

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720091152145

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于高通量测序技术的红树林湿地微生物群落及其对多环芳烃污染响应的研究

Analysis of Microbial Community and its Response to PAHs Contamination in Mangrove Sediment based on High-throughput Sequencing Technology

指导教师姓名: 田蕴 副教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2012年05月

论文答辩日期: 2012年06月

学位授予日期: 2012年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012年05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它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()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()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

目 录

摘 要.....	1
Abstract.....	3
1.前言.....	5
1.1 红树林湿地的多环芳烃(PAHs)污染状况.....	5
1.1.1 红树林湿地生态系统.....	5
1.1.2 红树林湿地生态系统面临的生态破坏.....	6
1.1.3 红树林湿地中 PAHs 的来源与分布.....	7
1.1.4 PAHs 的危害.....	10
1.2 红树林湿地沉积物中的微生物研究.....	12
1.2.1 红树林湿地沉积物中的微生物资源.....	12
1.2.2 红树林湿地微生物群落对 PAHs 的降解作用.....	14
1.2.3 红树林湿地微生物群落结构与功能的黑匣子.....	16
1.3 红树林湿地中降解 PAHs 的微生物群落结构与功能的研究方法.....	17
1.3.1 新一代测序技术.....	17
1.3.2 宏基因组学研究.....	18
1.3.3 宏转录组学研究.....	22
1.4 研究内容与意义.....	23
2.材料与amp;方法.....	26
2.1 材料.....	26
2.1.1 研究区域与采样站位的选择.....	26
2.1.2 菌株与质粒.....	28
2.1.3 主要试剂.....	28
2.1.4 PCR 引物.....	28
2.1.5 主要培养基.....	29
2.1.6 分析软件.....	30
2.1.7 主要仪器.....	30
2.2 基本方法.....	31

2.2.1 红树林原位沉积物理化参数测定	31
2.2.2 红树林原位沉积物中 PAHs 含量的测定	34
2.2.3 红树林湿地沉积物中微生物的群落结构与功能分析	37
2.2.4 红树林湿地沉积物微宇宙实验体系 (Microcosm) 的构建	44
2.2.5 PAHs 压力下 microcosm 体系中理化参数的测定	45
2.2.6 沉积物中 PAHs 降解率的测定	45
2.2.7 基于 454 高通量测序技术的 PAHs 污染压力下微生物的群落结构分析	46
3.结果与分析	47
3.1 红树林原位沉积物环境理化参数	47
3.2 红树林原位沉积物中 PAHs 的含量	47
3.3 红树林原位沉积物中的微生物群落结构分析	49
3.3.1 基于 Illumina 测序技术的红树林湿地沉积物宏基因组文库分析	49
3.3.2 基于 RNA 水平的微生物群落结构分析	59
3.3.3 Illumina 宏基因组文库、16S rRNA 基因文库、16S rRNA cDNA 文库比较分析	67
3.4 红树林湿地沉积物微宇宙体系 Microcosm 的构建	69
3.5 PAHs 压力下 microcosm 体系的理化参数	70
3.5.1 沉积物的温度、pH 值、盐度、含水量	70
3.5.2 电子传递系统活性 (ETSA) 测定	73
3.5.3 沉积物中总磷 (TP)、总碳 (TC)、总氮 (TN)、总硫 (TS) 的含量	74
3.6 Microcosm 体系中 PAHs 的降解	77
3.6.1 沉积物中微生物群落对菲的降解	78
3.6.2 沉积物中微生物群落对芘的降解	79
3.6.3 沉积物中微生物群落对苯并(a)芘的降解	80
3.7 沉积物各理化参数与 ETSA 值及 PAHs 降解率的相关性分析	82
3.8 基于 454 测序技术研究 PAHs 压力下沉积物中微生物的群落结构	89
3.8.1 PAHs 压力下沉积物中微生物群落多样性	89
3.8.2 PAHs 压力下沉积物中微生物的群落结构	93

4.讨论.....	101
4.1 Illumina 宏基因组文库、16S rRNA 基因文库、16S rRNA cDNA 文库比较分析.....	101
4.2 红树林湿地沉积物微生物群落对 PAHs 的降解.....	105
4.3 沉积物各理化参数与 ETSA 值及 PAHs 降解率的相关性分析.....	106
4.4 红树林湿地沉积物中微生物群落对 PAHs 污染的响应.....	107
5.结论与展望	110
5.1 结论.....	110
5.2 主要创新点.....	112
5.3 展望.....	112
参考文献	114
附 录.....	123
附录一 攻硕期间参与的课题.....	123
附录二 已发表及待发表文章.....	123
致 谢.....	124

