

许宝孝

(上海技术师范学院生物系)

产甲烷菌是古细菌中最大的一个类群^[1]。早期的产甲烷菌分类依据主要是形态。在第8版“Bergey氏细菌鉴定手册”中,产甲烷菌被描述为一个独立的科,下分3个属和9个种^[2]。现代的产甲烷菌分类已不再局限于形态和生理的一般描述,而是根据核酸(DNA和RNA)、蛋白质、酶、脂类和糖类等这些生物大分子,尤其是16S rRNA寡核苷酸序列比较揭示的亲缘关系,将产甲烷菌分成不同的种、属、科和目。1979年, Balch 等根据16S rRNA比较揭示的亲缘关系,把产甲烷菌重新分为3个目,4个科,7个属和13个种^[3]。近年来,随着产甲烷菌培养技术的不断改进,新

的产甲烷菌种、属和科时有增加,以致在最近一版的“Bergey氏系统细菌学手册”中,产甲烷菌已增加到3个目、6个科12个属和21个种^[4]。本文着重介绍和讨论根据生物大分子比较揭示的亲缘关系进行产甲烷菌分类的结果。

(一) 16S rRNA 寡核苷酸序列比较分析

1977年, Fox 等将16S rRNA的比较分析应用于产甲烷菌^[5]。1979年, Balch 等根据产甲烷菌对偶间16S rRNA的相似系数—— S_{AB} 值提出了一个新的产甲烷菌分类处理意见(图1)。产甲烷菌的最高分类单

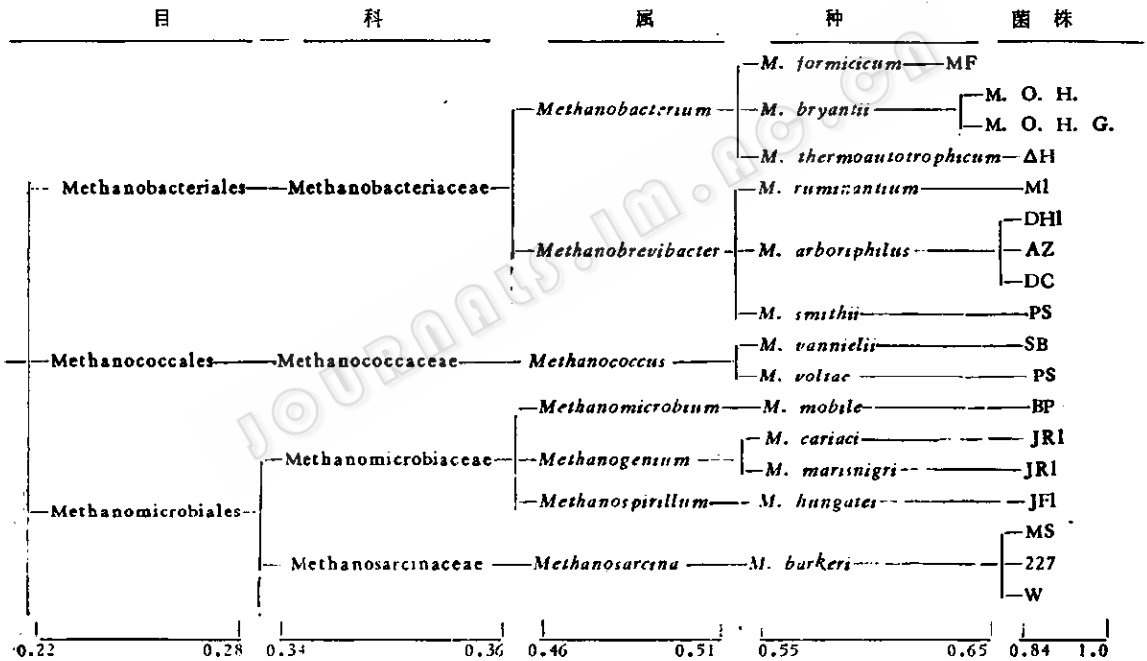


图1 根据16SrRNA比较分类的产甲烷菌新分类处理^[3]

元为目,目之间,同目的科之间,同科的属之间,同属的种之间和同种的菌株之间的 S_{AB} 范围分别为0.22—0.28,0.34—0.36,0.46—0.51,0.55—0.65和0.84—1.0^[3]。

