

硫酸盐还原菌多相分类系统的研究进展

陈悟 崔永明 潘飞 陈思奇 祝荻 曾庆福

(武汉科技学院纺织印染清洁生产教育部工程研究中心, 湖北 武汉, 430073)

摘 要: 自硫酸盐还原菌由 Beijerinck 发现并命名至今, 其分类地位一直处于不断的变化之中。近年来, 随着一些新种的发现和新的分析方法应用, 硫酸盐还原菌分类手段已由传统的形态学分类方法向现代的多相分类法过渡。本文阐述了经典分类法、化学分类法、分子分类法在硫酸盐还原菌分类中的应用, 并对它们的优缺点作了简要的评价。

关键词: 硫酸盐还原菌, 16s rDNA, 系统发育, 多相分类

中图分类号: TP393

文献标识码: A

文章编号: 1009-5160(2008)-007-06

硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing bacteria SRB) 是能利用硫酸盐和其它氧化态硫化物, 或利用元素硫作为电子受体, 并将这些物质还原成 S^{2-} 的原核生物。其中细胞含 C_3 型细胞色素较多; 罕见还原硝酸盐成氨, 有些种可固氮^[1]; 有些种的菌株行混合营养型, 利用 H_2 作为能源, 同化乙酸和 CO ; 种与种之间通常呈交叉抗原反应^[5]。它们存在于厌氧的泥浆、淡水的沉积物、咸水和海水生境、金属输送管道或容器以及人类或动物的口腔和胃肠道内^[2]。

由于硫酸盐还原菌特殊的生理作用, 可用于燃料脱硫、生物浸矿、染料、造纸^[3]、富硫酸盐^[4]的废水处理, 重金属污染处理, 核废料处理^[5], 原油泄漏污染处理^[6]等等。在自然界硫的循环中, 硫酸盐还原菌也发挥着不可替代的作用, 而受到从事环境修复、生态保护、元素循环^[7]等方面研究人员的重视。硫酸盐还原菌对各类金属均有不同程度的腐蚀作用并由此带来了巨大的经济损失, 而受到从事材料保护^[8]、金属防腐以及杀菌药剂研究与开发等方面研究人员的广泛关注。同时, 由于硫酸盐还原菌能够引起慢性肠炎、肠溃疡、肠癌以及口腔溃疡^[2]等疾病, 越来越受到从事病理研究的微生物学家的广泛关注。由于硫酸盐还原菌是按照它的生理学特征来定义的, 它的形态学等传统的分类系统特征不显著, 所以它的分类系统一直比较混乱。本论文从经典的分类方法入手, 按照绝大多数研究硫酸盐还原菌分类学地位的工作者公认的标准全面阐述它的新分类系统。

1. 硫酸盐还原菌有效发表的种

利用向福等^[9]开发的基于 Bioperl 设计的远程大规模获取基因系列的程序, 从 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 得到所有硫酸盐还原菌的 16s rRNA 新报道基因系列片断 198 条, 结合细菌分类法网站 Bacterial Nomenclature Up-to-date (<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>) 和细菌分类标准名录 LBSN 网站 (<http://www.bacterio.cict.fr>) 提供的最新 SRB 相关属和种的标准命名: 共有 40 个属 137 种。古细菌界只有古生球菌属 (*Archaeoglobus*) 中的三种; 细菌界中种类最多的是 δ -紫色光合细菌门中的脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 共有 42 种已经被发现, 该门中还有 33 个属 59 种被发现; 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 有 2 个属 26 个种, 其中脱硫肠状菌属 (*Desulfotomaculum*) 共有 23 种被发现; 硝化螺菌门 (*Nitrospira*) 只有嗜热脱硫弧菌属 (*Thermodesulfovibrio*) 中的 2 个种被发现, 热脱硫菌门 (*Thermodesulfo- bacteria*) 有 2 个属 5 个种被发现。详细的种属见表 1-1

2. 不同分类方法在硫酸盐还原菌分类中的应用

硫酸盐还原菌在 1895 年首先由 Beijerinck 发现并命名, 剑桥的 Postgate 系统地研究了 SRB 的生理、生态和生化特征及营养需求, 直到 20