Contents

Abstract(in Chinese)	1
Abstract(in English)	3
1.Introduction	5
1.1 Pollution status of PAHs in mangrove swamp	5
1.1.1 Mangrove swamp ecosystem	5
1.1.2 The ecological damage in mangrove swamp.....	6
1.1.3 The source and distribution of PAHs in mangrove sediment.....	7
1.1.4 The harm of PAHs	10
1.2 Study on microbes in mangrove swamp	12
1.2.1 Microbial resource in mangrove sediment	12
1.2.2 Microbial degradation of PAHs in mangrove sediment	14
1.2.3 The black box of microbial community structure and function	16
1.3 The methodology of PAHs-degrading microbial community structure and function	17
1.3.1 The next-generation sequencing technology	17
1.3.2 Metagenomics research	18
1.3.3 metatranscriptomics research	22
1.4 Contents and significance of this study	23
2. Materials and Methods	26
2.1 Materials	26
2.1.1 Study area and sampling staiton	26
2.1.2 Strains and plasmids	28
2.1.3 Reagents.....	28
2.1.4 Primers.....	28
2.1.5 Media	29
2.1.6 Main software	30
2.1.7 Equipments	30

2.2 Methods	31
2.2.1 Measurement of physicochemical parameters in in-situ sediment.....	31
2.2.2 PAHs concentration in in-situ sediment.....	34
2.2.3 Analysis of microbial community structure and function in mangrove sediment.....	37
2.2.4 Construction of simulate mangrove sediment experiment system (Microcosm).....	44
2.2.5 Measurement of physicochemical parameters in microcosm under the pressure of PAHs.....	45
2.2.6 Analysis of PAHs degradation.....	45
2.2.7 Analysis of microbial community structure in sediment under the PAHs based on 454 high-throughput sequencing technology.....	46
3. Results and Analysis	47
3.1 Physicochemical parameters of in-situ mangrove sediment	47
3.2 Concentration of PAHs in in-situ sediment	47
3.3 Analysis of microbial community structure in in-situ sediment	49
3.3.1 Analysis of metagenomic library based on Illumina sequencing technology.....	49
3.3.2 Analysis of microbial community structure on the level of RNA.....	59
3.3.3 Comparative analysis of Illumina metagenomic library,16S rRNA gene library and 16S rRNA cDNA library.....	67
3.4 Construction of microcosm	69
3.5 Measurement of physicochemical parameters in microcosm	70
3.5.1 Temperature, pH, salinity and water content in sediment.....	70
3.5.2 Detection of electronic transport system activity.....	73
3.5.3 The content of total phosphorus, total carbon, total nitrogen and total sulfur in sediment.....	74
3.6 PAHs degradation in microcosm	77
3.6.1 Degradation of phenanthrene.....	78
3.6.2 Degradation of pyrene.....	79
3.6.3 Degradation of benzo(a)pyrene.....	80

3.7 Correlation analysis among the parameters in sediment samples.....	82
3.8 Analysis of microbial community structure based on 454 high-throughput sequencing technology	89
3.8.1 Diversity of microbial community in sediment under the pressure of PAHs.....	89
3.8.2 The community structure in sediment under the pressure of PAHs.....	93
4.Discussion.....	101
4.1 Comparative analysis of Illumina metagenomic library, 16S rRNA gene library and 16S rRNA cDNA library	101
4.2 Microbial degradation of PAHs in mangrove sediment	105
4.3 Correlation analysis among the parameters in sediment samples.....	105
4.4 Microbial response to PAHs in mangrove sediment.....	107
5.Conclusions and prospect.....	110
5.1 Conclusions	110
5.2 Statement of novelty.....	112
5.3 Prospect.....	112
References	114
Appendix.....	123
Appendix 1 Projects	123
Appendix 2 Publications	123
Acknowledgement.....	124