Miller和Wolin从人类中分离出一株 G^+ 球状产甲烷菌,它利用 H_2 还原甲醇生长和产甲烷,不能利用 H_2 、 CO_2 、甲酸、乙酸或甲胺类产甲烷。但是,它的细胞壁含有拟胞壁质。免疫指纹测定表明,它与*Mb. thermoautotrophicum*有亲缘关系。它与Methanobacteriaceae

其它成员之间的 S_{AB} 值为0.45。这些都清楚地证明,新分离物是Methanobacteriaceae一个新属Methanosphera的成员^[6]。因为目前在Methanobacteriaceae的描述中是没有球形菌的,而且只有利用 H_2 、 CO_2 和甲酸作为产甲烷基质的成员,所以,Methanobacteriaceae的描述应该修正。

Mah等根据*Ms. burkeri* DSM800和*Mc. mazei* DSM2053之间的 S_{AB} 高达0.8以及其它的特性,将*Mc. mazei*修订为*Methanosarcina mazei*^[7]。

(二) DNA 碱基组成

产甲烷菌 DNA 的 GC 含量如表 1 所示。从表中可以看出, DNA 碱基组成相同未必就是相同或相似

的种属。分类鉴定时, G + C mol% 一定要结合其它性状一起考虑。实践证明, DNA 碱基组成与其它分类指标结合使用时, 的确是分类鉴定时一个很有价值的依据, 结果也与其它分类研究相一致。

表 1 产甲烷菌 DNA 的 GC 含量

种	菌株	G + C mol%			种	菌株	G + C mol%		
		Tm ^a	Bd ^b	其它 ^c			Tm ^a	Bd ^b	其它 ^c
I 目 I 科									
<i>Mb. formicium</i>	MF	42.0			<i>Mcr. paynteri</i>	G-2000		44.9	
			42.0		<i>Mg. cariaci</i>	JR1		51.6	
			40.7				50.0		
<i>Mb. bryantii</i>	M. o. H.		38.0		<i>Mg. marisnigri</i>	JR1		61.2	
			32.7				58.8		
	M. o. H. G.		33.2		<i>Mg. thermophilicum</i>	CR-1		59.1	
<i>Mb. thermoautotrophicum</i>	H		52.0			Los Angeles	56	59.69	
			49.7	50		Ratisbona	57		
		51			<i>Mg. olentangyi</i>	RC/ER		54.4	
		46			<i>Mg. tatis</i>	DSM2702	53.7		
	W	46			<i>Mg. frittonii</i>	FR-4		49.2	
	S	46			<i>Mg. aggregans</i>	MSt		52	
<i>Mb. wolfei</i>	DSM2970	61			<i>Msp. hungates</i>	JF1		45.0	
<i>Mb. uliginosum</i>	P2St	29.4	33.8				49.5		
<i>Mb. thermoacaliphilum</i>	AC60	38.8			III 目 II 科	GP1	46.5		
<i>Mb. thermoaggregans</i>	DSM3266	42			<i>Ms. barkers</i>	MS	43.9		
<i>Mbr. ruminantium</i>	MI		30.6					38.8	
<i>Mbr. arborophilus</i>	DHI	27.5	27.5				39		
	AZ		31.6			227	36.7		
	DC		27.7				39	38.8	
	TC 713		27.8			W		40.5	
<i>Mbr. smithii</i>	PS	32.0	32.0			UBS	43.5		
			31.0			Z	51.0		
<i>Mbr.</i>	HX			31.1	<i>Ms. mazei</i>	S-6		42	
<i>Mspa. stadtmansae</i>	MCB-3	25.8					42		
I 目 II 科					<i>Ms. acetovorans</i>	C2A	41		
<i>Mthi. jervidus</i>	V24S	33		33			42		
II 目 II 科					<i>Ms. thermophila</i>	TM-1		40.2	
<i>Mc. vannieli</i>	SB		31.1				42		
		28.3			<i>Ms.</i>	CHT155	39.3		
<i>Mc. voltae</i>	PS		30.7		<i>Mlb. tindarius</i>	Tindarius 3	45.9		
<i>Mc. thermolithotrophicus</i>	SN1	31.3		31.6			40		
<i>Mc. maripaludis</i>	JJ		33		<i>Mcc. methylutens</i>	TMA-10	42		
<i>Mc. deltae</i>	RC		40.5		III 目 III 科				
<i>Mc. jannaschii</i>	JAL-1		31		<i>Mpl. limicola</i>	M3	47.5		
III 目 I 科					<i>Mtx. soehngenii</i>	Opfikon	51.9		
<i>Mcr. mobile</i>	BP		48.8		<i>Mtx. concilii</i>	GP6			61.25

