

冻融作用对冻土区微生物生理和生态的影响

杨思忠, 金会军*

(中国科学院寒区旱区环境与工程研究所 冻土工程国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要: 不同时空尺度的冻融过程导致冻土温度变化及水的相变和迁移, 改变着微生物生境的物理和化学性质。冻融过程可改变细胞内外渗透压平衡, 且冰晶生长过程能损伤细胞膜和细胞器。限于营养、氧气等其它极端不利条件, 不少细胞逐渐转入休眠状态以度过难关; 微生物 DNA、蛋白质的合成和能量代谢仅用于维持细胞生存。冻融作用通过改变细胞代谢模式而影响微生物参与的寒区碳氮元素的生物地球化学循环。多年冻土层保存了不同地质时期微生物种群的多样性, 作为物理和生物地球化学屏障, 可有效削弱地表过程和地壳本底辐射对微生物的影响。在长期的适应过程中, 微生物发展了相应的耐受机制, 从结构和功能方面, 细胞和分子水平上应对冻土环境和冻融过程。这可为寻找地外寒冷星球上可能的生命形式提供一些线索。

关键词: 多年冻土; 冻结-融化作用; 微生物; 生物地球化学

文章编号: 1000-0933(2008)10-5065-10 中图分类号: Q142, Q935, Q938 文献标识码: A

Physiological and ecological effects of freezing and thawing processes on microorganisms in seasonally-froze ground and in permafrost

YANG Si-Zhong, JIN Hui-Jun*

State Key Laboratory of Frozen Soils Engineering, Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(10): 5065 ~ 5074.

Abstract: The freezing and thawing processes occurring at various spatio-temporal scales in soils can lead to cyclical changes in their temperature and moisture fields. The changes result in alterations of physical and chemical properties in microbial habitats, as well as direct or indirect injuries to the cell membranes and organelles. These injuries are caused by ice crystalization disrupting the cellular walls and changes in the osmotic balances. Due to restriction of the environments in seasonally frozen soils and in permafrost, cell becomes dormant, and DNA, protein synthesis and energy supply are maintained only at extremely low levels needed for cell survival. The biogeochemical cycles of carbon and nitrogen, mediated and modulated by microbial activity, are influenced by the freeze-thaw process in the seasonally-frozen ground and the active layer of permafrost. The permafrost environments tend to conserve biological objects and diversity at temperatures below 0°C and serve as physical and chemical barriers which sharply restrict the influences of external factors, including background radiation, on the microorganisms. During the long process of adaptation, microbes correspondingly developed tolerant mechanisms and structures and functions at both cellular and molecular levels consistent with the permafrost environments. This provides important implications in the search for past or extant life in the presumed permafrost on Mars,

基金项目: 冰冻圈科学国家重点实验室开放基金资助项目 (SKLCS 07-04); 中国科学院知识创新工程重要方向资助项目 (KZCX3-SW-339-3)

收稿日期: 2007-06-07; 修订日期: 2008-03-27

作者简介: 杨思忠 (1979 ~), 男, 甘肃靖远人, 博士, 主要从事寒区环境研究. E-mail: yangsz@lzb.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hjjin@lzb.ac.cn

Foundation item: The project was financially supported by the Open Research Fund of State Key Laboratory of Cryosphere Sciences (No. SKLCS 07-04) and by the Key Directional Project of the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KZCX3-SW-339-03)

Received date: 2007-06-07; **Accepted date:** 2008-03-27

Biography: YANG Si-Zhong, Ph. D., mainly engaged in cold environments. E-mail: yangsz@lzb.ac.cn

which apparently had a water environment earlier in its history, or perhaps in the near-surface of some moons with a methane environment.

Key Words: permafrost; microorganisms; freezing and thawing processes; biogeochemistry

宇宙中普遍存在冷生现象和冷生过程,广泛发育着多年冻土^①。例如太阳系大部分行星处于极端的低温状态,地球只是一个特例。地球上生物圈的 75% 属于冰冻圈,负温和冻结作用非常普遍。全球多年冻土面积约 $3.5 \times 10^7 \text{ km}^2$, 约占陆地生态系统面积的 26%^[1]。冻结和融化作用是冻土在热量平衡变化背景下的动力学响应。冻结和融化在时空上一般是不对称的^②。不同时空尺度上的冻融变化可以用频率、振幅和持续时间来表征。冻结持续时间长,消融期短;或者速度上不对称,冻结缓慢,融化迅速;或者冻结深度大,而融化深度小。冻融过程可在不同的时空尺度上发生。从时间尺度上来看,第四纪冰期间冰期旋回可以视作一类大时空尺度的冻融过程,这种变化显著地改变了整个地球表面的生态系统和其它圈层的面貌。各种不同尺度的气候和环境冷暖干湿变化都引起多年冻土层表征性参数的不同程度的变化,如其厚度、分布南界或下界、地温、含冰量等的变化。相比之下,每年一次的冻融循环过程可引起活动层^③或者季节冻土中温度、冰(水)、营养物质、含盐度、pH 和 Eh 等因素的季节性振荡^[1]。从空间尺度上讲,活动层每年都发生着冻融过程,短时间、小空间尺度的冻融过程主要影响当年微生物的生理、生化和代谢过程。而多年冻土层则长期冻结,仅在间冰期可能较长时期大范围的消融。

