

学校编码: 10384
学号: 22320121151329

密级_____

廈門大學

硕士学位论文

海洋黄杆菌 *Gramella flava* JLT2011 对浮游
植物多糖的利用及 *Pelagibaca* 新种的鉴定

Marine flavobacterium *Gramella flava* JLT2011
utilization polysaccharide of phytoplankton and
characterization of new species of *Pelagibaca* bacterium

林颖芳

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: 2015年5月

论文答辩时间: 2015年5月

2015年5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）：

林颖芳

2015 年 5 月 28 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）：

林颖慧
2015年5月28日

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论	1
1.1 学科背景	1
1.2 海洋异养细菌	2
1.2.1 海洋异养细菌在海洋生态系统中的作用和功能.....	3
1.2.2 海洋异养细菌的主要类型及分布.....	4
1.3 海洋黄杆菌的分布及其生态意义	6
1.3.1 海洋黄杆菌的分布.....	6
1.3.2 海洋黄杆菌的生态意义.....	8
1.3.3 海洋黄杆菌的研究进展.....	9
1.4 本论文的设计与研究意义.....	10
第二章 海洋黄杆菌 JLT2011 对浮游植物多糖的利用机制	13
2.1 研究背景	13
2.2 材料与方法	13
2.2.1 菌株 JLT2011 全基因组测序.....	13
2.2.2 菌株 JLT2011 培养基.....	15
2.2.3 菌株 JLT2011 培养及利用碳源潜能的验证.....	16
2.2.4 基于基因芯片手段研究 JLT2011 利用不同碳源的 RNA 表达差异.....	18
2.2.5 菌株 JLT2011 利用不同碳源表达蛋白差异.....	21
2.3 实验结果与讨论	24
2.3.1 菌株 JLT2011 基因组测序信息.....	24
2.3.2 菌株 JLT2011 的培养及生理实验验证.....	29
2.3.3 基于基因芯片技术研究 JLT2011 利用不同多糖的表达差异.....	39

2.3.4 菌株 JLT2011 利用不同多糖表达蛋白差异结果.....	50
2.5 本章节小结	62
第三章 一株深海海洋玫瑰杆菌的分离鉴定	65
3.1 研究背景	65
3.2 材料与方法	66
3.2.1 菌株来源及培养基.....	66
3.2.2 鉴定方法.....	66
3.3 实验结果与讨论	72
3.3.1 菌落及菌体形态.....	72
3.3.2 生长特性.....	72
3.3.3 菌株 API ZYM、API 20E 和 API 20NE 快速鉴定结果分析.....	75
3.3.4 JLT2014 ^T 的化学特性鉴定	79
3.3.5 鉴定总结.....	84
3.4 本章节小结	85
第四章 总结、创新点、不足与展望	86
4.1 本研究的主要结论	86
4.2 本研究的创新点	87
4.3 本论文的不足和展望	87
参考文献	88
硕士期间已发表的论文	99
致谢.....	100

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Discipline Background	1
1.2 Marine Heterotrophic Bacteria	2
1.2.1 The role and function of heterotrophic bacteria in marine ecosystems ..	3
1.2.2 The main types of marine heterotrophic bacteria and distribution	4
1.3 Distribution and ecological significance of <i>Flavobacteriaceae</i> in marine habitat	6
1.3.1 Distribution of <i>Flavobacteriaceae</i> in marine habitat.....	6
1.3.2 Ecological significance of <i>Flavobacteriaceae</i> in marine habitat.....	8
1.3.3 Research progress of <i>Flavobacteriaceae</i> in marine habitat	9
1.4 Design of This Thesis and Research Significance	10
Chapter 2 The molecular mechanism of marine flavobacterium JLT2011 utilization the polysaccharides of phytoplankton	13
2.1 Study Background	13
2.2 Materials and Methods	13
2.2.1 Whole genome sequencing of JLT2011 culture medium.....	13
2.2.2 Culture medium	15
2.2.3 Verify the potential of strain JLT2011 utilization carbon sources	16
2.2.4 Strain JLT2011 RNA expression differences by Microarray-based method.....	18
2.2.5 Bacterial protein expression differences	21
2.3 Results and Discussions	24

