

# 深海极端环境深部生物圈微生物学研究综述<sup>\*</sup>

党宏月 李铁刚 曾志刚 秦蕴珊

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

20 世纪下半叶是人类进行自然探索最为活跃的一段时期。新发现、新技术和新概念层出不穷, 大大拓展了人们对宇宙和生命的视野和认识。在海洋学领域, 深海热液喷口化能自养 (chemolithoautotrophy) 系统的发现大大激发了人们对洋底生物多样性及生命形式、过程、起源和进化的兴趣和热情 (Baross *et al*, 1985)。最近 30 年相继开展的国际深海钻探计划 (deep sea drilling project DSDP) 和大洋钻探计划 (ocean drilling program, ODP) 为我们揭示了一个以前未曾想像到的埋藏在海底沉积物和上部洋壳中的海底深部生物圈 (subseafloor deep biosphere) 微生物世界。近期研究表明, 深海热液系统中的嗜热和极端嗜热古菌据推测就来源于海底深部生物圈 (Delaney *et al*, 1998; Summitt *et al*, 2001), 由此推断, 生命的真正起源就发生在地球深部生物圈内。巨大的深度和广度, 使得海底深部生物圈容纳了大量的微生物生物量和新颖独特的代谢潜力 (Whitman *et al*, 1998)。由于洋壳板块运动而产生的海底地质构造和过程的异质性、洋壳地球化学过程的复杂性, 以及在漫长地质年代中的气候变迁和海洋真光层颗粒物沉降输出的历史和地理差异性, 埋藏在海底沉积物和上部洋壳中的生命赖以维持和繁衍的能量供给形式具有高度的多样性, 海底深部生物圈蕴藏着丰富多样的代谢形式和新颖的生理生化机制 (IPSC, 2001)。海洋深部生物圈内的古菌群落将作为特定地质微生物标志 (geomicrobiological signature), 用来指示过去和现代海洋的地球化学变化和地质环境变迁 (Inagaki *et al*, 2001)。海洋微生物生态学研究在最近的 20 年中取得了一些重要进展, 与全球海洋地质历史、地质事件、地质过程和地质作用相关的深海微生物生态学研究, 已发展成为一门具有独特魅力的新兴学科, 即海洋“地质微生物学” (geomicrobiology)。在 46 亿年的地球历史中, 地圈和生物圈的协同进化过程主要是在微生物的作用下完成的, 微生物在海洋沉积物和洋壳中的生物地球化学作用, 既是微生物的生态学, 又是沉积地质过程和洋壳蚀变的动力学, 许多原来以为“无机”的地质过程, 其实都是生命活动的结果 (汪品先, 2003)。在过去的 10 年中, 分子、遗传、生化和基因组学等现代生物技术被

<sup>\*</sup> 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (批准号: KZCX3-SW-223 和 KZCX3-SW-233) 和国家自然科学基金项目 (编号: 40476058 和 40576069) 联合资助。

通讯作者: 李铁刚, 男, 责任研究员, 博士生导师, 现从事海洋地质古生物学和古环境学等研究工作。

E-mail: tgl@ms.qd.cn

收稿日期: 2005 年 7 月 15 日。

引入地质微生物学的研究中,不但揭示了许多地质环境的微生物多样性,而且阐明了微生物在生物地球化学过程中所发挥的独特作用及环境和生态功能(Newman *et al.*, 2002)。海洋深部生物圈微生物的研究已成为新世纪海洋领域中地学和生物学交叉互补、综合研究前沿的一个新热点和生长点,被列入刚刚启动的国际综合大洋钻探计划(Integrated Ocean Drilling Program, IODP)研究项目的首选(IPSC, 2001; 中国大洋钻探学术委员会, 2003)。尽管这一领域的研究才刚刚起步,却已显示了旺盛的生命力和发展应用前景。

## 一、人类对海底深部生物圈的探索历程

早在 20 世纪二三十年代,美国和原苏联科学家就对地球深部可能存在的生命形式进行了先驱性的研究(D'Hondt *et al.*, 2002b),表明地表下(subsurface)的油气藏维持着一个以埋藏烃降解为能量来源的深部微生物群落。对陆地和海洋其他类型的深部环境是否存在活跃微生物群落等问题的思索,促使科学家向更加广泛多样的地球深部环境进行探索。最早从 DSDP 所获得的深海钻探沉积物样品中就提供了大洋海底表面下(subseafloor)微生物活动的间接证据(D'Hondt *et al.*, 2002b; 朱毅杰等, 2003);  $\text{CH}_4$ 和  $\text{SO}_4^{2-}$ 的浓度剖面及同位素标志分析表明在所取得的整个沉积物芯样中都有微生物活动存在的迹象。在实验室的培育实验中也证实了表层下沉积物中的微生物产甲烷活性和硫酸盐还原活性,表明在沉积物深部具有活跃的微生物活动或其潜力。这一发现向传统的微生物在海洋沉积物中只分布于表层几米的错误观念(Morita *et al.*, 1955)提出了严峻挑战。从 ODP 一系列航次所取得的沉积物芯样的地球化学分析表明,世界大洋洋底下沉积物中都有微生物的活动(D'Hondt *et al.*, 2002a),细胞直接计数和以 16S rRNA 基因(16S rDNA)核酸序列分析为基础的分子生物学研究也证明了微生物在洋底下沉积物中的普遍存在(Pakes *et al.*, 2000)。迄今为止,沉积物生物地球化学和微生物学研究已将海底深部生物圈的最大估计深度延伸至洋底沉积物表面下 800 m,含有微生物生命活动的海洋沉积物最古老的年龄也被追溯至 1500 万年前(Pakes *et al.*, 1994; Wellsbury *et al.*, 1997; Wellsbury *et al.*, 2002)。

越来越多的研究表明,在海底洋中脊两侧和洋盆的玄武岩洋壳浅层几百米内存在或曾经存在过活跃的微生物活动,这些微生物积极参与洋壳和海水间的化学成分交换及洋壳蚀变作用(Fisk *et al.*, 1998),上部洋壳可能构成海底深部生物圈中一个独特的亚系统(Cowen *et al.*, 2003),Fumes 等(2004)已在距今已有 34.8 亿年历史的海底玄武岩火山玻璃中发现了当初成岩后不久微生物蚀变的证据。

30 年来人类向海底深处坚持不懈进行的生命探索取得了意想不到的巨大收获,地球上的生物生存空间也由原来的陆地表面和海洋水体两大生存域扩展成为现在的包括深部生物圈在内的三大生存域(Gold, 1992)。海底深部生物圈的发现极大地扩展了地球生物圈的范围和深度,向人们展示了一个全新的古老原始的微生物世界,充分显示了地学和生物学学科交叉的魅力和发展潜力,具有重大的科学意义和研究价值。

## 二、海底深部生物圈微生物的研究意义和价值

海底深部生物圈生存着现今地球上最古老、最原始的微生物类群, 是科学家们研究地球生命起源和进化的理想场所 (Delaney *et al*, 1998)。巨大的深度和广度使海底沉积物和上部洋壳成为地球上最大的生态系统之一。海底深部生物圈中细菌和古菌的数量巨大, 占了全球生物圈原核生物总数的 70% (Whiman *et al*, 1998), 同时占有  $1/10 \sim 1/3$  的地球总生物量 (Parkes *et al*, 1994; Whiman *et al*, 1998)。海底沉积物是一个巨大的全球有机碳库 (约  $1.5 \times 10^{22}$  g C), 海底沉积物深部生物圈微生物介导的有机碳的降解和转化在海洋和全球碳的生物地球化学循环中起着重要的作用。海底深部生物圈微生物调节着海洋沉积物的成岩作用和大洋玄武岩的蚀变等生物地质过程 (Fisk *et al*, 1998), 并参与海洋沉积和洋壳环境的成矿作用和矿物转化 (Inagaki *et al*, 2001)。海底沉积物中蕴藏着巨大的天然气水合物 (gas hydrate) 矿藏, 海底深部生物圈微生物是海洋沉积物生源  $\text{CH}_4$  的生产者, 同时也是  $\text{CH}_4$  的消耗者, 与海底天然气水合物的形成和稳定密切相关, 对陆坡沉积物结构稳定性和对防止  $\text{CH}_4$  气体向海水及大气的逸出以影响全球气候变化起重要的作用 (Kvenvolden 1999)。卓越的极端环境适应和新颖的代谢机理及酶系统使得海底深部生物圈微生物正成为海洋生物技术开发的重要领域。

### 1. 海底深部生物圈微生物研究与生命起源和外空生命探索

海底深部生物圈可根据能量来源划分为两大系统, 即依赖于地球表面和水体真光层光合作用输出的碎屑系统和依赖于地球化学反应产能 (即所谓的地热能, geotherm energy) 进行初级生产的自养生产系统 (Stevens 1997)。海底深部生物圈微生物自养生产系统不依赖太阳能以及光合作用固碳和产氧, 而是利用一些在洋底地球化学热催化 (thermocatalytic) 反应过程中产生的还原性小分子 (如  $\text{H}_2$ 、 $\text{H}_2\text{S}$  和  $\text{CH}_4$  等) 为能量来源进行有机碳固定、生物生长和代谢维持。海底深部生物圈自养生产微生物保留了原始地球生命起源时的基本生理生化特征, 成为地球生命起源和演化研究的焦点。

