

学校编码: 10384

密级_____

学 号: 22320131151428

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

深海玫瑰杆菌固碳及蛋白质组分析

A study of carbon fixation and proteomic analysis of a
deep-sea *Roseobacter* bacteria

杨玉洁

指导教师姓名: 汤凯 副教授

专业名称: 海洋生物

论文提交日期: 2016年05月

论文答辩时间: 2016年05月

2016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.....	I
Abstract.....	II
第一章 绪论	1
1.1 海洋微生物与海洋碳循环	1
1.2 海洋玫瑰杆菌类群的研究概况	2
1.2.1 玫瑰杆菌类群的概况与分布	2
1.2.2 玫瑰杆菌类群的生理生化及生存代谢特征	4
1.3 玫瑰杆菌类群的营养方式及混合营养代谢方式	4
1.3.1 玫瑰杆菌类群的营养方式.....	4
1.3.2 海洋细菌的混合营养代谢方式	6
1.4 海洋微生物固碳方式及玫瑰杆菌类群在其中的作用	9
1.4.1 海洋微生物固碳方式.....	9
1.4.2 深海海洋微生物与碳固定	11
1.4.3 玫瑰杆菌类群在海洋固碳中的作用.....	12
1.5 海洋硫循环及玫瑰杆菌类群在其中的作用	14
1.5.1 海洋硫氧化微生物与海洋硫循环.....	14
1.5.2 玫瑰杆菌类群在海洋硫循环中的作用.....	16
1.6 本论文的设计及研究意义	17
第二章 深海玫瑰杆菌不同营养方式代谢差异的研究	18
2.1 研究背景	18
2.2 实验设计	18
2.3 实验菌株及培养基	18
2.3.1 实验菌株	18
2.3.2 实验培养基.....	18
2.4 实验方法	20
2.4.1 菌株生理培养.....	20
2.4.2 菌株生理实验.....	20
2.4.3 比较蛋白组 (iTRAQ) 测定及分析.....	24

2.5 结果与讨论	28
2.5.1 生理培养及生理生化特征测定	28
2.5.2 基于 iTRAQ 定量的比较蛋白组学分析	45
第三章 一株来自于中国南海的玫瑰杆菌的分离与鉴定.....	53
3.1 研究背景	53
3.2 材料与方法	53
3.3 实验结果与讨论.....	59
3.4 鉴定总结	70
3.5 本章节小结	71
第四章 本论文的主要结论和创新点.....	73
4.1 主要结论	73
4.2 创新点.....	73
4.3 本论文的不足与展望	74
参考文献.....	75
硕士期间已发表的论文.....	86
致谢.....	87

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Marine microorganisms and marine carbon cycle	1
1.2 Study progresses of <i>Roseobacter</i> Clade	2
1.2.1 The introduction and distribution of <i>Roseobacter</i> Clade	2
1.2.2 The physiological and metabolic characteristics of <i>Roseobacter</i> Clade	4
1.3 Trophic modes of <i>Roseobacter</i> clade and the mixotrophic strategy	4
1.3.1 Trophic modes of <i>Roseobacter</i> clade	4
1.3.2 The mixotrophic strategy of marine microorganisms	6
1.4 Carbon fixation pathways and the role of <i>Roseobacter</i> Clade in carbon fixation	9
1.4.1 Different carbon fixation pathways of marine microorganisms	9
1.4.2 Marine microorganisms and marine carbon fixation	11
1.4.3 The role of <i>Roseobacter</i> clade in carbon fixation	12
1.5 Marine sulfur cycle and the role of <i>Roseobacter</i> Clade in marine sulfur cycle	14
1.5.1 Sulfur-oxidizing bacterias and marine sulfur cycle	14
1.5.2 The role of <i>Roseobacter</i> clade in marine sulfur cycle	16
1.6 Targets of this study and research significance	17
Chapter 2 Studies on the difference metabolic strategies of a deep-sea <i>Roseobacter</i> strain	18
2.1 Research background	18
2.2 Experimental design	18
2.3 Experimental strain and culture medium	18
2.3.1 Experimental strain	18
2.3.2 Culture medium	18
2.4 Experimental methods	20
2.4.1 Fundamental culture	20
2.4.2 Physiological experiments	20
2.4.3 iTRAQ-based quantitative proteomic test	24

