

产甲烷菌细菌学原理与应用

CHANJIAWANJUNXIJUNXUEYUANLIYUYINGYONG

“十二五”国家重点图书



市政与环境工程系列研究生教材

程国玲 李巧燕 李永峰 著



哈尔滨工业大学出版社

Q 939.1
J0141

P1

“十二五”国家重点图书
市政与环境工程系列研究生教材

产甲烷菌细菌学原理与应用

程国玲 李巧燕 李永峰 著

哈尔滨工业大学出版社

内 容 简 介

本书共分为8章,首先介绍了产甲烷菌的分类、生态多样性、生理特性、基因组研究及厌氧反应器中的产甲烷菌,然后阐述了产甲烷菌的甲烷形成原理,最后介绍了产甲烷菌的研究方法和工业应用。

本书可作为微生物学、环境微生物学、环境科学及工程专业的学习材料,也可供从事微生物学、环境保护等教学与研究人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

产甲烷菌细菌学原理与应用/程国玲,李巧燕,李永峰著.
—哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2013.11
ISBN 978-7-5603-4291-7

I. ①产… II. ①程…②李…③李…
III. ①产甲烷菌-细菌学 IV. ①Q939.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 263515 号

策划编辑 贾学斌
责任编辑 苗金英
出版发行 哈尔滨工业大学出版社
社 址 哈尔滨市南岗区复华四道街 10 号 邮编 150006
传 真 0451-86414749
网 址 <http://hitpress.hit.edu.cn>
印 刷 哈尔滨工业大学印刷厂
开 本 787mm×1092mm 1/16 印张 10 字数 243 千字
版 次 2013 年 11 月第 1 版 2013 年 11 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-5603-4291-7
定 价 28.00 元

(如因印装质量问题影响阅读,我社负责调换)

《市政与环境工程系列研究生教材》编审委员会

名誉主任委员 任南琪 杨传平

主任委员 周 琪

执行主任委员 李永峰 施 悦

委 员 (按姓氏笔画顺序排列)

马 放	王 鹏	王爱杰	王文斗	王晓昌
冯玉杰	田 禹	刘广民	刘鸣达	刘勇弟
孙德志	李玉文	李盛贤	那冬晨	陈兆波
吴晓芙	汪大永	汪群惠	张 颖	张国财
林海龙	季宇彬	周雪飞	赵庆良	赵晓祥
姜 霞	姜金斗	郑天凌	唐 利	徐功娣
徐春霞	徐菁利	黄民生	曾光明	楼国庭
蔡伟民	蔡体久	颜涌捷		

《产甲烷菌细菌学原理与应用》编写人员名单与分工

作 者 程国玲 李巧燕 李永峰

编写分工 程国玲:第1~2章

李巧燕:第3~5章

李永峰:第6~8章

文字整理和图表制作:冯可心、梁乾伟、吴忠珊、张玉

前 言

自工业革命以来,水处理问题一直困扰着发达国家和发展中国家。污水处理能耗大、运行管理费用高,因此尽管其社会和环境效益显著,但经济效益并不明显,是一项投入大产出少的行业。随着现代高速厌氧反应器的出现以及对厌氧技术原理的深入认识,厌氧技术已为多种工业和生活废水的工业化处理提供了重要手段,它以低成本和能源的回收成为具有吸引力的技术。

厌氧消化是以废水中构成 BOD 的有机污染物为基质,进行沼气发酵,将其最终转化成以甲烷和二氧化碳为主要成分的生物气(沼气),借以降低废水的 BOD 值,同时获得气体燃料。产甲烷菌是参与有机物厌氧消化过程的最后一类细菌群,同时也是最重要的一类细菌群。

本书系统地介绍了产甲烷菌以及相关的研究方法和在工业方面的应用。全书共分为 8 章。第 1 章系统地阐述了产甲烷菌的分类,包括微生物的分类和产甲烷菌的分类以及一些代表性的菌种;第 2 章介绍了产甲烷菌的生态多样性,以产甲烷菌的四类生境为主介绍了产甲烷菌在自然系统中的分布;第 3 章介绍了产甲烷菌的生理特性,主要介绍了产甲烷菌独特的细胞结构、辅酶,生长繁殖条件以及产甲烷菌与不产甲烷菌之间的相互作用;第 4 章介绍了产甲烷菌的基因组研究进展以及基于基因组信息的产甲烷菌进化分析;第 5 章概述了厌氧反应器中的产甲烷菌,包括厌氧工艺的分类,以及厌氧污泥中产甲烷菌的种类,另外还简述了好氧活性污泥中的产甲烷菌;第 6 章阐述了产甲烷菌的甲烷形成途径,并以此为基础介绍了沼汽化工程;第 7 章阐述了产甲烷菌的富集、分离、保存以及产甲烷菌生理特性和产甲烷活性的测定方法;第 8 章系统地介绍了产甲烷菌在工业方面的应用,包括在厌氧生物处理、煤气层开发、酿酒等方面的研究进展和应用。

本书在编写过程中参考了相关中外文献,在此向文献作者表示诚挚的谢意。本书承蒙黑龙江省自然科学基金(E201354)项目的支持。由于作者的水平有限,加之科技的发展日新月异,所以本书的内容仍有不少疏漏之处,敬请广大读者及同行批评指正。