自从 1977 年美国科学家首次发现海底热泉生物系统以来, 到目前为止已在全球海底发现了 200 多类似的海底热泉系统 (图 1)。海底热液泉口化能自养系统的维持依赖于洋底地球化学热催化反应过程中产生的还原性小分子所蓄积的化学能, 这种生存方式被认为是较原始的。因此, 海底热液喷口化能自养系统一经发现就引发了人们对地球原始生命形式、过程、起源和进化的思索。但是, 海底热液喷口化能自养系统仍需要底层海水溶解氧做为系统的主要电子受体 (Stevens 1997), 而地球原始大气和原始海洋是缺氧的, 地球上  $\text{O}_2$  的生成和积累最终可归结于光合作用的出现 (Kasting *et al*, 2002), 这在地球和生命进化历史过程中是非常近代的事情。现代海底热液喷口处的化能自养系统由于间接依赖光合作用所产生的  $\text{O}_2$  而不大可能是地球原始生命的真正起源。但活跃的现代海底热液泉口却提供了一个人类探索地球深部生物及生命起源和进化的窗口 (Deming *et al*, 1993), 属于海底深部生物圈范畴的海底热液泉口深部 (sub-vent) 微生物区系研究越来越受到重视 (Summit *et al*, 2001)。由于有限的底层海水与上涌热液的混合和不

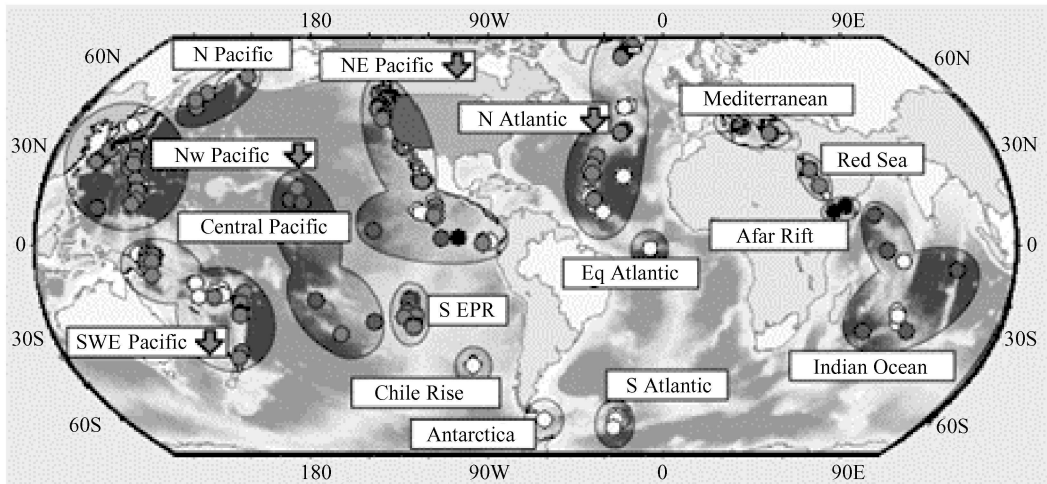


图 1 全球海底热泉分布

○尚未得到证实的海底热泉；●活跃的海底热泉；●死的海底热泉

依赖光合作用有机碳的输入，这一生境更接近人们设想的原始生命发生时的理化环境，将支持着一个非常原始的不需氧的极端嗜热化能自养系统 (hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem, HypeSLME)。海底深部生物圈 HypeSLME 系统的维持和运转很可能是由温热的玄武岩洋壳与缺氧水相互作用所产生的  $H_2$  驱动的 ( $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$ ) (Stevens *et al*, 1995)。尽管这一假说曾遭到置疑，最新的研究结果却证明在印度洋洋中脊 (mid-oceanic ridge) 海底扩张中心的一个活跃深海热泉下的确存在着这样一个 HypeSLME 自养系统 (Takai *et al*, 2004)，其中心维持者是厌氧的化学无机自养 (anaerobic chemolithoautotrophy) 极端嗜热古菌 (如极端嗜热产甲烷古菌等)。该系统的发现不但支持了地球生命起源于深部生物圈这一假说，而且也促进了人们向浩瀚宇宙进行生命探索的进程。

早期的空间探索实践和外空生物学 (exobiology) 研究证明，由于太阳系其他星球表面环境条件异常恶劣，很难有生命存在的可能。但是，一些星球的内部却存在与地球深部生物圈环境相似的可供生命发生、维持和生长的理化条件，地球深部生物圈微生物的广泛发现重新激起了人们对宇宙空间生命存在及其形式的探索。Guerrero (1998) 曾预测，在太阳系火星或其他星球的深部观察到微生物的活动将是 21 世纪的世纪发现。

2. 海底深部生物圈微生物研究与海底天然气水合物能源和全球变化

海底沉积物是全球最大的天然气水合物储藏库。天然气水合物是由天然气和水形成的一种笼形化合物 (俗称“可燃冰”)，被认为是洁净高效的替代能源。海底天然气水合物的形成多发生在世界大洋的陆坡、陆基和极区高纬陆架的低温高压富甲烷环境中，并多与海底冷泉 (cold seep) 或泥火山 (mud volcano) 活动相关。在全球范围内，现代海底天然气水合物多分布在海底扩张中心、汇聚板块边缘带和主动或被动大陆边缘带 (图 2)。现已查明，在世界海洋约  $3.57 \times 10^7 km^2$  (占海洋总面积的 10%) 的海底区域分布有天然

气水合物。海底天然气水合物作为巨大的未来能源、影响全球碳循环和气候变化的潜在因素，以及影响海底陆坡稳定性和引发海洋地质灾害的重要因子而备受关注 (Kvenvolden 1999)。

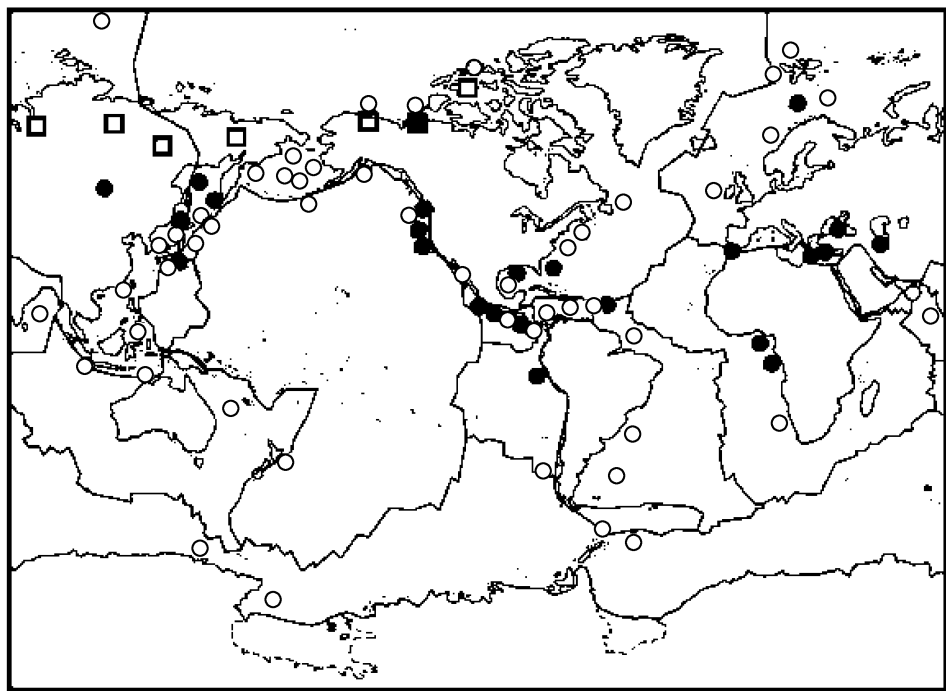


图 2 全球海底天然气水合物分布

图中：■ 已知的浅水天然气水合物分布区；● 已知的深海天然气水合物分布区；  
□ 尚未证实的浅水天然气水合物分布区；○ 尚未证实的深海天然气水合物分布区

海底天然气水合物的形成与深部生物圈微生物的活动密切相关。天然气水合物最主要的组分甲烷绝大部分是生源的，由海底深部生物圈中的厌氧产甲烷古菌生成。海底天然气水合物是地球上最大和最不稳定的甲烷库。据估计，海底天然气水合物包含了近  $2.1 \times 10^{16} \text{ m}^3$  的甲烷 (大约  $1.0 \times 10^{13} \text{ tC}$ ) (Kvenvolden 1999)，尽管最新的统计研究表明海底天然气水合物储量可能只有原来估算的  $1/20 \sim 1/4$  (Milkov 2004)，相对地层中日益减少的石油和煤炭等化石燃料储量却仍是一个不容忽视的能源储备。甲烷是一种比  $\text{CO}_2$  更具温室效应的气体，地球化学模型、古生物学 (Paleontology) 和稳定碳同位素分析表明全球海洋天然气水合物大规模分解释放的甲烷曾多次在地球历史上对全球气候变化和地球系统进化发生过重要影响 (Hesselbo *et al*, 2000; Katz *et al*, 1999; Kennett *et al*, 2000)。天然气水合物对全球气候的影响可能遵循正反馈作用机制 (Benton *et al*, 2003)，海水温度的升高会促进海底沉积物天然气水合物的分解和甲烷向海水和大气的释放，使全球温度进一步上升，加剧全球变暖的速率和危害。因此，可维持海底天然气水合物稳定性和可缓解甲烷向海水和大气释放的机制在全球变化研究中具有重要地位。