2.5 Results and discussion	28
2.5.1 Physiological culture and biochemical characteristics	28
2.5.2 iTRAQ-based quantitative proteomic analysis	45
Chapter 3 Isolation and identification of a <i>Roseobacter</i> from south china sea	53
3.1 Research background	53
3.2 Materials and methods	53
3.3 Results and discussion	59
3.4 Identification summary	70
3.5 Summarise of this chapter	71
Chapter 4 Conclusions and innovations	73
4.1 Conclusions	73
4.2 Innovations	73
4.3 Deficiency and perspectives	74
References	75
List of publications	86
Acknowledgements	87

廈門大學博碩士論文摘要

摘要

玫瑰杆菌类群 (*Roseobacter bacteria clade*) 是海洋微生物 α - 变形菌中红螺菌科的主要分支, 在海洋中分布广泛、普遍存在, 并参与海洋碳循环和硫循环。该类群系统发育相近, 但具有非常丰富的形态和生理特征。玫瑰杆菌生活环境多样复杂, 生存代谢方式受到环境的影响呈现多样化, 并具有一定的灵活性。人们对分布在近岸、表层及深海沉积物的可培养的玫瑰杆菌已有相当认识, 但处于深海这片广阔区域的玫瑰杆菌却少有分离及培养。本研究基于深海玫瑰杆菌 *Thiobacimonas profunda* JLT2016 的全基因组测序结果, 发现其具有多样可变的代谢方式, 例如具有异养代谢中心环节糖酵解途径及三羧酸循环途径的关键基因, 同时还具有固定二氧化碳的卡尔文循环的关键酶——二磷酸核酮糖羧化酶以及无机硫氧化酶的相关基因。这说明了深海玫瑰杆菌 JLT2016 具有自养、异养及混合营养的代谢潜能。之后对 JLT2016 设计并开展了在不同代谢方式下的生理培养实验, 分析了各类生理生化特征及蛋白组表达水平上的差异性。主要研究内容及结果如下:

1. 对深海玫瑰杆菌 JLT2016 设计生理培养实验, 包括自养、异养及混合营养代谢等。固体平板验证实验及液体血清瓶培养实验证实了其可营异养、自养并且在异养生存的同时可进行自养碳固定, 即具有混合营养代谢能力。

2. 对 JLT2016 生长代谢中底物的吸收和利用的测定及比较蛋白组学的分析得出: 在仅有有机物葡萄糖和无机碳酸氢钠的添加而无硫代硫酸盐的添加培养条件下, 无机碳的固定几乎不发生。并且蛋白水平表明硫代硫酸盐的添加能促进自养固碳酶 RubisCO 的表达。

3. 对 JLT2016 不同生存代谢下细菌主要物质分配以及比较蛋白组学的分析可以得出: 不同生存代谢下的细菌虽然蛋白质的总量占干重的比例相差不大, 但是相关代谢途径的关键蛋白在不同代谢状态下表达水平具有明显差异性。

本研究的生理培养、各类生理生化特征测定及蛋白组学的结果为了解深海玫瑰杆菌的代谢情况提供了信息, 并为后续深入研究深海细菌及玫瑰杆菌类群生态功能提供了参考。

关键词: 深海; 玫瑰杆菌; 混合营养代谢; 固碳; 硫氧化

Abstract

The *Roseobacter* clade is a major lineage of the *Rhodobacteraceae* within the *Alphaproteobacteria*. Strains of this clade are widespread in marine environments and make a contribution to marine carbon and sulfur cycle. The *Roseobacter* clade shows a phylogenetically coherent, but has heterogeneous phenotypic and physiological characteristics. What's more, a large variety of habitats lead to the flexible and versatile metabolic conditions of this clade. Many studies have focus on some cultured strains of *Roseobacter* from the coastal, surface and deep-sea sediment. However, the strains of this clade from the deep-sea have not been thoroughly investigated and most are uncultured. Here, we base on the complete genomes of a strain *Thiobacimonas profunda* JLT2016 of *Roseobacter* clade isolated from deep-sea and find that JLT2016 have versatile metabolisms and with the capabilities such as glycolytic pathway, tricarboxylic acid cycle, ribulose, bisphosphate carboxylase-mediated carbon fixation and inorganic sulfur oxidation. Therefore, this study suggests that JLT2016 is capable of autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic growth and explores the connections and differences of various metabolic strategies. The main research contents and conclusions are as the following.

1. The different culture conditions which include autotrophic, heterotrophic and mixotrophic were designed and used to test the metabolic ability of JLT2016. The conclusion is that the strain JLT2016 can indeed grow in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic which means simultaneous autotrophic and heterotrophic physiologies.

