

土壤中温泉古菌研究进展

贺纪正*, 沈菊培, 张丽梅

(城市与区域生态国家重点实验室, 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要: 古菌一直被冠以嗜极端环境的特征, 直到最近十几年, 由于分子生物学技术的发展, 越来越多的证据表明, 在许多非极端环境, 包括海洋、湖泊和土壤中, 分布着一类特殊的古菌—非嗜热泉古菌 (non-thermophilic *Crenarchaeota*)。该类古菌不仅分布广泛, 而且数量巨大。通过 16S rRNA 基因序列分析发现, 中温泉古菌可能参与到全球碳、氮等生物地球化学循环, 预示着其在整个生态系统中起着重要的作用。从古菌分类着手, 阐述了中温泉古菌在土壤中的分布和数量特征、影响因素, 进而对其在氮和碳循环过程中的潜在作用进行了简要介绍, 并提出了今后的研究重点。

关键词: 古菌; 中温泉古菌; 多样性; 丰度; 土壤环境

文章编号: 1000-0933 (2009) 09-5047-09 中图分类号: Q142, Q938 文献标识码: A

Advance in the research of soil non-thermophilic *Crenarchaeota*

HE Ji-Zheng*, SHEN Ju-Pei, ZHANG Li-Mei

State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China
Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(9): 5047 ~ 5055.

Abstract: Archaea have long been recognized as the microorganisms of extreme environments. With the rapid development of molecular biological techniques and their applications to the archaeal community studies, non-thermophilic *Crenarchaeota* are found widely distributing in moderate environments, such as marine, lakes and soils. Based on the analysis of archaeal 16S rRNA genes, the broad distribution and rich abundance of the non-thermophilic *Crenarchaeota* may contribute to the carbon and nitrogen cycles, indicating their potential roles in the global energy cycles. This paper reviewed the distribution and abundance of the non-thermophilic *Crenarchaeota* in soil ecosystems, introduced their ecological functions in soil carbon and nitrogen cycles, and foresaw the perspectives in the research field.

Key Words: Archaea; non-thermophilic *Crenarchaeota*; diversity; abundance; soil habitat

1977 年, Woese 和 Fox 提出将在极端高温、高盐、酸性和厌氧等环境下发现的古菌 (Archaea) 作为有别于真核生物 (Eukarya) 和细菌 (Bacteria) 的另一种生命形式, 构成生物的三域系统^[1] (图 1)。古菌和细菌具有类似的细胞结构, 如细胞核没有核膜包裹, 曾一度被认为是原核生物中更原始的一个分支。而对 16S rRNA 基因的比较分析发现, 古菌与真核生物在进化树上具有更近的亲缘关系 (图 1)。在基因转录过程上, 古菌也显示出与真核生物更多的相似特征, 例如, 古菌的转录系统使用真核生物的启动和延伸因子, 且其 RNA 聚合酶的结构与真核生物更相似^[2]。由于古菌的特殊生理特征, 有关其在极端环境下的生存机制一直受到人们的广泛关注。20 世纪 90 年代, Fuhrman 和 DeLong^[3~5] 通过对 16S rRNA 基因序列分析, 发现之前在极端环境如海底深处、火山口、热泉等才能找到的古菌在不同的海洋环境中均有分布, 并将其称为非嗜热泉古菌 (non-thermophilic *Crenarchaeota*), 或称中温泉古菌。此后在很多不同的生境, 包括森林土壤^[6,7]、草地^[8]、浅水^[9]、沉积物^[10] 以及陆水生动物的组织中^[11,12], 都发现了中温泉古菌的踪迹。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40871129, 40701087)

收稿日期: 2008-12-30; 修订日期: 2009-01-11

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

近年来,宏基因组学的研究揭示了未培养的中温泉古菌携带有与细菌氨氧化基因类似的基因^[13,14],通过分离培养的方法还获得一株具有氨氧化活性的泉古菌(*Nitrosopumilus maritimus*)^[15],进一步明确了泉古菌在氮循环过程中的作用。最近,《科学》杂志报道在海底沉积物中古菌占原核生物量的 87%,是地球上一个潜在的碳库^[17]。这些新的发现更激起了人们对古菌研究的兴趣。本文主要从古菌分类着手,详细阐述土壤中温泉古菌多样性特征、影响因素和数量分布,进而对其在土壤碳、氮循环过程中的潜在作用进行了简要概括,提出了今后应加强研究的几个方向。