2.3.1 Whole genome sequencing of JLT2011	24
2.3.2 Culture of the strain and physiological validation of JLT2011	29
2.3.3 The results of JLT2011 RNA expression differences by Microarray-based method.....	39
2.3.4 The results of JLT2011 protein expression differences.....	50
2.5 Summaries of This Chapter	62
Chapter 3 Isolation and identification of a deep-sea Rosebacter	65
3.1 Study Background.....	65
3.2 Materials and Methods.....	66
3.2.1 Origin of isolated bacterium and mediums	66
3.2.2 Identification method	66
3.3 Results and discussion	72
3.3.1 Colony and cell morphology.....	72
3.3.2 Growth characteristics	72
3.3.3 Strain API ZYM, API 20E and API 20NE rapid identification results	75
3.3.4 Chemical characterization of JLT2014	79
3.3.5 Identification summary	84
3.4 Summaries of This Chapter	85
Chapter 4 Conclusions, Remarks, Deficiencies and Prospects.....	86
4.1 Conclusions.....	86
4.2 Remarks	87
4.3 Deficiencies and Prospects	87
References	88
List of Publications	99
Acknowledgements	100

摘要

海洋浮游植物是海洋食物网的初级生产者，是海洋有机质重要分泌者。海洋浮游植物光合作用产生的有机质，通过海洋细菌分泌的一系列胞外酶等将颗粒有机质 POM (Particle Organic Matter, POM) 进一步代谢为生物可利用的溶解有机质 (Bioavailable Dissolved Organic Matter, BDOM)。在这一个过程中噬纤维菌-黄杆菌-拟杆菌 (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, CFB) 菌群起着重大的作用。这类细菌形态多样，一般具有较强的运动性和粘附性，能附着在大颗粒物质上生存，可以降解一般细菌难以利用的大分子有机质。从而削弱了基于浮游植物的沉降生物泵 (Biological pump, BP) 过程，促进海洋微型生物碳泵 (Microbial Carbon Pump, MCP) 过程。由于 CFB 类群的高丰度以及在利用和降解海洋溶解有机质 (Dissolved Organic Matter, DOM) 中的特殊地位，研究海洋典型的 CFB 细菌对我们了解这类微生物群体在利用 DOM 的地位和及其在碳循环的作用有重要的意义。取得结果如下：

(1) 本研究对象为分离自东南太平洋区域的一株海洋黄杆菌 *Gramella flava* JLT2011，通过其全基因组信息可知其有较为丰富的糖酵解酶系和多糖利用基因簇，结合生理培养、基因芯片技术和蛋白质质谱分析手段探究海洋黄杆菌 JLT2011 对浮游植物多糖的利用，以期了解这类海洋黄杆菌 JLT2011 在海洋碳循环中的地位和意义。

A. 在生理培养部分，分析 JLT2011 利用多糖和单糖的潜能。从 JLT2011 生长曲线和培养体系糖变化可知菌株 JLT2011 能良好利用果胶和木聚糖 (均为浮游植物多糖)。

B. 利用基因芯片技术，以葡萄糖组为参照，研究黄杆菌 JLT2011 利用两类浮游植物多糖 RNA 表达上的差异，观察到多糖代谢过程的差异基因集中于与特定多糖底物的糖酵解相关的基因如糖苷水解酶类、糖基转移酶类、多糖裂解酶类、多糖化合物酯酶及转载体蛋白等。

C. 利用蛋白质 Shotgun 定性分析黄杆菌 JLT2011 利用两类浮游植物多糖在蛋白质水平的表达差异如 Pectinesterase, Polygalacturonase, Endo-1,4-beta-xylanase, Glycosyl hydrolase family 88 只在相对应的底物中表达等。综合 JLT2011 基因组数

据、基因芯片数据、蛋白质质谱数据构建两类多糖果胶和木聚糖代谢途径。

(2) 基于稀释涂布平板法对东南太平洋区域(102°W, 3°S)站位采集的深层海水(2000m)进行菌株分离纯化, 得到一株相似性 97.6 % 深海玫瑰杆菌通过 16S rRNA 系统发育树的分析、形态学、生理生化特征、GC 含量测定、醌和脂肪酸含量测定以及 API 和 BIOLOG 快速鉴定系统等对该菌株进行了相关研究, 发现其为 *Pelagibaca abyssi* JLT2014^T(=LMG 27363^T=CGMCC 1.12376^T)新种。

