

研究报告



马里亚纳海沟不同深度水样微生物分离与多样性分析

黄莹 秦纹静 戴红 张汝毅 全哲学*

复旦大学生命科学学院 上海 200438

摘要:【背景】马里亚纳海沟挑战者深渊是地球表面最深点,认识其微生物群落结构和分离培养的微生物对挖掘新的微生物资源具有重要意义。【目的】对马里亚纳海沟不同深度水样进行细菌分离培养,并与这些样品的微生物群落结构进行比较,认识进一步要分离培养的微生物类型。【方法】采用不同培养基对马里亚纳海沟两个站位不同深度水样进行细菌分离培养,并通过 Illumina MiSeq 高通量测序分析各个水样的细菌和古菌的群落结构。【结果】从来自两个站位不同深度的 6 个水样样品中分离获得 783 株细菌,属于 4 个门 6 个纲 28 个属。其中,变形菌门占主导地位,67.8% 的菌株属于 γ -变形菌纲。分离获得的菌株主要属于亚硫杆菌属、假单胞菌属和交替假单胞菌属,它们在这些样品中广泛分布,且在高通量测序结果中也能检测到。高通量测序结果表明除浅层样品优势微生物为蓝细菌外,其他样品以变形菌门占主导;不同深度样品的微生物群落结构存在较大差异。【结论】马里亚纳海沟不同深度水样中不仅分离培养出了相对丰度较高的一些细菌属,也分离得到一些相对丰度较低的微生物类型。从马里亚纳海沟水样中分离培养获得的细菌菌株资源将用于功能微生物和功能酶挖掘等相关研究,这有利于深渊微生物资源挖掘。

关键词: 马里亚纳海沟, 微生物分离, 多样性

Microbial isolation and biodiversity analysis of water samples at different depth in the Mariana Trench

HUANG Ying QIN Wen-Jing DAI Hong ZHANG Ru-Yi QUAN Zhe-Xue*

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

Abstract: [Background] The Challenger Deep in the Mariana Trench is the deepest known site in the earth's ocean. Understanding of its microbial community structure and bacterial isolation are important for mining of deep-sea genetic resources. [Objective] Various types of bacteria were isolated from water samples at different depths in the Mariana Trench, and these microbes were compared with high-throughput sequencing results to know microbes that should be further isolated. [Methods] Different media were used to isolate bacteria from water samples, and Illumina MiSeq high-throughput sequencing system was used for the diversity analysis of bacteria and archaea. [Results] A total of 783 strains were isolated from 6 water samples at different depths and stations. These isolates belonged to 4 phyla, 6 classes and 28 genera. Among them, *Proteobacteria* was dominant and 67.8% of total strains belonged to

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFC0310600)

*Corresponding author: Tel: 86-21-31240665; E-mail: quanxz@fudan.edu.cn

Received: 21-01-2020; Accepted: 17-04-2020; Published online: 09-05-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC0310600)

*通信作者: Tel: 021-31240665; E-mail: quanxz@fudan.edu.cn

收稿日期: 2020-01-21; 接受日期: 2020-04-17; 网络首发日期: 2020-05-09

Gammaproteobacteria. The microbes were mainly belonged to *Sulfitobacter*, *Pseudomonas* and *Pseudoalteromonas*. These types of microbes were widely distributed in all samples and detected by high-throughput sequencing. High-throughput sequencing results showed that *Cyanobacteria* was the major bacteria in samples at shallow depth and *Proteobacteria* were dominated in other samples. The microbial community structures of samples at different depths were quite different. **[Conclusion]** Not only bacteria with relatively high abundance in Mariana Trench water were isolated, but also some bacteria with relatively low abundance. The isolated microbes in the Mariana Trench water samples will be helpful for the mining of functional microbes and enzymes.

Keywords: Mariana Trench, Microbial isolation, Diversity

海洋占地球总表面积的 71%和生物圈总体积的 90%,且地球上 90%的水资源和 80%的生物资源均来源于海洋^[1]。微生物是海洋碳循环的关键参与者,在生物地球化学循环中扮演着重要的角色,也是海洋生态系统的重要组成部分^[1-2]。很多海洋微生物具有特殊的遗传结构和代谢途径,并可能产生新型代谢物和功能酶等生物活性物质,在新型药物开发、环境修复和治理、疾病防治等方面具有较大的开发和应用潜能^[3]。

海洋大部分是 2 000 m 以上深度的深海,但因技术的限制人们对深海的认知相对缺乏,对深度达 6 000–11 000 m 深渊生态环境的物质循环及参与此过程的微生物的认知十分有限。近几十年,虽然深海探测技术的进步和深潜器的使用加快了海底勘探和调查的步伐^[4-6],深渊海沟的温度、盐度、溶解氧等其他物理和化学条件也与一般深海环境相似,但深渊海沟具有较高的静水压力和相对隔离的水文地质^[4,7-8]。作为地球表面最深的位置,深渊海沟的特殊地形可能导致该区域形成独特的生态环境和微生物群落结构^[9-10],成为挖掘有用微生物和基因资源的新的宝库。

虽然已有对波多黎各海沟、日本海沟和克马代克海沟等^[11-13]深渊环境相关微生物生态学的研究,但作为目前地球表面已知的最深点,对马里亚纳海沟(Mariana Trench)南端的挑战者深渊的微生物生态分布特点的研究和微生物资源的挖掘具有更重要的意义。目前对马里亚纳海沟挑战者深渊的地质、水化学和底栖生物群落等已有一定研究^[7-8,14-18],并发现了一些新的微生物种^[11,15-16],但急需进一步挖

