

·综述·

产甲烷菌研究进展

单丽伟,冯贵颖,范三红

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨陵 712100)

摘要 产甲烷菌是重要的环境微生物,在自然界的碳素循环中起重要作用。迄今已有 5 种产甲烷菌基因组测序完成。基因组信息使人们对产甲烷菌的细胞结构、进化、代谢及环境适应性有了更深的理解。目前已知的甲烷生物合成途径有 3 种,它们以乙酸、甲基化合物、氢/二氧化碳为起始,通过不同的反应途径都形成了甲基辅酶 M,在甲基辅酶 M 还原酶的催化下最终形成甲烷。

关键词 产甲烷菌;分类;基因组;甲烷合成机制

中图分类号 Q939.9

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2003)06-0042-05

产甲烷菌是一类能够将无机或有机化合物厌氧发酵转化成甲烷和二氧化碳的古细菌,它们生活在各种自然环境下,甚至在一些极端环境中。产甲烷菌是厌氧发酵过程的最后一个成员,甲烷的生物合成是自然界碳素循环的关键链条。由于产甲烷菌在有机废弃物处理、沼气发酵、动物瘤胃中有机物分解利用等过程中的重要作用,同时甲烷是导致全球变暖的第二大温室气体,因此产甲

烷菌和甲烷产生机理的研究备受关注。特别是近几年对产甲烷菌基因组的研究,使人们从全基因组的角度、进化的角度对甲烷生物合成机理、甲烷菌的生活习性、形态结构等方面获得更深刻的理解。

1 产甲烷菌的分类

Schnellen 第一个从消化污泥中分离纯化得到

Archaea->Euryarchaeota

■ Methanobacteria

◆ Methanobacteriales

- Methanobacteriaceae
 - Methanobacterium
 - Methanobrevibacter
 - Methanosphaera
 - Methanothermobacter
- Methanothermaceae
 - Methanothermus

■ Methanococci

◆ Methanococcales

- Methanocaldococcaceae
 - Methanocaldococcus
 - Methanotorris
- Methanococcaceae
 - Methanococcus
 - Methanothermococcus

◆ Methanomicrobiales

- Methanocorpusculaceae
 - Methanocorpusculum
- Methanomicrobiaceae

- Methanoculleus
- Methanofollis
- Methanogenium
- Methanomicrobium
- Methanoplasma
- Methanospirillaceae
 - Methanospirillum

◆ Methanosarcinales

- Methanosaeetaceae
 - Methanosaeta
- Methanosarcinaceae
 - Methanimicrococcus
 - Methanococcoides
 - Methanolalobium
 - Methanohalophilus
 - Methanolobus
 - Methanomethylovorans
 - Methanosalsum
 - Methanosarcina

■ Methanopyri

◆ Methanopyrales

图 1 产甲烷菌系统分类图

收稿日期:2002-11-01

作者简介:单丽伟 女,助教,在读硕士生。现从事环境生物技术研究工作。

甲酸甲烷杆菌(*Methanobacterium formicium*)和巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*); 1974年Bryant首次提出了产甲烷菌(*Methanogen*)一词,将其与以甲烷为能量来源的嗜甲烷菌(*Methanotrophs*)区分开来。到目前为止,分离鉴定的产甲烷菌已有200多种。它们存在于沼泽、湖泊、海洋沉积物及瘤胃动物的胃液等自然生态系统中,也存在于废水处理、堆肥和污泥消化等非自然的生态系统中。从分类学上讲,产甲烷菌属于古细菌的水生古细菌门(Euryarchaeota),已鉴定的产甲烷菌分属于3个纲的5个目中。由于目前国内的多数教科书中仍然沿用3目40余种的旧分类法,所以将最新的分类系统列出以供参考(如图1)。

2 产甲烷菌基因组研究

2.1 产甲烷菌基因组特征

基因组和比较基因组的研究为一个物种基因组特征

表1 产甲烷菌基因组特征

目	种	基因组/bp	%G+C	开放阅读框	公开日期	Genbank 组号
Methanobacteriales	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	1 751 377	49.5	1 873	1997/11	NC-000916
Methanococcales	<i>Methanococcus jannaschii</i>	1 739 933	31.3	1 738	1996/08	NC-000909 NC-001732
Methanopyrales	<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19	1 694 969	62.1	1 692	2002/04	NC-003551
Methanosarcinales	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	5 751 492	42.7	4 524	2002/02	NC-003552
	<i>Methanosarcina mazei</i> Goe1	4 096 345	41.5	3 371	2002/07	NC-003901

