

学校编码：

分类号：_____ 密级：_____

学号：

UDC：_____

学 位 论 文

西太平洋“暖池”区深海沉积物中 细菌多样性研究

Phylogenetic Analysis of Bacterial Communities in
Deep-sea Sediment from the Western Pacific “Warm Pool”

赵 晶

指导教师：沈明山 教授

曾润颖 副研究员

申请学位级别：硕士

专业名称：细胞生物学

论文提交日期：2004年6月30日

论文答辩日期：2004年7月5日

学位授予单位：厦 门 大 学

答辩委员会主席：肖湘研究员

答辩委员：陈亮副教授; 王鸣刚副

教授; 李春江副教授; 曾润颖副研究员

2004年6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的工作成果。对本文的研究工作作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

目 录

摘要.....	1
ABSTRACT.....	3
1. 前言.....	5
1.1 深海环境.....	5
1.2 深海微生物的研究进展.....	6
1.2.1 深海中的嗜压微生物.....	7
1.2.2 深海中的嗜冷微生物.....	7
1.2.3 深海中的嗜碱微生物.....	9
1.2.4 深海中的超高温微生物.....	10
1.2.5 深海中的其它微生物.....	10
1.3 深海微生物多样性的研究进展.....	11
1.3.1 深海微生物多样性的研究意义.....	12
1.3.2 分子生物学技术在微生物多样性研究中的应用.....	14
1.4 本论文的思路、目的和意义.....	19
2. 材料与方法.....	21
2.1 材料.....	21
2.2 基本方法.....	27
3. 结果与分析.....	37
3.1 深海沉积物中总 DNA 的提取.....	37

3.1.1 不同样品总 DNA 提取结果.....	37
3.1.2 DNA 的提取效率.....	38
3.1.3 粗提 DNA 的纯化.....	39
3.2 西太平洋“暖池”区深海沉积物中细菌群落结构调查.....	39
3.2.1 16S rDNA 序列扩增.....	39
3.2.2 16S rDNA 序列 RFLP 分析.....	40
3.2.3 细菌 16S rDNA 克隆文库的构建.....	41
3.2.4 WP0102 站位深海沉积物中细菌多样性分析.....	43
3.2.5 WP01-4(230 cm)站位深海沉积物多样分析.....	56
3.2.6 西太平洋“暖池”区不同站位深海沉积物中细菌多样性 比较分析.....	59
3.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 在深海沉积物细菌多样性分析 中的应用.....	60
3.3.1 基因组 DNA 的 PCR 扩增.....	60
3.3.2 16S rDNA PCR 扩增片段的 DGGE 分析.....	62
3.3.3 序列分析.....	64
3.3.4 太平洋不同站位深海沉积物中细菌多样性分析.....	64
4. 讨论.....	71
4.1 深海沉积物中总 DNA 的提取.....	71
4.2 太平洋深海沉积物中细菌多样性分析.....	73
4.2.1 西太平洋暖池区 WP0102 站位沉积物中微生物群落结构分析...	73

4.2.2 西太平洋“暖池”区 WP01-4 (230 cm) 深海沉积物细菌群落结构分析.....	75
4.2.3 不同深海沉积物中微生物多样性特征及与环境之间的关系...	76
4.3 利用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 进行微生物多样性研究方面的几点认识.....	79
5. 总结.....	83
参考文献.....	84
致谢.....	101
附录一 采样位点图示.....	102
附录二 样品记录.....	103
附录三 质粒图谱.....	104

摘要

本文对采集自太平洋深海 2000 m ~ 5000 m 的沉积物样品进行了分子生态学调查,研究了样品中微生物多样性及群落结构并对其与环境的关系进行了分析。

针对深海环境的特殊性,本文建立了一套能有效地提取沉积物中微量 DNA 的方法。该法采用化学裂解和酶解相结合,并利用 DNA 吸附树脂进行纯化。结果表明它能有效地去除沉积物中的腐殖酸等抑制剂,每克深海沉积物样品可得到 DNA 约 16 μg ,所得到的 DNA 分子片段均在 23kb 左右,可直接应用于各种分子生物学操作。

