

学校编码: 10384
学号: 21620121152386

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

西南印度洋中脊沉积环境放线菌的多样性研究
及五株海洋放线菌的多相分类鉴定

Actinobacterial Diversity in Depositional Environment of the
Southwest India Ocean Ridge and Polyphasic Taxonomy of Five
Marine Actinobacteria

王 爽

指导教师姓名: 徐 洵 研究员

张改云副研究员

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2015 年 04 月

论文答辩时间: 2015 年 05 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 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

目录

中文目录	I
英文目录	V
中文摘要	IX
英文摘要	XI
第一章 前言	1
1 海洋放线菌的多样性及其应用	1
1.1 海洋放线菌的多样性	1
1.2 海洋放线菌的应用	2
2 环境微生物多样性研究方法	3
2.1 可培养分析方法	3
2.2 免培养分析方法	3
3 细菌多相分类研究方法	5
3.1 表观分类	5
3.2 化学分类	5
3.3 分子分类	6
4 本文的研究目的及意义	7
第二章 西南印度洋中脊沉积环境放线菌的多样性分析	8
1 引言	8
2 材料与方法	8
2.1 材料	8

2.1.1 实验样品	8
2.1.2 质粒、菌株和工具酶	8
2.1.3 试剂盒	9
2.1.4 引物	10
2.1.5 培养基	10
2.1.6 主要试剂	12
2.1.7 主要仪器	13
2.2 方法	15
2.2.1 可培养放线菌多样性分析实验方法	15
2.2.2 免培养放线菌多样性分析实验方法	21
3 结果与分析	22
3.1 印度洋 26 航次样品实验结果与分析	22
3.1.1 可培养放线菌多样性	22
3.1.2 功能基因的筛选	27
3.1.3 抑菌活性的筛选	28
3.2 印度洋 30 航次样品实验结果与分析	30
3.2.1 可培养放线菌多样性	30
3.2.2 免培养放线菌多样性	36
3.3 总结	39
第三章 五株海洋放线菌的多相分类鉴定	49
1 引言	49
2 材料与方法	49
2.1 材料	49
2.1.1 实验菌株	49
2.1.2 质粒和工具酶	50
2.1.3 试剂盒	50
2.1.4 引物	50

2.1.5 培养基	50
2.1.6 主要试剂	52
2.1.7 主要仪器	54
2.1.8 软件和数据库	54
2.2 方法	55
2.2.1 表型特征分析	55
2.2.2 生理生化特征分析	55
2.2.3 化学分类分析	59
2.2.4 分子分类分析	66
3 结果与分析	67
3.1 菌株 Y32 ^T 的多相分类鉴定结果及分析	67
3.1.1 表型特征	67
3.1.2 生理生化特征	68
3.1.3 化学分类	68
3.1.4 分子分类	72
3.1.5 菌株 Y32 ^T 的鉴定结果及分析	74
3.1.6 菌种描述	74
3.2 菌株 Y4 ^T 的多相分类鉴定结果及分析	75
3.2.1 表型特征	76
3.2.2 生理生化特征	77
3.2.3 化学分类	78
3.2.4 分子分类	81
3.2.5 菌株 Y4 ^T 的鉴定结果及分析	83
3.2.6 菌种描述	84
3.3 菌株 149 ^T 的多相分类鉴定结果及分析	85
3.3.1 表型特征	86
3.3.2 生理生化特征	86
3.3.3 化学分类	86

3.3.4 分子分类.....	89
3.3.5 菌株 149 ^T 的鉴定结果及分析.....	91
3.3.6 菌种描述.....	92
3.4 菌株 F23 ^T 和 SD2 的多相分类鉴定结果及分析.....	92
3.4.1 表型特征.....	93
3.4.2 生理生化特征.....	94
3.4.3 化学分类.....	95
3.4.4 分子分类.....	98
3.4.5 菌株 F23 ^T 和 SD2 的鉴定结果及分析.....	101
3.4.6 菌种描述.....	102
第四章 总结与展望	104
参考文献	106
致谢	111
发表文章	112