2.2 基于基因组信息的产甲烷菌进化分析

传统的分类是在对大量单个微生物进行观察分析和描述的基础上,以它们的形态结构、生理生化特性和遗传性等特征的异同为依据进行的。随着分子生物学的发展,人们利用不同物种间small-subunit ribosomal RNA的同源性进行分类取得了较为满意的结果。但这种方法存在着明显的弊端,当环境压力使得某物种核酸中G+C含量变化时,分析结果会有较大偏差。随着多个物种全基因组测序的完成,使人们可以用全基因组信息研究物种的进化、基因的垂直进化和水平迁移。图2为基于全基因组的14种微生物的进化分析结果,图2A为基于不同物种间基因的“重

叠”(在2个物种中都出现)数量获得的进化树。在产甲烷菌之间基因的“重叠”性很高,发现一些基因簇只在产甲烷菌中出现而不在其它古细菌中出现,同样也发现一些其它微生物中共有的基因簇在产甲烷菌中找不到痕迹。在比较中发现*M. thermoautotrophicum*基因组中缺少物种间基因的水平转移,这可能是由于*M. thermoautotrophicum*生存在2000m深的海底且温度高达80~100度的独特环境中。图2B为基于不同物种间基因顺序获得的进化树。不同基因组间基因顺序的比较可以衡量2个物种间的亲缘关系,也能提示基因之间功能的关联性。图2C是基于核糖体蛋白同源性的进化树。利用核糖体蛋白同

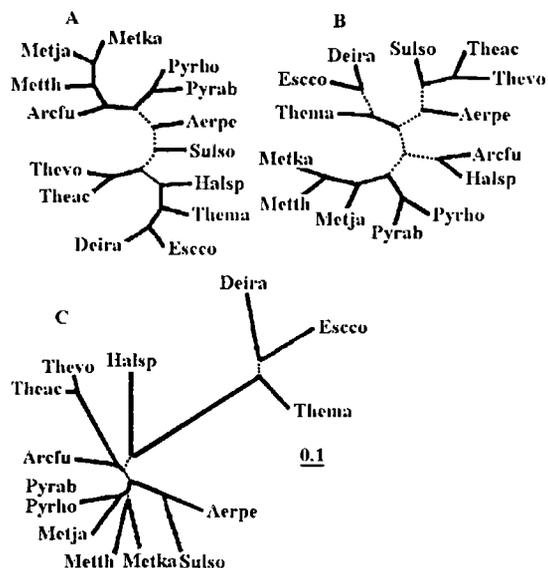


图2 古细菌基因组的进化树

A. 基于基因“重叠”的进化树; B. 基于基因顺序的进化树; C. 基于核糖体蛋白的进化树
Euryarchaeota: *A. fulgidus* (Arcfu), *M. thermoautotrophicum* (Metth), *M. jannaschii* (Metja), *M. kandleri* (Metka), *Pyrococcus horikoshii* (Pyrho), *Pyrococcus abyssi* (Pyrab), *Thermoplasma volcanium* (Thevo), *Thermoplasma acidophilum* (Theac), *Halobac terium* sp. (Halsp); *Crenarchaeota*: *Aeropyrum pernix* (Aerpe), *Sulfolobus solfataricus* (Sulso); bacteria: *Thermotoga maritima* (Thema), *Deinococcus radiodurans* (Deira), *Escherichia coli* (Escco)

源性构建进化树是目前认为最可靠的进化分析方法。从图2A,B,C可以看出3种产甲烷菌在进化树中非常靠近, *M. kandleri* 和 *M. thermoautotrophicum* 属于同一个分枝, 而 *M. jannaschii* 独处于一个分枝。在图2C, 古细菌和细菌明显地分成了2大分枝。

3 产甲烷菌代谢研究

3.1 产甲烷菌基本代谢途径

产甲烷菌生活在厌氧条件下, 它们通过甲烷的生物合成形成维持细胞生存所需的能量。在产甲烷菌中存在原核细胞和真核细胞所共有的糖酵解途径(EMP)、三羧酸循环(TCA)、氨基酸和核苷酸代谢。但一些基本所需的酶在产甲烷菌中未被确定, 如在 *Methanopyrus kandleri* AV19 的 TCA 循环中缺乏将两分子丙酮酸缩合成一分子六碳三羧酸所需的酶。在 *M. kandleri*, *M. thermo* 和 *M. jannaschii* 中均不存在由丙酮酸或磷酸烯醇式丙酮酸形成苹果酸所需的酶。产甲烷菌是自养型的生物, 它能利用环境中的化学能。因而产甲烷菌中发现了许多无机物进入细胞所需的

