

海洋二甲基硫产生菌及其功能基因研究进展

李立 汪鹏 彭梦珺 李友国

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 二甲基硫(DMS, dimethyl sulfide)是海洋排放的占优势地位的生源硫气体,其在大气中的氧化产物能够引起环境酸化和气候变化,因而 DMS 已成为全球气候变化研究的热点之一。二甲基巯基丙酸内盐(DMSP, dimethylsulfoniopropionate)是 DMS 形成的主要前体,该化合物在海洋环境中广泛存在,它是很多浮游植物以及少数陆地被子植物中的可溶性溶质。本文综述了驱动海洋 DMS 产生的微生物类群;总结了最新报道的 6 个 DMS 产生相关功能基因,即 *dddD*、*dddL*、*dddP*、*dddQ*、*dddY*、*dddW*,介绍了它们编码的蛋白质功能及活性特征。最后,对红树林生境中 DMS 产微生物、相关功能基因时空分布等研究动态进行了简介。

关键词 二甲基硫;二甲基巯基丙酸内盐;DMS 产微生物;*ddd* 基因;红树林生态系统

中图分类号 Q 939.9; X 172 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)05-0020-09

二甲基硫(dimethylsulfide, DMS, 分子式为 CH_3SCH_3)是海水中最重要、含量最丰富的还原态挥发性生源有机硫化物。海水中 DMS 主要来源于海洋浮游植物,并由浮游植物释放出来进入海水中。表层海水中的 DMS 处于高度过饱和状态,能以很高的通量($0.6 \times 10^{12} \sim 1.6 \times 10^{12}$ mol/a)穿过海—气界面进入大气,DMS 占海洋中硫释放量的 55%~80%,占全球天然硫排放源的 50%以上。因此,DMS 被认为是在全球硫循环中连接大气与海洋之间的“缺失环节”^[1]。

海洋中 DMS 的重要性在于 DMS 排放与气候变化之间可能存在的负反馈过程。1987 年,Charlson 等^[2]描述这一过程:高通量的 DMS 进入大气后被氧化,其氧化物形成气溶胶,增加了云凝结核(CCN)的数量;CCN 的增加提高了云层反射率,使全球热量收入减少,从而消减了温室效应的作用。Andreae^[3]认为,如果 DMS 的通量变化 1 倍,全球的平均温度将会变化几摄氏度。研究表明,海洋 DMS 的浓度跟太阳辐射量呈正相关^[4],支持了“辐射量增加使得海水温度升高从而导致 DMS 释放量增加”的说法。另外,DMS 衍生的气溶胶是 CNN 的重要源头,尤其在远离陆地海洋的大气中^[4]。

DMS 与气候变化的问题密切相关,因而成为全球气候变化研究的热点之一。

1 DMS 形成的重要前体物 DMSP

海洋是 DMS 最重要的释放源,大约 80% 的 DMS 来自海洋,还有 20% 的 DMS 来自盐沼地、河口和湿地^[5]。而二甲基巯基丙酸内盐(dimethylsulfoniopropionate, DMSP, 分子式 $(\text{CH}_3)_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$)是海洋中 DMS 形成最重要的来源和前体。DMSP 由海洋中的一些浮游植物、藻类和海岸盐生植物等产生。一些藻类细胞中能聚集 DMSP,浓度可高达几百 mmol/L,一些盐生植物如大米草也含有较高浓度的 DMSP^[6]。DMSP 可作为细胞内渗透压调节剂,便于生物在不利的渗透压条件下减少对含氮渗透压调节剂的吸收,促进生物生长^[7-8]。DMSP 还可作为抗氧化剂或者低温下的冷冻保护剂^[9]。DMSP 是海洋中的重要碳源、硫源,其浓度对 DMS 释放量具有重大影响。一旦 DMSP 释放到环境中,很快就会被微生物降解,值得注意的是,一部分微生物能降解 DMSP 产生 DMS,由微生物介导 DMSP 转化产生的 DMS 占据海洋 DMS 总产量的 90%以上。

收稿日期: 2012-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870448)、教育部留学回国人员启动基金项目和华中农业大学人才启动费资助项目(2005XRC026)

李立, 硕士。研究方向: 土壤及环境微生物。E-mail: ll19880519@yahoo. cn

通讯作者: 李友国, 博士, 教授。研究方向: 生物固氮、土壤及环境微生物。E-mail: youguoli@mail. hzau. edu. cn

2 微生物驱动 DMSP 代谢产生 DMS

全球每年转化大约 10 亿 t DMSP, 而 DMSP 的降解有 2 条途径, 主要由微生物驱动^[10]。途径一是去甲基化途径^[11], 不产生 DMS。即 DMSP 在酶蛋白 DmdA 等作用下分解为甲硫醇, 从而进入包含这条途径的细菌的中心代谢。途径二是 DMS 产生途径, 其一是在 DMSP 裂解酶的作用下, DMSP 裂解产生 DMS、丙烯酸和 1 个质子^[12]。目前在此途径中鉴定出的关键酶编码基因为: *dddL*, *dddP*, *dddQ*, *dddY*, *dddW*; 其二是在乙酰辅酶 A 转移酶 DddD 的作用下, DMSP 被降解并产生 DMS 和 3-羟基丙酸^[10]。有意思的是, 研究表明有些细菌至少存在 2 种不同的途径用于分解代谢 DMSP^[9]。

近年来, 科学工作者利用纯培养技术, 从海洋和盐沼地等环境分离获得多株能够降解 DMSP 并产生 DMS 的细菌, 称为具有 Ddd⁺ (DMSP-dependent DMS production) 表型的微生物。例如, de-Souza 等^[13] 从盐沼地沉积物中分离得到 *Alcaligenes faecalis* M3A, Ledyard 等^[14] 从马尾藻海海水中分离得到 *Roseobacter* sp. LFP。目前已知的 Ddd⁺ 微生物种类多样, 然而绝大多数属于变形菌纲细菌, 这些菌