Contents

Chinese Contents	I
English Contents	V
Chinese Abstract	IX
English Abstract	XI
Chapter 1 Forewords	1
1 Diversity and utilization of marine Actinobacteria	1
1.1 Diversity of marine actinobacteria	1
1.2 Utilization of marine actinobacteria	2
2 Methods of researching environmental microorganism diversity ...	3
2.1 Methods of cultural microorganism	3
2.2 Methods of uncultural microorganism	3
3 Polyphasic taxonomy	5
3.1 Phenotypic classification.....	5
3.2 Chemical classification	5
3.3 Molecular classification.....	6
4 Purpose and significance	7
Chapter 2 Actinobacterial diversity in depositional	
environment of the southwest India Ocean Ridge	8
1 Forewords	8
2 Materials and methods	8

2.1 Materials	8
2.1.1 Experimental samples	8
2.1.2 Plasmids, strains and enzymes	8
2.1.3 Kits	9
2.1.4 Primers	10
2.1.5 Mediums	10
2.1.6 Reagents	12
2.1.7 Instruments	13
2.2 Methods	15
2.2.1 Analysis method of cultured actinobacterial diversity	15
2.2.2 Analysis method of uncultured actinobacterial diversity	21
3 Results and analysis	22
3.1 Results and analysis of India Ocean samples collected during the 26th expedition	22
3.1.1 Culturable actinobacterial diversity	22
3.1.2 Screening of function gene	27
3.1.3 Screening of antibacterial activity	28
3.2 Results and Analysis of India Ocean samples collected during the 30th expedition	30
3.2.1 Culturable actinobacterial diversity	30
3.2.2 Unculturable actinobacterial diversity	36
3.3 summary	39
Chapter 3 Polyphasic taxonomy of five marine actinobacteria	49
1 Forewords	49
2 Materials and methods	49
2.1 Materials	49

2.1.1 Experimental strains	49
2.1.2 Plasmids and enzymes	50
2.1.3 Kits	50
2.1.4 Primers	50
2.1.5 Mediums	50
2.1.6 Reagents	52
2.1.7 Instruments	54
2.1.8 Software and databases	54
2.2 Methods	55
2.2.1 Phenotypic characteristics	55
2.2.2 Physiological and biochemical characteristics	55
2.2.3 Chemical characteristics	59
2.2.4 Molecular analysis	66
3 Results and analysis	67
3.1 Polyphasic taxonomy results of strain Y32 ^T	67
3.1.1 Phenotypic characteristics	67
3.1.2 Physiological and biochemical characteristics	68
3.1.3 Chemical characteristics	68
3.1.4 Molecular analysis	72
3.1.5 Identification results and analysis of strain Y32 ^T	74
3.1.6 Description	74
3.2 Polyphasic taxonomy results of strain Y4 ^T	75
3.2.1 Phenotypic characteristics	76
3.2.2 Physiological and biochemical characteristics	77
3.2.3 Chemical characteristics	78
3.2.4 Molecular analysis	81
3.2.5 Identification results and analysis of strain Y4 ^T	83
3.2.6 Description	84
3.3 Polyphasic taxonomy results of strain 149 ^T	85

3.3.1 Phenotypic characteristics	86
3.3.2 Physiological and biochemical characteristics	86
3.3.3 Chemical characteristics	86
3.3.4 Molecular analysis	89
3.3.5 Identification results and analysis of strain 149 ^T	91
3.3.6 Description	92
3.4 Polyphasic taxonomy results of strain F23 ^T and SD2	92
3.4.1 Phenotypic characteristics	93
3.4.2 Physiological and biochemical characteristics	94
3.4.3 Chemical characteristics	95
3.4.4 Molecular analysis	98
3.4.5 Identification results and analysis of strain F23 ^T and SD2	101
3.4.6 Description	102
Chapter 4 Summary and outlook	104
References	106
Acknowledgements	111
Publications	112