关键词: 海洋黄杆菌; 浮游植物多糖; 代谢途径; 菌株鉴定

Abstract

Marine phytoplankton, an important source of marine organic matter, is primary producers of the marine food web. Particle Organic Matter (POM), which is produced by marine phytoplankton photosynthesis, were further mineralized to bioavailable dissolved organic matter (BDOM) by marine bacteria through a series of secrete extracellular enzymes. In this process, *Cytophaga - Flavobacterium - Bacteroides* (Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides, CFB) bacteria play a significant role. The CFB bacteria have diverse forms, strong movement and adhesion characteristics, which can attached to large particulate matters and degrade organic macromolecules. Thus weakening the phytoplankton-based biological pump (Biological pump, BP) process, promoting the marine microbial carbon pump (Microbial Carbon Pump, MCP) process. Due to the high abundance of Flavobacterium taxa and the special status in degradation of marine dissolved organic matter (Dissolved Organic Matter, DOM). The study of marine typical flavobacterium plays an important role in our understanding of this type of microbial population in the use of DOM status and the ecological significance in carbon cycle.

Summarized as follows :

(1) *Gramella flava* JLT2011, which isolated from the Southeast Pacific, possess abundant glycolytic enzymes system and polysaccharides gene cluster through its whole genome sequencing information. We combined with physiological culture, gene chip technology and protein methods to explore the molecular mechanisms of JLT2011 utilization phytoplankton polysaccharides. In order to understand this type of marine favobacterium JLT2011 position and significance in the ocean carbon cycle,

In physiological culture section, JLT2011 use eight kinds of polysaccharides and 8 monosaccharides potential were confirmed. From JLT2011 growth curve and sugar content decreased, we found that bacteria can good use of pectin and xylan (both Polysaccharides).

JL2011 use two types of polysaccharide differences in RNA expression by using gene chip technology. Differences of expressed genes in polysaccharide metabolic processes focused on specific polysaccharide substrate glycolytic genes such as glycoside hydrolases, glycosyltransferase enzymes, polysaccharides cleavage enzymes, enzyme polysaccharide compound and polysaccharide transporter protein and other metabolic processes.

JLT2011 use two types of polysaccharide from differences in protein expression through Qualitative analysis of the use of protein Shotgun. Such as Pectinesterase, Polygalacturonase, Endo-1,4-beta-xylanase, Glycosyl hydrolase family 88 express only expressed in the corresponding substrate. Integrated JLT2011 genomic data, microarray data, proteomic data, we built two types of polysaccharide Pectin and Xylan metabolic pathways.

(2) Spread plate method based on the dilution culturing was used for isolation. A novel bacterial strain JLT2014^T (97.6% similarity) was isolated from the Southeast Pacific (102°W, 3°S) at the depth of 2000m. Based on the results of the phylogenetic tree analysis, morphological, physiological and biochemical characteristics, GC determination, determination of quinones and fatty acids as well as API and BIOLOG rapid identification systems, strain JLT2014^T represents a novel species of the genus *Pelagibaca*, for which the name *Pelagibaca abyssi* sp. nov. is proposed.

Key words: Marine flavobacterium; Phytoplankton polysaccharide; Metabolic pathways; Bacteria characterization

第一章 绪论

1.1 学科背景

工业革命以来，人类排放到大气中的 CO_2 不断增加，引发一系列全球变暖问题，与全球变暖相关的碳循环成为了研究的重点和热点。碳循环是指碳在大气、海洋及陆地生态系统 3 个主要贮存库之间的流动，其中占地球表面积的 71% 海洋在全球碳循环中起着极其重要的作用。海洋储存碳是大气的 60 倍，是陆地生物土壤层的 20 倍(IPCC, 2007)；大约 50% 人为排放的碳被海洋和陆地吸收(Prentice et al., 2001)。海洋碳循环是碳在海洋中吸收、输送及释放的过程，主要包括 CO_2 的海—气通量交换过程、环流过程、生物过程和化学过程。海洋碳的储存和释放在对缓解全球气候变化做出巨大贡献，因此研究碳在海洋中的转移和归宿，是了解全球气候变化的关键。

