

学校编码: 10384

密级\_\_\_\_\_

学号: 22320121151322

廈門大學

硕士学位论文

珠江口至南海海盆环境梯度上亚硝酸盐氧化功能细菌群落的研究

Researching on nitrite-oxidizing bacteria communities from  
the Pearl River estuary to the South China Sea basin

侯蕾

指导教师姓名: 张瑶教授

专业名称: 海洋生物

论文提交日期: 2015年8月

论文答辩时间: 2015年8月

2015年8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( )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

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言.....	1
1.1 海洋生物地球化学循环概述.....	1
1.2 海洋碳-氮循环概述.....	2
1.3 海洋氮循环概述与热点.....	3
1.3.1 海洋氮循环概述.....	3
1.3.2 海洋氮循环热点研究内容.....	5
1.4 硝化作用关键过程之亚硝酸盐氧化作用.....	14
1.5 本论文设计与研究意义.....	18
第二章 珠江口至南海海盆环境梯度上亚硝酸盐氧化功能细菌群落的研究.....	20
2.1 研究背景.....	20
2.2 材料与方法.....	21
2.2.1 采样站位与方法.....	21
2.2.2 环境因子参数测定.....	22
2.2.3 环境样品 DNA 提取.....	23
2.2.4 NOB 菌株培养与菌株基因组 DNA 提取.....	25
2.2.5 引物设计与条件摸索等 PCR 分析.....	28
2.2.6 多样性与系统发育分析.....	31
2.2.7 群落结构聚类分析.....	32
2.2.8 群落结构与环境因子相关性分析.....	32
2.2.9 <i>Nitrospira-nxrB</i> 和 <i>Nitrospina-nxrB</i> 的 QPCR 分析.....	33
2.2.10 本研究使用设备与数据分析软件.....	36
2.3 结果.....	37
2.3.1 珠江口至南海海盆环境特征概况.....	37

2.3.2 多样性分析 .....	39
2.3.3 系统发育分析 .....	43
2.3.4 群落结构聚类分析 .....	49
2.3.5 环境因子与群落结构相关性分析 .....	51
2.3.6 基因丰度在环境梯度上的特征变化 .....	53
2.4 讨论 .....	57
2.4.1 珠江口至南海海盆 NOB 群落组成 .....	57
2.4.2 亚硝酸盐氧化作用主要贡献者随环境梯度变化 .....	59
2.4.3 NOB 功能群在珠江口底层和南海弱光层更有利于亚硝酸盐氧化的发生 .....	61
2.4.4 不同 NOB 类群在颗粒物或浮游环境中对硝化作用的贡献 .....	62
2.4.5 关键环境因子 .....	64
<b>第三章 海洋异养细菌分离鉴定 .....</b>	<b>67</b>
3.1 研究背景 .....	67
3.2 材料与方法 .....	68
3.2.1 菌株分离与培养 .....	68
3.2.2 菌株形态、生态、生理和生化实验 .....	68
3.2.3 化学分类和基因组 DNA G+C 含量 .....	70
3.2.4 16S rRNA 系统发育分析 .....	73
3.3 结果与讨论 .....	74
3.3.1 菌落表型, 形态, 生理, 生化特性 .....	74
3.3.2 化学分类特征和基因组 DNA G+C 含量 .....	74
3.3.3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析 .....	75
3.3.4 菌株 JL1095 <sup>T</sup> 与系统发育相近种对比分析 .....	77
3.4 新属种描述 .....	79
3.4.1 新属描述 .....	79
3.4.2 新种描述 .....	79
<b>第四章 结论、创新点、不足与展望 .....</b>	<b>81</b>
4.1 重要结论 .....	81
4.2 创新点 .....	82