2. The consuming rate of the medium substrates and proteome analysis of JLT2016 suggest that the carbon fixation of the bacteria cultured in the condition which contains glucose and sodium bicarbonate except for thiosulfate is almost absent. The proteome also shows that thiosulfate have an impact on the expression of RubisCO.

3. The proteome analysis of JLT2016 revealed significant differences of expressions of protein which involved in various metabolic reactions in different culture conditions.

Physiologic and proteomic analysis of a deep-sea *Roseobacter* strain in this study provides the information of metabolic potential of deep-sea *Roseobacter* and the reference for subsequent study of deep sea and *Roseobacter* ecological function.

Key Words: Deep-sea; *Roseobacter*; Mixotrophic; Carbon Fixation; Sulfur oxidation

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 绪论

1.1 海洋微生物与海洋碳循环

地球上大约近 3/4 的面积是海洋，生活着地球上 80% 的生物类群。海洋生物类群除了一些大型植物和动物外，海洋微生物无处不在，通常包括微型真核生物（鞭毛虫、纤毛虫等）、微型原核生物（海洋细菌、古菌及自养蓝细菌等）等单细胞生物以及浮游病毒等个体较小（ $< 20 \mu\text{m}$ ）的类群（焦念志等，2006）。这些看起来“不起眼”的小家伙才是海洋生物量的主宰者，是海洋中的“巨人”（Karl, 2002）。与较大的生物相比，微型生物常常具有更小的营养吸收半饱和系数、更高的生产效率和更强的竞争力（Jiao & Wang, 1994），它们与其它生物相互作用，从而影响整个地球生态系统。这些数目巨大的微型生物不仅仅是全球海洋生物量的主要贡献者，是生命和非生命系统联系的关键环节，同时也在海洋物质循环和能量流动及维持海洋生态系统多样性与稳定性中发挥着不可或缺的作用。



图1-1 海洋垂直剖面图（wikipedia）

Fig. 1-1 The ocean vertical cross section chart（wikipedia）

海洋是地球上最大的碳库，在整个地球的生物生产力中海洋贡献了 87% ，并在调节全球气候变化中扮演着至关重要的作用。海洋中黑暗深海区 (>1000m) 占到了 70% 的海洋水体 (图 1-1)，是生物圈中最大的栖息地 (Copley, 2002)，也是水生系统中最大的微生物圈 (Whitman *et al.*, 1998)。在有光合作用发生的真光层中 (200m 以上)，光合作用产生的大部分的有机碳运输到深海被微生物呼吸消耗 (Arístegui *et al.*, 2005) 后，可能在几个月或几年的时间尺度中以二氧化碳的形式回到大气中，而一些直接沉降到深海区域的颗粒有机碳 (Particle Organic Matter, POC) 或溶解有机碳 (Dissolved Organic Matter, DOC) 则可深藏海底长达几个世纪。事实上，海洋中 95% 的有机碳是溶解态的，而其中 95% 又是惰性的，可在海洋中保存 5000 年。黑暗的深海区是碳在生物圈中长期存储的重要区域，是生物圈中最大的有机碳库 (Libes, 1992; Hansell & Carlson, 1998; Benner, 2002)。所以海洋微生物在海洋生态系统中的作用不仅是分解者或生产者，更是对海洋碳循环中的储碳做出了重要的贡献。

深海中的微生物种类繁多、数量巨大，仅深海沉积物中的原核生物的生物量就约占地球总生物量的 10%-30% (Parkes *et al.*, 1994)。在较早期的研究认为深海中的微生物主要是利用海洋真光层沉降下来的有机物作为其营养物质的来源进行异养代谢。到 1977 年，在加拉巴戈斯裂谷第一次发现一个深海热液生态系统 (Lonsdale 1977, Corliss *et al.* 1979) 的生物类群以化能自养代谢生存为主 (Jannasch & Wirsen 1979, Jannasch & Mottl 1985)。近期，Swan 等人通过单细胞和全基因组测序技术对两个亚热带环流海区研究发现深海中广泛存在着大量具有化能自养潜能的未能纯培养的细菌类群 (Swan *et al.*, 2011)，这为深海微生物在海洋碳循环中的地位及意义提供了新的角度和视野。

