

## 海洋古菌的研究进展\*

### ADVANCES IN RESEARCH OF MARINE ARCHAEA

潘晓驹 焦念志

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

近些年来,随着科学研究手段的进步和技术水平的提高,海洋生态学研究取得了若干重大突破,并导致了一系列新认识、新发现,正在推动着学科的迅速发展,并影响着相关学科的发展。海洋超微型生物生态学就是一个十分活跃、正在崛起的新领域。Waterbury 在 1979 年发现聚球藻 (*Synechococcus*) 和 Chisholm 在 1988 年发现原绿球藻 (*Prochlorococcus*), 大大改变了以往人们对海洋初级生产者结构的认识。而 90 年代海洋浮游古菌的发现与确认改写了早期认为古菌只存在于极端环境的论断,并由此产生了对海洋生态系统功能上(如物质循环、资源环境效应)的新观点、新认识。这三大发现被称为新近海洋生态学发展的三大里程碑<sup>[13, 18]</sup>。显然,对微型生物的研究发展到今天,我们再也不能把微型生物作为一个黑箱来对待,也不能仅仅停留在分粒级测定其生物量和生产力上,而应该更进一步地探讨微型生物群落的组成。海洋微型生物作为海洋环境中的最重要组分之一,历来被作为海洋生态学调查研究的重要内容。然而由于过去方法手段上的限制,其研究基本停留在总体计数水平上。事实上,它们不仅种类繁多,而且不同类群生态功能各异。DeLong 在 1992 年、1994 年和 Huber 在 1995 年的研究均表明,70 年代末以来一直认为只在极端生境(如高盐、极热、极端厌氧

等环境)下存在的古菌类,最近几年已被证实在大洋、近海、沿岸海区都有大量分布,且在生态系统中扮演着举足轻重的独特的角色<sup>[13, 14, 19, 22, 23]</sup>。

Woese 等在 1977 年的报告中根据核酸结构和序列的同源性比较,将所有生物划分为三大生物域(Domain, 比界更高一级的分类单位),包括真核生物域、真细菌生物域和古菌生物域。其中,古菌(Archaea)又分为 Euryarchaeota 和 Crenarchaeota 两个界,共五大类:产甲烷型古菌(Methanogenic Archaeobacteria)、硫酸盐还原型古菌(Archaeobacteria Sulfate Reducers)、极端嗜热型古菌(Extremely Halophilic Archaeobacteria)、无细胞壁型古菌(Cell Wall-less Archaeobacteria)、极端嗜热型硫代谢菌(Extremely Thermophilic Sulfur Metabolizers), 8 个目, 12 个科<sup>[15]</sup>。DeLong 在 1992 年的研究表明,古菌细胞较小,大多数属于超微型原核生物,目前已被广泛接受认为超微型浮游生物是海洋生态环境中极为重要的组分,而古菌在超微型浮游生物中占有相当比重,而且对于其他生物极其恶劣的生境条件下,如盐湖、温泉、极地海域等,往往能发现大量的古菌存在,甚至作为优势群,其生态地位不言而喻<sup>[17-19, 22]</sup>。然而,Brüschgi 在 1991 年,DeLong 在 1992 年、1994 年的研究均表明,古菌的绝大多数种难以纯化培养,

即使能培养,也往往非典型种,因此在自然环境下检测到的古菌和在实验室条件下培养的古菌不仅在数量上,而且在种类上相差迥异。这样,传统的微生物学方法,如细胞计数、细胞生理生化特征、放射性指示剂含量等,由于需要纯化培养,就无法对古菌进行定性分析,更谈不上对它进行定量及系统进化分析<sup>[13]</sup>。实际上,原核生物无论是在细胞水平还是在生理水平都很难为其可靠的系统发育提供特性,而它们的 rRNA 序列却在这方面提供了许多宝贵的信息。但是通过分子生物学技术,特别是比较小亚单位 rRNA 的系统进化关系,却能很好地揭示超微型生物的组成;并且表明自然环境下的组分和纯化培养下的组分有很大的区别<sup>[19]</sup>。因此随着分子生物技术应用的不断扩大,国际上掀起了研究古菌及其他生物的系统进化关系的热潮,特别是通过比较古菌 16 s rRNA 序列的最大相似性,揭示它们之间及与其他生物之间的进化关系,为古菌的形态、生理生化特性、生态作用的研究奠定基础<sup>[14, 21, 24]</sup>。