掘这个地球特殊环境中微生物的生态特点和微生物资源。本研究对马里亚纳海沟挑战者深渊两个站位的不同深度水样进行细菌的分离培养,获得了大量的细菌菌种资源,通过 16S rRNA 基因高通量测序认识深渊不同深度微生物分布特点,以期了解所分离细菌的菌种资源对生态环境中主要微生物的覆盖程度,以及需要进一步分离培养的主要微生物资源种类。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

2018 年于马里亚纳海沟挑战者深渊附近的海沟(全水深 11 000 m)和海盆(全水深 5 900 m)站位采集不同深度的水样,一部分水样在 4 °C 保存,用于微生物分离培养;一部分水样用 0.22 μm 滤膜过滤,过滤后的滤膜在 -80 °C 下保存,用于微生物群落结构分析。样品的基本信息见表 1。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

Marine 2216E 培养基、胰酪大豆胨培养基,海博生物技术有限公司; 2×Taq PCR Master Mix, 天根生化科技(北京)有限公司; Premix ExTaq, 宝日医生物技术(北京)有限公司; PowerSoil DNA 提取试剂盒,凯杰企业管理(上海)有限公司; AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒,爱思进生物技术(杭州)有限公司。

凝胶成像仪,上海复日科技有限公司; 高速离心机,赛默飞世而科技(中国)有限公司; 电泳仪,北京百晶生物技术有限公司; 电子分析天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司; EDC-810 PCR 仪,东胜国际贸易有限公司。

表 1 样品采集信息

Table 1 Information of collected samples in this study

样品名称 Samples name	站位 Site	经纬度 Longitude and latitude	采样水深 Depth for collection (m)
MTD50	Deepest site in the trench	142.2°E, 11.3°N	50
MTD1000	Deepest site in the trench	142.2°E, 11.3°N	1 000
MTD3000	Deepest site in the trench	142.2°E, 11.3°N	3 000
MTD4200	Deepest site in the trench	142.2°E, 11.3°N	4 200
MTD7000	Deepest site in the trench	142.2°E, 11.3°N	7 000
MTD11000	Deepest site in the trench	142.2°E, 11.3°N	11 000
B50	Sea basin	130.1°E, 22.2°N	50
B1100	Sea basin	130.1°E, 22.2°N	1 100
B3300	Sea basin	130.1°E, 22.2°N	3 300
B5900	Sea basin	130.1°E, 22.2°N	5 900

1.3 微生物的分离与鉴定

微生物的分离采用营养物质浓度稀释至 10% 的 Marine 2216E 海洋培养基^[19]和胰酪大豆胨培养基^[20]。通过稀释涂布法和漂浮滤膜法^[21]对 6 个来自不同站位及深度的水样(MTD3000/4200/7000/11000 和 B3300/5900)在 4 °C 避光条件下进行为期 2 周的微生物培养。根据菌落的形态学特征,挑取不同的单菌落进一步进行分离纯化与鉴定。采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1512R (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 扩 增 细 菌 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(25 μ L): 27F 和 1512R 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, ddH₂O 10.5 μ L, 用无菌牙签挑取的单菌落作为模板。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验合格后送至上海美吉生物股份有限公司进行纯化和测序。获得的序列通过 EzBioCloud Database (<https://www.ezbiocloud.net>)与模式菌株的 16S rRNA 基因序列进行相似性比较。

1.4 水体样品 DNA 提取及其 16S rRNA 基因扩增

采用 PowerSoil DNA 提取试剂盒对滤膜样品

(MTD50/1000/4200/11000 和 B50/1100/3300)进行 DNA 提取。采用细菌和古菌的 16S rRNA 基因通用引物 Pro341F (5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3')和 Pro806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') 进行扩增。PCR 反应体系(25 μ L): Pro341F 和 Pro806R 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, Premix ExTaq 12.5 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 牛血清蛋白(BSA, 20 mg/mL) 1 μ L, ddH₂O 7.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增后的 PCR 产物送至金唯智生物科技有限公司建库并利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术进行测序。

1.5 16S rRNA 基因高通量测序结果分析

高通量测序所得结果运用 QIIME 1.8.0 (<http://www.qiime.org/>)对原始数据进行质控、拼接、分库并去除嵌合体后,基于有效数据将相似性达 97% 的序列进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)聚类。得到的 OTU 代表序列于 Silva 数据库(<https://www.arb-silva.de/>)进行比对,并在各分类水平统计每个样品的微生物群落组成。根据 OTU 列表中的各样品物种丰度情况,计算 α 多样性指数(Chao1 指数和 Shannon 指数),并基于分类信息对各样本的物种组成进行深入分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与鉴定

马利亚纳海沟水样样品中分离获得的细菌种属类型、菌株数等情况详见表 2。采用 EzBioCloud 在线比对分离菌株与模式菌株间的 16S rRNA 基因序列相似性, 结果显示菌株的 16S rRNA 基因序列与模式菌株相似性均达 97%以上。分离获得的细菌隶

属于 4 个门 6 个纲 28 个属: 变形菌门(*Proteobacteria*)主要为 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)的 12 个属共 531 株(占总分离菌株数的 67.8%), α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)的 4 个属共 233 株, β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)的 1 个属 1 个菌株;放线菌门(*Actinobacteria*)主要为放线菌纲(*Actinobacteria*)的 7 个属共 14 个菌株;厚壁菌门(*Firmicutes*)主要为芽

表 2 马利亚纳海沟 6 个水样中分离得到的细菌分类信息表
Table 2 Taxonomy of isolated bacteria from 6 Mariana Trench water samples