尽管全球海洋沉积物甲烷储量极其巨大，但是现代海洋对大气甲烷的贡献却只在

2%左右, 尚没有对全球气候构成直接威胁。这是因为广泛分布的由沉积物微生物介导的甲烷厌氧氧化作用紧密调节着沉积物甲烷的生物地球化学循环。海底深部生物圈甲烷厌氧氧化微生物通过对甲烷的氧化可缓解甲烷向海水和大气的释放, 并在一定程度上影响海底天然气水合物的稳定性 (Lanoil *et al*, 2001)。类脂生物标志物、16S DNA 分子序列和 DNA 分子探针荧光原位杂交 (FISH) 分析研究表明, 甲烷厌氧氧化微生物主要含有 ANME-2 族的厌氧甲烷氧化古菌与硫酸盐还原细菌 (主要是脱硫八叠球菌属 *Desulfosarcina* 和脱硫球菌属 *Desulfococcus* 细菌) 的共栖互养体 (Syntrophism), 以及少量的 ANME-1 族的厌氧甲烷氧化古菌 (Boetius *et al*, 2000; Hinrichs *et al*, 1999; Ophian *et al*, 2001b, 2002)。因厌氧甲烷氧化古菌未曾被培养成功, 确切的甲烷厌氧氧化分子生化机理仍是个谜, 全球范围的微生物甲烷厌氧氧化最大承载力和速率尚是未知数, 再加上工业化对全球大气 CO<sub>2</sub> 输入通量的显著增加, 以及海底天然气水合物对全球变暖的正反馈作用机制等因素, 使海洋天然气水合物对全球变化的潜在影响成为科学家们研究的焦点, 海底天然气水合物富集区微生物群落的甲烷厌氧氧化能力、速率和机制成为海底深部生物圈微生物研究的重要课题 (Zhang *et al*, 2004)。

### 3. 海底深部生物圈微生物研究与深海生物资源多样性及其开发利用

自从 20 世纪 90 年代以来, 国际上拉开了争夺特殊重要海洋生物基因资源的帷幕, 1996 年正式生效的《联合国海洋法公约》确立了新的领海、大陆架和专属经济区、公海和国际海底区域制度, 这标志着世界海洋开发利用已呈全球化趋势, 以争夺国际海底区域资源以及深海生物资源利用为主要目的的海洋权益之争愈演愈烈, 海洋高科技成为海洋开发竞争的核心, 海洋微生物作为海洋生物资源的一个重要组成部分而备受瞩目。生境独特多样的深海沉积和洋壳环境蕴育了海底深部生物圈微生物物种、基因组成、生理生化和生态功能的高度多样性, 海底深部生物圈极端环境下的特殊微生物是众多尚未被发掘和利用的新颖生物活性物质的重要生产源, 是人类寻找和开发新型功能活性产物和天然药物的最后疆域, 海底深部生物圈正成为世界生物技术开发的重要前沿 (IPSC, 2001)。

海底深部生物圈是一个极端环境, 是嗜冷、嗜热、嗜压、嗜酸、嗜碱、嗜盐和嗜低营养条件等嗜极端环境细菌和古菌的理想来源。了解微生物在各种极端条件下的适应机制和基因调控行为有助于构造基因工程化动植物, 提高它们在自然环境中的抗逆能力, 具有巨大的发展前景和经济效益。适极端条件酶超越了传统酶催化功能的临界范围, 优越的催化效果使得极端酶在现代工业、医药、环保、材料、生物工程和国防等领域具有广阔的开发应用前景, 极端酶的应用开发将为需酶工业带来一场革命 (徐洵, 2000)。

绝大部分深海大洋表层沉积物终年在 2℃ 左右, 具有丰富的嗜冷微生物。许多海洋嗜冷细菌可产生  $\omega$ -3 多聚不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA s), 这类低熔点天然活性产物具有降低心血管疾病和一些癌症高危性的功效, 具有重要临床应用价值 (Bartlett 1999)。随沉积物和洋壳深度的增加, 环境温度以 30℃ / km 的速率递增, 在大洋深部沉积物和部分洋壳中存在着活跃的嗜热和极端嗜热微生物。由于具有高度压缩了的温度梯度, 现代海底热液活动中心是分离海底深部生物圈嗜热和极端嗜热微生物的最佳地点, 也是分离嗜盐微生物的理想场所 (Takai *et al*, 2001)。海洋平均水深

3 800 m, 最深处约 11 000 m, 巨大的海水静压使得大洋沉积物和洋壳中的微生物在漫长的进化过程中获得了压力适应能力, 海底深部生物圈是分离嗜压微生物的极佳环境 (Bale *et al.*, 1997)。由于非常有限的水体真光层颗粒有机物的输入和长期的生物和化学转化, 绝大部分海洋深层沉积物有机物含量很低, 并且也相当难降解。但是, 即使这样的环境中仍分布着活跃多样的微生物类群 (Parkes *et al.*, 2000), 以分解劣质有机物为生存和生长基础。该处分离的微生物具有分解矿化异源有机污染物的能力 (Fredrickson *et al.*, 1999)。海底热泉、冷泉和天然气水合物等高能区极大丰富了海底世界的生境多样性, 为海底特异微生物群落的形成和演化提供了环境和物质条件, 为新颖功能基因和生物活性物质的开发提供了基础 (Collier Jouault *et al.*, 2004)。在洋底矿物富集区微生物具有活跃的生理活动, 可能参与成矿作用和矿质元素的迁移和转化 (Daughney *et al.*, 2004; Greene *et al.*, 1997; Kashefi *et al.*, 2003), 利用微生物或其生物制剂来提取和浓缩金属具有巨大的发展潜力。

由于深海微生物人工培养上的难度, 基因资源的应用显得尤为重要。为了最大可能的充分利用海底深部生物圈微生物基因这一巨大资源库, 深入持续开展深海极端环境深部生物圈微生物生理、生化和生态学等基础研究以发现和了解特殊 (包括极端) 环境下微生物的特殊功能基因和功能酶已成为当务之急。

### 三、海底深部生物圈微生物研究已取得的成果

海底深部生物圈微生物由原核的细菌和古菌组成, 它们在沉积物的不同层次和环境中对地球元素生物地球化学循环各自发挥着一系列独特而又密切关联的作用。传统的微生物分离培养、细胞计数、生物标志物分析、放射性同位素示踪实验与现代分子生物技术的有机结合使我们对海底深部生物圈微生物的分布、数量、种类和生理生态功能有了一定了解。

#### 1. 海底深部生物圈微生物的数量分布

从 ODP 大洋钻探微生物研究结果表明, 微生物分布于大洋深海的各种沉积环境中。海底热泉、冷泉和天然气水合物富集区等高能区具有极高的局部微生物密度, 而在深海洋盆寡营养区, 沉积物微生物的密度相对较低。

在不受海底热泉、冷泉和天然气水合物等地质化学过程影响的大部分海域, 沉积物微生物密度具有随水深增加而降低的普遍性水平分布特征, 即浅水区沉积物微生物密度高, 深水区低, 这主要与真光层新生产输出和水深等因素有关 (Parkes *et al.*, 2000); 微生物在沉积物中垂直分布大致遵循 Parkes 等 (1994) 的经验公式, 即

$$\log \text{ cells} = 7.98 - 0.57 \log \text{ depth}$$

随沉积物深度增加微生物密度呈对数线性减低, 由表层 1 m 的  $10^9$  cells/cm<sup>3</sup> 降低到全球平均沉积物深度 500 m 的  $10^6$  cells/cm<sup>3</sup> (图 3)。海域间生产力的差异可能引起该回归方程截距的变化 (斜率不变), 如高生产力的秘鲁海比低生产力的赤道东太平洋有更高的微生物密度。沉积物有机碳含量和可降解度是影响这一分布特征的最主要因素, 沉积物孔隙度、地质年龄和地球化学特征也起了一定的作用 (Cowell *et al.*, 2004; Parkes *et al.*, 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net)

*al*, 2000)。沉积物微生物垂直分布的另一特征是, 沉积物深层(几百米或更深)微生物密度随深度增加变化不大, 这说明海底深部生物圈微生物的分布很可能超越现在探知的最大分布深度(800 m), 海底深部生物圈微生物对全球生物量和有机碳的贡献可能要比原来估算的要大。海底沉积物的最大深度可能超过 10 km, 温度很可能最终成为限制微生物分布最大深度的要素 (*Parkes et al*, 2000)。

