

极端环境下嗜热酸甲烷营养细菌研究进展

郑 勇^{1,2}, 郑袁明¹, 张丽梅¹, 贺纪正^{1,*}

(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 100049)

摘要: 甲烷营养细菌能够将温室气体甲烷(CH_4)转化为 CO_2 或生物质, 在碳生物地球化学循环及缓解由温室气体导致的全球气候变化方面发挥着重要的作用。甲烷营养细菌生存的条件范围较为广泛, 但在中性 pH (5 ~ 8) 和中温 (20 ~ 35°C) 范围内生长最佳。系统进化分析认为, 它们均属于 γ -或 α -变形菌门(Proteobacteria)。最近 3 项独立完成的研究从极端热酸(pH 接近 1, 温度高于 50°C)环境中分离获得了具有甲烷氧化(营养)功能的微生物, 经鉴定均属于疣微菌门(Verrucomicrobia)。这些全新的、不同于以往的研究结果不仅是对现有关于甲烷营养细菌生态学认知的进一步拓展, 同时也暗示着可能存在着新型的、由微生物介导的 CH_4 氧化途径与机制。因此, 特就极端环境中嗜热嗜酸甲烷营养细菌的最新研究进展作一概述。

关键词: 甲烷营养细菌; 极端环境; 基因组分析; 代谢途径; 疣微菌门

文章编号: 1000-0933 (2009)07-3864-08 中图分类号: Q945.11 文献标识码: A

Advances in thermoacidophilic methanotrophs from extreme environments

ZHENG Yong^{1,2}, ZHENG Yuan-Ming¹, ZHANG Li-Mei¹, HE Ji-Zheng^{1,*}

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 100049, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(7): 3864 ~ 3871.

Abstract: Methane-oxidizing bacteria (methanotrophs) play an important role in the biogeochemical carbon cycle and in controlling global climate change, by converting methane to carbon dioxide or biomass. Although these bacteria have been isolated from a variety of environments, most of which grow best at neutral pH (5 – 8) and moderate temperature ranges (20 – 35°C). Based on the phylogenetic analysis, methanotrophs are classified into type I and type II, which belong to the gamma- and alpha-Proteobacteria, respectively. Very recently, three independent studies have isolated methane-oxidizing microorganisms from extreme thermoacidophilic environments with pH values of approximately 1 and temperatures higher than 50°C, these nonproteobacterial strains were all identified as members of the phylum Verrucomicrobia. These new and unusual studies will undoubtedly expand the known phylogenetic and functional diversity of methanotrophs, also indicate that novel methane oxidizing pathways and mechanisms could exist in the methanotrophs. This review illustrates the latest advances in thermoacidophilic methanotrophs, based on the recent three reports on methane oxidation in the extreme environments.

Key Words: methanotroph; extreme environment; genome analysis; metabolic pathway; verrucomicrobia

作为仅次于 CO_2 的全球第二大温室气体, CH_4 对致全球温室效应的贡献率为 18%^[1], 并且随着工业化程度的不断深入, 其在全球大气中的浓度明显增加, 至 2005 年已达 $1.774 \mu\text{L L}^{-1}$, 远远超出工业化前的浓度值。大气 CH_4 的第一大汇是对流层中的光化学氧化作用; 其次就是微生物的氧化消耗^[2], 一种由甲烷氧化细菌

基金项目: 中国科学院知识创新工程资助项目(KZCX1-YW-06-03, KZCX2-YW-408); 国家自然科学基金资助项目(40601049, 40871129)

收稿日期: 2008-12-17; 修订日期: 2009-04-01

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

(methane-oxidizing bacteria),即甲烷营养细菌(methanotrophs)介导完成的生物作用过程。由此可见,在全球碳循环过程中甲烷营养细菌起着不可忽视的作用,对于甲烷营养细菌的研究就成为微生物学、生态学等学科及其交叉领域的研究热点。

