_5$  值變大，表示細胞內部大部分硫酸鹽直接轉換為硫化氫使硫同位素分化減小，當溫度由中溫到高溫時， $f_5$  值不變  $f_3$  值變小，表示硫酸鹽在細胞膜的交換增加使硫同位素分化增加，產生與理論模型相反的硫同位素分化變化趨勢 (Hoek et al., 2006)。但由於此模型中特定硫同位素分化大小可以對應的  $f_3$  和  $f_5$  值並非為單一值，兩者可能有許多不同的組合，因此模型中僅能對細胞內的質量流的變化做定性的描述與猜測。

總結上述討論可知我們無法使用理論模型解釋溫度如何影響硫同位素分化，可能由於理論模型僅考慮溫度對於細胞膜的影響使得模型過於簡化無法使用。

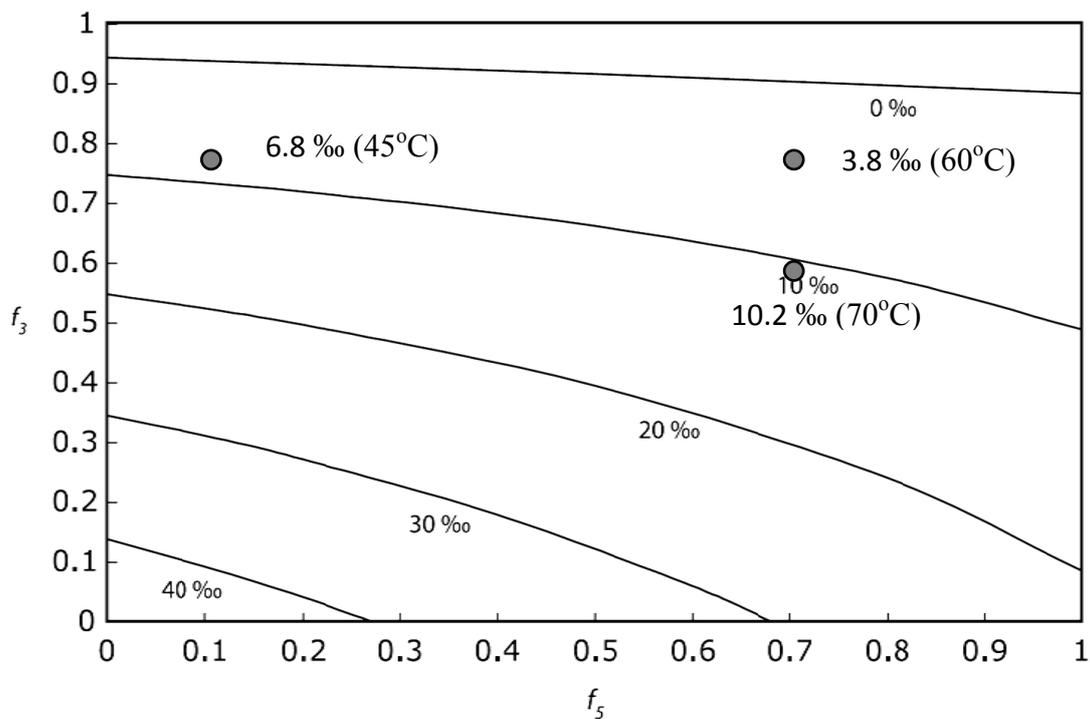


圖 4-2、不同  $f_3$  和  $f_5$  值與相對應分化大小的模型。Hoek et al. (2006) 利用培養嗜高溫菌 *Thermodesulfator indicus* 討論不同溫度之硫同位素分化可能對應的  $f_3$  和  $f_5$  值，溫度由低溫 (45°C) 到中溫(60°C) 時， $f_3$  值不變  $f_5$  值變大，當溫度由中溫 (60°C) 到高溫 (70°C) 時， $f_5$  值不變  $f_3$  值變小，產生與理論模型相反的硫同位素分化變化趨勢 (修改 Hoek et al., 2006)。

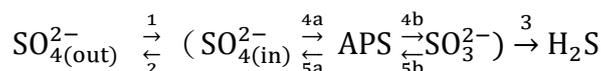
## 4.5 硫酸鹽還原作用之多重硫同位素分化模型

經由硫酸還原菌所產生的硫同位素分化與細胞內部酵素催化的複雜步驟相關，利用分化模型可以預測細胞內部作用如何影響最終硫同位素分化的大小。Farquhar 模型中所使用的分化係數 ( $^{34}\alpha$  和  $^{33}\lambda$ ) 皆為定值，常溫下熱力學平衡反應計算的結果，但是研究發現若  $^{34}\alpha$  和  $^{33}\lambda$  值均為定值時，無法完全涵蓋觀察到的多重硫同位素分析結果，因此  $^{34}\alpha$  和  $^{33}\lambda$  值應隨著不同條件而改變，而溫度顯然是其中一項重要函數 (Johnston et al., 2007)。由於 Brunner and Bernasconi 模型加入為更複雜的反應 (Brunner et al., 2005)，其中間物質是否存在以及其重要性仍需要更多的驗證，此外本研究結果中硫同位素分化並超過46%，因此本研究將先以 Farquhar 模型為基礎，配合不同溫度下熱力學平衡反應所得到的分化係數，經由計算建立多重硫同位素分化網格進行細胞內部質量流的探討。

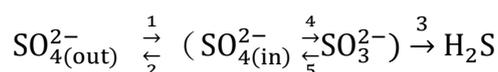
### 4.5.1 多重硫同位素分化網格計算方法

多重硫同位素分化網格以  $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{S}}$  和  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{S}}$  為兩軸，改變細胞內部不同還原步驟之間質量流的比例 ( $f_3$  和  $f_5$ ) 經由計算所得到，推導過程以下說明之。

微生物進行硫酸鹽還原模型如下：



因為細胞內的硫酸鹽形成 APS 的過程不會產生同位素分化，所以可將上式簡化為



每個步驟中具有不同的分化係數，分化係數之間的關係如下：

$$\alpha_1\alpha_2 = 1, \alpha_4\alpha_5 = 1$$

J 表示質量流，r 表示同位素的組成，根據物質守恆可得：

$$J_4r_4 = J_3r_3 + J_5r_5 \quad (1)$$

硫酸鹽進出細胞的質量流與細胞內部硫酸鹽與亞硫酸鹽之間轉換的質量流分別以  $f_3$  和  $f_5$  代表，

$$f_3 = \frac{J_3}{J_2 + J_3}, f_5 = \frac{J_5}{J_3 + J_5}$$

由於  $J_3 + J_5 = J_4 = 1$ ，因此  $f_5 = J_5$ ， $f_3 = 1 - f_5$ ，(1) 式可簡化為：

$$r_4 = J_3 r_3 + J_5 r_5 \quad (2)$$

根據分化係數 ( $\alpha$ ) 的定義，可列出下列的式子：

$$r_4 = r_{\text{SO}_4\text{-in}} \cdot \alpha_4 \quad (3)$$

$$r_3 = r_{\text{H}_2\text{S}} \quad (4)$$

$$r_5 = r_{\text{SO}_3^{2-}} \cdot \alpha_5 \quad (5)$$

$$\text{將 } r_{\text{SO}_3^{2-}} \cdot \alpha_3 = r_{\text{H}_2\text{S}}, \text{ 帶入 (5), 得到 } r_5 = \frac{r_{\text{H}_2\text{S}} \cdot \alpha_5}{\alpha_3} \quad (6)$$

將 (3)、(4) 和 (6) 式帶入 (2) 式中

$$r_{\text{SO}_4\text{-in}} \cdot \alpha_4 = (1 - f_5)r_{\text{H}_2\text{S}} + f_5 \cdot \frac{r_{\text{H}_2\text{S}} \cdot \alpha_5}{\alpha_3}$$

$$r_{\text{SO}_4\text{-in}} = \frac{(1-f_5)r_{\text{H}_2\text{S}}}{\alpha_4} + f_5 \cdot \frac{r_{\text{H}_2\text{S}} \cdot \alpha_5}{\alpha_3 \alpha_4}$$

$$r_{\text{SO}_4\text{-in}} = r_{\text{H}_2\text{S}} \left[ \frac{1-f_5}{\alpha_4} + \frac{f_5 \cdot \alpha_5^2}{\alpha_3 \alpha_4} \right]$$

$$r_{\text{SO}_4\text{-in}} = r_{\text{H}_2\text{S}} \left[ (1 - f_5)\alpha_5 + \frac{f_5 \cdot \alpha_5^2}{\alpha_3} \right]$$

$$r_{\text{SO}_4\text{-in}} = r_{\text{H}_2\text{S}} \alpha_5 \left[ (1 - f_5) + \frac{f_5 \cdot \alpha_5}{\alpha_3} \right] \quad (6)$$

細胞內的硫酸鹽同樣符合物質守恆可得

$$J_1 r_1 = J_2 r_2 + J_3 r_3 \quad (7)$$

$$f_3 = \frac{J_3}{J_2 + J_3}, f_2 = \frac{J_2}{J_2 + J_3}$$

因為  $J_2 + J_3 = J_1 = 1$ ，所以  $f_3 = J_3$ ， $J_2 = 1 - J_3 = 1 - f_3$ ，(7) 式可簡化為：

$$r_1 = J_2 r_2 + J_3 r_3 \quad (8)$$

根據分化係數 ( $\alpha$ ) 的定義，可列出下列的式子：

$$r_1 = r_{\text{SO}_4\text{-out}} \cdot \alpha_1 \quad (9)$$

$$r_2 = r_{\text{SO}_4\text{-in}} \cdot \alpha_2 \quad (10)$$

$$r_3 = r_{\text{H}_2\text{S}} \quad (11)$$

將 (9)、(10) 和 (11) 式帶入 (8) 式中

$$r_{\text{SO}_4\text{-out}} = r_{\text{SO}_4\text{-in}} \cdot \frac{\alpha_2}{\alpha_1} \cdot (1 - f_3) + \frac{r_{\text{H}_2\text{S}} f_3}{\alpha_1}$$

再將 (6) 式帶入

$$r_{\text{SO}_4\text{-out}} = \frac{1}{\alpha_1^2} \cdot (1 - f_3) \left( r_{\text{H}_2\text{S}} \alpha_5 \left[ (1 - f_5) + \frac{f_5 \cdot \alpha_5}{\alpha_3} \right] \right) + \frac{r_{\text{H}_2\text{S}} f_3}{\alpha_1}$$

$$r_{\text{SO}_4\text{-out}} = r_{\text{H}_2\text{S}} \left( \frac{\alpha_5 (1 - f_3) \left[ (1 - f_5) + \frac{f_5 \alpha_5}{\alpha_3} \right]}{\alpha_1^2} + \frac{f_3}{\alpha_1} \right)$$

最後可以得到

$${}^{34}\alpha = \frac{r_{\text{H}_2\text{S}}}{r_{\text{SO}_4\text{-out}}} = \frac{\alpha_5 (1 - f_3) \left[ (1 - f_5) + \frac{f_5 \alpha_5}{\alpha_3} \right]}{\alpha_1^2} + \frac{f_3}{\alpha_1} \quad (12)$$

假設  $\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_2\text{S}}=0$ ，因此  ${}^{34}r_{\text{H}_2\text{S}}=0.0443$ ， ${}^{33}r_{\text{H}_2\text{S}}=0.0228$ 。將 (12) 式帶入不同的  $f_3$

和  $f_5$  求得不同  $f_3$  和  $f_5$  組合下的  ${}^{34}\alpha$  值，即可推算得知  ${}^{34}r_{\text{SO}_4\text{-out}}$  和

$\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$ 。接著利用已知的  ${}^{34}\alpha$  值利用  ${}^{33}\alpha = {}^{34}\alpha^{0.515}$  的關係，求得  ${}^{33}\alpha$  和

$\delta^{33}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-out}}$ 。則利用下式求出，得知  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-out}}$  則可求出  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$ 。

$$\Delta^{33}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-out}} = \delta^{33}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-out}} - \left[ \left( 1 + \frac{\delta^{34}\text{S}}{1000} \right)^{3x\lambda} - 1 \right]$$

#### 4.5.2 多重硫同位素分化網格的限制

多重硫同位素分化網格以  $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{S}}$  和  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{S}}$  為兩軸， $\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  和  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  為  $f_3$  和  $f_5$  的函數， $f_3$  和  $f_5$  以數值 0 到 1 帶入，得到  $f_3$  和  $f_5$  在不同組合下的  $\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  和  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$ ，即可畫出多重硫同位素分化網格 (圖 4-3)，網格的形狀與涵蓋範圍並非只具有一種形式，會受到不同步驟的分化係數所影響。前人研究將硫酸鹽異化作用中的各步驟視為達成熱力學平衡分化作用，各步驟的分化係數即為溫度的函數 (表 4-1) (Farquhar et al., 2003; Johnston et al., 2007; Johnston et al., 2011)，利用不同溫度的分化係數計算網格，發現網格涵蓋範圍有隨著溫度降低而增大的趨勢 (圖 4-3)。由於分化係數為溫度的函數並且會影響分化網格涵蓋的範圍，因此本研究中不同生長溫度範圍的嗜溫菌與嗜熱菌將選用不同溫度下的  $^{34}\alpha_3$  和  $^{34}\alpha_4$  值， $^{33}\lambda$  則與前人相同設定為 0.515，分別求出兩菌株的多重硫同位素分化網格。嗜溫菌 *D. gigas* 培養溫度為 10 °C 到 41 °C，嗜熱菌 *T. commune* 接近株培養溫度為 35 °C 到 79 °C，各溫度下的  $^{34}\alpha_3$  和  $^{34}\alpha_4$  值列於表 4-2，將兩菌株多重硫同位素分化的分析結果作圖於網格中，發現資料點未能被網格所涵蓋 (圖 4-4)，表示建構網格所使用的分化係數需要更改，因此以下將探討分化係數的變化對於多重硫同位素分化網格的影響，希望找到涵蓋所有資料點的網格，進一步幫助我們了解細胞內部質量流的作用。

