

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 200720061152162

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

白令海北部浮游细菌及表层沉积物细菌  
的系统发育多样性分析

Pylogenetic analysis of bacterioplankton and bacteria  
in surface sediments from the Northern Bering Sea

邹扬

指导教师姓名: 郑天凌 教授

曾胤新 研究员

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2009年4月日

论文答辩日期: 2009年 月 日

学位授予日期: 年 月 日

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2009年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(郑天凌及曾胤新)课题(组)的研究成果,获得(1、国家自然科学基金(项目编号 40676002); 2、国家科技部国家自然科技资源平台建设项目(项目编号 2005DKA21209); 3、国家创新群体研究计划(项目编号 40521003))课题经费的资助,在(郑天凌)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要.....	1
Abstract.....	3
1 前 言.....	5
1.1 海洋微生物及其多样性.....	5
1.1.1 海洋微生物及其生态功能.....	5
1.1.2 海洋微生物的多样性及其研究意义.....	6
1.2 海洋细菌多样性的分析方法.....	7
1.2.1 传统分离培养方法.....	7
1.2.2 现代分子生态学方法.....	7
1.3 白令海细菌多样性研究.....	13
1.3.1 白令海概况.....	13
1.3.2 白令海及其它极地海域的细菌多样性研究进展.....	13
1.4 本论文的研究思路和意义.....	16
2 材料与amp;方法.....	18
2.1 材料.....	18
2.1.1 采样点概况与样品采集.....	18
2.1.2 菌株和质粒.....	22
2.1.3 滤膜.....	22
2.1.4 主要试剂.....	22
2.1.5 工具酶.....	22
2.1.6 引物.....	22
2.1.7 主要仪器.....	23
2.1.8 培养基.....	23
2.1.9 溶液配制.....	24

2.1.10 分析软件.....	26
<b>2.2 基本方法 .....</b>	<b>27</b>
2.2.1 白令海北部底、表层水体浮游细菌的群落结构与多样性分析.....	27
2.2.1.1 样品的采集与前处理.....	27
2.2.1.2 水样细菌基因组总 DNA 的提取.....	27
2.2.1.3 16S rDNA 片段的 PCR 扩增.....	28
2.2.1.4 16SrDNA-V3 区的 PCR 扩增.....	29
2.2.1.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)及细菌多样性分析.....	29
2.2.2 沉积物细菌的群落结构与多样性分析.....	33
2.2.2.1 沉积物细菌基因组总 DNA 的提取.....	33
2.2.2.2 16S rDNA 片段的 PCR 扩增.....	33
2.2.2.3 16S rDNA-V3 区的 PCR 扩增.....	33
2.2.2.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)及细菌多样性分析.....	33
2.2.2.5 细菌 16S rDNA 文库的构建.....	33
<b>3 结果与分析.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 白令海北部底、表层水体浮游细菌的多样性研究.....</b>	<b>35</b>
3.1.1 底、表层浮游细菌基因组总 DNA 的提取.....	35
3.1.2 底、表层浮游细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增.....	35
3.1.3 基于 DGGE 图谱的底、表层浮游细菌多样性的比较分析.....	36
3.1.4 底、表层浮游细菌优势种群的分子鉴定与系统发育分析.....	42
<b>3.2 白令海北部表层沉积物细菌的多样性研究.....</b>	<b>46</b>
3.2.1 表层沉积物细菌基因组总 DNA 的提取.....	46
3.2.2 表层沉积物细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增.....	46
3.2.3 基于 DGGE 图谱的表层沉积物细菌多样性分析.....	47
3.2.4 基于 16S rDNA 文库的表层沉积物细菌多样性分析.....	56
<b>4 讨论.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1 白令海北部底、表层水体浮游细菌的多样性分析.....</b>	<b>72</b>