1.2 海洋玫瑰杆菌类群的研究概况

1.2.1 玫瑰杆菌类群的概况与分布

玫瑰杆菌类群是海洋中最丰富的浮游微生物类群之一。其 16S 核糖体 RNA (rRNA) 克隆文库分别占到某些海洋表层和深海沉积物细菌类群的总文库的 10-25% 和 2-15% (Moran *et al.*, 2007)，其与海洋另一大细菌类群 SAR11 一样受到研究者的关注与重视 (图 1-2)。玫瑰杆菌属于变形菌门五个亚纲 (α -亚纲、 β -亚纲、 γ -亚纲、 δ -亚纲和 ϵ -亚纲) 中的 α -亚纲，隶属于其中的红螺杆菌科 (Garrity *et al.*, 2005)，并且这一类群细菌的 16S rRNA 之间的相似性

均在 89% 以上。

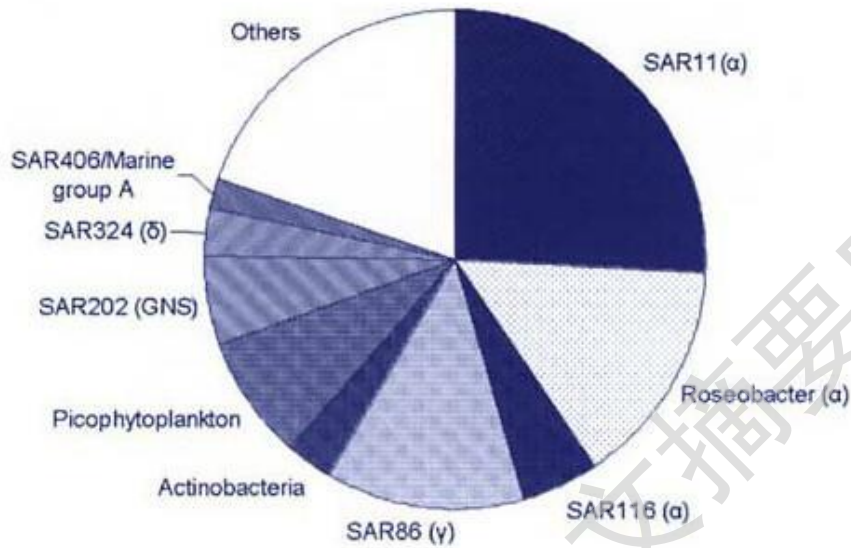


图1-2 海洋浮游生物中，细菌域中最常见的16S rRNA基因簇的出现频率 (Munn, 2003)

Fig. 1-2 Frequency of the most common 16S rRNA gene clusters of Bacteria in marine plankton (Munn, 2003)

最先描述的玫瑰杆菌 *Roseobacter litoralis* Och114 和 *Roseobacter denitrificans* Och149 出现在 1991 年，呈玫瑰色，含有细菌叶绿素 a，分离自海洋藻类 (Shiba, 1991)。目前通过实验室人工培养方法分离和描述玫瑰杆菌类群占预估玫瑰杆菌总数量的 0.1%。它们在海洋中分布极为广泛，从沿海到开阔大洋、从极地冰区到热带海洋，几乎无处不在。并且多分离自多样化的海洋或盐水的栖息地，如海洋沙滩、深海沉积物、潮滩沉积物 (Selje *et al.*, 2004; Shiba, 1991; Lafay *et al.*, 1995; Prokic *et al.*, 1998)、黑海 (Sorokin, 1995)、北海 (Wagner-Döbler *et al.*, 2003)、半对流湖 (Yurkova *et al.*, 2002)、黑烟囱 (Yurkov & Beatty, 1998) 温泉 (Petursdottir & Kristjansson, 1997)、含有超盐性水的盐场 (Dong Han Choi *et al.* 2006)，以及海鞘 (Young-Ok Kim *et al.*, 2012) 和大型藻类等。在沿海和表层，玫瑰杆菌类群更是重要的优势细菌类群 (Giovannoni & Rappé 2000; González *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; González & Moran, 1997)。

玫瑰杆菌分布虽然广泛且生存环境多样，但对于真光层 200m 以下的黑暗

海洋尤其是深海 (>1000m) 的广阔空间来说, 分离较少。另外, 约有 60 多株玫瑰杆菌个体完成了全基因组测序, 而仅有 1 株来自深海的 *Roseobacter* sp. SK209-2-6 菌株进行了单细胞测序。除此之外, 目前对于深海玫瑰杆菌类群的基因组信息还基本处于未知。

