

# 水稻土中硫酸盐还原微生物研究进展

刘新展<sup>1,2</sup>, 贺纪正<sup>1</sup>, 张丽梅<sup>1,\*</sup>

(1. 中国科学院生态环境研究中心城市与区域生态国家重点实验室, 北京 100085; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 硫是水稻必需的营养元素之一。硫酸盐还原是硫元素生物地球化学循环中的关键步骤, 在稻田土壤表层和水稻根际都十分活跃。介导硫酸盐还原过程的硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) 是稻田土壤中重要的功能菌群。它们不仅是硫元素生物地球化学循环的重要参与者, 也是土壤中有机污染物降解的主要力量之一, 发挥着重要的生态和环境功能。综述了稻田土壤中微生物参与的硫酸盐还原过程、SRB 的生物多样性以及目前研究稻田土壤 SRB 主要采用的分子生态学方法, 如末端限制性片段长度多样性 (T-RFLP)、变性梯度凝胶电泳 (DGGE)、实时荧光定量 PCR (real-time PCR)、荧光原位杂交 (FISH), 并对水稻土壤中 SRB 的分子生态学研究方向进行了展望。

**关键词:** 水稻土; 硫循环; 硫酸盐还原菌; 末端限制性片段长度多态性; 变性梯度凝胶电泳; 实时荧光定量 PCR; 荧光原位杂交  
文章编号: 1000-0933 (2009) 08-4455-09 中图分类号: S154.36 文献标识码: A

## The sulfate-reducing bacteria and sulfur cycle in paddy soil

LIU Xin-Zhan<sup>1,2</sup>, HE Ji-Zheng<sup>1</sup>, ZHANG Li-Mei<sup>1,\*</sup>

1 State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

*Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(8): 4455 ~ 4463.

**Abstract:** Sulfur is one of the most necessary nutrients for rice growth. Sulfate reduction is a key process in the sulfur biogeochemical cycle, which is active in the surface and rhizosphere of the rice paddy soils. Sulfate-reducing bacteria (SRB) are the main functional microbial group and can also play important roles in the degradation of some organic pollutants in the rice paddy soils. This review paper summarized recent major advances in the processes of sulfate reduction and the diversity of SRB in the rice paddy soils. It also introduced some prevalent molecular methods in the studies of SRB in the rice paddy soils, such as terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), denature gradient gel electrophoresis (DGGE), real-time PCR, and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Future perspectives in the molecular ecology of SRB studies were proposed.

**Key Words:** paddy soil; sulfur cycle; sulfate-reducing bacteria; T-RFLP; DGGE; real-time PCR; FISH

淹水稻田土壤被公认为是研究土壤微生物的典型模式环境, 一直备受研究者的重视<sup>[1]</sup>。近年来, 参与水稻土壤中碳、氮元素生物地球化学循环的微生物如甲烷氧化菌、氨氧化菌已经得到了深入的研究<sup>[2,3]</sup>。与碳和氮元素相比, 水稻土壤中硫元素的含量并不丰富, 但其所发挥的营养功能却是不能被忽视的。每年水稻土壤要获得 8 ~ 17 kg/hm<sup>2</sup> 的硫以满足水稻的正常生长<sup>[4]</sup>, 并且植物均以无机态硫酸盐的形式吸收硫素营养<sup>[5]</sup>。硫酸盐还原菌 (sulfate-reducing bacteria, SRB) 不仅是稻田土壤中硫元素生物地球化学循环的主要参与者, 而且还能够降解稻田土壤中的有机污染物如甲酚、联苯, 在环境修复方面发挥着重要的作用<sup>[6,7]</sup>。水稻土壤中

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (40571082); 国家重点基础研究发展规划资助项目 (2005CB121105)

**收稿日期:** 2008-08-27; **修订日期:** 2009-05-12

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhanglm@rcees.ac.cn

硫酸盐还原菌被证明能够参与甲烷的厌氧氧化,在水稻土壤中碳、硫循环中同时发挥着重要的作用<sup>[8]</sup>。本文将对近年来水稻土壤中硫酸盐还原过程,硫酸盐还原菌的多样性以及硫酸盐还原菌研究中常用的分子生态学方法作一简要综述,旨在为今后从事水稻土壤中硫酸盐还原菌微生物生态学的研究提供参考。

## 1 土壤硫循环及硫酸盐还原过程

### 1.1 土壤硫循环

硫是水稻生长的必需营养元素之一,水稻植株中 90% 的有机硫都参与氨基酸和蛋白质的合成<sup>[9]</sup>,但高浓度的硫化氢会对水稻种子的萌发和水稻根系生长产生极大的危害,从而降低水稻的产量<sup>[10]</sup>。土壤硫有 -2 至 +6 不同的价态,主要包括  $S^{2-}$ 、 $S^0$ 、 $SO_4^{2-}$ 、 $S_2O_3^{2-}$  和  $S_4O_6^{2-}$  等离子形式。硫元素会随着环境条件的改变在微生物的作用下转变为不同价态的化合物,构成了硫的生物地球化学循环。微生物在硫循环过程中的作用途径主要有 3 条,如图 1<sup>[11]</sup>所示:(1) 有机硫(如甲硫氨酸和铁硫蛋白中的硫)矿化为  $S^{2-}$ ,凡是能将含氮有机物分解产氨的微生物均具有脱硫作用,在这类微生物的作用下,含硫有机物脱硫后形成  $H_2S$ 。(2) 还原态硫的氧化, $H_2S$  在好氧条件下通过硫氧化微生物的氧化作用形成硫酸盐。目前发现的硫氧化微生物主要有 3 种,它们是无机化能自养细菌(如硫杆菌属),厌氧光合自养细菌(如绿硫细菌、紫硫细菌)和极端嗜酸嗜热的古生菌类(如硫化叶菌)。(3) 硫酸盐还原,硫氧化形成的硫酸盐一部分被植物和微生物吸收利用,另一部分在厌氧条件下参与由 SRB 介导的硫酸盐异化还原过程(形成  $H_2S$ )或同化还原过程(形成有机硫化物)。