作 者

2013 年 6 月

目 录

第1章 产甲烷菌的分类	1
1.1 微生物的分类	1
1.2 产甲烷菌的分类	10
1.3 产甲烷菌的代表种	18
第2章 产甲烷菌的生态多样性	22
2.1 产甲烷菌的生物地球化学作用	22
2.2 第一类生境	24
2.3 第二类生境	27
2.4 第三类生境	32
2.5 第四类生境	35
2.6 其他生态环境中的产甲烷菌	36
第3章 产甲烷菌的生理特性	41
3.1 产甲烷菌的微生物特性	41
3.2 产甲烷菌的细胞结构特征	41
3.3 产甲烷菌的辅酶	44
3.4 产甲烷菌的生长繁殖	49
3.5 产甲烷菌与不产甲烷菌之间的相互作用	54
第4章 产甲烷菌的基因组研究	58
4.1 产甲烷菌基因组特征	58
4.2 产甲烷菌的基因结构	61
4.3 突变型	63
4.4 原生质体	64
4.5 基因工程	64
4.6 问题与展望	65
第5章 厌氧反应器中的产甲烷菌	66
5.1 常见厌氧反应工艺	66
5.2 厌氧消化污泥中的产甲烷菌	80
5.3 厌氧颗粒污泥中的产甲烷菌	82
5.4 好氧活性污泥中的产甲烷菌	92
第6章 产甲烷菌的甲烷形成原理	93
6.1 产甲烷菌的甲烷形成途径	93
6.2 甲烷形成过程中的能量代谢	103
6.3 沼气技术	106

第7章 产甲烷菌的研究方法..... 126

7.1 厌氧操作 126

7.2 产甲烷菌的分离 131

7.3 产甲烷菌形态观察 134

7.4 产甲烷菌的保存方法 136

7.5 产甲烷菌的生理学特性测定 138

第8章 产甲烷菌的工业应用..... 142

8.1 厌氧生物处理 142

8.2 煤层气开发 143

8.3 酿酒行业 144

8.4 微生物采油 145

8.5 生物制氢 146

参考文献..... 150

第 1 章 产甲烷菌的分类

1.1 微生物的分类

1.1.1 微生物的分类原则

对微生物进行分类存在两种截然不同的分类原则:第一种是根据表型特征的相似性分群归类,这种表型分类重在应用,不涉及生物进化或不以反映生物亲缘关系为目标;第二种分类原则是指研究各类微生物进化的历史,按照生物系统发育相关性水平来分群归类,其目标是探寻各种生物之间的进化关系,建立反映生物系统发育的分类系统。

1.1.1.1 表型分类

许多特征被用于微生物分类和鉴定,这些特征分为两类:经典特征和分子特征。

1. 经典特征

分类学的经典方法是利用形态学、生理学、生物化学、生态学和遗传特征来分类,这些特征用于微生物分类已有许多年了。日常鉴定中它们是非常有用的,并可以同时提供系统发育信息。

(1) 形态特征。

有许多理由认为形态特征在微生物分类学中是重要的。形态学容易观察和分析,特别是在真核微生物和更复杂的原核生物中。另外,比较形态也是有价值的,因为形态特征依赖于许多基因的表达,通常是遗传稳定的,并且正常情况下(至少在原核生物中)形态不会随环境改变而有大的变化。因此,形态相似性常常是与系统发育关系密切的特征。

许多不同形态特征用于微生物分类和鉴定(表 1.1)。虽然光学显微镜始终是非常重要的工具,但约 0.2 μm 的分辨率极度限制了它用于观察更小的微生物及结构。透射和扫描电镜,因其更高的分辨率,已极大地帮助了所有微生物类群的研究。

表 1.1 分类和鉴定中使用的形态学特征

特征	微生物类群
细胞形状	所有主要类群
细胞大小	所有主要类群
菌落形态	所有主要类群
超微结构特征	所有主要类群
染色行为	细菌,一些真菌
纤毛和鞭毛	所有主要类群
运动机制	滑行细菌,螺旋体
内生孢子形状和位置	形成内生孢子细菌
孢子形态和位置	细菌、藻类、真菌
细胞内含物	所有主要类群
颜色	所有主要类群

（2）生理和代谢特征。

因为生理和代谢特征直接与微生物的酶和转运蛋白的本性和活性相关,所以它们是非常有用的。由于蛋白是基因的产物,分析这些特征即是提供了微生物基因组间的间接比较。

分类和鉴定中使用的生理和代谢特征有:碳源和氮源;细胞壁组成;能源;发酵产物;一般营养类型;最适生长温度和范围;发光;能量转换机制;运动性;渗透耐性;氧关系;最适 pH 值和生长范围;光合作用色素;盐需求及耐性;次级代谢产物形成;对代谢抑制剂和抗生素的敏感性;贮藏内含物。

（3）生态特征。

许多特征是自然界中的生态特征,因为它们影响着微生物与其环境之间的关系。因为根据生态特征即使是关系非常近的微生物也能区分开,所以这些特征是有分类价值的。生活在人体不同部位的微生物相互间不同,并且也不同于那些生活在淡水、陆地上和海洋环境中的微生物。下面是一些分类学上重要生态特征的例子,如生命循环类型;天然共生关系;对特定宿主致病能力;栖息地参数如对温度、pH 值、氧和渗透浓度的要求,其中许多生长需求也被认为是生理特征。