4.3 不足与展望.....	83
参考文献.....	85
附录.....	98
攻读硕士学位期间完成的论文.....	101
致谢.....	101

厦门大学博硕士论文摘要库

## Contents

Abstract (In Chinese) .....	I
Abstract (In English) .....	III
Chapter 1 Introduction .....	1
1.1 Overview of marine biogeochemical cycles .....	1
1.2 Overview of marine carbon and nitrogen cycles.....	2
1.3 Overview and research hotspots of marine nitrogen cycle .....	3
1.3.1 Overview of marine nitrogen cycle .....	3
1.3.2 Research hotspots of marine nitrogen cycle.....	5
1.4 Nitrite oxidizing process .....	14
1.5 Design of this thesis and research significance.....	18
Chapter 2 Researching on nitrite-oxidizing bacteria communities from the Pearl River estuaries to the South China Sea basin environmental gradient .....	20
2.1 Backgrounds.....	20
2.2 Materials and methods .....	21
2.2.1 Sampling stations.....	21
2.2.2 Environmental factor determination.....	22
2.2.3 DNA extraction for environmental samples .....	23
2.2.4 NOB cultivation and DNA extraction for NOB .....	25
2.2.5 Primer design and condition exploration.....	28
2.2.6 Diversity and phylogenetic analysis .....	31
2.2.7 Nonmetric multidimensional scaling analysis.....	32
2.2.8 Statistical analysis of community structure and environmental factors .....	32
2.2.9 QPCR analysis of <i>Nitrospira-nxrB</i> and <i>Nitrospina-nxrB</i> .....	33
2.2.10 Equipment and data analysis software.....	36
2.3 Results .....	37

2.3.1 From the Pearl River Estuary to the South China Sea basin environment characteristics .....	37
2.3.2 Diversity analysis .....	39
2.3.3 Phylogenetic analysis .....	43
2.3.4 Nonmetric multidimensional scaling analysis.....	49
2.3.5 Statistical analysis.....	51
2.3.6 Gene abundance in the environment gradient .....	53
2.4 Discussion .....	57
2.4.1 NOB community structure from PRE to the SCS basin.....	57
2.4.2 NOB changed with environmental gradient .....	59
2.4.3 NOB is more advantageous to the nitrite oxidation in the bottom of PRE and in the weak light layer of the SCS .....	61
2.4.4 Different NOB groups contribute Partical-attached and free-living environment .....	62
2.4.5 Key environmental factors.....	64
<b>Chapter 3 Isolation and identification of marine heterotrophic bacteria...</b>	<b>67</b>
3.1 Backgrounds.....	67
3.2 Materials and methods .....	68
3.2.1 Bacterial Resource and Cultivation .....	68
3.2.2 Morphological, Ecological, Physiological, and Biochemical Tests .....	68
3.2.3 Chemotaxonomy and Genomic DNA G+C Content .....	70
3.2.4 Phylogenetic Analysis Based on 16S rRNA Sequence .....	73
3.3 Results and discussion.....	74
3.3.1 Phenotypic, Morphological, Physiological, and Biochemical Characteristics .....	74
3.3.2 Chemotaxonomic Characteristics and Genomic DNA G+C Content .....	74
3.3.3 Phylogenetic Analysis Based on 16S rRNA Sequence .....	75
3.3.4 Comparison Between Strain JL1095T and Phylogenetically Closely Related Species .....	77
3.4 Description .....	79
3.4.1 Description of <i>Acuticoccus</i> gen. nov.....	79



3.4.2 Description of <i>Acuticoccus yangtzensis</i> sp. nov .....	79
Chapter 4 Conclusion, innovation, deficiencies and prospects .....	81
4.1 Conclusions .....	81
4.2 Innovation.....	82
4.3 Deficiencies and prospects .....	83
Reference.....	85
Supplementary materials .....	98
Lists of manuscripts.....	101
Acknowledgements .....	101

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

氮元素的生物地球化学循环几乎完全依赖于海洋生态系统中丰富的微生物调节。硝化作用（包括氨氧化过程和亚硝酸盐氧化过程）就是一个由微生物所介导的氧化反应，分别由氨氧化细菌、古菌（ammonia-oxidizing bacteria, AOB; ammonia-oxidizing archaea, AOA）和亚硝酸盐氧化细菌（nitrite-oxidizing bacteria, NOB）介导。长期以来氨氧化作用一直被视为硝化作用的限速步骤，因此，亚硝酸盐氧化过程一直被人们所忽略。直到最近，在对纳米比亚氧最小层、北太平洋热带东部地区上层水体与氧最小层研究时均发现亚硝酸盐氧化率可能比氨氧化率高，且 2 步氧化反应并没有必然的耦合关系。