作者简介: 陈悟 (1968-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 天然纺织品原料清洁生产。

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAC02A11) 和湖北省教育厅重大科技攻关项目 (Z20081701)

表 1.1 硫酸盐还原菌有效发表的种 (本研究将用到的菌株, 截至 2008.12.10)

Table 1.1 Availability genus of sulfate-reducing bacteria

门	属	典型种	种类数
	<i>Desulfobacca</i>	<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	1
	<i>Desulfobacter</i>	<i>Desulfobacter postgatei</i>	7
	<i>Desulfobacterium</i>	<i>Desulfobacterium indolicum</i>	7
	<i>Desulfobacula</i>	<i>Desulfobacula toluolica</i>	2
	<i>Desulfobotulus</i>	<i>Desulfobotulus sapovorans</i>	1
	<i>Desulfobulbus</i>	<i>Desulfobulbus propionicus</i>	4
	<i>Desulfocapsa</i>	<i>Desulfocapsa thiozymogenes</i>	2
	<i>Desulfocella</i>	<i>Desulfocella halophila</i>	1
	<i>Desulfococcus</i>	<i>Desulfococcus multivorans</i>	2
	<i>Desulfofaba</i>	<i>Desulfofaba gelida</i>	3
	<i>Desulfofrigus</i>	<i>Desulfofrigus oceanense</i>	2
	<i>Desulfofustis</i>	<i>Desulfofustis glycolicus</i>	1
	<i>Desulfohalobium</i>	<i>Desulfohalobium retbaense</i>	1
δ—	<i>Desulfomicrobium</i>	<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	6
	<i>Desulfomonas</i>	<i>Desulfomonas pigra</i>	1
	<i>Desulfomonile</i>	<i>Desulfomonile tiedjei</i>	2
紫	<i>Desulfomusa</i>	<i>Desulfomusa hansenii</i>	1
	<i>Desulfonatronovibrio</i>	<i>Desulfonatronovibrio</i>	1
色		<i>hydrogenovorans</i>	
	<i>Desulfonatronum</i>	<i>Desulfonatronum lacustre</i>	2
光	<i>Desulfonauticus</i>	<i>Desulfonauticus submarinus</i>	1
	<i>Desulfonema</i>	<i>Desulfonema limicola</i>	6
合	<i>Desulfonospira</i>	<i>Desulfonospira thiosulfogenes</i>	1
	<i>Desulforegula</i>	<i>Desulforegula conservatrix</i>	1
细	<i>Desulforhabdus</i>	<i>Desulforhabdus amnigena</i>	1
	<i>Desulforhopalus</i>	<i>Desulforhopalus vacuolatus</i>	2
菌	<i>Desulfosarcina</i>	<i>Desulfosarcina variabilis</i>	1
	<i>Desulfospira</i>	<i>Desulfospira joergensenii</i>	1
门	<i>Desulfotalea</i>	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	2
	<i>Desulfotignum</i>	<i>Desulfotignum balticum</i>	2
	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	42
	<i>Desulfovirga</i>	<i>Desulfovirga adipica</i>	1
	<i>Bilophila</i>	<i>Bilophila wadsworthia</i>	1
	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira briensis</i>	3
	<i>Lawsonia</i>	<i>Lawsonia intracellularis</i>	1
厚壁	<i>desulfotomaculum</i>	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	23
菌门	<i>Desulfosporosinus</i>	<i>Desulfosporosinus orientis</i>	3
硝化螺菌门	<i>Thermodesulfovibrio</i>	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>	2
热脱硫菌门	<i>Thermodesulfatator</i>	<i>Thermodesulfatator indicus</i>	1
	<i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>Thermodesulfobacterium commune</i>	4
	<i>Geothermobacterium</i>	<i>Geothermobacterium ferrireducens</i>	2
古细菌界	<i>Archaeoglobus</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	3