甲烷营养细菌的生境较为广泛,在自然湿地、农用和森林土壤,海洋沉积物等各种环境中均分离到了不同的菌株。已知的甲烷营养细菌可划分为两类: γ -和 α -变形菌^[3],也就是通常所指的 type I 和 type II 两种类型,它们氧化 CH_4 为 CO_2 的途径类似,均能够利用 CH_4 作为唯一碳源和能源以区别于其它微生物;同时它们还可分别通过核酮糖单磷酸途径(RuMP pathway)和丝氨酸途径(serine pathway)在甲醛水平上将碳转化为细胞物质。目前大多数已知的甲烷营养细菌均在适中的 pH (5~8) 和中温(20~35℃)范围内生长最佳。然而,在一些极端的温度、酸度、盐碱度环境下,例如热泉、火山口周围、碱湖等,也分离到了嗜极端环境的甲烷营养型微生物^[4~7];且新发现的菌株并不属于变形菌门,而是属于一个新的门——疣微菌门(Verrucomicrobia)。这些发现为甲烷营养细菌的研究提出了新的命题,也表明甲烷营养细菌在物种多样性和代谢机制方面可能存在着更多空白有待进一步探索。鉴于甲烷营养细菌在全球 CH_4 平衡和碳生物地球化学循环中发挥的重要作用,对该类微生物生态学功能及机制的研究将有助于更好地理解并重新评估 CH_4 对全球气候变化的影响力。因而,本文就极端生境下甲烷营养细菌,主要是嗜热、嗜酸及嗜热酸甲烷营养细菌的最新研究进展进行综述。

1 变形菌门中的嗜热嗜酸甲烷营养细菌

1.1 耐热嗜热甲烷营养细菌

最早描述的耐热(生长温度高达 50℃)甲烷营养细菌是 *Methylococcus capsulatus*^[8]。此后,又相继发现了 *Methylococcus thermophilus*, *Methylococcus ucrainicus*, *Methylocaldum tepidum*, *Methylocaldum gracile* 和 *Methylocaldum szegediense* 等几株耐热或中度嗜热菌。与 *M. capsulatus* 不同,*Methylocaldum* 属的种含有颗粒状甲烷单氧化酶(pMMO),而不含可溶性甲烷单氧化酶(sMMO),并且 *pmoA* 基因序列分析表明其在进化树上处于一独立的分支^[8,9]。Bodrossy 等^[10]在匈牙利和日本的热泉中发现的一组嗜热甲烷营养细菌 HB 生长温度介于 40~70℃ 之间,最适温度为 55~62℃,经 16S rRNA 基因和 *pmoA* 基因序列分析确定 HB 与 *Methylococcus* 和 *Methylocaldum* 菌属具有相近的亲缘关系,并将其鉴定为 *Methylothermus* 属的种^[10]。

1.2 嗜酸甲烷营养细菌

北半球广袤的酸性土壤和湿地,为嗜酸性甲烷营养细菌的生存提供了良好的条件。Dedysh 小组在嗜酸甲烷营养细菌的分离鉴定方面做了系统性工作。他们先是从酸性泥炭藓沼泽地中成功地分离到 3 株嗜酸性甲烷营养细菌,并将它们鉴定为 1 个新种 *Methylocella palustris*^[11]。*M. palustris* 的细胞膜磷脂脂肪酸主要为 18:1 型,而其 16-碳(16:1 和 16:0 型)磷脂脂肪酸的含量明显高于已知的 II 甲烷营养细菌^[12]。16S rRNA 基因测序表明这些酸性分离培养物构成了甲烷营养细菌的一个新分支,它们与 *Methylosinus*/*Methylocystis* 的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 90.5% 和 92.6%,而与异养菌 *Beijerinckia indica* 和 *Rhodopseudomonas acidophila* 的相似性却高达 96.5% 和 93.5%,后两者在酸性、沼泽性水体和土壤中很常见。这些嗜酸甲烷营养细菌的最适生长 pH 为 5.0~5.5^[12]。*M. palustris* 含有 sMMO,其 *mmoX* 基因与 *Methylosinus* / *Methylocystis* 和 *Methylococcus capsulatus* Bath 中的相同基因的序列相似性分别为 76.5%~78.6% 和 78.0%,由此表明 *Methylocella* 的 *mmoX* 基因形成了一个新的分支。

另 1 株嗜酸甲烷营养细菌 *Methylocapsa acidophila* 是从西伯利亚的一处泥炭沼泽地分离所得^[13]。该菌与 *M. palustris* 的 16S rRNA 基因序列相似性高达 97.3%。尽管二者的一些生理特征非常相似(如生长 pH,温度,及对盐度的敏感性),但在细胞形态及其超显微结构却有显著不同。*M. acidophila* 拥有 pMMO,不含 sMMO;其细胞膜主要磷脂为磷脂酰甘油(PG),而非 *M. palustris* 的磷脂酰甲基乙醇胺(PME)。此外,*M. acidophila* 还能形成固氮菌类型的胞囊。由此看来,尽管同样分离自酸性湿地,这些嗜酸甲烷营养细菌却分别代表着 2 组明显不同的表型和基因型。