纲	属	种/菌株数量	百分比	样品数
Class	Genus	Species/Number of strain	Proportion (%)	Sample number
<i>Actinobacteria</i>	<i>Agrococcus</i>	2/3	0.4	2
	<i>Kocuria</i>	2/2	0.3	1
	<i>Rhodococcus</i>	3/3	0.4	1
	<i>Curtobacterium</i>	1/1	0.1	1
	<i>Dietzia</i>	1/2	0.3	1
	<i>Micrococcus</i>	1/1	0.1	1
	<i>Microbacterium</i>	1/2	0.3	2
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonas</i>	4/23	2.9	2
	<i>Marinobacter</i>	2/28	3.6	3
	<i>Psychrobacter</i>	4/84	10.7	4
	<i>Pseudomonas</i>	8/173	22.1	6
	<i>Pseudoalteromonas</i>	9/139	17.8	3
	<i>Cobetia</i>	1/18	2.3	1
	<i>Halomonas</i>	1/3	0.4	2
	<i>Neptunomonas</i>	1/2	0.3	1
	<i>Pantoea</i>	1/1	0.1	1
	<i>Paraglaciecola</i>	1/3	0.4	1
	<i>Stenotrophomonas</i>	1/1	0.1	1
	<i>Vibrio</i>	1/56	7.2	1
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sulfitobacter</i>	1/227	29	5
	<i>Brevundimonas</i>	1/2	0.3	1
	<i>Erythrobacter</i>	1/3	0.4	1
	<i>Pseudohoeftia</i>	1/1	0.1	1
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Variovorax</i>	1/1	0.1	1
<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	1/1	0.1	1
	<i>Planococcus</i>	1/1	0.1	1
	<i>Staphylococcus</i>	1/1	0.1	1
<i>Deinococci</i>	<i>Deinococcus</i>	1/1	0.1	1

孢杆菌纲(*Bacilli*)的 3 个属 3 个菌株; 以及异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)的 1 个菌株。在属水平上, 亚硫酸杆菌属(*Sulfitobacter*)菌株数量最多, 共有 227 株, 占总分离菌株数的 29.0%, 且分布较广, 除 MTD7000 样品外的其余 5 个样品中均分离到这类菌株; 其次是假单胞菌属(*Pseudomonas*), 共有 173 株, 分属于 8 个种, 占细菌总数的 22.1%, 其分布也比较广, 6 个样品中均分离到该属菌株; 交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)和嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)出现的频率及多样性也比较高, 分别为 9 个种 139 株和 4 个种 84 株; 此外, 鞘氨醇单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和微球菌属(*Micrococcus*)等仅分离获得 1 株菌。

各样品分离获得的细菌在属水平上的组成情况见图 1 (取各样品比例大于 1% 的微生物)。各样品分离获得的菌株大多数属于变形菌门, 特别是 γ -变

形菌纲, 其次是 α -变形菌纲。MTD3000 样品包括 2 个纲 5 个属, 优势属为嗜冷杆菌属和亚硫酸杆菌属, 分别占此样品总分离菌株的 47.7% 和 43.2%。MTD4200 样品包括 3 个纲 10 个属, 除 α -和 γ -变形菌纲外还有放线菌纲。该样品主要微生物为假单胞菌属, 占总分离菌株的 48.6%, 其次是亚硫酸杆菌属 (23.2%)。放线菌纲中只分离到微杆菌属(*Microbacterium*)中的一种微生物且数量较少, 只占总分离菌株的 0.7%。MTD7000 样品分离获得的菌株分布较广, 包括 3 个纲 6 个属, 大部分菌株属于假单胞菌属, 少数菌株属于盐单胞菌属(*Halomonas*)和考克氏菌属(*Kocuria*), 分别占总分离菌株的 68.2%、9.1% 和 9.1%。值得注意的是, MTD7000 样品中还分离到一株异常球菌属(*Deinococcus*)微生物, 该菌株常见于较强辐射的环境中, 海洋当中较少分离。MTD11000 样品分离的微生物类型较多, 包括 5 个纲 14 个属, 主要微生物为亚硫酸

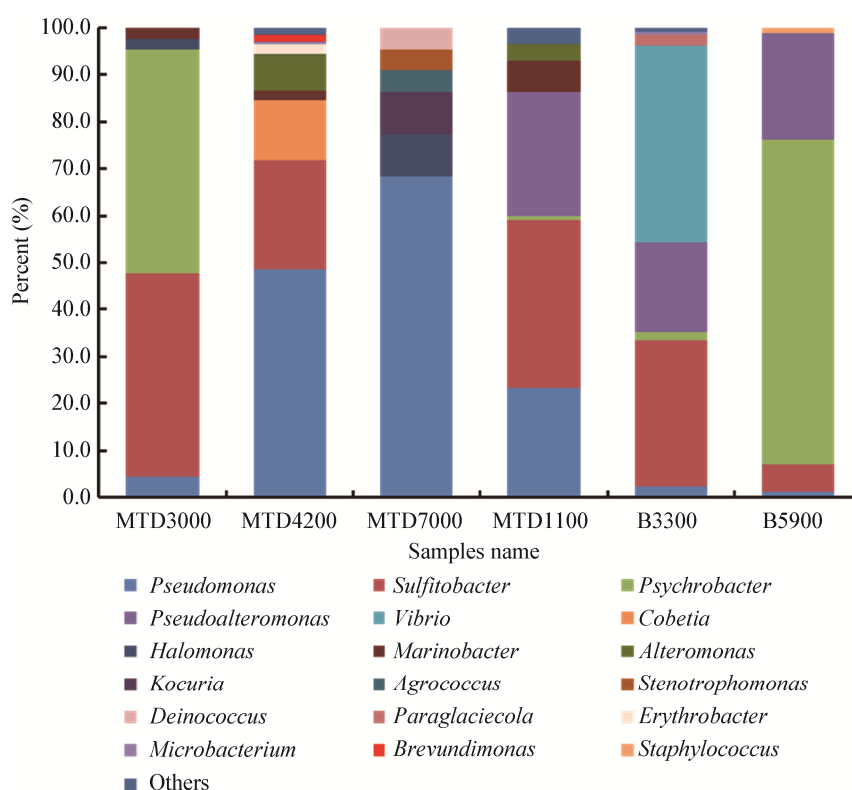


图 1 马里亚纳海沟水样中分离微生物在属水平上的分布

Figure 1 Distribution of cultivated microbes of Mariana Trench water at genus level