（4）遗传分析。

因为大多数真核生物能有性繁殖,所以在这些生物分类中遗传分析是相当有用的。前面已提到,根据有性繁殖定义种,虽然原核生物没有有性繁殖,在它们分类时研究通过转化和接合导致染色体基因交换,有时是有用的。

转化可发生在原核生物不同种之间,但在属间非常少。两菌株之间的转化发生表明它们关系近,因为除非细菌基因组相当相似,否则不能发生转化。在以下几个属已进行了转化研究:杆菌属、微球菌属、嗜血菌属、根瘤菌属及其他属。

接合研究也能够提供有用数据,特别是对肠道细菌。例如,埃希氏菌属能与沙门氏菌属和志贺氏菌属接合但不能与变形菌属和肠杆菌属接合,与其他数据结合分析表明,前 3 个属彼此间关系近于同变形菌属和肠杆菌属的关系。

质粒在分类学上无疑是重要的,因为大多数细菌都有质粒,并且许多质粒携有编码表型性状的基因。如果质粒携有在分类计划中的主要特性的基因,那么质粒对分类将有重要影响,但是最好是依据许多特征进行分类。当依据非常少的特征来分类时,而其中一些特征由质粒基因编码,那么可能会得出错误结果。例如,硫化氢产量和乳糖发酵在肠道细菌分类中是非常重要的特征,但是编码这两个特征的基因可以在质粒上也可以在细菌染色体上,因此必须避免由质粒携带特征而导致的错误结果。

2. 分子特征

分类学最有力的方法是通过蛋白质和核酸的研究而得出的方法。因为这些物质或是直接基因产物或是基因自身,所以比较蛋白质和核酸会获得真正相关性的重要信息,在原核生物分类学中这些最新方法变得更为重要。

（1）蛋白质。

蛋白质的氨基酸序列是 mRNA 序列的直接反映,并且与编码它们合成的基因的结构紧密相关。因此比较不同微生物的蛋白质对分类学有重要作用。蛋白质的比较有几种方法,最直接的方法是测定有相同功能蛋白的氨基酸序列。不同功能的蛋白质序列通常以不同速率改变(一些序列改变相当迅速,而另一些则非常稳定)。然而,如果相同功能蛋白质的序

列是相似的,拥有它们的生物可能亲缘关系较近。细胞色素和其他电子传递蛋白、组蛋白、转录和翻译蛋白、多种代谢酶的蛋白质的序列已经用于分类研究中。因为蛋白质测序缓慢又昂贵,所以比较蛋白质经常采用许多间接方法,在种和亚种水平上研究亲缘关系时蛋白质的电泳迁移率是有用的。抗体能区分非常相似的蛋白质,并且免疫学技术已用来比较不同微生物的蛋白质。

酶的物理、动力的和调控的特性已用于分类学研究。因为酶行为反映了氨基酸序列,当研究某些微生物类群时,这个方法是有用的,并已经发现调控的特定类群模型。

(2) 核酸碱基组成。

微生物基因组能直接比较,估计微生物分类的相似性可用许多种方法。测定 DNA 碱基组成这种方法可能是最简单的。DNA 包含 4 个嘌呤和嘧啶碱基:腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。在双链 DNA 中,腺嘌呤(A)与胞嘧啶(C)配对,鸟嘌呤(G)与胸腺嘧啶(T)配对。因此 DNA 中的 $(G+C)/(A+T)$ 比率、 $(G+C)$ 含量 $[(G+C) \text{ content}]$ 或 $(G+C)$ 摩尔分数,反映了碱基序列,并且随着碱基改变而改变。

$$(G+C) \text{ 摩尔分数} = \frac{G+C}{G+C+A+T} \times 100\%$$

可以用几种方法测定 DNA 碱基的组成。虽然水解 DNA 之后再用高效液相层析(HPLC)分析碱基也能确定 $(G+C)$ 摩尔分数,但是物理方法更简单些并更常用。 $(G+C)$ 摩尔分数常通过 DNA 的解链温度(melting temperature, T_m)来测定。双链 DNA 中 G、C 碱基对通过 3 个氢键连接, A、T 碱基之间由 2 个氢键连接,因此高 $(G+C)$ 摩尔分数的 DNA 将有更多氢键,在更高温度下才能分开。DNA 解链能用分光光度法检测到,因为 DNA 在 260 nm 的紫外吸光度随双链的分开而升高。缓慢加热 DNA 样品时,吸光度随着氢键断裂而增加,当所有 DNA 都成为单链时,吸光度达到一个平台。上升曲线的中间点即为解链温度,直接测定了 $(G+C)$ 摩尔分数。因为 DNA 的密度随 $(G+C)$ 摩尔分数线性增加,所以 DNA 的氯化铯密度梯度离心就能得到 $(G+C)$ 摩尔分数。