研究证实,极端甲烷营养细菌相对于普通甲烷营养细菌具有多种在结构—功能上的不同适应机制,如细

胞表面层状结构、细胞内的磷脂组成及有机渗透剂(如氢嘧啶类物质、5-羟脯氨酸、蔗糖等)合成的独特性等,这使它们具备了在极端环境下生存并繁育的必要条件^[14]。随着分子生物学研究手段的发展,尤其是微生物全基因组信息的获取,甲烷营养细菌不管在物种多样性、生态环境多样性还是在遗传多样性方面均可能超出以前的估计,相应地有可能存在新型的 CH₄氧化途径和生理代谢机制。

2 嗜热酸甲烷营养细菌的最新研究进展

2.1 3 株嗜热酸甲烷营养细菌

Islam 等^[5]将取自俄罗斯 Kamchatka 的酸性温泉的粘土和泉水样品基于 M3 矿质培养基(无硝酸盐,低 NaCl,pH 3.5),在温度为 55℃,CH₄浓度为 60% 条件下,利用富集培养方法,将菌液不断转接至新鲜培养基,最终获得菌株 Kam 1,并初步命名为 *Methyloacida kamchatkensis* (表 1),该菌细胞长约 0.8~1.0 μm,直径为 0.45~0.65 μm,呈卵形杆状(图 1)。同样,Pol 等^[6]对从意大利南部 Solfatara 处采集的泥浆和火山性热泥锅周边混合土壤样品,分别进行了 50℃ 的温度,pH 为 2,以 CH₄作为单一的碳源和能源的选择性富集培养。3 周后,在泥浆样和土样 2 组培养实验中都观察到了 CH₄消耗。将培养液连续转接到新鲜培养基中,最后用流动聚碳酸酯过滤器对培养物进行过滤,最终得到 1 株杆状纯培养物 SolV,它暂时被命名为 *Acidimethylosilex fumarolicum* (表 1),从电镜显微照片可以看出菌株 SolV 和 Kam 1 的细胞结构比较相似(图 2)。类似地,Dunfield 等取少量采自新西兰知名的 Hell's Gate 一处富含 CH₄的地热区域的土壤碎屑接种于矿质培养基平板上,在 60℃,pH 为 4.5~5.5,充以 25% 浓度 CH₄的密封性广口瓶中进行培养,得到了 1 株纯分离物 Isolate V4,将其暂定名为 *Methylokoros infernorum* (表 1),V4 菌体细胞长为 1~4 μm,直径 0.3~0.5 μm,表现为非运动型杆状(图 3)^[4]。

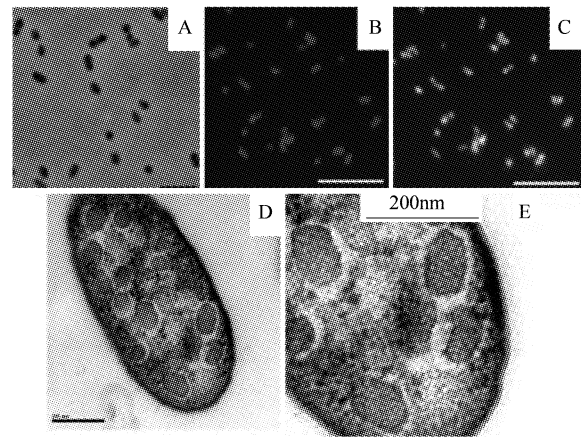


图 1 菌株 Kam1 的显微照片^[5]

Fig. 1 Photomicrographs of the methanotrophic strain Kam 1
A: 1000 × 相差显微镜下的菌体细胞(标尺,5 μm);B, C: 经 DAPI 染色(B)和 16S rRNA 基因探针结合(C)的荧光原位杂交(FISH)照片(标尺,5 μm);D: Kam 1 菌体的投射电镜照片(标尺,200 nm);E: D 中部分放大的图像 A: Phase-contrast image of Kam1 cells at 1000 × magnification (Scale bar, 5 μm.); B and C: Fluorescent in situ hybridization images of Kam1 cells visualized with DAPI staining and the 16S rRNA gene probe (Scale bar, 5 μm.); D: Transmission electron micrograph of a thin section of a Kam1 cell. (Scale bar, 200 nm.); E: Magnified part of the Kam1 cell in D, highlighting the polyhedral organelles (Scale bar, 200 nm.)