因此，对亚硝酸盐氧化过程的研究是必要的，本论文通过分子生物学技术，选择 NOB 类群保守亚基亚硝酸盐氧化还原酶（nitrite oxidoreductase, NXR）基因（*nxr*）作为 Genemarker，首次开展珠江口至南海海盆环境梯度上亚硝酸盐氧化功能群落的研究。在珠江口分颗粒物附着群落（ $>3 \mu\text{m}$ ）和浮游群落（ $0.2-3 \mu\text{m}$ ）分析，在南海为总群落（ $>0.2 \mu\text{m}$ ）分析。从背景环境参数中不难发现，亚硝酸盐浓度在整个研究区域都非常低，且经常检测不到；而硝酸盐浓度相对要高出许多。这种现象一定程度上暗示了 NOB 功能群在发挥作用。由此初步分析，我们集中于目前自然环境中可以检测到的 4 个 NOB 类群进行分析，通过设计或优化针对 4 个类群的 *nxr* 基因的引物，构建克隆文库，稀释曲线和多样性分析显示 *Nitrospira* 为河口内主导类群；*Nitrospina* 从珠江口到南海都有分布，且明显看到底层环境多样性高于表层；*Nitrobacter* 仅在珠江口靠近河口内 2 个站位的底层样品中有分布，而 *Nitrococcus* 则完全检测不到。序列的系统发育分析发现，*Nitrospira* 多来自污水环境，且在珠江口存在一独有的 *Nitrospira* 类群分布在多个站位，猜测其在珠江口发挥着重要作用；而 *Nitrospina* 序列系统发育分析揭示了南海海盆 SEATS 站的 *Nitrospina* 形成单独进化枝，说明在整个南海环境存在不同种的 *Nitrospina* 分别适合于珠江口和海盆 2 种不同的环境。将 *Nitrospira* 和 *Nitrospina* 2 个主要类群进行 qPCR 定量分析，珠江口 *Nitrospira-nxrB* 基因丰度显著高于 *Nitrospina-nxrB* 基因丰度，然而在南海海盆，*Nitrospira-nxrB* 基因却低于检测线；而 *Nitrospina-nxrB* 基因丰度从陆架到海盆有明显上升趋势，说明从珠江口至南海海盆环境梯度上存在显著 NOB 群落结构演替，分别贡献于河口与海盆

环境的亚硝酸盐氧化；在垂直深度梯度上，弱光层有着更丰富的基因分布，潜在贡献于亚硝酸盐氧化作用。

本研究首次在珠江口进行颗粒物吸附与浮游环境的 NOB 类群的比较分析，研究表明颗粒物吸附的 *Nitrospira-nxrB* 基因丰度显著高于浮游的基因丰度，而 *Nitrospina-nxrB* 基因则恰恰相反，在浮游环境中更有利于其存在，由此推测，*Nitrospina* 是广泛适应于大洋环境的 NOB 类群。此外，本研究还发现珠江口 *Nitrospira-nxrB* 基因丰度与溶解氧（Dissolved Oxygen, DO）浓度有显著负相关关系，与亚硝酸盐浓度则有显著正相关关系。综上，*Nitrospira* 和 *Nitrospina* 是南海主要的亚硝酸盐氧化类群，且从河口至海盆环境梯度上存在演替，*Nitrospira* 是珠江口 NOB 群落的优势类群，高悬浮颗粒物、低 DO 浓度和高亚硝酸盐浓度环境更利于其分布；而 *Nitrospina* 在珠江口也存在，但在海盆区更有优势，尤其是在海盆区的弱光层区域，发挥着潜在的重要作用。

另外，利用长江口航次，在其表层水水样中分离得到 1 株新菌 JL1095<sup>T</sup>，命名为 *Acuticoccus yangtzensis*。对其形态结构、细菌叶绿素、细胞脂肪酸、呼吸醌、极性脂、G+C 含量、单碳源利用和酶活性等生理生化特征进行了检测，并分析其系统发育等方面特征。

关键词：亚硝酸盐氧化；*NxrB* 基因；多样性；丰度；珠江口；南海海盆

## Abstract

The biogeochemical nitrogen cycle is almost totally dependent on regulation by abundant microorganisms in marine systems. Nitrification (ammonia oxidation and nitrite oxidation) is carried out by specific groups of prokaryotes: ammonia is firstly oxidized to nitrite by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA), and subsequently to nitrate by nitrite-oxidizing bacteria (NOB). Ammonia oxidation is typically assumed to be the rate-limiting step in nitrification, and thus its rate is usually given as the overall nitrification rate, meaning that the contribution of nitrite oxidation is ignored. Recent studies on the Namibian oxygen minimum zone and the upper water column and oxygen minimum zone of the eastern tropical North Pacific (ETNP) Ocean have shown that the nitrite oxidation rate may be higher than the ammonia oxidation rate. Thus, the two steps of nitrification are not necessarily coupled.