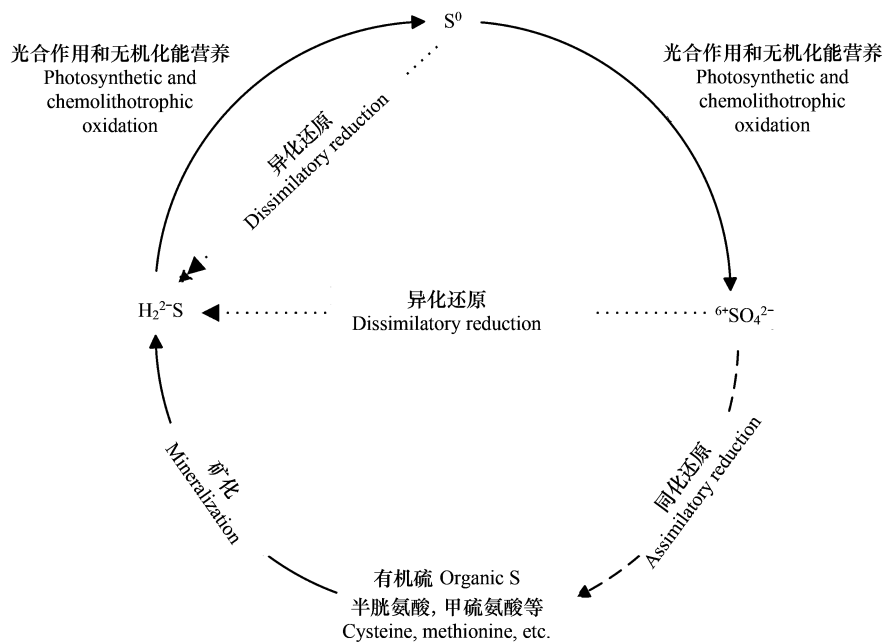


图 1 硫生物地球化学循环

Fig. 1 Geomicrobiological cycle of sulfur

### 1.2 硫酸盐还原的微生物过程

水稻土壤大多处于还原状态,硫酸盐的异化还原成为硫循环的重要环节,其代谢途径及所涉及的关键酶类如图 2 所示<sup>[11]</sup>。硫酸盐( $SO_4^{2-}$ )是最稳定的硫氧化物形式,在 ATP 推动下首先转化为腺苷磷酸硫酸酯(APS),可见,APS 是  $SO_4^{2-}$  还原过程的起始物。APS 还原有 2 个途径:一是以有机物(主要是乙酸)和  $H_2$  作为电子受体,直接转移 6 个电子还原为硫化氢(图中 1→2→3);二是先转化为三磺酸盐和硫代硫酸盐中间产物,再还原为  $S^{2-}$ (图中 1→2→4→5→6)。其中第一条途径被认为是普遍存在的、主要的还原过程。过去一般认为水稻土壤中 S 元素的含量相对较低,硫酸盐还原过程会因为电子受体  $SO_4^{2-}$  的低浓度而受到限制<sup>[12]</sup>。然而最新研究表明,在培养 13 周的水稻土壤中仍然可以检测到较高的硫酸盐还原速率(sulfate reduction rate,

SRR)<sup>[13]</sup>,这是由于还原态的硫化合物在水稻土壤富氧区域被重新氧化所致<sup>[14]</sup>,此富氧区域包括氧气可以扩散到的土壤表层(0~4 mm)和由于植物通气组织的泌氧作用而形成的根际富氧区域<sup>[15]</sup>,实验<sup>[16~18]</sup>证明这些区域具有很高的原位硫酸盐还原活性,SRB 数量也很高。