表 1 极端热酸环境下分离所得的 3 株菌的比较

Table 1 Comparison of three strains isolated from extremely thermoacidophilic environments^[4~6]

菌株名称 Strains	分离地点 Isolated site	温度 Temperature(℃)	pH	CH ₄ (%)
<i>Methyloacida kamchatkensis</i> Kam 1 ^[5]	俄罗斯 Kamchatka 温泉,泥浆样品	55	3.5	60
<i>Acidimethylosilex fumarolicum</i> SolV ^[6]	意大利 Solfatara 喷气孔,泥盆周边土壤	50	2	2~5
<i>Methylokoros infernorum</i> Isolate V4 ^[4]	新西兰 Hell's Gate 地热区,森林土壤	60	4.5~5.5	25

对 3 个菌株的生理生化特征的研究发现,Kam 1 能够以硝酸盐、铵或氮气为氮源,其生长的最适 pH 为 3.5,温度为 55℃。无 CH₄或 O₂条件下均不能生长;在培养基中可添加低浓度甲醇,而添加乙醇、乙酸、葡萄糖或 LB 肉汤时均不能生长,表明 Kam 1 具有专一性利用 CH₄特性。Kam 1 在常规培养基如 NMS、AMS^[15]、M1^[11]、10 倍稀释或未稀释的 LB 培养基中均不能生长。伴随着菌体数量的增加 CH₄的消耗不断增加,这证实了 Kam 1 对 CH₄的氧化作用,即甲烷营养代谢确实将 CH₄转化为了细胞生物量^[5]。Pol 等^[6]发现菌株 SolV 可以在 pH 为 0.8~5.8 的范围内生长,最佳温度是 55℃。利用 CH₄时的最大生长速率为 0.072 h⁻¹。在 pH 2 并

有 CH_4 存在时,醋酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、甲酸盐、甲醛和酵母粉仍能完全抑制 SolV 的生长,而在 NaCl 浓度大于 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或者是培养基中含有葡萄糖时,菌株不生长。SolV 能在甲醇中长势良好,但是甲醇完全抑制了 CH_4 的氧化;当甲醇被耗尽仅 4 h 后, CH_4 消耗和菌体的生长就重新开始。另外,SolV 还能够同时利用铵和硝酸盐作为氮源,前提是存在 CH_4 [6]。菌株 V4 在 60°C 下能利用 CH_4 生长,pH 范围为 1.0 ~ 6.0,而最适 pH 为 1.5 ~ 3.0。因此,V4 是目前所发现的最嗜酸的甲烷营养细菌。甲烷营养细菌中常见的平行堆叠状的细胞内膜系统(ICM)在菌株 V4 的细胞中很少见,而在其少数细胞膜的内陷结构中却发现管状膜结构 [4] (图 3)。甲烷营养细菌特有的细胞膜磷脂脂肪酸,包括 16:1 ω 8c,16:1 ω 5t 或 18:1 ω 8c 等,均未在菌株 V4 中找到,因此使用这些标识性脂肪酸进行研究时,不能发现 V4 类的甲烷营养细菌 [16]。

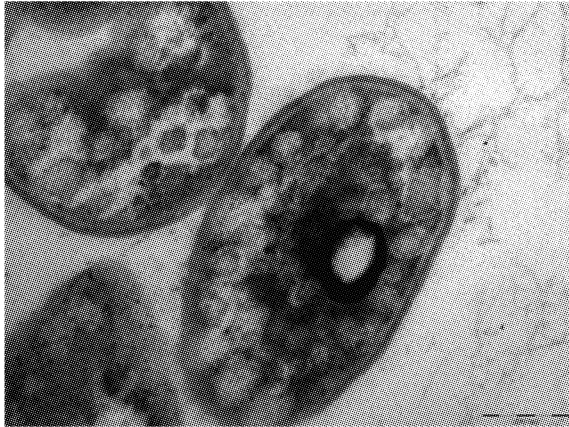


图2 菌株 SolV 细胞经戊二醛固定后的透射电镜显微照片 [6]

Fig. 2 Transmission electron micrograph of glutaraldehyde fixed SolV cells. Scale bar, 200 nm

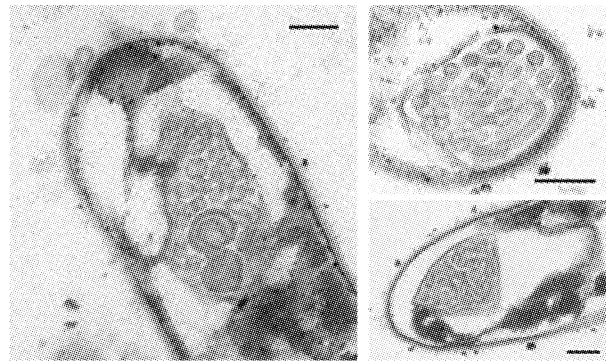


图3 菌株 V4 某些细胞中内膜结构的透射电镜显微照片 [4]