海洋碳循环可以分为三个方面(Sundquist & Visser, 2003)。第一是“碳酸盐泵”，指的是大气中的 CO_2 气体被海洋以碳酸盐的形式吸收并存在；第二是“物理泵”，与海洋环流密切相关，即混合层发展过程和陆架上升流输入；第三是基于“沉降”方式的“生物泵”，即生物净固碳输出，它是由浮游植物无机碳合成有机碳（初级生产力），再经消费、传递、沉降和分解等一系列生物学过程构成的碳从表层向深层的转移过程。2010 年焦念志等提出了基于“非沉降”方式的生物泵——“微型生物碳泵”（Microbial Carbon Pump, MCP）(图 1-1)，即在微型生物的驱动作用下将海洋中的活性溶解有机碳转化成惰性溶解有机碳（Recalcitrant Dissolved Carbon, RDOC），从而将大气中过多的 CO_2 长期储存在于海洋生物中介导过程。海洋微型生物作为将溶解有机碳转化成惰性溶解有机碳转化的主要驱动者，一直以来都受到广泛的关注(Jiao et al., 2010)。海洋微型生物主要包括微型真核自养、微型真核异养、微型原核自养和微型原核异养等单细胞生物及浮游病毒等多个类群。从粒径上看， $20\mu\text{m}$ 以下的类群，即 Nanoplankton 和 Picoplankton，统称为“微型生物”，而其中粒径在 $2\mu\text{m}$ 以下的 Picoplankton 类群称“超微型生物”，包括微型真核藻类、蓝细菌、细菌、古菌和病毒。与大

型生物相比,这些微型生物类群常常具有更小的营养吸收半饱和系数和更高的生产效率,在生态系统中更具有竞争力(焦念志等,2009)。这一微小的生物群落不仅仅是全海洋生物量的主要贡献者,同时在海洋物质和能量循环中发挥着无可取代的作用。自从1977年,Hobbie等人第一次用表面荧光显微镜观察到海洋细菌的存在(Hobbie et al., 1977),海洋细菌在海洋生物群落中的重要性就开始逐渐被海洋生物学家发现并认知。