表 4-1、平衡分化作用之分化係數與溫度的關係

T (°C)	$H_2S-SO_3^{2-}$			$SO_3^{2-}-SO_4^{2-}$		
	$^{33}\alpha$	$^{34}\alpha$	$^{33}\lambda$	$^{33}\alpha$	$^{34}\alpha$	$^{33}\lambda$
0	0.9719	0.9462	0.5148	0.9861	0.9731	0.5141
10	0.9735	0.9492	0.5148	0.9867	0.9744	0.5141
20	0.9750	0.9520	0.5149	0.9874	0.9756	0.5142
30	0.9763	0.9546	0.5149	0.9879	0.9767	0.5143
40	0.9776	0.9570	0.5150	0.9885	0.9777	0.5143
50	0.9788	0.9592	0.5150	0.9890	0.9787	0.5144
75	0.9813	0.9641	0.5151	0.9901	0.9809	0.5145
100	0.9835	0.9682	0.5151	0.9911	0.9827	0.5146

說明：假設硫酸鹽還原菌所進行的硫酸鹽還原為熱力學平衡分化作用

(thermodynamic equilibrium fractionation)，各步驟之間硫化物轉換所產生的分化係數可經由計算求得，為溫度的函數 (修改自 Farquhar et al.,2003)。

表 4-2、建構分化網格使用之不同溫度的平衡分化係數

For <i>Desulfovibrio gigas</i>					
temperature(°C)		41	30	21	10
$H_2S-SO_3^{2-}$	$^{33}\alpha$	0.9778	0.9763	0.9751	0.9735
	$^{34}\alpha$	0.9572	0.9545	0.9522	0.9492
$SO_3^{2-}-SO_4^{2-}$	$^{33}\alpha$	0.9885	0.9879	0.9874	0.9867
	$^{34}\alpha$	0.9778	0.9767	0.9757	0.9743
For <i>Thermodesulfobacterium commune</i>					
temperature(°C)		79	68	55	35
$H_2S-SO_3^{2-}$	$^{33}\alpha$	0.9818	0.9808	0.9794	0.9770
	$^{34}\alpha$	0.9649	0.9629	0.9603	0.9558
$SO_3^{2-}-SO_4^{2-}$	$^{33}\alpha$	0.9903	0.9898	0.9892	0.9882
	$^{34}\alpha$	0.9812	0.9803	0.9792	0.9772

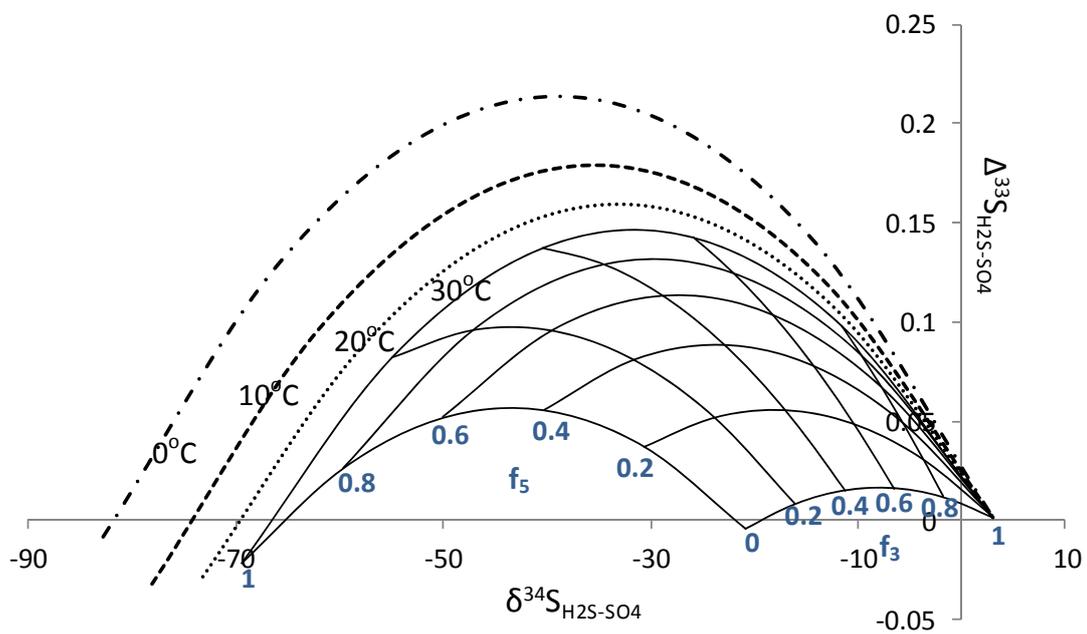


圖 4-3、多重硫同位素分化網格。Farquhar et al. (2003) 根據 Rees (1973) 所提出的模型加入質量流的概念，搭配不同比例的  $f_3$  和  $f_5$ ，所得到的多重硫同位素分化網格。實線網格為溫度  $30^\circ\text{C}$  下的分化結果，圖中也標示了溫度為  $20^\circ\text{C}$ 、 $10^\circ\text{C}$  和  $0^\circ\text{C}$  時最大分化範圍，顯示隨著溫度下降分化範圍會系統性的增加。

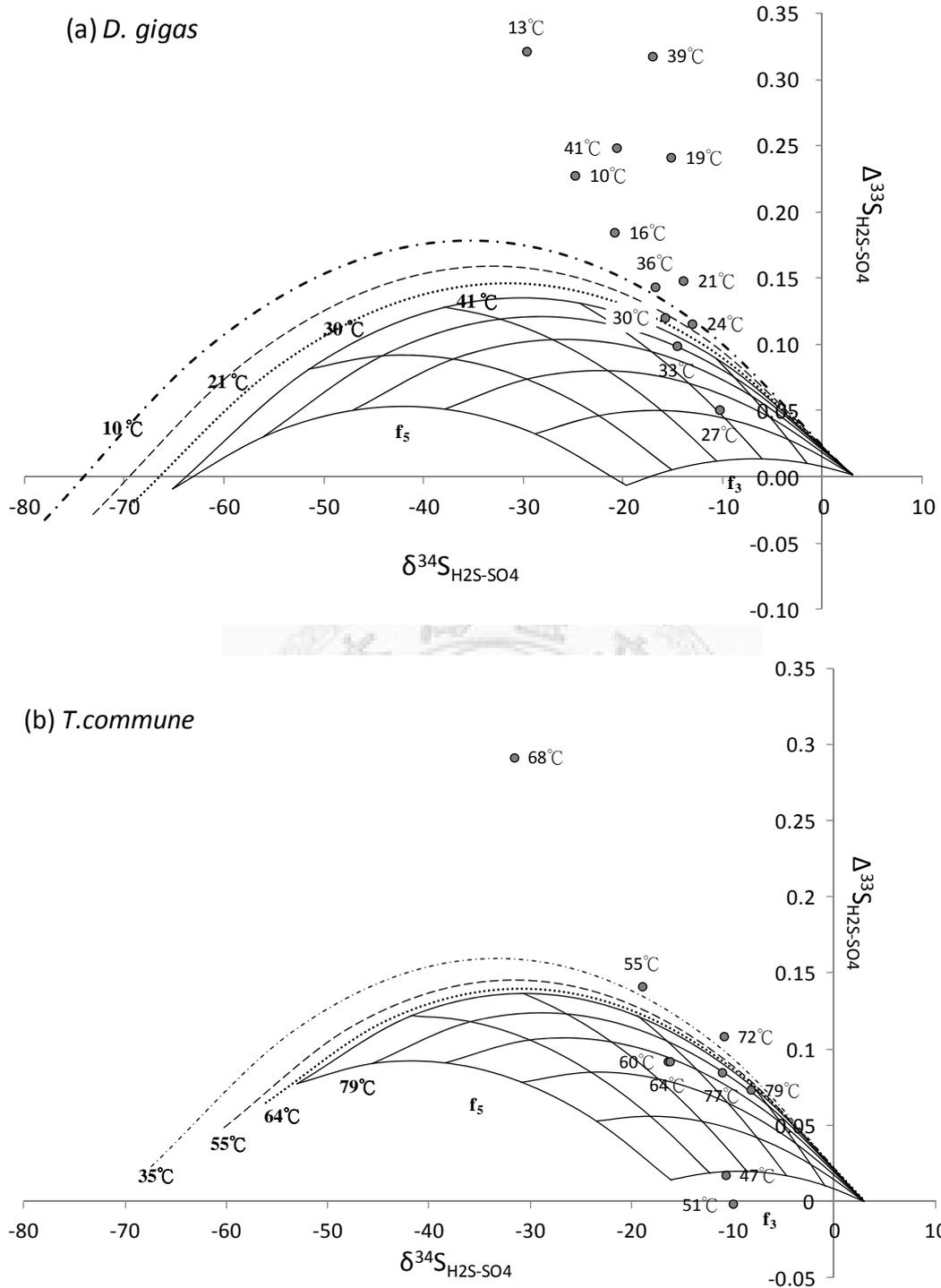


圖 4-4、不同溫度下之多重硫同位素分化網格。配合兩菌株的培養溫度範圍，使用不同溫度下的分化係數計算所得到的多重硫同位素分化網格，將兩菌株的分析結果作圖到網格中。(a) *D. gigas* 的作圖結果；(b) *T. commune* 接近株的作圖結果，兩菌株皆有資料落在網格之外。

### 4.5.3 多重硫同位素分化網格的擴充

分化網格的涵蓋範圍與形狀主要受到  $^{34}\alpha$  和  $^{33}\lambda$  所控制，其中  $^{34}\alpha$  是各步驟的分化係數，而  $^{33}\lambda$  值代表  $\delta^{34}\text{S}$  和  $\delta^{33}\text{S}$  之間的關係。不同類型的同位素分化過程會造成  $^{33}\lambda$  值的差異，同位素分化過程包括平衡分化與動力學分化，平衡分化來自於不同質量同位素之間鍵結力的差異，此作用下  $^{33}\lambda$  值的範圍在 0.514-0.516 之間，而動力學分化為單向化學或物理作用所產生的同位素分化，此作用下  $^{33}\lambda$  值可在 0.500 和 0.516 之間變動 (Farquhar et al., 2003)。硫酸鹽異化還原作用包含了熱力學平衡分化與動力學分化 (Hoek and Canfield, 2008)，因此  $^{33}\lambda$  值可使用 0.500 到 0.516 之間的數值而不限制於 0.515。將  $^{33}\lambda$  值以 0.500、0.505、0.510、和 0.515 帶入，隨著  $^{33}\lambda$  值的改變  $^{33}\alpha_3$  與  $^{34}\alpha_4$  之間的關係也會隨其變化，將  $^{34}\alpha$  固定帶入不同的  $^{33}\lambda$  值可得到不同數值的  $^{33}\alpha$  (表 4-3)。從作圖結果可發現  $^{33}\lambda$  值的改變會影響  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值與網格形狀但不具有規律性，而在設定相同的分化係數大小時 (即相同的  $^{34}\alpha_3$  和  $^{34}\alpha_4$  值)  $\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值的涵蓋範圍則無明顯的變化 (圖 4-5)

$^{34}\alpha_x$  值是不同步驟的分化係數，計算網格時所使用的  $^{34}\alpha_3$  和  $^{34}\alpha_4$  分別是亞硫酸鹽轉化為硫化物和硫酸鹽轉化為亞硫酸鹽步驟所造成的分化， $^{34}\alpha$  和  $^{33}\alpha$  的關係則受到  $^{33}\lambda$  值所控制。在此討論  $^{34}\alpha_x$  變化的影響時， $^{33}\lambda$  值設定為 0.500 和 0.516，再將  $^{34}\alpha_3$  和  $^{34}\alpha_4$  其中一值固定調整另一值，此時可得到相對應的  $^{33}\alpha$  值 (表 4-4)，藉此觀察調整  $^{34}\alpha_3$  和  $^{34}\alpha_4$  值對網格的影響。當固定  $^{34}\alpha_4$  (0.9731) 將  $^{34}\alpha_3$  分別以 0.9400、0.9450 和 0.9500 帶入，觀察作圖結果發現  $^{34}\alpha_3$  值較小時會具有較大的網格大小、 $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  和  $\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值變化範圍，網格形狀不會因  $^{34}\alpha_3$  值改變產生明顯的變化 (圖 4-6)。但是在不同的  $^{33}\lambda$  值下，網格大小與  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值隨  $^{34}\alpha_3$  值改變會具有不同的變化，當  $^{33}\lambda$  值為 0.500 時兩者會隨著  $^{34}\alpha_3$  值的減小而增加 (圖 4-6a)，然而當  $^{33}\lambda$  值為 0.516 時兩者隨  $^{34}\alpha_3$  值改變沒有規律性變化 (圖 4-6b)。當固定  $^{34}\alpha_3$  (0.9462) 將  $^{34}\alpha_4$  分別以 0.9600、