表 1.2 典型硫酸盐还原菌不同属中含有的细胞色素
Table 1.2 Cytochrome of typical SRB

不同属	细胞色素	不同属	细胞色素
<i>Desulfobulbus</i>	b,c,c ₃	<i>Thermodesulfobacterium</i>	b,c
<i>Desulfomicrobium</i>	b,c	<i>Desulfococcus</i>	b,c
<i>Desulfomonas</i>	c	<i>Desulfomonile</i>	c ₃
<i>Desulfovibrio</i>	c ₃ ,b,c	<i>Desulfonema</i>	b,c
<i>Desulfotomaculum</i>	b,c	<i>Desulfosarcina</i>	b,c
<i>desulfobacterium</i>	b,c		

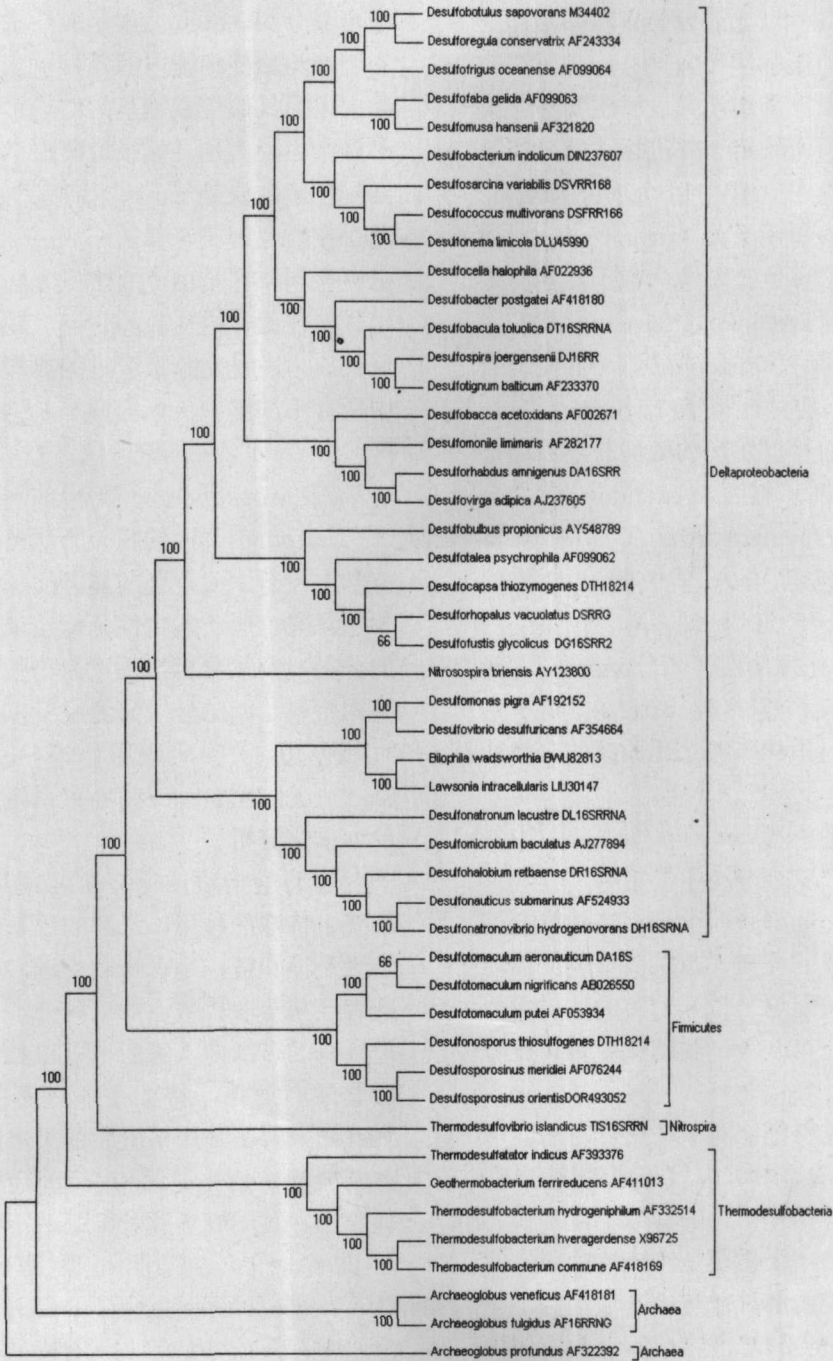


图 1 GeneBank 上报道的硫酸盐还原菌典型菌株的系统进化分析
Fig1 Phylogenetic relationship among typical genus of GeneBank