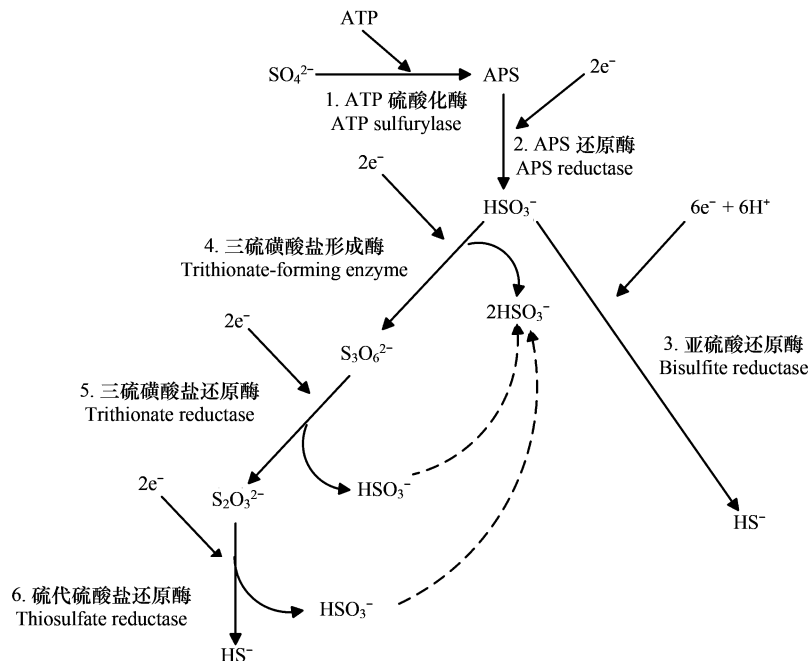


图2 异化硫酸盐还原代谢途径

Fig. 2 Metabolic schemes associated with dissimilatory sulfate reduction

土壤富氧表层(0~1 cm)是硫酸盐还原过程的主要发生区域之一。Thorsten 等<sup>[16]</sup>对意大利水稻土壤0~10 cm的土壤层进行分析后发现 $\text{SO}_4^{2-}$ 的浓度在1 cm以内最高,可达 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,在深度为10 cm时 $\text{SO}_4^{2-}$ 的浓度减少为 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。虽然水稻土的 $\text{SO}_4^{2-}$ 的浓度比海洋要低很多,但硫酸盐还原活性比较高,约为 $2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

水稻根际是硫酸盐还原过程最活跃的地方,不仅是因为其高的含氧量为硫酸盐还原过程提供大量的电子受体 $\text{SO}_4^{2-}$ ,而且由于根际释放大量的有机物如乙酸、丙酸、乳酸等,直接为硫酸盐还原菌提供电子供体和底物,因此根际区域的SRB群落也很为丰富<sup>[19]</sup>。水稻土中有限的 $\text{SO}_4^{2-}$ 离子浓度还不足以为活跃的硫酸盐还原过程提供足够的电子受体,水稻植株通气组织释放的氧气才是还原性硫化物转化为 $\text{SO}_4^{2-}$ 的主要原因,因此根际周围(0~3 mm)的 $\text{SO}_4^{2-}$ 浓度可以达到 $90\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,SRR可以达到 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ <sup>[13]</sup>。

## 2 硫酸盐还原菌的多样性

硫酸盐还原菌(SRB)是一类形态各异、营养类型多样,在厌氧和微氧环境中能利用硫酸盐或者其他硫氧化物作为氧化有机物的电子受体,并在代谢过程中产生高浓度 $\text{H}_2\text{S}$ 的革兰氏阳性或阴性细菌或古菌<sup>[20]</sup>。水稻土中,由于根际和非根际土壤不同的物理化学性质如有机底物浓度、含氧量,SRB的数量和多样性分布也存在着差异。与非根际水稻土相比,根际水稻土中SRB的数量较高<sup>[16]</sup>。另外,在根际水稻土中,生长速度较快、不完全氧化代谢有机物的SRB如*Desulfivibrio*占优势;而在非根际水稻土中,生长较为缓慢,能够形成孢子且以完全氧化代谢有机物的SRB如*Desulfotomaculum*为主要类群<sup>[18]</sup>。

过去一般根据细胞形状、细胞可移动性、DNA中鸟嘌呤和胞嘧啶含量(GC含量)、最适生长温度和是否完全氧化乙酸等对SRB进行分类,但随着分子生物学技术的迅猛发展,16S rRNA基因序列分析应用于SRB分类之中<sup>[21]</sup>,不仅有助于提供SRB进化的分子信息,而且加速了不同类别SRB的引物和探针设计,为更深入研究SRB提供了有利的手段。

目前,已发现的 SRB 达 130 余种,通过数据库中 16S rRNA 基因序列的分子进化分析它们被分为 4 个主要类群:革兰氏阴性嗜温 SRB,革兰氏阳性 SRB,嗜热 SRB 细菌和嗜热 SRB 古菌,涵盖了 4 个细菌门:变形菌门(Proteobacteria)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、热脱硫杆菌门(Thermodesulfobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和 1 个古菌门:广古菌门(Euryarchaeota)<sup>[21,22]</sup>(表 1)。以下对 4 类 SRB 进行分别介绍。

## 2.1 革兰氏阴性嗜温 SRB

此类群属于  $\delta$ -变形菌纲,主要包括两大科:脱硫杆菌科(Desulfobacteraceae)和脱硫弧菌科(Desulfovibrionaceae)<sup>[23]</sup>,其中 Desulfobacteraceae 科中有些具有很特殊的形态特性。如脱硫八叠球菌属(*Desulfosarcina*)可以形成鞭毛,脱硫线菌属(*Desulfonema*)的丝状 SRB 可以进行滑行运动。

利用 T-RFLP 和 16S rRNA 基因克隆文库分析发现<sup>[24]</sup>,水稻根际和非根际土壤中革兰氏阴性嗜温 SRB 的组成并无区别,但是会随季节而演替。Desulfobacteraceae 科的 SRB 主要以 *Desulfonema* 属、*Desulfosarcina* 属和杆状脱硫菌属-互营杆菌属(*Desulforhabdus-Syntrophobacter*)复合体为主;Desulfovibrionaceae 科主要以脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)为主。水稻根际 SRB rRNA dot blot 杂交分析显示,革兰氏阴性嗜温 SRB 约占细菌 rRNA 总量的 2%~3%,其中 Desulfobacteraceae 科约占 1.4%,高于 Desulfovibrionaceae 科的 0.5%。Real-time PCR 定量研究发现<sup>[25]</sup>,在水稻根际和非根际土壤中 Desulfobacteraceae 科是 SRB 的主要类群,每克干土中所含拷贝数分别为  $6.4 \times 10^7$  个和  $7.5 \times 10^7$  个,其中以 *Desulforhabdus-Syntrophobacter* 复合体和脱硫杆菌属(*Desulfobacterium*)为主。而在水稻根部,Desulfobacteraceae 科、Desulfovibrionaceae 科和脱硫叶菌属(*Desulfobulbus* sp.)均为主要类群,拷贝数量均为每克干土约  $1.0 \times 10^8$  个。