目前,国际上对古菌 16 s rRNA 的系统进化研究已并取得了不

\* 国家自然科学基金资助项目  
49876033, 39625008, 39630060 号。  
收稿日期:2000-01-20;  
修回日期:2000-05-15



少令人鼓舞的进展,纠正了以往不少错误的认识。例如,过去一直认为在海洋环境中古菌被限制在3个生境中:浅海或深海的缺氧底泥(包括自由生活和胞内共生的产甲烷菌)、深海火山口(包括产甲烷菌、硫还原菌、极端嗜热菌)、高盐度内海区(包括极端嗜盐菌)。但现在发现古菌的分布极其广泛,生境限制的划分不明显,如一些极端嗜热型古菌在低温有氧的环境中也生活得很好,对研究得最早也研究得较多的产甲烷古菌,人们发现它和硫酸盐还原型古菌一起,是厌氧环境中碳和硫循环的主要生物群落。Raskin在1994年的研究表明,它们互相竞争(主要通过硫酸盐的含量作为控制因子),将有机碳转变成 $\text{CO}_2$ 或 $\text{CH}_4$ ,但它们的实验室培养条件苛刻,因此用纯化培养的方法进行研究费时费力,而用特异性探针却能很快地鉴别出来。另外据实验室培养的结果认为嗜盐古菌必须在大于 $1.5 \text{ mol/L NaCl}$ 的条件下才能生长,但后来人们根据16s rRNA的分析发现在一些低盐度的环境中也存在嗜盐古菌,它们大多未曾在实验室中培养成功<sup>[21, 26]</sup>。而Buckley从Santa Barbara 10~20 m水深的海绵中发现了一种共生 *Crenarchaeota*,能在 $10^\circ\text{C}$ 生长良好,比目前所知的 *Crenarchaeota* 的最适培养温度低了 $60^\circ\text{C}$ 多,显然, *Crenarchaeota* 不仅包括了嗜热菌和极端嗜热菌,也包括非嗜热菌,其生长温度跨度很大,可以从火山口的大于 $100^\circ\text{C}$ 到南极的冰点以下( $<1.5^\circ\text{C}$ )<sup>[8, 24]</sup>。这表明自然界中尚有许多物种,特别是微生物还未曾被人们所认识,它们的生理生化特性(如细胞膜组成、特殊蛋白成分、维持内环境稳定的机制等)及在生态系统中的作用仍待探讨<sup>[19, 10, 25]</sup>。随着一些大型数据库,如OPD(Oligonucleotide Probe Database)、RDP

(Ribosomal RNA Database Project)、GenBank等的建立,生物技术的成熟,计算机分析手段的广泛应用,古菌16s rRNA的资料不断完善,已设计出不少专门针对于古菌甚至某一科目的引物和探针,使得对古菌的研究更加准确且详细。如果再结合流式细胞分析技术(FCM),则能在短时间内处理、分析大量样品中古菌的含量,使古菌的研究将产生飞跃<sup>[11, 14, 27]</sup>。国内对古菌的研究已日益引起重视,但主要是限于特殊的极端环境(如盐湖),忽视了古菌分布的广泛性,而且往往只是对一些能培养的种进行研究,对于其重要的生态学意义几乎未涉及,自然海区古菌的研究仍是一片空白<sup>[1, -7]</sup>。

## 1 基本研究方法

### 1.1 古菌富集

自然环境中的古菌无法单独分离,常常是与大量的其他微生物一起收集。对于大量的水样,通常是以一定孔径的核孔膜(Nuclepore filter)在一定的真空压力下抽滤来富集浮游生物;对于泥样及生物体内的寄生样,往往以相应的无菌海水或缓冲液进行抽提,然后再收集到膜上或沉淀;样品较少时,也可用高速离心的方法来沉淀样品。对于深层海域中采集的样品,由于其温度和压力与陆地相差迥异,在处理时往往需要加上一定的压力并且尽量使温度接近。富集的样品可置于 $-20^\circ\text{C}$ 或更低温度保存<sup>[8, 13, 19, 21, 23, 25]</sup>。

### 1.2 古菌的系统进化分析

主要是采用分子生物学方法来比较古菌之间及与其他生物之间的16s rDNA的相似程度,并依此绘制系统进化树。基本的思路是:提取样品中的总DNA→以古菌16s rDNA的特异性引物PCR扩增片断→构建基因库→限制性酶切片断的长度多态性分析