摘要

多环芳烃 (PAHs) 是一类广泛存在于环境中的持久性有机污染物, 具有“三致” (致癌、致畸、致突变) 效应, 由其引起的红树林湿地生态系统污染受到了研究者的广泛关注。红树林湿地沉积物中含有许多具有降解 PAHs 功能的微生物群落, 对它们的研究逐渐成为焦点。本论文以福建漳江口红树林国家级自然保护区为研究区域, 以原位沉积物、由原位沉积物与 PAHs 构成的污染压力下红树林湿地沉积物微宇宙 microcosm 体系为研究对象, 采用 16S rRNA cDNA 文库构建技术、Illumina 高通量宏基因组测序技术、454 高通量测序技术以及生物信息分析等手段, 开展了红树林湿地原位沉积物中的微生物群落及其对 PAHs 污染响应的研究。主要的研究结果如下:

1) 对福建漳江口红树林国家自然保护区桐花树生境沉积物宏基因组进行 Illumina 高通量测序, 获得了 2G 数据信息, 经生物信息分析, 该宏基因组文库涵盖了包括细菌、古菌、真核生物、病毒在内的 29 个门的物种信息;

通过 KEGG、eggNOG 数据库对预测基因进行功能注释分别得到了 23 种、21 种基因功能类群。经分析发现了与氮代谢功能基因、硫代谢相关基因以及与 PAHs (萘、蒽、芴) 及其他外源有机污染物 (甲苯、乙苯、二乙苯、六氯化苯等) 降解相关的基因类群。

2) 基于 RNA 水平研究红树林沉积物中存活着的优势微生物群落结构, 其包括了 8 个门的序列信息, 占绝对优势的 Proteobacteria 中, 10.98% 归属于 α -proteobacteria 类群, 8.54% 归属于 β -proteobacteria 类群, 34.15% 归属于 γ -proteobacteria 类群, 21.95% 归属于 δ -proteobacteria 类群, 另外 7.32% 归属于 ε -proteobacteria 类群。

3) 采用气相色谱-质谱 (GC-MS) 技术, 对福建云霄红树林区桐花树生境沉积物中优先监控的多环芳烃 (PAHs) 进行检测, 结果显示: 检测到沉积物中含有 13 种 PAHs, 分别为萘、芴、菲、蒽、荧蒽、芘、苯并 (a) 蒽、屈、苯并 (b) 荧蒽、苯并 (k) 荧蒽、茚并 (1,2,3-c,d) 芘、二苯并 (a,h) 蒽、苯并 (g,h,i) 二萘嵌苯。其中含量最高的是荧蒽, 为 596.68ng/g 干重, 含量最低的是萘, 为 2.97ng/g

干重。原位沉积物中 PAHs 总含量为 1811.14 ng/g 干重。

4) 以天然的红树林湿地沉积物构建微宇宙 (microcosm) 实验体系, 分别添加菲、芘和苯并(a)芘作为污染压力, GC-MS 分析结果显示, 红树林湿地模拟体系 microcosm 中菲、芘、苯并(a)芘的起始含量分别为 3.27mg/g 干重、 3.25mg/g 干重、 0.41mg/g 干重; 经 16d 培养后, 沉积物中微生物群落对菲、芘的降解率分别为 34.79%、12.61%, 而苯并(a)芘几乎未被降解; 经 64d 培养后, 分别为 58.43%、57.95%和 40.56%, 培养 90d 后, 降解率分别为 76.15%、77.67%和 71.57%。

5) 采用 454 高通量测序技术对 Microcosm 中菲、芘和苯并(a)芘污染压力下的沉积物微生物群落进行研究发现, 不同污染压力下, 微生物群落在界、门、纲分类水平变化不明显, 而在目、科级别存在较大差异; 加入 PAHs 后, 有些菌群未检测到, 另外一些菌群出现可能参与 PAHs 的降解, 而在此变化过程中仍有一些菌群一直存在并在关键氮、硫循环中发挥作用。

关键词: 红树林湿地、微生物群落、多环芳烃污染、宏基因组学、高通量测序技术

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are one class of persistent organic pollutants, widely distributed in the environment. PAHs are considered hazardous because of their cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic effects. Mangrove ecosystems, which are important inter-tidal estuarine wetlands along the coastlines of tropical and subtropical regions, are exposed to anthropogenic contamination by PAHs from tidal water, river water and land-based sources. The fates of these compounds in the environment and the remediation of PAH-contaminated sites are, therefore, of high public interest. The sampling station was established in Yunxiao Mangrove National Nature Reserve, China. This study was performed in in-situ mangrove sediment and mangrove sediment microcosm contaminated with PAHs. Using the strategy of the library construction of 16S rRNA cDNA, Illumina and 454 high-throughput DNA sequencing techniques and biological information analysis, the microbial community and its response to PAHs contamination were studied. The main results were as follows:

1. The sampling station was established in sediment of *Aegiceras corniculatum* community, Zhangjiang Estuary Mangrove National Nature Reserve, China. The total DNA extracted from in-situ sediment was sequenced by the high-throughput Illumina sequencing system, about 2G data were obtained. Through biological information analysis, the metagenomic library contained 29 phylum including Bacteria, Archaea, Eukaryota and Viruses.