已测定的微生物的 $(G+C)$ 摩尔分数见表 1.2。动物和高等植物的 $(G+C)$ 摩尔分数约为 40%,在 30% ~ 50% 之间。相反,真核和原核微生物 $(G+C)$ 摩尔分数改变很大,原核生物 $(G+C)$ 摩尔分数是变化最大的,在 25% ~ 80% 之间。特定种的菌株的 $(G+C)$ 摩尔分数是稳定的,如果两种微生物 $(G+C)$ 含量差别超过了约 10%,则可以判断它们的基因组有较大碱基顺序差别。但是,不能保证 $(G+C)$ 摩尔分数非常相似的生物就有相似 DNA 碱基序列,因为碱基序列差别非常大的 DNA 能有相同的 A、T 和 G、C 碱基对组成。仅仅在两种微生物表型也相似时,才能认为它们的相似 $(G+C)$ 摩尔分数表明它们亲缘关系近。

表 1.2 微生物的代表性(G+C)含量

生物	(G+C)摩尔分数 /%	生物	(G+C)摩尔分数 /%	生物	(G+C)摩尔分数 /%
细菌		螺旋体属	51 ~ 65	粘菌	
放线菌属	59 ~ 73	葡萄球菌属	30 ~ 38	网柄菌属	22 ~ 25
鱼腥蓝细菌属	38 ~ 44	链球菌属	33 ~ 44	<i>Lycogala</i>	42
芽孢杆菌属	32 ~ 62	链霉菌素	69 ~ 73	<i>Physarum olycephalum</i>	38 ~ 42
拟杆菌属	28 ~ 61	硫化叶菌属	31 ~ 37	真菌	
蛭弧菌属	33 ~ 52	热原体属	46	二孢蘑菇	44
柄杆菌属	63 ~ 67	硫杆菌属	52 ~ 68	蛤蟆菌	57
衣原体属	41 ~ 44	密螺旋体属	25 ~ 54	黑曲霉	52
绿菌属	49 ~ 58	藻类		埃莫森小芽枝霉	66
着色菌属	48 ~ 70	地中海伞藻	37 ~ 53	白假丝酵母	33 ~ 35
梭菌属	21 ~ 54	衣藻	60 ~ 68	麦角菌	53
噬纤维菌属	33 ~ 42	小球藻	43 ~ 79	白绒鬼伞	52 ~ 53
异常球菌属	62 ~ 70	<i>Cryptica</i> 小环藻	41	岑层孔菌	56
埃希氏菌属	48 ~ 52	纤维裸藻	46 ~ 55	鲁氏毛霉	38
盐杆菌属	66 ~ 68	丽藻	49	粗糙脉孢菌	52 ~ 54
生丝微菌属	59 ~ 67	有菱菱形藻	47	特异青霉	52
甲烷杆菌属	32 ~ 50	<i>Danica</i> 棕鞭藻	48	沼生多孔菌	56
微球菌属	64 ~ 75	三菱多甲藻	53	黑根霉	47
分支杆菌素	62 ~ 70	栅藻	52 ~ 64	啤酒酵母	36 ~ 42
支原体属	23 ~ 40	水绵藻	39	寄生水霉	61
粘球菌属	68 ~ 71	<i>Carteri</i> 团藻	50		
奈瑟氏球菌属	47 ~ 54	原生动物门			
硝化杆菌属	60 ~ 62	<i>Acanthamoeba castallani</i>	56 ~ 68		
颤蓝细菌属	40 ~ 50	阿米巴变形虫	66		
原绿蓝细菌属	41	草履虫	29 ~ 39		
变形菌属	38 ~ 41	<i>Berghei</i> 疟虫	41		
假单胞菌属	58 ~ 70	多态喇叭虫	45		
红螺菌属	62 ~ 66	四膜虫	19 ~ 33		
立克次氏体属	29 ~ 33	毛滴虫	29 ~ 34		
沙门氏菌属	50 ~ 53	锥体虫	45 ~ 39		
螺菌属	38				

(G+C)摩尔分数至少在两个方面是有分类学价值的。首先,与其他数据结合它们能确定一个分类大纲,如果在同一个分类单元中的生物(G+C)摩尔分数差别太远,这个分类单元可能应该再划分一下;第二,(G+C)摩尔分数在鉴定细菌属时是有用的,因为即使属之间的(G+C)摩尔分数可以改变非常大,同一个属内的含量改变常常小于10%。例如,葡萄球菌属的(G+C)摩尔分数在30% ~ 38%之间,而微球菌属(*Micrococcus*)DNA的(G+C)摩尔分数为64% ~ 75%。这两个革兰氏阳性球菌属之间仍有很多其他特征相同。

(3) 核酸杂交。

用核酸杂交(nucleic acid hybridization)方法能更直接比较基因组相似性。如果将 DNA 因加热而解开形成的单链 DNA 混合物,在低于 T_m 约 25 °C 温度处保温,那么互补碱基序列的链将会重新结合形成稳定双链 DNA,然而非互补链仍将是单链。因为不完全相似的链在较低温度下会形成较稳定双链 DNA 杂交体,在低于 T_m 为 30 ~ 50 °C 时的温育混合物将会让较多单链 DNA 杂交,而 T_m 小于 10 ~ 15 °C 的温育则仅仅让几乎一致的链形成杂交体。