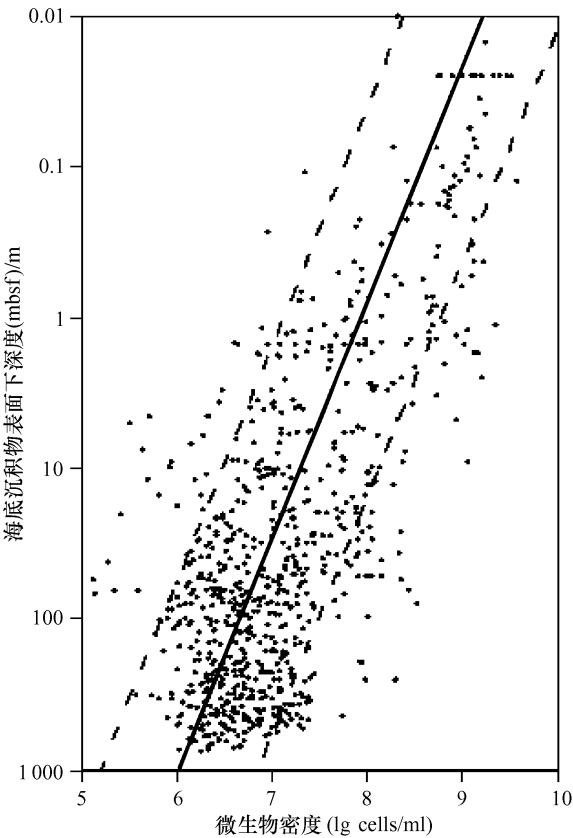


图 3 海底深部生物圈微生物密度分布与沉积物深度关系

在海底热泉、冷泉和天然气水合物富集区等高生物地球化学活动区, 由于在沉积物各深度层中不均匀分布的生物能源和地球化学特征, 微生物的分布一般不遵循以上归纳的对数线性变化规律, 而是往往产生离散的局部最大或高度压缩的梯度分布 (*Pakes et al*, 2000)。

2. 海底深部生物圈微生物的种类多样性

海底深部生物圈不但蕴藏了巨大的微生物生物量, 而且还拥有丰富的微生物种类。由于传统微生物培养法的局限和海底深部生物圈生境的特殊性, 从海底深部沉积物和洋壳中分离培养得到的微生物数量非常有限, 常常低于总细胞计数的 1% (*Pakes et al*, 2000)。尽管如此, 这些分离到的菌株仍代表了多样微生物功能类群, 包括需氧氨化菌、

硝酸盐还原菌、厌氧发酵异养菌、硫酸盐还原菌、产乙酸菌、产甲烷古菌、嗜热的厌氧异养菌和厌氧十六烷氧化菌等 (Barnes *et al*, 1998; Pakes *et al*, 2000; Summ it *et al*, 1998; Toffin *et al*, 2004)。在海底深部生物圈已发现了 6 个新物种, 即嗜压硫酸盐还原深栖脱硫弧菌 (*Desulfovibrio profundus*) (Bak *et al*, 1997)、产乙酸深海醋酸杆菌 (*Acetobacterium submarinus*) (Toffin *et al*, 2004)、产甲烷深海甲烷袋状菌 (*Methanococcus submarinus*) (Mikucki *et al*, 2003)、以  $H_2$  为能源以  $CO_2$  为碳源的奥尔胡斯甲烷杆菌 (*Methanobacterium aarhusense*) (Shlimon *et al*, 2004)、产乳酸耐压海洋乳杆菌 (*Marinilactibacillus piezotolerans*) (Toffin *et al*, 2005) 和嗜碱海杆菌 (*Marinobacter alkaliphilus*) (Takai *et al*, 2005)。这些分离培养到的细菌和古菌大致反映了海底深部生物圈微生物的一些基本生理生态特征和对环境的适应。在系统发育上这些微生物主要隶属于细菌的变形菌纲 (*Proteobacteria*)、低 G+C mol% 革兰氏阳性菌群 (low G+C content Gram-positive bacteria)、高 G+C mol% 革兰氏阳性菌群 (high G+C content Gram-positive bacteria)、噬纤维菌属 屈挠杆菌属 拟杆菌群 (*Cytophaga Flexibacter Bacteroides* CFB)、产液菌目 (Aquificales) (Inagaki *et al*, 2003; Toffin *et al*, 2004)、古菌的嗜热球菌目 (Thermococcales)、甲烷八叠球菌目 (Methanosarcinales)、甲烷杆菌目 (Methanobacteriales) 和甲烷球菌目 (Methanococcales) 等 (Mikucki *et al*, 2003; Shlimon *et al*, 2004; Summ it *et al*, 1998; Takai *et al*, 2004)。

为了克服传统培养法在海底深部生物圈微生物种类分析上的局限, 16S rDNA 核酸序列和系统进化分析近年来得以广泛应用。这些不依赖于微生物培养的分子分类学研究表明, 海底深部生物圈不但蕴藏了丰富的微生物种类, 并且许多种类与目前已描述的所有细菌和古菌都相距甚远, 只与尚未培养到的环境 DNA 克隆相近, 代表着新颖的微生物种类或类群。分子分类法新发现的培养法不曾得到的细菌类群有: 螺旋体细菌群 (Spirochaetes)、浮霉状菌属 衣原体属群 (*Planctomyces Chlamydia*)、绿色非硫菌群 (Green Nonsulfur Bacteria)、尚无培养菌株为代表的 OP8、OP9 和相关的深部沉积物菌群等 (Huber *et al*, 2003; Inagaki *et al*, 2002-2003; Komasa *et al*, 2003; Newberry *et al*, 2004; Reed *et al*, 2002; Toffin *et al*, 2004)。

分子分类法也大大扩展了对海底深部生物圈古菌多样性的了解, 古菌域 (Archaea) 的广域古菌界 (Euryarchaeota) 和嗜泉古菌界 (Crenarchaeota) 古菌在海底深部生物圈有着广泛的分布。而且, 与沉积环境古菌 16S rDNA 序列有较好亲缘关系的多数古菌类群一般尚无可培养菌株, 如数个海洋底栖古菌族 (Marine Benthic Groups) 和海洋古菌族 (Marine Groups), 以及在甲烷厌氧氧化中发挥重要作用的 ANME-1 和 ANME-2 古菌族等 (Bidle *et al*, 1999; Hinrichs *et al*, 1999; Huber *et al*, 2002; Inagaki *et al*, 2003; Lanoil *et al*, 2001; Marchesi *et al*, 2001; Mills *et al*, 2003; Newberry *et al*, 2004; Newman *et al*, 2002; Orphan *et al*, 2001a; Reed *et al*, 2002)。分子探针 FISH 研究进一步揭示了 ANME-2 族厌氧甲烷氧化古菌与硫酸盐还原菌的共栖互养关系 (Boetius *et al*, 2000; Orphan *et al*, 2001a, 2001b, 2002, 2004; Wenne *et al*, 2004), 为阐明海底深部生物圈微生物控制沉积物  $CH_4$  向水圈和大气圈释放的机制做出了重要贡献 (Valentine, 2002)。FISH 研究结果还表明, ANME-1 族厌氧甲烷氧化古菌也需要硫酸盐还原菌的参与以进

行  $\text{CH}_4$  的转化 (Michaelis *et al.*, 2002), 这很好地解释了在一些只有 ANME-1 而不曾发现 ANME-2 古菌的沉积环境中甲烷厌氧氧化与硫酸盐还原的耦合, 硫酸盐还原在  $\text{CH}_4$  厌氧氧化生物地球化学转化过程中是必不可少的。由于厌氧甲烷氧化在一定程度上可看作是产甲烷过程的逆过程, 厌氧甲烷氧化古菌可能吸收了产甲烷古菌甲烷生成路径中的一些关键元件, 作为产甲烷过程指示分子的甲基辅酶 M 还原酶  $\alpha$  亚基基因 (*mcrA*) 核酸序列同时也可能作为厌氧甲烷氧化的分子指示而用以厌氧甲烷氧化古菌的系统进化和种系归属分析 (Bidle *et al.*, 1999; Hallam *et al.*, 2003; Newberry *et al.*, 2004)。16S rDNA 和 *mcrA* 分析均表明: ANME-2 族厌氧甲烷氧化古菌隶属于甲烷八叠球菌目, 而 ANME-1 族古菌则是广域古菌界的一个新目。由于尚无可培养的菌株, 厌氧甲烷氧化古菌确切的甲烷氧化生理生化机理及可能的分子遗传调控目前仍无从知晓。