表 1 主要 SRB 类群分布

Table 1 The main SRB groups

| 主要分类单元 Taxonomy                          | 代表属种 Typical genus and species                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 革兰氏阴性嗜温 SRB Gram-negative mesophilic SRB | <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfomicrobium</i><br><i>Desulfobulbus</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfobacterium</i> <i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfosarcina</i> ,<br><i>Desulfomonile</i> , <i>Desulfonema</i> , <i>Desulfobotulus</i> , <i>Desulfoarculus</i> , <i>Desulfobacula</i> ,<br><i>Desulfospira</i> , <i>Desulfocella</i> , <i>Desulfobacca</i> , <i>Desulfacinum</i> , <i>Thermodesulforhabdus</i> ,<br><i>Desulforhabdus</i> , <i>Desulfocapsa</i> , <i>Desulforhopalus</i> , <i>Desulfofustis</i> |
| 革兰氏阳性 SRB Gram-positive spore SRB        | <i>Desulfotomaculum</i> , cluster I <i>Desulfosporosinus orientis</i> <i>Desulfotomaculum guttoideum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 嗜热 SRB 细菌 Bacterial thermophilic SRB     | <i>Thermodesulfobacterium commune</i> <i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 嗜热 SRB 古菌 Archaeal thermophilic SRB      | <i>Archaeoglobus fulgidus</i> <i>Archaeoglobus profundus</i> <i>Archaeoglobus lithotrophicus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

## 2.2 革兰氏阳性嗜温 SRB

革兰氏阳性嗜温 SRB 的 GC 含量比较低,其生长温度较革兰氏阴性嗜温 SRB 高,形态多样,乙酸、苯胺、琥珀酸盐、儿茶酚、吡啶、乙醇、烟碱、苯酚、硬脂酸盐、丙酮等都可以作为 SRB 生长的底物<sup>[26]</sup>。不同的 SRB 将这些有机底物不完全氧化为乙酸,或者完全氧化为  $\text{CO}_2$ <sup>[27]</sup>。另外,在此类中某些 SRB 例如脱硫肠状菌属(*Desulfotomaculum reducens*)可以利用  $\text{Fe}^{3+}$  来代替  $\text{SO}_4^{2-}$  作为电子受体<sup>[28]</sup>。

此类 SRB 中以 *Desulfotomaculum* 属为代表,并可进一步分为 3 个类群:cluster I, II 和 III,其中大部分种都属于 *Desulfotomaculum* cluster I。*Desulfosporosinus orientis* 和 *Desulfotomaculum guttoideum* 的 16S rRNA 基因序列分别与梭菌属(*Clostridium*)和 *Desulfitobacterium* 属具有很高的相似性,因此被认为是两类新的革兰氏阳性嗜温 SRB,分别代表着 cluster II 和 cluster III<sup>[29,30]</sup>。

虽然这类 SRB 与革兰氏阴性嗜温 SRB 的生长环境比较相似,但由于能形成芽孢,其耐受高温、干燥和富氧的能力更强。另外,水稻土比较低的  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度,也有利于生长较为缓慢的 *Desulfotomaculum* 属 SRB 生存<sup>[18]</sup>。Widdel<sup>[26]</sup>等研究发现,水稻土总是处于有氧和无氧的交替之中,*Desulfotomaculum* 具有较强的适应能力而普遍存在于水稻土中。Stephan 等<sup>[31]</sup>通过检测水稻根际和非根际土壤中的革兰氏阳性嗜温 SRB 发现,所得到的 16S rRNA 基因序列都属于 *Desulfotomaculum* cluster I,说明此类革兰氏阳性 SRB 在水稻土壤中的广泛分布。rRNA 斑点杂交得出在水稻根际 *Desulfotomaculum* cluster I rRNA 含量大约占整个细菌的 1%,而在

水稻非根际土壤中大约为 0.55%。利用 real-time PCR 方法对水稻根际和非根际土壤中的 *Desulfotomaculum* cluster I 进行定量后得出,这类 SRB 分别为总细菌量的 0.5% 和 2%<sup>[32]</sup>。

### 2.3 嗜热 SRB 细菌

此类 SRB 主要以热脱硫杆菌属 (*Thermodesulfobacterium commune*)<sup>[33]</sup> 和热脱硫弧菌属 (*Thermodesulfovibrio yellowstonii*)<sup>[34]</sup> 为代表。这两个属的 SRB 都是从美国黄石国家公园的热泉中分离出来的,其生长温度大约为 65 ~ 70℃,介于革兰氏阳性细菌和嗜热 SRB 古菌之间。这两个属的 SRB 虽然具有相似的生理特性,但是基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析表明它们的进化距离较远<sup>[21,34]</sup>。这种情形与 *Desulfovibrio* 属一样,此属中不同 SRB 种之间的生理特性很相似,但是它们的分子进化距离较远。此外,嗜热 SRB 细菌和 *Desulfovibrio* 属的 SRB 能够利用的底物有限,且对乙酸进行的是不完全氧化。因此 Henry<sup>[34]</sup> 认为嗜热 SRB 细菌和 *Desulfovibrio* 属 SRB 可能在环境中发挥着同样的生态功能。在细菌的分子系统进化分析中,嗜热 SRB 细菌处于进化分枝最深处的位置,这也验证了所有细菌的祖先都是嗜热细菌的推断<sup>[35]</sup>。