株主要来自 α -变形菌纲的玫瑰杆菌属 (*Roseobacter*) 和红杆菌属 (*Rhodobacter*), β -变性菌纲的产碱菌属 (*Alcaligenes*), γ -变形菌纲的海洋单胞菌属 (*Mariomonas*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*), ϵ -变形菌纲的弓形杆菌属 (*Archobacter*) 和 δ -变形菌纲的脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)。玫瑰杆菌属细菌在海水中广泛存在, 河口水体中的微生物经 16S rRNA 基因检测表明玫瑰杆菌属细菌占了 30%^[15]。研究者从珊瑚中分离得到的细菌, 分别来自 *Spongiobacter*, *Arhodomonas*, *Idiomarina* 等属, 气相色谱和核磁共振结果表明, 这些细菌也能降解 DMSP 产生 DMS^[16]。令人吃惊的是, Kirkwood 等^[17] 发现, 曲霉 (*Aspergillus*) 和镰刀霉 (*Fusarium*) 的部分菌株同样也能够降解 DMSP 产生 DMS。

3 DMS 产生途径中的关键功能基因

目前, 在 Ddd⁺ 细菌中发现和鉴定出 6 个关键功能基因: *dddD*、*dddL*、*dddP*、*dddQ*、*dddY*、*dddW*, 它们分别通过不同的途径催化 DMSP 裂解产生气体 DMS。分别总结和介绍如下 (表 1)。

表 1 直接作用于 DMSP 的酶蛋白

Table 1 Enzymes that act directly on dimethylsulphoniopropionate

酶蛋白 Enzymes	多肽分类 ¹⁾ Classification of peptides	分子质量/ku Molecular weight	裂解反应及产物 Degradation and product	分布 Distribution	其他特点 Other features
DddD	Class III 乙酰辅酶 A 转移酶家族 (COG1804)	93	裂解 DMSP, 生成 DMS 和 3-HP (3-羟基丙酸)	零散分布在 α 、 β -变形菌纲细菌中, 较多地存在于 γ -变形菌纲细菌中	含有 1 个串联重复的 Class III 乙酰辅酶 A 转移酶结构域, 与相关的 <i>ddd</i> 、 <i>acu</i> 等基因聚在一起形成基因簇
DddP	M24B 脯氨酰氨基肽酶金属酶家族 (COG0006)	50	裂解 DMSP, 生成 DMS 和丙烯酸	主要分布在玫瑰杆菌属细菌中, 也存在于“ <i>Candidatus Puniceispirillum marinum</i> str. IMCC1322”、“ <i>Oceanimonas doudoroffii</i> ”以及一些子囊真菌中	纯化后的 DddP 蛋白有 DMSP 裂解酶活性, 但是没有金属辅助因子
DddL	未知	26	裂解 DMSP, 生成 DMS 和丙烯酸	分布在海洋 α -变形菌纲细菌中, 主要是玫瑰杆菌属细菌	预测其羧基端含有 1 个 cupin-pocket 结构域
DddQ	未知	22	裂解 DMSP, 生成 DMS 和丙烯酸	仅分布在玫瑰杆菌属细菌中	预测其羧基端含有 1 个 cupin-pocket 结构域
DddW	未知	16	裂解 DMSP, 生成 DMS 和丙烯酸	仅分布在玫瑰杆菌属细菌中, 且仅在 2 株菌株中出现	预测其羧基端含有 1 个 cupin-pocket 结构域
DddY	未知	46 (成熟蛋白: 43 ku)	裂解 DMSP, 生成 DMS 和丙烯酸	零散分布在 β 、 γ 、 δ 、 ϵ -变形菌纲细菌中	该蛋白为含有一段 N 端信号肽的周质酶; 参与利用 DMSP 为唯一碳源的相关基因聚集在一起, 且常与编码细胞色素的基因相邻

1) 数据来自 COGs Data from cluster of orthologous groups of proteins (COGs)。

3.1 *dddL* 介导的 DMS 产生途径及 DddL 蛋白

几十年来,一直被广泛接受的依赖 DMSP 的 DMS 产生途径是:DMSP 在 1 种“DMSP 裂解酶”的作用下,释放 DMS、丙烯酸和质子,但是有关的功能基因一直未得到分离鉴定。Curson 等^[18]首次克隆和鉴定出“DMSP 裂解酶”编码基因——*dddL*。*dddL* 是从几株海洋红杆菌属细菌中发现的新基因,其编码产物 DddL 蛋白具有 DMSP 裂解酶的特性。DddL 蛋白,出现在红杆菌科不同种属的某些细菌或者相关的海洋 α -变形菌纲橙单胞菌科细菌中。最初从 *Sulfitobacter* EE-36 中克隆获得了 *dddL* 基因,其 DddL 多肽序列被用来预测其他 DMS 产生菌株,而这些菌株往往是未曾预料具有此能力的。*dddL* 在红杆菌科的个体菌株中零星出现,可能是因为它存在于这些进化枝的祖先中,但随后被大部分细菌丢失。