4.1.1 底、表层水体浮游细菌的系统发育多样性分析.....	72
4.1.2 底、表层水体浮游细菌的优势菌群分析.....	74
<b>4.2 白令海北部表层沉积物细菌的多样性分析 .....</b>	<b>75</b>
4.2.1 沉积物细菌的系统发育多样性分析.....	75
4.2.2 沉积物细菌的优势类群分析.....	76
<b>4.3 关于分子生物学技术在本次研究应用过程中的若干问题 .....</b>	<b>78</b>
4.3.1 剪膜法与洗膜法对 DNA 提取效果的影响.....	78
4.3.2 直接 PCR 与巢式 PCR 对 DGGE 的影响 .....	79
4.3.3 采用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术与 16S rDNA 克隆文库对细菌多样性研究结果的比较.....	80
<b>5 结论与展望 .....</b>	<b>82</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>85</b>
<b>附 录.....</b>	<b>93</b>
附录一：攻硕期间参与的课题 .....	93
附录二：载体图谱 .....	93
附录三：DNA 分子量标准.....	94
附录四：缩略语对照表 .....	95
附录五：发表的文章及获奖情况 .....	95
<b>致 谢.....</b>	<b>96</b>

## Contents

<b>Abstract(in Chinese)</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract(in English)</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Microbes and their diversity in marine environment</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 Microbes e and their ecological functions in marin environment.....	5
1.1.2 Microbial diversity in marine environment and its significances .....	6
<b>1.2 The method for microbial diversity analysis in marine environment</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Traditional cultivatable methods.....	7
1.2.2 Uncultivable molecular methods .....	7
<b>1.3 Baterial diversity in the Bering Sea</b> .....	<b>13</b>
1.3.1 Survey of the Bering Sea .....	13
1.3.2 Bacterial diversity in the Bering Sea and other polar oceans .....	13
<b>1.4 Purpose and significance</b> .....	<b>15</b>
<b>2 Materials and methods</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Materials</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 Sample collection.....	17
2.1.2 Strains and plasmids .....	21
2.1.3 Filter membranes .....	21
2.1.4 Reagents.....	21
2.1.5 Restrictive endonucleases and other enzymes .....	21
2.1.6 Primers .....	21
2.1.7 Instruments.....	22
2.1.8 Culture media.....	22
2.1.9 Solutions .....	23
2.1.10 Softwares.....	25



<b>2.2 Methods.....</b>	<b>26</b>
2.2.1 Analysis of community structure and diversity of bacteria in seawater ...	26
2.2.1.1 Sample treatment .....	26
2.2.1.2 Extraction of nucleic acid from environment .....	26
2.2.1.3 PCR amplification of 16S rDNA sequence .....	27
2.2.1.4 PCR amplification of 16SrDNA-V3 fragment .....	28
2.2.1.5 DGGE fingerprint analysis of bacterial diversity .....	28
2.2.2 Analysis of community structure and diversity of bacteria in sediment....	30
2.2.2.1 Extraction of nucleic acid from environment .....	33
2.2.2.2 PCR amplification of 16S rDNA sequence .....	33
2.2.2.3 PCR amplification of 16SrDNA-V3 fragment .....	33
2.2.2.4 DGGE fingerprint analysis of bacterial diversity .....	33
2.2.2.5 16S rDNA library construction.....	33
<b>3 Results and analysis.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Bacterial diversity in bottom and surface water of the Nothern Bering Sea.....</b>	<b>35</b>
3.1.1 DNA extraction of bacteria in seawater.....	35
3.1.2 PCR amplification of 16S rDNA sequence .....	35
3.1.3 Comparative analysis of bacterial diversity in in bottom and surface water based on DGGE fingerprinting .....	36
3.1.4 Phylogenetic diversity of dominant bacterial population .....	42
<b>3.2 Bacterial diversity in surface sediment of the Nothern Bering Sea.....</b>	<b>46</b>
3.2.1 DNA extraction of bacteria in surface sediment.....	46
3.2.2 PCR amplification of 16S rDNA sequence .....	46
3.2.3 Diversity analysis of bacteria in surface sediment based on DGGE fingerprinting .....	47
3.2.4 Diversity analysis of bacteria in surface sediment based on 16S rDNA clone library .....	56

