

深海微生物的研究进展*

赵昌会^{1,2} 叶德赞^{2**} 魏文铃¹

(厦门大学生命科学学院 厦门 361005)¹

(国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室、国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)²

摘要: 从生态学的角度介绍了深海微生物的营养来源、生物多样性及相关研究方法并展望深海微生物资源的开发前景。

关键词: 深海, 微生物, 营养来源, 生物多样性, 研究方法

中图分类号: Q178.533 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0142-05

Research on Deep-sea Microbiology*

ZHAO Chang-Hui^{1,2} YE De-Zan^{2**} WEI Wen-Ling¹

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)¹

(Key Laboratory of State Oceanic Administration (SOA) for Marine Biogenetic Resources

Third Institute of Oceanography, Xiamen 361005)²

Abstract: Nutritional supplies & biodiversities of deep-sea microorganisms and correlative methodologies were introduced here in an ecological point of view, and development of their natural products was prospective in an applied point of view.

Key words: Deep-sea, Microorganisms, Nutritional supplies, Biodiversities, Methodologies

深海一般指的是位于海洋 1,000m 深度以下的区域, 占地球面积的一半。相对于陆地的生境, 海洋的营养比较贫乏, 微生物的生命活动不活跃, 但从海洋表面到 11,034m 深的海沟, 都有微生物的存在, 甚至在海底软泥的 800m 深处都存在微生物的生命活动, 它们约有 1,500 万年的生活史^[1]。在永久低温 (火山口除外)、高压、黑暗、寡营养的深海环境里, 却存在着极为丰富的生物资源 (主要为微生物), 生活在深海的微生物必然有其特殊的代谢调控机制和代谢产物, 它们是开发新的生物活性物质的重要资源。

1 深海微生物的营养来源

深海生境中生存着种类繁多、数量巨大的微生物及动物, 仅海底软泥中原核生物的生物量估计占地球总生物量的 1/10 到 1/3 之多^[2]。深海没有直接的光合作用来提供有机物质, 传统海洋生态学的观点认为, 洋底生物群落的营养由海洋真光层的初级生产者产生。研究发现, 海洋真光层产生的有机质 99% 在 1,000m 以上被矿化或吸收, 仅有 1% ~ 3% 且难以降解的物质到达深海, 它却是维持深海生态系统的基本营养源泉^[3]。

* “973” 国家重点基础研究专项经费资助项目 (No. G2000078504)

中国大洋矿产研究开发协会资助项目 (No. DY105-02-03)

** 通讯作者 Tel: 0592-2195275, E-mail: yedezan@public.xm.fj.cn

收稿日期: 2005-08-15, 修回日期: 2005-11-01

这些沉降物由一系列不同大小的、活的及死的浮游植物、浮游动物及它们的排泄物组成，通常大于 0.5mm，在水下看起来就像雪花，被称为海雪（marine snow），它的数量决定了深海生物的多少和活性。沉降的海雪给深海微生物带来绝好的生长机会，它们在短的时间里加强 DNA 及蛋白质的合成，且微生物的生物量随沉降物的季节性变化而变动。微生物产生的水解酶将大颗粒物质降解成小分子物质，以维持自己的代谢活动，这表明深海微生物比表层的更为有效地利用难以降解的有机物质，深海微生物的生长受营养来源的影响很可能比周围的高压和低温环境的影响要大。

20 世纪 70 年代后期发现海底热液生态系统，人们证实深海的化能自养细菌可利用地壳上涌的矿物质扮演初级生产者的功能，成为洋底生物类群的另一类食物来源。化能自养微生物主要存在于热液区与冷泉区，如太平洋东部加拉帕哥斯峡谷的深海热液区附近的栖息着大量管状蠕虫及双壳贝类，有许多管状蠕虫长达 2 米多，其中的营养物质由化能自养细菌（如硫氧化细菌等）提供。用放射性碳标记证明热液区的化能合成非常活跃，无机化能自养菌是热液区的生物类群的主要营养物质。冷泉区也存在着丰富多样的生物，它与热液区的生物量十分相近，且两个区域的微生物都依赖于对硫化物的氧化为能源。总之，深海区域中的微生物利用海洋真光层的沉降物、海底上升的矿物质及环境中的 CO₂作为它们的营养物质。

2 深海微生物的多样性

深海拥有深水底流，诸多火山，海沟和地壳运动，火山喷发等，它隐含着各种各样特殊的环境，在这些特殊环境中生存着丰富的微生物类群（如表 1）。已发现的深海微生物类群主要包括：病毒、古菌、细菌、放线菌、酵母菌及真菌等。

