

雅浦海沟深海沉积物可培养真菌多样性及其反硝化能力研究

何高阳^{1,2} 徐 炜¹ 郭双双^{1,3} 刘文华² 骆祝华¹

(1. 国家海洋局第三海洋研究所、国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室 福建 厦门 361005;
2. 汕头大学理学院 广东 汕头 515063; 3. 厦门大学海洋与地球学院 福建 厦门 361005)

摘要: 自雅浦海沟 4 个站位的 12 个沉积物样品中分离得到 38 株真菌菌株, 基于形态观察和 ITS 序列信息对所得菌株进行分类鉴定, 发现它们分别属于青霉属 (*Penicillium*, 17 株)、曲霉属 (*Aspergillus*, 7 株)、篮状菌属 (*Talaromyces*, 1 株)、枝孢属 (*Cladosporium*, 6 株)、赭霉属 (*Ochroconis*, 1 株)、*Meyerozyma* 属 (1 株)、梅拉菌属 (*Meira*, 1 株)、*Cystobasidium* 属 (2 株)、*Wallemia* 属 (1 株) 和红酵母属 (*Rhodotorula*, 1 株) 等 10 个属。其中青霉属、曲霉属和枝孢属菌株为优势菌株, 分别占分离菌株总数的 44.7%、18.4% 和 15.8%; 而 *Wallemia* 属 (节担菌纲) 菌株是首次从深海环境中分离到。利用 PCR 技术在分离的深海真菌菌株中检测 *nirK* 和 *P450nor* 两种反硝化关键酶基因, 结果显示 *nirK* 基因可在黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*)、枝孢菌 (*Cladosporium* sp.)、枝状枝孢 (*Cladosporium cladosporioides*) 和产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 等 6 种真菌菌株中检测到, 而 *P450nor* 基因仅在黄曲霉菌株中检测到。同时还通过富集培养方法从上述沉积物样品中分离获得两株反硝化枝孢菌。结果表明, 雅浦海沟深海沉积物环境中存在着丰富的真菌资源, 它们在深海环境氮循环中起着一定作用, 这将增强人们对深海环境可培养真菌多样性及其生态作用的认识。

关键词: 海洋生物学; 深海沉积物; 可培养真菌; 多样性; 反硝化作用; 雅浦海沟

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 02. 010

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2018)02-0229-12

深海是指垂直深度在 1 000 m 以上的海洋, 占全球海洋面积的 3/4 以上, 具有低温 (除了热液口附近, 一般在 1~4℃)、无光照 (没有阳光, 只存在少量生物光和同位素射线)、高压 (随着深度下降每 10 m 压力会增加 1 atm)、寡营养等极端环境特点。极端的条件给人类的探索研究带来了很大困难, 但近年来随着科技的发展, 取样技术不断更新, 深海微生物得到了越来越多的关注^[1-3]。海洋真菌作为海洋微生物的重要部分, 存在于各种海洋环境中^[4]。Roth 等 (1964) 从大西洋 4 500 m 深处的海水中分离出第一株深海真菌^[5]。如今已在包括深海沉积物^[6-8]、热液区^[9-11]、冷甲烷渗出区^[12] 等多种深海环境中发现

真菌的存在。

深海沉积物主要是由海洋上层生命活动产生的物质及输入的陆源、大气物质沉降在海床上形成的, 虽然其中的有机质只有约 1% 最终沉积在海底, 但经过漫长地质时期的积累, 深海沉积物中的有机碳总量据估计可达 1.5×10^{22} g, 可以为生物的生存提供充足的养分, 因此微生物群落能在深海沉积物环境中广泛分布^[13]。深海沉积物覆盖了地球表面近一半的区域, 其中有丰富的真菌资源有待开发。目前深海沉积物中真菌多样性研究方法主要是传统的分离培养和以分子生物学为基础的免培养方法。免培养方法是以样品中真菌群落的总 DNA 为研究对象, 分析

收稿日期: 2017-07-05

基金项目: 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项资金资助项目 (海三科 2016039); 国家“973”项目重点基础研究发展计划资助项目 (2015CB755903); 国家自然科学基金资助项目 (41606145, 41776170)

作者简介: 何高阳 (1993~), 男, 硕士研究生; E-mail: m13411956411@163.com

通讯作者: 骆祝华 (1977~), 男, 研究员; E-mail: luozhuhua@tio.org.cn

自然状态下真菌多样性和群落结构,通过这种方法已经发现了很多新的深海真菌类群^[14-15].传统的分离培养方法虽然获得的真菌种类有限,但这些菌株可用于真菌对深海极端环境的适应机制、活性物质分离等方面的研究,对于深海环境真菌资源的开发利用具有重要意义^[16-17].

氮循环是生物圈基本物质循环之一,反硝化作用是指将硝态氮和亚硝态氮转化为气态氮的过程,是氮循环的重要环节.有关反硝化细菌的研究开始较早,发现了大量的反硝化细菌菌株,这使人们一度认为反硝化作用只存在于细菌中.直到1991年,Shoun等发现在低氧条件下 *Fusarium oxysporum* 能将 NO₃⁻ 或 NO₂⁻ 异化还原为 N₂O 并获取能量,真菌的反硝化作用才开始逐渐被关注^[18].目前已发现的反硝化真菌有镰刀菌属 (*Fusarium*)、毛壳菌属 (*Chaetomium*)、青霉属 (*Penicillium*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 等属的丝状真菌和一些酵母^[19].目前的研究表明反硝化过程主要涉及4种酶:硝酸还原酶 (Nar)、亚硝酸还原酶 (Nir)、一氧化氮还原酶 (Nor) 和一氧化二氮还原酶 (Nos).其中亚硝酸还原酶催化反硝化作用中亚硝酸盐转化为一氧化氮的过程,是反硝化作用的标志性和关键的限速步骤,因此编码 Nir 的基因常被作为分子标记来研究环境中反硝化微生物的多样性和群落结构. Nir 有两种类型 Cu-Nir 和 Cd₁-Nir,分别由 *nirK* 和 *nirS* 基因编码,两种酶功能相同但结构和催化位点不同且不能在同一细胞内共存. *nirS* 常用来检测反硝化细菌,但有研究显示 *nirK* 存在的范围更广,在真菌中也有发现,因此可用于反硝化真菌的检测^[20].真菌中还存在着一种行使一氧化氮还原酶功能的特殊细胞色素 P450,其能以 NADH 为直接电子供体将 NO 还原为 N₂O,称为一氧化氮还原酶细胞色素 P450 (P450nor)^[21]. *nirK* 和 *P450nor* 基因常被用于反硝化真菌检测,但主要是针对陆地土壤环境,目前对于海洋反硝化真菌的零星研究还仅限于近海环境^[22-24].