0.9650 和 0.9700 帶入，較小的  $^{34}\alpha_4$  值會使  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  和  $\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值的涵蓋範圍較大，並且使分化網格的下緣會往較大  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值移動。調整  $^{34}\alpha_4$  值對於分化網格形狀有明顯的影響，而在不同  $^{33}\lambda$  值下分化網格形狀隨  $^{34}\alpha_4$  值變化的趨勢也會有所不同 (圖 4-7)。

嗜熱菌 *T. commune* 接近株的多重硫同位素分析作圖結果有資料點落在平衡分化網格的下緣之外 (圖 4-4b)，所以需要調整參數使分化網格包絡範圍往較負的  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值移動，由前述分析可知當  $^{33}\lambda$  值為 0.510 時分化網格能夠在負值  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  區域包絡最大範圍，因此選定  $^{33}\lambda$  值為 0.510。在  $^{34}\alpha_3$  和  $^{34}\alpha_4$  值方面，由於調整  $^{34}\alpha_4$  值會使網格下緣產生變化 (圖 4-7)，因此先將  $^{34}\alpha_3$  值固定，調整  $^{34}\alpha_4$  值使分化網格可包絡具有負值  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  的資料點，最後再調整  $^{34}\alpha_3$  值使分化網格可包絡所有資料點。以熱力學平衡下可產生最大網格的  $0^\circ\text{C}$  下的分化參數作為參考依據 ( $^{34}\alpha_3=0.9462$ ,  $^{34}\alpha_4=0.9731$ )，將  $^{33}\lambda$  值以 0.510 代入並且固定  $^{34}\alpha_3$  值 (0.9462)， $^{34}\alpha_4$  值分別以 0.9600、0.9731 和 0.9800 代入，作圖結果顯示當  $^{34}\alpha_4$  值為 0.9800 時可剛好將具有負值  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  的資料點放入網格當中，但仍有資料點落在分化網格之外 (圖 4-8a)，因此固定  $^{33}\lambda$  值和  $^{34}\alpha_4$  值 (0.510 和 0.9800) 將  $^{34}\alpha_3$  值分別以 0.9300、0.9462 和 0.9200 代入，發現當  $^{34}\alpha_3$  值為 0.9200 時可剛好將所有資料點放入分化網格中 (圖 4-8b)。

由於嗜溫菌 *D. gigas* 產生最大的  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值，而當  $^{33}\lambda$  值為 0.515 時可在相同的分化係數下產生最大  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值 (圖 4-5)，因此我們選用 0.515 作為嗜溫菌 *D. gigas* 多重同位素分化網格的  $^{33}\lambda$  值，同樣以熱力學平衡下可產生最大網格的  $0^\circ\text{C}$  下的分化參數 ( $^{34}\alpha_3=0.9462$ ,  $^{34}\alpha_4=0.9731$ ) 作為參考依據，先固定  $^{33}\lambda$  值 (0.515) 和  $^{34}\alpha_3$  值 (0.9462)，調動  $^{34}\alpha_4$  值。由於當  $^{34}\alpha_4$  值較小時可產生較大  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值但是同時會使分化網格下緣往上移動 (圖 4-7)，因此我們將  $^{34}\alpha_4$  值分別以 0.9500、0.9600 和 0.9731 代入，希望求得一  $^{34}\alpha_4$  值可使網格產生最大  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值，同時網格下緣仍包絡具有最小  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值的資料點。

作圖結果顯示當  $^{34}\alpha_4$  值為 0.9500 雖然可以產生最大的  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值，但會使具有最小  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值的資料點落在分化網格之外 (圖 4-9a)，因此將選用 0.9600 作為  $^{34}\alpha_4$  值可使分化網格包絡具有最小  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值的資料點同時產生較大  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值。之後固定  $^{34}\alpha_4$  值 (0.9600)，將  $^{34}\alpha_3$  值分別以 0.9000、0.9100、0.9200 和 0.9462 代入，作圖結果顯示當  $^{34}\alpha_3$  值為 0.9000 時才可將所有資料點放入網格當中 (圖 4-9b)。

經由  $^{34}\alpha$  和  $^{33}\lambda$  值的調整可以分別找到能夠完全涵蓋兩菌株產生之多重硫同位素分化結果的網格，但是所推導出能夠涵蓋本研究分析結果的網格，其  $^{34}\alpha_3$ 、 $^{34}\alpha_4$  值小於前人研究中的設定 (表 4-1)，表示細胞內部各反應步驟的分化程度很大，整個網格所涵蓋的分化範圍也較以往更大，分化最大可達 150%，但這樣的設定可能並不合理。兩菌株之  $^{33}\lambda$  值需分別設定為 0.510 和 0.515，前者是動力分化的  $^{33}\lambda$  值範圍，後者則是兩類分化都可涵蓋的  $^{33}\lambda$  值範圍，表示硫酸還原菌所進行的硫酸鹽還原作用可能是動力學或是平衡分化的結果，因此僅考慮平衡分化下的分化係數可能會太過於簡化。總結上面討論的綜合結果，要獲得正確的參數建立模型並不容易，可能是由於所使用的模型無法充分代表細胞的新陳代謝過程，或是模型中所使用的分化係數有一個或多個是不正確的，也有可能兩個問題皆存在。雖然為了可以涵蓋分析結果而更改分化參數尚無其他研究支持，且可能造成質量流參數 ( $f_3$  和  $f_5$ ) 的絕對數值不正確，但由於網格的結構與內部質量流參數對網格的影響仍是相似的，因此資料呈現的整體變化趨勢仍然存在。下節將藉由變化趨勢的觀察與討論推測細胞內部質量流隨溫度的變化。

表 4-3、不同  $^{33}\lambda$  值對於  $^{33}\alpha_3$  和  $^{33}\alpha_4$  的影響

$^{34}\alpha_3=0.9682, ^{34}\alpha_4=0.9827$		
$^{33}\lambda$	$^{33}\alpha_3$	$^{33}\alpha_4$
0.500	0.9840	0.9913
0.505	0.9838	0.9912
0.510	0.9837	0.9911
0.515	0.9835	0.9911

表 4-4、分別調整  $^{34}\alpha_3$  和  $^{34}\alpha_4$  建構分化網格使用之分化係數

$^{33}\lambda=0.500$		$^{33}\lambda=0.516$	
$^{34}\alpha_4=0.9731, ^{33}\alpha_4=0.9865$		$^{34}\alpha_4=0.9731, ^{33}\alpha_4=0.9860$	
$^{34}\alpha_3$	$^{33}\alpha_3$	$^{34}\alpha_3$	$^{33}\alpha_3$
0.9400	0.9695	0.9400	0.9686
0.9450	0.9721	0.9450	0.9712
0.9500	0.9747	0.9500	0.9739
$^{34}\alpha_3=0.9462, ^{33}\alpha_3=0.9727$		$^{34}\alpha_3=0.9462, ^{33}\alpha_3=0.9719$	
$^{34}\alpha_4$	$^{33}\alpha_3$	$^{34}\alpha_4$	$^{33}\alpha_3$
0.9600	0.9798	0.9600	0.9792
0.9650	0.9823	0.9650	0.9818
0.9700	0.9849	0.9700	0.9844

說明：固定  $^{33}\lambda$  值分別調整  $^{34}\alpha_3$  和  $^{34}\alpha_4$  得到對應的  $^{33}\alpha$ 。

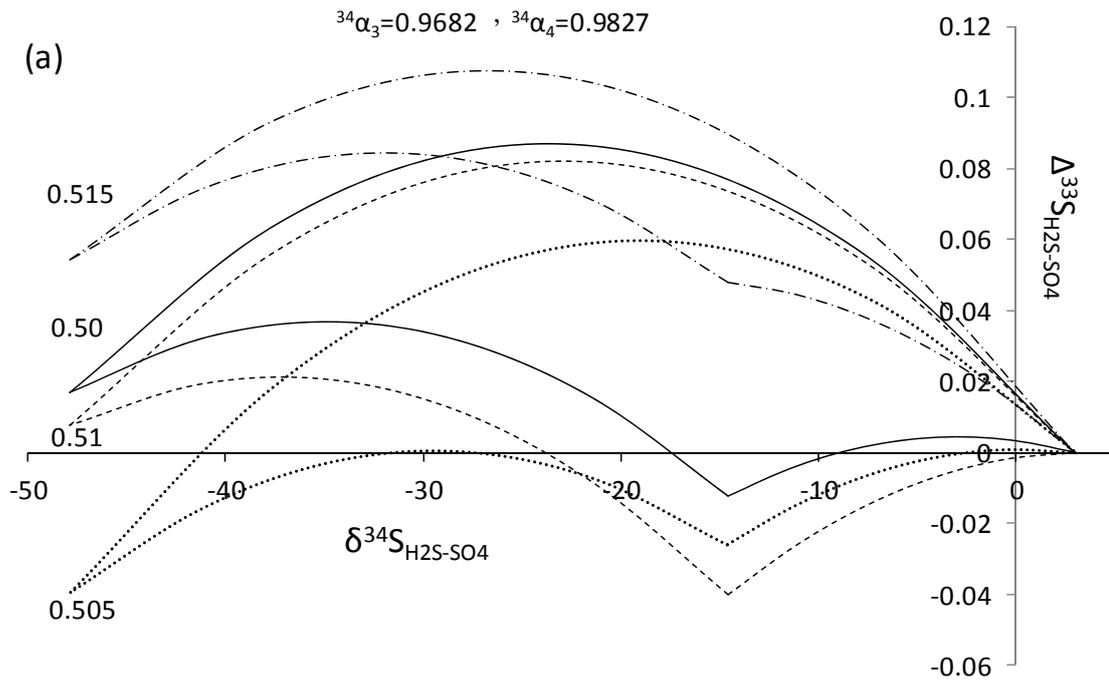


圖 4-5、 $^{33}\lambda$  值改變對於網格的影響。將  $\alpha$  值固定不變的情況下，將  $^{33}\lambda$  值代入 0.515、0.510、0.505 和 0.500，圖中分別以線段與點狀混和線、虛線、點狀線和實線代表，圖中顯示  $^{33}\lambda$  值的改變會造成網格形狀與  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值的變化。