杆菌属, 占总分离菌株数的 35.9%, 其次是交替假单胞菌属和假单胞菌属, 分别占分离菌株总数的 26.3%和 23.2%。B3300 样品包括 3 个纲 8 个属, 弧菌属(*Vibrio*)为主要微生物, 其次是亚硫酸杆菌属和交替假单胞菌属, 分别占总分离菌株数的 41.8%、31.3%和 19.4%。B5900 中分离的菌株包括 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲和芽孢杆菌纲的 3 个纲 5 个属, 主要微生物为嗜冷杆菌属和交替假单胞菌属, 分别占总分离菌株数的 69.0%和 22.6%。不同微生物属在样品中的分离情况存在明显差异: 假单胞菌属在海沟站位中分离较多, 尤其是在 4 200 m 和 7 000 m; 交替假单胞菌属主要从海盆站位中分离到, 海沟站位只有 11 000 m 分离到相关微生物; 嗜冷杆菌属在 MTD3000 和 B5900 样品中分离较多。海沟站位和海盆站位样品优势微生物也存在较大差异, 海沟站位以亚硫酸杆菌属和假单胞菌属为优势微生物, 海盆站位则以交替假单胞菌属和嗜冷杆菌属为优势微生物。

2.2 滤膜样品的微生物多样性及群落结构

采用 Illumina MiSeq 测序平台对 7 个滤膜样品进行 16S rRNA 基因高通量测序, 对序列进行质控和过滤后共获得 131 716 条有效序列, 按照 97%的相似度对序列进行 OTU 聚类, 并基于 OTU 聚类分析结果计算各样品的 α 多样性指数(根据样品中最少有效序列数标准化后计算), 结果见表 3。由结果

可以看出, 马里亚纳海沟和海盆站位水样的微生物多样性在不同深度的差异很大, 并且随深度的变化规律不一致。

在门水平上对不同样品的微生物组成进行分析(图 2)。从图 2 中可以看出, 在所有样品中, 细菌的相对丰度明显高于古菌。浅水层样品 MTD50 和 B50 的微生物组成较为相似, 其优势微生物为蓝细菌(*Cyanobacteria*), 且相对丰度分别为 41.1%和 38.8%; 其次是变形菌门、广古菌门(*Euryarchaeota*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)。其他深度样品的主要微生物均属于变形菌门, 特别是 γ -变形菌纲和 α -变形菌纲。MTD1000 样品和 B3300 样品中变形菌门的相对丰度分别为 46.8%和 33.3%, 其次是广古菌门和绿弯菌门(*Chloroflexi*)。MTD4200、MTD11000 和 B1100 样品中的变形菌门微生物的相对丰度明显高于其他样品, 依次为 82.5%、70.5%和 91.6%。其他门在样品中所占比例较低, 如放线菌门、奇古菌门(*Thaumarchaeota*)及硝基孢菌门(*Nitrospinae*)等。

为了进一步明确微生物群落的物种组成, 从科水平上对各样品的微生物组成进行分析, 结果见图 3(取各样品相对丰度大于 1%的微生物类型作图)。由图 3 可知, 浅水层样品 MTD50 和 B50 的主要微生物为蓝细菌, 优势属为原绿球藻属(*Prochlorococcus*)。MTD1000 和 B3300 样品的优势

表 3 马里亚纳海沟各样品的微生物多样性指数
Table 3 Microbial diversity indices in each sample from Mariana Trench

样品名称	序列数	操作分类单元数	Chao1 指数	香农指数
Samples name	Reads number	OTUs	Chao1 index	Shannon index
MTD50	28 336	414	528	5.28
MTD1000	18 333	1 126	1 544	7.8
MTD4200	17 699	653	1 020	3.91
MTD11000	8 837	811	1 196	5.33
B50	21 727	486	645	5.57
B1100	12 025	459	873	4.06
B3300	24 759	1 041	1 531	7.96

注: 多样性指数根据样品所含最少有效序列数(8 837 条)标准化后计算所得。
Note: The calculation of microbial diversity indices was based on the number of least valid sequences (8 837) contained in samples.