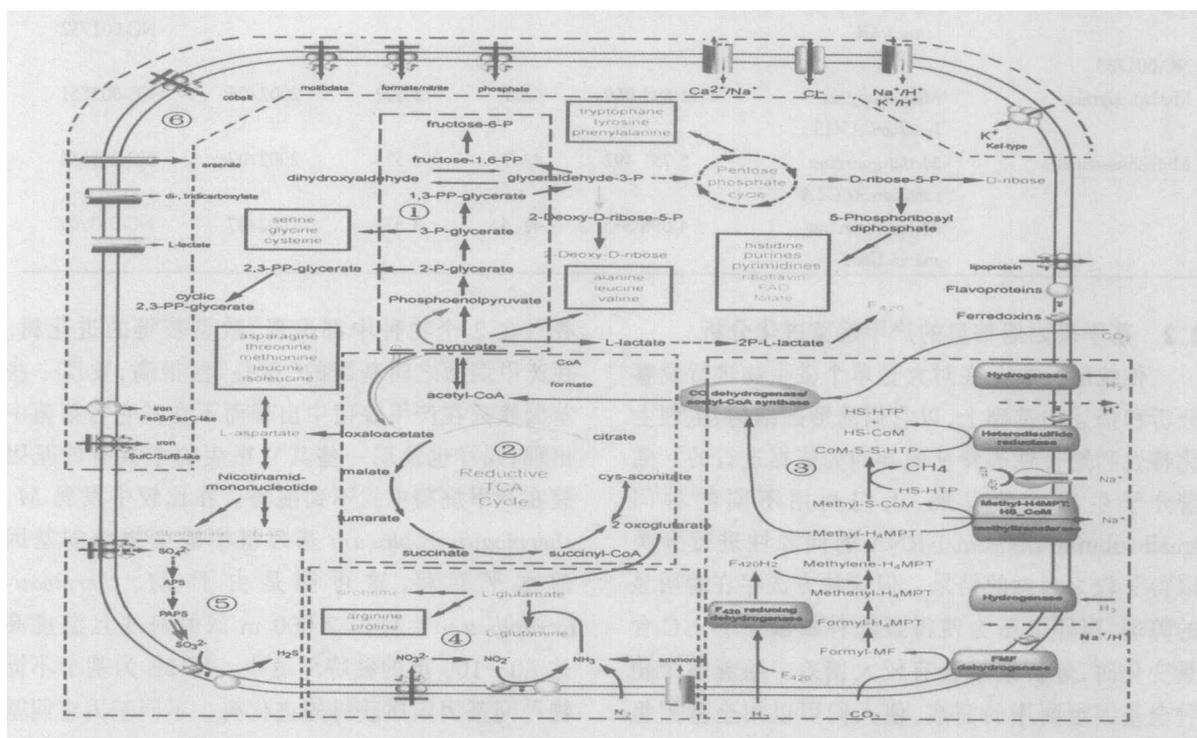


图3 根据基因组信息预测的产甲烷菌 *Methanopyrus kandleri* AV19 的基本代谢途径

- ①糖酵解途径; ②三羧酸循环(不完整); ③甲烷的生物合成及与其偶联的ATP的形成;
- ④氮素的吸收和固定; ⑤硫元素的吸收和硫化氢的生成; ⑥各种离子和有机的吸收和利用

通道蛋白。如 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cl^- , Fe^{2+} / Fe^{3+} 等离子;以及亚砷酸、磷酸、硫酸、硝酸等无机酸。产甲烷菌还具备运输乳酸、六碳三羧酸、六碳二羧酸等有机物进入细胞的转运蛋白。产甲烷菌是目前唯一知道的可固氮古细菌,该过程由固氮酶和固氮酶还原酶两个金属蛋白形成的固氮酶复合体完成。产甲烷菌能够吸收环境中的硫酸根,通过一系列的酶代谢最终形成硫化氢。图 3 是通过基因组分析预测出的嗜氢嗜热产甲烷菌 *Methanopyrus kandleri* AV19 的基本代谢途径,为了便于理解,图中用虚线将主要的代谢过程划分为六个区域,其中甲烷的生物合成(区域③)和氮素的固定(区域④)是产甲烷菌独特的代谢过程。甲烷生物合成过程中,甲烷的形成伴随着细胞膜内外化学梯度的形成,这种化学梯度驱动 ATP 酶产生细胞内能量通货 - ATP。