据推断^[18],*Sulfitobacter* EE-36 的 DddL 多肽具有 223 个残基,相对分子质量为 24 714,等电点 8.3。Blast 检索,没有发现与 DddL 有明显的序列相似性的已知功能多肽($e\text{-value} < e^{-10}$)。使用软件“Phyre”和“HHpred”分析发现,除了 1 个假定的跨膜结构域之外,DddL 没有明显的功能区域。与 DddL 相似度较高的蛋白质,是存在于其他菌株(大部分属于红杆菌科细菌)中的假想多肽。因此,DddL 属于一种新型酶家族,它是其中的第 1 个已知功能的多肽,从而引起了人们很大的兴趣。DddL 的作用机制还不清楚,例如是否需要任何辅因子,或者是以单体、二聚体还是三聚体的形式起作用。这些研究涉及到纯化的 DddL 蛋白。体外研究结果证实,DddL 不仅仅是 DMSP 裂解酶,还可能具有其他功能。由于在含 *dddL* 基因的大肠杆菌中,DddL 似乎能以某种方式促进依赖 DMSP 的丙烯酸形成。研究者推断,包含 *dddL* 的菌株也许不仅仅是将 DMS 作为营养物质,更多的是将 DMS 和丙烯酸作为信号分子,为防御或诱引之用。

3.2 *dddD* 介导的 DMS 产生途径及 DddD 蛋白

这是一种完全不同的 DMS 产生机制,*dddD* 基因的编码产物——DddD 是另一种形式的“DMSP 裂解酶”。*dddD* 和 *dddL* 在微生物驱动 DMS 释放过程中所起的不同作用,可能解释了之前的关于“DMSP 裂解酶”在不同细菌中具有不同特性的发现和报道^[6]。

dddD 基因首次从海洋单胞菌 MWYL1 中分离获得^[10]。MWYL1 菌株分离自产 DMSP 的被子植物大米草根际土壤。*dddD* 基因的相关研究结果令人印象深刻,体现在如下几个方面。第一,仅需导入 *dddD* 1 个基因,在载体启动子下的控制下表达,就可以完全赋予大肠杆菌 Ddd⁺ 表型;第二,DddD 并不是研究者长期以来推定存在并一直寻找的 DMSP 裂解酶。DddD 的最高同源物是大肠杆菌的 CaiB 蛋白,其功能已知,它编码 1 个 Class III 乙酰辅酶 A 转移酶。在厌氧条件下,CaiB 作为末端电子受体时,CaiB 能够将乙酰辅酶 A 转移到肉碱上。CaiB 是同源二聚体,值得注意的是,DddD 大约是 CaiB 大小的 2 倍,且有 1 个连续重复区域结构,因而可能形成 1 个“分子内二聚体”。因此,研究者推测 DddD 可以添加部分乙酰辅酶 A 分子到 DMSP,同 CaiB 的催化功能类似,从而引发随后的 DMSP 裂解和 DMS 释放^[10]。第三,DddD 的同源物出现在 *Silicibacter pomeroyi* DSS-3 和 *Sagittula stellata* E37 中。这 2 株细菌都属于变形菌门,虽亲缘关系较远,它们也具有 Ddd⁺ 表型。第四,更令人惊叹的是,DddD 的同源物存在于 2 株陆生细菌中,它们从未被报道过与 DMSP 代谢有联系,但值得注意的是,这 2 株细菌都与高等植物发生相互作用。其中 1 个是根瘤菌 NGR234,是 1 种可形成固氮共生体的 α -变形菌纲细菌。另外 1 个是 β -变形菌纲细菌 *Burkholderia cepacia* AMMD,是被子植物根际微生物的 1 个普遍成员。当 NGR234 和 AMMD(其余缺乏 *dddD* 的 *Rhizobium* 和 *Burkholderia* 菌株除外)受到底物 DMSP 诱导时,可检测到 DMS 的释放。但这 2 株细菌都不能完全利用 DMSP 生长,即它们不能以 DMSP 作为唯一碳源。

就分类学角度来看,DddD 的同源物分布在不同的世系中(即 α -、 β -、 γ -变形菌纲细菌中),这强烈暗示着 *dddD* 是辅助基因库的一部分,在亲缘关系较远的菌株中可发生水平转移。有一些事实支持这一观点,如根瘤菌 NGR234 的 *dddD* 存在于 1 个大质粒上,而不是染色体上^[10]。同样,*dddD* 零星随机出现于某一些细菌中,但它们并不是亲缘关系密切的菌株。例如 2 株全基因组测序的细菌,在 *S. pomeroyi* DSS-3 中存在 *dddD* 基因,但其亲缘关系十分密切的菌株 TM1040 中却没有 *dddD* 基因。

3.3 dddP 介导的 DMS 产生途径及 DddP 蛋白

dddP 基因是 2009 年发现的与 Ddd^+ 表型相关的特异性基因。在已知细菌中, *dddP* 多存在于红杆菌科的玫瑰杆菌属 (*Roseobacter*) 细菌。这种细菌广泛存在于海洋和沿海水域, 而且其中许多细菌很具有代表性, 它们通过去甲基化途径催化 DMSP, 或者存在一条抑或多条产 DMS 的特异性机制^[19]。一些菌株不仅能将 DMSP 去甲基化利用而且能够产生 DMS^[11-20], *dddP* 的发现菌 *Roseovarius nubinhibens* ISM 正是如此, 除了通过 ISM_00170 基因产物—DmdA 蛋白催化去甲基化途径, 另外还具有至少 2 条不同的 DMS 产生途径, 一条是此处论述的依赖 *dddP* 的 DMS 产生途径, 另外一条在之后的研究中得到了证实(依赖 *dddQ* 基因的 DMS 产生途径)^[21]。