a. 热变性法。 b. 浮力密度法。 c. 核苷酸直接分析法。

Methanothermobacter feravidus 与 *Mb. thermoautotrophicum* 在最适生长温度和 pH, RNA 聚合酶, 尤其是 DNA 组成(两者相差约 16 mol%) 上明显不同, 因而被定为不同属的成员^[13]。 *Mb. wolfei* DNA 的 GC 含量与 *Mb. thermoautotrophicum* 相比, 也应为不同属的成员。然而, *Mb. wolfei* 除了专性需要钨生长这一点之外, 其余的表型特征, 如利用 H_2-CO_2 自养生长和最适生长温度等均与 *Mb. thermoautotrophicum* 相似, 因此还是定为 *Methanobacterium* 的一个新种^[19]。 *Mb. thermocaliphilum* 则因为其 DNA 的 GC 含量 (38.8 mol%), 嗜碱生长, 溶解行为和需要酵母膏等特性而

被定为 *Methanobacterium* 的一个新种^[10]。 *Mb. thermoaggregans* 与 *Mb. thermoautotrophicum* 在形态, 生长基质, 最适温度与 pH 等方面均很相似, 但 DNA 的 GC 含量相差约 8 mol%, 再加上前者有聚集生长的特性, 所以也被定为一个新种^[11]。

(三) 细胞被膜组成

产甲烷菌细胞被膜系细胞壁(或胞壁囊), 蛋白质表层或鞘的总称。其结构与组分总结于表 2 中。

G^+ 产甲烷菌都有坚韧的胞壁囊。 *Methanobacteriales* 所属成员的胞壁囊由拟胞壁质组成, 而 *Methan-*

表 2 产甲烷菌细胞被膜的结构成分和革兰氏染色反应

目	科	属	革兰氏染色	细胞被膜		成分				
				结构						
				胞壁囊	蛋白质表层或鞘					
I	I	<i>Methanobacterium</i>	+	+	-	拟胞壁质				
		<i>Methanobrevibacter</i>								
		<i>Methanosphaera</i>								
II	II	<i>Methanothermobacter</i>	+	+	+	拟胞壁质, 蛋白质亚基				
		<i>Methanococcus</i>								
III	I	<i>Methanomicrobium</i>	-	-	+	蛋白质亚基				
		<i>Methanogenium</i>								
		<i>Methanospirillum</i>								
		<i>Methanosarcina</i>					+	+	-	(糖)蛋白质原纤维
		<i>Methanobrevibacter</i>								
		<i>Methanohalobium</i>								
		<i>Methanohalobium</i>								
		<i>Methanohalobium</i>								
		<i>Methanohalobium</i>								
		<i>Methanohalobium</i>								
<i>Methanohalobium</i>										
<i>Methanohalobium</i>										
<i>Methanohalobium</i>										
III	III	<i>Methanoplanus</i>	-	-	+	糖蛋白亚基				
		<i>Methanohalobium</i>								

sarcina 的胞壁囊由酸性杂多糖组成。只有 *Methanothermobacter feravidus* 在坚韧的拟胞壁质胞壁囊外还有一层由蛋白质亚基排列而成的表层。

所有 G^- 产甲烷菌都没有坚韧的胞壁囊, 只有一层由蛋白质或糖蛋白排列而成的表层。 *Msp. hungatei* 和 *Mtz. soehngeni* 则具有蛋白质原纤维的鞘^[12]。