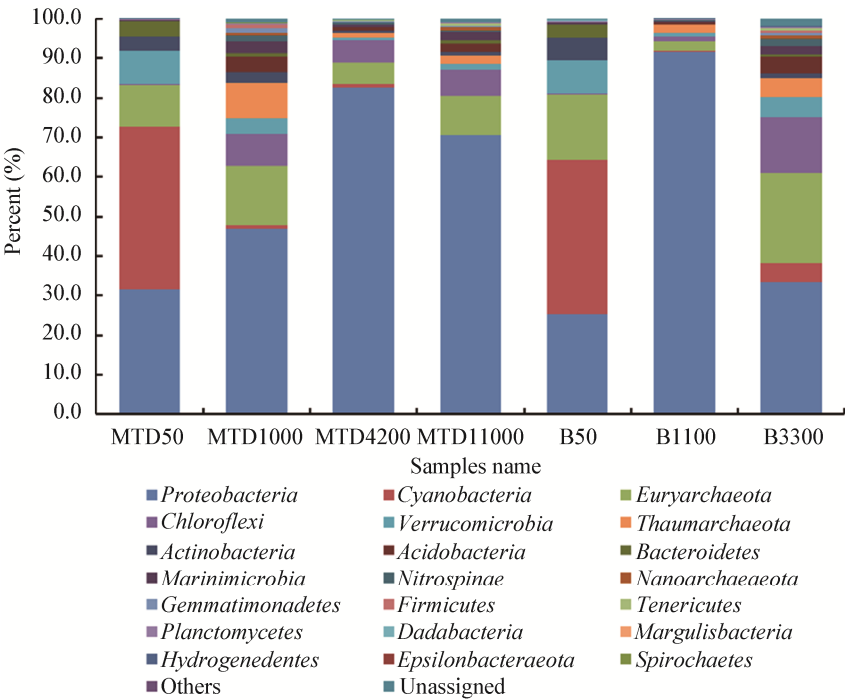


图 2 马里亚纳海沟水样在门水平上的微生物组成
Figure 2 Phylum level microbial composition of water samples in the Mariana Trench

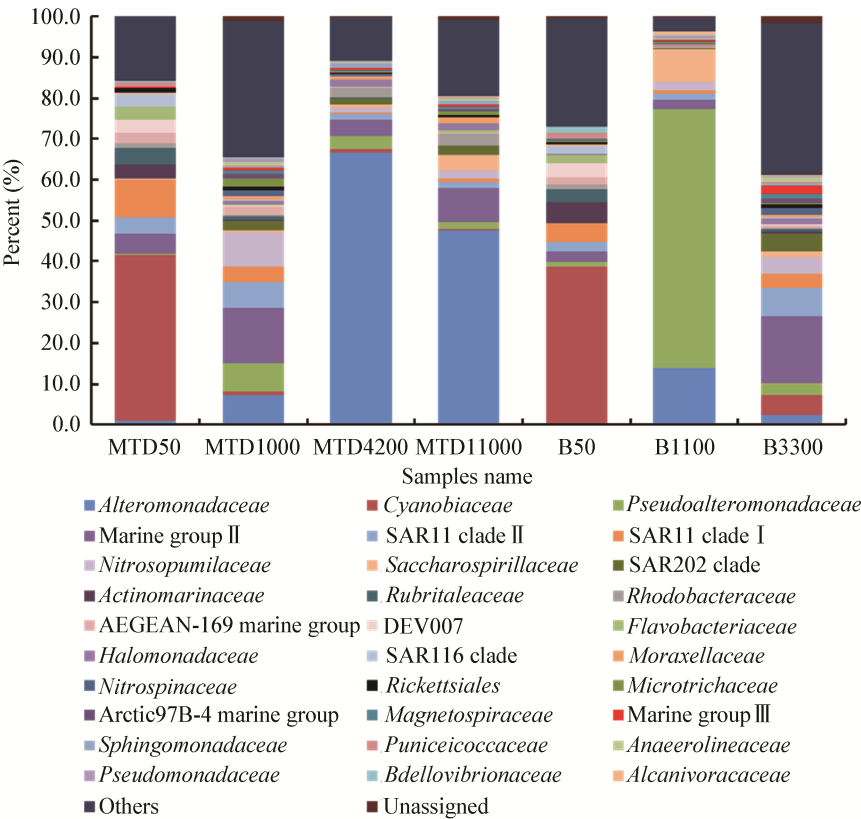


图 3 马里亚纳海沟水样在科水平上的微生物组成
Figure 3 Family level microbial composition of water samples in the Mariana Trench

微生物均为古菌 Marine group II。交替单胞菌科 (*Alteromonadaceae*) 和 交 替 假 单 胞 菌 科 (*Pseudoalteromonadaceae*)在 MTD1000 样品中也分布较多, B3300 样品中 SAR11 clade II 的相对丰度仅次于 Marine group II。MTD4200 样品的主要微生物为交替单胞菌科, 优势属为交替单胞菌属, 其次是 Marine group II 和交替假单胞菌科。MTD11000 样品中的主要微生物为交替单胞菌科, 优势属为交替单胞菌属, 其次是 Marine group II。B1100 样品的主要微生物为交替假单胞菌科, 优势属为交替假单胞菌属; 其次是交替单胞菌科, 优势属为交替单胞菌属。

2.3 深海样品可培养细菌与高通量测序结果比较

进一步对深海样品 MTD4200、MTD11000 及 B3300 的已分离细菌与高通量测序结果中的细菌种类进行比较分析。无论是分离培养结果还是高通量测序结果, 3 个深海样品的优势微生物都属于 γ -变形

菌纲和 α -变形菌纲。分离培养成功获得了高通量样品中主要的微生物属以及一些高通量样品中相对丰度较低的微生物(表 4)。从表 4 可以看出, MTD4200 和 MTD11000 样品中分离获得了高通量样品中相对丰度分别达 66.5%和 47.6%的交替单胞菌属。另外, 以上两个样品中还分离到亚硫酸杆菌属。虽然 MTD4200 样品中的海杆菌属以及 B3300 样品中的假单胞菌属和嗜冷杆菌属等只分离到 1-3 个菌株, 但从高通量测序结果中都检测到这些微生物类型, 说明这些微生物确实来自于马里亚纳海沟样品而不是污染。

由于 B3300 样品的高通量结果中有较多微生物类型无法进一步分类到属, 因此表 4 中只显示了前 6 类已分类到属的微生物分离情况。弧菌属和交替假单胞菌属在 B3300 高通量样品中的相对丰度极低, 但成功通过分离培养获得。交替单胞菌属虽然在 B3300 样品的高通量测序结果中检测到, 但并未