据推测^[19-20], DddP 多肽分子质量为 50 ku, 很可能属于脯氨酰氨基肽酶金属酶家族(COG0006), 该家族的成员能切割氨基、亚氨基以及包含氨基的键。该家族中构成 M24 金属肽酶活性位点以及结合金属(通常为 Co, Zn 或 Mn)辅因子的 5 个残基, 均在 *R. nubinhibens* 的 DddP、其他微生物中的 DddP 同源物中处于保守。COG0006 家族庞大而且多样, 但是就目前而言, 很少将该家族的成员同其相应底物一起研究过, 而且这些底物并不都是多肽。例如肌酸酶, 它的结构同预测的 DddP 十分相似, 尽管一级结构仅有 20% 的相似性。因此, DddP 可能代表 M24 氨基肽酶的另外 1 个亚类群, 它能够作用于非肽底物(例如 DMSP)。然而, 现在依赖 DddP 的 DMSP 代谢相关机制并不清楚^[20-21]。以 *R. nubinhibens* 的 DddP 序列搜索微生物基因组数据库, 在一些海洋红杆菌科细菌中发现亲缘关系紧密的同源物(氨基酸水平上 > 75% 相似度), 它们不是具有 Ddd^+ 表型, 就是同已知的 Ddd^+ 菌株紧密相关^[20-21]。除此之外, 细菌中具有最大相似度的同源物(相似度 47%) 是百脉根中慢生根瘤菌 MAFF 303099 的 *mlr1214* 基因产物, 但是该菌株没有 Ddd^+ 表型。

令人吃惊的是, DddP 同源蛋白也存在于一些真菌的推测蛋白质组中。米曲霉 RIB40 和黄曲霉 NRRL3357 都含有同源基因(分别为 BAE62778, *asfl_08468*), 它们二者的蛋白产物相似度为 100%, 并且它们与 *R. nubinhibens* 的 DddP 相似度为

55%。然而, 构巢曲霉、黑曲霉以及烟曲霉的基因组缺少 *dddP* 基因。与此一致的是, 当米曲霉 RIB40 在基础培养基上生长时, 以蔗糖为碳源并添加 DMSP, 会产生 DMS, 但是构巢曲霉、黑曲霉则不能。尽管米曲霉 RIB40 能利用 DMSP 产生 DMS, 但其菌丝不能以 DMSP 作为唯一碳源生长。DddP 的同源蛋白同样也存在于镰刀霉 PH1 的推测蛋白质组中, 由基因 XP_389272 编码。另外, 镰刀霉 cc19、镰刀霉 Fu42 也具有 Ddd^+ 表型, 需添加 DMSP 以及蔗糖, 同米曲霉一样, 它们不能以 DMSP 为唯一碳源。

有关文献^[10, 22]描述过 *ddd* 基因的水平转移现象(HGT)。*dddD* 的紧密同源物出现在 α -、 β -、 γ -变形菌纲细菌中, 其中包括 2 种陆生细菌, 它们均与高等植物根部发生相互作用^[10]。与此相似的是, 包含 *dddP* 的真菌也与植物相互联系。因此, 对于产 DMSP 的植物来说, 具有 DMSP 代谢能力的微生物可能具有与植物互作的一种选择性优势, 例如互花米草根际的腐生型真菌^[22] 以及根际的根瘤菌^[10]。这种选择性优势的本质还需要进一步的研究。

3.4 dddQ 介导的 DMS 产生途径及 DddQ 蛋白

由于玫瑰杆菌属菌株 *R. nubinhibens* ISM 中 *dddP* 基因的插入突变并没有完全终止依赖 DMSP 的 DMS 产生(Ddd^+ 表型), 暗示着该菌株必定存在其他类型的 DMSP 裂解酶^[23]。2011 年, Todd 等^[24]的相关研究证实了这一推论, 他们报道了第 3 种 DMSP 裂解酶—即由 *R. nubinhibens* ISM 的 *dddQ* 基因编码, 这个基因也存在于其他的玫瑰杆菌属细菌中, 包括 *Ruegeria* (以前称为 *Silicibacter*) *pomeroiyi* DSS-3, 并且广泛分布于海洋细菌的宏基因组中^[25]。

DddQ 是一种 DMSP 裂解酶, 它能够将 DMSP 分解为丙烯酸和 DMS, 在这个意义上, 它同之前发现的 DddL^[18] 和 DddP 酶^[23] 并没有什么不同, 但它不同于 DddD, DddD 的最初代谢产物很可能是 DMS 和 3-羟基丙酸^[21]。然而, DddQ 同 DddP 并没有明显的家族相似性, DddP 是 M24 肽酶这个大家族的一员^[23-24]。值得注意的是, DddQ 和 DddL 都包含一些高度保守的氨基酸, 也就是结合金属的 cupin 模体 1、2^[21]。但是, 即使在这些保守区域中, 仍然有一些残基非常不同, 而且相比之下, DddL 中模体之间的距离要比 DddQ 小。另外, DddL 和 DddQ 的 N-末端没有明显的相似性, 不管是一级结

构还是预测的二级结构,因此认为 DddQ 和 DddL 处于不同的多肽家族,它们的 cupin 折层结构是分别独立进化的。

目前,仅在玫瑰杆菌属进化枝的相关细菌中发现了 DddQ,还没有在其他细菌中发现确定的同源物。DddQ 多肽的特征是,序列变化很大;*R. rubinhibens* ISM 的 2 个相邻基因分别编码了 DddQ1 和 DddQ2,它们之间只有 39% 的相似度。是否正是这些序列的不同进而加强了酶的特性,例如,不同的序列类型可能是为了适应不同的 pH,对 DMSP 底物具有不同的亲和力,又或者预测的 cupin 模体可能是对不同的过渡金属起作用,这一推测尚待证实。

目前,已有关于 *ddd* 基因在 GOS 和其他宏基因组数据库中多样性的报道^[26],关于其相应 mRNA 在宏转录组中的出现频率亦有报道^[27]。DddQ-type 酶存在的丰度几乎与 DddP 一样,迄今为止,DddP 是 GOS 数据库中出现频率最高的 Ddd 蛋白^[23]。这一数据表明,在自然环境中依赖 DMSP 产生 DMS 的反应体系中,DddQ 和 DddP 是最重要的 DMSP 裂解酶。