产甲烷菌细胞被膜组成上的差异表明, 它们各自带有能刺激抗体产生的不同表面标记。 Conway de Macario 等用在家兔中产生的 21 株(代表 14 种) 产甲烷菌的抗体探针发现了 4 群抗原上有关的产甲烷菌^[13]。这 4 个抗原分类群与根据 16S rRNA 寡核苷酸分类确定的科^[13]是一致的。种内的交叉反应很强。科间没有交叉反应, 但是, 属间有弱的交叉反应^[14]。有关产甲烷菌的免疫鉴定, 作者已另文专述。

(四) 脂类组成

产甲烷菌细胞的全部脂类中, 70—80% 为极性

脂, 20—30% 是中性脂^[15]。产甲烷菌的极性脂中含类异戊二烯基甘油醚, 不含脂肪酸甘油酯。类异戊二烯基甘油以 C_{26} 双植烷基甘油二醚或 C_{40} 二双植烷基甘油四醚存在。产甲烷菌的极性脂中含二醚, 还是含二醚和四醚, 视产甲烷菌的属而定^[15, 16, 17]。最近报导, *Mcc. methylutens* 的极性脂中, 除了双植烷基甘油二醚外, 还有以前未曾在产甲烷菌中检出过的甘油醚, 而二双植烷基甘油四醚的量不明显^[17]。

产甲烷菌中性脂的主要组分是非环化的 C_{30} , C_{22} 和 C_{20} 类异戊二烯基类。除了 *Methanosarcina* 外, 所有产甲烷菌均含有 C_{30} 双法氏基或角鲨烯的成分^[18]。

已经证明, 产甲烷菌极性脂的双向薄层色谱分析(TLC) 是鉴定不同属产甲烷菌的一个化学指征^[19]。

(五) DNA-DNA 同源性

利用 DNA 杂交可以测出整个基因组中 DNA 碱基序列相似性的平均值, 由此测得的亲缘关系通常以

同源百分比来表示。它要胜过那些只是比较基因或基因产物的技术^[20]。这个方法在检出错分的菌株和将新描述的菌株划归已有分类单元时非常有用^[21,22]。

Sowers 等根据 DNA 同源值将 7 株甲基营养产甲烷菌分成两群,它们的 DNA 同源值只有 2%。在 I 群中, *Ms. TM-1* 菌株 *Ms. acetovorans* 和 *Ms. maei* 与其它所测菌株的同源值都不到 30%。而 II 群中的 *Mcc. methylutens* 和 *Mlb. tindarius* 彼此之间, 和与 I 群的成员之间均无同源性。这些结果表明, 这 7 株甲基营养产甲烷菌是 6 个不同的种。 *Ms. 227* 与 *Ms. barkeri* MS 菌株的 DNA 同源性高达 96%, 据此就将 227 菌株归入 *Ms. barkeri*, 这与 Balch 等利用 16 S rRNA 寡核苷酸分类的结果一致^[21]。

Zabel 等从含硫气田中分离到一株在低盐培养基中比较规则, 在高盐培养基中很不规则的 G^- 甲烷拟球菌。从它利用 H_2-CO_2 和甲酸生长与产甲烷, 最适生长温度为 37—40℃, 没有坚韧的细胞壁, 但有糖蛋白外被, DNA 碱基组成为 54 mol% G + C 等特征来看为 *Methanogenium* 的成员。新分离物与 *Mg. marisnigri*, *Mg. thermophilicum* 和 *Mg. olentangyi* 很容易区别。 *Mg. marisnigri* 生长不需要乙酸, 新分离物生长却严格需要乙酸。 *Mg. thermophilicum* 为嗜热产甲烷菌; *Mg. olentangyi* 没有鞭毛, 不能利用甲酸, 而新分离物为中温产甲烷菌, 具周生鞭毛, 能利用甲酸。新分离物的形态, 生理, 营养和 DNA 碱基组成虽与 *Mg. cariaci* 相似, 但它与 *Mg. cariaci* DNA 的同源性只有 38%, 所以被定为 *Methanogenium* 的一个新种——*Methanogenium taiii*^[23]。

(六) DNA-rRNA 同源性

在基因组进化的过程中, rRNA 基因的一级结构比 DNA 中的其它基因保守^[24], 因此可以利用 DNA-rRNA 同源值在种以上或更高水平上来确定亲缘关系^[21,24]。通过杂交确定 rRNA 的相似性虽然没有序列测定来得有力, 但与序列测定相比, 倒是比较快速、简便、花钱又少的一种技术。