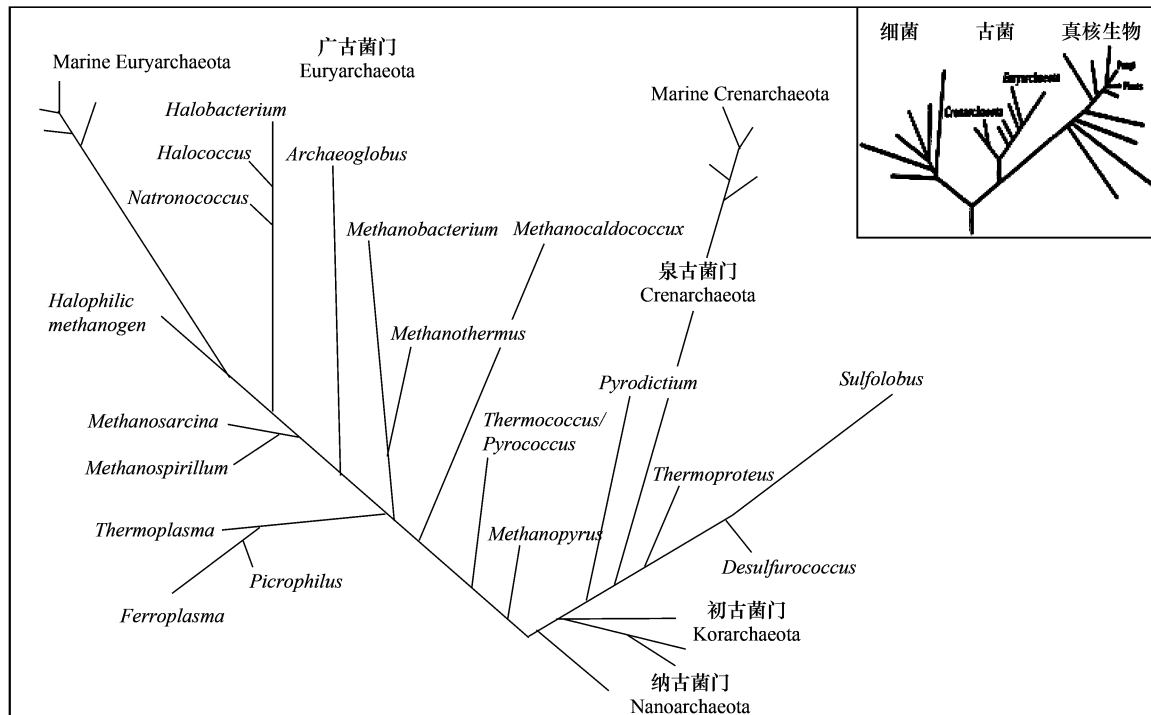


图1 古菌 16S rRNA 基因系统发育树^[18]

Fig. 1 Phylogenetic tree of Archaea and the three domain system

图示右上方为泛生命系统树,显示古菌在生物进化树的位置 The top right showing the position of Archaea in the system; 古菌的四大门: 广古菌门、泉古菌门、初古菌门和纳米古菌门; 三域系统: 细菌、古菌和真核生物 Four phyla of archaea: Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota and Nanoarchaeota; Three domain system: Bacteria, Archaea and Eucarya

1 古菌的分类系统

根据对核糖体小亚基 16S rDNA 的同源性分析将古菌分为 4 个门:包括广古菌门(*Euryarchaeota*)、泉古菌门(*Crenarchaeota*)和另外两类未确定的分别来源于美国黄石公园极端热环境中的初古菌门(*Korarchaeota*)和由 Karl Stetter 于 2002 年在冰岛的热泉口发现的奇特物种 *Nanoarchaeum equitans* 构成的纳米古菌门(*Nanoarchaeota*)^[19,20](图 1)。广古菌门包含了古菌中的大多数种类,包括广泛生活于各种厌氧环境(如湿地环境和动物肠道)中的产甲烷菌、在极高盐浓度下生活的盐杆菌、一些极端嗜热的好氧和厌氧菌、海洋广古菌类群,它们在 16S rDNA 系统发育树上组成一个分支。泉古菌是古菌的另一个大分支,包括很多极端嗜热类群(thermophilic *Crenarchaeota*)、在海洋浮游生物中占有相当比例的中温类群、以及一些从肠道中分离出的种类(餐古菌目),这些泉古菌的 16S rDNA 序列与其它古菌的亲缘关系相对较远。嗜热泉古菌和中温泉古菌的主要区别在两个方面,首先是温度和 pH 值的适应范围,前者主要生活在高温(高于 80℃)和低 pH 值(小于 6)环境,而后的生存温度一般低于 32℃,pH 范围也比较广;其次是 DNA 的碱基组成,嗜热泉古菌的 G + C 摩尔百分含量较高(60mol% ~ 90mol%),而中温泉古菌为 51mol% ~ 58mol%^[3,21]。基于 16S rRNA 基因同源性

分析,中温泉古菌主要分为以下几大类,即 Group 1.1, Group 1.2, Group 1.3 和 MBG (Marine Benthic Group)^[22]。最近报道海洋中还存在 DSAG (deep-sea archaeal group) 以及 Group MCG (Miscellaneous Crenarchaeotic Group)^[23,24]。土壤中发现的中温泉古菌主要为 Group 1.1 中的 1.1b 和 1.1c,还有一部分为 Group 1.1a。另有研究对 1.1a 作了进一步的分类,分为 5 个亚群: α , β , γ , δ 和 ε (图 2)^[25]。初古菌门是通过荧光原位杂交确认它们存在的,目前还没有培养成功的样品,与其它生物的关系也尚未确定。它们有可能并不是一个独立的类群,而是 16S rRNA 基因发生了某些快速或特殊突变的种类。纳古菌的细胞直径大约 400 nm,基因组只有 48 万个碱基对,这是目前已发现的有细胞生物中(即除病毒之外)基因组最小的生物。它的 16S rRNA 基因序列和其它生物相差很大,现在还不能通过 PCR 等分子方法进行分析,分类上也未确定。

2 中温泉古菌在土壤中的分布

土壤中的古菌主要分布在广古菌和泉古菌两大门,并以中温泉古菌为主^[8,30]。中温泉古菌在土壤中不仅分布广泛,且多样性丰富,对土壤中温泉古菌多样性分布和丰度的研究将为揭示其在土壤生态系统能量代谢过程中的生态作用提供依据。