3.5 *dddY* 介导的 DMS 产生途径及 DddY 蛋白

早在 1995 年,De-Souza 等^[13]从生长有产 DMSP 能力的大米草的潮间带土壤中,分离获得 β -变形菌纲细菌—粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)M3A 菌株。2011 年,Andrew 等^[28]在该菌株中克隆和分离出第 5 个 DMS 产生的功能基因 *dddY*。粪产碱菌 M3A 能够以 DMSP 和丙烯酸为碳源,并可将 DMSP 转化为丙烯酸^[29],随后进一步转变为羟基丙酸。研究者分离纯化出了 *dddY* 所编码的 DMSP 裂解酶,并定位于细胞表面^[30-31],与其他处于细胞质中的 DMSP 裂解酶不同。在早期研究中,Yoch 实验室^[31]证实了 M3A 中 DMSP 代谢途径的 3 个特征:(1)DMSP 裂解发生在菌体细胞表面,而非细胞质内;(2)丙烯酸是 DMSP 代谢的中间产物,并将随后转化为 3-羟基丙酸;(3)依赖 DMSP 产生的 DMS 产量受 DMSP 底物的诱导,同时也接受一些中间代谢产物的诱导。Andrew 等^[28]近期的研究工作从基因水平上提供了对以上观察结果的 1 个科学解释。

根据 *dddY* 序列分析以及直接的检测实验,证实了 DddY 的确是 1 个细胞周质酶。除了其 N-末端的信号肽,它与已知功能的酶没有相似性,而且没有发现功能模体。因此,与 DddP、DddL、DddQ 所

催化的生化过程不同,DddY 肯定是通过另外的新颖机制将 DMSP 裂解为丙烯酸和 DMS^[28]。同其他 *ddd* 基因一样,*dddY* 似乎也是通过水平转移(HGT)在亲缘关系较远的相关世系中分布,因为在产碱菌属(*Alcaligenes*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、弓形杆菌属(*Arcobacter*)中均存在 *dddY* 紧密同源物(上述 3 个属分别是 β -、 γ -、 ϵ -变形细菌)。这些菌株相互之间亲缘关系比较远,这 3 个属的成员都与微氧环境相关。

含有 *dddY* 的细菌偏好微氧环境,这可能是造成目前已公布的海洋细菌宏基因组数据库中缺少 DddY 同源物的原因之一,由于海洋细菌代表的是海洋的好氧表层。海洋沉积物中生长着大量细菌,大约是地球上总数的 30%^[32]。DMSP 裂解酶 DddY,尽管在海洋表层中很稀少,但是在有些环境中是广泛存在的,特别是富含 DMSP 的地方,如大米草占主导地位的盐碱地。这些生态环境中微生物宏基因组的调查将会对这方面研究提供指导作用。目前,关于细菌 DMS 产量的基因研究中,令人印象最深刻的特征可能是基因的多样性,因为不同细菌中与此相关的酶和代谢途径也不尽相同。DddY 是第 1 个典型特征的 DMSP 裂解酶,早在 1995 年 De Souza 等^[13]就对其相应基因及酶的新颖性展开了研究。关于 DddY 后续的深入研究,首先应该注重从厌氧环境下其生态学的重要性到分子酶学活性的分析,从而阐明其催化机制,即揭示 DddY 未知功能域在裂解 DMSP 时所发挥的具体作用。

3.6 *dddW* 介导的 DMS 产生途径及 DddW 蛋白

Todd 等^[33]从 *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 菌株中发现了第 6 个 DMS 产生的功能基因 *dddW*,该基因是继 *dddP* 和 *dddQ* 之后,在 *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 中发现的第 3 个产 DMS 相关基因。它编码的酶蛋白与 DddL、DddP、DddQ、DddY 一样,均属于 DMSP 裂解酶,都能够裂解 DMSP,生成丙烯酸并释放 DMS。早在 2011 年,该基因就由 Rinta-Kanto 等^[34]在 *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 的基因芯片研究中发现,在 DMSP 诱导条件下,该基因转录水平提高了 37 倍。

对 *dddW* 的序列分析发现,该基因在环境中的分布是很少的。目前为止,只在另外 1 株玫瑰杆菌属细菌 *Roseobacter* sp. MED193 中发现了该基因的同源序列,相似性为 65%。在另外 2 株菌株

Rhodobacterales bacterium HTCC2083 和 *Citri-cella* sp. SE45 中,也发现了 2 条与之相似程度很低(仅为 40%)的序列。通过对 *dddW* 在 GOS 和宏基因组数据库中的分布情况进行研究,也没有发现与之相似性较高的序列。但是 *DddW* 的氨基酸序列分析表明,该蛋白含有 1 个广泛存在的 Cupin-pocket 模体结构,该结构存在于很多酶的活性位点^[35]。例如,*DddQ*、*DddL* 2 个酶,虽然分子质量大小和氨基酸序列都与 *DddW* 差异很大,但它们均含有 Cupin-pocket 模体结构。

Gonzalez 等^[36]观察到 *R. nubinhibens* ISM 和 *R. pomeroyi* DSS-3 都能够催化 DMSP,分别通过去甲基化途径和产 DMS 途径。有意思的是,这 2 个生物转化过程受环境因素的影响,当 DMSP 浓度较低时,去甲基化途径比较重要。这些现象就引出了 2 个重要科学问题,为什么同一株菌可在不同的环境下采用不同的代谢途径,以及它是通过何种机制实现这样的转变。*DddP*、*DddQ* 以及 *DddW* 的发现好像使得这些问题更加复杂了,因为这 2 株菌(其他的玫瑰杆菌属细菌也很有可能)拥有多种产 DMS 的途径,通过不同的基因和相应的酶而发挥作用。若要完全理解这些不同途径中的各个角色,则需要对其中的变化过程进行更详细的研究,包括环境变化,如 DMSP 底物浓度,其他硫源、碳源以及微量元素的可用性,还包括一些参数变化,如温度、生长速率、浓度等。