表 1 深海中的部分微生物^[4]

环境	方法	筛选结果
大西洋（包括深海）	未培养	古菌，泉古菌门等主要菌类
北冰洋海底表层	未培养	CFB，细菌，较少种类的古菌
南极深海海水	未培养	细菌，γ-变形菌门，广古菌门
大西洋深海区	培养	以盐单胞菌属为主
海底火山口	培养	硫杆菌属、发硫菌属、贝日阿托氏菌属等
南极深海区	未培养	广古菌门Ⅱ～Ⅳ类群

以培养或未培养为基础，依赖于 16S rRNA 基因序列分析。CFB：细菌分类中的噬纤维菌属-黄杆菌属-拟杆菌属

深海中古菌的种类和数量都很多，主要包括嗜盐古菌、嗜热酸古菌及产甲烷古菌 3 大类群。Takami 等^[5]通过平板培养法从马里亚纳海沟 10,897m 深的海底沉积物中分离到数千个微生物菌株，包括放线菌、真菌及极端菌等，用 16S rDNA 测定出了 28 株细菌，其中有嗜压、嗜盐、嗜酸、嗜碱、嗜冷、嗜热等，有的基因序列已经测定，但对其嗜压、嗜冷及嗜热等机制还在研究中。又如 DeLong^[6]对深海嗜压菌的细菌系统发育分析表明它们分属于 γ-变形菌纲（γ-proteobacteria）中的 *Shewanella* sp.、*Photobacterium* sp.、*Colwellia* sp.、*Moritella* sp. 4 个属及尚未明确归类的 CNPT3，还有人在深海沉积物中发现 α-变形菌纲中的细菌和 GC 含量较低的革兰氏阳性菌等^[7]；Raghukumar 等^[8]从印度洋 Chagos 海沟 5,900m 深处的沉积物中进行真菌、细菌分离培养，发现从

底质表层到 370cm 深处都可分离到真菌, 各层次沉积物中细菌、真菌的丰度分为 10 ~ 2030、69 ~ 2493 CFU/g (底质, 干重), 其中真菌主要包括 *Aspergillus sydowii* 和一些未鉴定不产孢子的真菌; Nagahama 等^[9]从深海中分离到: *Rhodotorula*、*Rhodospiridium*、*Kluyveromyces* 等属的酵母菌, 我们研究组也从热带太平洋的底质中分离到细菌、放线菌、酵母菌及霉菌 650 多株, 即将完成菌种鉴定工作, 有关信息将发布于我们重点实验室网站 (www.mgr.org.cn)。可以预见, 随着研究深入, 深海微生物的多样性的内容势必更加丰富。

3 深海微生物的研究方法

3.1 培养法 培养法适用于微生物计数、菌株分离和特殊生理类群的鉴别。主要有平板培养法、超滤膜萌发法、灭绝培养及高压培养法等。其中平板培养较常用, 至今在微生物的研究中仍起着重要作用, 超滤膜萌发法是将样品过滤到滤膜上, 并将滤膜置于营养琼脂培养基上培养, 可研究长出的微生物菌落等。灭绝培养 (Extinction culture) 也称寡营养盐培养, 这种方法是将样品稀释的到几乎无菌状态, 然后用采样处灭菌后的海水培养, 研究微生物的特性, 它主要用于从原样品中获取最多种类的微生物。最近兴起的高压分离培养, 为分离到新的菌种提供了广阔的前景。

3.2 荧光显微镜直接计数法 它用于研究环境中微生物的丰度, 通过测定细胞的大小求得其体积, 进而换算成细菌 (含碳) 生物量, 为生态学提供必要的信息。1977 年 Hobbie 等运用吖啶橙 (Acridine orange, AO) 进行细菌染色, 然后过滤到用 Irgalan 染黑的 0.2 μ m 核孔滤膜上 (已有成品) 计数; 1980 年 Porter & Feig 改进对细菌的染色方法, 采用 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色, 与 AO 染色法相比, 这种方法受荧光染料干扰比较小, 背景更清晰, 染色效果更加专一, 还有用 SYBR Green I, YO-Pro I 及 SYBR Gold[®] 染色病毒或细菌。进入 80 年代后期, Sieracki 等在荧光显微镜上加了 CCD 照相机, 设计影像自动分析系统、运用微机自动计算分析细胞的大小, 使得分析速度大大提高。目前实验室中测定细菌大小和丰度常用该方法, 其受仪器限制比较小, 已成为我国 1991 年颁布的海洋调查规范的国家标准。

