

洱海沉积物硫循环相关微生物群落结构

王明义^{1,2}, 梁小兵¹, 郑娅萍², 魏中青¹, 赵由之¹

摘要: [目的] 分析洱海沉积物硫循环相关微生物群落多样性和空间分布特点。[方法] 倾注平板计数法分析洱海沉积物硫酸盐还原菌和硫氧化细菌数量; PCR 分析硫酸盐还原菌类群。[结果] 洱海沉积物硫酸盐还原菌和硫氧化细菌数量的空间分布规律相一致; 沉积物中检出 3 个硫酸盐还原菌类群, 脱硫叶菌属广泛分布于各层, 脱硫肠菌属分布于深层而脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属则分布于较浅层。[结论] 洱海沉积物硫循环相关微生物群落组成复杂。

关键词: 沉积物; 硫循环; 硫酸盐还原菌; 硫氧化细菌

MICROBIAL COMMUNITY COMPOSITION OF SULFUR CYCLE IN LAKE ERHAI SEDIMENTS WANG Ming-yi, LIANG Xiao-bing, ZHENG Ya-ping, et al. (State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry Chinese Academy of Science, Guizhou 550002, China)

Abstract: [Objective] To analyze the diversity and spatial characteristic of microbial community of sulfur cycle in Lake Erhai sediments. [Methods] Dumping culture was performed to count the numbers of sulfate-reducing bacteria and sulfate-oxidizing bacteria in the sediments of Lake Erhai, and PCR was utilized to analyze sulfate-reducing bacteria subgroups. [Results] The spatial distribution of sulfate-reducing bacteria coincided with sulfate-oxidizing bacteria. Three sulfate-reducing bacteria subgroups were detected. Desulfobulbus distributed widely, Desulfotomaculum scattered in the deeper sediments and Desulfococcus - Desulfonema - Desulfosarcina spreaded in the lower sediments. [Conclusion] The microbial community composition of sulfur cycle in Lake Erhai sediments is complex.

Key words: Sediments; Sulfur cycle; Sulfate-reducing bacteria; Sulfate-oxidating bacteria

酸雨是一种主要的环境污染物, 研究湖泊沉积物硫循环对于揭示酸雨产生的环境学效应机制具有重要意义^[1, 2]。微生物在湖泊沉积物硫的形态转化中起着重要的作用, 构成了的硫循环相关微生物群落中以硫酸还原菌 (Sulfate-reducing bacteria, SRB) 和硫氧化细菌 (Sulfur-oxidizing bacteria, SOB) 为重要, 湖泊沉积物硫循环相关微生物群落结构的研究是揭示酸雨等环境污染物迁移转化的生物学基础。

分析洱海沉积物硫酸盐还原菌和硫氧化细菌数量空间分布以及硫酸盐还原菌类群变化, 旨在了解洱海沉积物硫循环相关微生物群落多样性和空间分布规律。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 利用湖泊沉积物-水界面采样装置采集 4 月初云南洱海水深 21 m 处沉积物, 沉积物柱长 27 cm。厌氧条件下按 1 cm 距离将沉积物分样, 悬浮层为 0 cm, 标本迅速运输至实验室。

1.1.2 硫氧化细菌培养基 BaCl₂ 0.5 g; NaHCO₃ 0.2 g; KH₂PO₄

2 g; Na₂S₂O₃ 0.2 g; Ca (NO₃)₂ 0.1 g; 酵母膏 1.0 g; 硫磺 1.0 g; 固体培养基加入 2% 琼脂。

1.1.3 硫酸盐还原菌培养基参照文献^[3] 乳酸 2.5 ml; Na₂SO₄ 1.0 g; NH₄Cl 1.0 g; CaCl₂ 0.1 g; K₂HPO₄ 0.5 g; (NH₄)₂ SO₄ 0.5 g; 酵母膏 1.0 g; L-半胱氨酸 0.6 g; 0.1% 刃天青 1.0 ml; FeSO₄ 2.5 g; 固体培养基加入 2% 琼脂。

1.1.4 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker 和引物均为华美公司产品提供或合成, 电泳用琼脂糖购于 Shanghai Yito 公司。

1.1.5 仪器 超净工作台 (苏州安泰公司, SW-CJ-1F 型); PCR 梯度扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司); DNA 定量仪 (美国 Beckman 公司 640 型); 凝胶成像及分析系统 (美国 Bio-Rad 公司 75S02580 型); Bbo3-A 厌氧菌培养罐 (北京百信生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 沉积物硫酸盐还原菌和硫氧化细菌数量分析 采用倾注平板计数法^[4] 厌氧条件下进行硫酸盐还原菌计数, 35℃ 培养 21 d 后计数平板上黑色菌落; 需氧条件下进行硫氧化细菌计数, 35℃ 避光需氧培养 5 d 后计数出现白色沉淀环的菌落。