4 国内关于海洋 DMS(P)的相关研究及进展

从 20 世纪 90 年代开始,我国的研究人员就对海洋中的 DMS 浓度进行了测定。胡敏等^[37]研究了测定 DMS 释放量的方法,并调查了青岛海域 DMS 的释放量。杨桂朋研究团队^[38-41]对我国海洋中 DMS 和 DMSP 的存在量、时空分布、生产和消费速率以及影响因素进行了较为系统的调查,他们对胶州湾 DMS 浓度的调查结果显示,DMS 和 DMSP 的浓度呈现季节变化,高值出现在夏季。马奇菊等^[42]的调查显示,随着海水盐度从低到高,DMS 浓度先降低再升高,最高峰出现在河口位置。Jiao(焦念志)等^[43]于 1994—1998 年间,调查和研究了 DMS 及 DMSP 在我国胶州湾、芝罘湾、东海的分布状况及其影响因素,结果表明海洋中二者浓度都存在明

显的时空变化;地理分布规律为高值出现在沿岸海区和陆架海区,低值出现在外海;季节变化表现为高值出现在春季或夏季,低值出现在秋季。杨桂朋研究团队的调查以及焦念志等人的研究都表明叶绿素 a、光照、盐度、氮盐和 pH 会影响 DMS 和 DMSP 的浓度^[38-43],这与国外的研究结果相一致^[44-46]。

研究表明,海岸湿地生态系统是硫释放的主要来源之一,DMS 和 H₂S 是湿地释放的主要含硫气体,湿地系统释放硫通量一般比内陆土壤高 1 个或多个数量级^[47]。在耐盐耐淹的滨海植物如双头菊(*Wollastonia biflora*)、潮间带植物如大米草(*Spartina anglica*)和互花米草(*Spartina alterniflora*)等体内可大量合成 DMSP。另外,互花米草占优势的盐沼地单位面积释放 DMS 量显著高于一般海岸和海洋水域,这可能提示我们,在盐生植物密集生长的盐沼生态系统中存在大量的 DMS 产生菌^[48]。红树林作为热带海岸特有、硫循环活跃的湿地生态系统、营养丰富且具有密集生长的盐生植物,整体环境跟盐沼地相似,其释放 DMS 的通量也应该高于远海域。

近年来,笔者所在实验室采取纯培养技术与宏基因组相结合的方法,对红树林土壤中 DMS 产生细菌及 DMS 产生的相关功能基因的生态分布进行了研究。以海南文昌红树林土壤剖面(陆地—高潮带—潮间带—低潮带)采集的 29 个土壤样品为研究材料,筛选得到了 DMS 产生细菌,并且定量分析了它们产生 DMS 的能力。设计了细菌 DMS 产生的关键功能基因 *dddP* 的特异引物,并以 4 个地点红树林土壤 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,获得红树林土壤 *dddP* 基因,构建了 *dddP* 克隆文库,分析了红树林土壤中 *dddP* 的多样性及分布特点^[49-50]。结果表明,红树林土壤中确实存在 *Ddd*⁺ 细菌^[49-50],目前已知的大部分 *DddP* 细菌(*DddP* 型 *Ddd*⁺ 细菌)都存在其中,但更多的是未知的 *DddP* 细菌^[49]。系统发育树的分析显示,*dddP* 在红树林环境中广泛分布,不存在地域性。季节气候变化对红树林土壤 *dddP* 的类型和分布有影响,但影响强度小于其对红树林海水 *dddP* 的相应影响。在红树林土壤中,pH、有效硫含量、盐度和全氮含量对 *DddP* 细菌的分布具有重要影响^[49-50]。

5 展望

2007 年至今,*Ddd*⁺ 表型相关的功能基因陆续

发现,DMS 产生菌及功能基因的研究进展迅速,越来越引起人们的重视。目前虽已发现了 6 个 DMS 产生相关功能基因(*dddD*、*dddL*、*dddP*、*dddQ*、*dddY*、*dddW*),但仍有很多科学问题尚待解决。例如,这些不同的酶蛋白(DddD、DddL、DddP、DddQ、DddY、DddW)分别是如何作用的;包含这些蛋白的微生物又有哪些;在不同环境下,如海洋、珊瑚及盐碱地,这些酶蛋白对 DMSP 代谢产生的 DMS 通量有何贡献;在单一的菌株中,为何存在几种不同的 DMSP 代谢机制,这些机制之间是如何转换的,如 *R. pomeroyi* DSS-3 菌株可以通过去甲基化途径和产 DMS 途径催化 DMSP,并且在该菌株中也发现了能够介导 DMS 产生的酶蛋白—DddP、DddQ 以及 DddW^[51]。因此,对于 DMS 的相关研究才刚刚开始,后续研究将会为我们揭示 DMS 产生细菌是如何适应自然环境,以及它们对地球的主要元素(碳、硫)循环的影响。