Fig. 3 Transmission electron micrographs of internal membrane structures observed in some cells of isolate V4. Scale bar, 100 nm

2.2 基因组分析

通过 16S rRNA 基因序列的比较分析,菌株 Kam 1 与可培养的变形菌型甲烷营养细菌亲缘关系较远,因而该菌可能是第 1 株非变形菌型的甲烷营养细菌 [5]。同时发现 Kam 1 与一组黄石国家公园酸性温泉的克隆子的序列相似性高达 98%,推测在黄石温泉和其它一些酸性或地热环境中也可能存在着与 Kam 1 相关的甲烷营养细菌。Kam 1 和这些克隆子在疣微菌门中形成了一个紧密簇,发现者将它命名为 VTAM,意思是疣微菌门中的嗜热酸性甲烷营养细菌。在 Kam 1 中没有发现甲烷营养细菌的标识基因,如 *pmoA*、*mmoX* 和 *mxoF* 等,也未发现与氨氧化酶相关的基因,这表明 Kam 1 中的甲烷氧化酶系与已知的甲烷营养细菌的可能不同 [5]。

在菌株 SolV 中,检测到了 pMMO 活性。测序发现 SolV 含有 2 个完整的 *pmoCAB* 操纵子和 1 个只含部分 *pmoC* 的 *pmoCAB* 操纵子,使用标准的 PCR 引物和方法时也扩增到了 *pmoA* 基因。对 *pmoA* 基因的系统进化分析表明 *pmoA1* 和 *pmoA2* 与来自富集菌体中的环境序列高度相似。而 *pmoA3* 基因代表着另一个全新的远缘分支。近期的基因组数据表明,在 α -或 γ -变形型甲烷营养细菌中,可能存在 2 个相同或者远缘的 *pmoA* 基因 [17~19]。菌株 SolV 中没有检测到 sMMO 活性,也未发现其亚基。基因组序列分析看到很多与 C1 代谢相关的基因,表明菌株 SolV 可能同时利用丝氨酸、四氢叶酸、核酮糖-1,5 二磷酸等途径进行碳固定;没有发现核酮糖单磷酸途径的诊断基因(图 4) [6]。甲醛的转化似乎是依赖于四氢叶酸途径来调节或者是直接由甲醛脱氢酶来调节,并且检测到了甲醇脱氢酶活性。

对菌株 V4 的研究发现,使用标准的 PCR 引物和方法没能从其 DNA 提取物中扩增出 *pmoA* 基因。通过对其基因组草图的分析,发现了 3 个完整的编码 pMMO 的 *pmoCAB* 操纵子 [4]。其中 *pmoA 1* 和 *pmoA 2* 序列更相似,两者与 *pmoA 3* 序列差异较大。鉴于 *pmoA* 基因是一个保守而相当可靠的系统发育学的标识基因 [20, 21],进

一步对菌株 V4 中 3 个推测的 PmoA 蛋白序列进行系统发生分析。比较发现,与其它的甲烷氧化和氨氧化微生物的 PmoA 蛋白和 AmoA 蛋白序列不同,V4 的这些序列单独聚集为一个进化分支,表明疣微菌门和变形菌门在古代就发生了分化,而不是近期 *pmo* 基因的水平转移。

与甲烷营养细菌基因组序列已知的 *Methylococcus capsulatus* 比较^[18],在菌株 V4 中也发现有编码 pMMO 的基因,及编码甲酸脱氢酶和甲胺脱氢酶的基因簇。两菌株还都含有编码亚硝酸还原酶、羟胺氧化还原酶、NO 还原酶的基因,这些基因编码的酶被认为是用来去除由 pMMO 对氨的竞争性氧化所产生的毒性副产物^[4]。然而,在 V4 菌株中没有发现甲醇脱氢酶和甲醛氧化过程中的四氢甲烷嘌呤酶。Dunfield 等^[4]认为菌株 V4 是第 1 株经过全测序后发现缺少四氢甲烷嘌呤途径对甲醛进行氧化的甲烷营养细菌(图 5)。甲醛氧化的另一种潜在的方式是利用四氢叶酸酶类^[18],其中的几种酶存在于 V4 菌株中,但是至今尚未验证一条完整的代谢途径。