本研究利用分离培养方法对雅浦海沟沉积物样品中的真菌多样性进行分析,同时以 *nirK* 和

P450nor 基因作为分子标记对分离获得菌株的反硝化能力进行研究,并尝试通过富集培养方法分离获得反硝化真菌.本研究结果将进一步加深人们对深海可培养真菌多样性及其在深海生物地球化学循环中作用的认识.

1 材料与方法

1.1 样品信息

本研究所用沉积物样品来自雅浦海沟4个站点,共12个样品,为“向阳红09”调查船2016年4~7月进行的大洋第37航次调查采集,具体信息如表1所示.

表1 雅浦海沟沉积物样品站位信息

Tab.1 Information of sediment sampling sites at Yap Trench

站位	经纬度	水深/m	分层
Dive109	9.899° N, 138.386° E	4 435	Dive109-1(0~2 cm)
			Dive109-2(2~4 cm)
			Dive109-3(4~6 cm)
Dive111	9.867° N, 138.517° E	6 796	Dive111-1(0~2 cm)
			Dive111-2(2~4 cm)
			Dive111-3(4~6 cm)
Dive112	9.866° N, 138.493° E	6 300	Dive112-1(0~2 cm)
			Dive112-2(2~4 cm)
			Dive112-3(4~6 cm)
Dive113	9.863° N, 138.657° E	6 578	Dive113-1(0~2 cm)
			Dive113-2(2~4 cm)
			Dive113-3(4~6 cm)

1.2 真菌分离培养

本研究用1/5含量的PDA、CDA、CMA、MEA、YM和SDA共6种培养基分离沉积物样品中真菌,具体方法如下:每个沉积物样品取1g,加入到装有9cm³稀释液和玻璃珠的离心管中,振荡混匀,130 r/min摇床振荡孵育5 min.吸取200 mm³涂布平板,6种平板每种做3个重复,25℃恒温培养2~3 d后观察真菌生长状况.从平板上挑取菌落形状、颜色、浸出物等不同的真菌接种到新的PDA培养基上,得到纯培养物,-80℃甘油保存.培养基和稀释液配方如表2所示.

表2 不同培养基和稀释液成分

Tab.2 Compositions of different isolation media and ranger solution

名称	成分
马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)	马铃薯200.0 g,煮沸取滤液,葡萄糖20.0 g,琼脂粉15.0 g
察氏培养基(CDA)	NaNO ₃ 3.0 g, K ₂ HPO ₄ 1.0 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO ₄ 0.01 g, 蔗糖30.0 g, 琼脂粉15.0 g
玉米琼脂培养基(CMA)	玉米粉40.0 g, 琼脂粉15.0 g, Tween-80 10 cm ³

续表 2

名称	成分
麦芽提取物琼脂培养基 (MEA)	麦芽提取物 30.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 琼脂粉 15.0 g
酵母汁麦芽提取物琼脂培养基 (YM)	酪蛋白胨 5.0 g, 麦芽提取物 3.0 g, 酵母粉 3.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 琼脂粉 15.0 g
沙氏葡萄糖琼脂培养基 (SDA)	葡萄糖 40.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 琼脂粉 15.0 g
样品稀释液 (Ringer Solution)	NaCl 8.5 g, KCl 0.3 g, CaCl ₂ 0.33 g, Tween-80 100 mm ³

6 种培养基成分均取以上含量的 1/5, 加入人工海水至 1 000 cm³, 于 115℃ 高压灭菌 20 min, 冷却至 60℃ 左右加入 0.2 μm 针头过滤器过滤后的氯霉素和硫酸链霉素至终浓度 0.5 g/dm³ 来抑制细菌生长。

1.3 真菌的形态学鉴定

形态学鉴定包括培养性状和显微特征的观察。培养性状是将纯化后的菌株接种到 PDA 平板上, 室温培养 2~3 d 后开始每天观察菌落的生长状况, 记录各菌落直径、颜色、质地、反面特征、可溶性色素及渗出物等。显微特征的观察包括有性子囊果的着生方式、大小、形状、颜色、孔口的有无, 子囊的大小、形状, 子囊孢子的大小、颜色、形状等; 无性菌丝的颜色、表面特征, 分生孢子梗的着生方式、颜色、大小、表面特征, 分生孢子的着生方式、大小、形状、颜色、分隔情况以及表面特征, 采用埋片法: 用无菌解剖刀在 CMA 平板上切出两个宽度在 1 cm 左右的长方形小槽, 然后利用划线法将要观察的菌株接种在平板上, 在每个凹槽的两端盖上无菌盖玻片, 室温培养, 待菌丝生长状况合适后在倒置显微镜下观察。

1.4 真菌 DNA 的提取、纯化及 ITS 序列扩增

本研究中利用 CTAB 法提取真菌 DNA, 利用引物 ITS1/4 (ITS1: 5'-TCCGTAGCTGAACCT GCGG-3', ITS4: 5'-TCTCCGCTTATTGATATGC-3', Tm: 55℃) [25] 进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测是否为目的产物。使用 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 回收试剂盒纯化产物, 然后送至测序公司 (上海美吉生物医药科技有限公司) 测序。

1.5 真菌 ITS 序列进化分析

首先查看各菌株测序得到序列的长度和峰图, 挑选出可用序列, 然后利用 DNASTAR 软件去除冗余序列, 再将 ITS 序列在 NCBI 数据库中进行 Blastn 分析。从结果中挑选相似度在 97% 以上的序列归为同一种, 运用 Clustal W 将序列进行完全比对, 然后通过 MEGA 软件, 采用邻接法 (Neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树, 最终使用 1 000 次重