对采集西太平洋“暖池”区两个位点的沉积物样品,通过构建环境样品的微生物 16S rDNA 克隆文库,采用 PCR-RFLP 分析、16S rDNA 序列测定以及系统发育分析的方法,调查研究了深海沉积物中的微生物多样性、群落结构特征及其与环境之间的关系。结果表明,两位点虽然都以紫细菌亚群 (*Proteobacteria*) 为优势细菌类群,但二者在亚群的分布上有较大的差异。

在 WP0102(1~12 cm)沉积物四个层次的样品中,属于 γ -和 α -紫细菌亚群的细菌种类和数量均最为丰富; δ -亚群和 ε -亚群占有一定比例,这两个亚群的细菌大部分都和硫代谢相关;而属于 β -亚群的细菌很少。对该位点与 C、S 相关的细菌在各层次沉积物中的分布进行了分析,表明它们的代谢在该海区海底的物质能量代谢中占据重要的地位。

对 WP01-4(230 cm)样品的分析表明, α -和 β -亚群为优势和次优势菌群。在 α -亚群中,64.3%的基因型与 *Sphingomonas* 属细菌具有较高同源性。该属细菌能降解有机污染物,意味着在海底 2 m 以下的沉积物中存在着较为丰富的有机物。而在 β -亚群的研究中发现,有相当比例的克隆与具有脱氮、脱硫代谢机制的细菌的同源性较高。

结合 WP0102 和 WP01-4 两个不同深度的沉积物微生物多样性研究,推测

在西太平洋“暖池”区深海沉积物中存在着一个由微生物参与的由浅层至深层的较为完整的碳、氮、硫循环。

本文还采用 PCR-DGGE 检测方法对西太平洋“暖池”区不同站点及中、东太平洋“结核”区的群落结构及多样性进行分析比较，表明前者明显丰富于后者。同时还发现无论是在西太平洋“暖池”区不同站点之间，或是太平洋“暖池”区内外不同位点之间，沉积物中的细菌多样性都存在一定的差异，推测不同海区的地理特质及相同海区不同位点的水深和沉积物深度是引起这种差异性的重要因素。

关键词：西太平洋“暖池”区；总 DNA 提取；微生物多样性

ABSTRACT

The microbial diversity and their relationship to the environment in the deep sea sediment from the Pacific were investigated by molecular ecology approaches.

An efficient, nonselective protocol was developed to extract the small-scale DNA from sediments by SDS and lysozyme lysis. The total DNA was purified by resin. The results indicated that it could remove the humic acid and other inhibitors in sediment samples, and recover about 16 μg pure DNA with the size of about 23 kb from 1 g deep sea sediment. The pure DNA obtained can be used directly for molecular operation.

Microbial 16S rDNA clone libraries of deep sea sediments were constructed and studied by PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) and phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences. The microbial diversity and community structures in deep sea sediment collected from two different depth of the west Pacific “warm pool” including WP0102(1~12 cm) and WP01-4(230 cm), as well as the interaction between microbial community and environment, were analyzed based on these studies.

In WP0102 sediments, members of the γ -*Proteobacteria* and α -*Proteobacteria* were found to be most abundant, and members of β -*Proteobacteria* were seldom detected. Within the δ - and ϵ -*Proteobacteria*, most sequences are related to the sulphur cycling in the marine sediment. The distribution of the bacteria in each sediment which was related to the metabolism of sulfur and methane was analyzed. The results indicated that the metabolism of sulfur and methane played an important role in the substance and energy cycles of this area.

Among the analyzed sequences, α - and β -*Proteobacteria* were predominant in

WP01-4(230 cm) sediment. 64.3% of phylotypes within α -*Proteobacteria* were closely relative to *Sphingomonas* sp. which was recalcitrant towards organic pollutants and ubiquitous in different geographical locations. The result indicated that there were still abundant organic matter in the sediment of depth of 2 m below the sea floor. The analysis also revealed that many clones belonging to β -*Proteobacteria* were related to the metabolism of desulfurization and denitration.