因为 rRNA 同源性不仅取决于实际的序列相似性, 还取决于基因组大小, 每个基因组中 rRNA 基因的数目以及基因组的复制状态, 所以与 DNA 结合的 rRNA 百分比不是 rRNA 同源性的可靠量度。因此, 测定 DNA-rRNA 双链的热稳定性, 以 $T_m(c)$ 值(从与滤膜结合的 DNA 上洗脱一半配对的 rRNA 时的温度)表示^[25]。同源的 DNA-rRNA 杂种的 $T_m(c)$ 值一定最高, 而远缘的参比菌的 $T_m(c)$ 值肯定最低^[21,24]。

Huber 等从地热加热的海洋沉积物中分离到一株高温产甲烷菌。其 DNA 与 *Mc. voltae* 形成非常稳定(小数稳定值 $fs = 0.94$) 的杂种。他们根据形态, 基质利用, 细胞被膜, DNA GC 含量以及特有的嗜热, 无

机营养和最适盐浓度等性质, 将它命名为 *Methanococcus thermolithotrophicus*^[26]

Wildgruber 等从钻探废水的湿地中分离到一株有角的平碟状产甲烷菌。他们根据 DNA-16S rRNA 杂交结果, 以及形态, 基质利用和 DNA 的 GC 含量等特征证明, 新分离物是 *Methanomicrobiales* 中一个新科 *Methanoplanaceae* 的成员, 并命名它为 *Methanoplanus limicola*^[27]。

与 DNA-DNA 杂交实验一样, 7 种甲基营养产甲烷菌也被分成两群, 能区分这两群的唯一表型特征是利用乙酸的能力。I 群的种都能利用乙酸, II 群则不利用^[21]。实际上, I 群的所有物种都是 Balch 等描述的 *Methanosarcina* 的成员。II 群成员的 DNA 实际上无同源性(4%)表明, 它们是独立的种。不同的 GC 值和表型特征支持这一结论。 *Mlb. tindarius* 和 *Mcc. methylutens* 间的 rRNA 同源值比这两种产甲烷菌与 *Methanosarcina* 间的 rRNA 同源值只高 7%, 此外, 这两种产甲烷菌间的 $\Delta T_m(c)$ 小数比值比其它属间的值低。因此, 尽管两者表型上相似, 但亲缘是远的^[21]。这些结果表明, 尽管甲基营养产甲烷菌形态多样, 但从 rRNA 同源性水平来看却是有亲缘关系的。

根据 DNA-DNA 和 DNA-rRNA 杂交技术划分的系统不仅与表型特征一致, 而且还是 Balch 等的寡核苷酸序列分析资料的重要补充。

(七) RNA 聚合酶

有赖于 DNA 的 RNA 聚合物的比较免疫分析也是产甲烷菌分类鉴定的一个指征。Stetter 等从冰岛的温泉中分离出一株生长在极端高温(97℃)下的产甲烷菌。这种产甲烷菌虽然在生长温度, 营养需要和 DNA 组成上明显不同于 *Mb. thermoautotrophicum*, 但因为其细胞壁含有拟胞壁质, 所以还是应属于 *Methanobacteriales*。他们利用 Ouchterlony 免疫扩散试验测定新分离物 RNA 聚合酶与 *Mb. thermoautotrophicum* RNA 聚合酶抗体的血清反应。结果表明, *Mb. thermoautotrophicum* RNA 聚合酶抗体与 *Methanobacteriaceae* 的两个属 *Methanobacterium* 和 *Methanobrevibacter* 的成员有明显的沉淀弧, 而与新分离物 RNA 聚合酶无反应, 这证明, 新分离物为 *Methanobacteriales* 的一个新科 *Methanothermaceae* 的成员, 根据其接近沸水的生境, 命名为 *Methanothermus fervidus*^[31]。