复的自展值分析 (bootstrap analysis) 检验系统发育进化树的置信度。

1.6 *nirK* 和 *P450nor* 基因检测

将分离得到的不同种真菌接入到 PYG 液体培养基中, 于 25℃ 和 180 r/min 下恒温振荡培养 3~4 d 后, 利用 CTAB 法提取真菌基因组 DNA。通过引物 *nirK* F/R (*nirK*1F: 5'-GTCCCCHGGMCCHTTCAT-3', *nirK*1R: 5'-GGYTCRTGTTARAACCTCGC-3') 和 *P450nor* F/R (*P450nor* 1R 1F: 5'-CCSACDTTYGTGAYATG-GA-3', *P450nor* 1R: 5'-GTBGCRTTVCCNGCVAC-3') [20-23] 进行 PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测是否为目的产物。

1.7 好氧反硝化真菌筛选

配制液体反硝化培养基 (以 NO₃⁻ 为唯一氮源, CH₃COO⁻ 为唯一碳源) 分装到 250 cm³ 锥形瓶中, 每瓶 100 cm³, 高压灭菌并在冷却后加入适量抗生素抑制细菌生长。称取 1 g 沉积物样品加入锥形瓶中, 25℃、180 r/min 恒温振荡培养, 待培养液中发现有明显菌丝生长或浑浊后, 取 1 cm³ 菌液转入到新的培养基中继续培养, 重复 5 次。将最终的培养液按稀释梯度原液、10⁻¹、10⁻² 涂布到固体培养基上, 每个梯度重复 3 次, 25℃ 恒温培养, 挑取单菌落纯化。所得菌株反硝化能力的初步分析是将纯化后的菌株接种到新的液体反硝化培养基中, 25℃、180 r/min 恒温振荡培养, 每 48 h 取样 1 次, 监测样品培养液中 NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 含量的变化情况。

2 结果与讨论

2.1 沉积物真菌分离鉴定结果

雅浦海沟 4 个站位的 12 个沉积物样品中共分离得到 38 株真菌 (表 3), 这些菌株的 ITS 序列与 GenBank 数据库中已知序列相似度均在 97%~100% 之间, 属于 10 个属 19 个种, 分别是: 青霉属 17 株, 曲霉属 7 株, 篮状菌属 (*Talaromyces*) 1 株, 枝孢属 (*Cladosporium*) 6 株, 赭霉属 (*Ochroconis*) 1 株, *Meyerozyma* 属 1 株, 梅拉菌属 (*Meira*) 1 株, *Cystobasidium* 属 2 株, *Wallemia* 属 1 株和红酵母属

(*Rhodotorula*) 1 株,不同种代表菌株信息如表 4. 其中青霉属、曲霉属和枝孢属菌株处于优势地位,分别占总菌株数的 44.7%、18.4% 和 15.8% (图 1). 系

统进化树显示所分离菌株均属于子囊菌门和担子菌门,其中子囊菌门居优势地位(图 2).

表 3 38 株真菌的 GenBank 序列号
Tab. 3 GenBank number of all 38 isolates

菌株编号(GenBank 序列号)	真菌种类
YP-H35(KY437693) 、YP-H99(MG56410)	<i>Aspergillus flavus</i>
YP-H36(KY437694) 、YP-H37(KY437695) 、YP-H100(MG56411)	<i>Cladosporium halotolerans</i>
YP-H38(KY437696)	<i>Cladosporium</i> sp.
YP-H39(KY437697)	<i>Ochroconis</i> sp.
YP-H40(KY437698)	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
YP-H41(KY437699)	<i>Meira argovae</i>
YP-H42(KY437700) 、YP-H43(KY437701) 、YP-H44(KY437702) 、 YP-H75(KY437705) 、YP-H76(KY437706) 、YP-H78(KY437708) 、 YP-H80(KY437710) 、YP-H81(KY437711) 、YP-H85(KY437715) 、 YP-H86(KY437716) 、YP-H88(KY437718)	<i>Penicillium chrysogenum</i>
YP-H45(KY437703) 、YP-H46(KY437704)	<i>Aspergillus niger</i>
YP-H77(KY437707) 、YP-H82(KY437712) 、YP-H87(KY437717)	<i>Penicillium sclerotiorum</i>
YP-H79(KY437709) 、YP-H83(KY437713) 、YP-H84(KY437714)	<i>Penicillium citrinum</i>
YP-H89(KY437719) 、YP-H96(KY814726)	<i>Aspergillus sydowii</i>
YP-H90(KY437720)	<i>Cystobasidium minutum</i>
YP-H91(KY814725)	<i>Wallemia</i> sp.
YP-H92(KY437721)	<i>Meyerozyma caribbica</i>
YP-H93(KY437722)	<i>Aspergillus versicolor</i>
YP-H94(KY437723)	<i>Cladosporium tenuissimum</i>
YP-H95(KY437724)	<i>Talaromyces diversus</i>
YP-H97(KY814727)	<i>Cystobasidium calyptogenae</i>
YP-H98(KY814728)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

表 4 基于 ITS 序列比对分析雅浦海沟深海沉积物可培养真菌的鉴定结果

Tab. 4 Identification of cultivable fungi from Yap Trench sediment samples on the basis of ITS gene sequences

菌株编号 (GenBank 序列号)	GenBank 中亲缘关系最近的菌株 (序列注册号)	所属真菌纲	序列相似度 /%
YP-H35(KY437693)	<i>Aspergillus flavus</i> strain RG01(KX898361)	散囊菌纲	100
YP-H36(KY437694)	<i>Cladosporium halotolerans</i> isolate E-283(KU059910)	座囊菌纲	100
YP-H38(KY437696)	<i>Cladosporium</i> sp. strain HNC12-41(KT959271)	座囊菌纲	100
YP-H39(KY437697)	<i>Ochroconis</i> sp. strain LI265(KC288114)	座囊菌纲	97
YP-H40(KY437698)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> isolate HNC16-63(KT959303)	座囊菌纲	99