在最广泛使用的杂交技术中,结合有非放射性 DNA 链的硝酸纤维素膜与 ^{32}P 、 ^3H 或 ^{14}C 放射性标记的单链 DNA 片段在合适温度下温育,放射性片段与膜结合的单链 DNA 杂交之后,洗膜以便去掉那些未杂交单链 DNA,并测定它的放射性。膜结合的放射性的量反映了杂交的总量,因此也反映了 DNA 序列的相似性。相似性或同源性的程度以膜上实验 DNA 放射性的百分比与在同样条件结合同源 DNA 放射性百分比的比较来表示。如果两株菌在最适杂交条件下 DNA 至少有 70% 相关性,并且 T_m 值的差别小于 5%,那么就认为它们是同一个种的成员。

如果 DNA 分子在序列上差别非常大,它们将不能形成稳定、可检测的杂交体,因此 DNA-DNA 杂交仪仅用来研究亲缘关系较近的微生物。亲缘关系较远的生物通过用放射性核糖体或转移 RNA 为材料的 DNA-RNA 杂交实验来进行比较。之所以能够检测远的亲缘关系,是因为 rRNA 和 tRNA 基因仅代表总 DNA 基因组的一小部分,并且没有大多数其他微生物基因进化迅速。这个技术与用于 DNA-DNA 杂交的技术相似:膜结合 DNA 与放射性 rRNA 温育,洗涤,并计数。一个更精确测定同源性的方法是找到从膜上解离和移去一半放射性 rRNA 所需的温度;这个温度越高,rRNA-DNA 复合体越强,并且序列越相似。

(4) 核酸测序。

基因组结构除了用于 (G+C) 摩尔分数测定和核酸杂交研究之外,仅仅通过对 DNA 和 RNA 测序也能直接比较。现在已经有了快速测定 DNA 和 RNA 序列的技术;迄今为止, RNA 序列已经在微生物分类学中得到了更广泛的应用。

人们更多地关注 5S tRNA 和 16S tRNA 的序列,它们分别是原核生物核糖体 50S 和 30S 亚基中分离出来的。这些 rRNA 是研究微生物进化和相互关系的难得的理想材料,因为发现它们对所有微生物的一个主要细胞器——核糖体是必要的。它们的功能在所有核糖体中是一样的。因此,它们的结构随时间改变非常慢,可能由于它们是恒定和必要的功能。因为 rRNA 包含可变和稳定的序列,所以亲缘关系近和远的微生物都能比较。这是一个重要优点,仅仅使用随时间变化一点点的序列就能研究亲缘关系远的生物。

依据用如下寡核苷酸编目方法得到的部分序列能分析核糖体 RNA 特征。首先用 T_1 核糖体核酸酶处理经纯化的、放射性标记的 16S rRNA,前者可将后者切成片段。片段分离,包括至少 6 个核苷酸的所有片段都测序。然后把不同细菌的对应 16S rRNA 片段的序列集中,用计算机进行比较,计算相关系数(S_{ab} 值)。现在采用如下方法测定 rRNA 全序列。首先,分离和纯化 RNA,然后,使用反向转录酶合成互补 DNA,使用的引物是与保守 rRNA 序列互补的;其次,聚合酶链式反应(PCR)扩增这个 cDNA;最后,测定 cDNA 序列。从这个结果中推出 rRNA 序列。最近已经测定了一些细菌原核生物的全基因组序列。原核生物分类中直接比较全基因组序列无疑将会是重要的。

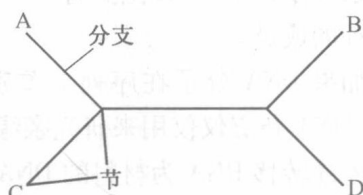
1.1.1.2 生物系统发育的分类系统

1. 分子计时器

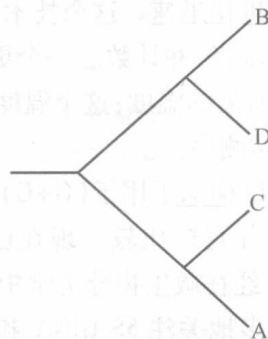
核酸和蛋白质的序列随时间而改变,并被认为是分子计时器(molecular chronometers)。这个概念首先由 Zuckerkandl 和 Pauling(1965)提出,在使用分子序列决定系统进化关系中最最重要的一个概念,并且该概念是建立在有一个进化钟的假说之上。该假说认为许多 rRNA 的序列和蛋白质随时间逐步改变,并且不破坏或极少改变它们的功能。人们假设这样的改变是选择中性的,完全随机发生,并随时间直线上升,当两个类群生物相同分子的序列非常不同时,那么很早以前一个类群就从另一个类群中分开了。用分子计时器分析系统发育有些复杂,因为序列改变的速率能够变化;某些时期会发生特别快的改变。而且,不同分子和相同分子的不同部位会以不同速率改变。用高度保守分子如 rRNA 来跟踪大尺度进化改变,而快速改变的分子用于跟踪物种形成。但是需要进一步研究来建立进化钟假说的准确性和有用性。