Daughney 等 (2004) 最近从海底洋壳中分离纯化出一株隶属于  $\gamma$  变形菌亚纲的菌株, Lysnes 等 (2002) 的培育实验亦证明了洋壳中微生物的  $\text{Fe}^{3+}$  还原活性和  $\text{CH}_4$  生成, 表明在海底洋壳中存在铁还原菌和以  $\text{H}_2$  为能源以  $\text{CO}_2$  为碳源的甲烷生成菌。以 16S rDNA 序列分析和 FISH 研究手段为基础的现代分子微生物学研究进一步证明了微生物在该特殊生境中的普遍存在 (Cowen *et al.*, 2003; Lysnes *et al.*, 2002; Thorseth *et al.*, 2001; Torsvik *et al.*, 1998)。一些科学家进行的研究还表明: 海底玄武岩洋壳具有不同于周围海水和沉积物的独特微生物种类或类群, 支持着一个生态功能特异的微生物群落 (Cowen *et al.*, 2003; Lysnes *et al.*, 2002; Thorseth *et al.*, 2001)。在玄武岩洋壳中发现的细菌多隶属于嗜热袍菌目 (Thermotogales)、异常球菌目 (Deinococcales)、变形菌纲、CFB 菌群、绿色非硫菌群、高 G+C mol% 革兰氏阳性菌群中的放线杆菌纲 (Actinobacteria)、低 G+C mol% 革兰氏阳性菌群的梭菌纲 (Clostridia) 和芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 等 (Cowen *et al.*, 2003; Kimura *et al.*, 2003; Lysnes *et al.*, 2002; Thorseth *et al.*, 2001), 而古菌多隶属于广域古菌界的古生球菌目 (Archaeoglobales) 和嗜泉古菌界内尚无可培养菌为代表的一些菌组 (Cowen *et al.*, 2003; Thorseth *et al.*, 2001)。

大洋钻探微生物污染示踪物追踪实验证明了 ODP 沉积物芯样内微生物种类的真实性 (Smith *et al.*, 2000), 这些细菌和古菌类群的发现表明了新颖物种在海底深部生物圈的广泛存在, 充分证明了分子微生物学在海底深部生物圈微生物多样性和功能研究中的重要性 and 核心地位, 并极大丰富了对海底深部生物圈微生物代谢生理和在生物地球化学过程中生态功能的认识。

### 3. 海底深部生物圈微生物的生物地球化学作用

海洋沉积环境微生物呼吸所需终端无机电子受体的垂直分布具有分层的特点, 随沉积物埋藏深度不同依次为  $\text{O}_2$ 、硝酸盐、金属 (铁、锰等) 氧化物、硫酸盐、硫和  $\text{CO}_2$  等 (DeLong 2004), 并且该分布梯度的陡度与真光层颗粒有机碳输入量相关。由于高的生物产能和利用率以及低的分子扩散率, 沉积物中的  $\text{O}_2$  最先被微生物消耗掉, 造成绝大部分海洋沉积物处于无氧环境中。由于微生物的厌氧反硝化作用, 硝酸盐也只分布在很浅的表层沉积物里。金属氧化物和硫的低溶解性和局部分布性等特点极大地限制了它们在沉积物中的分布深度和广度。因此,  $\text{SO}_4^{2-}$  和  $\text{CO}_2$  成为海底深部生物圈微生物最主要和

最重要的无机终端电子受体。这些电子受体在沉积物中的垂直分布决定了微生物种类和代谢类群的垂直分布。海底深部沉积物间隙水化学和稳定同位素剖面分析, 以及放射性同位素示踪物培育实验证明: 硫酸盐还原、产甲烷和发酵是该生境的主要微生物降解代谢活动 (D'Hondt *et al*, 2002a; Parkes *et al*, 2000)。由于  $H_2$  的地质化学热生成, 在深埋的沉积物和洋壳内很可能普遍存在着可固定  $CO_2$  的完全不依赖太阳光能和光合作用的极端嗜热化能自养微生物系统 HyperSLME (Takai *et al*, 2004)。

除一些特殊生境外 (典型的如秘鲁边缘海和日本海等), 由于对底物的竞争, 在海洋沉积物中普遍存在着硫酸盐还原和产甲烷微生物代谢过程的竞争 (D'Hondt *et al*, 2002a; Parkes *et al*, 2000)。硫酸盐还原过程一般发生在  $SO_4^{2-}$  浓度在 3 mM 以上的缺氧沉积物中, 由于底层海水与沉积物的交换, 在整个沉积物深度剖面中沉积物-海水界面处具有最高的  $SO_4^{2-}$  浓度。在有机质含量低、微生物代谢活动低的大洋沉积物中, 整个沉积物上层几百米都可保持较高的  $SO_4^{2-}$  浓度, 支持着以硫酸盐还原为主的微生物代谢活动。边缘海沉积物由于可降解有机质的含量较高而支持着较高的微生物种群和生理活动,  $SO_4^{2-}$  在沉积物浅层几十米中很快被消耗掉, 使得边缘海沉积物硫酸盐还原速率比大洋的高出 2~3 个数量级。在该高硫酸盐还原生物活动带下, 产甲烷和发酵成为沉积物柱层的主要微生物代谢活动。虽然深层沉积物  $CH_4$  不断向上扩散, 但边缘海高  $SO_4^{2-}$  浓度的表层沉积物却很少有高浓度的  $CH_4$  积累和向上覆海水和大气的扩散, 这主要是因为沉积物缺氧的  $CH_4$ - $SO_4^{2-}$  地球化学界面环境中普遍存在着与硫酸盐还原相耦合的微生物厌氧甲烷氧化作用 (D'Hondt *et al*, 2002a; Valentine 2002), 并且微生物厌氧甲烷氧化占有相当高的总硫酸盐还原量, 表明厌氧甲烷氧化是该环境  $SO_4^{2-}$  主要的汇 (Sink)。在墨西哥湾, 由于复杂的海底天然气和石油烃组成, 硫酸盐还原不但与甲烷厌氧氧化耦联, 并且促进了沉积物中其他烃类化合物的厌氧氧化过程 (Zhang *et al*, 2004)。因此, 海底深部生物圈微生物厌氧氧化过程可能对海底原油的转化和储量具有一定的影响。全球范围的海洋微生物厌氧甲烷氧化 ( $SO_4^{2-} + CH_4 \rightarrow HS^- + HCO_3^- + H_2O$ ) 还将对海洋碱度的长期变化有一定影响 (D'Hondt *et al*, 2002a)。

由于埋藏和长期生物地球化学作用, 作为海底深部生物圈微生物能量来源的有机物随沉积深度增加而减少, 并且也越来越难被降解利用。因此, 微生物的代谢速率随沉积深度增加而越来越低。但是, 局部不均匀分布的天然气水合物等能源可改变这种微生物生理活动的垂直分布规律, 甲烷高浓度带往往是整个沉积物柱层中微生物代谢最活跃带。并且, 由于地球化学热反应过程可产生非生源性甲烷, 深部沉积物中还可能出现以热生成甲烷为能量依托的次级微生物代谢活跃带 (Parkes *et al*, 2000)。海底深部生物圈微生物产甲烷和甲烷厌氧氧化已成为该生境微生物生理代谢活动及生物地球化学过程的研究焦点 (Zhang *et al*, 2004)。

在全球尺度上, 边缘海海底深部生物圈微生物年呼吸率占该处海洋表面真光层生物量年生产率的 1% 或更少, 而大洋海底深部生物圈微生物年呼吸率只占该处海洋表面真光层生物量年生产率的 1/10 000 或更少。但是, 海底深部生物圈却蕴藏着巨大的生物量 ( $3 \times 10^{17}$  g C), 比海水总生物量大 2 个数量级 ( $4 \times 10^{15}$  g C)。这说明, 除沉积物甲烷厌氧氧化高活动带外, 海底深部生物圈中的大部分微生物是不活跃的或只具有极低的代

谢速率 (D'Hondt *et al.*, 2002a; Pakes *et al.*, 2000)。

## 四、海底深部生物圈微生物对极端环境的适应

海底深部生物圈沉积和洋壳环境往往代表着复杂多样的低有机物含量、高静水压力、低温(大洋沉积物表层)或高温(海底深部沉积物和洋壳)、局部高盐或高酸碱度等极端环境。生活在这里的微生物经过长期的进化演化获得了生理或遗传上的适应。附生在物体表面、产生保护性生物膜(biofilm)和处于极低生理活动状态可能是海底深部生物圈大部分微生物的普遍生理适应对策(Coven *et al.*, 2003; D'Hondt *et al.*, 2002a; Huber *et al.*, 2002)。而在进化中产生与极端环境相适应的基因调控和特殊酶系统是海底深部生物圈微生物常见的遗传生化适应机制。了解微生物的极端环境适应不但有助于了解微生物在海底深部生物圈的原位生理生态活动和对海洋生物地球化学循环过程及地球系统进化的贡献和调控,而且有助于特殊功能基因、功能酶和天然生物活性物质的筛选和开发利用。由于海底深部生物圈高盐、高酸或高碱等极端环境只具有非常有限的分布和范围,本文将只对分布范围广、出现频率高的嗜极端温度和压力的海底深部生物圈微生物作进一步论述。

### 1. 海底深部生物圈微生物对温度的适应

温度是地球上生物生命活动的一个极其重要的环境因素。海底深部生物圈具有很大的温度跨幅,从近 2℃的深海大洋沉积物表层到海底热液泉口及深部温热的沉积物和上部洋壳中都有微生物的分布。嗜冷和嗜热微生物分布于许多细菌和古菌类群中。而在已知的极端嗜热微生物的 10 个目中,只有嗜热袍菌目和产液菌目属于细菌域,其他的都是古菌类群(刘志恒, 2002)。嗜热袍菌目和产液菌目是细菌域中最古老和进化最慢的分支,海洋嗜热袍菌(*Thermotoga maritima*)完整基因组分析表明嗜热袍菌与古菌具有很高的基因同源性(Nelson *et al.*, 1999),这进一步证实了极端嗜热细菌在进化中的原始性。极端嗜热微生物可能作为地球上最早发生的生命形式引起普遍兴趣,最近在一活跃深海热泉下发现的 HyperSLME 自养微生物系统进一步支持了这一假说(Takai *et al.*, 2004)。