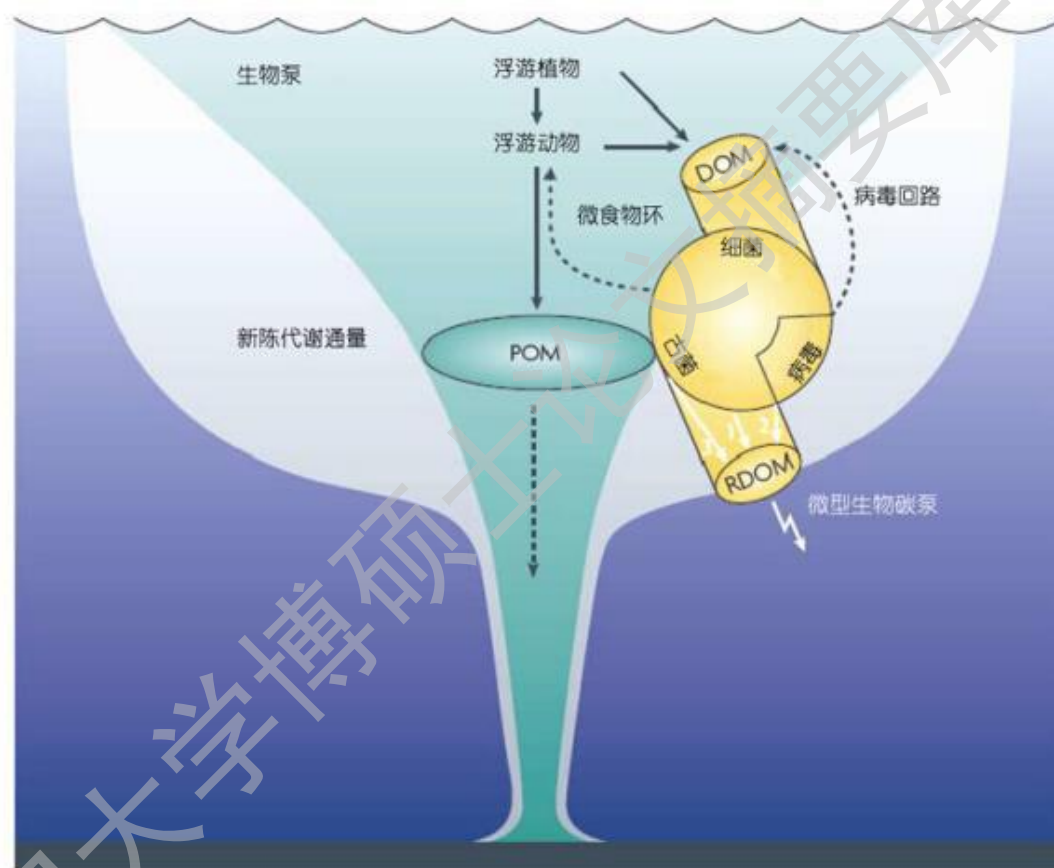


图 1-1 海洋碳循环的主要生物学机制 (Jiao et al., 2010)

绿色示“生物泵”(Biological Pump, BP),黄色示“微型生物碳泵”(Microbial Carbon Pump, MCP)

Fig. 1-1 The main biological mechanisms of the ocean carbon cycle

The green is Biological Pump and the yellow is Microbial Carbon Pump

1.2 海洋异养细菌

海洋浮游生物群落中的重要组成部分之一——海洋浮游细菌对整个海洋生

态系统的稳定起着重要的作用。根据营养方式的不同,海洋细菌可以分为三类,异养细菌、自养细菌和混养。海洋异养细菌是浮游生物群落的一个重要组成部分,肩负着生源要素再循环的重任,是海洋溶解有机质最主要的代谢者(Kirchman, 2008),在整个海洋生态系统中起着非常重要的作用。除病毒之外,异养细菌是海洋中乃至整个生物圈层丰度最大的生物。虽然海洋溶解有机物(Dissolved Organic Matter, DOM)可被多种微生物如蓝细菌和真核浮游生物利用(Mulholland, 2002),但海洋异养细菌仍是海洋 DOM 的最主要吸收者。1983 年 Azam 等在综合了前人研究结果的基础上提出了微生物食物环的概念(Microbial Loop),这使异养细菌“二次生产”的功能得到认识(Azam et al., 1983)。一方面,海洋异养细菌作为分解者,分解水体中大量存在的有机物质及矿化营养盐;另一方面,它还能够吸收溶解有机物(Dissolved Organic Matter, DOM),将其转化为颗粒有机碳(Particle Organic Matter, POM),并通过捕食关系将其传递给更高营养级生物。

1.2.1 海洋异养细菌在海洋生态系统中的作用和功能

海洋异养细菌在海洋生态系统物质循环、能量流动及维护海洋生态系统多样性与稳定性方面扮演着不可或缺的重要角色(Cho & Azam, 1988)。异养细菌是微食物环的主要组成部分,异养细菌利用 DOM 转变为 POM 的过程相当于初级生产力的 20~30%(Cole et al., 1988),异养细菌利用浮游动物不能利用的 DOM,提高了海洋生态系统总生态效益。异养细菌的生物量占总颗粒有机碳的 14-62%,寡营养海域中异养细菌的 DOM 相耦合构成了物质循环和能量流动的基础(Azam et al., 1992)。说明了海洋异养细菌在海洋物质循环和能量流动中至关重要的作用(图 1-2)。

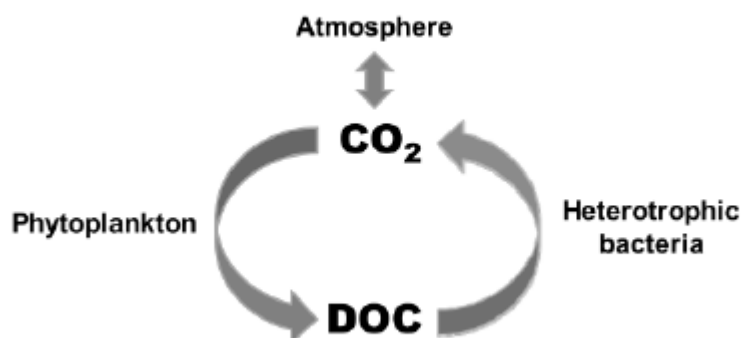


图 1-2 浮游植物与异养细菌参与海洋溶解有机质循环(Sowell,2008)

Fig. 1-2 Cycling of the marine dissolved organic matter pool by phytoplankton and heterotrophic bacteria (Sowell, 2008)