多年冻土常年处于低温、寡营养、缺氧、缺水的冻结状态下,其上部的活动层发生周期性的冻融过程。过去的研究已经证实,在数千(甚至数万)年的冰层中和多年冻土中的微生物仍有活性。它们绝大多数耐冷或者嗜冷,它们以可耐受极端环境的古菌为主,还有少量活性细菌、酵母菌和真菌。第四纪多年冻土层中以球菌和棒状杆菌为主,带有较厚细胞壁或者荚膜的原核生物明显多于真核生物,真菌仅发现在年龄 10000 年以内全新世的冻结沉积层中^[1]。此外,作为冻土区的基本动力学过程,冻融作用也显著限制微生物生命活动^[2~4]。这主要表现在温度变化、水冰相变和水分迁移过程。冻融作用不仅影响冻土的热、力学性质,还直接损伤微生物,改变微生物的生境,影响着诸如未冻水含量^④、物质传输、生理代谢等多个过程。在全球变暖条件下,冻融作用的扰动可能进一步打破和改变冻土中微生物已有的生活模式,进而通过其代谢过程改变生物地球化学循环,增加所预测的气候变化的不确定性。因此,冻融作用下的微生物生命特征和适应机制研究将成为生命科学和地球科学交叉的一个前沿领域。这方面的研究进展可以增进人们对寒区微生物生理、生态和进化的认识,寻找耐受冻融胁迫的功能基因和蛋白质。这些具有生物功能的微生物生态系统可以帮助人们研究寒区生物地球化学循环,为寻找地外寒冷星球上可能的生命形式提供一些线索。

2 冻融对细胞结构和生理生化过程的影响

冻结-融化作用可通过改变未冻水含量、含盐度、渗透压、可利用氧气含量和营养水平直接损伤细胞结构,改变冻土中微生物的形态、生理和生化水平。这种损伤与细胞类型、冻融速度、冻结达到的最低温度,保护剂的类型和浓度相关^[5]。微生物的抗冻机制取决于微生物个体在冻结环境中转化为非生物态的能力。细胞内外水分平衡状态可影响主要细胞结构的完好程度;它的失衡将导致细胞死亡^[6]。

2.1 细胞形态学变化

冻结过程可造成细胞严重脱水;由此引发的冻伤和细胞内外冰晶的增长对细胞膜和细胞器的机械性损伤

① 定义为负温时间超过一星球年的物质,可能含有冰或类似冰的物质(如水合物或固态晶体)。

② 由于冻土中一般含有冰,而冰的导热系数显著大于水,因此,在热交换量相同的情况下,一般冻深、冻结速率大于融深和融化速率,泥炭土尤其如此。

③ 多年冻土上限之上,每年春夏季节产生融化,然后在秋冬季节回冻的土层。

④ 在负温下,岩土中仍不冻结的液态水分。它可包括自由重力水和/或结合水。

是造成细胞形态发生变化的第一原因^[5]。超微结构显示,冰晶生长在酵母菌细胞壁上造成了大量空穴状结构,并可引起细胞破裂^[1]。一般细胞内部在 -10°C 以上不会冻结;这种过冷液相体系的蒸汽压比冰的高出很多;这可导致细胞失水,降低胞内蒸汽压而逐渐达到新平衡^[5]。因此,多年冻土中的细菌大小通常小于 $0.4\text{ }\mu\text{m}$,融化后则明显增大^[1]。由于细胞脱水,细胞质逐渐浓缩甚至析出,细胞核区固缩,细胞膜流动性降低,细胞壁受损^[5,7]。培养实验表明,西伯利亚多年冻土微生物在 22°C 细胞生长正常, -10°C 生长时细胞降低,核区物质向中央集中,膜外小泡和胞内包涵物增多^[8~10]。成冰过程还导致未冻水中的溶质浓缩,改变土水势,打破细胞内外渗透压平衡,促使细胞失水变小^[11]。所以,冻结造成的溶液浓缩效应是引发细胞形态变化的另一个因素^[5]。

受冻结胁迫的细胞可将细胞质水分转移到胞外以防止冻结;若超过体系的临界点,细胞内的所有溶质将全部析出^[5]。但当细胞质含水量低于10%时,即使温度降低到 -40°C ,细胞质也不冻结^[13]。合适的冷生保护剂可减轻溶液浓缩效应造成的损伤^[5]。另外,低温条件下,70%~80%的细胞集聚在一起,而在室温培养后群体解散;细胞集群可能有利于细菌耐受低温^[7]。微生物可分泌胞外基质形成包被硬壳或囊泡状被膜保护细胞,适应冻土环境^[7]。某些杆菌、梭菌产生孢子,坚实的孢子外壳给细胞提供了有效的防护层。与营养生长的细胞不同,低温冻土层中微生物可将细胞质变成晶体状,并进入深度休眠状态。该休眠状态被认为是长期冻结下不形成孢子的微生物的存活方式之一,也是研究地球和地外环境中生命形式的一个模式^[10]。

2.2 冻融影响生理代谢

2.2.1 代谢动力学变化

一般认为,长期冻结的多年冻层中的幸存者可能在生命的大部分时间以休眠状态存在,仅在局部区域或时段有代谢活动^[1]。多年冻土中可能存在通透性较强的微区;活细胞可以借此与周围液态环境交换离子,维持代谢功能^[4]。利用天冬氨酸外消旋作用估算,微生物在 -10°C 可以生长繁殖4万多年。这意味着,冻结环境中依然有养分从微生物周围的冻结围土中溶解进入水中而被利用^[14]。某些嗜冷菌在 -10°C 产生不少过剩的、停止在分裂中期的细胞^[8]。它表明,细胞依然进行着细胞分裂。代谢速率与环境冻结程度呈负相关关系。实验室培养采自西伯利亚多年冻土中的天然细菌群落时发现,最低细菌浓度倍增时间可从 5°C 的1d到 -10°C 的20d, -20°C 则需要160d^[15]。虽然从 $5\sim-12^{\circ}\text{C}$ 冻结过程中,西伯利亚多年冻土微生物依然可以利用 ^{14}C 标记的醋酸盐合成脂类,但是利用速度在 -1.5°C 骤然降低^[1]。受极端环境的限制,微生物仅仅维持最低的生命代谢活性。这个“孑遗群体”的基因突变和基因流动少,很可能保存了冻土形成时期的基因组特点。