<b>4 Discussion .....</b>	<b>72</b>
<b>4.1 Phylogenetic diversity analysis of bacterioplankton in bottom and surface water of the Northern Bering Sea .....</b>	<b>72</b>
4.1.1 Phylogenetic diversity analysis of bacterioplankton in bottom and surface water .....	72
4.1.2 Analysis of dominant population of bacterioplankton.....	74
<b>4.2 Phylogenetic diversity analysis of bacteria in surface sediment of the Northern Bering Sea .....</b>	<b>75</b>
4.2.1 Phylogenetic diversity analysis of bacteria in surface sediment .....	75
4.2.2 Analysis of dominant population of bacteria in surface sediment.....	76
<b>4.3 Something attentive in the application of molecular methods.....</b>	<b>78</b>
4.3.1 Effect of cutting and rinsing filter membranes on DNA extraction.....	78
4.3.2 Effect of general PCR and nested PCR on DGGE .....	79
4.3.3 Comparison of bacterial diversity revealed by DGGE and 16S rDNA clone library .....	80
<b>5 Conclusions and prospect .....</b>	<b>82</b>
<b>References .....</b>	<b>85</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>93</b>
<b>Appendix 1: Research projects .....</b>	<b>93</b>
<b>Appendix 2: Vectors .....</b>	<b>93</b>
<b>Appendix 3: DNA markers .....</b>	<b>94</b>
<b>Appendix 4: Abbreviations .....</b>	<b>95</b>
<b>Appendix 5: List of papers .....</b>	<b>95</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>96</b>

## 摘 要

本研究结合变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 技术、克隆文库技术和限制酶切片段长度多态性 (RFLP) 等分子生物学手段, 首次对白令海北部底、表层水体以及表层沉积物中的细菌群落结构进行比较与分析, 并利用 Bandscan 及多样性指数对该区域浮游细菌及表层沉积物细菌的生物多样性进行评估, 取得了以下主要结果:

1. 通过 PCR-DGGE 分析, 发现白令海北部底、表层海水中的细菌生物多样性水平总体较高, 而且底层水体中细菌多样性指数及丰度明显高于表层水体; St. Lawrence 岛北部 7 个站位的表层和底层水样, 其丰度和多样性指数平均值低于南部区域; 采样深度大于 100m 的 3 个站位的底层水样, 其多样性指数随着深度的增加出现递增现象。获得的 36 条 DGGE 条带, 其序列除了有 2 条属于环境样品中的未知菌群以外, 涵盖了以 *Proteobacteria* 和 *Actinobacteria* 为主的 6 个门。其中, *gamma-Proteobacteria* 和 *alpha-Proteobacterium* 分别以 25.0% 和 22.2% 占据优势地位。另外还包括: *Actinobacteria* (16.7%), *Cyanobacteria* (11.1%), *delta-Proteobacteria* (5.6%), *beta-Proteobacteria* (2.8%), *Firmicutes* (5.6%), *Bacteroidetes* (2.8%) 和 *Verrucomicrobia* (2.8%)。其中 83.3% 的序列与 GenBank 数据库中未培养微生物的相似性很高, 说明白令海北部底、表层海水中, 蕴藏着丰富的未培养微生物资源。

2. 对该海域 19 个站位沉积物样品的 PCR-DGGE 分析表明, 白令海北部表层沉积物中的细菌多样性指数、均匀度指数以及丰度的平均值, 均明显高于底、表层水样的结果。在深度大于 100m 的几个站位中, DBSA 站位的多样性指数及均匀度指数均为最大, 而 DBSE 和 DBS1 站位的丰度值则在沉积物的 19 个站位中处于最高。获得的 37 条 DGGE 条带, 有 56.8% 属于 *Proteobacteria*, 其中 *delta-Proteobacteria* (32.4%) 与 *gamma-Proteobacteria* (18.9%) 占据优势地位。此外还有: *Bacteroidetes* (13.5%), *Actinobacteria* (8.1%), *Acidobacteria* (8.1%) 和 *Cyanobacteria* (2.7%)。另有 10.8% 的序列属于环境样品中的未知菌群。

3. 构建了 NEC5、DBSE 和 DBS1 三个站位表层沉积物细菌的 16S rDNA 文库, 发现其涵盖了包括 *Proteobacteria* 和 *Acidobacteria* 等在内的 10-13 个门。具体包括: *alpha-*, *beta-*, *gamma-*, *delta-* 和 *epsilon-Proteobacteria*, *Acidobacteria*,

*Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Nitrospirae*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Chlorobi bacterium*, *Gemmatimonadetes*, *Cyanobacterium*, *Fibrobacteres* 和 *Spirochaetes* 等。在表层沉积物中最丰富的微生物类群为 *Proteobacteria*, 约占所有克隆子的一半。其中 *delta-Proteobacteria* 在 3 个站位中均为优势类群, 其次是 *gamma-Proteobacteria* 和 *Acidobacteria*。所测序列与 GeneBank 中已知细菌序列的相似性在 84.1-99.8%, 其中 41% 的序列同源性  $\leq 95\%$ , 说明该海域沉积物环境中蕴藏着丰富的未知微生物资源。与白令海沉积物细菌具有较近亲缘关系的序列, 有 99.8% 都来自不可培养的细菌。