1.2.2 玫瑰杆菌类群的生理生化及生存代谢特征

复杂多样的生态环境决定了玫瑰杆菌类群多样化的生理特征和生存形式。首先, 从已有的可培养的玫瑰杆菌的研究中体现了这个类群具有非常多样及丰富的形态和生理特征, 例如有些具有液泡 (Gosink *et al.*, 1997), 作为储能物质的聚羟基丁酸酯 (poly- β -hydroxybutyrate granules, PHB) (Cho *et al.*, 2004), 玫瑰花环结构 (Labrenz *et al.*, 1998), toga-like 晶体 (González *et al.*, 2003), 并且可以分泌毒素 (Gallacher *et al.*, 1997; Hold *et al.*, 2001) 等多种次生代谢物质 (Brinkhoff *et al.*, 2004; Howard *et al.*, 2008; Moran *et al.*, 2007; Moran *et al.*, 2004; Newton *et al.*, 2010; Swingley *et al.*, 2007)。另外, 玫瑰杆菌类群生存营养代谢方式也非常多样化, 其中有的种类以单细胞形式生存, 有的以多细胞小规模群居, 有的常与海洋浮游植物、藻类、无脊椎动物和脊椎动物等共生。玫瑰杆菌类群中一些菌株属于好氧不产氧光合细菌 (AAPB) 功能类群或变形菌视紫红质 (PR) 功能类群, 能够进行光能混养代谢生存。一些玫瑰杆菌类群细菌还可以高效降解萘、萘和蒽等多种多环芳烃类化合物, 氧化 CO, 还原亚硫酸 (Sorokin, 1995), 降解藻类渗透物二甲基巯基丙酸内盐从而产生与气候调节相关的气体二甲基硫 (Zubkov *et al.*, 2001; Zubkov *et al.*, 2002)。

1.3 玫瑰杆菌类群的营养方式及混合营养代谢方式

1.3.1 玫瑰杆菌类群的营养方式

由于玫瑰杆菌分布广泛, 生活环境复杂多样, 其生存代谢方式必然会受到环境的影响呈多样化, 并具有较高的灵活性。从已研究的玫瑰杆菌种类来看, 其主要以营异养代谢生存方式为主, 当环境营养变得丰富时, 能够快速生长 (Lauro *et al.*, 2009), 所以在沿海以及水华发生地, 玫瑰杆菌丰度较高。部分玫瑰杆菌类群与浮游植物存在共生关系, 可以附着在浮游植物上生长, 它们可利用来源于浮游植物的溶解有机质; 另一方面玫瑰杆菌类群可以合成维生素储备液 B₁₂ 等提供给浮游植物生长所需 (Wagner-Döbler *et al.*, 2010)。从转运体的角度来看, 玫瑰杆菌类群较其它细菌相比含有更为丰富的 ABC 转运体 (ATP-binding cassette

systems), 这些转运体主要运输包括糖类, 氨基酸, 二肽及寡肽, 使生物体更为高效地吸收有机物质而进行异养代谢 (Tang *et al.*, 2010)。