1.2.2 PCR 对沉积物硫酸盐还原菌类群分析 接种适量沉积物于硫酸盐还原菌液体培养基中, 32℃ 厌氧条件培养 5 d, 采用酚-氯仿-异戊醇法提取富集液细菌 DNA。采用依据 16SrDNA 特征性序列设计的硫酸盐还原菌 6 个类群的引物进行 PCR。PCR 扩增均为 30 个循环, 退火温度为 52℃~58℃, 每次均设阴阳性对照。反应体系中含 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40473050; 40173038)

作者简介: 王明义 (1973-), 男, 主管检验师, 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学

作者单位: 1. 中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳, 550002; 2. 贵阳医学院生物化学与分子生物学教研室

mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 2u Taq DNA 聚合酶, 0.4 uM 上下游引物, 0.2 mM dNTP, 0.2 μg DNA 模板。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果

2.1 沉积物硫酸盐还原菌和硫酸化细菌数量

沉积物硫酸盐还原菌数量有着明显空间变化规律, 悬浮层较低 (0.31×10³ 个/克); 随后逐渐升高至高峰, 以 4 cm 最高 (1.0×10³ 个/克); 之后逐渐下降, 到 16 cm 以后降低为 <10 个/克 (图 1); 沉积物硫酸化细菌数量变化趋势与硫酸盐还原菌相一致, 表现为悬浮层和 1 cm 较低 (0.02×10² 个/克和 0.1×10² 个/克), 随后逐渐升高, 以 15 cm 最高 (0.98×10² 个/克); 16 cm 后逐渐下降, 到 20 cm 以后降低为 <10 个/克 (图 2)。

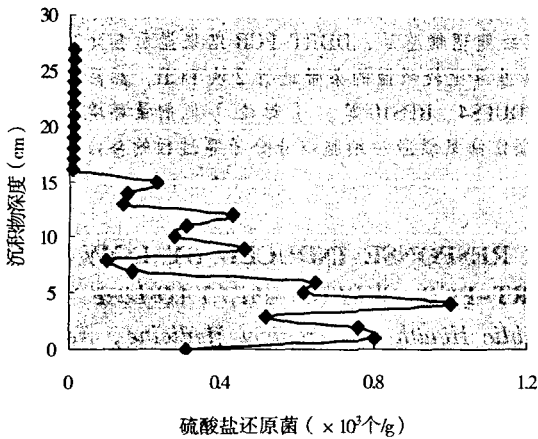


图 1 沉积物硫酸盐还原菌数量 (×10³ 个/g)

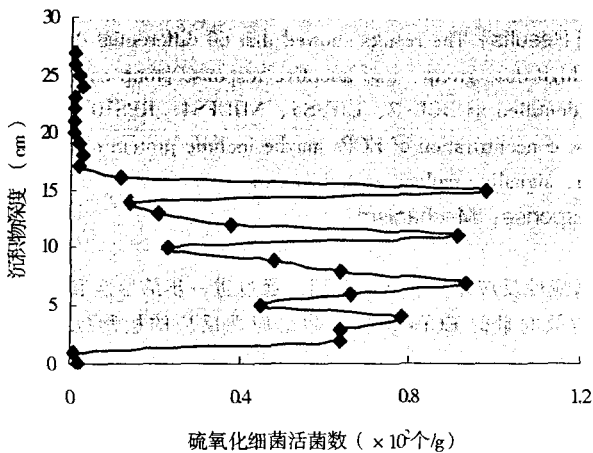


图 2 沉积物硫酸化细菌数量 (×10² 个/g)

2.2 沉积物硫酸盐还原菌类群分析

沉积物中共检出 3 个硫酸盐还原菌类群, 即脱硫肠菌属 (Desulfomaculum), 脱硫叶菌属 (Desulfobubus) 和脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属 (Desulfococcus - Desulfonema - Desulfosarcina)。其中 10、12、13 和 14 cm 沉积物中检出脱硫肠菌属; 悬浮层、1~15cm 沉积物检出脱硫叶菌属; 4~7 和 9 cm 沉积物检出脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属 (图 3~5)。