一般认为,营养生长的细胞在冻结胁迫下可转入代谢低迷水平^[13]。融化后,土壤中天冬氨酸利用率提高,丙氨酸利用率下降,但乳酸摄取能力基本一致^[6,7]。冻土或者苔原中冷生土壤样品融化后苏醒的微生物要比非冻土中的细胞增殖和菌落形成速率高。虽然菌落总数较少,但是生存能力却强于普通微生物^[2,7]。深度冻结可能造成细胞质生理失活;这时,微生物可以进一步转入休眠状态以适应环境,营养生长的微生物量急剧减少。温度值及其持续时间可以决定代谢低迷细胞和深度休眠细胞的数量比例,在条件好转后这些生物便可以逆转到增殖状态^[7]。Price推算,在多年冻层和冰层深处适应无氧、无光、高压、低温、贫养的酸性液态环境的微生物经过几万年存活的数量约为 $10\sim10^2\text{ cells/cm}^3$ ^[17]。Mylyukin等发现,Ca/K比的升高和P/S比的降低是休眠细胞形成的典型表征参数^[16]。这种降低还与冻结过程中液态水膜的厚度相关^[1]。

2.2.2 能量利用变化

冻结作用可以破坏细胞内的线粒体和叶绿体外膜,使依赖于膜的氧化磷酸化和光合磷酸化功能丧失,从而抑制细胞能量的生产。此外,可溶性酶的功能也可能丧失,酶促反应的异常化也将影响到能量释放和利用^[5]。如果没有外界或者内部能量来源,任何形式基于化学能量的生命将终结。从能量角度讲,微生物在遭遇冻融等不利的冻土环境时,一部分代谢水平迅速降低和周围温度和营养水平保持平衡;一部分改变结构并中断几乎所有的能量消耗;还有一部分形成孢子不再利用能量,而仅仅在条件改善的时候复苏过来以修复受

损的细胞^[18]。某种程度上来看,除了细胞主动降低代谢水平,细胞聚集在一起也可能是一种适应低温冻结环境的机制^[7]。从能量角度看,冻融过程中,微生物代谢水平出现3种情况:(1)代谢足以维持细胞生长;(2)代谢仅能维持细胞存活但不能支持细胞生长;(3)细胞休眠,仅能在条件好转时代谢修复冻结期积累下来的受损DNA和蛋白质^[19]。

冻融过程可影响土壤内部氧气和其它无机电子受体的存在形式以及可利用程度。在缺氧条件下,需养微生物受到抑制,那些厌氧的微生物则可利用土壤中的替代电子受体而维持代谢活动。在冻土条件下,原核生物发展多种自养代谢通路,可以利用 H_2 , Fe^{2+} , Mn^{2+} , 氧化或还原态含硫、含氮化合物的化学能,使用不同于水的电子供体(如 H_2 , Fe^{2+} , H_2S 和 S^0)。采用的主要末端电子受体取决于热力学效率。温度从 $+4^{\circ}C$ 向负温转变的过程中,细胞的能量分配逐渐发生改变。虽然细胞可以保持存活状态,但是其生物合成和繁殖可能停止。温度越低,更多的能量将被用于修复和维持微生物细胞存活^[8]。当能量物质耗尽,代谢低迷细胞将转入深度休眠状态。这有助于保全微生物的基因信息,解冻后细胞可迅速恢复其生理活性^[7]。Price根据维持微生物细胞最低代谢率所需的碳源物质计算后认为在微生物的量不大于 $100\text{ cell}/\text{cm}^3$ 的情况下,局部的碳源物质至少可维持它们生存 10000a ^[17]。

2.3 细胞生物化学合成变化

2.3.1 DNA,蛋白质的合成和修复

冻结条件明显削弱DNA及蛋白质的合成。例如,基因组大小为3 Mbp,蛋白质平均分子量为36 kDa的微生物细胞中,仅有不到1%的基因被复制,合成的蛋白分子不到100个^[19]。在冻融循环过程中,物质传输受阻和营养物质匮乏,导致微生物处于饥饿状态,核糖体DNA表达量发生变化。实时监测发现,冻融过程中的 N_2O 气体产量与16S和18S rRNA的转录表达量变化趋势一致,其中反硝化基因的表达量增加与 N_2O 气体释放增加密切相关^[20]。冻土微生物的某些启动基因结构受保护,遇适宜条件RNA的合成可被激活^[7]。某些细菌可合成DnaK和GroEL等冷休克蛋白,二者作为RNA的分子伴侣,与mRNA结合并促进翻译,从而保护低温微生物^[21]。另外,某些饥饿基因表达促使细胞增强抗性^[17]。另外一些微生物可在温度低于细胞质的冻结温度时启动合成抗冻蛋白。这些抗冻蛋白通常降低结冰温度,而不影响体系的融化温度。它们还能影响冰晶的形状,抑制小冰晶重结晶成更大的晶体。此外,细胞还能合成比活力更高,分子结构更柔软的低温酶^[22]。