世纪 70 年代以前, 确认的硫酸盐还原菌也只有脱硫弧菌 (*Desulfovibrio*)、脱硫肠状菌 (*Desulfotomaculum*) 和脱硫单胞菌 (*Desulfomonas*) 等 3 个属。1965 年 Campbell 等提出将 SRB 以是否产芽孢分为两类。产芽孢的有机体归属为脱硫肠状菌属 (*Desulfotomaculum*) 不产芽孢者归于脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)。1984 年出版的第一版伯杰氏系统细菌学手册第一卷中, Niddel 和 Pfenning 提出了 SRB 属的检索表, 把所有的能还原硫酸盐、亚硫酸盐或元素硫的细菌归为 8 个属。以上的分类方法都是建立在对硫酸盐还原菌的形态学和生理、生化研究的基础上得出的主要属; 利用现代分子生物学分类方法结合传统的经典方法对 SRB 进行系统分类是 2000 年^[10], 将硫酸盐还原菌的 14 个属分为四类: 革兰氏阴性嗜温硫酸盐还原菌 (Gram-negative mesophilic SRB), 革兰氏阳性产孢子硫酸盐还原菌 (Gram-positive spore forming SRB), 嗜热硫酸盐还原菌 (thermophilic bacterial SRB) 和嗜热的古硫酸盐还原菌 (thermophilic archaeal SRB)。而目前发现的硫酸盐还原菌报道的有 40 个属 137 种, 按照 Alexander L^[11] 的分类方法分为细菌界 Bacteria 和古细菌界 Archaea: 细菌界包括 δ -紫色光合细菌门 (*Deltaproteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、硝化螺菌门 (*Nitrospira*) 热脱硫菌门 (*Thermodesulfobacteria*)。这是目前国际公认的比较科学的硫酸盐还原菌的分类系统。

2.1 经典分类方法

硫酸盐还原菌的早期分类主要根据

2.1.1 结构性状: 如形状、大小、特殊特征、运动形式、静止阶段的性质, 革兰氏染色反应以及宏观生长外貌。按照这一特征分类的结果主要见伯杰细菌鉴定手册第八版: 脱硫弧菌属和脱硫肠状菌属。

2.1.2 生化和营养特征: 对一些化合物的利用和作用 (通常是碳水化合物), 以及形成的终产物, 继而关于细胞成分和代谢物的其他生化资料。按照这一标准分类的结果主要是将硫酸盐还原菌分为两大类: 第一类的菌种对有机基质进行不完全氧化, 以乙酸盐做为最终产物; 第二类的菌种将包括乙酸盐在内的有机基质完全氧化生成 CO_2 ^[12]。

2.1.3 其它分类系统主要是根据工程上需要而得到的分类系统。如在工程应用中, 国内外的

学者依据 SRB 对底物利用的不同将其分为三类: 即氧化氢的硫酸盐还原菌 HSRB; 氧化乙酸的硫酸盐还原菌 ASRB; 氧化高级脂肪酸的硫酸盐还原菌 FASRB。根据硫酸盐还原菌最适宜生长的环境温度将其分为常温菌、嗜热菌、嗜冷菌等等。