In conclusion, the distribution and amount analysis of these bacteria in different depths of core sediment showed that there was an intact C、N、S cycle driven by microbe in the western Pacific “warm pool” deep sea sediment.

Bacterial communities in deep sea sediments from several sea area, including the western Pacific “warm pool”、the east Pacific “manganese nodule” and the middle Pacific were compared by numerical analysis of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) profiles of 16S rDNA genes. The results revealed the microbial diversity in the sediment from “warm pool” was most abundant. The differences of bacterial communities were found to be existed not only in the sediment from different sea areas but also in sediment with different depths from the same sea area. It was deduced that these difference was related to the geographical characteristic existed in different sea areas and the depths of ocean and sediments.

Key Words: the western Pacific “warm pool”; the total DNA; microbial diversity

1. 前言

1.1 深海环境

浩瀚的海洋是地球上生命的摇篮，它覆盖着地球表面积的 71%，平均深度为 3800 m，最深处超过 10 000 m。海洋的空间总体积达 $1370 \times 10^6 \text{ km}^3$ ，比陆地和淡水中生命存在空间大 300 倍。占地球总水量 97% 的海洋，生物资源丰富，种类繁多。据统计大约有 20 多万种生物生存在海洋中，然而事实上能够得到阳光照耀的海洋表层仅占不到生物可存活空间的 3%，其他的 97% 都位于海面下黑暗的世界里，因此相对于地球上其他生命栖息地而言，深海存在着更为大量且鲜为人知的生物资源。

深海，一般指的是位于海洋 1000 m 以下的深度区域，占地球表面积的一半^[1]。直到近代人们对深海的了解还十分有限。随着现代科学技术的发展，深海才刚刚被探索和研究。已有的发现表明，与陆地世界相比较，深海世界有四个突出的特征。其一，高压化，水深每增加 10 米，其静压力约增加 1 大气压，所以深海海底的平均压力在 400 大气压以上，而在马里亚纳海沟（水深为 10924 米），静压力超过了 1000 大气压，可谓超高压。在巨大的静压力下，深海的洋床，即使是沉积物也坚实得近乎岩石一般；其二，深海的世界除生物发光外几乎一片黑暗，光线在距洋面几十米深的水体中就被迅速吸收掉了。如果深海里有生命存在，那么已无法靠光合作用提供能量和养分；其三，是深海世界大部分处于低温之中（1~4℃），但也有一些地方有热泉喷出口，不断喷出的热泉，使周围形成中心水温高达 300~400℃ 的高温环境。在这个环境里，围绕喷口生长着喷口动物群，如 1977 年首次发现位于东太平洋加拉帕戈斯深海的裂谷热泉喷口，水温高达 300~350℃，周围生长着贻贝、蛤类和管虫类，它被认为是深海生物学近一百年来最激动人心的发现^[2]。迄今为止，已发现和报道了 20 多个分布点；其四，是深海世界具有高度净化

能力，原来人们以为陆地世界和海洋本身的生命活动，长年累月排放出的巨大数量的垃圾、各种污染物，最终都排向、并累积在深海海底，可事实上这里还是清静之所在，显示了深海具有高度的自净能力。

以上特征，意味着深海可能是生命的极限环境，随着许多国家不载人和载人潜水调查器（船）的研制和使用，人们开始有计划地探索深海环境，特别是深海中的微生物王国。

1.2 深海微生物的研究进展

极端环境包括高、低温环境，高盐环境，高酸环境，高碱环境，高压环境，高辐射环境，寡营养、黑暗环境等。例如，温泉、南北极地或高山冰川、盐湖、碱湖、酸矿水、酸性热泉和深海等。近年来，这些过去被认为是生命禁区的区域，发现了各式各样的新的生命形式，它们生存繁衍的理想场所恰恰是这些极端环境、如嗜热菌、嗜冷菌、嗜碱菌、嗜盐菌、嗜压菌等，统称为极端微生物（Extremophiles）。极端微生物具有独特的基因类型，特殊的生理机制及特殊的代谢产物。作为地球上的边缘生命现象，极端微生物颇为耐人寻味。它的生命起源、系统进化等方面将给人们很多重要的启示，在生命行为的原理上也将拓展人们的概念。极端微生物存在的原理，又具有极大的应用价值；它们的特殊机制及特殊产物，将使某些新的生物技术手段成为可能；它们的应用也将改变整个生物技术的面貌。