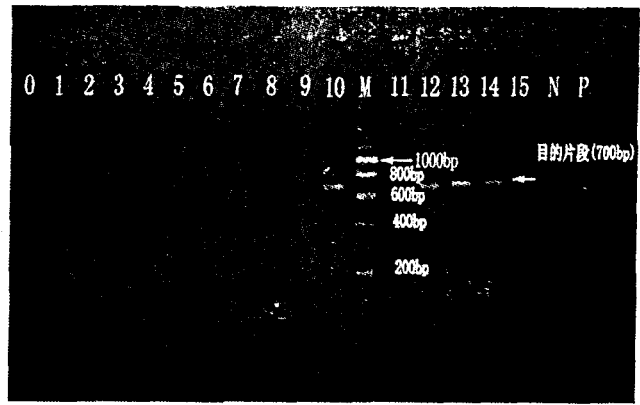


图 3 脱硫肠菌属 PCR 电泳后凝胶成像结果

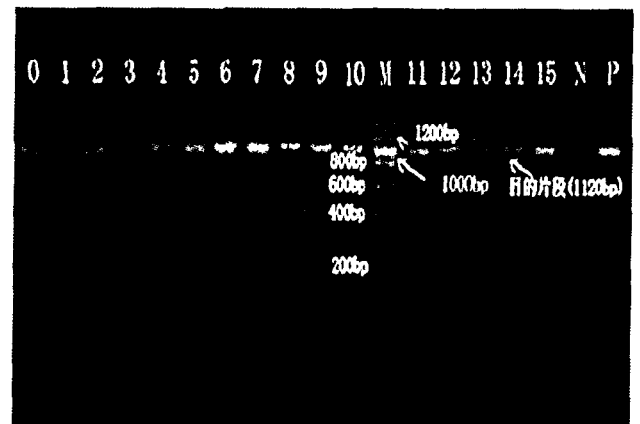


图 4 脱硫叶菌属 PCR 电泳后凝胶成像结果

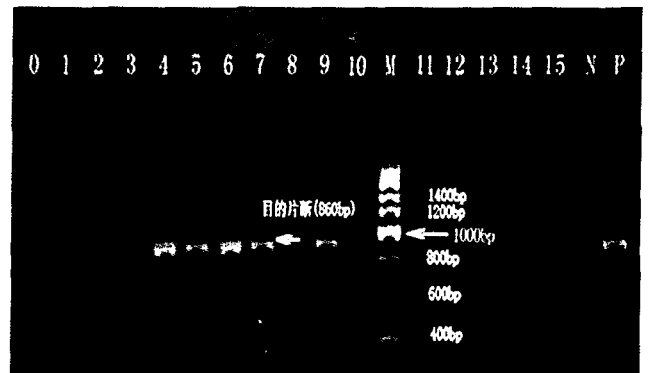


图 5 脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属 PCR 电泳后凝胶成像结果

3 讨论

硫酸盐还原菌是一类分解硫酸盐生成硫化氢的严格厌氧菌。硫酸化细菌则是一类可以利用还原态硫化物 (H₂S、S₀ 和 S₂O₃²⁻) 作为能源供体的需氧或者兼性厌氧菌, 文献表明存在海洋和淡水的硫酸化细菌多以还原态硫为能源供体并以有机物为碳源^[5]。

分析洱海沉积物硫酸盐还原菌和硫酸化细菌数量空间分布

(下转第 709 页)

时促进 DNA 的修复能力。当 TCE 剂量增大, 超过机体的代偿能力, 就表现为细胞的损伤。

3.3 DNA 损伤修复系统的参与

NADH 脱氢酶铁硫蛋白 4 (NDUFS4): NADH 脱氢酶铁硫蛋白 4 实质是 NADH 泛醌还原酶, 该酶是 NADH 氧化呼吸链中的重要酶, 该酶可以脱掉 NADH 的 H, 变为 NAD⁺。NAD⁺ 是生物氧化过程中大多数脱氢酶的辅酶, 也是 PARP 作用的底物。PARP 为参与 DNA 损伤修复的重要的酶, 可以催化 NAD⁺ 裂解为二磷酸腺苷核糖 (ADP-ribose) 和尼克酰胺两部分, 并将 ADP-ribose 糖基转移至受体蛋白谷氨酸残基上, 修饰受体蛋白 (这些蛋白在维持染色体结构和染色体相关蛋白功能方面均具有重要意义), 进而发生一系列级联反应, 使细胞对外界刺激作出应答^[6]。对这些基因更深入的研究可以更加明确它们在 ECPs 诱导适应性反应过程中的作用, 为机制研究提供科学依据。

3.4 激活细胞信号分子

如 NF- κ B-激活激酶等。NF- κ B/Rel 家族蛋白的一员, 哺乳动物中有五种 NF- κ B/Rel 蛋白: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), c-Rel, RelB 和 RelA (p65)。NF- κ B 是由 p50 和 RelA 组成的异源二聚体。当细胞处于静息状态下, NF- κ B 与其抑制蛋白 (inhibitor κ B, I- κ B) 结合, 以无活性的二聚体存在于胞质。有文献报道: NF- κ B 可以直接通过激活 caspase-8 顶端的 caspase 来阻止凋亡信号, 认为 NF- κ B 的激活是保护细胞免受一些凋亡刺激的首要机制。Oliver 等认为 PARP 蛋白质本身和 PARP 的活性都可以激活 NF- κ B, 而 PARP 又是 DNA 损伤过程中关键的修复酶。Chen SJ 等在研究 TCE 诱导细胞凋亡的过程中发现: p53 和 Bax 蛋白表达上调, 而 Bcl-2 蛋白表达下调, 该过程可能有 NF- κ B, caspase 的参与^[7-9]。这样就将外来因子刺激、PARP、NF- κ B 激酶、NF- κ B、p53、Bcl-2 蛋白家族和凋亡联系起来。机体在外来刺激下可能通过 NF- κ B 和各因子之间的相互作用启动防御机制, 诱导适应性反应。