2. 系统发育树

系统发育关系用分支图或树的形式说明一棵系统发育树(phylogenetic tree)是由连结节的分支组成的(图 1.1)。这些节代表分类单位如种或基因,那些在外的节,位于分支的末端,代表活的生物。这棵树可以有一个时间尺,分支的长度可以代表发生在两个节之间的分子改变的数目。系统发育树可以是无根的,也可以是有根的。一棵无根树[图 1.1(a)]仅仅表示系统发育关系但是不提供进化途径。图 1.1(a)表示 A 与 C 比与 B 或 D 关系近,但是不能明确 4 个种共同的祖先或变化的方向。相反,有根的树[图 1.1(b)]给出了一个节作为那个共同祖先,并且显示了来自这个根的 4 个种的发育。



(a) 连接 4 个分类单位的无根树



(b) 有根树

图 1.1 系统发育关系

比较两个分子时,为了排列并比较同源序列首先必须对齐以便于相同的部分配对,相似的两个分子是因为它们在过去有一个共同起源。由于这一工作量特别大,因此必须应用计算机和数学来缩小被比较序列的分歧和不匹配的数目。

排列了分子之后,就能测定序列中改变的位置的数目,然后用测得的数据来计算序列间差别的程度。这个差别表示为进化距离(evolutionary distance),进化距离仅仅是两个排列大分子差别的位置数目的定量表示。对发生的回复突变和多重置换可作统计修正,然后根据序列相似性把生物聚集在一起,最相似的生物聚集在一个类群,然后与剩下的生物比较,与相似性或进化距离水平较低的聚在一起形成一个较大类群,这个过程继续进行,一直到所有的生物都包括在这棵树上。

3. rRNA、DNA 和蛋白质作为系统发育的指示物

虽然能够使用各种分子技术来推测原核生物的系统发育关系,但是比较从几千种菌株中分离出来的 16S rRNA 仍然是特别重要的(图 1.2)。完整 rRNA 或 rRNA 片段都能测序和

比较,采用从 rRNA 研究中得出的相关系数或 S_{ab} 值作为亲缘关系的一个真实测量, S_{ab} 值越高,生物之间亲缘关系就越近;如果两种生物的 16S rRNA 序列是同样的,则 S_{ab} 值为 1.0。 S_{ab} 值也是进化时间的测量,一群很早就分叉的原核生物,其 S_{ab} 值将会在一个大范围内,因为它比那些最近发育的类群有更多时间去分化。 S_{ab} 值测定之后,用计算机计算生物之间的亲缘关系,并且将它们的关系总结在一棵树或树状图中。

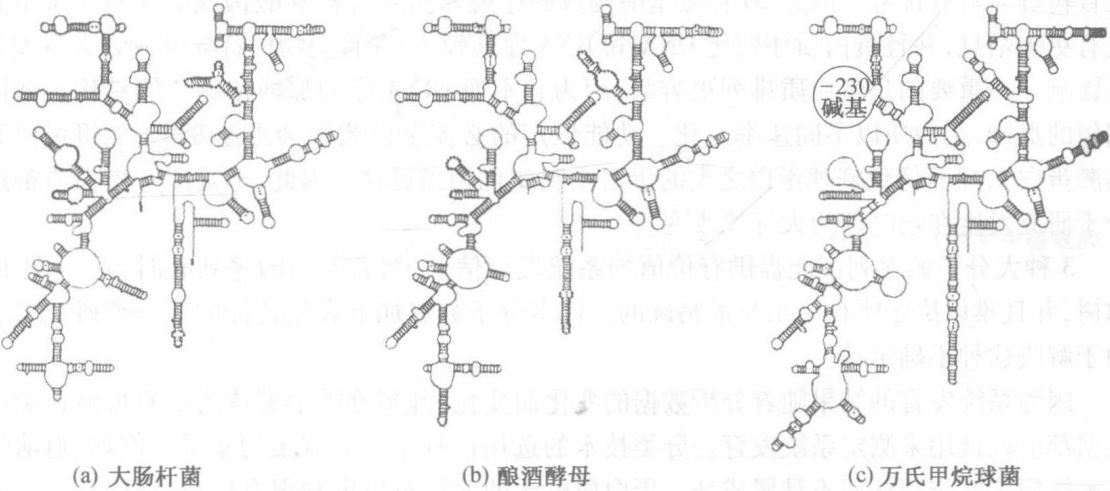


图 1.2 小核糖体亚单位 RNA

许多主要系统发育类群的 16S rRNA 有一个或多个被称为寡核苷酸标签的特征核苷酸序列。寡核苷酸标签序列 (oligonucleotide signature sequences) 是特殊的寡核苷酸序列,一个特定系统发育类群的大多数或全部成员都有这个序列。其他类群很少或从不存在这个标签序列,即使是在亲缘关系近的细菌中。因此标签序列能用来把微生物放在正确的类群中。细菌、古生菌、真核生物和许多主要原核生物类群都已经鉴定出了标签序列(表 1.3)。

表 1.3 一些细菌类群的被选择的 16S rRNA 标签序列

rRNA 中的 位置	γ 变形 杆菌	一致 组成	蓝 细菌	螺 旋 体	拟 杆 菌 属	绿 硫 菌	绿 色 非 硫 菌	异 常 球 菌 属	革 兰 氏 阳 性 菌 低 (G+G)	革 兰 氏 阴 性 菌 低 (G+G)	浮 霉 状 菌 属
47	C	+	+	U	+	+	+	+	+	+	G
53	A	+	+	G	+	+	G	+	+	+	G
570	G	+	+	+	U	+	+	+	+	+	U
812	G	C	+	+	+	+	+	C	+	+	+
906	G	AC	+	+	+	+	A	+	+	A	+
955	U	+	+	+	+	+	+	+	+	AC	C
1207	G	+	C	+	+	+	+	+	C	C	+
1234	C	+	+	a	U	A	+	+	+	+	+