深海具有极端自然环境的特殊性加上各种科学器材的研制和开发，深海极端微生物的研究已日益引起人们的关注。世界各国海洋科技界广泛地开展了深海微生物的搜集、分离、保存、基因研究和开发应用工作，在深海中嗜压、嗜冷、嗜碱、超高温和石油分解微生物等方面的应用，取得了开创性的突破进展，使人们看到了深海微生物在开发新产物方面的巨大潜力和广阔的应用前景。下面就近年来深海微生物方面的研究作一概述。

1.2.1 深海中的嗜压微生物

嗜压微生物 (Barophiles) 是指那些生存繁衍有赖于高静压力的独特细菌。多数生长在 0.7 ~ 0.8 MPa 的环境中, 高的达 1.04 MPa 以上, 低于 0.4 ~ 0.5 MPa 则不能生长。显然, 如果具有典型高压特征的深海即使不是其唯一的, 也必定是其主要的栖息场所。也正因为如此, 它们应当是适应于低温的一类微生物。近年来, 许多来自深海 2500 m ~ 11000 m 深的海底沉积物中的嗜压菌和耐压菌已得到了分离和鉴定^[3, 4, 5, 6], 大部分的菌株不仅是嗜压菌, 而且是嗜冷菌。此外, 有研究还认为嗜(耐)压菌在深海中大部分处于半休眠状态或生长极其缓慢的状态^[7, 8]。

目前所分离的嗜压细菌系统发育分析表明它们分属于五个属, 包括希瓦氏菌属 (*Shewanella* sp.)、发光杆菌属 (*Photobacterium* sp.)、科尔韦氏菌属 (*Colwellia* sp.)、莫里特拉菌属 (*Moritella* sp.) 和一个尚未明确的菌属 (CNPT3 类群)。而绝对嗜压菌只分布在三个菌属中: 包括希瓦氏菌属、科尔韦氏菌属和 CNPT3 类群。所有的嗜压细菌与浅水中的同属细菌都具有很高的同源性, 表明压力不是细菌进化中决定进化方向的因素。希瓦氏菌属的细菌在海洋和陆地中都有广泛的分布, 在目前所分离的嗜压菌中, 希瓦氏菌属占了很大部分, 并且来自不同的地方^[4, 9, 10, 11, 12, 13]。它们与菌株海底希瓦氏菌 (*Shewanella benthica*) 都具有很高的同源性, 表明海底希瓦氏菌是最常见的嗜压菌, 它的分布范围包括太平洋、大西洋和南极的海域。

嗜压菌的 DNA 中有一组能调节压力影响的基因。这些基因在高压下表达, 并通过它们减少其他一些蛋白的产出率, 减少膜的通道通性, 从而阻止体内的糖和其它营养成分扩散到体外。由于独特的适应性机制和理化特点, 嗜压微生物被广泛的应用于高压生物反应器以及耐压酶的研制。

1.2.2 深海中的嗜冷微生物

冷适应性微生物可分为嗜冷型 (Psychrophiles) 和耐冷型

(Psychrotrophies)。其中最宜生长在寒冷环境中的微生物叫做嗜冷微生物，专性嗜冷菌则是指在 0°C 附近也能生长，最适生长温度不高于 15°C，最高生长温度不超过 20°C 的微生物。而耐冷菌是一类可在 0~5°C 生长繁殖，其最高生长温度高于 20°C，低于 35°C，最适生长温度 15°C，低于 20°C 的微生物。以前只报道嗜冷细菌栖息于南北极地、冰川冻土地带，现在则查明其广泛分布于大洋深处 - 深海。由于深海最广阔的区域属于恒定的低温环境，90% 的海水的平均温度为 5°C 或者更低，因此为它们提供了最佳的生存环境。