续表 4

菌株编号 (GenBank 序列号)	GenBank 中亲缘关系最近的菌株 (序列注册号)	所属真菌纲	序列相似度/%
YP-H41(KY437699)	<i>Meira argovae</i> strain AS006(AY158676)	外担菌纲	99
YP-H42(KY437700)	<i>Penicillium chrysogenum</i> isolate F2A2(KT071714)	外担菌纲	100
YP-H45(KY437703)	<i>Aspergillus niger</i> strain ASP(KT844472)	外担菌纲	99
YP-H77(KY437707)	<i>Penicillium sclerotiorum</i> strain FRR 2074(NR_077157)	外担菌纲	99
YP-H79(KY437709)	<i>Penicillium citrinum</i> strain KAM4(LC105674)	外担菌纲	100
YP-H89(KY437719)	<i>Aspergillus sydowii</i> isolate HNC15-115(KT989398)	外担菌纲	100
YP-H90(KY437720)	<i>Cystobasidium minutum</i> strain CBS319(KY103140)	囊担菌纲	100
YP-H91(KY814725)	<i>Wallemia</i> sp. strain F53(FJ755832)	节担菌纲	99
YP-H92(KY437721)	<i>Meyerozyma caribbica</i> strain CBS5241(KY104225)	酵母纲	100
YP-H93(KY437722)	<i>Aspergillus versicolor</i> isolate Santa Lucia 4(KP773281)	散囊菌纲	100
YP-H94(KY437723)	<i>Cladosporium tenuissimum</i> strain UTHSC DI-13-177(LN834398)	座囊菌纲	100
YP-H95(KY437724)	<i>Talaromyces diversus</i> strain DTO_13116(KJ775700)	散囊菌纲	99
YP-H97(KY814727)	<i>Cystobasidium calyptogae</i> strain SN59(FJ515190)	囊担菌纲	100
YP-H98(KY814728)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain IIFCSW-B2(KY218730)	微球黑粉菌纲	99

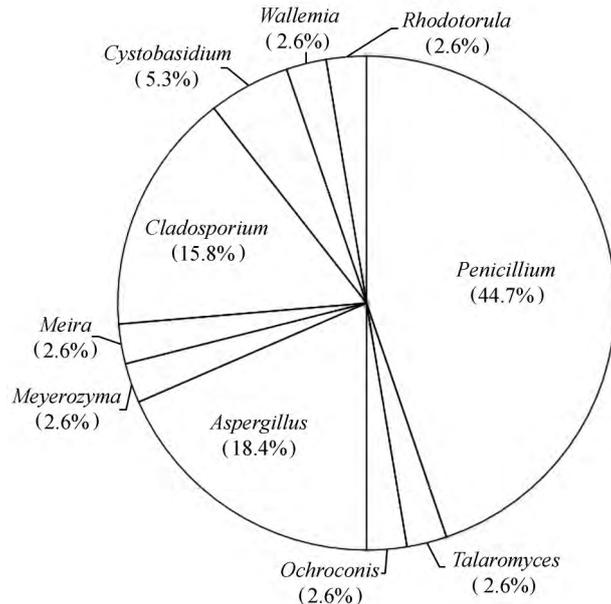


图 1 雅浦海沟沉积物样品中可培养真菌的群落结构

Fig. 1 Community structure of cultivable fungi in sediment samples from Yap Trench

2.2 不同站位沉积物样品真菌多样性差异

如表 5 所示, 4 个站位的沉积物样品都有分离到真菌, 其中 D112 和 D113 中最多, 分别是 8 种 12 株和 8 种 11 株; 其次是 D111, 有 7 种 8 株; 最少的是 D109, 只分离出 3 种 7 株。所有 19 种真菌

中没有任何一种从 4 个站位中全部分离到, 只有产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 一个种在除 D111 外的 3 个站位都有出现, 有 13 个真菌种只在单一站位有分离, 不同站位可培养真菌多样性之间差异很大。