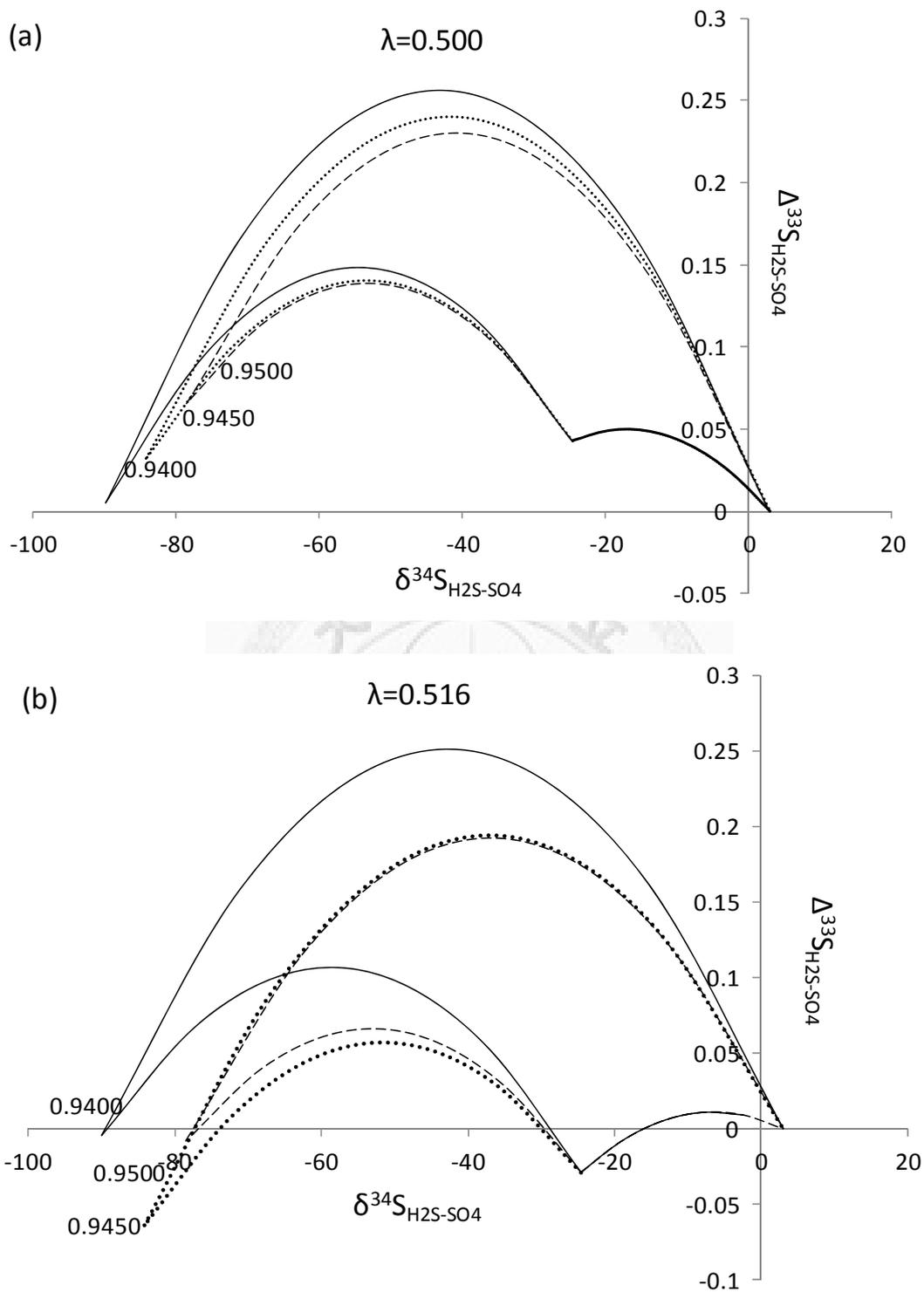


圖 4-6、亞硫酸鹽轉化硫化物過程之分化大小對多重硫同位素網格的影響。 $^{33}\lambda$  值和  $^{34}\alpha_4$  (0.9731) 固定不變的情況下，將  $^{34}\alpha_3$  分別以 0.9400、0.9450 和 0.9500 代入，發現網格大小、 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{S}}$  和  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值皆會隨  $^{34}\alpha_3$  改變，但網格形狀則無明顯的變化，不同  $^{33}\lambda$  值會具有不同變化趨勢。

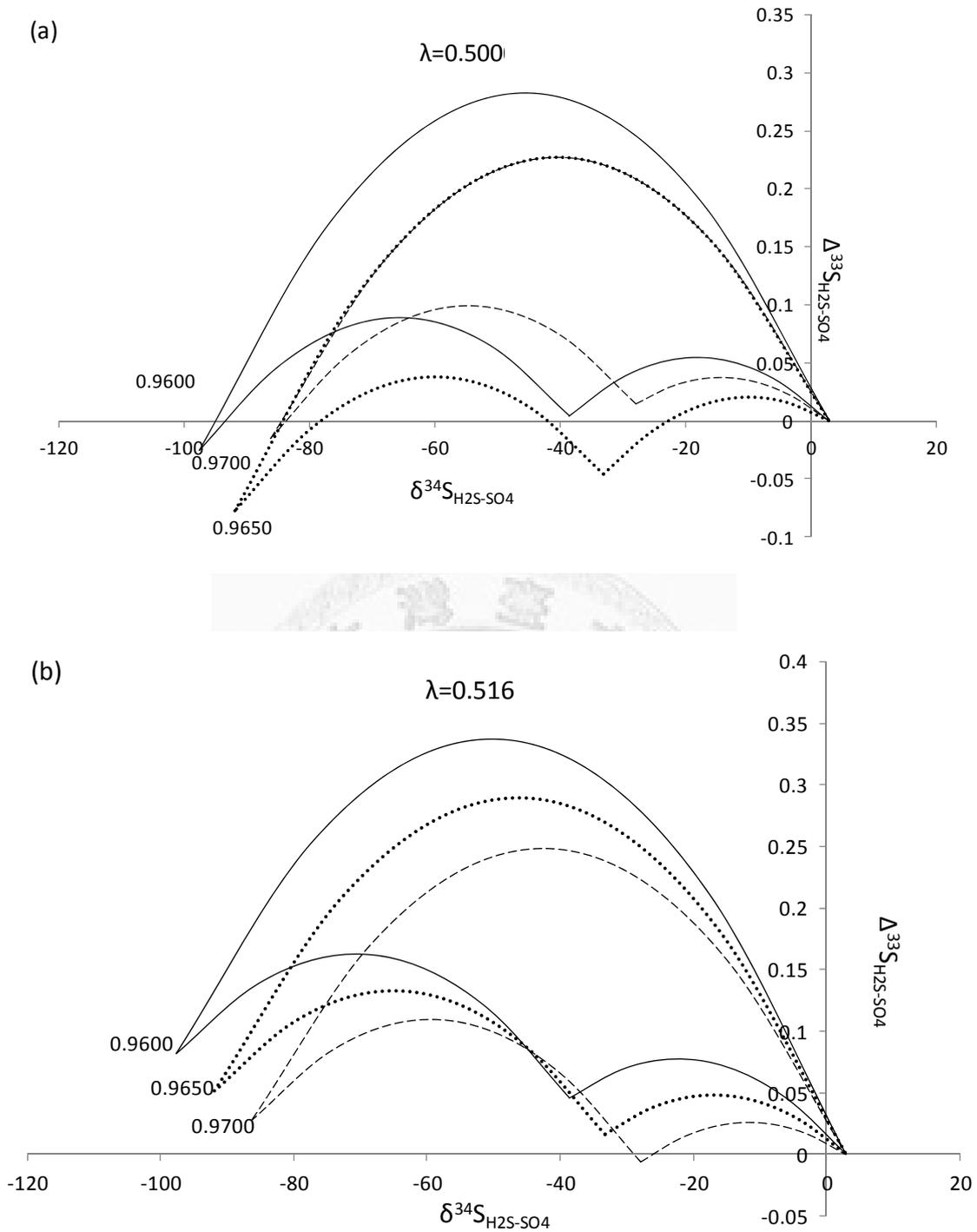


圖 4-7、硫酸鹽轉化為亞硫酸鹽過程之分化大小對多重硫同位素網格的影響。 $^{33}\lambda$  值和  $^{34}\alpha_3$  (0.9462) 固定不變的情況下，將  $^{34}\alpha_4$  分別以 0.9600、0.9650 和 0.9700 代入，發現網格大小、 $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4\text{-H}_2\text{S}}$  和  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值皆會隨  $^{34}\alpha_4$  改變，同時對於網格的形狀也會有明顯的影響，而在不同  $^{33}\lambda$  值會具有不同變化趨勢。

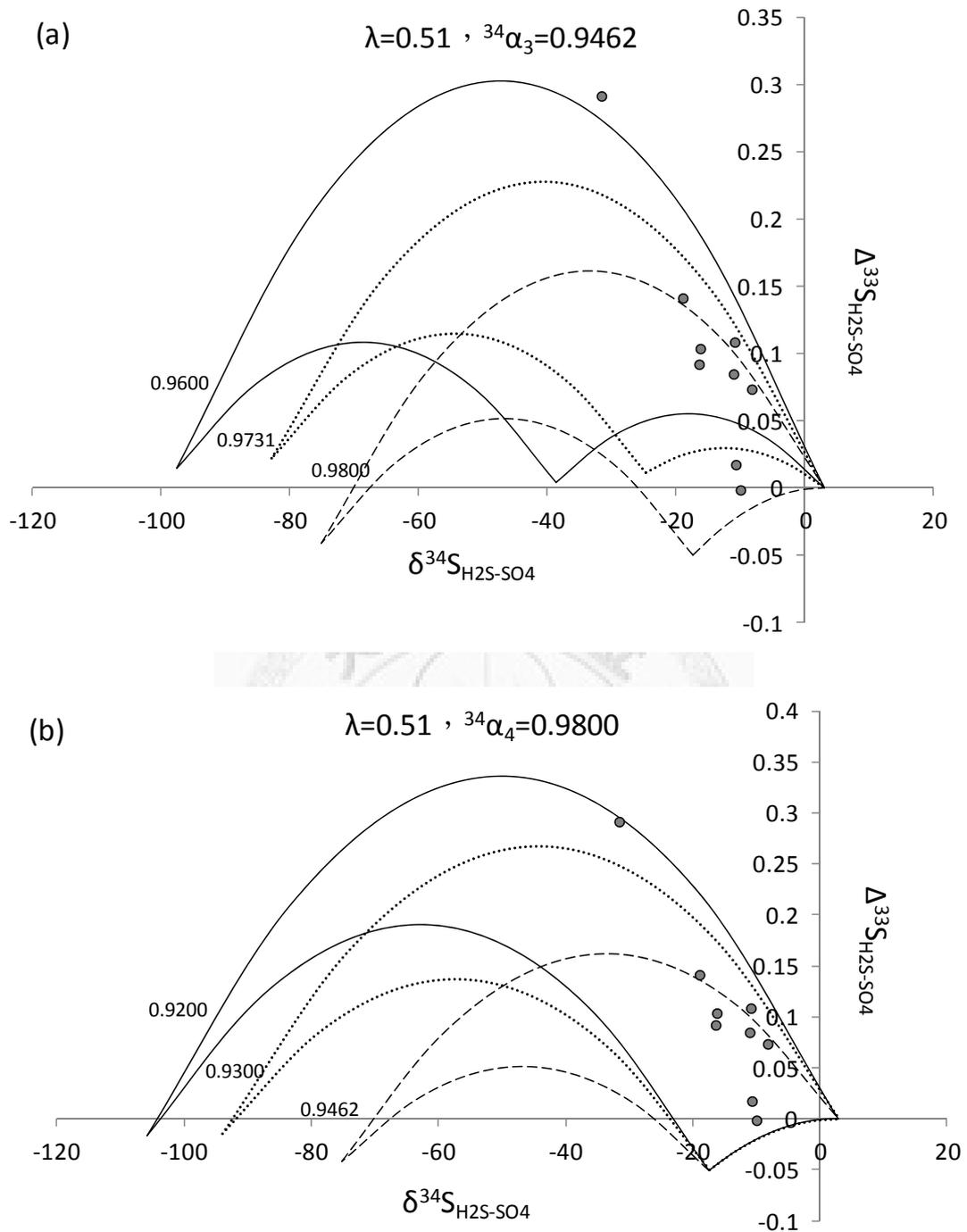


圖 4-8、嗜熱菌 *T. commune* 接近株之多重硫同位素分化網格。(a) 將  $^{33}\lambda$  值 (0.510) 和  $^{34}\alpha_3$  (0.9462) 固定， $^{34}\alpha_4$  分別以 0.9600、0.9731 和 0.9800 代入，發現  $^{34}\alpha_4$  值為 0.9800 時可將負值  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  的資料點放入網格當中；(b) 將  $^{33}\lambda$  值 (0.510) 和  $^{34}\alpha_4$  (0.9800) 固定， $^{34}\alpha_3$  分別以 0.9200、0.9300 和 0.9462 代入，發現  $^{34}\alpha_3$  值為 0.9200 時可將所有資料點包覆在網格當中。