孢子失活程度和DNA双链结构的破坏以及DNA结合蛋白的交联程度有关。产孢杆菌、梭菌可以合成小分子酸性溶解蛋白,DNA与之结合后变得更加饱和而显著改变DNA的化学和酶反应活性。长期的干燥可导致蛋白质和DNA在 Fe^{2+} 离子催化下发生Fenton氧化,或者通过美拉德反应将糖分子上的羰基和核酸及蛋白质上的氨基缩合产生交联物质,损伤核酸和蛋白质^[9]。为稳定核酸的二级结构,降低冻结对DNA复制、转录和翻译过程的抑制,微生物可以合成低温激活蛋白,其柔性结构和高效的催化效率可在一定范围内缓解冻结的负面影响^[19,22]。冻结和地壳辐射可以改变蛋白质的构象。根据天冬氨酸的自发消旋化速率,推断多年冻土环境中D-和L-型氨基酸的比例为1:1,但实际上西伯利亚冻土微生物能够维持主要氨基酸的D-型构象并重复利用至少2.5万年,这说明微生物可以修复蛋白质,稳定其构象^[14]。

2.3.2 膜结构和功能变化

细胞膜对于维持胞内微环境的相对稳定,同外界环境进行物质(如离子和营养的吸收)、能量(电子转移)和信息传递至关重要。膜的脂类组成必须维持正确的流动性与膜相结构,才能保证正常的膜生理功能。细胞的外膜是阻止温度在 $-10\sim-15^{\circ}C$ 以上胞内结冰的主要屏障。细胞以脱水还是细胞内结冰方式达到新平衡主要决定于膜的通透性^[5]。冻结过程微生物主要改变细胞膜双分子层中的脂类结构。通过增加脂肪酸甲基分支,提高支链脂肪酸及不饱和脂肪酸的比例,或者降低环状脂肪酸比例,可降低膜脂熔点,增强膜的流动性和通透性,但通常脂肪酸链长度不会缩短^[13]。这些变化有利于细胞膜在低温、缺水条件下处于具有较强的水合特性和流动能力的液晶状态,维持膜的生理功能。活动层融化时,脂含量升高、膜面积增大则有利于提高细胞对营养物质的吸收能力。根据理论计算5~6个双键的细胞膜抗性最好;南极多年冻土中分离的微生物含

有的不饱和双键正好与理论值相符^[11]。胞膜的修饰过程一般不是重新合成不饱和脂肪酸,而是将已有的饱和脂肪酸去饱和,这样相对节省能量。某些特殊的细胞间隙化合物可以抵抗冻害、稳定细胞膜的柔韧性,胞外多聚糖也可发生改变^[23]。另外,某些细菌还可利用溶解的碳酸盐和多聚物作为低温保护剂^[22]。冻结过程产生干旱胁迫,多数细胞可以产生丙三醇、不饱和脂肪酸等化学保护剂应对冻结造成的生理干旱。一些细胞中储备高浓度的细胞相容性物质(如脯氨酸、海藻糖等)可增强细胞在干旱和再水合后的存活能力^[2]。

3 冻融作用与物质传输

3.1 未冻水的对生物的保护作用

冻土中依然存在未冻水,以薄膜形式包裹着土壤和冰晶颗粒,受周围颗粒的吸附而稳定在液相。冻融作用影响冻土中水分发生三相(固、液、气)转化,未冻水的含量波动尤其显著。通常未冻水膜厚度和冻结前后的温差以及土壤颗粒相关。据估计,西伯利亚冻土中的未冻水膜厚度在 -1.5°C 是约为 15nm , -10°C 时骤减到 5nm 。温度低于 -10°C 时,未冻水膜厚度变化很小,土壤粒径及其表面能可以抵消负温对未冻水膜厚度的影响^[3]。土壤颗粒越小,比表面积越大,与水的相互作用越强。例如,粘土比玄武岩和其它岩石的矿物颗粒表面的未冻水膜的要厚很多。北极壤土中未冻水比例在 $-9\sim-12^{\circ}\text{C}$ 可以达到 10% ,而砂质土壤由于颗粒较大,几乎不含未冻水^[3]。

由于水有极高偶极矩,细胞外的液态水与细胞膜和细颗粒土通过电荷相互作用。冻土沉积层的颗粒越细,细胞与未冻水的作用越强,可存活细胞的数量越多。例如,壤土中可比砂土中的可存活细胞的数量高出 $2\sim3$ 个数量级;相同负温下,冻土中的活菌数量可以比纯冰中高出好几个数量级^[2,6]。细胞内未冻水中偶极子可以和细胞膜或者蛋白质表面电荷相互吸引并在其表面排列成层状。这层未冻水的性质和冰及大量存在的水分不同。由于细胞质中充满着细胞骨架,细胞中几乎可完全构建这种有序的未冻水。一般来说,每个水分子距离蛋白质表面的距离不超过 3 个水分子大小。胞内水分子的这种排列方式有利于细胞无需通过代谢产能就可保证在很低的环境温度下细胞内物质不被冻结。

3.2 物质传输的影响

即使冻土中存在液态水膜,但只有水分和营养物质发生传输的时候,才有可能进行代谢活动。多年冻土中未冻水的水分活度低于最适条件,而且水膜较薄而不能容纳和允许微生物细胞自由迁移,但这层未冻水却在冻土生态系统中发挥着营养溶剂和传输介质的作用^[2,3]。如果没有物质传输,微生物细胞将最终被饥饿和毒性物质累积致死。如果细胞依然和周围环境隔离,缺乏物质交换过程,电子受体因无法传递而不能被细胞利用。代谢产物,特别是硝酸盐将积存在细胞内而逐渐抑制代谢。即使细胞还有活性,随着营养物的逐渐耗尽,细胞代谢也会逐渐停止^[4]。实际上,冻土中通过薄膜水的物质传输速率很慢,因此限制了细胞的生长代谢^[19]。未冻水中溶解的 NaCl , CaCl_2 或者 MgCl_2 能显著降低水溶液的冰点,因此有利于离子在冻土中迁移^[3]。冻土中透镜体、脉冰等冰包裹边缘区域,往往有一个含冰量较低,离子化学梯度较高的微区。这个部位的物质交换的速率最大,可以观测到显著的 K^+ 和 Cl^- 传输^[4]。