参 考 文 献

- [1] LOMANS B P, VANDER-DRIFT C, POL A, et al. Microbial cycling of volatile organic sulfur compounds[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002, 59: 575-588.
- [2] CHARLSON R J, LOVELOCK J E, ANDERAE M O. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate[J]. Nature, 1987, 326: 655-661.
- [3] ANDERAE M O. Ocean-atmosphere interactions in the global biogeochemical sulfur cycle[J]. Marine Chemistry, 1990, 30: 1-29.
- [4] VALLINA S M, SIMÓ R, GASSÓ S. What controls CCN seasonality in the Southern Ocean? A statistical analysis based on satellite-derived chlorophyll and CCN and model-estimated OH radical and rainfall[J]. Global Biogeochem Cycles, 2006, 20: 1-13.
- [5] WATTS S F. The mass budgets of carbonyl sulfide, dimethylsulfide, carbon disulfide and hydrogen sulfide[J]. Atmospheric Environment, 2000, 34: 761-779.
- [6] YOCH D C. Dimethylsulfoniopropionate: its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 5804-5815.
- [7] SIMÓ R. Production of atmospheric sulfur by oceanic plankton: biogeochemical, ecological and evolutionary links[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2001, 16: 287-294.
- [8] SUNDA W, KIEBER D, KIENE R P, et al. An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae[J]. Nature, 2002, 418: 317-320.
- [9] GONZÁLEZ J M, JOHNSTON A W B, VILA-COSTA M, et al. Genetics and molecular features of bacterial dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and dimethylsulfide (DMS) transformations[M]//TIMMIS K N. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin: Springer-Verlag, 2010.
- [10] TODD J D, ROGERS R, LI Y G, et al. Structural and regulatory genes required to make the gas dimethyl sulfide in bacteria[J]. Science, 2007, 315: 666-669.
- [11] HOWARD E C, HENRIKSEN J R, BUCHAN A, et al. Bacterial taxa that limit sulfur flux from the ocean[J]. Science, 2006, 314: 649-652.
- [12] KETTLE AJ, ANDERAE M O. Flux of dimethylsulfide from the oceans: a comparison of updated data sets and flux models[J]. Journal of Geophysical Research, 2000, 105: 26793-26808.
- [13] DE-SOUZA M P, YOCH D C. Purification and characterization of dimethylsulfoniopropionate lyase from an *Alcaligenes*-like dimethyl sulfide-producing marine isolate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 21-26.
- [14] LEDYARD K M, DELONG E F, DACEY J W H. Characterization of a DMSP-degrading bacterial isolate from the Sargasso Sea[J]. Archives of Microbiology, 1993, 160: 312-318.
- [15] GONZÁLEZ J M, MORAN M A. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class proteobacteria in coastal seawater[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 4237-4242.
- [16] RAINA J, TAPIOLAS D, WILLIS B, et al. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75: 3492-3501.
- [17] KIRKWOOD M, TODD J D, RYPIEN K L. The opportunistic coral pathogen *Aspergillus sydowii* contains *dddP* and makes dimethyl sulfide from dimethylsulfoniopropionate[J]. International Society for Microbial Ecology, 2010, 4(1): 147-150.
- [18] CURSON A R J, ROGERS R, TODD J D, et al. Molecular genetic analysis of a dimethylsulphoniopropionate lyase that liberates the climate-changing gas dimethyl sulphide in several marine α -proteobacteria and *Rhodobacter sphaeroides* [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10: 757-767.
- [19] BUCHAN A, GONZÁLEZ J M, MORAN M A. Overview of the marine *Roseobacter* lineage[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71: 5665-5677.
- [20] GONZÁLEZ J M, KIENE R P, MORAN M A. Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the α -subclass of the class *Proteobacteria* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 3810-3819.
- [21] TODD J D, CURSON A R J, NIKOLAIDOU-KATSARAIDOU N, et al. Molecular dissection of bacterial acrylate catabolism—unexpected links with dimethylsulfoniopropionate catabolism and dimethyl sulfide production[J]. Environmental Micro-