表 4 马里亚纳海沟微生物群落组成中主要微生物的分离情况
Table 4 Isolation of major microbes in microbial community in Mariana Trench samples

样品名称	主要属	高通量测序百分比	是否分离得到
Samples name	Major genera	Proportion in high-throughput sequencing (%)	Whether to be isolated
MTD4200	<i>Alteromonas</i>	66.5	Yes
	<i>Pseudoalteromonas</i>	3.1	No
	<i>Sulfitobacter</i>	1.6	Yes
	<i>Halomonas</i>	1.6	No
	<i>Prochlorococcus</i>	0.8	No
	<i>Oleibacter</i>	0.7	No
MTD11000	<i>Alteromonas</i>	47.6	Yes
	<i>Oleibacter</i>	3.8	No
	<i>Sulfitobacter</i>	1.8	Yes
	<i>Pseudoalteromonas</i>	1.7	Yes
	<i>Acinetobacter</i>	1.3	No
	<i>Halomonas</i>	1.0	No
B3300	<i>Prochlorococcus</i>	4.4	No
	<i>Pseudoalteromonas</i>	2.9	Yes
	<i>Alteromonas</i>	2.4	No
	SAR11 clade Ia	1.5	No
	<i>Vibrio</i>	0.7	Yes
	<i>Oleibacter</i>	0.7	No

注: 表中显示的是样品高通量结果中相对丰度前六的细菌属, B3300 样品显示的是前 6 类分类到属的微生物。
Note: The table shows the top six bacterial genera in the high-throughput sequencing results of the sample. The table only shows the top six microbes that can be classified into genus in B3300.

被成功分离。B3300 样品的高通量测序结果表明古菌 Marine group II 为优势微生物,但本次分离培养的对象为细菌,未分离出古菌。B3300 样品中变形菌门虽然占主导地位,但其在属水平上的分布较为分散,且无相对丰度较高的微生物。此外,*Oleibacter*、原绿球藻属(*Prochlorococcus*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)等微生物在部分高通量样品中也被检测到,但并未被成功分离。

3 讨论与结论

通过对来自马里亚纳海沟挑战者深渊两个站位不同深度水样的细菌分离培养,获得了丰富的深海微生物菌种资源。在分离获得的 783 株细菌中,主要为变形菌门,其中 γ -变形菌纲的细菌数量最多,占总分离菌株的 67.8%,这与早前国内外深海微生物相关的研究结果^[22-24]较为一致。分离菌株中优势微生物主要是假单胞菌属、交替假单胞菌属、亚硫酸杆菌属或嗜冷杆菌属,这些微生物在海洋环境中广泛存在^[13]。不同深度样品中分离出来的同属或同种的大量微生物菌株(如亚硫酸杆菌),可用于从生理生化和基因组水平上研究适应于不同深度高压环境的微生物的特点。

本次分离获得的交替假单胞菌属占总分离菌株的 17.8%。研究表明,该属微生物菌株能够分泌胞外多糖物质和适冷蛋白酶,可应用于食品、医药、化工和能源等方面^[25]。放线菌被广泛应用于抗生素和生物活性物质的生产,生活在极端海洋环境中的放线菌由于独特的代谢途径及产天然抗生素的能力,成为次生代谢物的重要来源。如 Abdel-Mageed 等从马里亚纳海沟 11 000 m 沉积物中分离出两株产生 7 种新型化合物的放线菌^[26]。虽然本次分离培养只获得了 14 株放线菌,但分别属于土壤球菌属(*Agrococcus*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、微球菌属等 7 个属,这些多种类型的放线菌将进一步用于抗生素等次生代谢产物生产潜力的研究。

对水体的 16S rRNA 基因高通量测序结果表

明,两个站位浅层水样的微生物组成类似,其优势微生物都是蓝细菌,属于原绿球藻属,相对丰度为 35%–40%。这可能是因为浅水层样品处于光合作用带(0–200 m)^[27],蓝细菌可进行光合作用。另外,有研究表明温度是影响海洋原绿球藻属生长的重要因素^[28],浅水层的温度较深层高,因此更有利于原绿球藻属的生长。原绿球藻属广泛分布于海洋当中,其显著特点是极小的体积、独特的色素沉着及能在寡营养环境中繁殖和定居^[29],可能是马里亚纳海沟表层的主要碳输入来源。与早期研究一致,除浅层样品外,其他深海样品中的优势微生物主要是 γ -变形菌纲,且相对丰度明显高于浅层样品。马里亚纳海沟挑战者深渊深层样品中 γ -变形菌纲的交替单胞菌属占主导。海沟的漏斗形地形使得深渊主要碳源来自于沉降的颗粒有机物,而深海分离菌株的基因组分析结果表明交替单胞菌适合于微好氧和降解难利用有机物,这个特点使得交替单胞菌适于附着在快速沉降的大颗粒上生长^[30-31]。此外,静水压力可能通过影响微生物对有机物的降解速率而对微生物分布产生影响:表层微生物对有机碳的降解速率随着压力的增加而降低,相对丰度降低;深层微生物由于适应高压环境,成为优势微生物,相对丰度增加^[32]。Marietou 等的研究发现 α -变形杆菌纲、 γ -变形杆菌纲、放线菌纲等在压力增加时相对丰度增加^[33]。本研究中深层样品 γ -变形菌纲的相对丰度明显高于浅层样品,这与 Marietou 等的研究结果相符。先前报道中指出马里亚纳海沟 11 000 m 相对丰度最高的是海洋螺菌目(*Oceanospirillales*)^[34],但我们检测到的主要是交替单胞菌目(*Alteromonadales*),海洋螺菌目只占 5.7%。虽然这两个采样点都是马里亚纳海沟 11 000 m 深处,但从地理位置上看距离 10 km 左右,说明海沟深处也不是均一的环境,其小生境可能存在很大差异,这些差异将为挖掘更多新的微生物和基因资源提供参考。