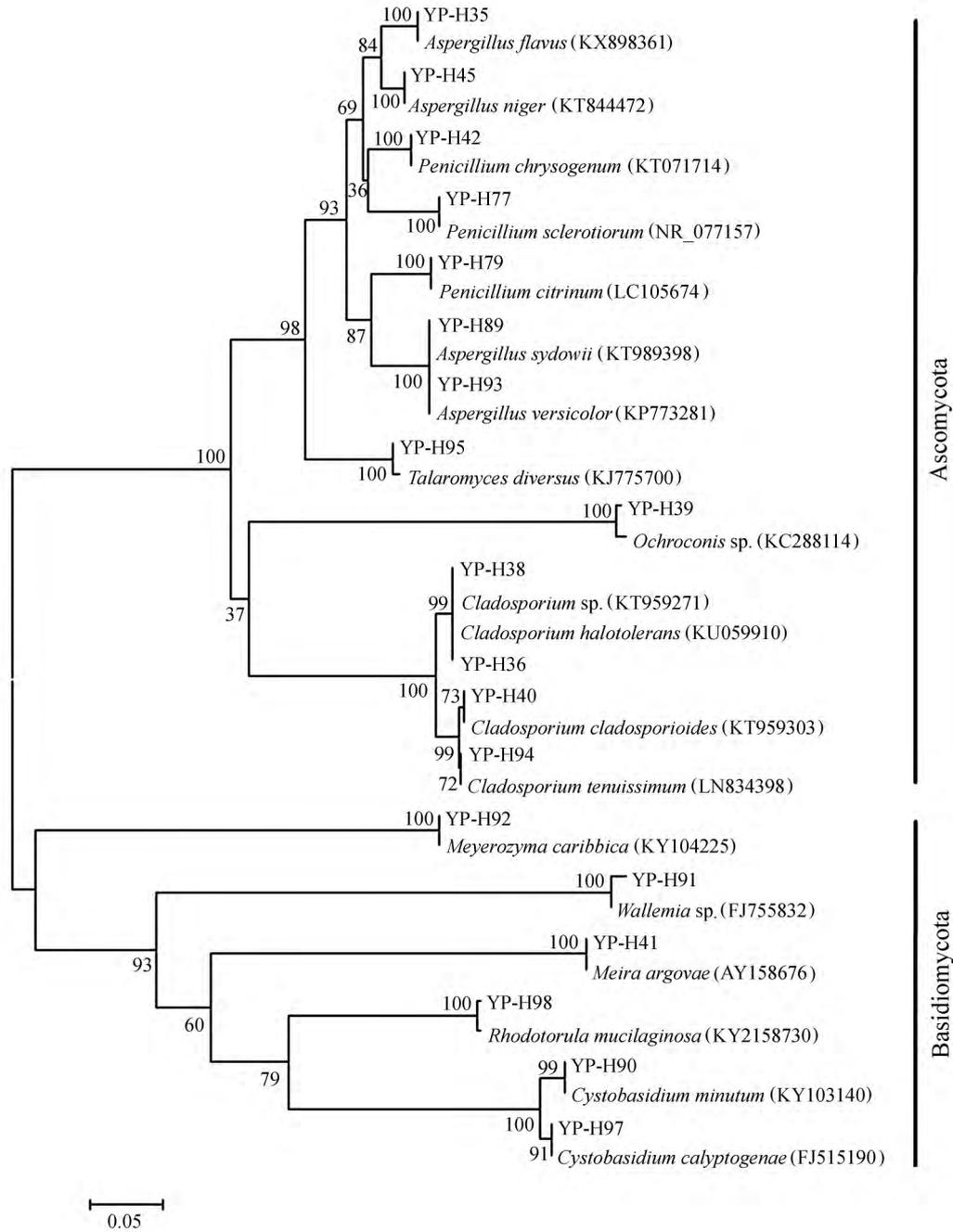


图 2 Neighbour-Joining 法构建的雅浦海沟深海沉积物可培养真菌系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of cultivable fungi in deep-sea sediments from Yap Trench by Neighbour-Joining method

表 5 雅浦海沟 4 个站位沉积物样品中分离真菌的信息

Tab. 5 Diversity and distribution of cultivable fungi from 4 different sediment sampling sites at Yap Trench

真菌种类	菌株数/株			
	D109	D111	D112	D113
<i>Aspergillus flavus</i>	1	1		
<i>Cladosporium halotolerans</i>	1		2	
<i>Cladosporium</i> sp.		1		
<i>Ochroconis</i> sp.			1	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>			1	
<i>Meira argovae</i>			1	

续表 5

真菌种类	菌株数/株			
	D109	D111	D112	D113
<i>Penicillium chrysogenum</i>	5		3	3
<i>Aspergillus niger</i>			1	1
<i>Penicillium sclerotiorum</i>			1	2
<i>Penicillium citrinum</i>			2	1
<i>Aspergillus sydowii</i>		2		
<i>Cystobasidium minutum</i>		1		
<i>Wallemia</i> sp.		1		
<i>Meyerozyma caribbica</i>		1		
<i>Aspergillus versicolor</i>		1		
<i>Cladosporium tenuissimum</i>				1
<i>Talaromyces diversus</i>				1
<i>Cystobasidium calyptogenae</i>				1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>				1
总菌株数(种数)	7(3)	8(7)	12(8)	11(8)

2.3 不同培养基分离真菌能力差异

本研究利用 6 种不同培养基来分离深海沉积物样品中真菌,结果如表 6 所示,每种培养基都有分离到真菌,其中获得菌株最多的是 YM 培养基有 9 种 10 株,其次是 PDA 培养基的 8 种 8 株,而效果最差

的是 CMA 和 CDA 分别只有 3 种 5 株和 2 种 2 株。只有产黄青霉在所有 6 种培养基上都有分离到,有 12 个种都只在 1 种培养基上有发现,说明大多数深海沉积物中真菌都对培养基有很强的偏好性。

表 6 利用 6 种培养基获得可培养真菌的差异

Tab. 6 Differences of cultivable fungi isolated from 6 different media

真菌种类	菌株数/株					
	CDA	CMA	YM	SDA	MEA	PDA
<i>Aspergillus flavus</i>			1			1
<i>Cladosporium halotolerans</i>			2			1
<i>Cladosporium</i> sp.						1
<i>Ochroconis</i> sp.					1	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>			1			
<i>Meira argovae</i>			1			
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	3	1	3	2	1
<i>Aspergillus niger</i>	1					1
<i>Penicillium sclerotiorum</i>		1	1			1
<i>Penicillium citrinum</i>				2	1	
<i>Aspergillus sydowii</i>		1		1		
<i>Cystobasidium minutum</i>					1	
<i>Wallemia</i> sp.						1
<i>Meyerozyma caribbica</i>					1	
<i>Aspergillus versicolor</i>			1			
<i>Cladosporium tenuissimum</i>				1		
<i>Talaromyces diversus</i>			1			
<i>Cystobasidium calyptogenae</i>						1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			1			
总菌株数(种数)	2(2)	5(3)	10(9)	7(4)	6(5)	8(8)

2.4 反硝化基因 *nirK* 和 *P450nor* 检测结果

利用 PCR 技术检测分离菌株的 *nirK* 和 *P450nor* 基因 结果表明在 6 种 18 株真菌中可检测 *nirK* 基因 ,它们分别是黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、杂色曲霉(*Aspergillus versico-*

lor)、枝孢(*Cladosporium sp.*)、枝状枝孢(*Cladosporium cladosporioides*) 和产黄青霉; 而 *P450nor* 基因仅在 2 株黄曲霉中检测到(表 7)。表 7 还显示每个站位都有具有反硝化基因的菌株。

表 7 深海沉积物可培养真菌中反硝化基因 *nirK* 和 *P450nor* 的检测结果

Tab.7 Detection assay of denitrifying genes *nirK* and *P450nor* in cultivable fungi from deep-sea sediments

真菌种类	站位	<i>nirK</i>	<i>P450nor</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	D109、D111	●	●
<i>Cladosporium halotolerans</i>	D109、D112		
<i>Cladosporium sp.</i>	D111	●	
<i>Ochroconis sp.</i>	D112		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	D112	●	
<i>Meira argovae</i>	D112		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	D109、D112、D113	●	
<i>Aspergillus niger</i>	D112、D113	●	
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	D112、D113		
<i>Penicillium citrinum</i>	D112、D113		
<i>Aspergillus sydowii</i>	D111		
<i>Cystobasidium minutum</i>	D111		
<i>Wallemia sp.</i>	D111		
<i>Meyerozyma caribbica</i>	D111		
<i>Aspergillus versicolor</i>	D111	●	
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	D113		
<i>Talaromyces diversus</i>	D113		
<i>Cystobasidium calyptogenae</i>	D113		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	D113		