对低温或高温的适应是许多海底深部生物圈微生物执行其生态和生物地球化学功能的基础。增加多聚不饱和脂肪酸以维持细胞膜流动性和功能性以及产生嗜冷酶以提高细胞的低温代谢活力是嗜冷微生物的主要适应对策。相反,嗜热和极端嗜热微生物通过增加膜脂的脂肪酸饱和度和产生新型结构醚脂或其二聚体而保持细胞膜结构的稳定性和功能性。产生嗜热或极端嗜热酶、小分子量相容性溶质(compatible solute)和可帮助高温下变性蛋白重新折叠的嗜热体(thermosome)分子伴侣蛋白(chaperon)是主要的蛋白质热适应分子和生化机制。产生相容性溶质、特殊 DNA 结合蛋白(如极端嗜热古菌的碱性组蛋白)和逆促旋酶(reverse gyrase)是嗜热和极端嗜热微生物的主要 DNA 热稳定机制(刘志恒, 2002)。

## 2. 海底深部生物圈微生物对压力的适应

海水平均深度为 3 800 m, 每增加 10 m 水深即增加 1 个大气压。因此, 大部分海底沉积物和洋壳处在高压环境中。海洋嗜压微生物广布于广域古菌界和嗜泉古菌界的一些古菌类群中, 但在细菌域中嗜压微生物多集中在  $\gamma$  变形菌亚纲 (Bartlett 2002; DeLong *et al.*, 1997)。隶属于  $\delta$  变形菌亚纲的嗜压深栖脱硫弧菌 (*D. profundus*) 的发现表明海底深部生物圈可能存在大量的  $\gamma$  变形菌亚纲以外的嗜压细菌 (Bale *et al.*, 1997; Bames *et al.*, 1998)。已发现的嗜压细菌和古菌与非嗜压的海洋微生物在系统发生关系上非常密切, 表明对压力选择的应对可能不需要显著的微生物进化上新种系 (Lineage) 的发生 (Bartlett 2002)。由于大洋深海底部的低温性, 目前分离的嗜压微生物大多也是嗜冷的 (Bartlett 1999), 但随着沉积物深度的增加, 高压使环境温度以  $30^{\circ}\text{C}/\text{km}$  的速率增加, 在海底数千米以下的沉积物和洋壳中可能生存着嗜热和极端嗜热的嗜压微生物。作为窥视海底深部生物圈微生物生命活动窗口的深海热泉喷口是分离嗜热和极端嗜热的嗜压微生物理想场所。

海洋嗜压微生物通常有能感受压力作用的基因, 包括细胞膜蛋白基因 *toxR* 和 *rscC* 以及 DNA 重组基因 *redD*。革兰氏阴性细菌细胞内膜 *ToxR* 是理想的压力感受系统, 转录调节着一系列压力适应蛋白的基因表达, 并可通过降低膜通道蛋白的表达程度防止细胞内糖和其他营养成分在高压胁迫下的流失。细菌内膜跨膜蛋白 *RscC* 对压力的敏感性来自于其与膜系电子传递系统的密切联系, 可能与细胞抗高压能量需求有关。*RedD* 可能与在高压条件下 DNA 损伤修复有关, 保障在极端条件下微生物遗传物质的完整性。海洋嗜压希瓦氏菌 (*Shewanella*) 还普遍具有 2 个在细菌染色体上位置临近的压力调节操纵子 (Pressure regulated Operon) (Li *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004), 除阅读框 ORF3 外, 它们编码的大部分开放阅读框 (open reading frame, ORF) 的分子和生理功能尚不明确。ORF3 编码在细胞色素 *bd* 复合体 (Cytochrome *bd* Complex) 形成中必不可少的 *CydD* 蛋白, 可能与高压环境适应的能量需求和能量代谢有关。

在细胞膜分子机理水平, 嗜压微生物对高压的适应类似于嗜冷微生物对低温的适应, 高压环境常常促使单聚和多聚不饱和脂肪酸合成的增加以调节细胞膜的组成和流动性 (Bartlett 1999; 2002)。

## 五、海底深部生物圈微生物研究展望

海底深部生物圈微生物研究是一个综合了地学和微生物学的年轻领域, 是 DSDP 和 ODP 研究计划最重要贡献之一。由于现场取样难度和高保真度要求的制约, 目前对该生境微生物种类多样性、原位 (*in situ*) 生态功能、地质过程中的生物地球化学循环作用仍了解的非常不全面。刚刚启动的国际 IODP 综合大洋钻探计划有望对这些问题做进一步解答。

### 1. 海底深部生物圈微生物分布极限的研究

多年的海底深部沉积物和洋壳微生物的研究表明, 海底深部生物圈微生物垂直分布

的极限可能远远超过现在探知的海底表面下 800 m, 这一分布极限可能最终仅受温度这一重要环境要素的制约。目前可培养的极端嗜热微生物最高生存温度可达 121℃ (Kashefi *et al*, 2003), 这表明深海沉积物表面下数千米处都有可能存在活的微生物存在 (Amend *et al*, 2005), 虽然该处深埋的来源于水层的有机物质经过漫长历史的生物和非生物地球化学转化而所存无几, 并且可利用率也极低, 很难支持微生物的代谢活动。但是, 深部沉积物和洋壳热催化反应生成的  $H_2$  等还原性气体有可能作为能源而支持着微生物的代谢、生长和  $CO_2$  固定。HyperSLME 极端嗜热化能自养微生物系统很可能在海底表面下数千米的沉积物和洋壳中普遍存在, 并且, 在这样极端特殊的环境中很可能蕴藏着地球上最原始的生命形式和过程或其遗迹, 如何探测如此深度环境中微生物的存在、生理生化特征和生物地球化学作用将是未来海底深部生物圈微生物研究的一个挑战。日本 2005 年刚刚下水的“地球号”深海地球深部钻探船的钻头可钻透海底下 7 000 m 的沉积物和洋壳, 并有望取得上部地幔样品。日本科学家将于 2006 年推出一项史无前例的地心探索计划, 即在太平洋洋底地壳最薄处打钻, 穿透深海沉积物和洋壳直抵地幔, 取回岩芯和可能存在的深部微生物样本。该计划对探究在地球的深处是否存在特别的生命物质, 解开地球生命起源之谜将具有如同人类登月取回月球岩石样品以进行宇宙研究一样的划时代意义。

## 2. 海底深部生物圈微生物种类和功能多样性的研究

由于传统培养法的局限, 我们目前对海底深部生物圈微生物多样性的研究多依赖于环境 16S rDNA 系统发育分析。尽管这一微生物分子生态学方法极大地扩展了我们对海底深部生物圈细菌和古菌多样性的认识, 却也难免有其不足。由于许多 16S rDNA 序列与已知的可培养的微生物序列相去甚远, 无法确切判定它们在细菌和古菌中的种系归属和系统发育位置, 因此也无法推断这些 DNA 序列所代表的细菌或古菌的生理生态特点, 更无从知晓它们的原位生物地球化学作用。要解决这一问题, 一是要加强培养法的突破, 二是要加强原位微生物群落功能基因的分析, 推广宏基因组学 (metagenomics) 和功能基因组学 (functional genomics) 的应用, 用以检测主要生源要素 (如 C、N、P、S 等) 和金属元素 (如 Fe、Mn 等) 生物地球化学转化过程中的功能基因表达和调控的 DNA、mRNA 和蛋白质芯片分析技术具有巨大的发展潜力和应用前景。

目前对海底深部生物圈微生物多样性研究的另一不足是有关主要微生物类群在沉积物中原位空间分布特点的报道几乎没有, 即我们缺乏对该特殊生境微生物群落组成的原位定量了解。DNA 分子探针 FISH 相关技术将是解决这一问题的关键 (Schippers *et al*, 2005)。

由于 DSDP 和 ODP 微生物取样站位在全球沉积环境中有限的分布, 我们目前对海底深部生物圈微生物全球分布的规律性及局部分布的特殊性仍知之甚少, 对全球范围内上部洋壳微生物的分布规律更是一无所知, 深海极端环境深部生物圈微生物对海洋环境变化、海底天然气能源形成和稳定、全球变化以及地球系统进化和演化的作用和影响尚不能确定, 相信 ODP 计划的实施和深入将会为我们找到答案。

### 3. 海底深部生物圈微生物作为海洋古环境和现代环境指示生物的研究

一些现代深海环境中的活跃微生物群落有可能是地球或海洋历史中某一地质或环境事件的见证，因此，海洋深部生物圈微生物有可能作为特定地质生物标志，用来指示海洋地球化学变化和地质环境变迁历史 (Inagaki *et al.*, 2001)。最近，日本科学家在一个距今已有约 100 万年历史的陆地黑页岩岩芯样品中，通过现代分子生物学研究手段，发现了残存的海洋沉积环境细菌群落，这一微生物群落的种类特征真实地反映了地球历史上在白垩纪中期所发生的大洋缺氧事件 (Inagaki *et al.*, 2005)。寻找深海典型极端环境的指示微生物系统或指示生物大分子系统将是海底深部生物圈微生物研究的一个重要内容。