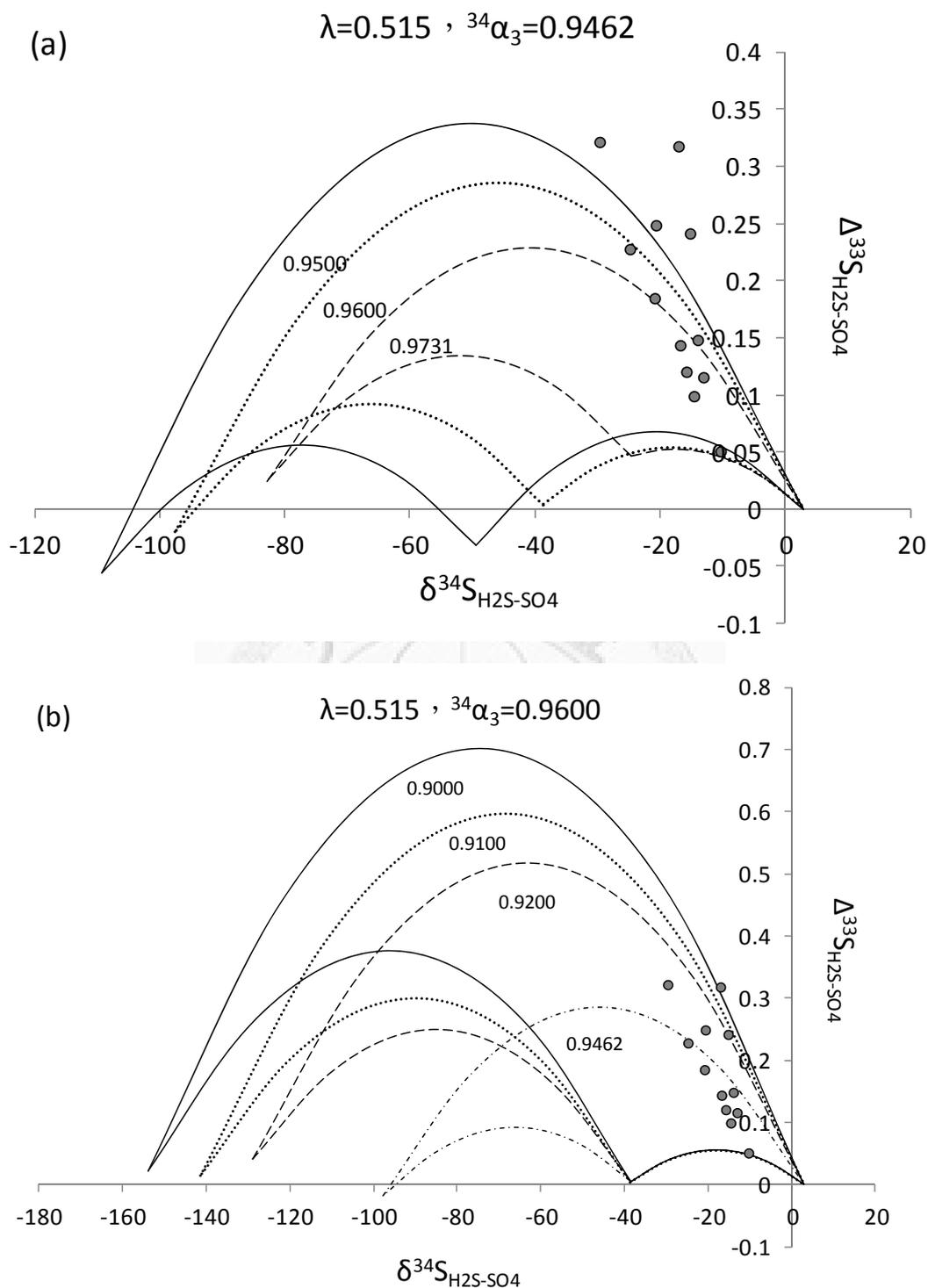


圖 4-9、嗜溫菌 *D. gigas* 之多重硫同位素分化網格。(a) 將  $^{33}\lambda$  值 (0.515) 和  $^{34}\alpha_3$  (0.9462) 固定,  $^{34}\alpha_4$  分別以 0.9500、0.9600 和 0.9731 代入, 發現當  $^{34}\alpha_4$  值小於 0.9600 時無法將具有最小  $\Delta^{33}\text{S}_{\text{H}_2\text{S-SO}_4}$  值的資料點放入網格當中; (b) 將  $^{33}\lambda$  值和  $^{34}\alpha_4$  (0.9600) 固定, 當  $^{34}\alpha_3$  為 0.9000 時網格可涵蓋所有資料點。

#### 4.6 利用多重硫同位素分化網格探討細胞新陳代謝之質量流

觀察嗜溫菌 *D. gigas* 作圖結果顯示分化程度最小的溫度 (27 °C) 相較其他的培養溫度具有最小的  $f_5$  值 (圖 4-10a), 表示大部分在細胞體內的亞硫酸鹽會在細胞內作用再氧化為硫酸鹽, 而不是進一步還原為硫化物排出體外, 因此若同位素分化僅受到細胞體內硫酸鹽轉換為亞硫酸鹽的過程所影響會造成, 在此溫度下應可產生最大分化程度, 但與本實驗同位素分化結果相反, 表示 *D. gigas* 造成硫同位素分化為一綜合性的結果無法利用單一質量流去推測。在最適生長溫度 (33 °C) 生長時, 其  $f_3$  和  $f_5$  值皆非為所有培養溫度中的最小值, 表示細胞通透性與體內酵素的活性皆不是所有溫度中最大值, 因此細胞生長速率並不能代表細胞內部質量流作用的情形或是細胞內部擁有更複雜的質量流交換。除了特定溫度下質量流的變化, 將 *D. gigas* 的生長溫度範圍粗略, 分為極低溫、低溫、中溫和高溫四群, 藉此觀察細胞內部質量流隨溫度的變化的趨勢。當溫度由高溫到中溫時,  $f_5$  值減小許多, 而中溫的溫度資料點也為所有培養溫度中具有最小  $f_5$  值和最大細胞生長速率的溫度範圍, 表示在細胞最適合生長溫度範圍附近時, 細胞體內大部分的亞硫酸鹽會再氧化形成硫酸鹽。當溫度由中溫到低溫時,  $f_3$  值增加表示當培養溫度由最適生長溫度下降時, 細胞通透性會隨之降低, 當溫度又由低溫下降到極低溫時, 發現  $f_5$  值增加但  $f_3$  值則是減小, 表示當細胞在幾乎不生長的溫度時, 細胞體內大部分的亞硫酸鹽會直接還原形成硫化物, 而其細胞膜通透性也可能增加。總體來說, 經由質量流的觀察可知在本研究中嗜溫菌 *D. gigas* 細胞中硫酸鹽與亞硫酸鹽之間的酵素活性與細胞膜受溫度的影響皆與理論模型並不相同, 這也可能為硫同位素分化隨溫度變化與理論模型不相同的原因。

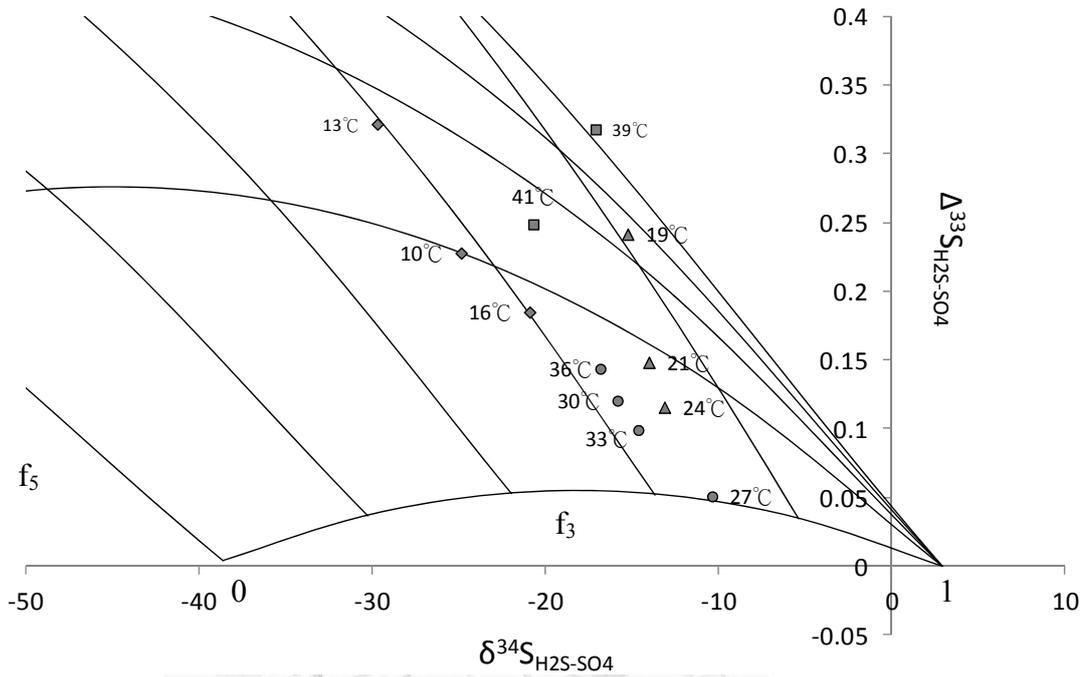
*T. commune* 接近株作圖結果顯示最大分化溫度 (68 °C) 相較其他的培養溫度具有最大的  $f_5$  值 (圖 4-10b), 表示大部分在細胞體內的亞硫酸鹽皆再進一步還原為硫化物排出體外, 與 *D. gigas* 情況相同若同位素分化僅受到細胞體內硫酸鹽轉換為亞硫酸鹽的過程所影響會造成, 在此溫度下應可產生最小分化程度,

但與本實驗同位素分化結果相反，表示 *T. commune* 接近株造成硫同位素分化為一綜合性的結果無法利用單一質量流去推測。最適生長溫度 (72°C) 的  $f_3$ 、 $f_5$  值並無明顯的特點，因此 *T. commune* 接近株在最適溫度下質量流的變化所反應的結果與 *D. gigas* 的相同。同樣將 *T. commune* 接近株的培養溫度分為高溫、中溫、低溫和極低溫四個部分，其中中溫為具有最大的細胞生長速率的溫度範圍，當溫度在中溫範圍內其  $f_5$  值會大於其他溫度範圍，表示在細胞生長速率較快時，細胞內部大部分亞硫酸鹽會直接還原為硫化物，而當溫度在中溫與高溫範圍內大部分資料點的  $f_3$  值會大於低溫和極低溫範圍，表示細胞通透性並無隨著溫度的升高而增加，反而稍微下降。總體來說，經由質量流的觀察本研究中 *T. commune* 接近株其細胞膜隨溫度的變化與理論模型也不相符。

Johnston et al. (2007) 所進行的實驗與本研究相似，同樣使用溫度梯度反應槽進行菌株培養並且進行微量硫同位素分析，培養的菌株為 *Desulfobacterium autotrophicum*，與本研究所使用的 *Desulfovibrio gigas* 同屬於嗜溫菌，溫度範圍為 2 到 36°C，最適生長溫度為 22°C，將其研究結果放入本實驗中 *Desulfovibrio gigas* 之多重硫同位素分化網格中進行討論 (圖 4-11)，發現不同溫度之間質量流的特性相近並無明顯變化趨勢，與 *Desulfovibrio gigas* 的變化也不相同。

總結上述觀察，細胞在特定溫度下進行硫酸鹽還原作用是具有不同的質量流特徵，但是細胞通透性與細胞體內酵素作用的活性隨著溫度改變並無一致的規律性變化，顯示溫度影響硫酸鹽還原作用所造成的同位素分化為十分複雜的過程，如何經由模型精準的去預測細胞內部活動，進而推測硫同位素與溫度之間的關係仍需要更多相關研究。

(a) *D. gigas*



(b) *T. commune* 接近株

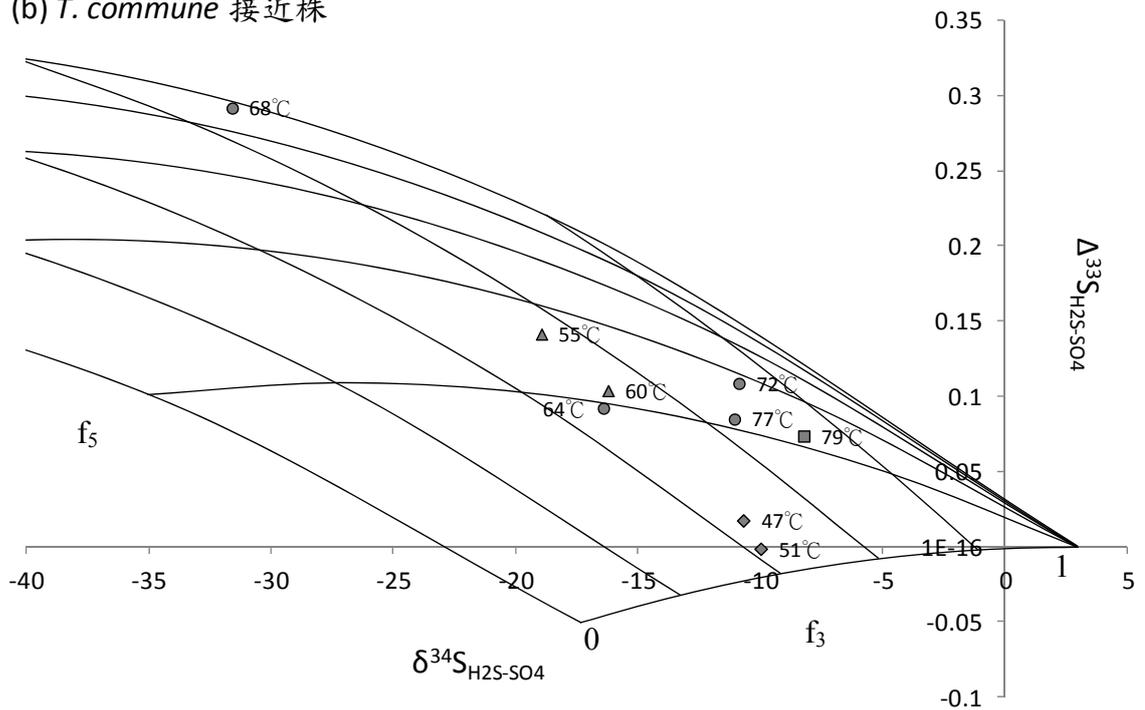


圖 4-10、嗜溫菌 *D. gigas* 與嗜熱菌 *T. commune* 接近株之作圖結果。將兩菌株的生長溫度範圍粗略的分類，分為極低溫、低溫、中溫和高溫四群，分別以菱形、三角形、圓形與正方形代表。