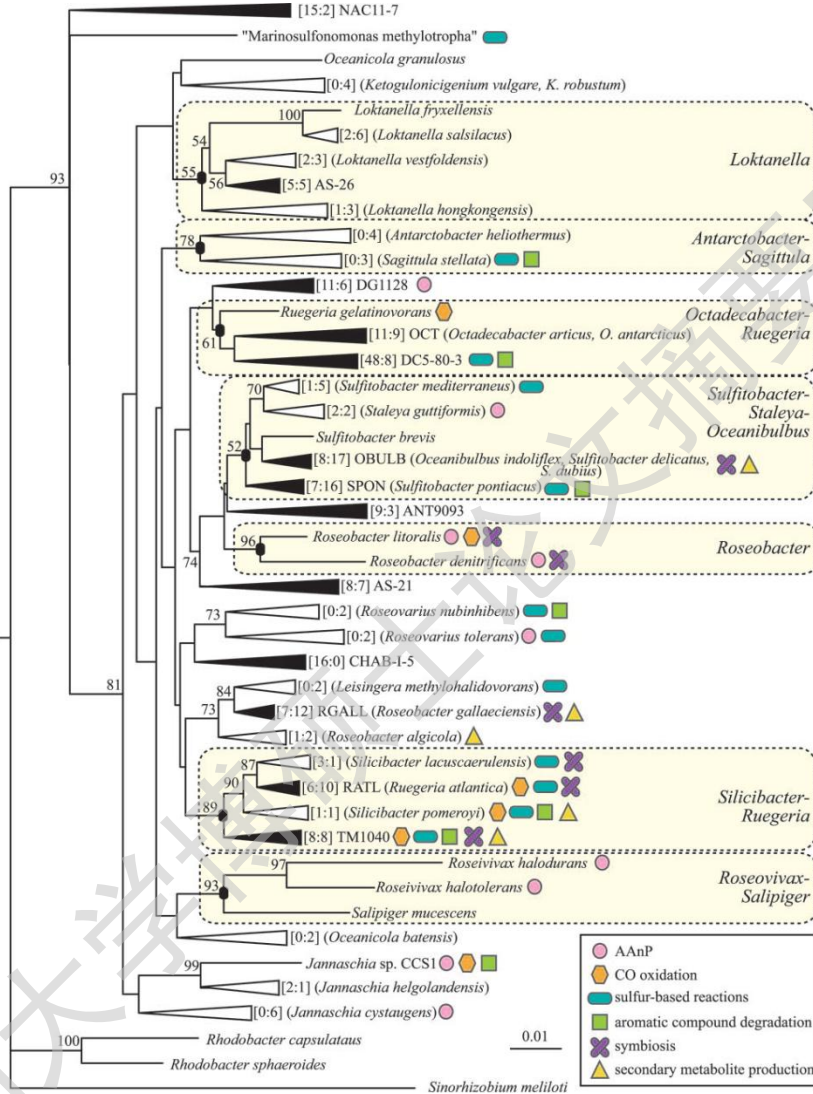


图1-3 41 株玫瑰杆菌类群系统发育树 (Buchan *et al.*, 2005)

Fig. 1-3 The 41 major lineages of the *Roseobacter* clade (Buchan *et al.*, 2005)

但随着越来越多的细菌被分离出来, 玫瑰杆菌多样灵活的代谢策略也逐渐引起人们的重视 (图 1-3)。例如, 首次分离到的玫瑰杆菌类群的细菌 *Roseobacter litoralis* Och114 和 *Roseobacter denitrificans* Och149, 在功能类群上属于好氧不产氧光合细菌 (Aerobic anoxygenic photosynthesis bacteria, AAPB)。AAPB 作为一种好氧异养生长兼光合作用的类群, 其具有带有色素的光合基因簇对光能进行采集来补充细胞能量供给, 使得其营光能混养代谢方式生存。除此之外有些玫瑰杆

菌类群的菌株还有含有变形菌视紫红质也可以进行光能混养 (Newton *et al.*, 2010)。玫瑰杆菌类群中另一类较突出的代谢类型是化能异养, 如氢氧化细菌 (González *et al.*, 1997) 和氧化无机含硫化合物 (硫酸盐、硫化物、硫代硫酸盐) 的硫氧化细菌 (Sorokin, 1995; González *et al.*, 1999; Sass *et al.*, 2010)。以上两种代谢类型光能混养和化能异养是玫瑰杆菌两种主要的代谢策略。

1.3.2 海洋细菌的混合营养代谢方式

海洋中微生物代谢方式多种多样, 主要根据不同的能量来源、碳源及电子来源进行划分。从能量提供角度上划分, 可分为光能, 无机物和有机物提供; 作为碳源来源, 又可分为由无机碳和有机碳提供碳源; 从电子供体来看, 又可分为有机物和无机物提供。根据以上三种角度划分, 可将微生物营养代谢方式分为光能无机自养型, 光能有机异养型, 化能无机自养型和化能有机异养型, 以及混合营养代谢类型, 各营养型代表细菌类群如图 1-4 所示。其中混合营养代谢类型近几年受到人们越来越多的关注 (Munn, 2012)。混合营养代谢 (Mixotrophy 以下简称混养) 这个术语最早是用在生态学著作中描述可以进行光能营养和吞噬的原生生物 (Stoecker, 1998)。但是随着研究的进行, 混养代谢越来越多地也被用在形容细菌代谢的方式类型。2006 年发表的一篇综述中提到, 表层海水中营混养代谢的细菌其实是普遍存在的, 并首次将混合营养代谢方式进行定义: 即具有以下三种或三种以上 (photo-, organo-, auto-, hetero-) 模式的组合的代谢方式 (Eiler *et al.*, 2006) (图 1-5)。

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 for delivery details.