注 “●”表示有检测到

2.5 好氧反硝化真菌筛选

本研究从 Dive113 站位 2~4 cm 沉积物样品中分离到 2 株反硝化枝孢菌: *Cladosporium sp.* (NCBI 序列号: MG56412) 和 *Cladosporium ramotenellum* (NCBI 序列号: MG56413), 分别与 *Cladosporium sp.* strain LCZ28 (KY643766) 和 *Cladosporium ramotenellum* strain 4.1.2.1 (KX674646) 的相似度为 100%, 纯化后的 2 株真菌接种到新的反硝化液体培养基中生长状况良好(图 3)。通过 12 d 的取样监测后发现 2 株真菌培养液中 NO_3^- 含量都有降低了约 30

mg/dm^3 , 且只出现极微量的 NO_2^- 累积, 说明这两株枝孢菌都有一定反硝化能力(图 4)。

2.6 讨论

已有的深海可培养真菌多样性报道所分离得到的菌株均属于子囊菌门和担子菌门, 包括子囊菌门的 5 个纲: 散囊菌纲、座囊菌纲、粪壳菌纲、酵母纲和锤舌菌纲; 担子菌门的 6 个纲: 伞菌纲、外担菌纲、囊担菌纲、微球黑粉菌纲、银耳纲和黑粉菌纲^[2, 8, 14, 16]。本研究从雅浦海沟 12 个沉积物样品中分离到 10 个属的共 38 株真菌, 全部属于子囊菌门

和担子菌门,且子囊菌门占优势地位,这与已有的研究结果一致.

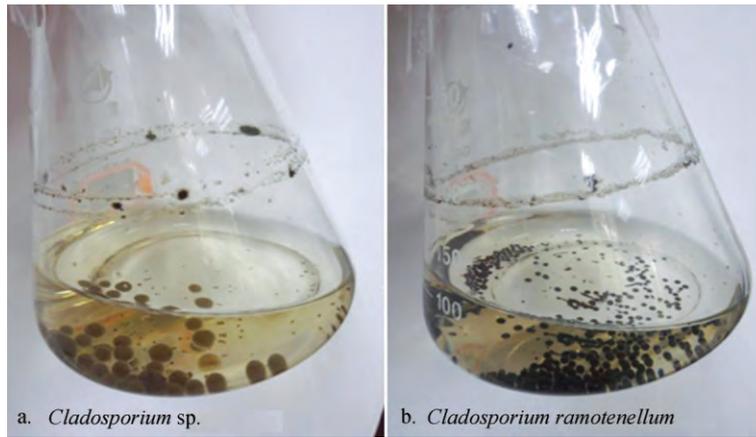


图3 两株枝孢菌接种到反硝化培养基中 12 d 后的生长状况

Fig. 3 Growth conditions of 2 *Cladosporium* fungi in aerobic denitrification medium after inoculation for 12 days

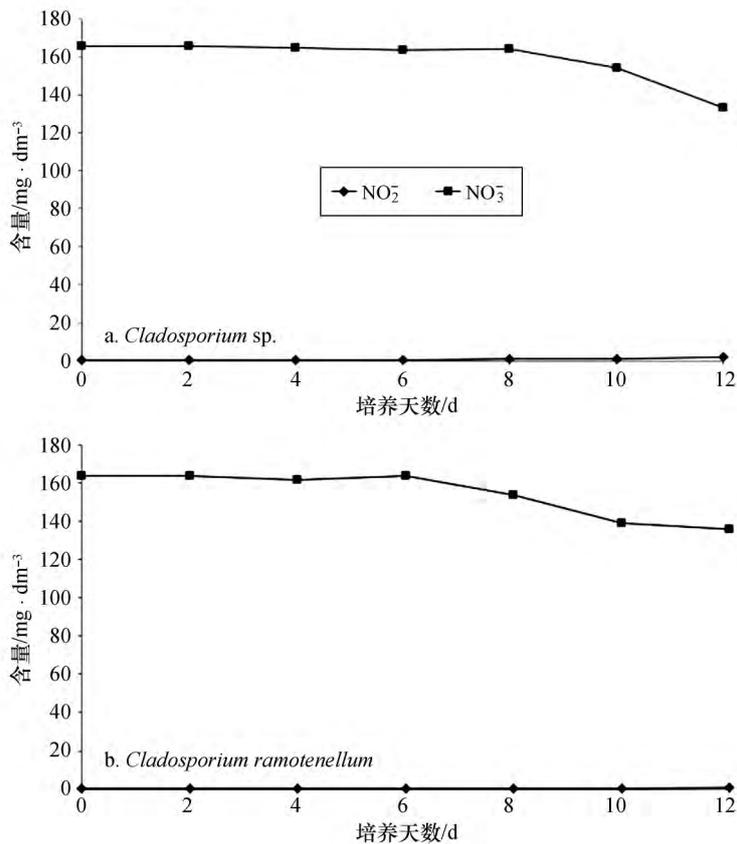


图4 两株枝孢菌的好氧反硝化性能

Fig. 4 Aerobic denitrification performance of two strains of *Cladosporium* fungi

本研究获得菌株属于子囊菌门的 3 个纲: 散囊菌纲、座囊菌纲和酵母纲,及担子菌门的 4 个纲: 外担菌纲、囊担菌纲、微球黑粉菌纲及节担菌纲. 其中散囊菌纲的青霉属、曲霉属和座囊菌纲的枝孢属真菌菌株在本研究所分离菌株中所占比例很高,这类真菌在地球各种环境中广泛分布,而高压条件下的

培养实验结果表明此类真菌的某些成员也可来自深海^[2,16];红酵母属是微球黑粉菌纲最常出现在深海环境中的属之一^[8,10,16];本研究分离获得了一株 *Wallemia* 真菌,这是自深海环境中首次分离得到节担菌纲真菌,*Wallemia* 属模式种 *Wallemia sebi* 是一种耐盐真菌,已从其发酵产物中鉴定出包括 walleminol

和 walleminone 等多种具有抗真菌、肿瘤细胞毒性的化合物^[26-27]。另外,本研究亦分离到酵母纲的 *Meyerozyma* 属和散囊菌纲的 *Talaromyces* 属成员,它们曾自大西洋和南海沉积物分离到^[28]。此外本研究还分离获得了座囊菌纲的赭霉属、囊担菌纲的 *Cystobasidium* 属和外担菌纲的梅拉菌属的菌株,这些属真菌多发现于陆生环境,在深海沉积物真菌多样性研究中未见报道^[29-31]。