2.1 中温泉古菌的多样性特征

与细菌的多样性相比,土壤中古菌多样性有很多独特的地方^[31]。有文献表明绝大多数古菌的多样性要小得多,而且种群分布在土壤层次间也有一定的专一性^[32,33]。从同一环境样品分析得到的结果显示,古菌的 16S rRNA 基因文库大小或者多样性远远没有细菌来的大。分析其原因,有科学家认为这是由于古菌相对于细菌,对生存环境或者底物的要求更苛刻^[34]。以上研究一致认为在分析古菌多样性的过程中不能单纯的根据 16S rRNA 基因文库的大小来评论,而是需要更深入的研究才能有一个较为清晰的反映。然而,也有人认为,正是由于古菌种群的相对简单和对环境变化的响应特性,有可能使其成为比细菌更为特异的指示群落,可作为评价环境体系的指标^[35]。例如, Ochseneiter 等^[27]在研究中发现, Group 1.1b 是土壤中分布最为广泛的一个古菌类群,并且认为该种群是古菌中最能与多样性极为丰富的细菌进行有效竞争的一个类别。另外,细菌的多样性在某种程度上还与古菌的多样性有一定的相关性,比如,一些影响细菌群落的环境因子也改变了那些可被古菌利用的底物,最终对古菌的多样性产生影响^[36]。

2.2 中温泉古菌在土壤中的分布

中温泉古菌在陆地环境中分布广泛^[22,27],在农业土壤^[37,38]、森林土壤^[7,39]、草原^[8,40]、水稻田^[41,42]、以及退化冰川高山等土壤中均有发现^[30,43]。

对泉古菌 16S rRNA 基因的系统发育分析显示,土壤来源的泉古菌主要集中在 Group 1,且以 1.1b 和 1.1c 为主^[6,33,39],少数属于 1.1a^[30]。比如, Nicol 等^[40]在英国 Scotland 地区最常见土壤类型草地上就检测到了这两类土壤泉古菌, Groups 1.1b 和 1.1c; 根据 Sliwinski 和 Goodman^[44]应用 SSCP 技术(单链构象多态性分析, Single strand conformation polymorphism)和克隆文库的方法对威斯康星州不同环境土壤样品的检测结果,所有土壤样品的古菌均以 Group 1.1b 为主; Kemnitz^[7]等对酸性森林土壤样品分析结果表明其中的泉古菌却以 Group 1.1c 为主。尽管对土壤中泉古菌的分布尚没有一致的认识,但多以 Group 1.1b 为主,包括在不同的 pH 值、土壤温度等环境^[27]。与 Group 1.1b 相比, Group 1.1c 的分布受很多土壤环境因子的限制,表现出明显的特异性分布特征^[30,43]。Nicol 等^[30]研究发现, Group 1.1c 主要适合生长在低 pH 值土壤,如在 pH 值低于 5 的酸性高山草地或是 pH 值低于 3 的沼泽地^[45],而在 pH 值大于 7 的草地试验区未能检测到 Group 1.1c^[8,40]。

在外界环境因子作用下土壤泉古菌群落组成会发生很大的变化。比如在奥地利阿尔卑斯中脉退化冰河陆地土壤中,发现一个很清晰的古菌群落原生演替现象,而且在所有的演替时间内均能检测到土壤泉古菌 Group 1.1b,而 Group 1.1c 却只发现于成熟土壤^[30];在该山脉的另外两个地点(Rotmoosferner 和 Ödenwinkelkees)也得到了类似的结果^[43]。Pesaro 和 Widmer^[39]利用限制性内切酶 *Hae*III 对森林表层土(0~9 cm)和底层土(50~100 cm)的泉古菌 16S rRNA 基因克隆文库进行限制片段长度多态性(RFLP)分析,发现古菌在土壤层次间也存在着明显的群落演替现象,而且广古菌与泉古菌的比率随着土壤层次加深而下降。