2.2 化学分类方法

硫酸盐还原菌化学分类方法的研究主要集中在细胞色素的分析、脂肪酸成分分析和细胞壁的氨基酸成分分析。这些分析方法只能为最终的种属归类提供一个依据, 而不能根据检测的结果来给其分类。细胞色素是血红蛋白的特化形态, 它们参与原核细胞内的各种氧化还原反应, 在菌体内依照其血红素辅基的结构可以分为 a、b、c、d 四个主要类别。据报道硫酸盐还原菌中含有的细胞色素主要是 c、b 型细胞色素: 细胞色素 C₃ 几乎在所有的脱硫弧菌 (*Desulfovibrio*) 中可以分离得到, 它是由 110 个氨基酸、四条血红素链组成, 在菌体内与硫的传递、脱氢酶和耐氧能力有关。下表是文献报道过的典型硫酸盐还原菌属中所含不同细胞色素的情况, 这种分类方法对于区分 δ -紫色光合细菌门 (*Deltaproteobacteria*) 中的一些属和厚壁菌门 (*Firmicutes*) 中的脱硫肠状菌属, 特别是从形态学上没有太大差别的属之间加以区分有一定的参考意义。脂肪酸定性分析结果限于属和属以上的分类, 定量分析结果可为种和亚种提供有用的基本资料。脂肪酸组分测定可以用玻璃毛细管柱气相色谱, 气-质联用色谱, 美国 MIDI 公司 Sherolock 全自动细菌鉴定系统用于菌体脂肪酸的标准化分析。

脂肪酸指纹图谱分析常常用作分析微生态系统中特殊的种属, 水解的甲基化物分析可以从是否是饱和链, 是否带有支链, 是否带有环丙基或者羟基等取代基而加以区分不同的种类。据报道所有的古细菌水解后可以得到支链带有醚链的脂肪酸^[13]而这一特征在细菌界就比较难以观察到。缩醛磷脂是严格厌氧菌类水解特征产物, 例如: 梭菌、消化道菌和脱硫弧菌, 0-烷基酰基-磷脂也含有缩醛磷脂是细菌的特征产物; 另据报道说含有丙三醇脂是嗜盐硫酸盐还原菌 *Desulfohalobium retbaense* 和粘细菌 *Stigmatella aurantiaca* 的特征; 相比较来说含有饱和链达到 90% 并且带有偶数个丙三醇脂支链是嗜热菌 *Aquifex pyrophilus* and *Thermodesulfobacterium commune* 的特征; 报道^[14]也认为嗜温的硫酸盐还原菌中也含有偶数或

者双烷基脂的结构; 因此, 在原核生物中, 将含有饱和脂链的作为古细菌和极端细菌的分类特征。

2.3 分子分类方法

通过 16SrRNA 基因片段分析对微生物进行分类鉴定对于硫酸盐还原菌来说主要有以下两种:

一是将 PCR 产物克隆到质粒载体上进行测序, 与 16SrRNA 数据库中的序列进行比较, 确定其在进化树中的位置, 从而鉴定样本中可能存在的微生物种类, 该方法获得的信息最全面, 但在样品成分复杂的情况下需要大量的测序工作。图 1 是根据报道的 SRB 有效种中比较有代表性菌株利用 T-COFFEE 进行多重序列比对, 比对结果用 MEGA3^[15] 软件构建最大节约一致树。

二是通过 16SrRNA 种属特异性的探针与 PCR 产物杂交以获得微生物组成信息。此外探针也可以直接与样品进行原位杂交检测, 通过原位杂交不仅可以测定微生物的形态特征和丰度, 而且能够分析它们的空间分布。该方法简单快速, 主要应用于快速检测, 但可能出现假阳性或假阴性结果。在所有跟鉴定硫酸盐还原菌种属有关的以 16S rRNA 为靶标的寡聚核苷酸探针中: 有的探针特异性很强, 可以鉴别到种; 并且有的还有几组特异性探针鉴定同一种, 但是绝大部分探针的特异性只能到属, 有的只能判别到门; 所以, 用探针的方法鉴别微生物只能作为辅助的鉴定手段。

3. 结论

由于硫酸盐还原菌是以生理生化特性来命名的, 其分类特征不明显。目前比较快捷的分类方法是对 16SrDNA D1 /D2 区进行测序分析, 然后将该系列与国际核酸数据库中所有硫酸盐还原菌的同源序列进行比对, 与亲缘关系最近菌株的同源性达到一定程度差异(通常小于 99%), 就可作为疑似菌株进行详细形态学、生理生化鉴定及更多分子生物学手段分析, 以确立其分类学地位。而要确定一个新种的分类地位, 需要有形态学、全面的生理生化、辅酶 Q 类型及遗传发育特征等信息的支撑, 缺少其中任何指标将使结果缺乏说服力。

参考文献:

[1] Beller, H. R, E. A. Edwards. Anaerobic toluene activation by benzylsuccinate synthase in a highly enriched methanogenic culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000,66, 5503~5505.