嗜冷菌的分布受到环境温度的严格限制，而且数量稀少，即使在南北极常冷的环境中，嗜冷菌在所分离到的微生物中也只占很少部分。嗜冷菌具有广泛的微生物区系，已发现的嗜冷微生物包括细菌、放线菌、蓝细菌、酵母菌、真菌、藻类和嗜冷古细菌^[14, 15, 16]。嗜冷菌对温度的变化很敏感，当温度上升到室温时，这类微生物就会被杀死。目前认为嗜冷菌能够在其它微生物不能生存的低温下生长的主要原因有：(1) 嗜冷菌所含的酶在低温下能有效地催化生化反应，而对较高的温度非常敏感，在 30~40 °C 时很快失活；(2) 嗜冷菌在低温下主动转运过程仍能正常进行，有效地吸收所必需的营养物质，其细胞质膜中含有较多的不饱和脂肪酸，使其在低温下仍可保持膜的半流动性。嗜冷菌是低温保藏食品腐败的根源。

低温微生物的研究既可丰富生物多样性的研究内容，同时，其特殊基因及活性物质的研究与开发也是生物资源应用的重要方面。Kolene等^[17]在嗜冷 *P. putida* 中进行了嗜温性质粒介导的降解能力的转接和表达，该转移接合体在 0 °C 仍能降解甲苯甲酸盐；滨本已从深海分离到十多株嗜冷细菌，其中有数株能产生淀粉酶^[18]；有研究者从日本海沟深海沉积物中，先后分离到 14 株能产生抗生素样活性物质的嗜冷菌^[19]。显而易见，深海嗜冷微生物将是各种具有特异性能的酶和生物活性物质的丰富源泉，因此了解低温微生物的生理及分子机制，提取出有用的相关基因及产物，将会在基础研究和开发利用如低

温生物合成、医药品加工、食品处理和低温环境保护等方面带来益处。

1.2.3 深海中的嗜碱微生物

最适生长在pH8.0以上，通常在pH9-10之间的微生物，称为嗜碱菌（Alkaliphiles），而能在高pH条件下生长，但最适值并不在碱性pH范围的微生物称为耐碱菌（alkalitolerant）。专性嗜碱菌（obligate alkaliphiles）在pH中性或以下不能生长，而兼性嗜碱菌（facultive alkaliphiles）在中性或以下可以生长。在碱性和中性环境中都可以分离到嗜碱菌。

此类微生物自从1928年Downie A. W发现第一个嗜碱菌 *Stueptococcus facialis* 以来，大量不同类型的嗜碱菌已从土壤、碱湖、碱性泉、甚至海洋中分离到。许多菌经过了表型（数值）分类、化学分类或系统发育学分析，其中G菌的大部分属于 *Proteobacteria* 的 *gamasubovision*；与 *Halomonas* 相近的可能有新属存在；另外有些与 *Pseudomonas* 相近，还有一些具有独特地位。由于极端环境的特殊性，环境中某一种极端因子常常与另一种或几种极端环境因子同时出现，故产生一些适应多方面极端环境的微生物，因此许多嗜碱菌也兼具嗜盐、嗜热、嗜冷等极端微生物的功能。例如，方金瑞^[19]等人从日本海沟水深6,500 m的泥样中先后分别分离到100多株嗜冷-嗜碱微生物，其中有20多株能分别产生蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶；还有5株在有上述三种酶的诱导物均存在时，能同时产生三种酶。它们所产生的酶，都具有耐受高pH（在pH = 10时，酶的活性最强），和在低温（0~10℃）条件下使酶活性特别强的独特性能。

嗜碱菌的价值已被广泛认识，它不仅在工业应用上具有特殊的优势和特点，还可作为研究生命原理的模式系统，如膜交换机制、蛋白质结构与功能等，并将加强我们对生物多样性的认识。嗜碱菌的碱性酶已经得到广泛应用，如蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶等。嗜碱菌的碱性酶不仅具有直接应用在高pH下稳定的特点。其结构与功能的研究对于中性酶的改造也有重要意义。