(RFLP)→测定不同RFLP的序列→比较序列之间的相似性→绘制系统进化树,并可依此设计引物和探针<sup>[8, 13, 19, 21, 23, 25]</sup>。不过需注意的是:(1)提取DNA时,需采用温和破细胞壁法,如用溶菌酶破壁;而且由于样品比较少,需特别注意提高DNA回收效率,常采用微浓缩器浓缩DNA,有时也采用乙醇沉淀法<sup>[13, 19]</sup>。(2)根据所要研究的古菌类别选用特定的引物。一般来说,为了保证不遗漏类群,往往采用通用的古菌引物,如OPD序列库中的S-D Arch-0021-a-S-20和S-D Arch-0958-a-A-19,有时也采用一个古菌引物再加上一个通用引物(Universal primer)来提高扩增量。只有对于那些特定研究对象(如专门针对产甲烷古菌)才采用特异引物。这些引物资料可通过OPD、RDP中已知种属的序列的比较自己设计。(3)系统进化分析常用的分析软件可通过OPD、RDP等链接下载,如“Clustaw”,“Phylip”,“Vector NTI Suite 5.5”等软件。

### 1.3 古菌含量测定

有3种方法可用于古菌的定量:(1)利用一已知浓度的靶序列和待定序列在相同条件下的扩增效率的比较来推算原始浓度及其百分比<sup>[28, 29]</sup>。不过,这种方法只能粗略地估计含量。(2)利用带有同位素标记的探针杂交方法计数,该方法灵敏,但不够快捷,且放射性对人体有害,目前正逐步被非放射性方法所取代<sup>[8]</sup>。(3)目前更安全并且更常用的方法是将古菌的特异探针挂上荧光素(如在探针的5'端挂上四甲基诺丹明、地高辛、生物素等荧光素),通过核酸分子杂交技术使荧光探针与自然样品中的靶序列相结合,利用荧光底物在荧光显微镜或流式细胞仪下检测。该方法灵敏度高,而且可通过采用结



含有多个荧光素的探针或利用多个荧光探针来提高检测度;不仅能够对古菌计数,而且能测定细胞的大小;经荧光标记的细胞还可通过流式细胞仪分离收集<sup>[12,16,20,23]</sup>。探针的选择可通过对古菌序列的比较自己设计,也可通过 OPD、RDP 等查询<sup>[9]</sup>。

## 2 讨论与展望

分子生物学在微型生物的研究中有着广阔的应用前景,特别是对于难以纯化培养的微生物,更是目前最有效的分析手段,因此越来越受到系统分类学家和生态学家的青睐。对于古菌而言,由于目前只有产甲烷古菌、硫酸盐还原型古菌中极少的一些种被培养成功,通过其他方法来研究往往难以奏效,因此利用分子生物学来研究已成为共识。归结起来,分子生物学在古菌研究中主要有以下几个主要用途:

### 2.1 揭示分布频度

利用不同类型的探针,可以了解不同海域微型浮游生物的分布和古菌在其中的比例及地位。例如: Delong 等在 1992 年的报告中,通过对大西洋和太平洋不同水深的样品的系统进化分析,发现古菌随着水深相对含量增加,可以从表层的占微型浮游生物的约 2%,到 200 m 深达到最大值约 20%,然后就不在随深度发生变化,但由于在表层与 200 m 水深的微生物总量相差一个数量级,因此古菌的绝对含量却无多大的变化;并且发现在表层的古菌多为 Euryarchaea,而在深层则多为 Crenarchaea。

### 2.2 绘制系统进化树

这是目前古菌研究中的重点与难点。由于样品是从自然环境中采集的,未经过纯化培养处理,因此所提取的 DNA 的杂菌的数量及种类均过多,如何有效地扩增古菌片

断及对 PCR 产物的分离纯化就需要耗费大量的时间和精力。目前一些大型数据库已收集的许多古菌 16S rRNA 部分片断的序列,可减轻测序的压力。

### 2.3 发现新种

通过对古菌 16S rRNA 序列的分析和比较,可以发现许多序列并没有发表过,但仍然可通过最大相似性比较来将它归类,并可设计出对古细菌特定种属的探针用于未纯化培养的样品中,可以识别出新种。例如: Raskin 等在 1994 年通过产甲烷菌的 16S rDNA 的探针分析,发现了 3 个不寻常(新)种。