4 冻融速率和频率的影响

细胞的活性很大程度上取决于土的冻结速率。快速冻结和消融对微生物的影响较小,细胞内成冰或者变成无冰晶的液晶状;但缓慢冻结和融化则对细胞损伤较大,因为冰晶形成于细胞外,冰晶颗粒大,对细胞器破坏力更强^[5]。如果冻结速率很慢,细胞可充分脱水,由此破坏细胞内外的渗透压平衡。此时,细胞的存活率将与微生物的渗透压抗性相关。相反,如果冻结速率很快($>1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$),细胞内水分可以在跨膜转移前迅速冻结,避免渗透压对细胞的扰动。细胞可耐受的临界冻结速率与细胞体积/表面积比呈负相关,与细胞膜对水分的通透性呈正相关^[5]。从水分和热传递速率角度来看,如果水分跨膜转移速率比热流快,细胞水分将在胞内结冰前转移到胞外,胞内水分不会结冰,细胞存活率较高;相反,传热速度和水分转移速率相等时,因为热损失过快细胞来不及失水减小体积,冻结速率就会引起胞内失水、结冰,导致细胞死亡率升高。融化过程中可能出现细胞内重新结冰,对细胞产生机械性损伤。只要融化速率足够高就可以防止细胞内重结晶,细胞存活

的几率较大^[24]。如果冻结后的最终温度依然高于细胞可耐受的临界温度,融化速率不会明显影响细胞存活;然而,如果最终温度低于细胞临界值,升温融化速率将成为决定细胞存活程度的主要因素^[12]。自然条件下的冻融速率相对缓慢,但是夏季在南北两极某些地方可发生单日尺度的冻融过程,对表层微生物存活影响很大,反复冻融使得存活细胞的数量逐渐下降。

多次冻融循环后存活的细胞明显越少。从冻土中分离出来的天然菌株经受 48 次快速的冻融循环后,活菌数量是模拟环境温度进行恒温培养下的几万分之一,且物种多样性明显降低^[25]。但是,经过多次冻融循环后存活下来的细菌,比自然条件下的原生菌株抗冻融作用的能力提高 1000 多倍^[26]。冻融变温幅度对细胞的影响也很大。多年冻土中的微生物对低温范围(4 ~ -3℃)的冻融振荡的抗性最强,温度维持在 0℃ 左右对微生物数量的影响很小,但是变温幅度稍大一些的冻融循环则可显著降低微生物数量^[10]。对北极苔原微生物进行多次单日尺度(白天 2℃, 9 h; 晚上 -4℃, 15 h, 18 循环)的冻融循环后,微生物的碳氮比降低。由于微生物群落中细菌比真菌的碳氮比低,微生物碳氮比的降低可能表明微生物群落优势种从真菌逐渐转向细菌^[25]。但是改变冻融相变持续时间后(2℃, 2 d; -2℃, 3 d, 16 循环),得到的碳氮比和 2℃ 相差不大或者略有提高^[27],因此,微生物群落对冻融的响应还与具体地点土壤背景相关。虽然微生物数量降低,但是融化后存活的微生物代谢活性却比较高;它在利用土壤无机氮素的同时增加了微生物对 N 素的生物束缚转化,降低了氮素淋失风险^[25]。

相比之下,多年冻土层则主要经受着大时间尺度的冻结影响,融化影响相对很小。由于长期的冻结选择作用,可培养菌落既有厌氧也有好氧菌,通常数量相对较低。活菌数量(特别是好氧菌)和生物多样性随多年冻土年龄增大而降低,但是微生物可在活动层底部聚集(可能是水分迁移的结果),因而此处微生物数量通常有一个峰值^[1, 6]。而且活菌数量与土壤颗粒组成相关,壤土中数量高出砂土 2 ~ 3 个数量级,生物多样性也相对较高。西伯利亚多年冻土每克土壤中的好氧菌的数量可达 10⁸ CFU,青藏高原的数量在 10² ~ 10⁷,北美极圈和南极多年冻土中数量通常低于 10⁶ ^[3, 6, 7, 10]。分离出的厌氧菌多为硫、铁还原菌、反硝化菌和产甲烷菌。南极多年冻土这些微生物多数耐冷,但是真正的嗜冷菌很少。多数细菌可以耐受寡养条件,且通常非嗜盐微生物,对抗生素抗性低于农耕菌,但是对冻融过程耐受性较强^[6]。西伯利亚冻土中微生物多数属于 α -和 δ -型变形菌(*proteobactia*) (46.5%),少数属于 β -和 γ -型(14%),大约有 10% 属于 G⁺ 细菌,其余 28% 分属于纤维杆菌(*fibrobacter*),浮霉状菌(*planctomyces*),螺旋菌(*spirochaetes*),拟杆菌(*bacterioids*)和绿色硫细菌(*green sulfur bacteria*) ^[3, 7, 10]。

5 冻融过程影响生物地球化学循环

冻融作用使土壤颗粒风化变细,结构疏松化,降低团聚体的水稳定性。冻融过程中水冰相变和水分迁移直接影响溶解、沉淀和阳离子交换等化学反应和化学传输过程。例如,交替冻融会增加代换性 NH₄⁺,降低代换性 K⁺ 浓度,而且代换性 Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 等离子均受到不同程度影响。冻土区地表积雪融水淋洗、溶解雪盖中的化学物质不仅携带大量 PO₄³⁻、K⁺、Mn²⁺、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 进入活动层,还带来了雪盖中积累的无机氮素,因此可缓解无机氮素缺乏对寒区生态系统的限制^[28]。这个过程可决定土壤背景的差异,也可决定微生物的多样性和特有性,并可调节微生物活动的营养环境。这些生命力顽强的微生物对土壤中营养条件和有机质分解、寒区地-气交换、碳氮循环和有机质的迁移和演化影响很显著。目前,全球变暖使得活动层不断加深,进而造成多年冻土融化并释放其中封存的古甲烷气体。同时,微生物代谢活动增强并加速分解贮存在多年冻土层中的有机碳,促进温室气体的排放^[6]。由于多年冻土面积非常广阔,其中潜在的巨大数量的微生物代谢对于低温环境中的物质循环和生物地球化学循环过程,起着十分重要的作用。因此在全球生态与环境系统中占据重要地位。