一些在海洋碳循环中扮演重要角色的微生物在 16S rRNA 基因的高通量测序中被检测到, 但并未被成功分离。可能主要存在以下几种情况: (1) 奇古菌门(*Thaumarchaeota*)和硝基孢菌门在除了浅表层(50 m)外的其他深度样品的高通量测序结果中都被检测到, 这些微生物在海洋氨氧化和硝酸化过程中可能起关键作用^[35-37]。然而, 本研究中微生物的分离是在 4 °C 培养 2 周条件下进行的, 这么短时间的培养不适合分离生长缓慢的微生物。另外, 这些自养微生物不适合于有机物含量丰富的培养基, 因此未能成功分离。为了获得这些自养微生物资源, 首先要根据其生理特点, 通过长时间的液体传代培养进行富集, 并探索分离这些自养微生物的方法。(2) *Oleibacter* 在 MTD11000 样品中的相对丰度达到 3.8%, 但未能培养得到。该属中唯一被成功分离的菌株 *Oleibacter marinus* DSM 24913 是从印度尼西亚海水的原油富集物中获得的, 且能够降解石油脂族烃^[38]。为了分离培养这些具有特殊营养需求的微生物, 应该根据其特点设计培养基, 添加这些微生物所需的特定底物。(3) SAR11 (clade I 和 II) 在所有样品的高通量测序结果中都被检测到, 其在海洋中广泛分布, 是海洋中最丰富的异养海洋细菌种类^[39]。尽管其数量丰富且分布广泛, 但目前已分离获得的菌株数量十分有限, 这可能是因为它们生长缓慢, 并适应于寡营养环境^[40]。已有研究通过使用高通量培养(high-throughput culturing, HTC)方法, 原始海水作为培养介质, 成功分离了 SAR11 进化支相关的微生物^[41]。虽然本研究中培养基的营养物质浓度已降低至常规培养基的 10%, 但对于一些寡营养生长的微生物而言, 其营养物质浓度还是太高, 因此在以后的分离培养中应将营养物质稀释至更低的浓度, 并结合原位培养。(4) 广古菌门的 Marine group II 在海洋环境中广泛分布, 本研究中所有样品的高通量测序结果中都检测到此微生物, 且相对丰度不低。虽然宏基因组分析发现其在有机物的降解过程中具有重要作用^[42-43], 但目前尚未从海洋环境中成

功富集或分离到相关微生物。因此, 这些微生物的富集和培养需要确立专门的研究方向, 摸索这类微生物的生理生化特点, 探索各种富集培养方案。

海洋微生物为适应深海环境不断进化, 从而产生不同于陆生微生物的酶系统和新型代谢产物, 因此海洋具有丰富的酶基因资源, 对海洋微生物特定功能酶的挖掘是提高海洋资源利用率的关键。这些海洋微生物及其酶资源可应用于工业生产、医药行业及环境修复和治理等^[44-45]。本文通过分离纯化获得了丰富的细菌菌种资源, 并通过 16S rRNA 基因的高通量测序认识了我们分离的细菌资源在各个深度生态系统中的分布以及未分离出的主要微生物类型, 这些结果将有利于加深对马里亚纳海沟微生物的认识及对深海微生物基因资源的进一步挖掘。

REFERENCES

- [1] Lauro FM, McDougald D, Thomas T, et al. The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(37): 15527-15533
- [2] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(12): 6578-6583
- [3] Li YZ, Chen Q. Diversity of marine microorganisms[J]. Progress in Biotechnology, 1998, 18(4): 34-40,33 (in Chinese)
李越中, 陈琦. 海洋微生物资源多样性[J]. 生物工程进展, 1998, 18(4): 34-40,33
- [4] Jamieson AJ, Fujii T, Mayor DJ, et al. Hadal trenches: The ecology of the deepest places on earth[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2010, 25(3): 190-197
- [5] Danovaro R, Della Croce N, Dell'Anno A, et al. A depocenter of organic matter at 7800 m depth in the SE Pacific Ocean[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2003, 50(12): 1411-1420
- [6] Gallo ND, Cameron J, Hardy K, et al. Submersible- and lander-observed community patterns in the Mariana and New Britain trenches: influence of productivity and depth on epibenthic and scavenging communities[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2015, 99: 119-133
- [7] Taira K, Kitagawa S, Yamashiro T, et al. Deep and bottom currents in the Challenger Deep, Mariana Trench, measured with super-deep current meters[J]. Journal of Oceanography, 2004, 60(6): 919-926

