

极端微生物的研究进展

Progress on study of extremophiles

丁玲^{1,2}, 李富超¹, 秦松¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)03-0071-05

极端微生物是指能够生活在被认为是生命禁区, 如极端的酸碱度 ($\text{pH} > 8.5$, $\text{pH} < 5.0$)、温度 ($> 45^\circ\text{C}$, $< 15^\circ\text{C}$)、压力 ($> 50 \text{ MPa}$)、盐度 (NaCl 浓度 $> 1.0 \text{ mol/L}$)、高浓度金属离子的环境中的生命类群^[1]。极端微生物占据生命三大类群, 以古菌为多。它们挑战了生命的极限, 给生命起源, 外空生物学等基础研究提供了依据。特殊的生存环境决定了其代谢的特殊性。极端微生物产生的很多活性物质, 如极端酶, 促进了科学以及工业的发展, 极端微生物研究已经备受瞩目。但是, 极端环境微生物采集和培养需要特殊的设备和条件, 造成极端微生物研究相对缓慢。近年来, 随着技术条件的进步和学科交叉的发展, 极端微生物研究取得快速发展。作者就极端微生物在基础和应用研究中的意义以及存在的问题进行综述。

1 极端微生物的研究意义

1.1 对生命起源及生命极限的认识

据估计, 海底沉积物中存在着超过地球一半的原核生命, 是地球上最大的原核生物圈^[2]。最近科学家用核糖体为标记, 检测出了有 1 600 万年历史, 在 400 多米深的海洋沉积物中生活着的细菌^[3]。在没有阳光的大洋深处, 生活着很多微生物和无脊椎动物, 组成了有机的生命圈, 深海微生物引起了人们探索地下生物圈极限的浓厚兴趣, 独特的生活环境决定了其代谢途径及能源利用的特殊性, 它们通过化能细菌还原二氧化碳和非有机物获取能量为生。Thomas^[4]从深海热液喷口采到了一株专性光合作用的绿硫细菌, 它通过特有的色素吸收地热辐射能量进行光合作用。这一有趣的发现对于光合作用及生命的演化提出了很多设想, 打破了“万物生长靠太阳”的传统看法。特殊的生活环境决定了其代谢途径的特殊性。Hou^[5]对一株分离自海底热液的伽马原细菌 *Idiomarina loihiensis* 基因组分析表明, 与普通的糖酵解途径不同, 该菌可发酵氨基酸作为碳源

提供能量。

古菌基因组测序显示, 它们基因序列简单, 一般低于 200 万 bp, 处于进化树的深处。一种高度嗜热厌氧的纳米古菌 *Nanoarchaeum equitans* 的基因组仅 490 kb, 位于进化树的最深部^[6]。地球上最初的原核细胞可能是古核生物而非原核生物。

1.2 对于外空生物学的启示

地球外是否存在生命一直是比较神秘的话题。地球上一些特殊的环境与其他星球非常相似, 最近, 在地球上一些极端环境中发现了生命, 这给外空生物学研究带来了信心。探索地球上极端环境中生命的存在可以给外空生物学提供证据和理论基础。目前, 已有很多证据表明, 在火星、土卫星上可能存在生命需要的水^[7~9]。《自然》杂志最新报道, 从火星上拍摄到的照片显示其表面可能是一层被灰尘覆盖的冰海, 与南极冰海非常相似。火星表面的一些物理化学属性符合生命体存在和生长的要求, 表明火星上可能存在生命^[10]。在寒冷、高辐射、温差幅度大、低营养的南极冰海中, 生活着很多嗜冷生物。南极洲大峡谷中干燥多孔的岩石环境与火星最为相似。在其中生活的真菌被当作探索火星生命的真核生命模型^[11]。2002 年, 美国科学家在爱达荷州热泉中发现了一个新型的微生物群落, 多数为古菌。它们生活在水下 200 m, 将 CO_2 和 H_2 反应生成 CH_4 产生能量生存。根据地质化学和热动力学的推测, 产甲烷菌可能是火星和土卫星地下生态系统的主要生命类群^[12]。

美国科学家在新墨西哥州卡尔巴斯附近地下岩

收稿日期: 2007-10-10; 修回日期: 2008-02-21

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-G-022, KZCX3-SW-223, 2007-1); 大洋协会项目 (DYXM-115-02-2-17)

作者简介: 丁玲 (1981-), 女, 博士研究生, 研究方向: 海洋微生物学, 电话: 0532-82898863, E-mail: bcding@yahoo.com; 秦松, 通信作者, 研究员, E-mail: sqin@ms.qdio.ac.cn

洞的一个古老盐结晶体内发现了一株耐盐菌,已经存活了 2.5 亿年^[13]。该嗜盐菌的复活挑战了生命存活时间的极限,同时,也提示生物的星际旅行是可能的。

1.3 极端微生物产生极端酶、抗生素、PUFA 等活性物质

Taq DNA 聚合酶开拓了分子生物学的新领域。研究者们正在开发热稳定性的酶标记新合成的 DNA,减少同位素等放射性物质标记对人体及环境造成的潜在威胁^[14]。1997 年,Cellulase 103 在市场上的推广是极端酶在工业领域应用的里程碑事件^[15]。现以嗜热酶为例介绍极端酶在工业中的用途。

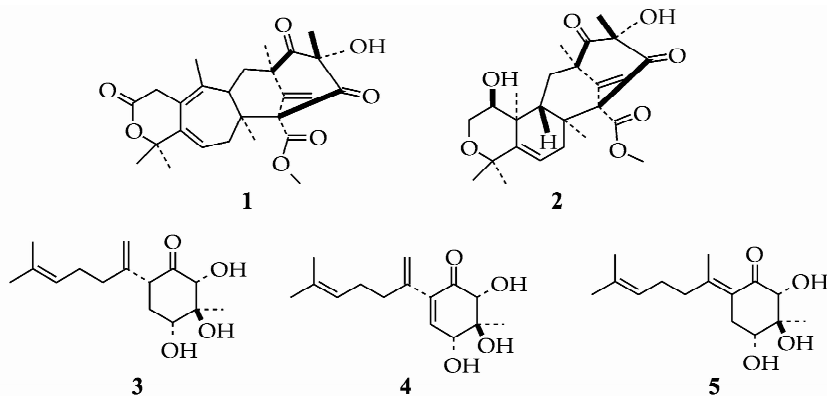
由于缺乏耐酸且在 100℃ 上具有高活性的酶,将淀粉转化为葡萄糖需要经过繁琐耗能的步骤,最后清除反应过程中产生的大量盐分需要经过昂贵的离子交换柱^[16]。现发现很多在相同条件下具备高活性的耐热淀粉酶。从多种嗜热菌 *Methanogen jannaschii*、*Pyrococcus* sp. KOD1、*Thermococcus profundus* DT5432、*Pyrococcus furiosus*、*Pyrococcus woesei* 等克隆到了嗜热淀粉酶基因,有些已经在传统宿主菌中表达^[17~23]。在工业生产中,嗜热酶应用于生物转化过程中,可以节能减排,提高效率。

利用高温酶处理木浆可以有效地去除木质素,减少对化学漂白剂的用量,从而减少了对环境的污染。而目前市场上的木聚糖酶在 70℃ 以上时迅速变性,因此,用这些酶处理纸浆时,必须先将纸浆冷却

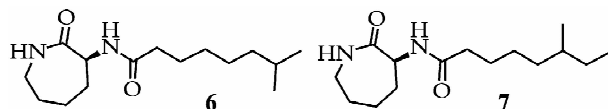
处理后再加热以进行下一个步骤,既浪费时间和能量,又比较繁琐。高热稳定性的木聚糖酶的发现与应用将会在本质上解决这一难题。*Thermotoga* sp. Strain FjSS3-B. 1、*T. maritima*、*T. neapolitana* 以及 *T. thermarum* 等能分泌具有高热稳定活力的木聚糖酶。这些酶主要在 80~105℃ 具有酶活^[24]。目前已克隆了几个编码嗜热木聚糖酶的基因。来自 *T. maritima* 的木聚糖酶基因已经在大肠杆菌中表达,该酶比目前用于造纸业中的最好的木聚糖酶更具有应用价值^[25]。

海藻糖是在工业、食品、化妆品中应用广泛的二糖。从面包酵母中提取海藻糖代价昂贵。从高度嗜热嗜酸古菌 *Sulfolobus shibatae* DMS 5389 中得到了嗜热的海藻糖合成酶^[26]。来源于 *Sulfolobus solfataricus* MT4 海藻糖合成酶 TDFE 与 TFE 的基因在大肠杆菌中得到了高效表达,经过分离纯化的酶在 pH 4.5~pH 10.5 稳定性好,最适反应温度为 85℃^[27]。

长期的进化,特殊的生活环境决定了极端微生物独特的代谢和生理能力,能够产生普通生物所没有的活性物质。目前,已经从各类极端微生物中提取到多种结构新颖的抗生素。在美国 Montana,一个由废弃铜矿形成的 450 多米深的湖中,分离得到了多种生物,发现生活在其中的真菌能够产生结构新颖的活性化合物,如 berkeleydione (1), berkeleytrione (2) 和另外 3 个新颖的倍半萜 (3~5),具有抑制基质金属蛋白酶-3(MMP-3)的活性^[28,29]。

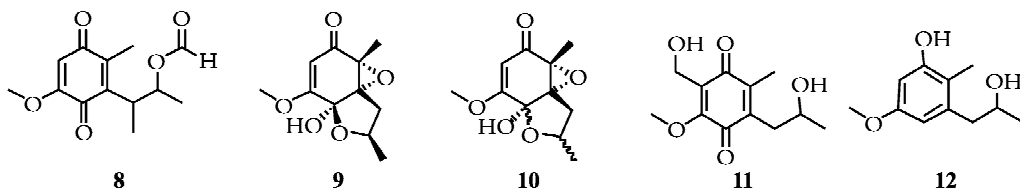


Caprolactin A (6) 和 caprolactin B (7) 是由分离自 5 000 m 深的大洋沉积物中一株细菌产生的,对 KB 细胞和 LoVo 细胞有中等抑制活性。同时,这两种化合物还具有抗单纯疱疹病毒(HSY)的作用^[30]。

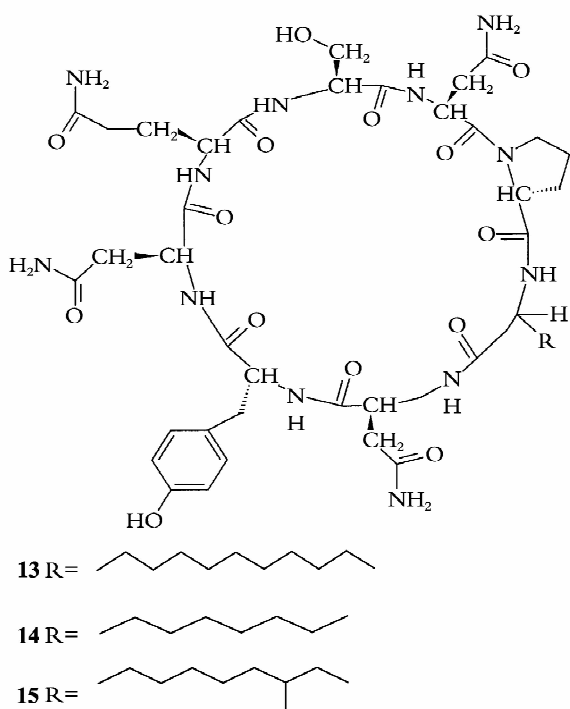


从 1 300 多米深处的海水中分离到丝状真菌 *Penicillium corylophilum*, 产生 5 个新聚酮类化合

物, (+)-formylanserinone B(8), (-)-epoxyserinone A(9), (+)-epoxyserinone B(10), hydroxymethylanserinone B(11), 和 deoxyanserinone B(12)。



在靠近北极的海泥中, 分离到一株杆状菌, 产 3 种 iturin 族的, 7 个氨基酸组成的小肽 mixirin A-C (13~15)。Mixirin A-C 具有抗结肠癌细胞株的活性 ($IC_{50} = 0.68, 1.6, 1.3 \text{ mg/L}$)^[32]。



除抗生素外, 极端微生物还可以产生其他多种有用的活性物质, 如 PUFA(多聚不饱和脂肪酸)等。PUFA 在医药食品饲料方面具有广泛的应用。嗜冷菌会产生 PUFA 以保持低温下膜脂的流动性^[33]。现在已经在很多嗜冷细菌中找到了在低温下具有高活性的合成 PUFA 的酶基因家族^[34]。

1.4 极端微生物在环境保护中发挥重要作用

工业废水中的毒性有机物质造成了严重的环境污染。芳香化合物大量累积于碱湖等一些天然环境中, 生活在其中的极端微生物可能具有降解芳香化合物的能力。实验证明, 嗜盐碱性细菌 *Halomonas campisalis* 可以降解高盐高碱环境中的苯酚等芳香化合物^[35]。*C. tropicalis* YMEC14 已被尝试用于

(+)-Formylanserinone B(8) 对血癌具有选择毒性, 对乳腺癌 MDA-MB-435 有中等细胞毒性 ($IC_{50} = 2.9 \text{ mg/L}$)^[31]。

处理橄榄油生产造成的废水, 在 40℃ 下, 经过 24 h 的发酵周期后, 苯环类物质减少了 50% 以上^[36]。环境友好的生物治理方案将会成为治理环境污染的主导方向。据中国科学院纳米科技网报道, 日本鹿儿岛市一家公司在当地七家下水污染处理场高温环境中发现一耐高温微生物, 能在高温 96℃ 下分解各种有机废弃物。该菌在 120℃ 下发酵处理垃圾下水淤泥等污染物, 40~50 d 转变成为高效有机堆肥。这一成果引起日本科技厅的重视, 将其列为一个重要研究开发项目, 即通过高温需氧发酵把造纸厂排放污水产生的污泥转化为有机肥料服务农业。

2 问题与展望

许多极端微生物在实验室条件下是不可培养的, 需要特殊的设备, 如耐酸耐高压等设施。在加州伯克利大学, Clark 研究小组设计出了独特的具备生产规模的生物反应器用于研究深海的极端微生物^[37]。极端微生物的大规模培养需要物理学、工程学、材料学等多学科的努力。

从极端环境中直接提取极端微生物的 DNA, 建立文库, 进行极端酶和抗生素研究将是目前的研究热点。用这种方法, Recombinant BioCatalysis Inc. (RBI) 公司得到了 175 种新的极端酶, 做成的试剂盒已经商业化^[15]。尽管极端微生物功能基因在普通工程菌株中高效表达有很多成功的例子, 如 *Cellulase* 103。但是, 异源的蛋白质很容易被宿主细胞降解。最近, 来源于霉菌的嗜热酶二硫化物异构酶(PDI) 在蛋白酶缺陷型的宿主 *Bacillus brevis* 31-OK 中得到了表达^[38]。同时, 由于古菌与大肠杆菌、酵母等工程菌株密码子系统有很大差别, 传统工程菌不能正确表达古菌来源的活性物质。发现和改造一些古菌作为宿主菌也是今后的努力方向。目前已经发现很多古菌中存在质粒, 多种古菌质粒的基因序列已经测序, 如 *Pyrococcus abyssi*, *Acidianus ambivalens*, *Haloarchaeal coccus* LOC-1 等。另外还发现一些病毒可感染嗜酸菌 *Sulfolobus*^[15]。

研究极端酶本身特有的结构、稳定性、生物化学和生物物理常数,揭示极端酶的反应机理将成为蛋白质工程的热点。随着酶工程的发展,可以在体外对极端酶或普通酶进行修饰,更好地满足工业要求。

在天然产物研究中,极端微生物也成为重要的研究材料,其将是天然产物研究的重要宝库。克隆不可培养微生物的抗生素合成酶基因,也将是抗生素生物合成,组合合成的重要方案。

为解释生命起源演化问题,探索极端微生物适应环境的机理,并得到更多的功能基因,科学家们更多地寄希望于极端微生物基因组。古菌基因组学研究正在成为研究的热点。截至 2007 年 1 月 1 日,在 NCBI 网站上已经公布了 28 种古菌的全基因序列。1996 年,詹氏甲烷球菌是第一个完成基因组测序的古菌,其序列不像任何细菌,证实了三域学说的正确性。*Thermoplasma acidophilum* 是一株嗜热嗜酸古菌,全基因测序已经完成,对该菌基因组的分析,将会给嗜热古菌的代谢机制,生态,演化带来启示^[39]。1999 年 5 月起我国对云南腾冲热泉中得到的泉生热孢菌进行了基因组测序,发现了 2 588 个基因,其中 824 个功能未知,其中有 15 个基因是嗜热菌所特有的^[40]。加州大学伯克利分校的 Tyson 等从加州一个废弃黄铁矿的高酸性地下水中直接提取 DNA。他们重建了两种细菌的基因组,并部分重建了另外三种细菌的基因组,其中一种细菌的近源种从未被测序过,研究人员推断出其大部分代谢通路,并查明该菌是如何以铁为食的^[41]。

美国国家科学基金会投资 20 亿美元用于建设大洋观测站网络^[42]。我国地域水域广阔,各种复杂的极端环境决定了我国具有丰富的极端微生物资源。由中科院微生物所主持的 973 项目“极端微生物及其功能利用的基础研究”已经取得了一系列成果^[43]。我国应该加大极端微生物的科研投资力度,加快极端微生物研究的步伐,在国际生命科学中占有一席之地。

参考文献:

[1] Podar I M, Reysenbach A L. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles [J]. **Curr Opin Biotech**, 2006, 17:250-255.

[2] Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: The unseen majority [J]. **Proc Natl Acad Sci**, 1998, 95: 6 578-6 583.

[3] Schippers A, Neretin L N, Kallmeyer J, et al. Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria [J]. **Nature**, 2005, 433: 861-864.

[4] Thomas B J, Overmann J, Michael T, et al. An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent [J]. **Proc Natl Acad Sci**, 2005, 102 (26):

9 306-9 310.

[5] Hou S B, Saw J H, Lee K S, et al. Genome sequence of the deep-sea γ -proteobacterium *Idiomarina loihiensis* reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy [J]. **Proc Natl Acad Sci**, 2004, 101 (52): 18 036-18 041.

[6] Huber H, Hohn M J, Stetter K O, et al. The phylum Nanoarchaeota: Present knowledge and future perspectives of a unique form of life [J]. **Res in Microbiol**, 2003, 154(3): 165-171.

[7] Kivelson M G, Khurana K K, Russell C T, et al. Galileo magnetometer measurements: a stronger case for a subsurface ocean at Europa [J]. **Science**, 2000, 289: 1 340-1 343.

[8] McCord T B, Hansen G B, Hibbitts C A. Hydrated salt minerals on Ganymede's surface: evidence of an ocean below [J]. **Science**, 2001, 292: 1 523-1 525.

[9] Malin M C, Edgett K S. Evidence for recent groundwater seepage and surface runoff on Mars [J]. **Science**, 2000, 288: 2 330-2 335.

[10] Horneck G. The microbial world and the case for Mars [J]. **Planet Space Sci**, 2000, 48(11): 1 053-1 063.

[11] Onofri S, Selbmann L, Zucconi L, et al. Exploring Mars surface and its earth analogues, Antarctic microfungi as models for exobiology [J]. **Planet Space Sci**, 2004, 52(1-3): 229-237.

[12] Chapelle F H, O'Neill K, Bradley P M, et al. A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens [J]. **Nature**, 2002, 415: 312-315.

[13] Vreeland R H, Rosenzweig W D, Powers D W. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal [J]. **Nature**, 2000, 407: 897-900.

[14] Snchez-Porro C, Martín S, Mellado E, et al. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes [J]. **J Appl Microbiol**, 2003, 94(2): 295.

[15] Pennisi E. Biotechnology: In industry, extremophiles begin to make their mark [J]. **Science**, 1997, 276 (5 313): 705-706.

[16] Niehaus F, Bertoldo C, Khler M, et al. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1999, 51(6): 711-729.

[17] Li M, Peeples T L. Purification of hyperthermophilic archaeal amylolytic enzyme (MJA1) using thermoseparating aqueous two-phase systems [J]. **J Chrom B**, 2004, 807(1): 69-74.

[18] Tachibana Y, Mendez L M, Fujiwara S, et al. Cloning and expression of the α -amylase gene from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus* sp. KOD1 and characterization of the enzyme [J]. **J Ferment Bioeng**,

- 1996, 82: 224-232.
- [19] Lee J T, Kanai H, Kobayashi T, *et al.* Cloning, nucleotide, sequence and hyperexpression of α -amylase gene from an archaeon, *Thermococcus profundus* [J]. **J Ferment Bioeng**, 1996, 82: 432-438.
- [20] Laderman K A, Asada K, Uemori T, *et al.* α -Amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*: cloning and sequencing of the gene and expression in *Escherichia coli* [J]. **J Biol Chem**, 1993, 268: 24 402-24 407.
- [21] Frillingos S, Linden A, Niehaus F, *et al.* Cloning and expression of α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongate* [J]. **J Appl Microbiol**, 2000, 88: 495-503.
- [22] Dong G, Vieille C, Savchenko A, Zeikus J G. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1997, 63: 3 569-3 576.
- [23] JØrgensen S, Vorgias C E, Antranikian G. Cloning, sequencing and expression of an extracellular α -amylase from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. **J Biol Chem**, 1997, 272: 16 335-16 342.
- [24] Winterhalter C, Liebl W. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8 [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1995, 61: 1 810-1 815.
- [25] 唐雪明. 具有工业应用价值的高热稳定性极端酶 [J]. **食品与发酵工业**, 2001, 27(5): 65-70.
- [26] Di Lernia I, Morana A, Ottombrino A, *et al.* Enzymes from *Sulfolobus shibatae* for the production of trehalose and glucose from starch [J]. **Extremophiles**, 1998, 2(4): 409-416.
- [27] De Pascale D, Sasso M P, Di Lernia I, *et al.* Recombinant thermophilic enzymes for trehalose and trehalosyl dextrins production [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2001, 11: 777-786.
- [28] Stierle D B, Stierle A A, Hobbs J D, *et al.* Berkeleydione and Berkeleytrione, New bioactive metabolites from an acid mine organism [J]. **Organic Letters**, 2004, 6(6): 1 049-1 052.
- [29] Stierle A A, Stierle D B, Kemp K. Novel sesquiterpenoid Matrix Metalloproteinase-3 inhibitors from an acid mine waste extremophile [J]. **J Nat Prod**, 2004, 67: 1 392-1 395.
- [30] Davidson B S, Schumacher R W. Isolation and synthesis of Caprolactins A and B, new caprolactams from a marine bacterium [J]. **Tetrahedron**, 1993, 49: 6 569-6 574.
- [31] Gautschi J T, Amagata T, Amagata A, *et al.* Expanding the strategies in natural product studies of marine-derived fungi: a chemical investigation of penicillium obtained from deep water sediment [J]. **J Nat Prod**, 2004, 67: 362-367.
- [32] Zhang H L, Hua H M, Pei Y H, *et al.* Three new cytotoxic cyclic acylpeptides from marine *Bacillus* sp. [J]. **Chem Pharm Bull**, 2004, 52: 1 029-1030.
- [33] Thomas D N, Dieckmann G S. Antarctic sea ice-a habitat for extremophiles [J]. **Science**, 2002, 295: 641-644.
- [34] Metz J G, Roessler P, Facciotti D, *et al.* Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both Prokaryotes and Eukaryotes [J]. **Science**, 2001, 293: 290-293.
- [35] Alva V A, Peyton B M. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity [J]. **Environ Sci Technol**, 2003, 37(19): 4 397-4 402.
- [36] Ettayebi K, Errachidi F, Jamai L, *et al.* Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction [J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2003, 223(2): 215-927.
- [37] Park C B, Clark D S. Rupture of the cell envelope by decompression of the deep-sea methanogen *Methanococcus jannaschii* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68: 1 458-1 463.
- [38] Kajino T, Kato K, Miyazaki C, *et al.* Isolation of a protease-deficient mutant of *Bacillus brevis* and efficient secretion of a fungal protein disulfide isomerase by the mutant [J]. **J Biosci Bioeng**, 1999, 87(1): 37-42.
- [39] Ruepp A, Graml W, Santos-Martinez, M L, *et al.* The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum* [J]. **Nature**, 2000, 407: 508-513.
- [40] Bao Q Y, Tian Y Q, Li W, *et al.* A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome [J]. **Genome Res**, 2002, 12(5): 689-700.
- [41] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment [J]. **Nature**, 2004, 428: 37-43.
- [42] David M. Ocean science: panel to prepare plan for underwater network [J]. **Science**, 2004, 303: 296-297.
- [43] 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 [J]. **微生物学报**, 2006, 46(2): 336.

(本文编辑:张培新)