1.2.4 深海中的超高温微生物

超高温微生物(Hyperthermophiles)指的是生长的最适温度在80℃以上的微生物总称。现已查明,除了个别的例外,这类微生物的大多数属于古细菌属,是现存的生物当中最接近原始生命体的生物。它们栖息于自深海海底喷口的、处于适度还原状态的热水中,被认为相当真实地反映了原始地球的环境。因此,研究深海热水环境中栖息的超高温微生物,是解开地球生命诞生之谜的一个捷径;另一方面,超高温微生物也是各种超高温酶类的来源^[20],因此吸引着许多海洋微生物学家投身与此研究。

已有的研究成果表明,能适应海洋环境的超高温微生物多种多样,其中大多数是古细菌属中的有代表性的菌株,仅少数归类于甲烷球菌或其它细菌属,例如*Pyrodictium*和*Methanopyrus*属菌株最高的生长温度已达110℃,最适生长温度也在100℃附近,低于82℃则不能生长,但并不死亡,即使在常温下还能存活数年。其中前者利用氢分子还原硫获得能量,而后者是严格的化能无机自养的产甲烷细菌。

对于嗜热菌的嗜热机制仍无统一的说法,但目前从分子水平的研究结果来看有4种可能:类质的敏感作用;重要代谢物的迅速再合成;大分子的热稳定性;蛋白质合成系统的热稳定性^[21]。深海中的超高温菌的发现,表明生命能适应的温度上限仍然不能确定。既然在温度超过100℃时,生物分子的稳定性会急剧的下降,那么微生物生命的最高生长温度可能处于110~150℃之间的某一处,在这里对热敏感的生物分子的破坏和再合成处于某种的平衡。显然,如何去分离和培养这样的微生物,是对现代微生物学家的一个挑战。

1.2.5 深海中的其它微生物

深海有着高度的自净能力,而这种自净能力应主要归功于深海微生物的分解活动。基于此设想,近年来人们已把过去探索陆地土壤分离石油分解细菌的目光转向了深海海底。结果发现:(1)与陆地土壤相比,从深海海泥分

离到耐有机溶媒的微生物的机率要高出100倍以上；(2)以往从陆地土壤中，最好情况下只分离到能耐甲苯的微生物，这种微生物在溶媒毒性更大的苯里则不能生存；现在从深海海泥里已分离到许多耐苯的微生物，可以应用于重油的分解，也可以用于有机溶媒存在的条件下，使水中不溶或难溶性物质转化为水可溶性物质。

来自深海的海洋黄杆菌菌株有很强的分解石油的能力，基本上能将重油中正烷烃分解掉，但对芳香烃还缺乏分解能力。该菌在生长时能在菌体外产生大量的类似于界面活性剂的物质，此物质不溶于水，对热和碱稳定，能使重油的油滴分散，使油滴的直径变小，进而转化为可溶性的。已查明这种活性与一种糖和蛋白质的复合体相关，二价的金属离子能提高其活性，高浓度的盐存在并不影响其活性，因此能适用于海上原油污染的清除^[22, 23]。目前，人们正致力于筛选分解能力更强的菌株，同时利用生物技术，改良或培育新的菌株，以便更好的应用于治理我们日益被污染的生存环境。

尽管目前关于深海微生物的研究成果相对于庞大的深海微生物生态系统而言仅仅是冰山一角，但这方面的研究已确凿的告诉我们，深海中生存繁衍着很多未知的特殊的微生物，研究、开发和利用它们已是现代海洋生物技术的一个重要领域。深海极端微生物的发现大大拓展了生命生存的疆域，为更好地认识生命现象、发展生物技术提供了新的机会，是微生物学科发展的新生长点。现今，极端微生物已成为国际研究的热门领域，日本、美国、欧洲等国都启动了极端微生物的研究计划，在揭示极端生命形式的奥秘并利用其特殊机制与特殊产物方面的努力和竞争，已形成国际趋势。

1.3 深海微生物多样性的研究进展

微生物的物种资源极其丰富，就其种类和数量而言是地球上仅次于昆虫的第二大类群的生物。微生物多样性的研究是整个生物多样性研究的重要组成部分。通常情况下，生物多样性可以理解为生物物种的多样化及其变异的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库