### 2.4 指导特定古菌的分离纯化及生理生化分析

由于通过绘制系统进化树能够发现古细菌与其他种属生物间的亲缘关系,因此可借鉴已纯化培养成功并且与古菌亲缘关系最接近的其他生物的培养条件来纯化古菌,并在此基础上研究古菌的生化性质。古菌能够在极端环境和普通条件下生存,必然有其特殊的细胞代谢与调控机制和特异性的酶作用,研究并利用这些性质具有广阔的前景。目前已有不少科研人员对自己实验室纯化培养的古菌进行这方面的研究<sup>[9,10,17]</sup>。

### 2.5 利用古菌特殊的生理生化特性指导环境治理

例如链烷是石油燃料的主要成分,经常发现于受污染的环境中,对于它们的生物降解过程备受瞩目。早期的调查研究主要集中在有氧过程中,在此氧化酶攻击碳氢链,但对无氧生物降解的过程所知甚少,但随着 Ackersberg 等在 1991 年的开拓性进展,目前已有不少能在无氧环境下降解链烷的硫酸盐还原型古菌被纯化出来。So 等曾从长期受石油污染的河口湾底泥中分离出一种硫酸盐还原菌,它能以甲酸盐、脂肪酸(C4-C6)及氢作为

电子供体,以硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐作为电子受体,而硫、亚硝酸盐、硝酸盐则无效。据认为这些硫酸盐还原型古菌的无氧降解链烷现象可能大大超出人们的预计,并有可能提供一种全新的代谢机制<sup>[12,29]</sup>。

但是,分子生物学在古菌研究中仍存在有许多困难。首先是引物的设计往往会漏掉样品中的一些种类,即使是广适性的引物也存在着片面性。其次是探针的设计,一般而言,探针是具有物种特异性的,也就是说,它们往往是根据实验者所要特定研究的种属来设计的,这就不可避免会忽略 PCR 产物的许多成分,对一些至今还不为人们所知的种类更难以兼顾。再次,PCR 结束后,往往由于结果上的限制,人们总是选取一定长度的产物(例如 200~500 bp),这也不可避免会遗失许多数据;并且由于不同序列的模板的克隆效率不同(例如低 G+C 含量的模板的效率大大高于高 G+C 含量的模板),这就不可避免会掩盖某些模板特性,甚至产生较大的错配、误配。

尽管如此,分子生物学比传统的实验方法仍具有更大的精确度和适应性,随着人们经验和数据的积累以及实验方法的不断改进,分子生物学在古菌研究领域将发挥越来越大的作用。

### 主要参考文献

- 1 田新玉等.微生物学报,1997,37: 1~6
- 2 田新玉等.微生物学报,1998,38: 310~312
- 3 辛明秀等.微生物学报,1998,38: 400~403
- 4 陈之瑞等.植物系统学进展.北京:科学出版社,1998.1~22
- 5 周宇光.微生物学通报,1999,26: 201~203
- 6 刘铁汉等.微生物学通报,1999,26: 232~233



- 7 和致中等. 微生物学通报, 1999, 26: 363 ~ 367
- 8 Buckley D. H. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 4 333 ~ 4 339
- 9 Cann I. K. O. *et al.*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 14 250 ~ 14 255
- 10 Coates J. D. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 3 589 ~ 3 593
- 11 Enric Llobet-Brossa *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 2 691 ~ 2 696
- 12 Fuchs B. M. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 4 973 ~ 4 482
- 13 Fuhrman J. A. *et al.*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1997, 150: 275 ~ 285
- 14 Gasol J. M. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 4 475 ~ 4 483
- 15 Grant W. D. *et al.*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3, Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1989, 2 171 ~ 2 254
- 16 Hines M. E. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 2 209 ~ 2 216
- 17 Kypides N. C. *et al.*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 3 726 ~ 3 730
- 18 Lise  $\phi$  vreas *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 3 367 ~ 3 373
- 19 Massana R. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 50 ~ 56
- 20 Marie D. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 45 ~ 52
- 21 Munson M. A. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 4 729 ~ 4 733
- 22 Murray A. E. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 2 585 ~ 2 595
- 23 Perenthaler J. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 4 299 ~ 4 306
- 24 Preston C. M. *et al.*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93: 6 241 ~ 6 246
- 25 Sandaa Ruth Anne. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 3 293 ~ 3 297
- 26 Santegòeds C. M. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 4 619 ~ 4 629
- 27 So C. M. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 2 969 ~ 2 976
- 28 Tani K. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 1 536 ~ 1 540
- 29 Wood J. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 3 683 ~ 3 689

(本文编辑:刘珊珊)