The results by comparison of KEGG, eggNOG showed that 23, 21 kinds of gene function group were got respectively. The analysis demonstrated some gene function groups resembled genes involved in nitrogen metabolism, sulfur metabolism and the degradation of PAHs (naphthalene, anthracene, fluorene) and other exogenous organic pollutants (toluene, ethylbenzene, diethylbenzene, hexachlorocyclohexane and so on).

2. The dominant and viable microbial community was studied on the base of the total RNA extracted from mangrove sediment. The results contained 8 phylums, the Proteobacteria were dominants, which contained α -Proteobacteria(10.98%), β -Proteobacteria(8.54%), γ -Proteobacteria (34.15%), δ -Proteobacteria(21.95%), ϵ -Proteobacteria(7.32%).

3. 16 kinds of priority pollutants were detected in sediment of *Aegiceras corniculatum* community by GC-MS. The results demonstrated that thereof 13 kinds including naphthalene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, indeno(1,2,3-c,d)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene were found. The concentration of fluoranthene was the highest, which was 596.68ng/g dry weight. The concentration of naphthalene was the lowest, which was 2.97ng/g dry weight. The total concentration of PAHs was 1811.14 ng/g dry weight.

5. The microcosm consisted of in-situ mangrove sediment and PAHs (phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene). The analysis results of GC-MS data showed that, the initial contents of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene were 3.27mg/g dry weight, 3.25mg/g dry weight, 0.41mg/g dry weight. After 16 days, the degradation rates of phenanthrene, pyrene were 34.79%, 12.61% respectively, benzo(a)pyrene were hardly degraded. After 64 days, the degradation rates of PAHs were 58.43%, 9.82%, 40.56% respectively. After 90 days, the degradation rates of PAHs were 76.15%, 77.67%, 71.57%.

6. The microbial communities in sedimen under the pressure of phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene were studied. The results showed that, apparent differences were not found on kingdom, phylum and class levels, but the differences on the order and family levels were significant. Some microfloras weren't detected, and some others which were likely involved in PAHs degradation appeared, in this process, some microfloras which played roles in the key nitrogen and sulfur cycles were always in there.

Keywords Mangrove swamp; Microbial community; PAHs pollution; Metagenome; High-throughput sequencing technology

1.前言

1.1 红树林湿地的多环芳烃(PAHs)污染状况

1.1.1 红树林湿地生态系统

红树林素有“海上森林”之美称，它是海滩上特有的森林类型^[1]。红树林是指热带海岸潮间带的木本植物群落。红树林中生长的木本植物叫红树植物，除长期生存于林下的蕨类外，一般都没有包括群落内外的草本植物或藤本植物。红树植物主要分布在泥质滩涂，也有的在泥沙滩。红树林主要生长在热带地区的隐蔽海岸，常在有海水渗透的河口、或泻湖或有泥沙覆盖的珊瑚礁上。由于长期受潮汐浸渍，故有人也将红树林称为海岸盐生沼泽植被。在黑色泥质土壤条件下，由于土壤通气不良和盐渍生境以及风浪的作用，红树植物有许多生理、形态适应特征，如支柱根、各种形式的呼吸根及许多胎生幼苗等。

红树林生存的物质基础首先是沉积物。红树林海岸的沉积物来源于河流从陆地带来的泥沙，海浪冲击海岸所剥蚀下来的陆源物质以及浪潮掀动浅海底再搬运来的物质。它们都是从红树林生态系统外搬运进来的，称为外源性沉积物。这些沉积物随海岸地貌、河流、波浪、潮汐性质不同在适合的地段沉积下来，成为红树植物定居的原始基质。经河流、海潮搬运、分选、堆积起来的沉积物，只有在生物因子作用下才能发育成土壤，作为主要的成土因子之一，红树林对土壤的形成和发育具有十分重要的作用^[2]。