普遍的冻融循环对北极冻土苔原土壤微生物种群和对生态系统的养分循环产生了很大的影响。北极土壤融化过程中微生物可利用土颗粒中所含的低水平的氮素并将其富集到微生物产物中。冻结引起土壤 Eh 降低,硝化、产甲烷作用以及铁、硫还原作用等厌氧代谢增强,有利于氨化和硝化作用,造成氨态和硝态氮浓度

增加^[28]。而融化后 N_2O 和 CO_2 释放增加^[20]。冻融作用对 CH_4 痕量气体的释放也非常重要。实地研究发现,在西伯利亚勒拿河三角洲苔原地区 CH_4 释放总量和冻土层中微生物的 CH_4 生产和氧化过程密切相关, CH_4 释放量与活动层融化深度显著正相关。活动层消融后温度在 1°C 左右有明显的 CH_4 生产,而季节融化层在双向冻结过程中,中间的活动层可以保持非冻结状态并可不断产生 CH_4 气体,暂时冻结封存气体在紧接的消融期释放到大气中^[29]。苔原冻土中每年向大气中输入的 CH_4 估计为 $20 \sim 40 \text{ Tg}$,相当于自然来源的 CH_4 排放总量的 25%^[30]。消融期亚北极泥炭地沼泽的 CH_4 释放量强烈增加,几乎占到整个仲夏排放量的 25%^[31]。全球变暖背景下,季节融化层不断加深不仅扩展微生物的活动空间,增加活性微生物的数量,而且还使得微生物的活性增强,结果可能导致储存在多年冻土中的有机碳以 CH_4 、 N_2O 和 CO_2 等温室气体的形式释放到大气中,反过来又促进气候变暖。全球变暖叠加日益增强的人类活动,将非线性地影响多年冻土区原有的冻融强度、深度和频率,从而加剧多年冻土在全球碳循环中“汇”或“源”贡献的不确定性。

6 冻结对本底辐射的影响

微生物长期经受着地壳放射性物质的本底辐射。除了一些耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 可耐受高剂量的辐射外,大多数细胞在辐射剂量 $5 \sim 1000 \text{ Gy}$ 时无法存活^[32]。理论上,西伯利亚多年冻土中的背景射线每年的辐射剂量高达 $2 \times 10^6 \text{ Gy}$,若被细胞全部吸收,完全可以破坏 DNA 和蛋白质结构。而冻结环境本身可以部分地吸收和削弱细胞接收的本底辐射,在冻土层保护下,每年的背景辐射大致降为 $3 \times 10^{-4} \text{ Gy}$,因此可有效保护细胞^[2]。即使抗辐射能力非常强的细菌也会被 $2 \sim 3 \times 10^4 \text{ Gy}$ 的辐射剂量全部杀死,这个数值相当于西伯利亚冻土中 1000 万 a 间的天然辐射剂量总和。因此,冻土中长期存活下来的细胞应该进行着修复活动,至少能部分抵消背景辐射的累积效应。但是,冻土中极低的代谢水平可能难以支撑高强度的 DNA 修复,或许存在其它的抗辐射机制。目前认为,干燥环境可增强微生物的抗辐射能力,而冻土的冻结特性恰好显著降低了可流动的水含量。此外,冻结环境下细胞质转变成晶体状对不良环境的耐受能力增强^[10]。例如,枯草芽孢杆菌的孢子在冻结脱水后(细胞结构发生变化),在 25°C 、 -73°C 和 -193°C 接收紫外线 (253.7 nm) 照射依然能够存活,主要是由于冻结基质可以降低辐射对细胞的损伤^[10]。科学家认为,西伯利亚多年冻土存在的微生物可以用于追踪研究火星冻土中可能存在生物活性的微生物。但是,火星地壳中钾、铀、钍的天然辐射累积剂量将非常高,如果没有修复活性,微生物则很难在火星冻土中存活 10 亿 a^[33]。

7 长期冻结的保存作用

多年冻土层作为物理和生物地球化学屏障,有效削弱了地表过程波动的影响,封闭和保存了不同地质时期微生物种群的多样性。微生物多样性可能与当时的初始状态相关。多年冻土中保存了近百万年以来的微生物,其中一些可能是地球上存活下来的最古老的生命^[2, 7]。而多年冻土中生物多样性整体上较低,这与冻土极端环境有关。但是在某些地方的古老冻土中依然发现了多样性很高的微生物群落,其多样性甚至超过了较新的冻土沉积物,也许多样性较低的现代沉积物在冻结前微生物就比较贫乏^[3, 7]。多年冻土微生物是一个“幸存的孑遗群体”。多年冻土在一定的尺度上(或程度上)起到了物理和生物地球化学屏障的作用,削弱了地表环境因素及其动力学过程的影响,为微生物提供了相对稳定的生境(稳定负温、水分、养分等)。这种稳态有利于微生物的长期保存。有关这些古老微生物得以保存下来的生理基础以及冻土环境因素(如未冻水和地壳本底辐射等)前文已经述及,不再赘述。