3.3 流式细胞仪分析法 流式细胞仪就是一种可区别不同微粒及细胞, 并可对细胞进行多参数分析及计数的仪器。20 世纪 90 年代末流式细胞仪引入到微生物学的研究领域中, 主要用于原位、快速的定量分析不同的单细胞微生物, 如水体中的微藻、细菌及病毒等, 还可以研究微生物的代谢活动等。

3.3.1 测定微藻的丰度、种类及代谢: 应用流式细胞仪对某些藻类快速的进行超微型生物类群区分、数量测定、细胞周期分析等。一般是根据微藻细胞的叶绿素、藻蓝素、藻红素等色素的自发或激发荧光的波长差异, 同步检测大小不同藻类的数量、组成和各组分比例, 此外还可追踪配子形成过程。染色 DNA 或蛋白质、荧光标记抗体、特殊功能探针如荧光素二乙酸酯 (Fluorescein diacetate FDA) 等标记与流式细胞仪结合, 进一步提高人们对微藻的动力学及多样性等的认识。

3.3.2 测定病毒的丰度及种类: 培养法测病毒的数量需特定的寄主, 显微技术 (如扫描显微镜) 不仅耗时且不易操作, 而流式细胞仪在线检测微生物包括病毒不仅快速而

且受不同操作人员的影响很小,加上新一代荧光标记物(TOTO-1、YOYO-1、Pico Green 及 SYBR Green 等)的出现,使得流式细胞仪在病毒的研究中显出了优势。

3.3.3 测细菌的丰度及研究其生长速度与核酸含量的关系等:流式细胞仪测单细胞细菌的生长速度也有独到之处,Gasol 等^[10]发现:生长快的微生物细胞往往是高核酸(high nucleic acid HNA)细胞,且在微生物群落中占绝大部分。Servais 等^[11]用流式细胞仪研究了高核酸(HNA)和低核酸(low nucleic acid LNA)细胞的细胞特异性(cell-specific activity CSA)及生物量特异性(biomass-specific activity BSA),发现 HNA 细胞的 BSA 总是明显高于 LNA 细胞的,LNA 细胞生长比较慢,鉴定这类微生物可能更有意义,它将为研究深海难培养的微生物提供重要参考价值。

3.3.4 研究微生物的多样性:应用荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization FISH)研究环境中微生物的多样性,但 FISH 只能研究群落中的主要微生物类群,对于某些特殊的微生物,常由于荧光标记太弱而无法用荧光显微镜检测。流式细胞仪已广泛的用于定量分析为生物群落中的不同细胞类群,它依赖于细胞的不同散射光、自发荧光及荧光染料,结合 rRNA 探针的荧光原位杂交技术,可鉴定出微生物的复杂类群中的不同种类,也可根据不同细胞的形态学及生理学特征的差异将其分类收集,并进一步分析,以提供特定的生化信息,它将在深海微生物领域中有广阔的应用前景。

3.4 分子生物学方法 该法在深海方面主要用于研究微生物的多样性,特别是 DNA 原位提取技术建立之后,发现了大量“未培养”微生物的存在,极大的丰富了深海微生物的多样性。另外通过 DNA 定量分析深海微生物多样性与丰度研究相结合,扩展了分子生态学的研究内容。

3.4.1 核酸杂交技术:核酸杂交技术是包括整个基因组的重组,可测核苷酸序列的相似程度。用 DNA-DNA 杂交法判断同一种或两种间关系,用 DNA-rRNA 杂交测同源性。如核酸杂交技术与 MPN(最可或然细胞数)法结合,可估计序列相似度,划分特定分类单元,以可能相近的种属为参照将微生物分类到种的水平上,可研究深海微生物的多样性。

3.4.2 PCR 及相关技术:主要有嵌套式 PCR、PCR 扩增、竞争性 PCR、RT-PCR(Real-time PCR)、竞争性 RT-PCR(cRT-PCR)及微阵列分析等,可用于测定基因种类及物种的分子鉴定等。如实时 PCR 结合了 cRT-PCR 及相关技术,在分析微生物基因表达方面具有十分灵敏、快速、简便、高通量的优点。这些将是我们研究微生物的关键技术,也必将是我们打开深海未知微生物世界的金钥匙。

3.4.3 基于多态性的技术:主要有随机扩增 DNA 多态(RAPD)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)法,可用于分析混合微生物群系中微生物的多样性,不同菌株间的亲缘关系。