In this paper, we used *nxr* gene as a Genemarker for researching on NOB communities from the Pearl River estuaries to the South China Sea basin. Our research focused on particle-attached ( $>3\ \mu\text{m}$ ) and free-living ( $0.2\text{-}3\ \mu\text{m}$ ) microbial communities in the Pearl River estuary, and total ( $>0.2\ \mu\text{m}$ ) microbial communities in the South China Sea basin. Nitrite concentration was very low in all samples, and often could not be detected; nitrate concentration was much higher. This implied the presence of functional groups of NOB in the research area. Based on this preliminary result, we examined our samples on the diversity of NOB groups that have previously been found in marine habitats (including *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* and *Nitrospina*).

*Nitrospira* and *Nitrospina* were the major contributors to nitrite oxidation in the Pearl River estuary and the South China Sea, respectively. Rarefaction curves and diversity indices suggested that *Nitrospira* was the dominant NOB taxon in the Pearl River estuary. *Nitrospina* was widely distributed from the Pearl River estuary to the South China Sea basin, with much higher diversity in the bottom of the Pearl River estuary and in the weak light layer of the South China Sea. *Nitrobacter* was present, but not abundant, at the bottom of two PRE stations; and *Nitrococcus* was not detected.

Phylogenetic analysis of *Nitrospira-nxrB* gene sequences indicated that most detected strains could have come from waste water treatment plants (WWTPs). There

was also a unique lineage of *Nitrospira* in the Pearl River estuary, which was found at almost all PRE sampling sites. On the basis of its ubiquity, we speculated that the PRE-Lineage might perform a key function in nitrite oxidation. Phylogenetic analysis of *Nitrospira-nxrB* sequences showed that the lineage found at the SEATS site in the South China Sea basin was distinct from those found at other PRE stations. Members of both *Nitrospira* and *Nitrospina* were also detected using quantitative PCR. Quantitative data showed that copy numbers of *Nitrospira-nxrB* gene were markedly higher than those of *Nitrospina-nxrB* in the Pearl River estuary, but were too low to be detected in the South China Sea. In contrast, *Nitrospina-nxrB* gene copy numbers increased significantly from the shelf to the basin. Our data showed that NOB was predominantly distributed below the euphotic zone.

Here, we provided the first analysis of NOB community structure at two different scales, particle-attached and free-living, in the Pearl River estuary. *Nitrospira-nxrB* gene copy numbers were higher in the particle-attached than the free-living portions, while *Nitrospina-nxrB* gene copy numbers were higher in the free-living than the particle-attached portions, possibly indicating habitat preference of the strains detected from each genus. In addition, *Nitrospira-nxrB* gene copy number correlated negatively with dissolved oxygen (DO) concentration, and positively with  $\text{NO}_2^-$  and total suspended material (TSM) concentrations in the Pearl River estuary. *Nitrospina* was predominant in the disphotic zone of South China Sea basin.

In addition, a new strain of JL1095<sup>T</sup>, named *Aceticoccus yangtzensis*, isolated from the surface water of the Yangtze Estuary, China. We described its morphological structure, its chlorophyll *a*, cellular fatty acids, respiratory chain, polar lipids, G+C content, carbon source utilization, enzyme activity and other physiological and biochemical characteristics, and its phylogenetic evolution.

Key Words: Nitrite oxidation; *NxrB* gene; Diversity; Abundance; Pearl River estuary; South China Sea basin

## 第一章 前言

### 1.1 海洋生物地球化学循环概述

在地球表层生物圈中,生物有机体经由生命活动,从其生存环境的介质中吸取元素及其化合物(常称矿物质),通过生物化学作用转化为生命物质,同时排泄部分物质返回环境,并在其死亡之后又被分解成为元素或化合物(亦称矿物质)返回环境介质中,这一循环往复过程被称为生物地球化学循环。海洋是地球上最广阔的水体,约占地球表面积的71%,然而人类对海洋的研究探索却少之又少。海洋是全球生态系统的重要组成部分,在地球系统中,海洋与大气、陆地紧密联系在一起,在调节全球气候等方面发挥着举足轻重的作用(宋金明,2005)。由于海洋在整个生态系统中的重要作用,海洋生物也因此在海洋生物地球化学循环中显得尤为重要。海洋生物地球化学循环主要是研究与海洋生物相关的物质,特别是生源要素(C、N、P、Si等)在生物过程作用下的行为。通过多种生物对各种化学物质的转化与利用,将多种生源要素建立关系,相互作用,以保证海洋生态环境中各种生源要素的收支平衡,从而维持整个海洋生态系统的平衡与稳定。图1-1为海洋碳、氮、磷和氧生物地球化学循环综合示意图(Gruber,2008)。