红树林群落与其所在的生境相互联系相互作用构成了红树林生态系。红树林湿地生态系统处于海洋与陆地的动态交界面，周期性遭受海水浸淹的潮间带环境使其在结构和功能上具有既不同于陆地生态系统又不同于海洋生态系统的特性。红树林土壤兼有海洋和陆地的性质却又与二者不同，这种特殊的生境使红树林土壤具有独特的性质：(1)成土时间短，土壤在许多方面仍保留母质特性。红树林土壤处于边沉积边成土状态，成土时间短，呈糊烂状，无结构，很难划分层次，更无明显的发生层。(2)土壤呈还原状态，具沼泽化特征。由于海潮时常淹没，红树林土壤基本上处于还原状态，除表层几厘米呈黄棕色的氧化层外，整个土体

被水分饱和，土壤通气性差，还原性物质含量高具明显的沼泽化特征。(3)土壤含盐量高，具盐渍化特性。由于经常性受海水浸淹和红树林强烈的生物积盐作用，红树林土壤的含量较高，一般在 10‰以上，并明显高于无红树林的滩涂土壤。(4)土壤 pH 值低，呈较强的酸性。红树林的土壤 pH 普遍较低，表层 pH 值一般为 3.3~6.9，底层为 3.02~3.80。(5)土壤有机质含量较高。大多数在 2.5%以上，甚至高达 10%以上，平均为 4.48%，这主要由于土壤呈还原状态，有机质分解慢，易于累积，且红树林残体常被埋藏，一般根系多的层次，有机质含量相对较高。(6)土壤质地均匀，粘粒含量高。红树林土壤大多属壤土类和粘土类， $<0.01\text{ mm}$ 的物理粘粒含量一般在 30%~85%之间^[2]。

1.1.2 红树林湿地生态系统面临的生态破坏

红树林是一种珍贵的生物资源，在河口生态系中占有重要的地位，作为初级生产者这一重要环节，为林区动物、微生物提供食物和营养来源，也为鸟类、昆虫、鱼虾、藻菌提供栖息繁衍场所，并与其构成复杂的食物网关系。近年来随着沿海地带社会经济迅猛发展和人口、资源、环境压力的不断增大，位于河口海岸开发前沿地带的红树林受到生态破坏性开发活动的严重破坏，河口海岸资源可持续利用和环境健康面临极大的威胁。全球红树林呈现持续萎缩的趋势，覆盖红树林的海岸长度从 1980 年的 198,000 km 下降为 1990 年的 157,630 km，现仅余 146530 km。而我国海岸线最长、红树林分布面积最大的广东省，1956 年、1986 年和 90 年代初的红树林面积分别为 21273 km²、3526 km² 和 3813 km²，最大减少了近 85%^[3]。

目前，红树林湿地的污染主要集中在重金属、富营养化、油和有机化学物质污染等方面。其中多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类重要的持久性有机污染物(Persistent Organic Pollutants, POPs)，因其具有潜在的致癌、致畸和致突变毒性作用，引起学者的广泛关注^[4-6]。

1.1.3 红树林湿地中 PAHs 的来源与分布

1.1.3.1 PAHs 简介

PAHs 是指两个及两个以上苯环以稠环形式相连,以线状、角状或簇状排列的化合物。PAHs 按照芳环的连接方式可分为两类:第一类为稠环芳烃,即相邻的苯环至少有 2 个共用碳原子的 PAHs,其性质介于苯和烯烃之间,如萘、蒽、菲、苯并(a)芘等;第二类是苯环直接通过单键联合,或通过一个或几个碳原子连接的碳氢化合物,称为孤立 PAHs,如联苯、1,2-二苯基乙烷等。一般,把含有三个或三个以下苯环的 PAHs 称为低分子量 PAHs,如萘、菲;含有四个及四个以上苯环的 PAHs 称为高分子量 PAHs,如芘、苯并(a)芘。PAHs 是目前环境中普遍存在的污染物质,美国环保局在 80 年代初把 16 种未带分支的 PAHs 确定为环境中的优先监测污染物(图 1.1),我国也把 PAHs 列入环境污染的黑名单中。

PAHs 性质稳定,且随着苯环数量的增加,分子间极性降低,其水溶性降低而脂溶性增大,熔点、沸点随之升高。对生物降解、光解、化学分解有较强的抵抗作用,难以降解。

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