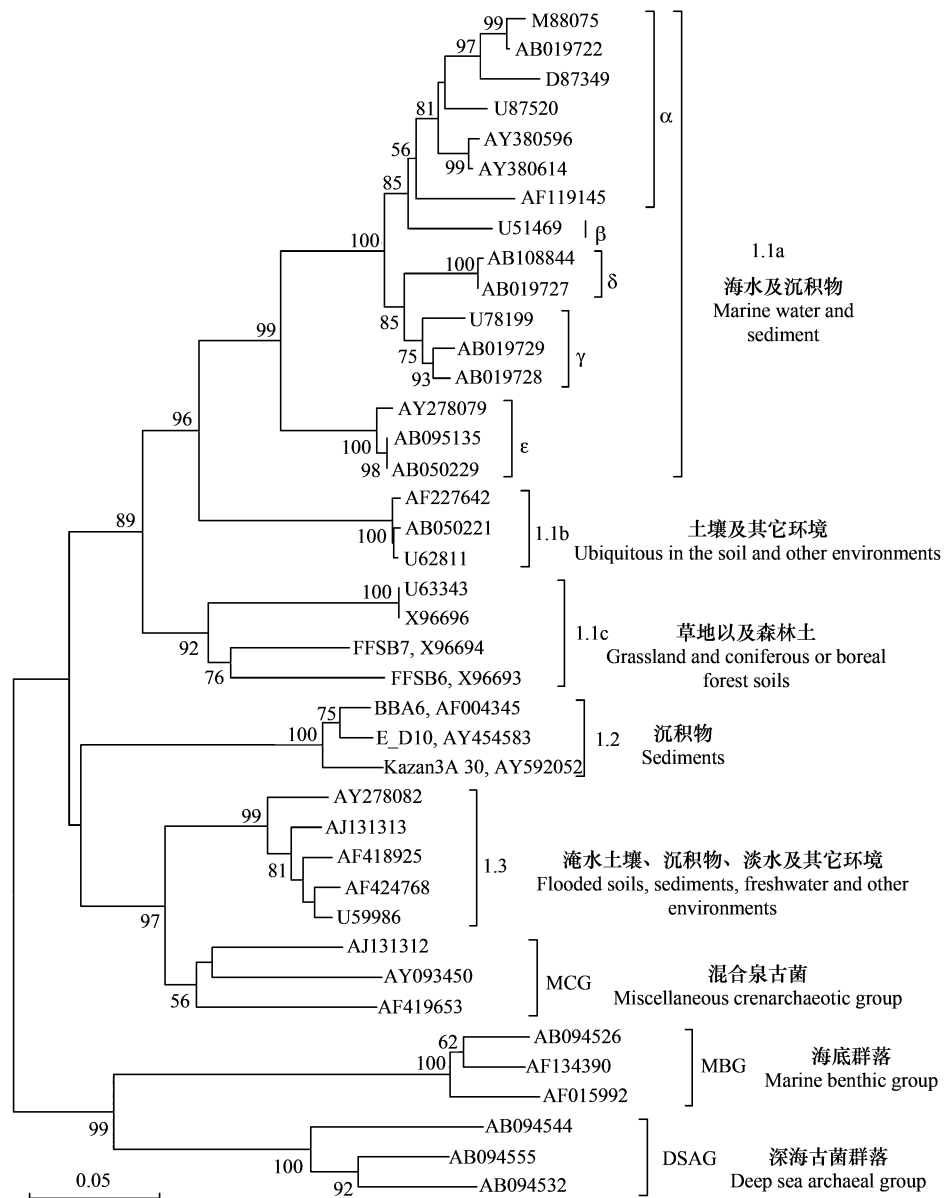


图2 环境中中温泉古菌的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of representative non-thermal Crenarchaeotal phylotypes from environmental samples

所用序列来自 NCBI 数据库^[19, 25~29], 进化树根据 16S rDNA 序列按 Neighbor-joining 算法构建, 并经 1000 次计算的 Bootstrap 检验; 标尺代表 5% 序列变异 The sequences were retrieved from NCBI database; The tree was constructed by neighbor-joining analysis of the 16S rDNA sequences. Bootstrap analysis was performed with 1000 replicates; The scale bar indicates 5% estimated sequence divergence

2.3 中温泉古菌在土壤中的数量

理解中温泉古菌在原核生物体系中所占的比重, 对重新评价微生物各大类群在生态系统中的作用具有重要意义。对海洋环境中中温泉古菌数量的研究发现, 绝大多数海洋中温泉古菌属于 Group 1.1a, 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析显示其在环境中含量非常丰富, 可占海洋全部浮游原核生物的 20%, 而在深海海域中则成为优势群落, 其生态地位不言而喻^[5, 46, 47]。土壤中的中温泉古菌主要为 Groups 1.1b 和 1.1c, 其含量也很高, 约占全部原核生物的 1%~5%^[27, 48], 在酸性森林土壤中达到 12%^[7]。有趣的是, 虽然土壤细菌的数量远远高于古菌, 而在整个原核生物中古菌的比重随土壤层次加深而趋于增大, 比如在酸性森林土壤中从 12% 增加到 38%^[7]。

在草地生态系统中的研究发现,泉古菌的数量远远大于广古菌^[8,30]。也有研究报道,在土壤 16S rRNA 基因克隆文库中未发现广古菌的序列,这可能和土壤氧气状况有关^[27],因为广古菌的主要生境是厌氧环境(甲烷古菌但不是嗜盐古菌),比如水稻田^[49,50],或者湖底沉积物的甲烷产生区^[51]。利用 rRNA 印迹杂交技术也发现耕作土中中温泉古菌数量占整个微生物群落的 1.5%,且与古菌在整个原核生物中的比率非常接近^[48]。尽管还没有对土壤广古菌和泉古菌丰度进行系统比较分析的研究,然而已有结果表明,海水中的泉古菌在数量上占有优势,比如在北太平洋亚热带地区,广古菌在整个水域中数量比较小,而中温泉古菌不仅数量庞大且其在整个原核微生物中的比重随海水深度加深而增加^[47]。可见,中温泉古菌在生态系统中占有重要地位。