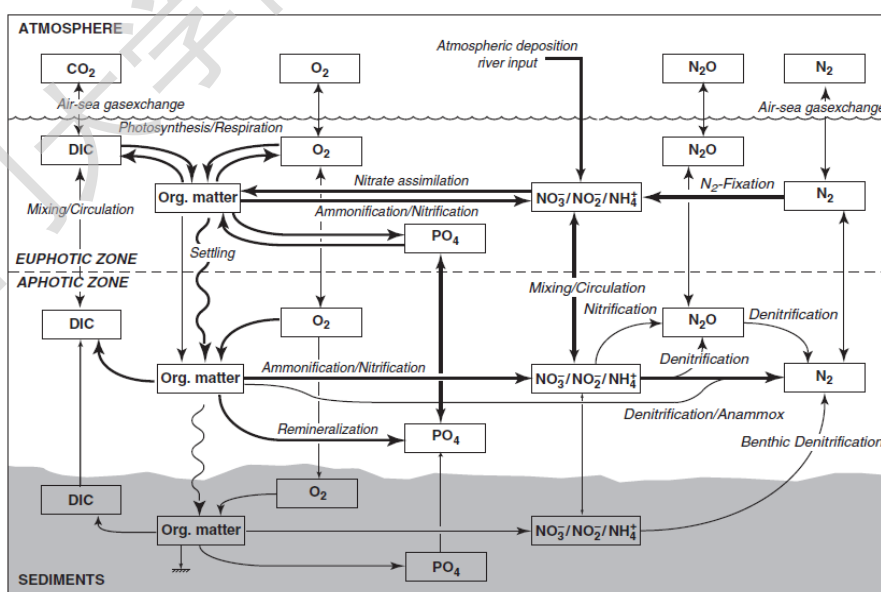


图 1-1 海洋碳、氮、磷和氧生物地球化学循环示意图 (Gruber, 2008)

Fig. 1-1 Schematic representation of the marine cycles of carbon, nitrogen, phosphorus and oxygen (Gruber, 2008)

## 1.2 海洋碳-氮循环概述

微生物调节海洋碳、氮循环。氮元素在许多海域作为限制性营养物质，控制营养物质的生物可利用性，初级生产力和温室气体（诸如： $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{CO}_2$ ）的生成与消耗，因此它与生物固定  $\text{CO}_2$  以及海洋碳循环紧密结合（Gruber, 2004; Ward et al., 2007; Füssel et al., 2012; Karl et al., 2012），在海洋生物地球化学循环中占据着中心地位；同时，对海洋中其他化学元素循环也有非常重要的影响，见图 1-1。

工业革命以来，人类活动使得大气中  $\text{CO}_2$  浓度持续增加，可以预测在未来相当长的时间内，大气  $\text{CO}_2$  浓度会不断增加。然而大气  $\text{CO}_2$  浓度增加导致的全球气候变化，已成为当今人类社会可持续发展最严峻的挑战之一，引起国际社会的高度关注（焦念志, 2012）。海洋是地球上极为重要的碳储库，每年从大气中净吸收约 22 亿吨碳。如图 1-2 (A) 所示的“生物泵”（Biological Pump, BP）被认为是 1 种将碳封存于海洋的驱动力（Baker et al., 2013），从浮游植物光合作用开始，沿着食物链从初级生产者逐级向高营养级传递有机碳，产生颗粒有机碳（Particle Organic Carbon, POC）沉降，将一部分碳封存在海洋中长期不参与大气  $\text{CO}_2$  循环，起到“海洋碳储”的作用（焦念志, 2012）。如图 1-2 (B) 所示的“微型生物碳泵”（Microbial Carbon Pump, MCP）则主要强调异养细菌将活性溶解有机碳（Labile dissolved organic carbon, LDOC）转化成惰性溶解有机碳（Recalcitrant dissolved organic carbon, RDOC）的非沉降式“碳储”过程，这一概念是由焦念志院士在 2010 年提出（Jiao et al., 2010），代表了最新的“碳储”模型。2 种“碳泵”同时存在，共同作用于海洋碳循环。2 种“碳储”方式均由生物作用引起：前者主要是浮游植物光合作用，后者主要是微生物尤其是异养细菌对 LDOC 的吸收与利用。在 MCP 理论结构框架中，更强调了微生物在海洋中的驱动转换作用是海洋巨大的“幕后推手”（Stone, 2010）。然而，在所有的生物地球化学循环中，氮循环与微生物关系最紧密（Ward et al., 2007）。首先，氮是合成 2 种最重要的生命物质——核酸和蛋白质的关键因子（Canfield et al., 2010），细胞物质合成的碳与氮的比例通常为每 100 个碳原子伴随着 2 到 20 个氮原子（Sterner et al., 2002）。其次，氮元素存在比其他化学元素更多的化学形态，且几乎所有的化学形态转化都由海洋生物承担，要么作为其结构部件，要么为其提供生长所需能量。再次，当自养生物进行  $\text{CO}_2$  固定合成有机物时伴随着多种营养