## 六、我国海底深部生物圈微生物研究的方向和策略

除大型国际性 DSDP、ODP 和正在运行中的 IODP 海底深部生物圈研究计划外，许多发达国家在 20 世纪 90 年代相继开展了国家或区域性深海微生物研究计划。1993 年，日本海洋科学和技术中心 (JAMSTEC) 率先开展了“深海之星” (Deep Star) 深海微生物研究计划。欧盟从 1996 年在其第四和第五框架发展计划 (FP4 和 FP5) 中连续多年开展了“嗜极端微生物作为细胞工厂” (Extremophiles as Cell Factories) 的研究。美国从 1997 年，由其国家科学基金会连续多年资助了“极端环境生命” (Life in Extreme Environments - LExEN) 的深海微生物研究计划，目前该计划已发展成为全球性的“洋中脊多学科全球试验” (Ridge Interdisciplinary Global Experiments - RIDGE) 计划。鉴于我国目前海底深部生物圈微生物的研究才刚刚起步，与国际研究水平存在巨大的差异，有限的经验和物力要求我们的研究要有重点、有层次、有档次。要紧跟国际前沿研究中的重大重点问题，要紧密结合国家的海洋和经济发展战略，即要着手解决一批突破性的基础前沿科学问题，也要着手于海底深部生物圈特殊微生物资源的开发利用，为经济建设服务。

我国周边海沉积物天然气水合物藏矿区、海底金属成矿区、海底热液和火山活动区域应是我国开展海底深部生物圈微生物研究的重点海域 (中国大洋钻探学术委员会, 2003; 曾志刚等, 2003; Guo *et al.*, 2004)，这主要关系到我国未来海底能源和矿产资源的开发利用，防止海洋地质灾害对海洋工业工程发展可能造成的不良影响，有助于揭示微生物对海底矿藏的作用及对全球变化的影响，促进对地球生命起源和进化的探索，推动海洋微生物资源的开发利用。

我国的海底深部生物圈微生物研究应着重微生物的主要过程和机理研究，集中解决一些海洋沉积和洋壳环境中的重大重点生物地球化学问题，如我国海域微生物的厌氧甲烷氧化最大承载力和速率以及生化和分子遗传机理，微生物的金属成矿机理和对矿物的转化作用以及生化和分子遗传机理，微生物对沉积物有机物的矿化转化以及对全球变化的响应和影响，微生物对大洋洋壳的蚀变作用以及生化和分子遗传机理，微生物在极端条件下的生态功能以及生理生化和分子遗传适应机理，HyperSLME 极端嗜热化能自养微生物系统或类似自养系统的能量流动、物质循环和信息流通规律等。对这些基础科学问题的研究和解答有助于了解海底深部生物圈微生物的基本过程、功能、机制和规律，

促进我国海洋科学、地球科学和生命科学的协作和发展, 提高我国在世界科学领域中的大国形象, 具有深刻的战略意义和广阔的发展应用前景。

## 参 考 文 献

- 刘志恒. 2002. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 903
- 汪品先. 2003. 我国的地球系统科学研究向何处去. 地球科学进展, **18**(6): 837~851
- 徐洵. 2000. 海洋生物技术与资源的可持续利用. 中国工程科学, **2**(8): 40~42
- 曾志刚, 秦蕴珊. 2003. 大洋钻探对海底热液活动研究的贡献. 地球科学进展, **18**(5): 764~772
- 中国大洋钻探学术委员会. 2003. 中国加入综合大洋钻探(ODP)科学计划(2003~2013). 地球科学进展, **18**(5): 662~665
- 朱毅杰, 于开平, 周祖翼. 2003. 科学大洋钻探与深部生物圈. 海洋地质动态, **19**(9): 13~16
- Amend J B, Teske A. 2005. Expanding frontiers in deep subsurface microbiology. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **219**(1~2): 131~155
- Bale S J, Goodman K, Rodelle P A *et al*. 1997. *Desulfivibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **4**: 515~521
- Barnes S R, Bradbrook S D, Cragg B A *et al*. 1998. Isolation of sulfate reducing bacteria from deep sediment layers of the Pacific Ocean. *Geomicrobiological Journal* **15**: 67~83
- Baross J A, Hoffman S E. 1985. Submarine hydrothermal vents and associated gradient environments as sites for the origin and evolution of life. *Origins of Life* **15**: 327~345
- Bartlett D H. 1999. Microbial adaptations to the psychrosphere/piezosphere. *The Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**(1): 93~100
- Bartlett D H. 2002. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1595**(1~2): 367~381
- Benton M J, Twitchett R J. 2003. How to kill (almost) all life: The end Permian extinction event. *Trends in Ecology and Evolution* **18**(7): 358~365
- Bile K A, Kastner M, Bartlett D H. 1999. A phylogenetic analysis of microbial communities associated with methane hydrate containing marine fluids and sediments in the Cascadia margin (ODP site 892B). *FEMS Microbiology Letters* **177**(1): 101~108
- Boetius A, Ravenshlag K, Schubert C J *et al*. 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**(6804): 623~626
- Collier J, Jovall S, Zanchetta R, Helley D *et al*. 2004. Exopolysaccharides produced by bacteria isolated from deep sea hydrothermal vents: New agents with therapeutic potential. *Pathologic Biology* **52**(3): 127~130
- Colwell F, Matsumoto R, Reed D. 2004. A review of the gas hydrates: geology and biology of the Nankai Trough. *Chemical Geology* **205**(3~4): 391~404
- Coven J B, Giovannoni S J, Koenig F *et al*. 2003. Fluids from aging ocean crust that support microbial life. *Science* **299**(5603): 120~123
- Daughney C J, Rioux J B, Fortin D *et al*. 2004. Laboratory investigation of the role of bacteria in the weathering of basalt near deep sea hydrothermal vents. *Geomicrobiological Journal* **21**(1): 21~31
- DeKeyser J R, Kelley D S, Lilley M D *et al*. 1998. The quantum event of oceanic crustal accretion: Impacts of diiking at mid ocean ridges. *Science* **281**(5374): 222~230
- DeLong E F. 2004. Microbial life breathes deep. *Science* **306**(5705): 2198~2200
- DeLong E F, Franks D G, Yayanos A A. 1997. Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep sea bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(5): 2105~2108
- Deming J W, Baross J A. 1993. Deep sea smokers: Windows to a subsurface biosphere? . *Gaia in Acta et Cosmochimica Acta* **57**: 3219~3230

- D Hondt S, Rutherford S, Spivack A J. 2002a. Metabolic activity of subsurface life in deep sea sediments. *Science* **295** (5562): 2067~2070
- D Hondt S, Smith D G, Spivack A J. 2002b. Exploration of the marine subsurface biosphere. *JODES Journal* **28** (1): 51~54
- Fisk M R, Giovannoni S J, Thorseth I H. 1998. Alteration of oceanic volcanic glass: Textural evidence of microbial activity. *Science* **281**(5379): 978~980
- Fredrickson J K, Balkwill D L, Romine M F *et al*. 1999. Ecology, physiology and phylogeny of deep subsurface *Sphingomonas* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **23**(4~5): 273~283
- Fumes H, Banerjee N R, Muehlenbachs K *et al*. 2004. Early life recorded in Archean pillow lavas. *Science* **304**(5670): 578~581
- Gold T. 1992. The deep hot biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (13): 6045~6049
- Greene A G, Patel B K G, Sheehy A J. 1997. *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic anaerobic and iron reducing bacterium isolated from a petroleum reservoir. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**: 505~509
- Guerreiro R. 1998. Crucial crises in biology: Life in the deep biosphere. *International Microbiology*, **1**(4): 285~294
- Guo T M, Wu B H, Zhu Y H *et al*. 2004. A review on the gas hydrate research in China. *Journal of Petroleum Science and Engineering* **41**(1~3): 11~20
- Hallam S J, Gargis P R, Preston C M *et al*. 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(9): 5483~5491
- Hessebo S B, Grotcke D R, Jenkyns H C *et al*. 2000. Massive dissociation of gas hydrate during a Jurassic oceanic anoxic event. *Nature* **406**: 392~395
- Hinrichs K U, Hayes J M, Sylva S P *et al*. 1999. Methane consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398** (6730): 802~805
- Huber J A, Butterfield D A, Baross J A. 2002. Temporal changes in archaeal diversity and chemistry in an mid ocean ridge subsurface habitat. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1585~1594
- Huber J A, Butterfield D A, Baross J A. 2003. Bacterial diversity in a subsurface habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiology Ecology*, **43**(3): 393~409
- Inagaki F, Okada H, Tsapin A I *et al*. 2005. Microbial survival: the paleomagnetic sedimentary genetic record of past microbial communities. *Astrobiology* **5**(2): 141~153
- Inagaki F, Sakihama Y, Inoue A *et al*. 2002. Molecular phylogenetic analyses of reverse transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments. *Environmental Microbiology* **4**(5): 277~286
- Inagaki F, Suzuki M, Takai K *et al*. 2003. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subsurface sediments from the Sea of Okhotsk. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(12): 7224~7235
- Inagaki F, Takai K, Komatsu T *et al*. 2001. A archaeology of Archaea: geo-microbiological record of Pleistocene thermal events concealed in a deep-sea subsurface environment. *Extremophiles* **5**(6): 385~392
- IOOE. 2001. Earth, Oceans and Life: Integrated Ocean Drilling Program. Initial Science Plan. 2003~2013. Washington DC: IOOE Supporting Office: 110
- Kashefi K, Lovley D R. 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science* **301**(5635): 934
- Kasting J F, Siefert J L. 2002. Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* **296**(5570): 1066~1068
- Katz M E, Pak D K, Dickens G R *et al*. 1999. The source and fate of massive carbon input during the latest Paleocene thermal maximum. *Science* **286**(5444): 1531~1533
- Kennett J P, Cannariato K G, Hendy I L *et al*. 2000. Carbon isotopic evidence for methane hydrate instability during Quaternary interstadials. *Science* **288**: 128~133
- Kinura H, Asada R, Masta A *et al*. 2003. Distribution of microorganisms in the subsurface of the Manus basin hydrothermal