2.4 影响中温泉古菌在土壤中分布的因素

土壤是一个复杂的异质体系,这决定着土壤中微生物群落的分布和数量受土壤理化性状的影响。土壤泉古菌分布不仅与土壤养分状况紧密相关^[32,52,53],也与土壤 pH 值^[54,55]、土壤层次深度^[56]、污染状况^[35]、植被^[38]和土壤管理方式^[40]有很大的关系。土壤剖面上有机碳组成和可利用性的变化可能引起泉古菌在剖面上的分布差异^[7,39]。Hansel 等^[33]应用克隆文库的方法调查了微生物在土壤剖面上的空间分布,结果发现几乎所有属于 Group 1.1b 的序列只分布在土壤水饱和 C 层,而在水不饱和 C 层和 B 层却没有找到,但在这两个土层中却发现了属于 Group 1.1c 和两个与 Group 1.1a 很接近的序列。在厌氧培养土柱中,发现古菌丰度和甲烷释放的增加与新鲜有机物的添加有关^[52]。Nicol 等^[32]曾用培养的方法,试图探索驱动草地泉古菌群落变化的影响因子,分别采用提高 pH 值、施用无机氮肥和羊尿添加等方法,结果所有处理均未能检测到土壤泉古菌群落的变化。然而,根据对长期定位试验站的调查结果,土壤 pH 值影响氨氧化泉古菌群落和丰度,尤其在酸性土壤^[54]。同样,Nicol 等^[55]最新发表的结果也显示,氨氧化泉古菌的群落结构在不同 pH (4.9~7.5) 的长期影响下产生了明显的变化。

由于水分、植物根系以及通气状况等的差异,不同空间层次的土壤微生物区系间会有较大差异。对古菌群落变化与土壤不同层次理化性状的相关性分析发现,随土壤剖面加深,土壤有机质和总氮含量明显降低,同时土壤广古菌和中温泉古菌也随之减少,而土壤质地和 pH 值没有表现出显著的变化^[39]。Jackson 等^[56]用 16S rRNA 基因构建克隆文库的方法对森林泥炭土的剖面进行分析,发现表层土壤中(0 cm 和 10 cm)未能检测到古菌序列,而在深层土壤中(20 cm 和 50 cm)获得了属于泉古菌的序列,且在這些土层中未检测到广古菌序列。土壤泉古菌的分布还与污染状况有关,虽然这方面的研究不多,却已有报道显示重金属在某种程度上会对古菌的生长和生存产生毒害,比如在污灌土壤中泉古菌的多样性条带和种群分布与未污染土壤相比发生了很大的变异^[35]。

植物根系是影响土壤泉古菌组成的一个潜在的重要驱动力,而泉古菌也可能在调节根际物质循环中起着重要作用。Bomberg 等^[57]在 Scot 松树树苗的外菌根根际中检测到 Group 1.1c 序列,这也表明特殊的菌根可能影响泉古菌群落。另外有研究发现,在玉米根际土壤中发现的泉古菌种群与海洋泉古菌的序列有很高的相似性^[58]。Simon 等^[38]发现泉古菌可能参与根系生物代谢,并在西红柿根系成功富集到泉古菌。这些结果为泉古菌可能为异养型微生物的推论提供了依据^[7]。同样,在水稻土中发现氨氧化泉古菌在根际要比非根际丰富,而且比不种水稻的水稻田也丰富,说明水稻根系不仅改变了泉古菌的数量而且对群落结构也产生了很大的影响^[59]。

除受以上因素影响外,土壤泉古菌的多样性同时也受其他土壤生命活体,比如细菌等的影响。由于土壤生态系统时间和空间上的复杂性,需要更深入的研究去探索泉古菌在土壤中的分布及其生理生化特性。

3 中温泉古菌在氮、碳循环中的作用

中温泉古菌在自然界中广泛而大量的分布,暗示其在生态系统中的重要作用。它丰富的多样性为更好地研究整个生态系统的微生物功能提供了重要的信息,在生态系统物质循环,尤其是在氮、碳转化中起着重要的作用^[60]。

3.1 中温泉古菌与氨氧化作用

关于中温泉古菌在氮循环中的作用,最早的证据来自于对氨氧化泉古菌的研究。Venter 等^[13]应用鸟枪

法对 Sargasso 海中的宏基因组的测序分析发现其中存在属于泉古菌的氨单加氧酶基因(*amoA*)序列;Treusch 等^[14]在一个 43 kbp 的土壤宏基因组片段中发现编码潜在的细菌氨单加氧酶 A 和 B 亚基的同源基因,该基因与泉古菌组 1.1b 的 16S rRNA 基因相邻。这两个研究首次分别揭示了海洋和土壤体系中温泉古菌中氨氧化基因的存在,获得了中温泉古菌具有氨氧化能力的遗传学证据。Könneke 等^[15]成功地从海水中分离到一株泉古菌 *Nitrosopumilus maritimus*,该菌具有氨单加氧酶基因的所有成员 *amoA*、*amoB* 和 *amoC*,且以氨为唯一能源进行自养生长。这一发现有力地证实了氨氧化泉古菌与氨氧化作用之间的内在联系^[15]。

2006 年 Leininger 等^[61]在 Nature 杂志上发表了对 12 个跨越 3 个气候带的原始土壤和农业土壤的研究结果,发现这些来源广泛的土壤中,泉古菌 *amoA* 基因的拷贝数是 β -变形菌纲细菌的 3000 倍,*amoA* 基因的拷贝数与泉古菌特有的细胞脂质(包括 crenarchaeol)含量呈显著正相关。同时,应用反转录定量 PCR 和焦磷酸测序技术对 cDNA 的测序分析都证实了 *amoA* 基因的原位表达活性与 *amoA* 基因数量的研究结果一致,即泉古菌 *amoA* 基因的拷贝数高于氨氧化细菌。含有 *amoA* 基因的泉古菌也被称为氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA),相应地,将含有 *amoA* 基因的细菌称为氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)。不论在 pH 很低的酸性红壤还是在碱性潮土中,氨氧化泉古菌 *amoA* 基因的拷贝数都明显高于氨氧化细菌^[54, 62]。应用克隆文库的方法发现古菌 *amoA* 基因与古菌 16S rRNA 基因在多样性、数量和分类上极其相似^[33],可以推测,环境中绝大多数中温泉古菌为氨氧化古菌,并且在这些环境的氮循环过程中可能起着重要作用^[22, 29, 63]。