### 2.4 嗜热 SRB 古菌

嗜热 SRB 古菌相较于其它几类 SRB 而言最大的特点是其最适生长温度都在 80℃ 以上,到目前为止共得到 3 株分离自海底热泉的 SRB 古菌: *Archaeoglobus fulgidus*<sup>[36]</sup>, *Archaeoglobus profundus*<sup>[37]</sup> 和 *Archaeoglobus lithotrophicus*<sup>[38]</sup>,它们均属于古丸菌属。Stetter<sup>[39]</sup> 发现 *A. fulgidus* 能够产生少量的甲烷气体,具有产甲烷菌所特有的 F<sub>420</sub> 因子,四氢甲烷蝶呤(即 F<sub>342</sub> 因子)和甲烷呋喃。这被认为是硫酸盐还原菌和产甲烷菌之间进化关系的证明,即硫酸盐还原菌的祖先可能来自于产甲烷菌<sup>[35]</sup>。另外,通过对 *A. fulgidus* 16S 和 23S rRNA 基因序列的分子进化分析得出,它与硫还原古菌和硫氧化菌的进化距离反而没有与产甲烷菌的进化距离近<sup>[40]</sup>。Woese 等认为硫酸盐还原古菌是从产甲烷菌进化而来的<sup>[41]</sup>,因为产甲烷菌的划分依据除了能否产生甲烷,还包括其它重要的代谢特征,例如喜盐古菌和嗜热酸菌。此外,Wagner 等<sup>[42]</sup> 认为古菌和细菌拥有共同的祖先且具有硫酸盐还原酶的活性,或者硫酸盐还原酶基因在古菌和细菌域之间存在水平转移。*Archaeoglobus* 是古菌域中唯一能够还原硫酸盐的类群,但是它们是怎么获得硫酸盐还原的活性,至今尚未找到答案。1997 年, *A. fulgidus* 的全序列公布,这也是第一个发表的 SRB 全基因组序列<sup>[43]</sup>。

## 3 研究硫酸盐还原菌的分子生态学方法

众所周知,传统的微生物检测手段只能研究土壤中约 1% 的微生物种类,这大大阻碍了土壤微生物生态学研究步伐。分子生物学技术能够提供丰富的不可培养微生物的数量和活性信息,使全面了解和认识不同环境中微生物的结构和功能成为可能。这些研究技术主要包括:基于聚合酶链式反应(PCR)的分子标记技术如末端限制性片段长度多样性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、基因克隆文库分析法(clone library)、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、实时荧光定量 PCR(real-time PCR)和不依赖于 PCR 的核酸杂交技术如荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)。目前,这些技术已经广泛应用于 SRB 的分子生态学研究中去,将环境微生物领域的研究带入一个革命性的新时代。在实际应用中为获得更加准确的检测结果,常常将两种或多种技术结合起来相互补充、相互印证。

### 3.1 T-RFLP 和克隆文库技术

T-RFLP 即末端标记限制性片段长度多态性,是一种全新、快速、有效的微生物群落结构分析方法。T-RFLP 采用一端荧光标记的引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经限制性内切酶消化后,消化产物以 DNA 测序仪进行分离,通过激光扫描,得到荧光标记端片段的图谱<sup>[44]</sup>。图谱中波峰的多少表明了群落结构的复杂程度,峰面积的大小代表了相应群落的相对数量。与其它分子技术相比,它的优点是能够迅速产生大量重复且精确的数据,用于微生物群落结构的时空演替研究;而且其精确度和分辨率都要高于其它方法产生的图谱。但是,T-RFLP 仅提供微生物的种类和相对数量的信息,还无法确定是何种微生物。因此,通常结合克隆文库测序分析,达到确定微生物种类的目的。Scheid 等<sup>[24]</sup> 以基于 16S rDNA 的 T-RFLP 技术为主,辅以构建克隆文库为手段研究了水稻根际和非根际土壤中革兰氏阴性 SRB 在不同生长期的群落结构变化。Schmalenberger 等<sup>[45]</sup> 利

用基于异化亚硫酸盐还原酶基因 (dissimilatory (bi) sulfite reductase, *dsrAB*) 的 T-RFLP 技术分析了酸性沼泽地 0 ~ 50 cm 深度梯度下 SRB 群落结构的变化趋势。

### 3.2 DGGE 技术

DGGE 的原理是根据含有不同序列的 DNA 片段在具有变性剂梯度或温度梯度的凝胶上由于其解链行为的不同而导致迁移率的不同。此种方法灵敏度非常高,能将仅有 1 个碱基差异的 DNA 片段分开<sup>[46]</sup>。自 1993 年 Muyzer<sup>[47]</sup> 等将 DGGE 的方法应用于微生物生态学研究以来,DGGE 迅速成为一种简便而有效的分子生物学研究手段。Miletto<sup>[48]</sup> 等使用 DGGE 技术对不同类型土壤的 SRB 进行研究,且对 DGGE 的技术条件进行了优化,辅以建立克隆文库的方法对 DGGE 的结果进行验证,结果发现两种分子生物学技术具有很好的可比性,DGGE 是一种有效的揭示 SRB 群落结构的分子生物学方法。目前,DGGE 技术已经广泛用于研究海底沉积物<sup>[49]</sup>、含水土层<sup>[50]</sup>、湖泊<sup>[51]</sup> 等环境的 SRB 研究中去,还未见到其应用于水稻土 SRB 研究的报道。DGGE 技术也存在一定的局限性。例如,Vallaey<sup>[52]</sup> 等发现 DGGE 方法并不能对样品中所有的 DNA 片段进行分离。Muyzer<sup>[46]</sup> 等通过试验得出 DGGE 只能对微生物群落中数量上大于 1% 的优势种群进行分析。