本研究尝试利用 6 种不同培养基从 4 个站位沉积物样品中分离真菌,结果发现 4 个站位样品中有 3 个的可培养真菌多样性基本没有差异,D112、D113 和 D111 分别分离出 8、8、7 种,但 D109 样品只有 3 种。从 6 种不同培养基的分离能力来看,效果最好的是 YM 培养基,得到 9 种,其次是 PDA 有 8 种;效果最差的是 CMA 的 3 种和 CDA 的 2 种,这与已有的报道有很大差异。Damare 等(2006)在对中印度洋海盆深海沉积物可培养真菌的研究中得出 MEA 和 CMA 是效果最好的两种培养基^[2];Singh 等(2010)对同样来自中印度洋海盆的沉积物样品进行可培养真菌分离,发现 MEA 是效果最好的培养基^[16];Singh 等(2012)在另一个研究中得出效果最好的分离培养基是 CDA 和 PDA^[32]。这说明即使是来自同一海域的沉积物样品,在分离过程中效果最好的培养基也不尽相同,但总的来说利用不同培养基进行分离的方法,获得了更多的可培养真菌,对深海环境真菌多样性的研究有很大帮助。

已报道的反硝化真菌主要来源于各种陆地环境,包括镰刀菌属、柱孢菌属、赤霉菌属、链格孢属、毛壳菌属、曲霉属、青霉属等,这些反硝化真菌能从 NO_3^- 或 NO_2^- 开始生成 N_2O ^[33]。本研究对深海沉积物中反硝化真菌的多样性进行了初步研究,首先利用 PCR 技术检测获得的真菌菌株的亚硝酸还原酶基因 *nirK* 和一氧化氮还原酶基因 *P450nor*,发现可在黄曲霉、黑曲霉、杂色曲霉、枝孢菌、枝状枝孢以及产黄青霉等 6 种真菌菌株中检测到 *nirK* 基因,而 *P450nor* 基因仅在黄曲霉菌株中检测到。同时本研

究利用富集培养方法分离得到 2 株好氧反硝化枝孢菌: *Cladosporium* sp. YN1 和 *Cladosporium ramotenellum* YN2。本研究首次从深海沉积物环境中分离获得反硝化真菌,表明真菌在深海环境的氮循环中发挥一定作用,有待深入研究。

本研究通过分离培养方法对深海沉积物样品中可培养真菌多样性进行了研究,所分离获得的菌株大多属于青霉属、曲霉属和枝孢属,同时也分离得到了一些从未在深海环境中分离到的真菌种类;此外本研究还利用富集培养方法分离获得了两株好氧反硝化枝孢菌。这些结果增强了我们对深海环境真菌多样性的认识,为研究真菌对深海极端环境的适应机制及其生态作用奠定了基础。分子生态学研究表明在深海环境中还存在大量未知真菌种属,因此后续研究将改进分离培养方法并扩大研究海域以获得更多不同种类的新型深海真菌资源。

3 结论

本研究从雅浦海沟 4 个站位 12 个样品中分离到 38 株真菌,序列比对结果表明属于 7 个纲(10 个属):散囊菌纲、座囊菌纲、酵母纲、外担菌纲、囊担菌纲、节担菌纲、微球黑粉菌纲,其中节担菌纲是首次从深海环境中被分离出来;优势属是青霉属、曲霉属和枝孢属。所分离获得的真菌都属于子囊菌门和担子菌门,并且子囊菌门占优势地位。同时利用 *nirK* 和 *P450nor* 两种反硝化关键酶基因作为分子标记对分离获得的深海沉积物真菌进行检测,结果在 6 种真菌中发现 *nirK* 基因:黄曲霉、黑曲霉、杂色曲霉、枝孢菌、枝状枝孢以及产黄青霉;*P450nor* 基因仅在黄曲霉中被发现。此外还利用富集分离的方法从沉积物样品中得到两株枝孢菌,接种新到液体反硝化培养液中一段时间后均检测到 NO_3^- 含量的降低,说明这两株菌都具有反硝化能力。本研究有助于加强对深海环境真菌多样性和群落结构的认识,以及真菌在深海生态系统的地球化学循环中所起的作用提供基础理论证据。

参考文献:

- [1] Xu H X, Wu M, Wang X G, et al. Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(2): 479-485.
- [2] Damare S, Raghukumar C, Raghukumar S. Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin [J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2006, 53(1): 14-27.
- [3] Lai X, Cao L, Tan H, et al. Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea [J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(8): 756-762.
- [4] 金静, 李宝笃. 海洋真菌的研究概况 [J]. *菌物学报*, 2005, 24(4): 620-626.
- [5] Roth J F, Orpurt P, Ahearn D. Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment [J]. *Canadian Journal*