甲烷营养细菌通常以核酮糖单磷酸或丝氨酸途径异养性同化固定碳。在菌株 V4 中,没有发现核酮糖单磷酸途径中的关键酶(己酮糖-6-磷酸合成酶和己酮糖-6-磷酸异构酶)的同族体^[22, 23]。然而,却发现了一些编码参与丝氨酸循环的酶的基因,这表明另一种形式的丝氨酸循环可能发挥同样功能(图 5)。此外,检测到了完整的卡尔文-本森循环(Calvin cycle)基因;根据基因组信息还能预测出一个完整的三羧酸循环(TCA cycle),但奇怪的是,菌株 V4 只能在 C1 底物 CH₄ 或甲醇上生长,而不能利用多碳底物^[4]。

2.3 3 株嗜热酸甲烷营养细菌氧化机制的比较

这 3 株最新发现的嗜热酸性甲烷营养细菌不仅在系统进化上与所有已知的甲烷营养细菌截然不同,同时也表现出独特的 CH₄ 氧化途径。嗜热型甲烷营养细菌 *Methylococcus capsulatus* Bath 的 pMMO 的晶体结构中含有 2 个铜结合位点与其 PmoB 蛋白联在一起,而与这 2 个铜结合位点相关的残基相对保守,但是,在菌株 V4 的 PmoB 蛋白的 3 个拷贝中均没有发现此类残基。另外,在 3 个菌株中均未发现 sMMO。三者不同之处表现在甲醇脱氢酶(由 *mxoF* 基因编码)的存在与否,在 Kam 1 中没有 *mxoF*,在 V4 中发现不完整的 *mxoF*,而在 SolV 中发现有完整的 *mxoF* 基因且能检测到甲醇脱氢酶活

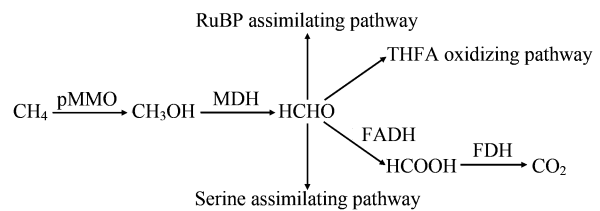


图 4 推测出来的菌株 SolV 的代谢途径^[6]

Fig. 4 The speculated metabolic pathway of nonproteobacterial strain SolV^[6]

RuBP assimilating pathway: 核酮糖二磷酸碳同化途径; Serine assimilating pathway: 丝氨酸碳同化途径; THFA oxidizing pathway: 四氢叶酸甲酰氧化途径; pMMO, 颗粒状甲烷单氧化酶; MDH, 甲醇脱氢酶; FADH, 甲醛脱氢酶; FDH, 甲酸脱氢酶

RuBP assimilating pathway means ribulose monophosphate pathway for assimilating carbon, Serine assimilating pathway means serine pathway for assimilating carbon, and THFA oxidizing pathway means tetrahydrofolate pathway for oxidizing formaldehyde. pMMO, MDH, FADH, and FDH represent the enzymes of particulate methane monooxygenase, methanol dehydrogenase, formaldehyde dehydrogenase, and formate dehydrogenase, respectively

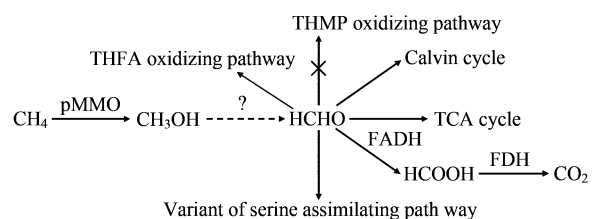


图 5 推测出来的菌株 V4 的代谢途径^[4]

Fig. 5 The speculated metabolic pathway of nonproteobacterial isolate V4^[4]

THMP oxidizing pathway: 四氢甲烷嘌呤甲酰氧化途径; THFA oxidizing pathway: 四氢叶酸甲酰氧化途径; Variant of Serine assimilating pathway: 变型的丝氨酸碳同化途径; Calvin cycle: 卡尔文-本森循环; TCA cycle: 三羧酸循环; pMMO, 颗粒状甲烷单氧化酶; FADH, 甲醛脱氢酶; FDH, 甲酸脱氢酶

THMP oxidizing pathway means tetrahydromethanopterin pathway for formaldehyde oxidation, THFA oxidizing pathway means tetrahydrofolate pathway for oxidizing formaldehyde, and variant of Serine assimilating pathway means a variant of serine cycle may function in carbon assimilation; Calvin cycle and TCA cycle mean Calvin-Benson Cycle and tricarboxylic acid cycle for carbon fixation, respectively; pMMO, FADH, and FDH represent the enzymes of particulate methane monooxygenase, formaldehyde dehydrogenase, and formate dehydrogenase, respectively