从环境因素考虑,冰冻圈的特殊低温冻结条件有效降低了生化降解速率过程,有利于古细菌及其残体得以在 0°C 以下保存下来。土壤冻结或冰的形成过程产生封闭区域,可以隔离埋藏生物遗体 DNA 与氧气之间的接触,有利于细胞中 DNA 的保存。由于液态水含量极大地减少和冰胶结作用,使得主要依赖于液态水而发生的生物大分子的化学分解以及生物降解反应作用减慢,有机体没有成岩过程中降解以及水解作用,古 DNA 分子可以得到较好的保存。仅就死亡和休眠细胞中的 DNA 来说,可因水解和氧化作用遭到损伤、降解破坏,这个过程取决于是否存在未冻水、氧自由基、重金属离子螯合物、烷基化物质,还有 pH。温度每下降 10°C ,降解速率下降一个数量级。根据理论推算,将一个基因组大小为 $3 \times 10^6 \text{ bp}$ 的细菌被分解成 100bp 左右

的片断分子,在 15℃ 下需要 0.5ka, -10℃ 得 81ka,而当温度降至 -20℃,则需要 1.7Ma^[34]。因此,冻土的低温环境有利于细胞中 DNA 的保存。

8 小结与展望

多年冻土层为研究冻土形成期间的环境与微生物生态学,以及生物的进化提供了良好的材料。研究表明多年冻土区的部分微生物处于低代谢水平,部分处于深度休眠状态。这些微生物已经耐受低温和冻结生境而存活了至少几千至上百万年。在长期冻结环境中,微生物细胞受多年冻土保护得以长期保存;但是由于冻结选择作用,其种群和生物多样性有所下降。细胞的主要抗冻机制与细胞个体在活性状态和休眠态之间的转化能力,以及细胞膜和水的表面相互作用密切相关。未冻水的存在是细胞得以存活和代谢的重要因素。只有水分和溶解的营养物质可以发生传输的时候,才有可能进行细胞代谢。微生物对低温和冻结过程的适应机制涉及菌体自身的生理、生化和遗传物质,以及所处生态环境与营养条件等众多因素。主要体现方式包括:能量转移与传导、胞内环境调节及新陈代谢调节的特殊机理,细胞膜、细胞壁结构性成分与功能性成分的稳定性,反应动力学,蛋白构象和酶功能。了解微生物适应低温和生长机制,有助于认识生命与环境相互作用规律,追踪在低温生态系统中微生物生存的普遍策略以及陆地生命的物理限制因素。

地球化学可以追踪时间和环境背景,冻土微生物的地球化学处于微生物学与冻土学以及其他一些相关学科的交叉点上,有可能成为地质生物学研究的热门领域。某些多年冻土可以对微生物定年,也可用于研究微生物对极端寒冷和营养缺乏的响应。微生物数量、代谢产物浓度以及不同温度下冻土或者冰层的年龄(或深度)之间的存在定量关系可用于推断微生物在冻土中的原位代谢速率。至今尚未深入研究微生物种类随深度的变化,或确认这些微生物依旧存活并进行代谢,还是存活但不能培养,亦或是休眠或死亡。由于广袤的多年冻土中微生物数量巨大,尽管代谢速率较慢,微生物活动也会对全球营养循环和诸如 C、N 和 S 元素的生物地球化学过程产生重要的影响^[3, 15]。气候变暖背景下,活动层显著加深和冻土大规模、快速退化,冻土层长期储存的碳库可以温室气体形式释放出来,参与较短时间的生物地球化学循环。另外,某些封存的古老病毒也可能释放出来,威胁人类健康。

总体来讲,冻结后的低温环境是一种极端的限制因素,长期的冻结导致一些不适应持续负温、冻结环境的物种减少或消失,物种多样性降低。但是,低温冻结环境也可成为保存和稳定微生物存活的积极因素。不同层位的微生物可保留相应冻结时期的生态学特征。因此其物种多样性变化见证并可记录生物进化的历程。比较不同年代生物的进化序列,将有助于佐证进化事件,检验生物进化理论,揭示生物圈、冰冻圈和地圈协同演化过程^[2]。目前,人类寻找外星生命的首要条件是,在当前条件下地球以外的其它星球是否存在液态水。只要行星演化的某个阶段物理和化学环境合适,就可能有生命出现。早期火星上的条件类似于早期地球,有利于生命出现。仔细研究地球的生命史和生物成功适应地表和地下所有可能极端生境的适应策略,将为火星早期甚至今天的生态环境提供线索。宇宙中众多天体(如行星、卫星、小行星、彗星、宇宙尘埃等)普遍以冷生为主,发育着以固态 H₂O、CO₂、NH₃ 或者 CH₄ 为“冰”的广义多年冻土。冻结作用下的冻土区微生物为人类追踪外星生命提供了研究模式。而冻结岩土中高通透性的微区是冻土中最有可能支持寒冷行星和小行星上有活细胞生物生存和繁衍的区域。

微生物是疑似外星生物最可能的候选研究对象。在太阳系的其它低温环境为主的星球上,以及火星和月球的背光面,那里的低温并不一定完全抑制微生物的存在。从火星轨道和着陆器探测到火星地质侵蚀特点来看,火星和地球早期的地表物理和化学性质非常相似;35 亿 a 前火星上的气候潮湿,气温足够允许存在大量的浅表层或深层水体^[2]。而那个时候的地球已经有生命存在。火星表面极地和高纬地区(倾角超过 40°),温度可以高于 -20℃,局部情况下可以超过 0℃,很可能是生物存在的边缘区域^[2, 3]。对于新兴的天体生物学来说,地球冻土收录了大量的生物源的气体 and 矿物质、生物色素、脂类、酶、蛋白质、核苷酸、RNA 及 DNA 片段和分子,以及死亡和存活的细胞。这些远古的生物标记物为寻找外星居民和可能潜在的生态系统或者生命形式,追踪星际生物的存活、代谢和繁殖规律提供了研究线索。如果在地球之外发现生命分布,这些特殊的生物