通过以上分析, 可见低剂量的 ECPs 诱导机体的适应性反

应的机理可能有以下几个过程的参与: 维持细胞稳态、抗氧化、DNA 损伤修复及细胞信号传导。当然本研究只是对部分差异表达的基因进行了鉴定, 继续鉴定差异表达的条带及其已经鉴定基因的深入研究有利于更深入研究 ECPs 诱导的适应性反应的机理, 笔者也正在从事这方面的工作。

参考文献:

- [1] 林忠宁, 董胜璋, 董书芸, 等. MTT 法检测 T 淋巴细胞增殖功能的方法学探讨与应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10: 8-10.
- [2] Collier JM, Selmin O, Johnson PD. Trichloroethylene effects on gene expression during cardiac development [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2003, 67 (7): 488-495.
- [3] 黄锦生, 陈惠珍, 吴平方, 等. 低浓度三氯乙烯对人体抗氧化酶系统影响[J]. 中国公共卫生, 2002, 18 (3): 282-283.
- [4] 杨翠婵, 李伯灵, 邹志方. 低剂量三氯乙烯对作业工人脂质过氧化作用的影响[J]. 中国公共卫生, 2002, 3 (28): 23-24.
- [5] Yamaok K, Edamutsu R, Mri A. Increased SOD activated decreased lipid peroxide levels induced by low dose X-irradiation in rat organs[J]. FreeRadical BoilMed, 1991, 11: 299.
- [6] Viatcheslav A, Soldatenkov MD, Smulson PH. Poly (ADP-ribose) polymerase in DNA damage response pathway: implications for radiation oncology[J]. nt J Cancer, 2000, 90 (1): 59-67
- [7] Wang CY, Mayo MW, Komeluk RG, et al. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and C-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation[J]. Science, 1998, 281: 1680-1683.
- [8] Oliver FJ, Menissier-de Murcia, Nccci J, et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- κ B activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficiency mice [J]. EMBO, 1999, 18: 4446.
- [9] Chen SJ, Wang JL, Chen JH, et al. Possible involvement of glutathione and p53 in trichloroethylene- and perchloroethylene-induced lipid peroxidation and apoptosis in human lung cancer cells [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 3 (4): 464-472.

(收稿日期: 2006-10-16)

(上接第 705 页)

规律相一致, 均表现为浅层含量低, 随后逐渐升高, 达到高峰后逐渐下。分析认为这是由于二者在代谢中存在紧密的联系, 硫酸盐还原菌利用硫酸根作为电子受体并产生硫化氢, 硫酸化细菌又可以氧化硫化氢和单质硫等形成硫酸根, 二者通过硫的生物地球化学循环相互影响而构成硫循环相关微生物群落。2~15 cm 是该类微生物数量较多的沉积层, 示该区域可能硫循环较为活跃。洱海沉积物检出 3 个硫酸盐还原菌类群 (脱硫肠菌属、脱硫叶菌属和脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属), 各个类群空间分布是不均一的。表现为脱硫叶菌属分布广泛, 脱硫肠菌属分布于深层而脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属则分布于较浅层。分析认为该结果除了与硫酸盐浓度有关外, 湖泊沉积物不同垂直度有机质含量和种类亦参与了硫酸盐还原菌类群空间分布变化的控制。

参考文献:

- [1] Rudd JWM, Kelly CA, Schinder DWA. Comparison of the acidification efficiencies of by two whole-lake addition experiments [J]. Limnology and Oceanography, 1990, 35 (3): 663-679.
- [2] 梁小兵, 万国江. 硫循环的酶促反应机制及湖泊环境效应[J]. 地质地球化学, 2000, 28 (3): 33-36.
- [3] Li Fude, Harris B, Urrutia MM, et al. Reduction of Cr (VI) by a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRB III) [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 375-378.
- [4] 倪语星. 微生物学和微生物学检验实验指导 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001, 1 (3): 27
- [5] 马迪根 MT, 马丁克 JM, 帕克 J (杨文博译). 微生物生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001, 1: 612, 683.

(收稿日期: 2006-03-17)