性。同时,这些新鉴定的甲烷营养细菌可能也利用了新型的碳同化途径。菌株 SolV 和 V4 不仅利用变形菌型甲烷营养细菌氧化甲醛的四氢甲烷蝶呤(THMP)途径,还可能利用了四氢叶酸酶。在 V4 和 SolV 中也都鉴定出卡尔文—本森循环中的重要基因,在 V4 菌株中甚至发现了整套卡尔文—本森循环的基因,表明该循环可能与 V4 同化碳过程有关(图 5)。3 个菌株都具有区别于变形菌型甲烷营养细菌的明显相似的内膜结构(图 1 ~ 图 3),这些膜结构可能是类似于羧酶体的细胞结构。事实上,菌株 V4 的生长还强烈依赖 CO_2 , CO_2 存在时的生长速率比无 CO_2 时要高 2 个数量级。总之,这些数据表明嗜热酸甲烷营养细菌可能利用的是一种独特的碳同化途径。

这些甲烷营养细菌尽管是从极端环境中分离获得,但它们细胞的生长速率与普通甲烷营养细菌相似^[7],表明嗜热酸甲烷营养细菌种群可能大量存在于类似的极端环境中,因此它们可能在调节全球 CH_4 释放方面发挥着重要作用。另外,3 株分离培养物均不能利用多碳化合物,表明它们是专一性的甲烷营养细菌,而不同于先前发现的 *Methylocella silvestris* 等中度嗜酸性兼性甲烷营养细菌^[24]。

2.4 疣微菌门(Verrucomicrobia)的研究现状

新发现的 3 株菌嗜热酸甲烷营养细菌 Kam 1、SolV 及 V4 的一个最大共同点在于,它们均归属于疣微菌门(Verrucomicrobia)。疣微菌分支在 1997 年首次提出^[25],它包括 6 个亚类^[26, 27],广泛分布于水体和陆地环境,以及人类和动物的肠道^[26~29]。在土壤中,它们占总细菌的 1% ~ 10%^[30~33],表明它们充当着重要的生态角色。稳定同位素探测实验证明,疣微菌是酸性土壤^[34]和碱性沉积物^[35]中 CH_4 循环的参与者,因此它们可能极富生态多样性。Dunfield 等^[4]最近还从一处酸性泥浆的混合培养物中获得另一株疣微菌,其 16S rRNA 基因序列与 V4 的同源性小于 90%。由于样品也是取自同一地热区域,此发现恰恰说明疣微菌型甲烷营养细菌不但种类繁多,而且极富环境耐受能力。目前,疣微菌门中仅有少数几株菌被分离和培养,发现它们都是嗜中温的烃类降解菌^[27]。还没有分离培养得到亚类 3 中的菌株,直到在一项关于土壤微生物群落的研究中,在含有烃类作为底物的琼脂平板上长出的菌斑被鉴定为此亚类的成员^[36]。因此,Km 1 等 3 株菌的甲烷氧化作用及其嗜热酸特性表明,Verrucomicrobia 的代谢和生理多样性要远远大于目前的已知结果。

3 结语

3 株新发现的嗜热酸甲烷营养细菌均属于 Verrucomicrobia,16S rRNA 基因序列表明它们明显区别于大多数变形菌门的甲烷营养细菌。由于 Verrucomicrobia 广泛出现在各类环境中,但典型的代表较少,因此这些发现表明 Verrucomicrobia 可能在碳生物地球化学循环中发挥着重要作用,也大大丰富了温室气体 CH_4 作为全球碳循环重要环节的生态学内涵。考虑到这几株嗜热酸甲烷营养细菌分离来源的范围之广,可以初步断定细菌氧化 CH_4 的贡献比先前认知的要大。因此,在今后的研究中,一方面可以有针对性的对 Verrucomicrobia 的生态分布进行调查,同时探究属于其它门类的甲烷营养细菌的存在,更加充分地了解未知的营甲烷微生物;另一方面可以利用比较基因组学和比较蛋白组学方法对这些嗜极端微生物的独特生理结构及其功能进行深入的研究,认识其代谢机理;在不断扩展对甲烷氧化作用认知的同时,还可以利用基因改良手段来构建高效专一的工程菌株加以应用,降低大气 CH_4 浓度,缓解由温室效应导致的全球气候变化问题。

References:

- [1] Intergovernment Panel on Climate Change (IPCC). Climate Change 2007: The physical science basis. Working Group I contribution to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- [2] Lowe D C. A green source of surprise. Nature, 2006, 439(7073): 148—149.
- [3] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria. Microbiological Reviews, 1996, 60(2): 439—471.
- [4] Dunfield P F, Yuryev A, Senin P, et al. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. Nature, 2007, 450(7171): 879—882.
- [5] Islam T, Jensen S, Reigstad L J, et al. Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(1): 300—304.