- of Botany , 1964 , 42(4) : 375-383.
- [6] Xu W , Pang K L , Luo Z H. High fungal diversity and abundance recovered in the deep-sea sediments of Pacific Ocean [J]. *Microbial Ecology* , 2014 , 68: 688-698.
- [7] Nagano Y , Nagahama T , Hatada Y , et al. Fungal diversity in deep-sea sediments—the presence of novel fungal groups [J]. *Fungal Ecology* , 2010 , 3(4) : 316-325.
- [8] Zhang X Y , Tang G L , Xu X Y , et al. Insights into deep-sea sediment fungal communities from the East Indian Ocean using targeted environmental sequencing combined with traditional cultivation [J]. *PLoS ONE* , 2014 , 9(10) : 109-118.
- [9] Burgaud G , Le C T , Arzur D , et al. Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents [J]. *Environmental Microbiology* , 2009 , 11: 1 588-1 600.
- [10] Burgaud G , Hue N T M , Arzur D , et al. Effects of hydrostatic pressure on yeasts isolated from deep-sea hydrothermal vents [J]. *Research in Microbiology* , 2015 , 166(9) : 700-709.
- [11] Connell L , Barrett A , Templeton A , et al. Fungal diversity associated with an active deep sea volcano: Vailulu'u Seamount , Samoa [J]. *Geomicrobiology Journal* , 2009 , 26: 597-605.
- [12] Nagahama T , Takahashi E , Nagano Y , et al. Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in deep-sea methane cold-seep sediments [J]. *Environmental Microbiology* , 2011 , 13: 2 359-2 370.
- [13] Fry J C , Parkes R J , Cragg B A , et al. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep sub-seafloor biosphere [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 2008 , 66(2) : 181-196.
- [14] Nagano Y , Nagahama T. Fungal diversity in deep-sea extreme environments [J]. *Fungal Ecology* , 2012 , 5(4) : 463-471.
- [15] Manohar C S , Raghukumar C. Fungal diversity from various marine habitats deduced through culture-independent studies [J]. *FEMS Microbiology Letters* , 2013 , 341: 69-78.
- [16] Singh P , Raghukumar C , Verma P , et al. Phylogenetic diversity of culturable fungi from the deep-sea sediments of the Central Indian Basin and their growth characteristics [J]. *Fungal Diversity* , 2010 , 40: 89-102.
- [17] 计长柱 孙世伟 蔡生新 等. 深海来源曲霉真菌 CXCTD-06-6a 次级代谢产物中的肿瘤细胞增殖抑制活性成分研究 [J]. *中国海洋药物* 2011 30(3) : 1-6.
- [18] Shoun H , Tanimoto T. Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome-P450 in the respiratory nitrite reduction [J]. *Journal of Biological Chemistry* , 1991 , 266: 11 078-11 082.
- [19] 黄莹, 龙锡恩. 真菌对土壤 N₂O 释放的贡献及其研究方法 [J]. *应用生态学报* 2014 25(4) : 1 213-1 220.
- [20] Chen H H , Yu F B , Shi W. Detection of N₂O-producing fungi in environment using nitrite reductase gene (*nirK*)-targeting primers [J]. *Fungal Biology* , 2016 , 120(12) : 1 479-1 492.
- [21] McQuarters A B , Wirgau N E , Lehnert N. Model complexes of key intermediates in fungal cytochrome P450 nitric oxide reductase (*P450nor*) [J]. *Current Opinion in Chemical Biology* , 2014 , 19: 82-89.
- [22] Long A , Song B , Fridley K , et al. Detection and diversity of copper containing nitrite reductase genes (*nirK*) in prokaryotic and fungal communities of agricultural soils [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 2015 , 91(2) : 1-9.
- [23] Novinscak A , Goyer C , Zebbarth B J , et al. Novel *P450nor* gene detection assay used to characterize the prevalence and diversity of soil fungal denitrifiers [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2016 , 82(15) : 4 560-4 569.
- [24] Jebaraj C S , Raghukumar C. Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa , India [J]. *Mycological Research* , 2009 , 113: 100-109.
- [25] Lott T J , Kuykendall R J , Reiss E. Nucleotide sequence analysis of the 5. 8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species [J]. *Yeast* , 1993 , 9(11) : 1 199-1 206.
- [26] Frank M , Kingston E , Jeffery J C , et al. Walleminol and walleminone , novel caryophyllenes from the toxigenic fungus *Wallemia sebi* [J]. *Tetrahedron Letters* , 1999 , 40(1) : 133-136.
- [27] Mu J , Jiao B H , Zhang Y , et al. Study on antifungal and cytotoxic compounds of marine *Wallemia sebi* XD20 [J]. *Journal of Biotechnology* , 2008 , 136: S600.
- [28] 郝文惠. 大西洋与南海深海沉积物真菌多样性分析及极地产低温酶菌株的筛选 [D]. 厦门: 厦门大学 2014.
- [29] Vyas S , Chhabra M. Isolation , identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast [J]. *Bioresource Technology* , 2017 , 223: 250-258.
- [30] Tanaka E , Shimizu K , Imanishi Y , et al. Isolation of basidiomycetous anamorphic yeast-like fungus *Meiraargovae* found on Japanese bamboo [J]. *Mycoscience* , 2008 , 49(5) : 329-333.
- [31] Martin-Sanchez P M , Novakova A , Bastian F , et al. Two new species of the genus *Ochroconis* , *O. lascauxensis* and *O. anom-*

- ala* isolated from black stains in Lascaux Cave , France [J]. *Fungal Biology* ,2012 ,116(5) :574-589.
- [32] Singh P ,Raghukumar C ,Meena R M , et al. Fungal diversity in deep-sea sediments revealed by culture-dependent and culture-independent approaches [J]. *Fungal Ecology* ,2012 ,5(5) :543-553.
- [33] 黄莹 ,龙锡恩. 真菌对土壤 N₂O 释放的贡献及其研究方法 [J]. *应用生态学报* ,2014 ,25(4) :1 213-1 220.

Diversity and denitrification capability of cultivable fungi from deep-sea sediments of Yap Trench

HE Gao-yang , XU Wei , GUO Shuang-shuang , LIU Wen-hua , LUO Zhu-hua

(1. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources , Third Institute of Oceanography , SOA , Xiamen 361005 , China;
2. College of Science , Shantou University , Shantou 515063 , China; 3. College of Ocean and Earth Sciences , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

Abstract: In this study , fungal diversity of 12 deep-sea sediment samples from 4 sampling sites at Yap Trench were investigated based on culture-dependent method. A total of 38 fungal strains were isolated and the taxonomic identification was performed based on morphological observation and ITS sequence analysis. The results showed that all strains were affiliated with 10 genera , including *Penicillium*(17 strains) , *Aspergillus*(7 strains) , *Talaromyces*(1 strain) , *Cladosporium*(6 strains) , *Ochroconis*(1 strain) , *Meyerozyma*(1 strain) , *Meira*(1 strain) , *Cystobasidium*(2 strains) , *Wallemia*(1 strain) and *Rhodotorula*(1 strain) . The dominant genera were *Penicillium* , *Aspergillus* and *Cladosporium* , whose members accounted for 44. 7% , 18. 4% and 15. 8% of all strains isolated. Furthermore , the *nirK* gene was detected in 18 strains belonging to 6 fungal species including *Aspergillus flavus* , *Aspergillus niger* , *Aspergillus versicolor* , *Cladosporium* sp. , *Cladosporium cladosporioides* and *Penicillium chrysogenum* while the *P450nor* gene was only detected in *Penicillium chrysogenum*. Meanwhile , 2 denitrifying fungal strains were isolated based on enrichment method , both belonging to the genus *Cladosporium*. Results of this research indicated that there were abundant fungal resources in deep-sea environments and they might play an important role in the deep-sea nitrogen cycle , which should enhance the understanding of fungal diversity and their ecological roles in deep-sea environments.

Key words: marine biology; deep-sea sediments; cultivable fungi; diversity; denitrification; Yap Trench

DOI: 10. 3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 02. 010

(责任编辑: 肖 静、王 静)