*D. gigas* vs. *D. autotrophicum*

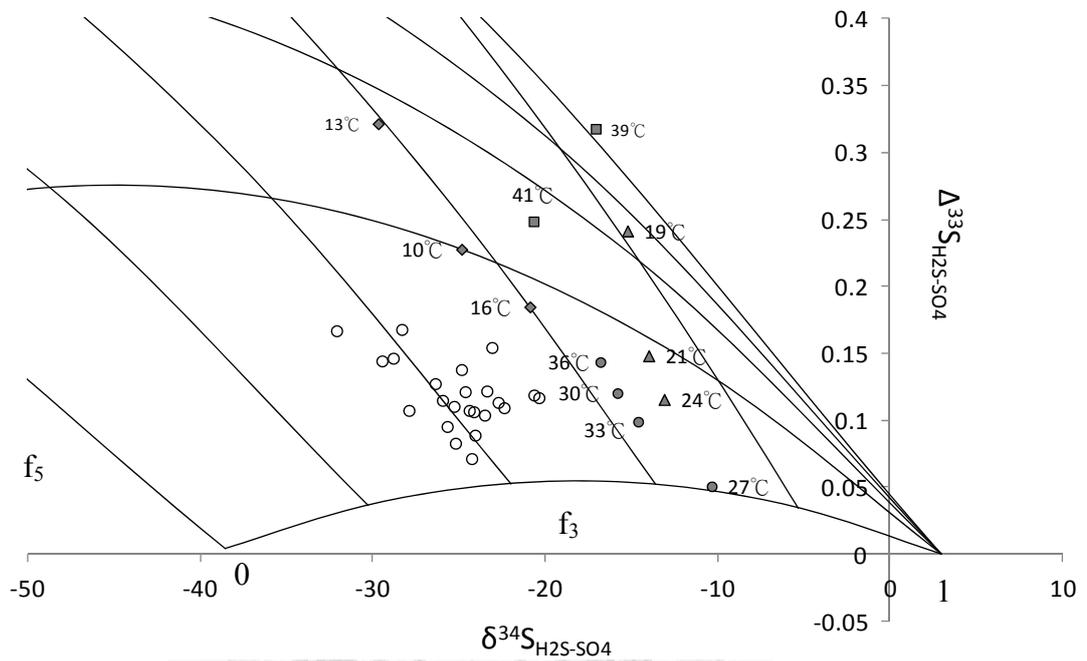


圖 4-11、*Desulfobacterium autotrophicum* 與 *Desulfovibrio gigas* 之作圖結果。將 Johnston et al. (2007) 的研究結果放入本實驗中 *Desulfobacterium gigas* 之多重硫同位素分化網格內，以空心圓型做為代表。作圖結果不同溫度之間質量流的特性相近並無明顯變化趨勢。

#### 4.7 相關研究與未來工作

硫酸鹽異化還原作用所造成硫同位素的分化的過程十分複雜，必須了解細胞內部的作用才能夠幫助我們解決硫酸鹽異化還原作用對硫同位素分化的影響，而探討細胞內部的相關研究包括還原酵素的測量與氧同位素的標定。測量還原酵素的濃度為了解細胞內部作用最直接的方法，硫酸鹽異化還原作用進行需要不同還原酵素的催化，還原酵素的作用會影響細胞內部質量流的反應，因此不同步驟中還原酵素的濃度能直接反應細胞內部質量流的比例，而近期研究也發現可催化中間物質 ( $S_3O_6^{2-}$ ,  $S_2O_3^{2-}$ ) 的酵素，但在細胞內部是否確實存在此反應和過程中可產生多大的硫同位素分化，都需進一步探討 (Bradley et al., 2011)。氧同位素分析同樣是了解細胞內部作用的重要工具之一，由於硫酸鹽還原過程中的硫酸鹽與亞硫酸鹽皆含有氧原子，細胞內部亞硫酸鹽的氧同位素會與細胞外的水進行氧同位素的交換，因此將水中加入  $^{17}O$  進行標定與追蹤，當亞硫酸鹽與含有  $^{17}O$  的水反應過後，再氧化形成硫酸鹽時就會使得剩下硫酸鹽的氧同位素值異常，藉此我們可以直接觀察細胞內部再氧化的過程 (Farquhar et al., 2008)。不論如何，想要更加了解細胞內部的新陳代謝需要結合不同領域，包括微生物學、生物化學、同位素化學和數值模擬等研究，清楚細胞內部的完整的步驟與質量流作用後，才可以進而去了解硫酸鹽異化還原作用對於硫同位素分化大小的控制機制。

## 第五章 結論

本研究利用培養嗜熱菌 *Thermodesulfobacterium commune* 接近株與嗜溫菌 *Desulfovibrio gigas* 進行代謝反應物的多重硫同位素測量，並配合硫酸鹽異化還原的分化模型和質量流計算，探討溫度如何影響硫酸還原菌的生理代謝，並進而影響硫同位素的分化程度。獲得下述結果：

1. *Thermodesulfobacterium commune* 接近株在 34 到 79 °C 的生長溫度範圍內產生 8.2 到 31.6 ‰ 之間的硫同位素分化；*Desulfovibrio gigas* 在 10 到 41 °C 的生長溫度範圍內產生 10.3 到 29.7 ‰ 之間的硫同位素分化。兩菌株所產生的同位素分化雖與一般硫酸還原菌可產生的分化大小無異，但與同屬菌株相比則皆大於前人研究結果，顯然菌株種類的微小差異和培養的條件不同會造成同位素分化程度的不同。
2. 溫度會影響微生物硫酸還原作用所產生的硫同位素分化程度，並且硫同位素分化程度隨溫度的變化具有不同的趨勢。本研究中嗜溫菌 *Desulfovibrio gigas* 產生的硫同位素分化之最小分化出現在中間溫度培養，較大分化則出現在最高溫與最低溫培養，嗜熱菌 *Thermodesulfobacterium commune* 接近株產生的硫同位素分化隨溫度則無特定變化趨勢。
3. 前人根據微生物硫酸還原作用的連串反應步驟模型所建立的多重硫同位素分化網格，無法包絡本研究的多重硫同位素分析結果，顯然已建立的多重硫同位素分化網格須被重新檢討。推測可加以修正的部分包括所使用的模型無法充分描述細胞內部進行的新陳代謝過程，或是模型中所使用的分化係數有一個或多個是不正確的，也有可能兩個問題皆存在。

## 參考文獻

- Akagi, J., 1995, Respiratory sulfate reduction: *Biotechnology Handbooks*, v. 8, p. 89-89.
- Berner, R.A., 1989, Biogeochemical cycles of carbon and sulfur and their effect on atmospheric oxygen over Phanerozoic time: *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 75, p. 97-122.
- Bradley, A., Leavitt, W., and Johnston, D., 2011, Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway: *Geobiology*, v. 9, p. 446-457.
- Brandt, K., Vester, F., Jensen, A., and Ingvorsen, K., 2001, Sulfate reduction dynamics and enumeration of sulfate-reducing bacteria in hypersaline sediments of the Great Salt Lake (Utah, USA): *Microbial Ecology*, v. 41, p. 1-11.
- Brunner, B., Bernasconi, S.M., Kleikemper, J., and Schroth, M.H., 2005, A model for oxygen and sulfur fractionation in sulfate during bacterial sulfate reduction processes: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 69, p. 4773-4785.
- Canfield, D.E., 2001a, Biogeochemistry of sulfur isotopes: *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, v. 43, p. 607-636.
- Canfield, D.E., 2001b, Isotope fractionation by natural populations of sulfate-reducing bacteria: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 65, p. 1117-1124.
- Canfield, D.E., 2004, The evolution of the Earth surface sulfur reservoir: *American Journal of Science*, v. 304, p. 839-861.
- Canfield, D.E., Olesen, C.A., and Cox, R.P., 2006, Temperature and its control of isotope fractionation by a sulfate-reducing bacterium: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 70, p. 548-561.
- Canfield, D.E., and Teske, A., 1996, Late Proterozoic rise in atmospheric oxygen concentration inferred from phylogenetic and sulphur-isotope studies: *Nature*, v. 382, p. 127-132.
- Canfield, D.E., and Thamdrup, B., 1994, The production of  $^{34}\text{S}$ -depleted sulfide during bacterial disproportionation of elemental sulfur: *Science*, v. 266, p. 1973-1975.
- Cypionka, H., 1995, Solute transport and cell energetics: *Biotechnology Handbooks*, v. 8, p. 151-184.
- Detmers, J., Brüchert, V., Habicht, K.S., and Kuever, J., 2001, Diversity of sulfur isotope fractionations by sulfate-reducing prokaryotes: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 888-894.
- Farquhar, J., Canfield, D.E., Masterson, A., Bao, H., and Johnston, D., 2008, Sulfur and oxygen isotope study of sulfate reduction in experiments with natural

- populations from Fællestrand, Denmark: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 72, p. 2805-2821.
- Farquhar, J., Johnston, D.T., Wing, B.A., Habicht, K.S., Canfield, D.E., Airieau, S., and Thiemens, M.H., 2003, Multiple sulphur isotopic interpretations of biosynthetic pathways: implications for biological signatures in the sulphur isotope record: *Geobiology*, v. 1, p. 27-36.
- Farquhar, J., and Wing, B.A., 2003, Multiple sulfur isotopes and the evolution of the atmosphere: *Earth and Planetary Science Letters*, v. 213, p. 1-13.
- Gall, J.L., 1963, A new species of *Desulfovibrio*: *Journal of Bacteriology*, v. 86, p. 1120.
- Habicht, K.S., Gade, M., Thamdrup, B., Berg, P., and Canfield, D.E., 2002, Calibration of sulfate levels in the Archean ocean: *Science*, v. 298, p. 2372-2374.
- Harrison, A., and Thode, H., 1958, Mechanism of the bacterial reduction of sulphate from isotope fractionation studies: *Transactions of the Faraday Society*, v. 54, p. 84-92.
- Hoek, J., and Canfield, D.E., 2008, Controls on isotope fractionation during dissimilatory sulfate reduction: *Microbial sulfur metabolism*. Springer, New York, p. 273-284.
- Hoek, J., Reysenbach, A.L., Habicht, K.S., and Canfield, D.E., 2006, Effect of hydrogen limitation and temperature on the fractionation of sulfur isotopes by a deep-sea hydrothermal vent sulfate-reducing bacterium: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 70, p. 5831-5841.
- Holland, M.M., Bitz, C.M., and Tremblay, B., 2006, Future abrupt reductions in the summer Arctic sea ice: *Geophysical Research Letters*, v. 33, L23503
- Jørgensen, B., and Fenchel, T., 1974, The sulfur cycle of a marine sediment model system: *Marine Biology*, v. 24, p. 189-201.
- Jørgensen, B.B., 1982, Mineralization of organic matter in the sea bed—the role of sulphate reduction: *Nature*, v. 296, p. 643-645.
- Jørgensen, B.B., Isaksen, M.F., and Jannasch, H.W., 1992, Bacterial sulfate reduction above 100 °C in deep-sea hydrothermal vent sediments: *Science*, v. 258, p. 1756-1757.
- Johnston, D.T., Farquhar, J., and Canfield, D.E., 2007, Sulfur isotope insights into microbial sulfate reduction: When microbes meet models: *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 71, p. 3929-3947.
- Johnston, D.T., Farquhar, J., Wing, B.A., Kaufman, A.J., Canfield, D.E., and Habicht, K.S., 2005, Multiple sulfur isotope fractionations in biological systems: a case study with sulfate reducers and sulfur disproportionators: *American Journal of*

- Science, v. 305, p. 645-660.
- Kaplan, I., and Rittenberg, S., 1964, Microbiological fractionation of sulphur isotopes: Journal of General Microbiology, v. 34, p. 195-212.
- Laanbroek, H.J., Abee, T., and Voogd, I.L., 1982, Alcohol conversion by *Desulfobulbus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen: Archives of Microbiology, v. 133, p. 178-184.
- McCready, R., 1975, Sulphur isotope fractionation by *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species: Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 39, p. 1395-1401.
- Mitchell, K., Heyer, A., Canfield, D.E., Hoek, J., and Habicht, K.S., 2009, Temperature effect on the sulfur isotope fractionation during sulfate reduction by two strains of the hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus*: Environmental Microbiology, v. 11, p. 2998-3006.
- Rabus, R., Hansen, T.A., and Widdel, F., 2006, Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes: The prokaryotes, v. 2, p. 659-768.
- Rees, C.E., 1973, Steady-state model for sulfur isotope fractionation bacterial reduction processes. Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 37(5), p. 1141-1162.
- Rudnicki, M.D., Elderfield, H., and Spiro, B., 2001, Fractionation of sulfur isotopes during bacterial sulfate reduction in deep ocean sediments at elevated temperatures: Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 65, p. 777-789.
- Scherer, S., and Neuhaus, K., 2006, Life at low temperatures: The prokaryotes, v. 2, p. 210-262.
- Shen, Y., Buick, R., and Canfield, D.E., 2001, Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era: Nature, v. 410, p. 77-81.
- Sim, M.S., Bosak, T., and Ono, S., 2011, Large sulfur isotope fractionation does not require disproportionation: Science, v. 333, p. 74-77.
- Sim, M.S., Ono, S., Donovan, K., Templer, S.P., and Bosak, T., 2011, Effect of electron donors on the fractionation of sulfur isotopes by a marine *Desulfovibrio* sp: Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 75, p. 4244-4259
- Thode, H., Kleerekoper, H., and Mcelcheran, D., 1951, Isotope fractionation in the bacterial reduction of sulphate: Research, v. 4, p. 581-582.
- Thode, H., Monster, J., and Dunford, H., 1961, Sulphur isotope geochemistry: Geochimica et Cosmochimica Acta, v. 25, p. 159-174.
- Zeikus, J., Dawson, M., Thompson, T., Ingvorsen, K., and Hatchikian, E., 1983, Microbial ecology of volcanic sulphidogenesis: isolation and characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. and sp. nov: Journal of General Microbiology, v. 129, p. 1159-1169.