### 3.3 Real-time PCR 技术

从环境中获得 SRB 群落数量信息对于研究 SRB 的活性强度和生态意义具有重要的意义。过去,普遍采用传统的依赖于可培养的方法对环境样品中的 SRB 进行定量,比如最大可能数法 (most probable number, MPN)<sup>[16,18]</sup>。然而,这种方法非常耗时,而且由于环境中大部分 SRB 为不可培养微生物,MPN 法往往过低的估计样品中 SRB 的数量<sup>[53]</sup>。实时荧光定量 PCR 在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 的进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析<sup>[54]</sup>。目前对 SRB 的定量大多借助于 Real-time PCR 技术。Stubner<sup>[25,32]</sup> 用此技术定量分析了水稻土壤中 3 个主要的革兰氏阴性 SRB 种群 *Desulfobacteraceae* 科、*Desulfovibrionaceae* 科和 *Desulfobulbus* sp. 的组成以及革兰氏阳性 SRB *Desulfotomaculum* 属的丰度。其结果与基于 16S rRNA 的斑点杂交结果<sup>[24,31]</sup> 相吻合,再次印证了 Real-time PCR 是一种灵敏的微生物种群定量技术。刘新展<sup>[55]</sup> 等使用 Real-time PCR 分析了冬夏两个季节不同施肥处理下水稻土壤中的 SRB 群落丰度,结果发现,不同施肥处理下水稻土壤中 SRB 并没有显著性差异。冬季平均每克干土 *dsrAB* 基因拷贝数为  $5.08 \times 10^8$ ,夏季平均每克干土 *dsrAB* 基因拷贝数为  $5.92 \times 10^8$ 。

### 3.4 FISH 技术

FISH 技术主要以微生物 16S rRNA 基因作为鉴别微生物的标志物,设计并合成荧光探针,直接与环境样品中微生物 16S rRNA 基因上的目标特异性片段进行杂交反应,激发荧光信号对目标微生物进行观察和计数。该方法的特点是能直观、准确地得到目标微生物的原位数量和空间分布信息,探测微生物群落结构和生物多样性,监测微生物群落动态变化<sup>[56]</sup>。FISH 技术结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性,是各种分子标记技术的有益补充,已经被广泛应用于微生物生态学的研究领域中。在不同环境中硫酸盐还原菌群落结构的研究中也是一种非常有力的手段,被众多研究者所青睐。Detmers 等<sup>[57]</sup> 利用 FISH 技术对德国煤矿 GarzweilerI 附近的土层微生物群落分析得出,*Desulfotomaculum* 属是优势的硫酸盐还原菌群,约占整个群落数量的 2.5%。Purdy 等<sup>[58]</sup> 使用 SRB 特异性探针研究淡水和海水沉积物中 SRB 类群时发现,在低  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度 ( $0.1 \sim 2.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的淡水沉积物中,只能检测到 *Desulfobulbus* 属和 *Desulfobacterium* 属,并且只占整个微生物群落结构很小部分,大约 1.6%;而在海水沉积物中,SRB 群落更为多样,并且数量能够达到整个微生物群落的 10% ~ 11.4%。但是目前利用此技术来研究水稻土壤中 SRB 原位空间分布和丰度变化还未见报道,因此这是一个有待于发掘的广阔空间。

## 4 展望

水稻土壤是典型的淡水环境模式体系。水稻土壤中硫酸盐还原菌不仅与土壤中硫素的转化及其利用有着直接的关系,而且与 N、Mn、Fe 和 C 循环的微生物功能群如硝酸盐还原菌、锰还原菌、铁还原菌和产甲烷菌有着密切的竞争关系。研究水稻土壤中的硫酸盐还原菌的生态结构和生态机制,可以有效地保护土壤的肥

力,阐明不同土壤微生物功能群之间的协作机制,维持水稻土壤生态系统的稳定。因此基于对国内外此领域的研究工作加以总结后得出,今后需要重点加强以下研究:

(1) 目前对于水稻土壤中硫酸盐还原过程及其相关的 C、N、Fe 元素的循环过程都还是停留在描述性的阶段,究其原因是能够分离出来的可以培养的微生物还很少,阻碍了对单一微生物或主要微生物作用机制的深入研究,使我们不能确定到底这些微生物在土壤中究竟发挥着怎样的功能。因此应对传统的微生物学方法进行改善,结合现代分子生态学方法从水稻土壤中分离鉴定出更多的硫酸盐还原菌。

(2) 开展水稻土壤中硫酸盐还原菌系统的分子生态学研究,将影响水稻土壤中硫酸盐还原过程中的主要理化因子如  $\text{SO}_4^{2-}$  的浓度和底物(主要为乙酸和  $\text{H}_2$ )的含量等原位信息与 SRB 群落的组成联系起来,揭示特定 SRB 菌群生理特性。在分子水平上深入研究 SRB 对环境条件,如温度、pH 及施肥等农业管理措施变化的响应,阐述生态结构变化与环境因素改变之间的相互关系,从而对环境变化进行预警。