**关键词:** 白令海; PCR-DGGE; 16S rDNA 文库; 细菌多样性;

## Abstract

Biodiversity of bacteria in the bottom and surface water, as well as the bacteria in the top layer of sediments from the Northern Bering Sea, were studied by a combination of PCR-DGGE, RFLP and 16S rDNA analysis. Shannon-wiener's Index and software BandScan were used to evaluate the bacterial biodiversity. The main results were as follows:

1. DGGE analysis showed that the bacterial biodiversity of bottom and surface water in the Northern Bering Sea was quite abundant. The Shannon-wiener's Index value and richness of bacteria in the bottom water were higher than those in the surface water. 36 sequences fell into six bacterial groups, including *gamma-proteobacteria* (25.00%), *alpha-proteobacterium* (22.22%), *Actinobacteria* (16.67%), *Cyanobacteria* (11.11%), *delta-proteobacteria* (5.56%), *beta-proteobacteria* (2.78%), *Firmicutes* (5.56%), *Bacteroidetes* (2.78%) and *Verrucomicrobia* (2.78%), unidentified bacteria(5.56%). About 83.3% of the sequences had a high similarity with uncultured bacteria, suggesting that there are rich microbial resources in the Northern Bering Sea.

2. DGGE analysis showed that the Shannon-wiener's Index value, richness and evenness of bacteria in sediments were clearly higher than those in water. The top Shannon-wiener's Index value and evenness are appeared in DBSA(100m). DBSE(438m) and DBS1(2375m) showed the top richness. 37 sequences fell into six bacterial groups. 56.8% of them were *Proteobacteria*. Others were *Bacteroidetes* (13.51%), *Actinobacteria* (8.11%), *Acidobacteria* (8.11%), and *Cyanobacteria* (2.7%). *Delta-Proteobacteria* was dominant in sediments in this area. 10.81% of the sequences belonged to unidentified bacteria in environment.

3. 16S rDNA clone libraries of sediments from NEC5, DBSE and DBS1 indicated that bacterial community composition of the sediments had a high diversity. More than 400 clones from the 16S rDNA library fell into 10-13 bacterial groups, including *alpha-*, *beta-*, *gamma-*, *delta-* and *epsilon-Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Nitrospirae*, *Verrucomicrobia*,

*Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Chlorobi bacterium*, *Gemmatimonadetes*, *Cyanobacterium*, *Fibrobacteres* and *Spirochaetes*. 99.8% of the sequences had a high similarity to uncultured bacteria, and 41% of them showed less than 95% similarity to the sequences in GeneBank. *Delta-Proteobacteria* was dominant in all three 16S rDNA clone libraries, followed by *gamma-Proteobacteria* and *Acidobacteria*.

**Keywords:** Bering Sea; PCR-DGGE; 16S rDNA; bacterial diversity

## 1. 前 言

### 1.1 海洋微生物及其多样性

#### 1.1.1 海洋微生物及其生态功能

海洋中分布着数量庞大、种类繁多的微生物，它们包括了海洋中从原核到真核的不同类群的生物，如细菌、放线菌、真菌、部分藻类和病毒<sup>[1]</sup>。它们具有种类和群落结构、代谢类型、适应机制的多样性，在海洋生态系统的物质循环、能量流动、信息传递中有着极其重要的作用。

海洋微生物种类繁多,据统计有 100 万至 2 亿种,而且相对于陆地微生物而言,它们能够适应海洋特有的高盐、高压、低营养、低光照等极端条件<sup>[2]</sup>。广泛地分布于海洋中的原核生物是海洋微生物极重要的组成部分,其主要营浮游生活 (free-living) 或附着在其它大型海洋生物或颗粒物质上 (particle-attached), 它们在海洋表层和海洋沉积物中的数量都极为可观。海洋水体中原核生物的总数约为  $1 \times 10^{29}$  个, 在海洋沉积物表层 (0-10 cm) 栖息了大约  $1.7 \times 10^{28}$  个微生物<sup>[3]</sup>。