1.2.2 海洋异养细菌的主要类型及分布

海洋异养细菌的类型十分多样,包括极小部分可培养的和大部分不可培养的类型,最常见的主要有变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。

变形菌门的异养细菌在海洋中种类最多、生理生态特性最丰富,主要包括 5 个亚纲,即 α 亚纲、 β 亚纲、 γ 亚纲、 δ 亚纲和 ϵ 亚纲,其中在海洋中较常见是 α 亚纲和 γ 亚纲的细菌,它们从表层到深海均有广泛分布,在多数水域中常属于占优势的类群(Murray et al., 1990)。

在海洋中发现和研究最多的类群是 α 变形菌亚纲,其中最常见有:玫瑰杆菌(*Roseobacter*)、赤杆菌(*Erythrobacter*)、SAR11 类群和 SAR116 类群等。*Roseobacter* 类群是全球海洋中发现的九个主要类群之一,从近岸到外海均有分布,且生理特性多样(Giovannoni & Rappé 2000; Brinkhoff et al., 2004; Buchan et al., 2005; Selje et al., 2004)。*Erythrobacter* 类群在海洋中的分布也很广泛,且和 *Roseobacter* 类群共同存在一个非常重要的功能类群,即好氧不产氧光合异养细菌(Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria, AAPB)。SAR11 类群在淡水、海洋、海底沉积物中均有分布,并且在表层和深水中通常占主导地位,在海洋有机质循环中起着重要作用(Morris et al., 2002; Malmstrom et al., 2004)。SAR116 类

群也是海洋中丰富的类群之一，在很多克隆文库中均能找到它们的序列，在大洋和近岸环境中均有广泛分布（Schwalbach et al., 2005; Kirchman, 2008）。

γ 变形菌是海洋中的优势类群之一，它们种类多、丰度高、分布广，特别是在营养条件较好的环境中。 γ 变形菌主要类型有：交替单胞菌属（*Alteromonas*）、海杆菌属（*Marinobacter*）、弧菌属（*Vibrio*）、西瓦氏菌属（*Shewanella*）和 SAR86 类群等（Giovannoni & Rappé, 2000）。在外海中， γ 变形菌是主要的附着在颗粒上生活的类群之一（DeLong et al., 1993），也是可培养的主要类群之一，因此， γ 变形菌在海洋中的作用也备受人们关注。

拟杆菌（*Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides*, CFB）类群，包括拟杆菌（*Bacteroidetes*）、黄杆菌（*Flavobacteria*）和鞘脂杆菌（*Sphingobacteria*）三个纲（Kirchman, 2002）。16S rRNA 基因克隆文库和荧光原位杂交方法调查显示，拟杆菌在海水中的丰度占到总浮游细菌的 50%（Cottrell & Kirchman, 2000）。研究还发现，它们能高效地降解一般细菌很难利用的大分子生物多聚物，因此对海洋碳循环有着重要的意义（Ó'Sullivan et al., 2004）。

海洋异养细菌不仅类型多样，而且在数量上也很丰富。全球异养细菌丰度的调查中发现，海洋异养细菌的丰度一般在 $10^5 \sim 10^6$ cells/mL，通常是近岸高于大洋、表层高于深层、夏季高于冬季，这与初级生产力高低、营养盐可得性、温度条件等密切相关（Bird & Kaff, 1984; Li, 1998）。与此同时，随着分子生物学技术的发展，1990 年 Giovannoni 等人提出海洋浮游细菌的多样性非常高（Giovannoni et al., 1990），这一观点也从 16S rRNA 基因序列的结果中不断积累证实（Kirchman, 2008）。从早期构建的克隆文库中发现主要细菌类群就已经覆盖了海洋细菌总 16S rRNA 基因类型的 80%（Giovannoni & Rappé, 2000），主要包括 α 变形菌中的 SAR11 类群、*Roseobacter* 类群、拟杆菌的 CFB 类群等。然而，Pommier 等人对全球 9 个不同海区进行 16S rRNA 基因克隆文库的聚类分析发现，不同海区占优势的主要类群基本相似，但同时存在区域性类群（图 1.1），这说明虽然环境中物种丰富度很高，但是在特定环境中还是有些类群的生态位受到了限制（Pommier et al., 2007; Kirchman, 2008）。

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.