(3) 研究水稻土壤中硫酸盐还原过程和 N、Mn、Fe 和 C 循环过程的联系和相互制约关系,以及 SRB 和土壤其它重要功能菌群如硝酸盐还原菌、锰还原菌、铁还原菌和产甲烷菌之间的协作、竞争关系,阐明不同微生物功能菌群之间的生态结构和调节机制。

#### Reference:

- [ 1 ] Liesack W, Schnell S, Revsbech N P. Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(5): 625—645.
- [ 2 ] Zheng Y, Zhang L M, Zheng Y M, Di H J, He J Z. Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices. *Journal of Soils and Sediments*, 2008, 8(6): 406—414.
- [ 3 ] He J Z, Zhang L M. Advances in ammonia-oxidizing microorganisms and global nitrogen cycle. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(1): 406—415.
- [ 4 ] Freney J R, Jacq V A, Baldensperger J F. The significance of biological sulfate cycle in rice production. In: Dommergues Y D, Diem H G eds. *Microbiology of tropical soils and plant productivity*. Hague: Martinus Nijhoff/W Junk Pub, 1982.
- [ 5 ] Kertesz M A, Mirleau P. The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(404): 1939—1945.
- [ 6 ] Shibata A, Toyota K, Miyake K, Katayama A. Anaerobic biodegradation of 4-alkylphenols in a paddy soil microcosm supplemented with nitrate. *Chemosphere*, 2007, 68(11): 2096—2103.
- [ 7 ] Yang S Y, Yoshida N, Baba D, Katayama A. Anaerobic biodegradation of biphenyl in various paddy soils and river sediment. *Chemosphere*, 2008, 71(2): 326—336.
- [ 8 ] Murase J, Kimura M. Methane production and its fate in paddy fields: VII. Electron acceptors responsible for anaerobic methane oxidation. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1994, 40(4): 647—654.
- [ 9 ] Lefroy R D B, Mamaril C P, Blair G J, Gonzales P B. Sulfur cycling in wetlands. In: Howarth R W, Stewart J W B, Ivanov M V eds. *Sulfur cycling in the Continents*. New York: John Wiley and Sons, 1992.
- [ 10 ] Jacq V A, Prade K, Ottow J C G. Iron sulphide accumulation in the rhizosphere of wetland rice (*Oryza sativa* L.) activities. In: Berthelin ed. *Diversity of Environmental Biogeochemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1991.
- [ 11 ] Barton L L. Metabolism of nitrogen and sulfur. In: Barton L L ed. *Structural and functional relationships in prokaryotes*. Amsterdam: Elsevier, 2005.
- [ 12 ] Yao H, Wassmann R, Neue H U. Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen paddy soils from China, the Philippines and Italy. *Biogeochemistry*, 1999, 47(3): 269—295.
- [ 13 ] Wind T, Conrad R. Localization of sulfate reduction in planted and unplanted rice soil. *Biogeochemistry*, 1997, 37(3): 253—278.
- [ 14 ] Stubner S, Wind T, Conrad R. Sulfur oxidation in rice field soil: Activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 1998, 21(4): 569—578.
- [ 15 ] Revsbech N P, Pedersen O, Reichardt W, Briones A. Microsensor analysis of oxygen and pH in the rice rhizosphere under field and laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29(4): 379—385.
- [ 16 ] Wind T, Conrad R. Sulfur compounds, potential turnover of sulfate and thiosulfate, and numbers of sulfate-reducing bacteria in planted and unplanted paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 18(4): 257—266.
- [ 17 ] Ouattara A S, Jacq V A. Characterization of sulfate-reducing bacteria isolated from Senegal rice fields. *FEMS Microbiology Ecology*, 1992, 101(3): 217—228.
- [ 18 ] Wind T, Stubner S, Conrad R. Sulfate-reducing bacteria in rice field soil and on rice roots. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, 22(2):

269—279.