- [6] Pol A, Heijmans K, Harhangi H R, *et al.* Methanotrophy below pH 1 by a new Verrucomicrobia species. *Nature*, 2007, 450(7171): 874—878.
- [7] Semrau J D, DiSpirito A A, Murrell J C. Life in the extreme: thermoacidophilic methanotrophy. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(5): 190—193.
- [8] Bodrossy L, Murrell J C, Dalton H, *et al.* Heat-tolerant methanotrophic bacteria from the hot water effluent of a natural-gas field. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(10): 3549—3555.
- [9] Bodrossy L, Holmes E M, Holmes A J, *et al.* Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. *Archives of Microbiology*, 1997, 168(6): 493—503.
- [10] Bodrossy L, Kovacs K L, McDonald I R, *et al.* A novel thermophilic methane-oxidising gamma-*Proteobacterium*. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 170(2): 335—341.
- [11] Dedysh S N, Panikov N S, Liesack W, *et al.* Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. *Science*, 1998, 282(5387): 281—284.
- [12] Dedysh S N, Liesack W, Khmelenina V N, *et al.* *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(3): 955—969.
- [13] Dedysh S N, Khmelenina V N, Suzina N E, *et al.* *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from *Sphagnum* bog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(1): 251—261.
- [14] Trotsenko Y A, Khmelenina V N. Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Archives of Microbiology*, 2002, 177(2): 123—131.
- [15] Whittenbury R, Phillips K C, Wilkinson J F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilising bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1970, 61(2): 205—218.
- [16] Dedysh S N, Belova S E, Bodelier P L E, *et al.* *Methylocystis heyeri* sp. nov., a novel type II methanotrophic bacterium possessing ‘signature’ fatty acids of type I methanotrophs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(3): 472—479.
- [17] Dunfield P F, Yimga M T, Dedysh S N, *et al.* Isolation of a *Methylocystis* strain containing a novel *pmoA*-like gene. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 41(1): 17—26.
- [18] Ward N, Larsen O, Sakwa J, *et al.* Genomic insights into methanotrophy: the complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Plos Biology*, 2004, 2(10): 1616—1628.
- [19] Yimga M T, Dunfield P F, Ricke P, *et al.* Wide distribution of a novel *pmoA*-like gene copy among type II methanotrophs, and its expression in *Methylocystis* strain SC2. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5593—5602.
- [20] Dumont M G, Murrell J C. Community-level analysis: key genes of aerobic methane oxidation. *Methods in Enzymology*, 2005, 397: 413—427.
- [21] Knief C, Lipski A, Dunfield P F. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6703—6714.
- [22] Kelly D P, Anthony C, Murrell J C. Insights into the obligate methanotroph *Methylococcus capsulatus*. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(5): 195—198.
- [23] Trotsenko Y A. Metabolic features of methane- and methanol-utilizing bacteria. *Acta Biotechnologica*, 2004, 3(3): 269—277.
- [24] Dedysh S N, Knief C, Dunfield P F. *Methylocella* species are facultatively methanotrophic. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(13): 4665—4670.
- [25] Hedlund B P, Gosink J J, Staley J T. Verrucomicrobia div. nov., a new division of the bacteria containing three new species of *Prostheobacter*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1997, 72(1): 29—38.
- [26] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(18): 4765—4774.
- [27] Sangwan P, Chen X L, Hugenholtz P, *et al.* *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, Spartobacteria classis nov., of the phylum Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(10): 5875—5881.
- [28] He J Z, Xu Z H, Hughes J. Molecular bacterial diversity of a forest soil under residue management regimes in subtropical Australia. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 55(1): 38—47.
- [29] Wagner M, Horn M. The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(3): 241—249.

- [30] Buckley D H, Schmidt T M. Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35(1): 105 — 112.
- [31] Buckley D H, Schmidt T M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(6): 441 — 452.
- [32] Felske A, Akkermans A D L, De Vos W M. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11): 4581 — 4587.
- [33] Felske A, Wolterink A, Van Lis R, *et al.* Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 3998 — 4003.
- [34] Morris S A, Radajewski S, Willison T W, *et al.* Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1446 — 1453.
- [35] Lin J L, Radajewski S, Eshinimaev B T, *et al.* Molecular diversity of methanotrophs in Transbaikial soda lake sediments and identification of potentially active populations by stable isotope probing. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(10): 1049 — 1060.
- [36] Sangwan P, Kovac S, Davis K E R, *et al.* Detection and cultivation of soil Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8402 — 8410.