- vent field in Papua New Guinea. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(1): 644~648
- Kornas K A, Smith D G, Edgcomb V *et al*. 2003. Molecular analysis of deep subsurface microbial communities in Nankai Trough sediments (ODP Leg 190 Site 1176). *FEMS Microbiology Letters*, **45**(2): 115~125.
- Kvenvolden K A. 1999. Potential effects of gas hydrate on human welfare. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(7): 3420~3426
- Lanoil B D, Sassen R, La Duc M T *et al*. 2001. Bacteria and Archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(11): 5143~5153
- Li L, Kab G, Nogi Y *et al*. 1998. Distribution of the pressure regulated operons in deep sea bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **159**(2): 159~166
- Lysnes K, Torsvik T, Thorseth IH *et al*. 2002. Microbial populations in ocean floor basalt: Results from ODP Leg 187. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, **187**: 1~27
- Marchesi J R, Weighn A A, Cragg B A *et al*. 2001. Methanogen and bacterial diversity and distribution in deep gas hydrate sediments from the Cascadia Margin as revealed by 16S rRNA molecular analysis. *FEMS Microbiology Letters*, **34**(3): 221~228
- Michaels W, Seifert R, Nauhaus K *et al*. 2002. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*, **297**(5583): 1013~1015
- Mukicki J A, Liu Y, Delwiche M *et al*. 2003. Isolation of a methanogen from deep marine sediments that contain methane hydrates and description of *Methanococcus submarinus* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(6): 3311~3316
- Milov A V. 2004. Global estimates of hydrate bound gas in marine sediments: How much is really out there? . *Earth-Science Reviews*, **66**(3~4): 7663~7668
- Mills H J, Hodges G, Wilson K *et al*. 2003. Microbial diversity in sediments associated with surface breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiology Letters*, **46**(1): 39~52
- Morita R Y, Zobell C E. 1955. Occurrence of bacteria in pelagic sediments collected during the Mid-Pacific Expedition. *Deep Sea Research*, **3**: 66~73
- Nelson K E, Clayton R A, Gill S R *et al*. 1999. Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermoplasma maritimum*. *Nature*, **399**: 323~329.
- Newberry C J, Webster G, Cragg B A *et al*. 2004. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough. Ocean Drilling Program Leg 190. *Environmental Microbiology*, **6**(3): 274~287
- Newman D K, Banfield J F. 2002. Geomicrobiology: how molecular scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science*, **296**(5570): 1071~1077
- Ophan V J, Hinrichs K U, Ussler W 3rd *et al*. 2001a. Comparative analysis of methane oxidizing archaea and sulfate reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(4): 1922~1934
- Ophan V J, House C H, Hinrichs K U *et al*. 2001b. Methane consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science*, **293**(5529): 484~487
- Ophan V J, House C H, Hinrichs K U *et al*. 2002. Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(11): 7663~7668
- Ophan V J, Ussler III W, Naeher T H *et al*. 2004. Geological, geochemical, and microbiological heterogeneity of the seafloor around methane vents in the Eel River Basin, offshore California. *Chemical Geology*, **205**(3~4): 265~289
- Parkes R J, Cragg B A, Bak S J *et al*. 1994. Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. *Nature*, **371**: 410~413
- Parkes R J, Cragg B A, Wellsbury R. 2000. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeological Journal*, **8**(1): 11~28
- Reed D W, Fujita Y, Delwiche M E *et al*. 2002. Microbial communities from methane hydrate bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(8): 3759~3770
- Schippers A, Neretin L N, Kallmeyer J *et al*. 2005. Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living

- bacteria. *Nature* **433**(7028): 861~864
- Shlin A G, Friedrich M W, Nienann H *et al* 2004. *Methanobacterium aarhusense* sp. nov., a novel methanogen isolated from a marine sediment (Aarhus Bay, Denmark). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(3): 759~763
- Smith D G, Spivack A J, Fisk M R *et al* 2000. Tracer-based estimates of drilling-induced microbial contamination of deep-sea crust. *Geomicrobiological Journal* **17**: 207~219
- Stevens T O, McKinley J P. 1995. Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science* **270**: 450~454
- Stevens T. 1997. Lithoautotrophy in the subsurface. *FEMS Microbiological Reviews* **20**: 327~337
- Summit M, Baross J A. 1998. Thermophilic subsurface microbial organisms from the 1996 North Gorda Ridge eruption. *Deep Sea Research II* **45**(12): 2751~2766
- Summit M, Baross J A. 2001. A novel microbial habitat in the mid-ocean ridge subsurface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(5): 2158~2163
- Takai K, Gamo T, Tsunogai U *et al* 2004. Geochemical and microbiological evidence for a hydrogen-based hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLME) beneath an active deep-sea hydrothermal field. *Extremophiles* **8**(4): 269~282
- Takai K, Komatsu T, Inagaki F *et al* 2001. Distribution of archaea in a black smoker chimney structure. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3618~3629
- Takai K, Moyer CL, Miyazaki M *et al* 2005. *Marinobacter alkaliphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium isolated from subsurface alkaline serpentine mud from Ocean Drilling Program Site 1200 at South Chamorro Seamount, Mariana Forearc. *Extremophiles* **9**(1): 17~27
- Thorsen IH, Torsvik T, Torsvik V *et al* 2001. Diversity of life in ocean floor basalt. *Earth and Planetary Science Letters* **194**(1~2): 31~37
- Toffin L, Webster G, Weightman A J *et al* 2004. Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. *FEMS Microbiological Ecology* **48**(3): 357~367
- Toffin L, Zink K, Kab G *et al* 2005. *Marinilactibacillus pizotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep-sea floor sediment of the Nankai Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(1): 345~351
- Torsvik T, Fumes H, Muehlenbachs K *et al* 1998. Evidence for microbial activity at the glass alteration interface in oceanic basalts. *Earth and Planetary Science Letters* **162**(1~4): 165~176
- Valentine D L. 2002. Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: A review. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**(1~4): 271~282
- Wang F, Wang R, Chen M *et al* 2004. Isolation of extremophiles with the detection and retrieval of *Shewanella* strains in deep-sea sediments from the west Pacific. *Extremophiles* **8**(2): 165~168
- Wellsbury P K, Goodman K, Barth T *et al* 1997. Deep marine biosphere fueled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature* **388**(6642): 573~576
- Wellsbury P, Mather J, Pakes R J. 2002. Geomicrobiology of deep-low organic carbon sediments in the Woodlark Basin, Pacific Ocean. *FEMS Microbiological Ecology* **42**(1): 59~70
- Weme J B, Haese R R, Zitter T *et al* 2004. Life at cold seeps: A synthesis of biogeochemical and ecological data from Kazan mud volcano, eastern Mediterranean Sea. *Chemical Geology* **205**(3~4): 367~390
- Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(12): 6578~6583.
- Zhang C L, Lanoil B. 2004. Geomicrobiology and biogeochemistry of gas hydrates and cold seeps. *Chemical Geology* **205**(3~4): 187~194

## Microbiological Studies on Subseafloor Deep Biosphere in Deep Sea Extreme Environments

DANG Hongyue LI Tiegang ZENG Zhigang QIN Yunshan

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071*)

### ABSTRACT

Because of extreme environmental conditions, deep sea subsurface sediments were traditionally regarded as a huge 'desert' unable to support any kind of life form. However, 30 years' investigation by the successive DSDP and ODP deep drilling projects indicated that microbes are extensively distributed in the deeply buried sediments and some shallow oceanic crusts in the world oceans. The subseafloor deep biosphere has huge microbial biomass and great biological and molecular diversity, and carries out a series of complicated and diverse physio-ecological functions. Study of the deep subseafloor biosphere microorganisms became the foci of studies on life's origin and evolution, earth system evolution and transformation, global climate change, biotechnological development and exploitation of marine life and subseafloor natural energy resources. This review discusses the significances of the subseafloor deep biosphere microbial study and summarizes the progresses newly made in this field, in order to promote the initiation and development of related researches in our country for the active engagement in global marine resource exploitation and in international cooperation in tackling profound scientific issues in the new millennium.