- [19] Waschutza S, Hofmann N, Niermann, E G, Fendrik L. Investigations on root exudates of Korean rice. *Symbiosis*, 1992, 13(1-3): 181—189.
- [20] Odom J M, Singleton R Jr. The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives. New York: Springer-Verlag, 1992.
- [21] Castro H F, Williams N H, Ogram A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31(1): 1—9.
- [22] Stackebrandt E, Stahl D A, Devereux R. Taxonomic relationships. In: Barton L L ed. Sulfate-reducing bacteria. New York: Plenum Press, 1995.
- [23] Widdel F, Bak F. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: Balows A, Truper H G., Dworkin M, Harder W, Schleifer K H eds. The Prokaryotes. New York: Springer Verlag, 1992.
- [24] Scheid D, Stubner S. Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36(2-3): 175—183.
- [25] Stubner S. Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 57(2): 219—230.
- [26] Widdel F. The genus *Desulfotomaculum*. In: Balows A, Truper H G, Dworkin M, Harder W, Schleifer K H eds. The Prokaryotes. New York: Springer, 1992.
- [27] Fauque G D. Ecology of sulfate-reducing bacteria. In Barton L L ed. Sulfate-reducing Bacteria. New York: Plenum Press, 1995.
- [28] Tebo B M, Obraztsova, A Y. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 162(1): 193—198.
- [29] Stackebrandt E, Sproer C, Rainey F A, Burghardt J, Pauker O, Hippe H. Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: Evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47(4): 1134—1139.
- [30] Kuever J, Rainey F A, Hippe H. Description of *Desulfotomaculum* sp. Groll as *Desulfotomaculum gibsoniae* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49: 1801—1808.
- [31] Stubner S, Meuser K. Detection of *Desulfotomaculum* in an Italian rice paddy soil by 16S ribosomal nucleic acid analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 34(1): 73—80.
- [32] Stubner S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen™ detection. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50(2): 155—164.
- [33] Zeikus J G, Dawson M A, Thompson T E, Ingvorsen K, Hatchikian E C. Microbial ecology of volcanic sulphidogenesis: isolation and characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov.. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1983, 129: 1159—1169.
- [34] Henry E A, Devereux R, Maki J S, Gilmour C C, Woese C R, Mandelco L, Schauder R, Remsen C C, Mitchell R. Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium *Thermodesulfobacterium yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to *Thermodesulfobacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain. *Archives Microbiology*, 1994, 161(1): 62—69.
- [35] Achenbach-Richter L, Cpta R, Stetter K O, Woese C R. Were the original eubacteria thermophiles? *Systematic and Applied Microbiology*, 1987, 9: 34—39.
- [36] Stetter K O. *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov. a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 1988, 10: 172—173.
- [37] Burggraf S, Jannasch H W, Nicolaus B, Stetter K O. *Archaeoglobus profundus* sp. Nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 1990, 13: 24—28.
- [38] Stetter K O, Huber R, Blochl E, Kurr M, Eden R D, Fielder M, Cash H, Vance I. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature*, 1993, 365(6448): 743—745.
- [39] Stetter K O, Lauerer G, Thomm M, Neuner A. Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: Evidence for a novel branch of archaeobacteria. *Science*, 1987, 236: 822—824.
- [40] Achenbach-Richter L, Stetter K O, Woese C R. A possible biochemical missing link among archaeobacteria. *Nature*, 1987, 327: 348—349.
- [41] Woese C R, Achenbach L, Rouviere P, Mandelco L. Archaeal phylogeny: reexamination of the phylogenetic position of *Archaeoglobus fulgidus* in light of certain composition-induced artifacts. *Systematic and Applied Microbiology*, 1991, 14(4): 364—371.
- [42] Wagner M A, Roger J, Flax J L, Brusseau G A, Stahl D A. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *The Journal of Bacteriology*, 1998, 180(11): 2975—2982.
- [43] Klenk H P, Clayton R, Tomb J F, White O, Nelson K E, Ketchum K A, Dodson R J, Gwinn M, Hickey E K, Peterson J D, Richardson D L, Kerlavage A R, Graham D E, Kyrpides N C, Fleischmann R D, Quackenbush J, Lee N H, Sutton G G, Gill S, Kirkness E F, Dougherty B A, McKenney K, Adams M D, Loftus B, Venter J C. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, 1997, 390(6658): 364—370.

- [44] Marsh T L. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplicons. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 323 — 327.
- [45] Schmalenberger A, Drake H L, Kusel K. High unique diversity of sulfate-reducing prokaryotes characterized in a depth gradient in an acidic fen. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(5): 1317 — 1328.
- [46] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 317 — 322.
- [47] Muyzer G, De Wall E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695 — 700.
- [48] Miletto M, Bodelier P L E, Laanbroek H J. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(1): 103 — 111.
- [49] Leloup J, Fossing H, Kohls K, Holmkvist L, Borowski C, Jorgensen B B. Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation. *Environmental Microbiology*, 2009, doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01855.x.
- [50] Geets J, Borremans B, Diels L, Springael D, Vangronsveld J, Van der Lelie D, Vanbroekhoven K. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66(2): 194 — 205.
- [51] Foti M, Sorokin D Y, Lomans B, Mussman M, Zacharova E E, Pimenov N V, Kuenen J G, Muyzer G. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(7): 2093 — 2100.
- [52] Vakkaeys T, Topp E, Muyzer G, Macheret V, Laguerre G, Rigaud A, Soulas G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rRNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 24(3): 279 — 285.
- [53] Hsieh Y P, Yang C H, Feng J. Sulfate reduction and a molybdate-induced soluble nitrogen flush in sediment during incubation. *Soil Biology & Biochemistry*, 1998, 30(13): 1799 — 1804.
- [54] Heid C A, Stevens J, Livak K J, Williams P M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 1996, 6(10): 986 — 994.
- [55] Liu X Z, Zhang L M, Prosser I J, He J Z. Abundance and community structure of sulfate reducing prokaryotes in a paddy soil of southern China under different fertilization regimes. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, doi:10.1016/j.soilbio.2009.01.001.
- [56] Delong E F, Wickham G S, Pace N R. Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science*, 1989, 243(4896): 1360 — 1363.
- [57] Detmers J, Strauss H, Schulte U, Bergmann A, Knittel K, Kuever J. FISH shows that *Desulfotomaculum* spp. are the dominating sulfate-reducing bacteria in a pristine aquifer. *Microbial Ecology*, 2004, 47(3): 236 — 242.
- [58] Purdy K J, Nedwell D B, Embley T M, Takii S. Use of 16S rRNA -targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36(2-3): 165 — 168.

#### 参考文献:

- [3] 贺纪正, 张丽梅. 氨氧化微生物生态学与氮循环研究进展. *生态学报*, 2009, 29(1): 406 ~ 415.