[2] P. S. Langendijk-Genevaux, W.-D. Grim Sulfate-reducing bacteria in relation with other potential periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*,2001,28: 1151~1157.

[3] Jane G. Caroline S. H. Metabolic diversity aromatic compound utilization by anaerobic microbes *Annu. Rev. Microbiol*,2002, 56:345~369.

[4]K. Szymanska., F. Domka, Interaction of Amino Acids with Metal and Sulphate Reduction by *Desulfotomaculum Ruminis* Bacteria *Polish. Journal of Environmental Studies*, 2003,12(1): 99~104.

[5]J. H. P. Watson, I. W. Croudace, Adsorption of radioactive metals by strongly magnetic iron sulfide nanoparticles produced by sulfate-reducing bacteria, *Separation Science and Technology*. 2001,36:2571~2607.

[6]D. fortin, R. goulet, Seasonal Cycling of Fe and S in a Constructed Wetland: The Role of Sulfate-Reducing Bacteria, *Geomicrobiology Journal*, 2000, 17:221~235

[7]Kirsten Ku' sel, Ursula Roth, Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments, *Environmental and Experimental Botany*, 2001,46:213~223.

[8]Z. Keresztes, I. Felho si, E. Ka'lma'n Role of redox properties of biofilms in corrosion processes, *Electrochimica Acta*.2001,46:3841~3849.

[9] Fu Xiang, Wu Chen, Longjiang Yu: Ethernet driver design and implementation based on gene serious of Bioperl *Biotechnology* 2004,14:64~66(in Chinese) (向福,陈悟,余龙江.基于 Bioperl 的基因序列获取的程序设计与实现. *生物技术*.2004,14:64~66)

[10] Hector F. C, Norris H. W, Andrew O; Phylogeny of sulfate-reducing bacteria1. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000,31: 1~9

[11] Alexander Loy, Angelika Lehner, Natuschka Lee., Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA Gene-Based Detection of All Recognized Lineages of Sulfate- Reducing Prokaryotes in the Environment. *Appl. Environ. Microbiol*, 2002,68: 5064~5081

[12] Widdel, F. and Hansen, T.A., The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*: Springer, New York,1992:583~624.

[13] Koga Y, Morii H, Akagawa-Matsushita M, Ohga M, Correlation of polar lipid composition with 16S rRNA phylogeny in methanogens. Further analysis of lipid component parts, *Biosci Biotech Biochem*.1998, 62:230~236

[14] Orphan VJ, Hinrichs KU, Ussler III W, Paull CK, Taylor LT, Sylva SP, Hayes JM, DeLong EF, Comparative analysis of methane-utilizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments, *Appl Environ Microbiol*, 2001,67:1922~1934

[15] Kumar.S, Tamura.K., MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J], *Briefings in Bioinformatics*,2004, 302: 205~217.

THE ADVANCE ON POLYPHASIC AXONOMY OF SULFATE-REDUCING BACTERIA

CHEN Wu, CUI Yongming, PAN Feng, CHEN Siqu, ZHU Di, ZENG Qingfu

(1. The Research Centre of Environmental Science; Wuhan University of Science & Engineering; Wuhan Hubei 430073; China

2 School of Life Science & Technology, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract : Taxonomy of genus sulfate-reducing bacteria has been changing since it was set up by Beijerinck. The classification of the genus has been changed dramatically in recent years , with the new species described and new methods. The changing of taxonomy is mainly on the methods altering from old morphological to modern polyphasic taxonomy. Additionally, the applications of classical method, chemical method as well as molecular method in taxonomy were elucidated. Their advantages and disadvantages were also evaluated in this paper.

Key words : sulfate-reducing bacteria; 16s rDNA; lineages evolution; polyphasic taxonomy

www.cnki.net