## 附錄

附表一、*D. gigas* 在不同溫度下之細胞濃度與硫酸鹽濃度隨時間變化

<i>Desulfovibrio gigas</i> — 41°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0122	3.5E+06	27.9±0.1
7	0.0404	6.3E+06	27.0±0.1
14.5	0.1499	1.7E+07	26.0±0.2
23.5	0.2866	3.1E+07	24.1±0.9
30.5	0.3915	4.1E+07	21.3±1.1
37.5	0.4492	4.7E+07	18.4±0.0
47.5	0.4808	5.3E+07	18.0±0.0
56.5	0.4354	4.8E+07	18.0±0.1
84.5	0.3854	4.3E+07	18.0±0.1
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 30.5 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> — 39°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0169	3.9E+06	24.1±0.5
7	0.0381	6.0E+06	23.4±0.1
14	0.1284	1.7E+07	22.3±0.0
21.5	0.2760	3.7E+07	20.8±0.6
29	0.3610	5.8E+07	18.3±0.1
37	0.4160	6.4E+07	16.3±0.1
45	0.4760	7.0E+07	15.8±0.1
49	0.4930	7.2E+07	15.4±0.1
60	0.4290	6.5E+07	15.2±0.0
74	0.4440	6.7E+07	15.4±0.0
97.5	0.3710	5.9E+07	15.2±0.0
109	—	—	15.0±0.0
120	—	—	16.1±0.1
127	0.2330	4.6E+07	15.2±0.0
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 49 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> – 36°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0253	4.8E+06	24.5±0.5
5	0.0284	5.1E+06	24.0±0.2
10	0.0748	1.2E+07	23.0±0.3
13	0.1772	2.7E+07	22.0±0.2
15	0.3290	5.5E+07	21.5±0.4
17	0.3480	5.7E+07	21.1±0.4
19	0.3660	5.9E+07	20.5±1.0
21	0.3710	5.9E+07	21.0±0.1
24	0.4090	6.3E+07	19.5±0.0
29.5	0.5090	7.3E+07	16.9±0.0
35.5	0.6630	8.9E+07	15.6±0.1
43.5	0.7760	9.9E+07	13.4±0.3
53.5	0.7970	1.0E+08	13.2±0.4
65.5	0.7550	9.8E+07	13.1±0.1
76.5	0.8280	1.1E+08	12.2±0.0
92	0.9240	1.1E+08	11.8±0.1
102.5	0.5880	8.1E+07	11.1±0.3
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 24 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> – 33°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0253	4.8E+06	24.4±0.2
5	0.0234	4.6E+06	24.5±0.8
10	0.0554	1.0E+07	23.2±0.1
13	0.1284	2.2E+07	22.9±0.0
15	0.2600	4.8E+07	22.6±0.1
17	0.2710	4.9E+07	22.1±0.1
19	0.3160	5.4E+07	22.7±1.1
21	0.2430	4.7E+07	21.3±0.0
25.5	0.3510	5.7E+07	20.5±0.2
29.5	0.4640	6.9E+07	18.8±0.1
35.5	0.5090	7.3E+07	17.4±0.1
43.5	0.7340	9.6E+07	15.4±0.0
53.5	0.7160	9.4E+07	14.4±0.0
65.5	0.7240	9.5E+07	14.4±0.1
76.5	0.8300	1.1E+08	14.2±0.2
92	0.9420	1.17E+08	14.0±0.3
102.5	0.5610	7.84E+07	14.2±0.5
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 29.5 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> – 30°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0253	4.8E+06	24.1±0.5
5	0.0241	4.6E+06	23.5±0.2
10	0.0500	9.5E+06	22.9±1.1
13	0.0968	1.9E+07	22.6±0.0
15	0.1780	4.0E+07	22.4±0.4
17	0.2020	4.3E+07	21.8±0.6
19	0.2400	4.6E+07	21.1±0.4
21	0.1720	4.0E+07	21.9±0.2
25.5	0.2690	4.9E+07	21.3±0.4
29.5	0.3580	5.8E+07	19.1±0.2
35.5	0.4220	6.5E+07	18.6±0.1
43.5	0.4800	7.0E+07	16.9±0.0
53.5	0.5850	8.1E+07	14.7±0.1
65.5	0.8080	1.0E+08	13.9±0.1
76.5	0.7650	9.9E+07	11.6±0.0
92	0.9880	1.2E+08	10.8±0.2
102.5	0.5760	8.0E+07	9.8±0.2
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 29.5 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> – 27°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0253	4.8E+06	24.4±0.5
5	0.0257	4.8E+06	24.2±0.3
10	0.0498	9.4E+06	23.4±0.1
13	0.0824	1.7E+07	23.6±0.1
15	0.1900	4.1E+07	23.1±0.2
17	0.2050	4.3E+07	22.8±0.1
19	0.1790	4.0E+07	23.8±1.1
21	0.1820	4.1E+07	22.7±0.2
25.5	0.2520	4.8E+07	21.8±0.3
29.5	0.3310	5.5E+07	21.4±0.3
35.5	0.3890	6.1E+07	20.8±0.1
43.5	0.4000	6.2E+07	18.9±0.7
53.5	0.5320	7.6E+07	18.3±0.2
65.5	—	—	15.2±0.1
76.5	0.7490	9.7E+07	12.8±0.1
92	1.0290	1.3E+08	11.0±0.1
102.5	0.5980	8.2E+07	9.4±0.2
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 29.5 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> – 24°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0169	3.9E+06	24.1±0.6
7	0.0254	4.8E+06	24.5±0.2
14	0.0354	8.0E+06	23.3±0.2
21.5	0.0812	1.7E+07	23.2±0.9
29	0.1348	2.2E+07	22.9±0.3
37	0.1470	3.7E+07	22.5±0.2
45	0.2830	5.1E+07	21.5±0.3
57	0.3430	5.7E+07	20.8±0.5
74	0.3860	6.1E+07	—
97.5	0.3780	6.0E+07	15.2±0.1
109	—	—	14.5±0.0
120	—	—	14.0±0.0
127	0.3140	5.4E+07	14.5±0.1
148.5	0.3380	5.6E+07	14.1±0.2
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 74 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> – 21°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0169	3.9E+06	25.9±0.1
7	0.0270	4.9E+06	25.8±0.7
14	0.0392	8.4E+06	—
21.5	0.0432	1.3E+07	24.8±0.7
32	0.0900	1.8E+07	23.6±0.6
45	0.1396	2.3E+07	23.5±0.7
56	0.1600	3.8E+07	22.3±0.0
76	0.3080	5.3E+07	20.6±0.2
97.5	0.2950	5.2E+07	19.0±0.0
109	—	—	18.0±0.1
120	—	—	16.6±0.2
127	0.3030	5.3E+07	15.1±0.1
148.5	0.4820	7.1E+07	12.8±0.4
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 76.5 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> — 19°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0169	3.9E+06	22.7±1.2
7	0.0332	5.6E+06	23.1±0.0
14	0.0422	8.7E+06	22.5±0.1
21.5	0.0576	1.5E+07	22.0±0.2
32	0.094	1.8E+07	22.5±0.1
45	0.094	1.8E+07	21.1±0.4
73	0.168	3.9E+07	20.7±0.4
97	0.171	3.9E+07	19.0±0.0
109	—	—	18.5±0.1
120	—	—	18.1±0.0
127	0.206	4.3E+07	17.5±0.0
148.5	0.276	5.0E+07	15.7±0.1
176	0.309	5.3E+07	—
200.5	0.441	6.6E+07	—
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 121 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> — 16°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0122	4.7E+07	27.8±0.0
30.5	0.0369	8.0E+07	28.4±0.1
84.5	0.0668	1.2E+08	26.8±0.2
130.5	0.0720	1.3E+08	—
154	0.0887	1.5E+08	25.6±0.4
174.5	0.1117	1.8E+08	—
193	0.1359	2.1E+08	24.6±0.5
271.5	0.2528	3.7E+08	21.2±0.6
536.5	0.2943	4.3E+08	14.5±0.0
599	0.3300	4.8E+08	14.3±0.0
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 130.5 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> – 13°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0122	4.7E+07	27.7±0.1
130.5	0.0430	8.8E+07	26.9±0.0
154	0.0474	9.4E+07	26.3±0.1
174.5	0.0445	9.0E+07	26.2±0.1
193	0.0478	9.5E+07	25.9±0.1
271.5	0.0654	1.2E+08	24.5±0.2
536.5	0.2368	3.5E+08	17.6±0.0
599	0.3522	5.1E+08	16.4±0.1
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 174.5 小時			

<i>Desulfovibrio gigas</i> – 10°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0122	4.7E+07	27.7±0.4
130.5	0.0266	6.6E+07	28.3±0.1
154	0.0362	7.9E+07	26.2±0.5
174.5	0.0387	8.2E+07	25.1±0.5
193	0.0369	8.0E+07	—
271.5	0.0340	7.6E+07	26.0±0.3
536.5	0.0613	1.1E+08	—
599	0.0676	1.2E+08	20.7±0.3
727	0.1500	2.3E+08	—
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 536.5 小時			