3.2 泉古菌与碳循环

泉古菌在碳代谢中的重要作用,关键的证据来自泉古菌参与了海洋碳循环过程。在地中海和太平洋 200 米深的海域中,用底物示踪显影和荧光原位杂交相结合的方法检测到 60% 的中温泉古菌可主动吸收可溶性氨基酸^[60]。应用碳辐射和同位素示踪的方法揭示出海洋浮游泉古菌是以可溶性无机碳作为碳源的^[64, 65]。另外,对泉古菌 *Cenarchaeum symbiosum* 与海绵共生体的宏基因组学的研究发现,在 *C. symbiosum* 基因组中存在编码类似 3-羟基丙酸循环(碳的自养同化作用过程)及三羧酸循环所需的几乎全部基因,表明这个生物能够进行专性自养,或能以 CO₂ 和有机物为碳源的混合营养^[63]。Ingalls^[66]等应用古菌膜脂中自然分布的放射性碳来定量亚热带北太平洋环流两个不同深度的古菌群落的总碳代谢,发现在水表层区古菌膜脂中的碳为现代的,而在 670m 深处的古菌膜脂的碳有与同一深度处无机碳相近的同位素富积。而最新的结果更证实了泉古菌的这一作用,如 2007 年 Science 上报道在古菌体内发现的一条被称为第五途径的二氧化碳固定途径^[16];2008 年 Nature 上报道,在世界 16 个海域挖掘的海底之下 10cm 至 365m 的沉积物内生存着大量古菌,生物量占有原核生物生物量的 87%,真细菌只占 13%^[17];同时还提出海洋泉古菌可能是生物能量的储存库,因为以碳元素来衡量,整个地球海底之下地层中的古菌总量可达 900 亿 t,相当于陆地土壤中各种微生物总量的 3 倍以上^[17]。可见,古菌作为一种潜在的巨大碳库,将会在未来的研究中逐步显示出其重要的功能作用。

可以预见,随着技术手段的发展和研究领域的拓宽,泉古菌在生态系统物质和能量循环过程中的作用将会越来越受到研究者的重视,对土壤中泉古菌多样性和生态功能的认识会越来越清楚。

4 展望

国内对于泉古菌的研究虽不多,但对古菌的关注和研究已有较长时间,在古菌资源、生理生化、遗传和进化机理方面开展了较多工作,如 2004 年 10 月由中国科学院微生物研究所东秀珠研究员主持承担,多个高校院所参与的国家重点基础研究发展规划项目“极端微生物及其功能利用的基础研究”的获批足以说明对古菌基础研究的重视^[67]。山东大学微生物技术国家重点实验室对海洋微生物和极端微生物酶也作了多方面的工作^[68]。这些研究主要集中在极端环境或海洋领域,而对陆地环境、尤其是土壤中的中温泉古菌的研究还很少。此外,虽然泉古菌在自然界中广泛存在,但是到目前为止,分离到的菌株一般都是来自极端环境的嗜热菌,直到 2005 年才从海洋中分离到一株氨氧化泉古菌^[15]。到目前为止,还没有从土壤中分离到氨氧化古菌。值得高兴的是,国内已有关于土壤中泉古菌的研究报道。例如,有研究对两个分别取自中国新疆和广西土壤及两个美国亚利桑那州南部地区的土壤古菌进行了分析,发现所有这些 16S rDNA 的序列都归类于古菌的泉

古菌门(*Crenarchaeota*),且明显区别于海洋和淡水地带的泉古菌种群^[53]。对几种土壤中氨氧化泉古菌的组成和数量进行了较系统的研究,发现它们较氨氧化细菌更丰富^[54, 59, 62],甚至其组成可随环境条件变化而改变^[54]。由于中温泉古菌在地球上分布广泛,数量巨大,其在生态系统尤其是在土壤中的生态效应是目前亟待解答的问题,需要受到研究者更多的关注。

分子生物技术包括 rRNA 基因序列分析、定量 PCR、荧光原位杂交及宏基因组学等方法的应用大大促进了古菌生态学研究的发展,而对这类分布广泛的泉古菌在生态系统中的功能作用的研究才刚刚起步。稳定性同位素标记技术与分子生物学技术相结合发展起来的稳定性同位素探测技术(stable isotope probing, SIP),在对复杂群落中参与特定基质代谢的微生物进行分类鉴定的同时,确定其在这些物质转化过程中的作用,从而分析其在生态系统中的功能,近来已被逐步应用于环境中微生物多样性与生态系统功能相互关系研究中,具有巨大的应用潜力^[69]。今后对土壤中温泉古菌研究的重点可以放在以下几个方面:(1)根据不同的需要,综合并改进微生物培养方法,实现从土壤中分离培养中温泉古菌目标,尤其是分离培养对氮、碳循环起作用的中温泉古菌,推动土壤氮、碳循环过程及机理研究方面的突破;(2)结合由分子生物学技术获得的土壤泉古菌的分子遗传信息,综合分析评价泉古菌的作用,提升对泉古菌多样性、生理生化和遗传特性的认识;(3)系统研究中温泉古菌在我国主要土壤中组成和多样性分布的特征,阐明其影响因子及可能的生态功能;(4)在 DNA 和 mRNA 水平,分析中温泉古菌 16S rRNA 基因的表达可以作为其蛋白质活性的表征,揭示它们的进化过程、生态功能、以及潜在的生态价值。虽然这些工作才刚刚起步,还需要长期而艰苦的努力,但可以预见,土壤中温泉古菌的研究和发展,将会极大地推动人们对未知生物世界的认识,促进我国土壤科学、特别是微生物生态学的发展,并在国际相关研究领域占据重要地位。