(八) 其它

根据产甲烷菌核糖体蛋白质比较免疫分析^[32]和 5 S rRNA 全序列比较分析^[33]所得到的分类群与通过 16 S rRNA 比较分类确定的相一致。

产甲烷菌中多胺的分布情况^[30]虽然也与根据 16 S rRNA 分类确定的科的关系相一致^[33], 但在区分属和

种时无多大用处。

产甲烷菌是一个生理特性上类似而基因型多样化的类群。与真细菌分类一样,产甲烷菌分类的最终目的也是根据它们的系统发育关系来确定分类单元。生物大分子在这方面非常有用。16S rRNA 寡核苷酸序列比较分析为阐明产甲烷菌的系统发育关系提供了一种可靠的方法^[1,3]。根据这种分析建立起来的产甲烷菌自然分类系统反映了性状的进化。DNA 碱基组成,细胞被膜和脂类组成,DNA-DNA 和 DNA-rRNA 同源性, RNA 聚合酶比较免疫分析,核糖体蛋白质比较免疫分析和 5S rRNA 全序列比较分析等进一步证实并补充了根据 16SrRNA 比较分析确定的亲缘关系。应该强调指出,即使根据生物大分子进行分类,一个指标一般也是不够的,必须与其它明显而又稳定的性状结合在一起考虑。

参 考 文 献

- [1] Fox, G. E. et al.: *Science*, **209**: 457—463, 1980.
- [2] Bryant, M. P.: In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 472—477, 1974.
- [3] Balch, W. E. et al.: *Microbiol. Rev.*, **43**: 260—296, 1979.
- [4] Mah, R. A.: In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- [5] Fox, G. E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 4537—4541, 1977.
- [6] Miller, J. L., and M. J. Wolin: *Arch. Microbiol.*, **141**: 116—122, 1985.
- [7] Mah, R. A., and D. Kuhn: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**: 263—265, 1984.
- [8] Stetter, K. O. et al.: *Zbl. Bakt. Hyg., 1 Abt. Orig.* **C2**: 166—178, 1981.
- [9] Winter, J. et al.: *System. Appl. Microbiol.*, **5**: 457—466, 1984.
- [10] Blotvogel, K. H. et al.: *Arch. Microbiol.*, **142**:

211—217, 1985.

- [11] ———: *ibid.* **142**: 218—222, 1985.
- [12] Kandler, O., and H. König: In *Bacteria VIII-Archaeobacteria*, pp. 413—457, 1985.
- [13] Conway de Macario, E. et al.: *Science*, **214**: 74—75, 1981.
- [14] ———: *J. Bacteriol.* **149**: 316—319, 1982.
- [15] Langworthy, T. A.: In *Bacteria VIII-Archaeobacteria*, pp. 459—497, 1985.
- [16] Tornabene, T. G., and T. A. Langworthy: *Science*, **203**: 51—53, 1978.
- [17] Sowers, K. R., and J. G. Ferry: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 684—690, 1983.
- [18] Tornabene, T. G. et al.: *J. Mol. Evol.*, **13**: 1—8, 1979.
- [19] Grant, W. D. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **131**: 3277—3286, 1985.
- [20] Stackebrandt, E. and C. R. Woese: In M. H. Carlile et al. (eds.) *Molecular and cellular aspects of microbial evolution*, Soc. Gen. Microbiol. Symp. 32 pp. 1—31, Cambridge: Cambridge University, 1981.
- [21] Sowers, K. R. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**: 444—450, 1984.
- [22] Zabel, H. P. et al.: *System. Appl. Microbiol.*, **6**: 72—78, 1985.
- [23] ———: *Arch. Microbiol.*, **137**: 308—315, 1984.
- [24] Schleifer, K. H., and E. Stackebrandt: *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**: 143—187, 1983.
- [25] DeLey, J., and J. Desmedt: *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol* **41**: 287—307, 1975.
- [26] Huber, H. et al.: *Arch. Microbiol.*, **132**: 47—50, 1982.
- [27] Wildgruber, G. et al.: *ibid.*, **132**: 31—36, 1982.
- [28] Schmid, G., and A. Bock: *J. Bacteriol.*, **147**: 282—288, 1981.
- [29] Fox, G. E. et al.: *Zbl. Bakt. Hyg., 1 Abt. Orig.* **C 3**: 330—345, 1982.
- [30] Scherer, P., and H. Kneifel: *J. Bacteriol.*, **154**: