

文章编号: 1001-8166(2005)06-0664-07

分子地质微生物学研究方法述评^{*}

王红梅¹, 谢树成², 赖旭龙², 黄俊华², 杨娇艳³

(1·中国地质大学环境学院生物科学与技术系, 湖北 武汉 430074; 2·中国地质大学地球科学学院, 湖北 武汉 430074; 3·华中师范大学生命科学学院, 湖北 武汉 430079)

摘要 微生物在诸如海洋、湖泊、土壤、冰川、洞穴等许多生态系统的地质过程中发挥着重要作用, 国际上对一些单个生态系统的地质微生物研究进展及微生物类脂物碳同位素组成与碳循环的关系等已部分地进行了总结。从分子水平上总结了地质微生物研究进展, 着重从核酸(16S rRNA、DNA)和类脂物(磷脂酸、藿醇)两大方面评述了分子地质微生物学的研究, 重点剖析了地质历史时期的甲烷氧化细菌、绿硫细菌、蓝细菌等一些重要微生物类群的类脂物分子标志化合物特征, 揭示了当今分子地质微生物研究领域最新的研究方法及其发展动态, 指出单体稳定同位素研究和放射性同位素示踪的结合将使分子地质微生物学研究进入一个崭新阶段。

关键词 地质微生物; 生物标志化合物; 分子化石; 微生物

中图分类号: Q939.99 文献标识码: A

0 引言

地质微生物学(geomicrobiology)最早源于 geological microbiology 一词。1954年 Beerstecher^[1]对地质微生物学进行了定义, 认为它是研究微生物和地球历史关系的科学。1963年 Kuznetsov^[2]在地质微生物学的定义中更加强调了微生物在现代地质过程中的作用, 如微生物在各种水体包括地下水中的沉积作用及在地壳表层的风化作用等。目前对地质微生物学较为统一的认识是: 地质微生物学是研究微生物在过去或现代正在进行的地质过程中所起作用的学科^[3]。已有的研究表明, 微生物可以通过多种方式来改变人们赖以生存的地球^[4]。如它们可以通过放氧的光合作用、固氮作用等改变大气圈的化学性质^[5], 通过控制矿物的风化速率或导致矿物的沉淀影响海洋、河流和孔隙流体的组成, 通过释放

配位剂或用酶催化氧化还原反应而改变金属和非金属在水、土壤和沉积物中的形成作用, 更为重要的是微生物生态类型的多样性使它们几乎无处不在, 尤其是在各种极端环境如高温(热液喷口附近)^[6]、高压(大陆超深钻中)、极酸环境(pH为-0.1)^[7]中微生物的发现, 不得不使人们对微生物的地质作用重新进行审视, 地质微生物学也因此倍受重视。

然而, 由于微生物的常见类群如细菌、放线菌、真菌和单细胞藻类等个体均十分微小, 而且生活周期也十分短暂, 这就使地质微生物学的研究尤其是涉及到地质历史时期微生物作用的研究十分困难。用传统的微生物培养方法不可能对地质历史时期微生物进行研究, 要由此进一步研究这些微生物的地质作用和地球化学过程就更加不可行。现代分子生物学的飞速发展不仅成为生物学发展史上的一个里程碑, 而且对与之相关的学科也起到了巨大的推动

* 收稿日期: 2004-05-25 修回日期: 2005-01-25.

* 基金项目: 国家自然科学基金项目“典型地区土壤微生物芽孢计数异常与下伏矿化的关系”(编号: 40202011); 武汉市晨光计划项目“红土型金矿区微生物找矿潜力研究”(编号: 2003500216-29); 教育部留学回国人员科研启动基金联合资助。

作者简介: 王红梅(1970-), 女, 河南濮阳人, 副教授, 主要从事地质微生物学、分子有机地球化学、生物学等方面的教学和科研工作。
E-mail: hm.wang@cug.edu.cn

作用。分子生物学技术为检测现代环境中的微生物提供了强有力的保障,一些分子生物学中常用的技术方法和生物化学的一些研究方法被引入到地质微生物学的研究中,为地质微生物学提供了前所未有的发展空间。与此同时分子地质微生物学也应运而生,它借助有机地球化学和现代分子生物学的手段,研究微生物本身或地质体中来源于微生物的有机组分的组成和结构特征,揭示微生物的群落结构和地球化学过程,为寻求重大科学问题(如环境演变、生命起源等)的答案提供线索。在这些有机组分中,最为重要的当属微生物分子化石(化学化石, chemical fossils)。分子化石(molecular fossil)是指地质体中那些来自生物有机体的分子,它们在有机质演化过程中具有一定的稳定性,虽受成岩、成土等地质作用的影响,没有或较少发生变化,基本保存了原始生物生化组分的碳骨架,记载了原始生物母质的相关信息,具有一定的生物学意义。

目前,分子地质微生物学的研究内容已涵盖了核酸、蛋白质和类脂物等,研究载体也覆盖了土壤、洞穴、冰川、湖泊和海洋沉积物、大陆超深钻、大洋中脊、热泉等。就过去的地质作用而言,地质微生物学更着重类脂物和微生物成因结构的分析。这是因为与富含生物学信息的核酸相比,类脂物在地质体中要稳定得多,可以在许多载体中长期保存,虽然经历了一定的成岩、成土、压实等作用,它们仍然能够保留原始生物的碳骨架,它们所携带的生物学信息比核酸少,但在判断一些生物面貌上仍能提供十分有用的信息。而生物成因的结构则可以提供微生物存在的一些证据。由于地质微生物学研究载体的广博性和文章篇幅的限制,再加上已有不同的学者就上述某些单一生态系统的地质微生物研究以及原核生物类脂物碳同位素组成与不同环境中碳循环的关系进行了一些总结^[8-10],在此作者仅就不同载体所共用的研究方法和有关研究内容进行一些综述,以反映该领域日新月异的研究方法和发展趋势。

1 核酸的研究方法

核酸是生物遗传信息的携带者,包含大量的生物学信息。利用核酸特定的核苷酸序列来鉴别环境中出现的微生物已成为现代微生物生态学和环境微生物学中十分重要的手段。由于该方法的使用并不依赖于活的生物体,因此只要有良好的核酸保存条件,该方法对死了的生物也同样适用。这就为研究地质历史时期特殊环境中的微生物提供了不可多

得的契机。核酸的研究方法很多,下面仅就最基本的几种加以介绍,在实际工作中,几种方法通常结合起来使用,具体的流程图见图1。

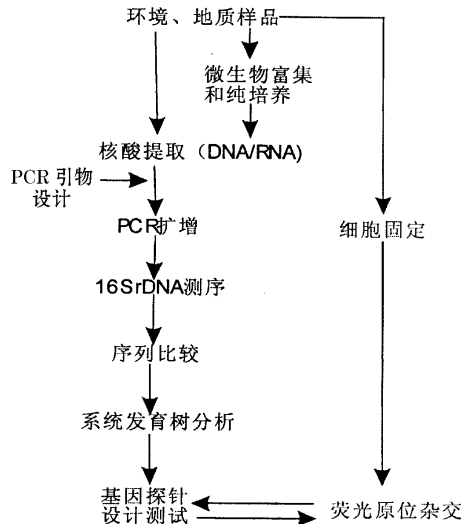


图1 分子地质微生物核酸分析流程简图

Fig.1 The flow diagram of nucleic acid analysis in molecular geomicrobiology

1.1 核酸扩增技术——PCR 反应

PCR (Polymerase Chain Reaction) 即多聚酶链式反应技术的出现是现代分子生物学发展史上的一个里程碑。它使得在体外快速扩增 DNA 成为现实。该技术能够模拟体内 DNA 复制的方式在体外的小试管中通过酶促反应,选择性地扩增目的 DNA 某个特殊区域。通过变性、退火和延伸三个步骤的不断循环,获得大量目的 DNA。该技术已经成为分子生物学最基础的实验技术,在微生物生态学和环境微生物学中应用十分广泛。如在对冰芯中的微生物进行研究时,由于很多冰芯微生物并不能用传统的纯培养的方法获得,而且数量也很有限,如果没有足够量的 DNA,就会给微生物的进一步鉴定带来困难。或者多种微生物的 DNA 混杂在一起,也会影响最终的鉴定结果。此时利用 PCR 技术不仅可以大量扩增 DNA,而且还可以根据研究的需要通过选择不同的引物来扩增不同目的 DNA。张晓君等^[11]就用 PCR 技术扩增了马兰冰芯中微生物的 16S rDNA,并构建了扩增片段的基因文库,在此基础上利用系统发育树对冰芯中的微生物进行了鉴定。Fish 等^[12]通过对 11 ~425 Ma BP 的岩盐样品中 16S rRNA 部

分基因序列的扩增,检测到了嗜盐古细菌和细菌的存在,证明了微生物在蒸发岩形成过程中的作用。

1.2 核酸序列分析

核酸序列的特异性为不同微生物的鉴定提供了可靠证据。被用于微生物鉴定的核酸序列包括 16S rRNA /DNA, 23S rRNA /DNA, 以及 16S rRNA 和 16S ~23S rDNA 间区的核苷酸序列。核酸测序主要利用不同微生物在核糖体 16S rRNA 及其基因(rDNA)序列上的差异来进行微生物种类的鉴定和定量分析。rRNA 是研究细菌进化和亲缘关系的重要指标,它含量大(约占细菌 RNA 总量的 80%)并存在于所有细菌中,在细菌中高度保守,素有“细菌化石”之称,是细菌系统分类学研究中最有用的手段。利用 16S rRNA 序列分析可以区分细菌和古细菌等两大范畴以及分属于该领域内的不同微生物。对微生物 16S rDNA 测序的长度取决于研究的目的。如果所测序列将要用于探针设计和新物种鉴定时,最好进行全长测序。而通常来讲,400 ~600 碱基的序列足以对环境中微生物的多样性和种群分类进行初步的估计。有了微生物 16S rDNA 序列,不论是全序列还是部分序列,都可以提交到 GenBank 采用 BLAST 程序与已知序列进行相似性分析。GenBank 将按照与测得序列的相似性高低列出已知序列名单、相似性程度以及这些序列相对应的微生物种类,并进一步根据微生物 16S rRNA 的序列同源性,计算不同物种之间的遗传距离,然后采用聚类分析等方法,将微生物进行分类,在属或种的层次上构建它们的系统发育树^[13]。但由于 16S rDNA 序列在原核生物中的高度保守性,对于相近种或亚种的鉴别能力较差。如作者在对金矿化指示菌株蜡芽芽孢杆菌群进行 16S rRNA /DNA 测序时发现该菌群的核苷酸序列高度相似,无法进一步进行种一级的鉴定。此时可以尝试对 16S rRNA 和 16S ~23S rDNA 区间序列进行测序(杨娇艳等,数据待发表)。

近年来由于该研究方法的迅速崛起,极大地促进了极地和冰川微生物学的兴起。研究者^[14-17]通过提取冰芯或冰雪中的 DNA,扩增后对其进行测序和各种指纹分析来反映微生物群落的组成和变化,并试图挖掘微生物群落结构的变化与气候演变之间的关系。实践证明该方法无论对样品中死亡或不可培养的微生物都行之有效,这就为人们研究特殊地质体中地质历史时期的微生物开辟了道路。

1.3 环境中特定核酸序列的检测——基因探针

基因探针指的是一段特异性的 DNA 单链,长度

通常为 15 ~30 个碱基。在特定条件下,基因探针可根据碱基互补配对的原则,与待测样品中互补的 DNA 序列结合,这种结合被称为杂交。如果在杂交前将基因探针的核苷酸序列标记上一些可检测的物质(如放射性同位素、荧光染料或催化特异性反应的酶)就可利用与目标基因结合的基因探针上的放射性信号或荧光信号识别样品中目标核酸,如 16S rRNA,从而判断样品中微生物的种类。根据信号的强弱还可以定量地来了解靶核酸的量。

荧光原位杂交(Fluorescence in Situ Hybridization, FISH)就是将基因探针用荧光染料标记,再使之与固定在载玻片上的微生物样品杂交,将未杂交的荧光探针洗去后用普通荧光显微镜或共聚焦激光扫描显微镜进行观察和摄像。FISH 将精确的分子遗传学鉴定和显微镜可视的图像信息结合起来,使得在自然环境中的单个微生物细胞鉴别成为可能。由于该技术不需要任何选择、纯化和扩增的步骤,并且可以同时对不同类群的细菌在细胞水平上进行原位的定性定量分析和空间位置标识,因此被广泛应用于不同环境,如沉积物^[18]、海湾^[19]、土壤^[20]微生物群落和微生物多样性的研究中。

2 类脂物

值得注意的是,近年来微生物类脂物标志化合物研究工作取得了长足进展,不仅从地质体中发现了针对某一具体微生物类群(如蓝细菌、绿硫细菌、紫硫细菌、嗜甲烷菌)的分子化石,而且利用生物标志化合物还可对目前存在的微生物群落进行研究。后者的工作主要来自于磷脂酸^[21, 22]和藿类化合物如细菌藿多醇等^[23]。这些微生物标志化合物为追溯微生物随时间(深度)的变化,并进而评价其对有机碳同位素的贡献创造了条件。

2.1 磷脂酸(PLFA)

PLFA(磷脂酸)几乎是所有生物细胞膜的重要组成部分,在正常的生理条件下微生物磷脂酸含量恒定,因此可根据不同微生物类群特定的磷脂酸组成来揭示环境中微生物的类群。磷脂酸并不稳定,在微生物死后的数星期内就会被水解,因此 PLFA 通常被用来指示当前活的微生物生物量和微生物群落结构^[22, 24, 25]。再者由于微生物对外界环境条件变化具有高度的灵敏性,微生物 PLFA 的含量在外界环境条件发生了特定的变化后,也会很快地在 PLFA 的种类和数量上得到反映。因此,通过对 PLFA 图谱分析就可以获得微生物群落结构随环境变

化的信息,为挖掘环境变化或微生物地球化学过程提供了平台。Petsch等^[26]曾用 PLFA 和碳同位素相结合,研究了俄亥俄州黑色页岩风化剖面上微生物随深度的变化情况。发现该剖面的微生物由好气的原核和真核微生物以及厌氧微生物群落组成,它们的 PLFA 组成在 40 ~50 cm 处存在一个显著的变化,该变化与页岩有机质的减少、 Fe^{3+} 和土壤有机质的增加相对应。同位素结果揭示页岩至少有一部分有机质的减少与厌氧微生物的代谢消耗有关。磷脂酸的研究显示在风化的页岩剖面上,不断发生着古代有机质的降解和现代土壤有机质的积累和降解过程,揭示了近地表环境中微生物作用的复杂性。有关 PLFA 方法的详细综述可参见文献^[27,28]。

2.2 细菌藿多醇

藿类化合物(藿醇等)是细菌细胞膜的组成成分,主要用于维持细胞膜的稳定性,它们被认为是地球上最丰富的自然产物^[29],广泛存在于土壤、沉积物中。不同微生物,其藿类化合物有一定差异^[23]。在岩石中也可以发现由这些前身物转化来的生物标志化合物如藿烷,它们甚至在前寒武纪的地质体中也有发现^[30]。Pancost等^[31]利用来自细菌的藿类化合物得出的气候变化旋回与植物化石所反映的一致,显示了微生物生物标志化合物指标在古气候重建中的较好潜力。

2.3 同位素标记法

稳定放射性碳同位素标记方法是微生物生态学研究中常用的一种方法,通常用于特定底物的标记。具体作法是将特定的反应底物用 ^{14}C 、 ^{15}N 或 ^{34}S 标记,将研究的微生物接种到标记过的反应底物中,经过一定时间的生长或反应,检测同位素在不同组分之间的分布便可揭示微生物利用某些物质时的途径和微生物具体的地球化学行为。如Boschker等^[32]便通过对特定生物标记化合物进行碳同位素的标记,揭示了在陆相和盐度稍大的沉积物中,参与硫酸盐还原(与醋酸氧化相关联)的细菌主要是与革兰氏阳性细菌相似的硫酸盐还原细菌而非革兰氏阴性细菌 *Desulfobacter* spp. 在淡水沉积物中甲烷氧化主要是由 I 型甲烷氧化菌完成。这对揭示特定的微生物类群与硫酸盐还原和甲烷氧化两个重要的地球化学过程的对应关系意义重大。

3 一些特殊微生物的类脂物标志化合物

下面着重分析一下具有重要意义的一些细菌的分子标志化合物。目前,我国对这类标志化合物的

研究很少,工作基本上是空白,还未很好地引起人们的关注。

3.1 甲烷氧化细菌

当今海底天然气水合物倍受人们的关注,不仅仅因为它是将来巨大的潜在能源,而且还在于它的环境效应。海底天然气水合物释放所产生的环境变化可以引起生物的剧变乃至灭绝。已有研究指出^[33],发生在侏罗纪/三叠纪分界面(200 Ma BP)、早侏罗世托阿尔阶(183 Ma BP)、早白垩世中维克特阶(116 Ma BP)、白垩纪森诺曼阶/土仑阶分界面(91 Ma BP)和古近纪/白垩纪分界面上的大量海底生物灭绝,特别是单细胞海底生物的灭绝可能与天然气水合物大规模快速分解有关。而研究历史时期的天然气水合物的对象之一便是以甲烷为能源的甲烷氧化细菌。甲烷的微生物氧化是自然界中十分重要的生物地球化学过程,该过程可以抑制温室气体甲烷从厌氧环境中的释放。对现代甲烷氧化细菌的研究可以利用 PLFA 图谱进行,目前根据 PLFA 图谱的不同特征已经可以将甲烷氧化细菌区分为两大类:类型 I 和类型 II。类型 I 的甲烷氧化细菌主要包含一系列 $C_{16:1}$ 的磷脂酸,而类型 II 的甲烷氧化细菌则以 $C_{18:2}$ 磷脂酸为主^[34]。并且利用 PLFA 的特征还可以对类型 I 的甲烷氧化细菌进行次一级的划分^[35]。古代嗜甲烷菌的活动和生物量最直接的证据则依赖于类脂物分子化石的记录^[36-39]。最主要的分子化石就是 diploptero1,它是一种藿类化合物,由多种好氧细菌包括嗜甲烷菌合成^[40],其 ^{13}C 大约在 -60‰,证明以甲烷为碳源的生物合成作用^[39]。Hinrich等^[41]利用 diploptero1 这一分子化石及其碳同位素揭示了晚更新世海水中甲烷浓度不断变化的趋势,并与有孔虫数据对比,发现二者有极好的对应关系。并且只有在有孔虫同位素出现偏负时,甲烷氧化菌 diploptero1 分子化石含量才在背景值以上,通常与低氧纹层相联系。

3.2 绿硫细菌

绿硫细菌是一类不产氧光养型细菌,它们是严格厌氧和专性光养。一方面,只能在厌氧条件下通过光合作用生长,因为在这些细菌中色素的产生会被 O_2 所抑制。另一方面,在无光条件下不能进行呼吸代谢,在有还原性硫化物作为硫的来源的情况下,可以吸收简单有机基质以供生长。因此,这类细菌是一种很好的环境指标,它们的存在指示了当时水体的透光带富含硫化氢。

研究证实,这类具有很好环境指示意义的绿硫

细菌具有很特征的类脂分子标志化合物,那就是 2-烷基-1,3,4-三甲苯系列^[42,45]。其中的烷基侧链具有类异戊二烯结构。这个系列的化合物碳数分布主要在 C_{10} ~ C_{31} 范围,一般 C_{17} 含量相对较低,主峰化合物多变,目前还不清楚主峰化合物变化的原因,化合物质谱的特征离子峰为 133 或 134。这一系列化合物被认为是由绿硫细菌中的含芳环的类胡萝卜素转化来的,因此可以作为这类细菌的标志化合物。这类化合物已在志留纪、泥盆纪、石炭纪、二叠纪、三叠纪、侏罗纪、白垩纪的沉积岩中检测到,分布比较广泛。

然而,进一步的研究发现,这类化合物也可以由其他有机化合物而不是含芳环的类胡萝卜素转化来的^[46]。因此,这类化合物是否指示了绿硫细菌的存在还需单体同位素的证据,以证明这类化合物与类胡萝卜素之间的相互关系。

3.3 蓝细菌

蓝细菌由大量且不均一的光合细菌组成,与绿硫细菌的最大区别在于它们是产氧的光合细菌,它们是最早能放出氧气的光合自养生物并担负着地球大气从无氧到有氧的转换作用。蓝细菌代表着细菌主要系统发育谱系中的一支并且与革兰氏阳性细菌的关系较远。蓝细菌只含一种叶绿素,即叶绿素 *a*。蓝细菌形态多种多样,广泛分布于陆地、淡水和海洋中。总的来说,它们比藻类更能忍受不良环境。它们的营养要求比较简单,不需要维生素,能以硝酸盐或氨作为氮源。

这些细菌具有比较特征的类脂物分子,如脂肪酸组成与其他所有的原核生物都不同,通常含有 2 个或多个双链组成的不饱和酸。特别是,在细菌组成中,细菌藿多醇是细胞膜的组分,它具有调控和固化的功能,其中在 C_2 位置上的甲基化是蓝细菌所特有的现象。因此,由 2-甲基藿醇转化来的地质体中的 2-甲基藿烷是蓝细菌的标志化合物^[40,47,48]。在实际应用中,常采用的 2-甲基藿烷指数来表示 2-甲基藿烷与正常藿烷的比值,如 C_{31} -2-甲基藿烷与 C_{30} 藿烷的比值等。把产氧光合作用提前到 27 亿年以前,就是依靠的这个分子化石指标^[48]。

4 展望

分子地质微生物学是一个极具发展潜力的交叉学科,目前已成为地球科学、生物学这两大基础学科的一个研究热点。它主要利用分子生物学和微生物学研究中的方法和手段来解决一些与微生物密切相

关的重大地质问题在分子水平上的记录。当前,地质微生物领域的一些新成果促使人们重新审视生命的极限,微生物的多样性与传统生态理论体系的宏观生物系统的多样性明显不同^[13,49],宏观生态学在多大程度上能应用到微观生态学是个值得争议的问题^[4,13],对地质历史时期生物多样性的变化和绝灭的了解在很大程度上依赖于对微生物资料的积累,因为微生物是地球上生物质的主要贡献者^[50],也是地球上最难弄清楚的生物,它的复杂性不亚于生物礁和热带雨林^[51]。

这些问题的突破都有待于分子地质微生物的深入,它不仅需要传统的微生物学研究方法,更有赖于现代新技术新方法的引进,其中之一便是单体稳定同位素的工作。早在 1978 年,著名质谱学家 Hayes 就把气相色谱—同位素质谱仪引进到了分子有机地球化学、分子古生物学领域,使复杂混合物中单体稳定同位素的研究成为可能,但直到 1988 年、1994 年才分别出现了复杂混合物中单体稳定碳同位素和氮同位素的商业应用,而研究复杂混合物中单体稳定氢、氧同位素则仅在 1999 年才开始得以应用^[52]。毫无疑问,单体稳定同位素研究和放射性同位素的示踪将在未来分子地质微生物学中大放异彩。我国虽然引进了一些这方面的先进设备,但研究工作还亟待加强。

参考文献(References):

- [1] Beerstecher E. *Petroium Microbiology* [M]. New York: Elsevier, 1954.
- [2] Kuznesov S I, Inanov M V, Lyalikova M N. *Introduction to Geomicrobiology (English translation)* [M]. New York: McGraw-Hill, 1963.
- [3] Ehrlich H L. *Geomicrobiology* [M]. New York: Marcel Dekker, 2002.
- [4] Newn A D K, Banfield J F. Geomicrobiology: How molecular-scale interaction underpin biogeochemical systems [J]. *Science*, 2002, 296: 1071-1077.
- [5] Kasting J F, Siefert J L. Life and the evolution of Earth's atmosphere [J]. *Science*, 2002, 296: 1066-1068.
- [6] Reysenbach A L, Shock E. Merging genomes with geochemistry in hydrothermal ecosystem [J]. *Science*, 2002, 296: 1077-1082.
- [7] Edwards K J, Bond P L, Ghiring T M, et al. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage [J]. *Science*, 2000, 287: 1796-1799.
- [8] Northrup D E, Lavoie K H. Geomicrobiology of caves: A review [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2001, 18: 199-222.
- [9] Pakes R J, Cragg B A, Walsbury P. Recent studies on bacterial populations and process in subsurface sediments: A review [J].