注:加号表示类群有一致序列的碱基,如果给出大写字母,表示有 90% 以上发生变化,小写字母代表较少发生碱基改变(<15%)

虽然在种水平上比较 rRNA 是有效的,但是对不同的种和属进行分类时,用(G+C)含量或杂交来研究 DNA 相似性更有效些。如同用 rRNA 一样,细胞的 DNA 组成不随生长条件改变。比较 DNA 也是依据完整基因组,而不是一部分,并且使得以 70% 亲缘关系的标准精确定义一个种更加容易。

最近研究出现了蛋白质序列来做系统发育树。相对于 rRNA 而言,蛋白质序列的系统发育树确实具有优势。因为 20 种氨基酸构成的序列比由 4 种核苷酸构成的序列在每个点上有更多信息,并且蛋白质序列比 DNA 和 RNA 序列较少,并且受物种特异(G+C)含量差异的影响。最重要的是蛋白质排列更容易,因为它不像 rRNA 序列那样依赖二级结构。如同期望的那样,蛋白质以不同速率进化。功能恒定的必需蛋白质不会迅速变化(如组蛋白和热激蛋白),然而像免疫球蛋白之类的蛋白质则变化相当迅速。因此,不是所有蛋白质都适合研究发生在长时期的大标尺改变。

3 种大分子的序列都能提供有价值的系统发育信息,然而不同的序列有时会产生不同的树,并且难以决定哪种结果是最精确的。许多分子数据加上表型特征的进一步研究将有助于解决这种不确定性。

因为系统发育的结果随着分析数据的变化而变化,许多分类学家认为所有可能正确的数据都应该被用来测定系统发育。分类技术的选用依赖于分类方案的水平。例如,血清学技术能用于鉴定菌株而不是属或种。蛋白质电泳的方法对决定种很有用,却不能区分属或科。DNA 杂交及(G+C)含量的分析能用于研究种和属。一些特征诸如化学组成、DNA 探针结果、rRNA 序列和 DNA 序列能用于限定种、属和科。尽可能多的特征可得到更稳定、更可靠的结果。

1.1.2 微生物的分域

Carl Woese 和他的合作者使用 rRNA 研究结果将所有活的生物分成 3 个域(domains): 细菌、古生菌和真核生物。第一个类群,细菌包含了原核生物的绝大部分。细菌的细胞壁由含胞壁酸的肽聚糖组成,或与有如此细胞壁的细菌相关联,并含有与真核生物膜脂相似的酯键、直链脂肪酸的膜脂类(表 1.4)。第二个类群,古生菌很多方面与细菌不同,某些方面与真核生物相似。

与细菌不同,古生菌的细胞壁无胞壁酸,并且具有如下特性:

- (1) 有醚键分支脂肪族链的膜脂。
- (2) 转移 RNA 的 T 没有胸苷。
- (3) 特殊的 RNA 聚合酶。
- (4) 不同组成和形状的核糖体。

从表 1.4 中可以看出细菌和古生菌都与真核细胞有一些共同的生化特性,例如,细菌和真核生物有脂键膜脂类;古生菌和真核生物就 RNA 和蛋白质合成系统的某些成分而言是相似的。

表 1.4 比较细菌、古生菌和真核生物

特征	细菌	古生菌	真核生物
有核仁、核膜的细胞核	无	无	有
复杂内膜的细胞器	无	无	有
细胞壁	几乎都含胞壁酸的肽聚糖	多种类型,无胞壁酸	无胞壁酸
膜脂	酯键脂,直链脂肪酸	醚键脂,支脂族链	酯键脂,直链脂肪酸
气囊	有	有	无
转移 RNA	大多数 tRNA 有胸腺嘧啶	tRNA 的 T 臂中无胸腺嘧啶	有胸腺嘧啶
多顺反子 mRNA	起始 tRNA 携带甲酰甲硫氨酸	起始 tRNA 携带甲硫氨酸	起始 tRNA 携带甲硫氨酸
mRNA 内含子	有	有	无
mRNA 剪接、加帽及聚腺苷酸尾	无	无	有
核糖体	无	无	有
大小	70S	70S	80S(胞质核糖体)
延伸因子	不与白喉杆菌毒素反应	反应	反应
对氯霉素和卡那霉素敏感性	敏感	不敏感	不敏感
对茴香霉素敏感性	不敏感	敏感	敏感
依赖 DNA 的 RNA 聚合酶的数目	1 个	几个	3 个
结构	简单亚基形式(4 个亚基)	与真核生物酶相似的复杂亚基形式(8 ~ 12 个亚基)	复杂亚基形式(12 ~ 14 个亚基)
利福平敏感性	敏感	不敏感	不敏感
聚合酶 II 型启动子代谢	无	有	有
相似 ATP 酶	无	是	是
产甲烷	无	有	无
固氮	有	有	无
以叶绿素为基础的光合作用	有	无	有
化能无机自养型	有	有	无