- biology, 2010, 12: 327-343.
- [22] BACIC M K, NEWELL S Y, YOCH D C. Release of dimethylsulfide from dimethylsulfoniopropionate by plant-associated salt marsh fungi[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 1484-1489.
- [23] KIRKWOOD M, LE-BRUN N E, TODD J D, et al. The *dddP* gene of *Roseovarius nubinhibens* encodes a novel lyase that cleaves dimethylsulfoniopropionate into acrylate plus dimethyl sulfide[J]. Microbiology, 2010, 156: 1900-1906.
- [24] TODD J D, CURSON A R, KIRKWOOD M, et al. DddQ, a novel, cupin-containing dimethylsulfoniopropionate lyase in marine roseobacters and in uncultured marine bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13: 427-438.
- [25] HOWARD E C, SUN S, BIERS E J, et al. Abundant and diverse bacteria involved in DMSP degradation in marine surface waters[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10: 2397-2410.
- [26] RAINA J B, DINSDALE E A, WILLIS B L, et al. Do the organic sulfur compounds DMSP and DMS drive coral microbial associations? [J]. Trends in Microbiology, 2010, 18: 1010-1018.
- [27] VILA-COSTA M, RINTA-KANTO J M, SUN S, et al. Transcriptomic analysis of a marine bacterial community enriched with dimethylsulfoniopropionate[J]. International Society for Microbial Ecology, 2010, 4: 1410-1420.
- [28] CURSON A R J, SULLIVAN M J, TODD J D, et al. DddY, a periplasmic dimethylsulfoniopropionate lyase found in taxonomically diverse species of Proteobacteria [J]. International Society for Microbial Ecology, 2011, 5(7): 1191-1200.
- [29] ANSEDE J H, PELLECHIA P J, YOCH D C. Metabolism of acrylate to beta-hydroxypropionate and its role in dimethylsulfoniopropionate lyase induction by a salt marsh sediment bacterium, *Alcaligenes faecalis* M3A[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65: 5075-5081.
- [30] YOCH D C, ANSEDE J H, RABINOWITZ K S. Evidence for intracellular and extracellular dimethylsulfoniopropionate (DMSP) lyases and DMSP uptake sites in two species of marine bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 3182-3188.
- [31] DE-SOUZA M P, YOCH D C. Comparative physiology of dimethyl sulfide production by dimethylsulfoniopropionate lyase in *Pseudomonas douderoffii* and *Alcaligenes* sp. strain M3A[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 3986-3991.
- [32] SCHIPPERS A, NERETIN L N, KALLMEYER J, et al. Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria[J]. Nature, 2005, 433: 861-864.
- [33] TODD J D, KIRKWOOD M, NEWTON-PAYNE S, et al. DddW, a third DMSP lyase in a model *Roseobacter* marine bacterium, *Ruegeria pomeroyi* DSS-3[J]. International Society for Microbial Ecology, 2012, 6: 223-226.
- [34] RINTA-KANTO J M, BURGMANN H, GIFFORD S M, et al. Analysis of sulfur-related transcription by *Roseobacter* communities using a taxon-specific functional gene microarray[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13: 453-467.
- [35] DUNWELL J M, PURVIS A, KHURI S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily [J]. Phytochemistry, 2004, 65: 7-17.
- [36] GONZALEZ J M, COVERT J S, WHITMAN W B, et al. *Silicibacter pomeroyi* sp. nov. and *Roseovarius nubinhibens* sp. nov., dimethylsulfoniopropionate-demethylating bacteria from marine environments [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53: 1261-1269.
- [37] 胡敏, 唐孝炎. 海水中二甲基硫测定方法的研究[J]. 环境化学, 1995, 14: 157-163.
- [38] GUI P Y, HONG H Z, LU P S, et al. Biogenic emission of dimethylsulfide (DMS) from the North Yellow Sea, China and its contribution to sulfate in aerosol during summer [J]. Atmospheric Environment, 2009, 43: 2196-2203.
- [39] ZHANG H H, YANG G P, LIU C Y, et al. Seasonal variations of dimethylsulfide (DMS) and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the sea-surface microlayer and subsurface water of Jiaozhou Bay and its adjacent area [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2009, 28(2): 73-86.
- [40] YANG G P, JING W W, KANG Z Q, et al. Spatial variations of dimethylsulfide and dimethylsulfoniopropionate in the surface microlayer and in the subsurface waters of the South China Sea during springtime [J]. Marine Environmental Research, 2008, 65(1): 85-97.
- [41] HONG H Z, GUI P Y, TONG Z. Distribution and cycling of dimethylsulfide (DMS) and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the sea-surface microlayer of the Yellow Sea, China in spring [J]. Continental Shelf Research, 2008, 28(17): 2417-2427.
- [42] 马奇菊, 胡敏, 田旭东, 等. 青岛近岸海域二甲基硫排放和大气中二甲基硫浓度变化[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 21-24.
- [43] JIAO N Z, LIU C Z, HONG H S, et al. Dynamics of dimethylsulfide and dimethylsulfoniopropionate produced by phytoplankton in the Chinese seas-distribution patterns and effecting factors [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(7): 774-786.
- [44] LEYARD K M, DACEY J W H. Microbial cycling of DMSP and DMS in coastal and oligotrophic seawater [J]. Limnology and Oceanog, 1996, 41: 33-40.
- [45] STEFELS J, VAN L M. Effects of iron and light stress on biochemical compound of Antarctica *Phaeocystis* sp. (*Prymnesiophyceae*). I. Intracellular DMSP concentrations [J]. Journal of Phycology, 1998, 34: 186-195.
- [46] STEFELS J. Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants [J]. Journal of Sea Research, 2000, 43: 183-197.
- [47] 张晋华. 土壤-植物生态系统中挥发性含硫化合物释放研究

- [D]. 南京:南京理工大学化工学院,2004.
- [48] STEUDLER P A, PETERSON B J. Contribution of gaseous sulfur from salt marshes to the global sulfur cycle[J]. *Science*, 1984, 311: 455-457.
- [49] PENG M J, XIE Q Y, HU H, et al. Phylogenetic diversity of the *dddP* gene for dimethylsulfoniopropionate-dependent dimethyl sulfide synthesis in mangrove soils[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58: 523-530.
- [50] 彭梦珺. 红树林生境 DMS 产生相关功能基因 *dddP* 的分子生态学研究[D]. 武汉:华中农业大学生命科学技术学院, 2011.
- [51] ANDREWR J, JONATHAN D T, MATTHEW J S, et al. Catabolism of dimethylsulfoniopropionate microorganisms, enzymes and genes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9: 849-859.

Advances on studies of marine dimethyl sulfide producing bacteria and its functional genes

LI Li WANG Peng PENG Meng-jun LI You-guo

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The volatile dimethyl sulfide (DMS) is the most important biogenic sulfurous compound transferred from the oceans to the atmosphere. Its oxidation products in the atmosphere can affect environment and global climate, thus it becomes the highlight of research on weather variations. Dimethylsulfoniopropionate (DMSP), the main precursor of DMS, is widely distributed in the ocean and produced in large amounts by ubiquitous marine phytoplankton and a few terrestrial angiosperms. A variety of DMS-producing microbes were reviewed. Six currently-reported functional genes involved in DMS production including *dddD*, *dddL*, *dddP*, *dddQ*, *dddY* and *dddW* were summarized. Functions and biochemical characteristics of its encoding proteins were described in details. The updated progress on the studies of ecological distributions of DMS-producing bacteria and functional genes in the mangrove ecosystem China was briefly introduced.

Key words dimethyl sulfide; dimethylsulfoniopropionate (DMSP); DMS-producing bacteria; *ddd* genes; mangrove ecosystem

(责任编辑:张志钰)