摘要

随着各类拮抗病原菌和顽固性病原菌的出现,以及人们对抗病毒、抗肿瘤等低毒性药物需求的增加,海洋微生物活性次生代谢产物已经成为全球创新药物新的增长点。放线菌是一类重要的药用微生物资源,一百多年来,陆生放线菌资源的研究和开发利用取得了极其辉煌的成就;但受资源获取的限制,目前人们对海洋放线菌的研究还未完全展开。本论文以西南印度洋中脊沉积环境采集的海洋生物样品为基础,对其中的放线菌进行分离方法、生物学特性和系统分类学研究,并结合克隆文库方法对其中放线菌的多样性进行研究;对于发现的新分类单元菌株,进行系统多相分类鉴定,确定其系统发育地位;通过抑菌活性筛选及其功能基因的扩增,对分离菌株次级代谢产物的产生能力进行评估。具体研究内容如下:

(1) 本文采用 3 种预处理方法 15 种培养基从 17 份西南印度洋中脊沉积物样品中总共分离获得 406 株纯培养放线菌菌株,这些放线菌分布于放线菌门放线菌纲五个目 10 个科下的 17 个属,其中优势菌属为迪茨氏属(*Dietzia*, 占 49.5%)、红球菌属(*Rhodococcus*, 占 16.0%)、微杆菌属(*Microbacterium*, 占 5.4%)和短杆菌属(*Brevibacterium*, 占 5.2%)。其中菌株 WP001、WY083、WW040、GY1247、GY1352 和 GY1362 与已知典型种的 16S rRNA 基因相似性较低,可能分别代表 *Amycolatopsis* 属、*Microbacteriaceae* 科、*Brevibacteriaceae* 科、*Nesterenkonia* 属和 *Microbacterium* 属的潜在新分类单元。

(2) 为进一步研究西南印度洋中脊沉积环境放线菌的多样性,我们构建了四个放线菌 16S rRNA 基因文库,结果显示该样品中属于放线菌门的 226 个克隆可划分为 76 个 OTU,包含了放线菌门放线菌纲中的放线菌亚目(*Actinomycineae*)、微酸菌亚目("Acidimicrobineae")、棒杆菌亚目(*Corynebacterineae*)、弗兰克氏菌亚目(*Frankineae*)、微球菌亚目(*Micrococccineae*)、丙酸杆菌亚目(*Propionibacterineae*)和一些未分类的放线菌目和放线菌,其中优势类群为丙酸杆菌科(*Propionibacteriaceae*, 36.3%)和微杆菌科(*Microbacteriaceae*, 24.3%)。21 个克隆(27.6%)同数据库中已发表典型种之间的 16S rRNA 序列相似性低于 97%;17 个克隆(22.4%)同数据库中已发表典型种之间的 16S rRNA 序列相似性低于 95%,初步数据分析结果显示西南印度洋中脊沉积环境放线菌的高度

多样性和新颖性。

(3) 为进一步评估所分离菌株次级代谢产物的产生能力, 我们从得到的可培养放线菌中选取 20 株代表性菌株, 对其进行抑菌活性筛选和功能基因的扩增。结果显示, PKS I 基因覆盖率为 30.0%, PKS II 基因覆盖率为 25.0%, NRPS 基因覆盖率为 60.0%。20 株代表菌株对苏云金芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的抑制率较高, 分别为 40.0% 和 30.0%, 对金黄色葡萄球菌抑制率较低, 为 10%, 对核盘菌、立枯丝核菌、香蕉炭疽病菌和棉花枯萎病菌这四种植物病原真菌和大肠杆菌均无抑制作用。

(4) 运用现代多相分类鉴定的方法, 对分离自西太平洋深海沉积物的放线菌菌株 Y32^T、Y4^T、149^T、F23^T 和 SD2 这 5 个潜在细菌新分类单元进行了形态学, 生理生化特征, 化学分类特征以及分子学特征的鉴定实验。经鉴定菌株 Y32^T 代表了乔治菌属中的一个新种, 命名为 *Georgenia subflavus*, 典型菌株为 Y32^T (= LMG 28101^T = MCCC 1A09955^T); 菌株 Y4^T 代表类诺卡氏属的一个新种, 命名为 *Nocardioides flava*, 典型菌株为 Y4^T (= MCCC 1A09944^T = LMG 28100^T); 菌株 149^T 代表类诺卡氏属的一个新种, 命名为 *Nocardioides globerula*, 典型菌株为 149^T (= MCCC 1A10075^T = LMG 28102^T); 菌株 F23^T 和 SD2 代表了短杆菌科的一个新属, 命名为 *Pacificibacterium sediminis*, 典型菌株为 F23^T (= LMG 28103^T = MCCC 1A09945^T)。