- [8] Taira K, Yanagimoto D, Kitagawa S. Deep CTD casts in the challenger deep, Mariana trench[J]. *Journal of Oceanography*, 2005, 61(3): 447-454
- [9] Simonato F, Campanaro S, Lauro FM, et al. Piezophilic adaptation: a genomic point of view[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126(1): 11-25
- [10] Lauro FM, Bartlett DH. Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats[J]. *Extremophiles*, 2008, 12(1): 15-25
- [11] Eloë EA, Shulse CN, Fadrosch DW, et al. Compositional differences in particle-associated and free-living microbial assemblages from an extreme deep-ocean environment[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(4): 449-458
- [12] Nunoura T, Hirai M, Yoshida-Takashima Y, et al. Distribution and niche separation of planktonic microbial communities in the water columns from the surface to the hadal waters of the Japan Trench under the Eutrophic Ocean[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1261
- [13] Peoples LM, Donaldson S, Osuntokun O, et al. Vertically distinct microbial communities in the Mariana and Kermadec trenches[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195102
- [14] Glud RN, Wenzhöfer F, Middelboe M, et al. High rates of microbial carbon turnover in sediments in the deepest oceanic trench on earth[J]. *Nature Geoscience*, 2013, 6(4): 284-288
- [15] Takami H, Inoue A, Fuji F, et al. Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 152(2): 279-285
- [16] Kato C, Li LN, Nogi Y, et al. Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(4): 1510-1513
- [17] Fujioka K, Okino K, Kanamatsu T, et al. Morphology and origin of the Challenger Deep in the southern Mariana Trench[J]. *Geophysical Research Letters*, 2002, 29(10): 10-1-10-4
- [18] Yoshida M, Takaki Y, Eitoku M, et al. Metagenomic analysis of viral communities in (Hado)pelagic sediments[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57271
- [19] ZoBell CE. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes[J]. *Journal of Marine Research*, 1941, 4: 42-75
- [20] Mac Faddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol 1[M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1985
- [21] de Bruyn JC, Boogerd FC, Bos P, et al. Floating filters, a novel technique for isolation and enumeration of fastidious, acidophilic, iron-oxidizing, autotrophic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(9): 2891-2894
- [22] Nunoura T, Takaki Y, Hirai M, et al. Hadal biosphere: insight into the microbial ecosystem in the deepest ocean on earth[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(11): E1230-E1236
- [23] Tarn J, Peoples LM, Hardy K, et al. Identification of free-living and particle-associated microbial communities present in hadal regions of the Mariana Trench[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 665
- [24] Tian JW, Fan L, Liu HD, et al. A nearly uniform distributional pattern of heterotrophic bacteria in the Mariana Trench interior[J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2018, 142: 116-126
- [25] Nichols CAM, Garon S, Bowman JP, et al. Production of exopolysaccharides by antarctic marine bacterial isolates[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(5): 1057-1066
- [26] Abdel-Mageed WM, Milne BF, Wagner M, et al. Dermacozines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2010, 8(10): 2352-2362
- [27] Yu T. Cultivation of deep-sea microorganisms from the South China Sea and taxonomic analysis of four novel bacteria[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 (in Chinese)
于童. 南海深海微生物的分离培养及 4 株海洋新菌的分类鉴定[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2013
- [28] Flombaum P, Gallegos JL, Gordillo RA, et al. Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(24): 9824-9829
- [29] Partensky F, Hess WR, Vaulot D. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(1): 106-127
- [30] Ivars-Martínez E, Martín-Cuadrado AB, D'Auria G, et al. Comparative genomics of two ecotypes of the marine planktonic copiotroph *Alteromonas macleodii* suggests alternative lifestyles associated with different kinds of particulate organic matter[J]. *The ISME Journal*, 2008, 2(12): 1194-1212
- [31] Koch H, Dürwald A, Schweder T, et al. Biphasic cellular adaptations and ecological implications of *Alteromonas macleodii* degrading a mixture of algal polysaccharides[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(1): 92-103
- [32] Tamburini C, Boutrif M, Garel M, et al. Prokaryotic responses to hydrostatic pressure in the ocean—a review[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(5): 1262-1274
- [33] Marietou A, Bartlett DH. Effects of high hydrostatic pressure on coastal bacterial community abundance and diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(19): 5992-6003
- [34] Liu JW, Zheng YF, Lin HY, et al. Proliferation of hydrocarbon-degrading microbes at the bottom of the Mariana Trench[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 47

- [35] Sun X, Kop LFM, Lau MCY, et al. Uncultured *Nitrospina*-like species are major nitrite oxidizing bacteria in oxygen minimum zones[J]. The ISME Journal, 2019, 13(10): 2391-2402
- [36] Spieck E, Keuter S, Wenzel T, et al. Characterization of a new marine nitrite oxidizing bacterium, *Nitrospina watsonii* sp. nov., a member of the newly proposed phylum “*Nitrospinae*”[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2014, 37(3): 170-176
- [37] Beman JM, Popp BN, Francis CA. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine *Crenarchaeota* in the Gulf of California[J]. The ISME Journal, 2008, 2(4): 429-441
- [38] Teramoto M, Ohuchi M, Hatmanti A, et al. *Oleibacter marinus* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades petroleum aliphatic hydrocarbons in a tropical marine environment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(2): 375-380
- [39] Morris RM, Rappé MS, Connon SA, et al. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities[J]. Nature, 2002, 420(6917): 806-810
- [40] Song J, Oh HM, Cho JC. Improved culturability of SAR11 strains in dilution-to-extinction culturing from the East Sea, West Pacific Ocean[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 295(2): 141-147
- [41] Connon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates[J]. Applied Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3878-3885
- [42] Tully BJ. Metabolic diversity within the globally abundant Marine Group II *Euryarchaea* offers insight into ecological patterns[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 271
- [43] Xie W, Luo HW, Murugapiran SK, et al. Localized high abundance of Marine Group II archaea in the subtropical Pearl River Estuary: implications for their niche adaptation[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(2): 734-754
- [44] Lin BX, Huang ZQ, Xie LH. Advance in researches of drugs derived from marine bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(4): 657-660 (in Chinese)
林白雪, 黄志强, 谢联辉. 海洋细菌活性物质的研究进展[J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 657-660
- [45] Ma R. Isolation and diversity analysis of deep-sea bacteria in South Atlantic[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2013 (in Chinese)
马瑞. 南大西洋深海细菌的分离及多样性分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2013