References:

- [1] Woese C R, Fox G E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5088—5090.
- [2] Huet J, Schnabel R, Sentenac A, *et al.* Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *EMBO J*, 1983, 2:1291—1294.
- [3] DeLong E F. Archaea in Coastal Marine Environments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:5685—5689.
- [4] Fuhrman J A, McCallum K, Davis A A. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature*, 1992, 356:148—149.
- [5] Fuhrman J A, Ouverney C C. Marine microbial diversity studied via 16S rRNA sequences: cloning results from coastal waters and counting of native archaea with fluorescent single cell probes. *Aquat Ecol*, 1998, 32:3—15.
- [6] Jurgens G, Lindstrom K, Saano A. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63:803—805.
- [7] Kemnitz D, Kolb S, Conrad R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 60:442—448.
- [8] Nicol G W, Glover L A, Prosser J I. Spatial analysis of archaeal community structure in grassland soil. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(12): 7420—7429.
- [9] Jurgens G, Glockner F O, Amann R, *et al.* Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, 34:45—56.
- [10] Orphan V J, House C H, Hinrichs K U, *et al.* Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:7663—7668.
- [11] Preston C M, Wu K Y, Molinski T F, *et al.* A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:6241—6246.
- [12] Friedrich M W, Schmitt-Wagner D, Lueders T, *et al.* Axial differences in community structure of Crenarchaeota and Euryarchaeota in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite *Cubitermes orthognathus*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:4880—4890.
- [13] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso sea. *Science*, 2004, 304: 66—74.
- [14] Treusch, A H, Leininger S, Kletzin A, *et al.* Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol*, 2005, 7: 1985—1995.
- [15] Könneke M, Bernhard A E, de la Torre J R, *et al.* Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437:543—546.
- [16] Berg I A, Kockelkorn D, Buckel W, *et al.* A 3-hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science*, 2007, 318:1782—1786.
- [17] Lipp J S, Morono Y, Inagaki F, *et al.* Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature*, 2008, 454:

991—994.

- [18] Madigan M, Martinko J. Brock Biology of Microorganisms. 11th ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2006.
- [19] Barns S M, Fundyga R E, Jeffries M W, *et al.* Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:1609—1613.
- [20] Huber H, Hohn M J, Rachel R, *et al.* A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, 2002, 417, 63—67.
- [21] Hershberger K L, Barns S M, Reysenbach A L, *et al.* Wide diversity of Crenarchaeota. *Nature*, 1996, 384:420—420.
- [22] Schleper C, Jurgens G, Jonuscheit M. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Micro*, 2005, 3:479—488.
- [23] Inagaki F, Suzuki M, Takai K, *et al.* Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the sea of Okhotsk. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69:7224—7235.
- [24] Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, *et al.* Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2815—2820.
- [25] Takai K, Oida H, Suzuki Y, *et al.* Spatial distribution of marine crenarchaeota group I in the vicinity of deep-sea hydrothermal systems. *Appl Environ Microb*, 2004, 70:2404—2413.
- [26] Barns S M, Delwiche C F, Palmer J D, *et al.* Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:9188—9193.
- [27] Ochsenreiter T, Selezi D, Quaiser A, *et al.* Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ Microbiol*, 2003, 5:787—797.
- [28] Huang Y, Krauss G, Cottaz S, *et al.* A highly acid-stable and thermostable endo-beta-glucanase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem J*, 2005, 385:581—588.
- [29] Nicol G W, Schleper C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol*, 2006, 14:207—212.
- [30] Nicol G W, Tschérko D, Embley T M, *et al.* Primary succession of soil Crenarchaeota across a receding glacier foreland. *Environ Microbiol*, 2005, 7:337—347.
- [31] DeLong E F, Pace N R. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol*, 2001, 50:470—478.
- [32] Nicol G W, Webster G, Glover L A, *et al.* Differential response of archaeal and bacterial communities to nitrogen inputs and pH changes in upland pasture rhizosphere soil. *Environ Microbiol*, 2004, 6:861—867.
- [33] Hansel C M, Fendorf S, Jardine P M, *et al.* Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a Geochemically Variable Soil Profile. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74:1620—1633.
- [34] Aller J Y, Kemp P F. Are Archaea inherently less diverse than Bacteria in the same environments? *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 65:74—87.
- [35] Sandaa R A, Enger O, Torsvik V. Abundance and diversity of Archaea in heavy-metal-contaminated soils. *App Environ Microbiol*, 1999, 65:3293—3297.
- [36] Høj L, Olsen R A, Torsvik V L. Archaeal communities in high arctic wetlands at Spitsbergen, Norway (78 N) as characterized by 16S rRNA gene fingerprinting. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 53:89—101.
- [37] Bintrim S B, Donohue T J, Handelsman J, *et al.* Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 277—282.
- [38] Simon H M, Dodsworth J A, Goodman R M. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environ Microbiol*, 2000, 2:495—505.
- [39] Pesaro M, Widmer F. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of a forest soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, 42:89—98.
- [40] Nicol G W, Glover L A, Prosser J I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environ Microbiol*, 2003, 5:152—162.
- [41] Kudo Y, Shibata S, Miyaki T, *et al.* Peculiar archaea found in Japanese paddy soils. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, 61:917—920.
- [42] Kim H, Honda D, Hanada S, *et al.* A deeply branched novel phylotype found in Japanese paddy soils. *Microbiol-Sgm*, 2000, 146:2309—2315.
- [43] Nicol G W, Tschérko D, Chang L, *et al.* Crenarchaeal community assembly and microdiversity in developing soils at two sites associated with deglaciation. *Environ Microbiol*, 2006, 8:1382—1393.
- [44] Sliwinski M K, Goodman R M. Spatial heterogeneity of crenarchaeal assemblages within mesophilic soil ecosystems as revealed by PCR-single-stranded conformation polymorphism profiling. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:1811—1820.
- [45] Nicol G W, Campbell C D, Chapman S J, *et al.* Afforestation of moorland leads to changes in crenarchaeal community structure. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 60:51—59.
- [46] DeLong E F, Schleper C, Feldman R, *et al.* Application of genomics for understanding the evolution of hyperthermophilic and nonthermophilic Crenarchaeota. *Biol Bull*, 1999, 196:363—365.
- [47] Karner M B, DeLong E F, Karl D M. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 2001, 409:507—510.
- [48] Buckley D H, Graber J R, Schmidt T M. Phylogenetic analysis of non-thermophilic members of the kingdom Crenarchaea and their diversity and abundance in soils. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 4333—4339.