3.2 甲烷生物合成途径

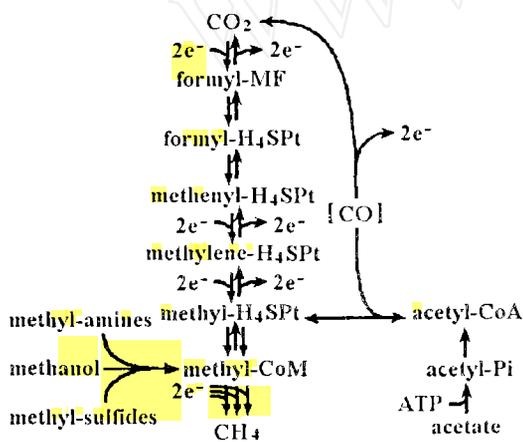


图 4 甲烷生物合成的 3 种途径

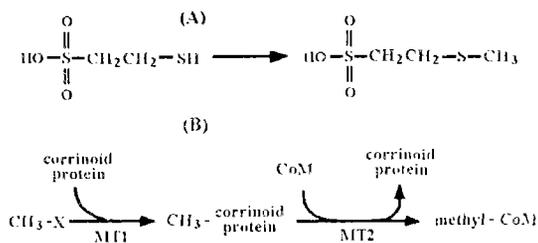


图 5 A 辅酶 M 到甲基辅酶 M 的转变

B 甲基化合物到甲基辅酶 M 的转变

目前发现的甲烷生物合成过程有 3 种途径,如图 4 所示。第 1 种途径为以乙酸为原料的甲烷生物合成,第 2 种为以氢、二氧化碳为原料的甲烷生物合成,第 3 种是以甲基化合物为原料的

甲烷生物合成过程,如甲醇、甲基胺、甲基硫等。3 种途径最终都形成甲基辅酶 M(如图 5 A 所示),甲基辅酶 M 在甲基辅酶 M 还原酶 I(MR I)和甲基辅酶 M 还原酶 II(MR II)的催化下最终形成甲烷。其中乙酸为底物的甲烷合成占自然界甲烷合成的 60 % 以上,以氢和二氧化碳为底物的甲烷合成的 30 %。在此过程中有多种辅酶参与反应,如:甲酰甲基咪喃(MFR)、甲酰四氢甲基喋呤(THMP)、辅酶 M(HSCoM)、辅酶 F420(CoF420)、辅酶 F430(CoF430)和辅因子 B(HS-HTP)。如前所述,甲烷形成的过程伴随着细胞膜内外化学梯度的形成,这种梯度的形成过程类似于以氧为末端电子受体的氧化磷酸化和电子传递链的偶联。在化学梯度形成过程中, Na^+ 离子梯度的形成是由钠离子泵 - methyl-THMP:HS-CoM 甲基转移酶实现的, H^+ 梯度的形成是由位于细胞膜上的 HDR 实现的, HDR 催化与 HTP-S-S-CoM 的还原偶联的氢的氧化。形成的 Na^+ 和 H^+ 梯度最终驱动位于细胞膜上的 ATP 合成酶产生 ATP。图 4 中由乙酸生成甲烷的代谢途径中乙酸首先磷酸化生成乙酰磷酸,乙酰磷酸再转化为乙酰辅酶 A,乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 脱羧酶(ACDS)的催化下形成 1 分子甲基四氢甲基喋呤(methyl-H4Spt)和 1 分子一氧化碳,一氧化碳在一氧化碳脱氢酶(CODH)的催化下脱氢形成 CO_2 ,同时形成还原型的铁氧环蛋白。还原型的铁氧环蛋白通过细胞膜的细胞色素蛋白将氢质子泵出细胞膜形成质膜内外的质子梯度差,甲基四氢甲基喋呤在 methyl-THMP:HS-CoM 甲基转移酶的作用下将甲基转移给 HS-CoM,形成甲基辅酶 M,同时将 Na^+ 泵出细胞膜。以二氧化碳和氢为原料的合成途径通过一系列的电子传递过程形成甲基辅酶 M,后续的步骤和乙酸途径相同。以甲基化合物为底物的甲烷合成过程都要通过图 5B 所示的过程将甲基转移给 HS-CoM,此过程需要 2 种酶甲基转移酶 1(MT1)和甲基转移酶 2(MT2),不同的底物需要不同的 MT1 和 MT2,已知的 MT1、类钴啉蛋白(corrinoid protein)和 MT2 各有十多种。一般而言,一种产甲烷菌只具有一种甲烷合成途径,但具有多细胞结构的甲烷八叠球菌同时含有 3 种甲烷合成途径,而且至少可以利用 9 种甲烷合成的底物。