虽然古生菌、细菌和真核生物这 3 个域的观点获得最广泛接受,但也有其他的系统发育树,图 1.3 给出了一些系统发育树的示意图。图 1.3(a)表示的是 3 个类群之间是等距的,并与早期 rRNA 数据相符。图 1.3(b)代表最被认可的系统发育树,其中古生菌和真核生物有共同的祖先,像细菌之类的生物可能比其他的域先存在。第三个系统发育树,称为原生细胞(eocyte)树[图 1.3(c)],认为依赖硫并且极端嗜热的原核生物为原生细胞(最早出现的细胞),是一个单独类群,与真核生物的关系较之与古生菌亲缘关系近。最后,有些人提出真核细胞是嵌合的,由一个细菌和一个古生菌融合生成,可能是缺少细胞壁的细菌吞食了一个似原生细胞古生菌[图 1.3(d)]。

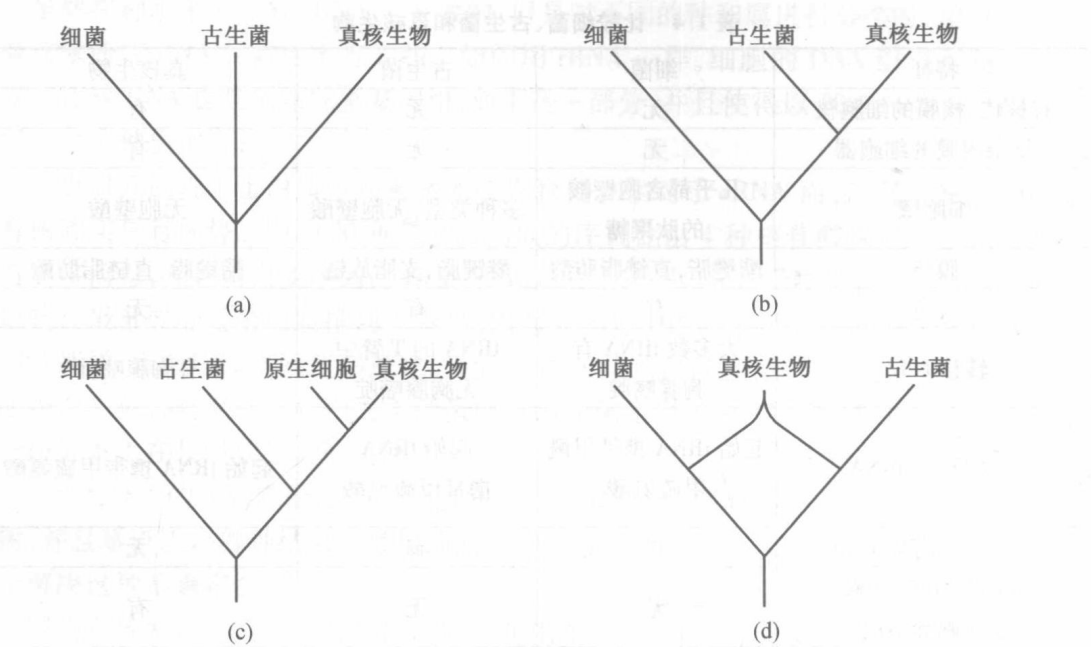


图 1.3 生命树的不同形式

1.2 产甲烷菌的分类

1990 年,伍斯提出了三域分类学说:生物分为真核生物、真细菌和古生菌三域。古生菌作为微生物三个域中的一种,是一类很特殊的细菌,多生活在海底热溢口以及高盐、强酸或强碱性水域等极端环境中。古生菌又可以分为热变形菌、硫化叶菌、嗜压菌、产甲烷菌、盐杆菌、热原体、热球菌。其中,研究最多的是产甲烷菌。

产甲烷菌作为一个生理和表型特征独特的类群,其突出的特征是能够产生甲烷。它们生活在极端的厌氧环境中,如海洋、湖泊、河流沉积物、沼泽地、稻田和动物肠道,与其他群细菌互营发酵复杂有机物产生甲烷。

产甲烷菌是厌氧发酵过程中的最后一个环节,在自然界碳素循环中扮演重要角色。由于产甲烷菌在废弃物厌氧消化、高浓度有机废水处理、沼气发酵及反刍动物瘤胃中食物消化等过程中起关键性作用,也由于产甲烷菌所释放出来的甲烷是导致温室效应的重要因素,因此对于产甲烷菌的研究成为环境微生物研究的焦点之一。

1.2.1 产甲烷菌的分类标准

1988 年,国际细菌分类委员会产甲烷菌分会提出了产甲烷菌分类鉴定的基本标准。这一基本标准既参考了过去沿用的表型特征的描述,也指出基于形态结构和生理特征的描述经常难以区分分类群中的差异,不能正确断定分类群种系发生的地位,新的分类鉴定的基本标准增加了化学、分子生物学和遗传学有关的分类数据,为使新的分类种系的位置更确切,常常依靠核酸序列、核酸编码的研究或黑白指纹法的研究。

在该次会议上提出一个观点:确定一个种的分类位置时,系统发育上的数据和标准应当优先于生理学和形态学的特征。也就是说,正确的分类标准必须在提供大量表型特征的描