- [49] Chin K J, Lukow T, Conrad R. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 2341—2349.
- [50] Lueders T, Friedrich M. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 2732—2742.
- [51] Zepp-Falz K, Holliger C, Grokopf R, *et al.* Vertical Distribution of Methanogens in the Anoxic Sediment of Rotsee Switzerland. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 2402—2408.
- [52] Wachinger G, Fiedler S, Zepp K *et al.* Variability of soil methane production on the micro-scale: spatial association with hot-spots of organic material and archaeal populations. *Soil Biol Biochem*, 2000, 32:1121—1130.
- [53] Fan H X, Fairley D J, Rensing C, *et al.* Identification of similar non-thermophilic Crenarchaeota in four Chinese and American pristine soils. *Biodiversity Science*, 2006, 14 (3):181—187.
- [54] He J Z, Shen J P, Zhang L M, *et al.* Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ Microbiol*, 2007, 9:2364—2374.
- [55] Nicol G W, Leininger S, Schleper C, *et al.* The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidising archaea and bacteria. *Environ Microbiol*, 2008, 10: 2966—2978.
- [56] Jackson C R, Liew K C, Yule C M. Structural and functional changes with depth in microbial communities in a tropical peat swamp forest. *Microbiol Ecol*, 2008, online.
- [57] Bomberg M, Jurgens G, Saano A, *et al.* Nested PCR detection of archaea in defined compartments of pine mycorrhizo spheres developed in boreal forest humus microcosms. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 43:163—171.
- [58] Chelius M K, Triplett E W, The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbiol Ecol*, 2001, 41:252—263.
- [59] Chen X P, Zhu Y G, Xia Y, *et al.* Ammonia-oxidizing archaea: important players in paddy rhizosphere soil? *Environ Microbiol*, 2008, 10:1978—1987.
- [60] Ouverney C C, Fuhrman J A. Marine planktonic archaea take up amino acids. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66:4829—4833.
- [61] Leininger S, Urlich T, Schlöter M, *et al.* Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442: 806—809.
- [62] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, *et al.* Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol*, 2008, 10:1601—1611.
- [63] Hallam S J, Mincer T J, Schleper C, *et al.* Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLOS Biol*, 2006, 44:0520—0536.
- [64] Wuchter C, Schouten S, Boschker H T, *et al.* Bicarbonate uptake by marine Crenarchaeota. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 219: 203—207.
- [65] Herndl G J, Reinthaler T, Teira E, *et al.* Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 2303—2309.
- [66] Ingalls A E, Shah S R, Hansman R L. Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 6442—6447.
- [67] Zhang M, Dong X. A survey of extremophiles project supported by 973. *Acta Microbiological Sinica*, 2006, 46(2):336
- [68] Wang T H, Hou Y H. Molecular characterization of extreme enzymes isolated from marine extremophiles. *Science and Technology Review*, 2004, 9:7—10.
- [69] Ge Y, He J Z, Zheng Y M, *et al.* Stable isotope probing and its applications in microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(5): 1574—1582.

参考文献:

- [53] 樊昊心, Fairley D J, Rensing C, *et al.* 中国和美国原始土壤中非高温泉古菌的发现和鉴定. *生物多样性*, 2006, 14 (3):181—187.
- [67] 张敏, 东秀珠. 973 项目“极端微生物及其功能利用的基础研究”研究进展. *微生物学报*, 2006, 46(2):336.
- [68] 旺天虹, 侯运华. 海洋极端微生物和极端酶分子生物学研究. *科技导报*, 2004, 9:7—10.
- [69] 葛源, 贺纪正, 郑袁明, 等. 稳定性同位素探测技术在微生物生态学研究中的应用. *生态学报*, 2006, 26(5): 1574—1582.