元素，包括氮、磷、铁等的被吸收；但同时生物体呼吸以及有机物再矿化时都会将这些营养元素释放到海洋中。如此这样的循环过程再加上洋流等物理过程的配合，形成了大尺度上的海洋生物地球化学循环，制约着海洋中几乎所有的生物地球化学活性物质的分布（Gruber, 2008）。综上可知在海洋生物地球化学循环中，碳与氮是与生物最最相关的不可缺少的化学元素，对二者的研究是长期以来关注的热点。

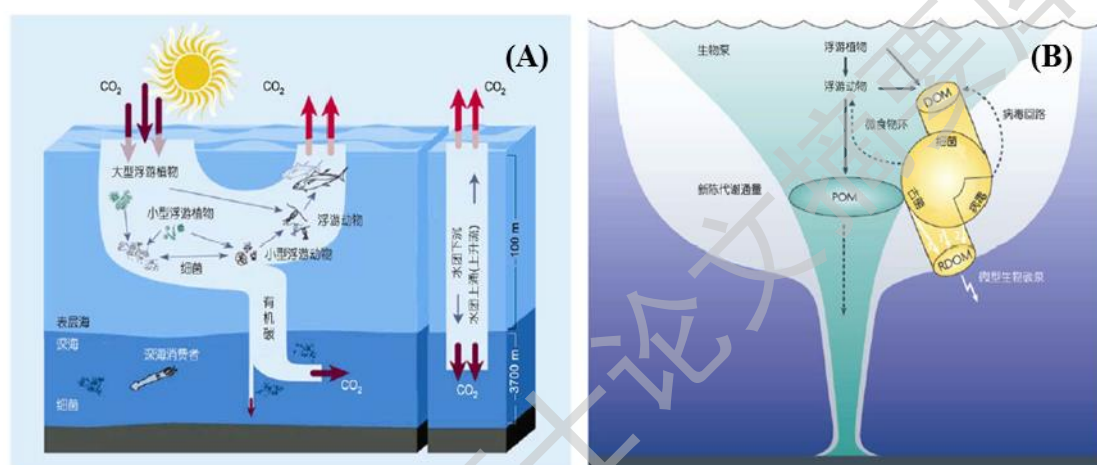


图 1-2 海洋固碳与储碳的主要过程 (A)，图左侧为生物过程，右侧为物理过程 (Chisholm, 2000)；海洋碳循环的主要生物学机制 (B)，绿色代表“生物泵”，黄色代表“微型生物碳泵” (Jiao et al., 2010)

Fig. 1-2 The main processes of carbon fixation and storage in the ocean (A), the biological process on the left side of the Fig 1-2(A), and the physical process on the right side of the Fig 1-2(A) (Chisholm, 2000). The main biological mechanism of marine carbon cycle (B), green represents “Biological Pump”, yellow represents “Microbial Carbon Pump” (Jiao et al., 2010)

## 1.3 海洋氮循环概述与热点

### 1.3.1 海洋氮循环概述

氮循环与微生物关系最为密切。氮元素的每一步转化均由微生物介导，氮循环主要包括固氮作用、硝化作用（氨氧化作用和亚硝酸盐氧化作用）、脱氮作用（反硝化作用和厌氧氨氧化作用）、氮的同化作用和氨化作用等，如图 1-3 所示。



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.