說明：硫酸鹽濃度測量為二重覆平均；“—”表示未測量或資料缺失。

附表二、*T. commune* 接近株在不同溫度下之細胞濃度與硫酸鹽濃度  
變化

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 79°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	BDL	BDL	27.3±0.2
5	0.0156	2.4E+08	—
8	0.0201	2.6E+08	27.3±0.2
13	0.0634	3.9E+08	25.2±0.1
16	0.0953	4.8E+08	24.3±0.4
19	0.1070	5.2E+08	22.7±0.5
22	0.1183	5.5E+08	21.3±0.3
28	0.1206	5.6E+08	19.5±0.0
41	0.1363	6.1E+08	16.6±0.1
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 19 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 77°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0075	2.5E+06	22.3±0.1
7.5	0.0710	1.9E+08	19.9±0.2
10.5	0.1223	3.5E+08	17.8±0.2
12	0.1444	3.9E+08	16.9±0.5
15.5	0.1606	4.4E+08	14.4±0.1
19	0.1788	4.6E+08	14.4±0.1
23	0.1896	4.9E+08	13.8±0.1
32.5	0.1852	4.8E+08	13.3±0.0
39	0.1416	3.4E+08	13.3±0.1
46.5	0.1320	3.2E+08	12.7±0.0
57.5	0.1480	3.6E+08	11.9±0.1
65.5	0.1404	3.4E+08	10.8±0.3
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 12 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 72°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0056	0.0E+00	22.6±0.2
7.5	0.0357	8.7E+07	21.3±1.0
10.5	0.0711	1.9E+08	19.0±0.3
12	0.0836	2.1E+08	18.8±0.2
15.5	0.1150	3.1E+08	17.7±0.2
19	0.1356	3.3E+08	14.3±0.1
23	0.1228	2.9E+08	14.8±0.0
32.5	0.1352	3.3E+08	14.0±0.1
39	0.1304	3.1E+08	13.3±0.0
46.5	0.1152	2.7E+08	13.6±0.3
57.5	0.1036	2.3E+08	12.5±0.1
65.5	0.0896	1.9E+08	12.3±0.3
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 12 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 68°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0075	2.5E+06	22.2±0.4
7.5	0.0374	9.2E+07	21.6±0.6
14	0.0989	2.8E+08	19.0±0.4
21	0.1726	4.8E+08	15.0±0.3
26	0.1964	5.1E+08	13.3±0.2
31	0.2108	5.5E+08	13.1±0.3
35.5	0.2040	5.3E+08	13.1±0.1
45	0.2048	5.3E+08	13.3±0.1
50	0.2020	5.3E+08	12.8±0.1
58	0.2064	5.4E+08	12.5±0.1
71	0.1788	4.6E+08	11.8±0.3
96	0.1832	4.7E+08	10.7±0.3
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 23.5 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 64°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0075	2.5E+06	22.7±0.4
7.5	0.0271	6.1E+07	21.8±0.2
14	0.0677	1.8E+08	20.2±0.3
21	0.1206	3.2E+08	17.8±0.3
26	0.1508	3.7E+08	15.5±0.0
31	0.2100	5.5E+08	13.2±0.3
35.5	—	—	13.1±0.1
45	0.1996	5.2E+08	—
50	0.2144	5.6E+08	12.8±0.2
58	0.1920	5.0E+08	12.7±0.1
71	0.1908	4.9E+08	12.2±0.1
96	0.2012	5.2E+08	10.8±0.2
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 23.5 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 60°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0075	2.5E+06	22.4±0.1
7.5	0.0252	5.6E+07	22.1±0.2
14	0.0507	1.3E+08	21.4±0.2
21	0.0978	2.5E+08	20.4±0.0
26	0.1088	2.9E+08	20.2±1.0
31	0.1660	4.2E+08	17.2±0.1
35.5	0.1768	4.5E+08	—
45	0.1972	5.1E+08	13.2±0.2
50	0.2144	5.6E+08	12.2±0.3
58	0.2188	5.8E+08	—
71	0.2036	5.3E+08	11.6±0.1
96	0.2084	5.5E+08	10.5±0.3
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 26 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 55°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	0.0075	2.5E+06	22.2±0.1
7.5	0.0181	3.4E+07	22.5±0.0
14	0.0295	6.9E+07	22.4±0.2
21	0.0517	1.4E+08	21.1±0.7
28	0.0946	2.4E+08	20.8±0.3
35.5	0.1112	2.9E+08	20.0±0.3
45	0.1474	4.0E+08	21.0±0.4
50	0.1516	4.1E+08	16.5±0.2
58	0.2140	5.6E+08	14.8±0.1
71	0.1924	5.0E+08	14.0±1.6
96	0.2112	5.5E+08	11.7±0.2
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 36 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 51°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	BDL	BDL	23.0±0.1
7.5	0.0151	2.5E+07	—
15.5	0.0228	4.8E+07	21.5±0.4
23	0.0276	6.3E+07	21.4±0.2
32.5	0.0465	1.2E+08	19.4±0.0
39	0.0612	1.6E+08	20.4±0.3
46.5	0.0864	2.2E+08	19.4±0.3
57.5	0.1128	3.0E+08	18.2±0.3
65.5	0.1272	3.4E+08	16.6±0.1
73.5	0.1772	4.5E+08	13.5±0.0
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 39.5 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 47°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	BDL	BDL	22.0±0.2
7.5	0.0091	7.3E+06	22.6±0.0
15.5	0.0142	2.3E+07	22.0±0.1
23	0.0212	4.4E+07	21.9±0.1
32.5	0.0270	6.1E+07	21.2±0.2
45	0.0383	9.5E+07	20.9±0.1
57.5	0.0483	1.2E+08	20.7±0.0
70.5	—	—	19.9±0.0
81.5	—	—	19.3±0.1
93.5	0.0906	2.5E+08	16.4±0.2
118.5	0.1120	3.0E+08	14.4±0.4
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 39.5 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 45°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	BDL	BDL	27.2±0.1
41	0.0140	2.2E+07	28.2±0.2
120.5	0.0167	3.0E+07	27.5±0.1
171.5	0.0193	3.8E+07	26.9±0.3
290	0.0226	4.8E+07	27.3±0.2
377	0.0237	5.1E+07	27.2±0.3
457	0.0236	5.1E+07	26.7±0.2
574	0.0267	6.0E+07	25.2±0.0
762	0.0129	1.9E+07	25.3±0.8
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 575 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 40°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	BDL	BDL	27.0±0.2
120.5	0.0146	2.4E+07	27.5±0.1
171.5	0.0157	2.7E+07	27.8±0.0
377	0.0199	4.0E+07	26.8±0.3
574	0.0203	4.1E+07	28.0±0.0
762	0.0181	3.4E+07	28.5±0.5
957	0.0153	2.6E+07	27.9±0.1
1098	0.0232	5.0E+07	29.8±0.4
1361	0.0211	4.3E+07	28.3±0.2
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 957 小時			

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株 — 35°C			
培養時間 (hrs)	光學吸光值	細胞濃度 (cells/ml)	硫酸鹽濃度 (mmol/L)
0	BDL	BDL	30.2±0.1
171.5	0.0135	2.1E+07	28.5±0.5
377	0.0191	3.7E+07	28.8±0.3
574	0.0170	3.1E+07	29.2±0.6
957	0.0170	3.1E+07	29.0±0.2
1098	0.0172	3.2E+07	27.6±0.4
1361	0.0168	3.0E+07	28.2±0.6
細胞濃度的誤差為±10%；同位素分析取樣時間為 1098 小時			

說明：硫酸鹽濃度測量為二重覆平均；“-”表示未測量或資料缺失；BDL表示低於偵測極限。

附表三、兩菌株之細胞生長速率與硫酸還原速率

<i>Desulfovibrio gigas</i>		
溫度 (°C)	細胞生長速率 (hr <sup>-1</sup> )	硫酸還原速率 (fmol · day/cell)
41	0.08±0.01	206.1±2.0
39	0.10±0.01	178.7±2.2
36	0.22±0.01	150.3±5.4
33	0.23±0.02	102.2±5.4
30	0.21±0.02	78.0±7.5
27	0.17±0.02	65.5±3.5
24	0.07±0.02	50.0±0.4
21	0.04±0.01	45.4±0.2
19	0.03±0.00	30.6±1.0
16	0.01±0.00	7.5±0.1
13	BDL	1.9±0.0
10	BDL	2.4±0.0

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株		
溫度 (°C)	細胞生長速率 (hr <sup>-1</sup> )	硫酸還原速率 (fmol · day/cell)
79	0.07±0.01	29.9±0.5
77	0.10±0.01	56.1±0.3
72	0.15±0.01	54.3±0.3
68	0.12±0.01	41.2±0.1
64	0.10±0.01	37.1±0.2
60	0.08±0.01	22.8±0.1
55	0.08±0.00	17.8±0.1
51	0.04±0.00	13.4±0.0
47	0.02±0.00	9.6±0.1
45	0.00±0.00	8.3±0.0
40	—	—
35	—	—

說明：“—”表示未測量或資料缺失；BDL表示低於偵測極限。

附表四、兩菌株之硫同位素分析資料

<i>Desulfovibrio gigas</i>				
溫度 (°C)	$\delta^{33}\text{S}$	$\delta^{33}\text{S}_{\text{T}_0}$	$\delta^{34}\text{S}$	$\delta^{34}\text{S}_{\text{T}_0}$
41	(a)8.06±0.02 (b)7.70±0.01	5.08±0.21	(a)15.75±0.02 (b)15.05±0.01	9.87±0.39
39	(a)8.35±0.01 (b)7.57±0.10	5.68±0.18	(a)16.35±0.01 (b)14.85±0.01	11.03±0.38
36	(a)7.31±0.02 (b)7.16±0.01	5.56±0.21	(a)14.28±0.02 (b)13.94±0.01	10.81±0.41
33	(a)7.27±0.02 (b)7.22±0.02	5.56±0.21	(a)14.15±0.01 (b)14.08±0.01	10.81±0.41
30	(a)6.38±0.01 (b)6.01±0.01	5.56±0.21	(a)12.40±0.01 (b)11.82±0.01	10.81±0.41
27	(a)6.54±0.01 (b)5.86±0.01	5.56±0.21	(a)12.73±0.00 (b)11.40±0.01	10.81±0.41
24	(a)7.27±0.01 (b) —	5.68±0.18	(a)14.17±0.01 (b) —	11.03±0.38
21	(a)6.57±0.01 (b)7.51±0.01	5.68±0.18	(a)12.79±0.01 (b)14.66±0.00	11.03±0.38
19	(a)7.75±0.01 (b)7.98±0.00	5.68±0.18	(a)15.17±0.01 (b)15.60±0.01	11.03±0.38
16	(a)6.47±0.01 (b)6.34±0.01	5.08±0.21	(a)12.60±0.01 (b)12.32±0.00	9.87±0.39
13	(a)6.19±0.01 (b)6.58±0.02	5.08±0.21	(a)12.07±0.01 (b)12.80±0.01	9.87±0.39
10	(a)7.59±0.02 (b)7.41±0.00	5.08±0.21	(a)14.80±0.01 (b)14.43±0.01	9.87±0.39

說明：不同溫度培養之硫同位素組成 ( $\delta^{33}\text{S}$  和  $\delta^{34}\text{S}$ ) 為四重複測量之平均，T<sub>0</sub> 為同樣表示初始硫同位素組成的兩個樣本測量結果之平均。“—”表示未測量或資料缺失。

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株				
溫度 (°C)	$\delta^{33}\text{S}$	$\delta^{33}\text{S}_{\text{T}_0}$	$\delta^{34}\text{S}$	$\delta^{34}\text{S}_{\text{T}_0}$
79	(a)6.05±0.01 (b)7.00±0.00	5.57±0.11	(a)11.76±0.02 (b)13.64±0.01	10.82±0.23
77	(a)8.01±0.01 (b)7.97±0.01	5.96±0.26	(a)15.64±0.01 (b)15.57±0.00	11.61±0.52
72	(a)7.76±0.01 (b)7.13±0.01	5.96±0.26	(a)15.20±0.01 (b)13.88±0.01	11.61±0.52
68	(a)10.19±0.02 (b)—	5.72±0.05	(a)19.89±0.00 (b) —	11.13±0.12
64	(a)9.20±0.01 (b) 8.34±0.02	5.72±0.05	(a)17.93±0.01 (b)16.24±0.01	11.13±0.12
60	(a)7.88±0.01 (b) 8.28±0.02	5.72±0.05	(a)15.35±0.01 (b)16.15±0.00	11.13±0.12
55	(a)8.11±0.02 (b)8.13±0.01	5.72±0.05	(a)15.80±0.01 (b)15.86±0.01	11.13±0.12
51	(a)6.38±0.01 (b)7.16±0.01	5.96±0.26	(a)12.42±0.01 (b)13.95±0.00	11.61±0.52
47	(a)7.03±0.01 (b)7.92±0.01	5.96±0.26	(a)13.64±0.01 (b)15.43±0.01	11.61±0.52

說明：不同溫度培養之硫同位素組成 ( $\delta^{33}\text{S}$  和  $\delta^{34}\text{S}$ ) 為四重複測量之平均， $\text{T}_0$  為同樣表示初始硫同位素組成的兩個樣本測量結果之平均。“—”表示未測量或資料缺失。

附表五、兩菌株之硫同位素分化計算結果

<i>Desulfovibrio gigas</i>					
溫度 (°C)	$^{33}\epsilon$	$^{34}\epsilon$	$^{33}\alpha$	$^{34}\alpha$	$\Delta^{33}\text{S}$
41	10.5±0.7	20.7±1.0	0.9895±0.0007	0.9793±0.0010	0.2488 ±0.0006
39	8.5±1.7	17.1±1.0	0.9915±0.0017	0.9829±0.0010	0.3179±0.0010
36	8.5±0.4	16.8±1.5	0.9915±0.0004	0.9832±0.0015	0.1437 ±0.0008
33	7.4±0.4	14.6±1.3	0.9926±0.0004	0.9854±0.0013	0.0991 ±0.0007
30	8.1±1.3	15.8±4.0	0.9919±0.0013	0.9842±0.0040	0.1204 ±0.0021
27	5.3±1.0	10.3±2.4	0.9947±0.0010	0.9897±0.0024	0.0508 ±0.0013
24	6.6±1.3	13.1±0.8	0.9934±0.0013	0.9869±0.0008	0.1157 ±0.0008
21	7.1±2.6	14.0±1.4	0.9929±0.0026	0.9860±0.0014	0.1483 ±0.0015
19	7.6±1.5	15.2±1.0	0.9924±0.0015	0.9848±0.0010	0.2415 ±0.0009
16	10.6±2.1	20.9±2.2	0.9894±0.0021	0.9791±0.0022	0.1848 ±0.0015
13	15.1±3.0	29.7±3.2	0.9849±0.0030	0.9703±0.0032	0.3217 ±0.0022
10	12.6±1.1	24.8±1.5	0.9874±0.0011	0.9752±0.0015	0.2278 ±0.0009

說明：硫同位素分化計算為二重複測量之平均。

<i>Thermodesulfobacterium commune</i> 接近株					
溫度 (°C)	$^{33}\epsilon$	$^{34}\epsilon$	$^{33}\alpha$	$^{34}\alpha$	$\Delta^{33}\text{S}$
79	4.2±0.7	8.2±0.7	0.9958±0.0007	0.9918±0.0007	0.0735±0.0005
77	5.6±1.0	11.1±1.0	0.9944±0.0010	0.9889±0.0010	0.0848±0.0007
72	5.5±0.3	10.9±1.4	0.9945±0.0003	0.9891±0.0014	0.1085±0.0007
68	16.1±0.2	31.6±0.4	0.9839±0.0002	0.9684±0.0004	0.2916±0.0002
64	8.4±0.2	16.4±0.2	0.9916±0.0002	0.9836±0.0004	0.0920±0.0002
60	8.3±0.3	16.2±0.3	0.9917±0.0003	0.9838±0.0002	0.1037±0.0002
55	9.7±0.3	19.0±0.3	0.9903±0.0003	0.9811±0.0003	0.1413±0.0002
51	5.2±2.4	10.0±2.8	0.9948±0.0024	0.9900±0.0028	-0.0015±0.0018
47	5.5±1.3	10.7±1.3	0.9945±0.0013	0.9893±0.0013	0.0174±0.0009

說明：硫同位素分化計算為二重複測量之平均。