可能拥有独特的机制让他们保持几十亿年活力。与之相似的地球冻土层微生物的存活和繁殖机制,可以作为研究诸如火星等可能存在活性生命的行星的一个范例。

References:

- [1] Gilichinsky D A. Permafrost model of extraterrestrial habitat. In: Horneck G, Baumstark-Khan C eds. *Astrobiology: the quest for the conditions of life*. Springer: Berlin, 2001. 125 — 142.
- [2] Gilichinsky D A, Soina V S, Petrova M A. Cryoprotective properties of water in the earth cryolithosphere and its role in exobiology. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 1993, 23(1): 65 — 75.
- [3] Steven B, Léveillé R, Pollard W H, *et al.* Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles*, 2006, 10(4): 259 — 267.
- [4] Ostroumov V E, Siegert C. Exobiological aspects of mass transfer in microzones of permafrost deposits. *Advances in Space Research*, 1996, 18(12): 79 — 86.
- [5] Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, 1970, 168: 939 — 949.
- [6] Gilichinsky D, Wagener S. Microbial life in permafrost: a historical review. *Permafrost and Periglacial Processes*, 1995, 6: 243 — 250.
- [7] Vorobyova E, Soina V, Gorlenko M, *et al.* The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997, 20: 277 — 290.
- [8] Bakermans C, Tsapin A I, Souza-Egipsy V, *et al.* Reproduction and metabolism at -10°C of bacteria isolated from Siberian permafrost. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(4): 321 — 326.
- [9] Potts M. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology*, 1999, 34: 319 — 328.
- [10] Soina V S, Mulyukin A L, Demkina E V, *et al.* The structure of resting bacterial population in soil and subsoil permafrost. *Astrobiology*, 2004, 4(3): 345 — 358.
- [11] Mancinelli R L. 12 microbial life in brines, evaporites and saline sediments: the search for life on Mars. *Advances in Astrobiology and Biogeophysics*, 2005, 4: 277 — 297.
- [12] Dumont F, Marechal P A, Gervais P. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to -196°C . *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1330 — 1335.
- [13] Finegold L. Molecular and biophysical aspects of adaptation of life to temperatures below the freezing point. *Advances in Space Research*, 1996, 18(12): 87 — 95.
- [14] Brinton K L F, Tsapin A I, Gilichinsky D A, *et al.* Aspartic acid racemization and age-depth relationships for organic carbon in Siberian permafrost. *Astrobiology*, 2002, 2(1): 77 — 82.
- [15] Rivkina E M, Friedmann E I, McKay C P, *et al.* Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8): 3230 — 3233.
- [16] Mulyukin A L, Sorokin V V, Vorboeva E A, *et al.* Detection of microorganism in the environment and preliminary appraisal of their physiological state by X-ray microanalysis. *Microbiology*, 2002, 71(6): 723 — 734.
- [17] Price P B. A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. *PNAS*, 2000, 97: 1247 — 1251.
- [18] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993, 362: 709 — 715.
- [19] Price P B, Sowers T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *PNAS*, 2004, 101(13): 4631 — 4636.
- [20] Sharma S, Szele Z, Schilling R, *et al.* Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 2148 — 2154.
- [21] Morita R Y. Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation survival in nature. *Canadian Journal of Microbiology*, 1988, 34: 436 — 441.
- [22] Cavicchioli R, Thomas T, Paul M G. Cold stress response in Archaea. *Extremophiles*, 2000, 4: 321 — 331.
- [23] Callaghan T V, Bjorn L O, Chernow Y, *et al.* Biodiversity, distributions and adaptations of Arctic species in the context of environmental change. *Ambio*, 2004, 33(7): 380 — 393.
- [24] Dumont F, Marechal P A, Gervais P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-

- rapid cooling rates. *Cryobiology*, 2003, 46(1): 33—42.
- [25] Larsen K S, Jonasson S, Michelsen A. Repeated freeze-thaw cycles and their effects on biological processes in two subarctic habitats. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21: 187—195.
- [26] Walker V K, Palmer G R, Voordouw G. Freeze-thaw tolerance and clues to the winter survival of a soil community. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 1784—1792.
- [27] Sjörsen H, Michelsen A, Holmström M. Effects of freeze-thaw cycles on microarthropods and nutrient availability in a sub-Arctic soil. *Applied Soil Ecology*, 2005, 28: 79—93.
- [28] Ping C L, Michaelson G J, Kimble J M. Carbon storage along a latitudinal transect in Alaska. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 1997, 49: 234—242.
- [29] Wagner D, Kobabe S, Pfeiffer E M, *et al.* Microbial controls on methane fluxes from a polygonal tundra of the Lena Delta, Northeast Siberia. *Permafrost and Periglacial Processes*, 2003, 14: 173—185.
- [30] Christensen T R, Prentice I C, Kaplan J, *et al.* Methane flux from northern wetlands and tundra: an ecosystem source modeling approach. *Tellus*, 1996, 48B: 651—660.
- [31] Friborg T, Christensen T R, Sgaard H. Rapid response of greenhouse gas emission to early spring thaw in a subarctic mire as shown by micrometeorological techniques. *Geophysical Research Letters*, 1997, 24(23): 3061—3064.
- [32] Mattimore V, Battista J R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(3): 633—637.
- [33] McKay C P. The search for life on Mars. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 1997, 27: 263—289.
- [34] D'Amico S, Claverie P, Collins T, *et al.* Molecular basis of cold adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2002, 357(1423): 917—925.