- Hydrology Journal, 2000, 8: 11-28.
- [10] Pancost R D, Damst J S S. Carbon isotopic compositions of prokaryotic lipids as tracers of carbon cycling in diverse settings [J]. *Chemical Geology*, 2003, 195: 29-58.
- [11] Zhang Xiaojun, Ma Xiaojun, Yao Tandong, et al. Diversity of 16S rDNA and environmental factor influencing microorganisms in Malan ice core [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(9): 947-951. [张晓君, 马晓军, 姚檀栋, 等. 马兰冰芯 16S rDNA 的多样性与影响冰芯中微生物的环境因素 [J]. *科学通报*, 2003, 48(9): 947-951.]
- [12] Fish S A, Shepherd T J, McGenity T J, et al. Recovery of ¹⁶S ribosomal RNA gene fragments from ancient halite [J]. *Nature*, 2002, 417: 432-436.
- [13] Macalady J, Banfield J F. Molecular geomicrobiology: Genes and geochemical cycling [J]. *Earth and Planetary Sciences Letters*, 2003, 209: 1-17.
- [14] Christner B C, Thompson E M, Thompson L G, et al. Recovery and identification of viable bacteria buried in glacial ice [J]. *Ice Ages*, 2000, 144: 479-485.
- [15] Dancer S J, Shears P, Platt D J. Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canada's high Arctic [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, 82: 597-609.
- [16] Ma L J, Catharine M C, Starmer W T, et al. Revival and characterization of fungi from ancient polar ice [J]. *Mycologist*, 1999, 13: 70-73.
- [17] Zhang Xiaojun, Yao Tandong, Ma Xiaojun, et al. Analysis of the characteristics of microorganisms packed in the ice core of Malan Glacier, Tiber, China [J]. *Science in China (D)*, 2001, 44(suppl.): 369-374.
- [18] Li Chet-Brosae E, Russell-Mora R, Amann R. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 691-696.
- [19] Ramasingh N B, Fossing H, Ferdinann T G, et al. Distribution of bacteria populations in a stratified fjord quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 391-404.
- [20] Felske A, Akkermans A D L, De Vos W M. In situ detection of an uncultured predominant *Bacillus* in dutch grassland soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 588-590.
- [21] Pennanen T, Frostegard A, Fritze H, et al. Phospholipid acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in Coniferous forest [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 420-428.
- [22] Fierer N, Schimel D P, Holden P A. Variation in microbial composition through two soil depth profiles [J]. *Soil & Biochemistry*, 2003, 35: 167-176.
- [23] Farrind P, Head I M, Innes E. Environmental influence on the bioproduct composition of recent sediments [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, 64: 985-992.
- [24] Kelly J J, Hoggblom M, Tate III R L. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of insecticide: A laboratory microcosm study [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, 31: 455-465.
- [25] Waldrop M P, Balsler T C, Firestone M K. Linking microbial community composition to function in a tropical soil [J]. *Soil & Biochemistry*, 2000, 32: 837-846.
- [26] Petsch S T, Edwards K J, Eglington T I. Abundance, distribution and ¹³C analysis of microbial phospholipid-derived fatty acids in a black shale weathering profile [J]. *Organic Geochemistry*, 2003, 34: 731-743.
- [27] Qi Hongyan, Xue Kai, Zhang Hongxun. Phospholipid fatty acid analysis and its application in microbial ecology [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8): 576-582. [齐洪雁, 薛凯, 张洪勋. 磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在微生物生态学领域的应用 [J]. *生态学杂志*, 2003, 23(8): 576-582.]
- [28] Zhang Hanbo, Duan Changqun, Qu Lianghu. Culture independent methods for studies on microbial ecology of soils [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2003, 22(5): 331-336. [张汉波, 段昌群, 屈良鹤. 非培养方法在土壤微生物生态学研究中的应用 [J]. *生态学杂志*, 2003, 22(5): 331-336.]
- [29] Currisson G, Albrecht P. Geochimica: The most abundant natural products on Earth? [J]. *Accounts of Chemistry Research*, 1992, 25: 398-402.
- [30] Summons R E, Jahnke L L, Hope J M, et al. 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis [J]. *Nature*, 1999, 400: 554-557.
- [31] Pancost R D, Baas M, Damst J S S. ¹³C values and radiocarbon dates of microbial biomarkers as tracers for carbon recycling in peat deposits [J]. *Geology*, 2000, 28: 663-666.
- [32] Boschker H T S, Nold S C, Wellesbury P, et al. Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C labelling biomarkers [J]. *Nature*, 1998, 392: 801-805.
- [33] Hesselbo S P. Massive dissociation of gas hydrate a Jurassic oceanic event [J]. *Nature*, 2000, 406: 392-395.
- [34] Hanson R S, Hanson T E. Methanotrophic bacteria [J]. *Microbiology Review*, 1996, 60: 439-471.
- [35] Bowman J P, Sly L I, Stacklebrandt E. The phylogenetic position of the family Methylococcaceae [J]. *International Symposium on Bacteriology*, 1993, 45: 182-185.
- [36] Freeman K H, Hayes J M, Trendelenburg J M, et al. Evidence from carbon isotope measurements for diverse origins of sedimentary hydrocarbons [J]. *Nature*, 1990, 343: 254-256.
- [37] Summons R E, Jahnke L L, Roksandic Z. Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria: Relevance for interpretation of the geochemical record of biomarkers [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1994, 58: 853-863.
- [38] Hinrichs U, Hayes J M, Sylva S P, et al. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments [J]. *Nature*, 1999, 398: 802-805.
- [39] Hinrichs K U. A molecular recorder of methane hydrate destabilization [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2001, 65(1): 1-10.