4 产甲烷菌对环境的适应性

产甲烷菌生活在各种厌氧环境中,甚至在极端环境中,这种适应性是长期进化的结果。同时产甲烷菌中存在各种机制以调节自身适应环境。比如甲烷八叠球菌,它们生活在淡水、海底沉积物、腐败的叶子、土壤、油井、下水道污物、动物排泄物等环境中。甲烷八叠球菌基因组中含有大量表面蛋白基因,可以形成具有保护作用的荚膜。它是古细菌中唯一可以形成多细胞结构的物种,因此提供了一个良好的用于研究多细胞形成机制的模型。在不同的生长阶段和不同的环境条件下甲烷八叠球菌处于不同的细胞形态。在胁迫环境下,多细胞结构形成对提高适应环境能力起到关键作用。产甲烷菌和其它物种一样具有信号转导的二元调控系统(two-component regulatory systems),但它及其它古细菌的二元调控系统与已经研究清楚的细菌的二元调控系统有很大不同。细菌的二元系统由组氨酸激酶(histidine kinase)和响应调控蛋白(response regulator protein)按1:1的比例组成,而且响应调控蛋白一般具有一个效

应域(effector domain)。在产甲烷菌及其它古细菌基因组中的响应调控蛋白一般含有响应调控域,而不具备和细菌类同的效应域。这暗示产甲烷菌可能存在一种新的信号转导机制。尽管还未观察到任何甲烷八叠球菌的运动性,但在其基因组中发现了一个完整的鞭毛基因簇和两个完整的趋化性基因簇,这些基因簇的存在也暗示了产甲烷菌可能会通过运动和趋化性适应环境。

5 结 语

产甲烷菌是厌氧发酵过程中最后一个环节,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,产甲烷菌的研究成为环境微生物研究的焦点之一。产甲烷菌基因组及甲烷生物合成研究有利于人们从基因组和分子水平分析古细菌进化、阐明产甲烷菌独特的代谢调控机制及其对环境的适应性;进而为通过生物技术进行环境检测和环境治理奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Deppenmeier U, Johann A. The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2002, 4(4):453-61.
- [2] Galagan JE, Nusbaum C. The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity [J]. Genome Res, 2002, 12(4):532-42.
- [3] Slesarev AI, Mezhevaya KV. The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(7):4644-9.
- [4] Bult CJ, White O. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii* [J]. Science, 1996, 273(5278):1058-73.
- [5] Smith DR, Doucette-Stamm LA. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics[J]. J Bacteriol., 1997, 179(22):7135-55.
- [6] Veupele M, and Thauer, R. K. Two F420-reducing hydrogenases in *Methanosarcina barkeri*[J]. Arch. Microbiol, 1998, 169: 201-205.
- [7] Mählert F, Bauer C. The nickel enzyme methyl-coenzyme M reductase from methanogenic archaea: In vitro induction of the nickel-based MCR-ox EPR signals from MCR-red2[J]. J Biol Inorg Chem, 2002, 7(4):500-13.
- [8] Deppenmeier U. The unique biochemistry of methanogenesis [J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol., 2002, 71:223-83.
- [9] Schafer G, Engelhard M, Müller V. Bioenergetics of the Archaea[J]. Microbiol Mol Biol Rev., 1999, 63(3):570-620.
- [10] Graham DE, White RH. Elucidation of methanogenic coenzyme biosyntheses: from spectroscopy to genomics [J]. Nat Prod Rep., 2002, 19(2):133-47.
- [11] 贺延龄. 废水厌氧生物处理[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998, 42-56.
- [12] 钱泽树, 闵航. 沼气发酵微生物学[M]. 杭州:浙江科技出版社, 1986, 62-84.

Progress in Genome and Methanogenesis of Methanogens

SHAN Liwei, FENG Guiying, FAN Sanhong

(The College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shanxi, 712100, China)

Abstract Methanogens is an important class of environmental microorganism. It plays a pivotal role in the global carbon cycle. Now, five complete genomes of methanogens have been sequenced. From the genome information, we got a comprehensive view about cell structure, evolution, metabolism and adaptability. There are three pathways for methanogenesis. They start from acetic acid, C-1 compound and H_2/CO_2 respectively, and all three pathways converge on the reduction of methyl CoM to methane (CH_4).

Keywords methanogens, taxonomy, genome, methanogenesis.