3.4.4 核酸探针检测技术:即用与特定核苷酸序列发生特异性互补的已知核酸片段作为探针标记来分析样品中的特定 DNA 序列。如通过 16S rDNA 克隆文库的建立,PCR-RFLP 分析与序列测定对西太平洋“暖池”沉积物中的细菌类群及其与环境的关系进行了分析^[12],Ravenschlag 等^[13]从永冻的海底沉积物中分离得到了 353 株微生物,通过 16S rDNA 斑点杂交发现它们大部分是与硫循环有关的细菌(主要是 *Desulfotalea* sp.)。

3.4.5 分子流行病学技术:主要有 DNA 的限制性内切酶消化、质粒指纹图谱分析、

低分子量 RNA 分布图、限制性内切酶酶切片段长度多态性分析 (RFLP) 等。如将 RFLP 分析与 PCR^[14] (即 PCR-RFLP), 可检测环境中微生物多样性及其群落结构的研究。目前的分子生物技术虽然部分地代替了经典方法菌种鉴定, 但仍需不断完善和发展, 从而在深海微生物研究领域发挥更大的作用。

4 深海微生物的开发前景

微生物代谢产生的活性物质对人类的贡献十分巨大, 许多重要药物, 如是抗生素等微生物的次生代谢物或其衍生物, 在过去的半个多世纪挽救了无数人的生命。然而从陆源微生物寻找新的抗生素药物的几率大大降低, 分离所得的化合物 90% 是前人鉴定过的。海洋微生物的研究传来了令人兴奋的发现, 研究人员已从海洋微生物分离出了众多的新化合物。深海微生物更是一个吸引人的天然药物宝库, 如表 2 所述。

表 2 深海生境特征及开发前景^[15]

生活环境	环境特征	生物开发前景
大洋海沟	高压	促进和开发新的生物催化剂和化学物质
深海	低温	低温生物催化剂及抗冻剂; 生物修复; 表面活性剂
海水	寡营养	高亲和性的催化剂和配基
热液区	多金属元素	耐高温、稳定的生物催化剂; 生物湿法冶金
沉积物	寡营养区	敏感型、信号型、防御型等新的生物活性物质
饱和盐区	高盐	耐盐生物催化剂, 新的代谢物质
碳氢化合物渗出区	碳氢化合物	生物修复及生物转化
深海沉积物	厌氧	厌氧生物转化

此外, 深海中存在着各种各样的极端菌, 如嗜热菌、嗜冷菌、嗜酸菌、嗜碱菌、嗜压菌、嗜盐菌等, 它们常产生各种极端酶。除了一些酶类外, 还有新型抗生素、抗癌药物、不饱和脂肪酸、毒素等可供发掘和开发。随着一些新技术和新方法的应用, 人类必将对海洋微生物尤其是深海微生物有新的认识, 也必将创造 21 世纪深海微生物开发及应用的新辉煌。

参 考 文 献

- [1] Wellsbury P, Mather I, Parkes R J. *FEMS Microbiol. Ecol*, 2002, **1390**: 1 ~ 12.
- [2] Parkes R J. *Nature*, 1994, **371**: 410.
- [3] Danovaro R, Anno A D, Fabiano M, *et al.* *TRENDS in Ecology and Evolution*, 2001, **16** (9): 505 ~ 510.
- [4] Deming W J. *Ecology and Industrial Microbiology*, 2002, **5**: 301 ~ 309.
- [5] Takami, H, Inoue A, Fuji F, *et al.* *FEMS Microbiol. Letters*, 1997, **152**: 279 ~ 285.
- [6] DeLong E F, Franks D G, Yayanos A A. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 2105 ~ 2108.
- [7] Takami H, Kobata K, Nagahama T, *et al.* *Extremophiles*, 1999, **3**: 97 ~ 102.
- [8] Raghukumar G, Raghukumar S, Sheelu G, *et al.* *Deep-sea Research 1*, 2004, **51**: 1759 ~ 1768.
- [9] Nagahama T, Hamamoto M, Nakase T, *et al.* *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2001, **80**: 101 ~ 110.
- [10] Gasol J M, Comerma M, Garcı J C, *et al.* *Limnol Oceanogr*, 2002, **47**: 62 ~ 77.
- [11] Servais P, Casamayor E O, Courties C, *et al.* *Aquat Microb Ecol*, 2003, **33**: 41 ~ 51.
- [12] 曾同颖, 赵 晶, 张 锐, 等. *中国科学 (D 辑) 地球科学*, 2004, **34**: 265 ~ 271.
- [13] Ravenschlag K, Sahm K, Pernthaler J, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 3982 ~ 3989.
- [14] Bala A, Murphy P, Giller K E. *Molecular Ecology*, 2003, **12**: 917 ~ 930.
- [15] Deming J W, Curr O. *Biotechnol*, 1998, **9**: 283 ~ 287.