- 2000GC0001118.
- [40] Rohmer M, Bouvier-Nave P, Ourisson G. Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes [J]. *Journal of General Microbiology*, 1984, 130: 137-150.
- [41] Hinrichs K U, Hmelio L, Sylva S P. Molecular fossils record of elevated methane levels in late Pleistocene coastal waters [J]. *Science*, 2003, 229: 214-217.
- [42] Summons R E, Powell T G. Chlorobiaceae in Palaeozoic seas revealed by biological markers, isotopes and geology [J]. *Nature*, 1986, 319: 763-765.
- [43] Summons R E, Powell T G. Identification of aryl isoprenoids in source rocks and crude oils: Biological markers for the green sulphur bacteria [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1987, 51: 557-566.
- [44] Yu K, Fan P, Philip R P. Novel biomarkers found in South Florida basin [J]. *Organic Geochemistry*, 1990, 15: 433-438.
- [45] Grice K, Schaeffer P, Schwarz L, et al. Changes in palaeoenvironmental conditions during deposition of Permian Kupferschiefer (Lower Rhine Basin, northwest Germany) inferred from molecular and isotopic compositions of biomarker components [J]. *Organic Geochemistry*, 1997, 26: 677-690.
- [46] Sinnighe D J S, Kock-van D A C, de Leeuw J W. Identification of long-chain isoprenoid alkylbenzenes in sediments and crude oils [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1988, 52: 671-677.
- [47] Simonin P, Jurgens U J, Rohmer M. Bacterial triterpenoids of the hopane series from the prochlorophyte *Prochlorothrix hollandica* and their intracellular localization [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 241: 865-871.
- [48] Brocks J J, Logan G A, Buick R, et al. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes [J]. *Science*, 1999, 285: 1033-1036.
- [49] Finlay B J. Global dispersal of free-living microbial Eukaryote species [J]. *Science*, 2002, 296: 1061-1063.
- [50] Whitman W, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: The unseen majority [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1998, 95(12): 578-583.
- [51] Fenchel T. Microbial behavior in a heterogeneous world [J]. *Science*, 2002, 296: 1068-1071.
- [52] Hilker A W, Douhit C B, Schluter H J, et al. Isotope ratio monitoring gas chromatography/mass spectrometry of D/H by high temperature conversion isotope ratio mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999, 13: 226-230.

EVALUATION OF THE METHODOLOGY IN MOLECULAR GEOMICROBIOLOGY

WANG Hong-mei¹, XIE Shu-cheng², LAI Xu-long²,
HUANG Jun-hua², YANG Jiao-yan³

(1. Biological Science and Technology, School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China; 2. School of Earth Sciences, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China; 3. College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract Microbes are extensively involved in geological processes occurring within a variety of ecosystems such as marine and oceans, lakes, soils, glaciers, caves, etc. Specific summaries of the microbial studies in individual ecosystems have been partly, if not wholly, presented in literatures. However, This paper overviews some advances in the studies of the biochemical components in molecular geomicrobiology including nucleic acids (16S rRNA and DNA) and lipids (PLFA and hopanols). Summary is made on the lipid characteristics of specific geomicrobes. Typically, diplopterol, 2-methylhopanes and aryl isoprenoids (2-alkyl-1,3,4-trimethylbenzene) are respectively reviewed in the exploitation as the biomarkers of methanotrophs, cyanobacteria and green sulfur bacteria through the geological time. It is proposed that new techniques such as the integration of stable with radioactive isotopes of compound-specific will enhance the further development of molecular geomicrobiology in the future.

Key words: Geomicrobe; Biomarker; Molecular fossil.