海洋微生物生物量比浮游植物大 2-3 倍, 占生命及非生命颗粒有机碳 (POM) 总量的 26-62%<sup>[4]</sup>, 并且能矿化大约一半海洋中光合作用固定下来的碳<sup>[3, 5]</sup>, 参与完成 C、N、P、Si 等生源要素的循环, 推动海洋有机物质的矿化过程, 对海洋生态系统中碳和能量的转换起着重要作用。Kirchman 等(1993)在亚北极太平洋 (oceanic subarctic Pacific) 水域对异养浮游细菌的研究结果表明, 在该水域, 异养浮游细菌构成了一个大型的碳源及氮源贮存库, 从而成为次北极太平洋水域生态系统动力学中一个重要的调控因素<sup>[6]</sup>。

1988 年美国科学家 Cole 发现细菌生产力在海洋真光层中相当重要, 其中细菌生产力相当初级生产力的 31%, 且 2/3 是在真光层中产生, 另外 1/3 是在无光层中产生<sup>[7]</sup>。海洋微生物可以作为海洋食物链中的有机物初级生产者, 成为浮游动物及底栖动物的食物来源。20 世纪 80 年代初, Azam 等人的研究揭示了海洋细菌可以直接被原生动物摄食, 而原生动物继续被个体更大的后生动物捕食<sup>[3, 5]</sup>。而且, 海洋微生物, 尤其是海洋中数量巨大的异养细菌不仅仅是无机元素再生的分解者, 也是海洋中有机颗粒的重要生产者。海洋环境中另外一种有机碳存在形式即 POC 在较低的粒径范围内不具有生物可利用性, 必须经过细菌的作用转化后才得以流动。细菌在利用溶解有机碳(DOC)的过程中实际上又提供了上层

营养级可利用的颗粒有机碳。这个过程被称之为微生物二次生产(bacterial secondary production)<sup>[8]</sup>。

海洋微生物还作为分解者，具有降解有机物质的能力，在海洋的生物地球化学循环中起着单一且简单的还原有机物质的作用。海洋细菌能将生物营养转化过程中遗失的颗粒有机物(POM)和可溶有机物(DOM)分解利用使其返回到再循环中。在贫养海区它可将86%的初级生产力返回<sup>[9]</sup>。

### 1.1.2 海洋微生物的多样性及其研究意义

微生物多样性是指生命体在遗传、种类和生态系统层次上的变化。它代表着微生物群落的稳定性，也反映环境生态机制对群落的影响。微生物多样性还可以定义为微生物生命的丰富性，通常以生物区系的变化和生物化学过程间的相互关系来反映。微生物多样性研究的内容基本上可以分为3个层次<sup>[10]</sup> (1) 微生物种类多样性的调查。如土壤微生物的分离、培养、鉴定、分类。(2) 微生物生态功能多样性的研究。可通过分析测定环境中的一些转化过程，如氮矿化速率、土壤氮固持率、硝化作用以及酶的活性等开展研究。(3) 遗传多样性，在酶水平和DNA水平定性、定量分析它们的多样性。

海洋约占地球表面积的71%，其区域环境复杂多变，高盐、高压、低温、低营养和无光照等特殊区域生态环境，使海洋微生物在物种、基因组成和生态功能上具有多样性。海洋微生物多样性是所有海洋微生物种类、种内遗传变异及其生存环境的总称，包括生活环境的多样性、生长繁殖速度的多样性、营养和代谢类型的多样性、生活方式的多样性、基因的多样性和微生物资源开发利用的多样性等<sup>[11, 12]</sup>。海洋微生物多样性的研究无论对于生态系统功能的完整理解，还是对于微生物资源的利用和开发都具有特殊重要的意义。

在海洋微生物多样性的研究中，微生物群落的种群多样性一直是海洋微生物生态学和环境学科研究的重点。近几年来，微生物群落结构成为研究的热点。首先，群落结构决定了生态功能的特性和强弱。其次，群落结构的高稳定性是实现生态功能的重要因素。再次，群落结构变化是标记环境变化的重要方面<sup>[13]</sup>。因此，通过对海洋环境微生物群落的种群结构和多样性进行解析并研究其动态变化，可以为优化群落结构、调节群落功能和发现新的重要微生物功能类群提供可靠的依据。



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库