关键词: 放线菌多样性; 西南印度洋; 多相分类鉴定

Abstract

With the emergence of various types of antagonist resistant pathogenic bacteria, and the increase of demand for drugs against the virus and tumor with low toxicity, secondary metabolites with good activity of marine microorganisms has become a new growth point of the global drug innovation. Actinobacteria is a kind of important resources of medicinal microorganisms. Over the past 100 years, research and utilization of terrestrial actinobacteria have made glorious achievement. However, by the limitations of resources acquisition, current research on marine Actinobacteria has't carried out fully. In this paper, we carried out the separation methods, biological characteristics and systematics research about the samples collected from the depositional environment of Southwest Indian Ridge, combined with clone library method in actinomycetes diversity. Using the Polyphasic taxonomy method, we studied the phylogenetic position of new marine actinobacteria. Also the ability of producing secondary metabolites about the isolated strains were evaluated.

(1) In this paper, a total of 406 actinobacteria strains were isolated from 17 sediment samples collected from Southwest India ocean ridge through the diversity studies of culturable actinobacteria by using three pretreatment methods and 15 mediums. These strains can be assigned to seven orders, ten families and seventeen genera, genus *Dietzia* (49.5 %), *Rhodococcus* (16.0 %), *Microbacterium* (5.4 %) and *Brevibacterium* (5.2 %) were the dominating actinobacteria genera. Strains named WP001, WY083, WW040, GY1247, GY1352 and GY1362 showed low 16S rRNA sequence similarity with the known, which could be the potential taxon of *Amycolatopsis*, *Microbacteriaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Nesterenkonia* and *Microbacterium*.

(2) In addition, we analyzed the uncultured actinobacteria diversity of four sediment samples. The results showed that, the environment of these four sample contained actinobacteria of five suborder (*Actinomycineae*, "*Acidimicrobineae*", *Corynebacterineae*, *Frankineae*, *Micrococcineae*) and some unclassified

actinobacteria. The dominant groups were *Propionibacteriaceae* (36.28 %) and *Microbacteriaceae* (24.3 %). About 21 clones (27.6 %) showed 16S rRNA sequence similarity less than 97 % between the published species; 17 clones (22.4%) showed 16S rRNA sequence similarity less than 95 % between the published species. These data showed a high degree of diversity and novelty of the Southwest Indian Ridge hydrothermal sedimentary environment actinobacteria.

(3) Twenty representative actinobacteria strains were used to test the distribution of function genes and antimicrobial activity. It revealed that the coverage of PKS gene type I, PKS gene type II and gene NRPS was 30 %, 25 % and 60% respectively. The inhibition ratio to *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* was 40 %, 30 % and 10 % respectively. None of these representative actinobacteria strains showed any inhibitory action to *Escherichia coli*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Banana anthracnose fungus* and *Fusarium oxysporum*.

Using the Polyphasic taxonomy method, we studied the taxonomic characteristics of five marine actinobacteria named Y32^T, Y4^T, 149^T, F23^T and SD2. It showed that strains Y32^T represented a new novel species of genus *Georgenia*, which name was *Georgenia subflavus*, the type strain Y32^T (= LMG 28101^T = MCCC 1A09955^T); strains Y4^T represented a new novel species of genus *Nocardioides*, which name was *Nocardioides flava*, the type strain Y4^T (= MCCC 1A09944^T = LMG 28100^T); strains 149^T represented a new novel species of genus *Nocardioides*, which name was *Nocardioides globerula*, the type strain 149^T (= MCCC 1A10075^T = LMG 28102^T); strains F23^T and SD2 represented a new genus of *Brevibacteriaceae*, which name was *Pacificibacterium sediminis*, the type strain F23^T (= LMG 28103^T = MCCC 1A09945^T).

key words: Actinobacteria diversity; Southwest India Ocean; Polyphasic taxonomy

第一章 前言

放线菌是一类含有高 DNA (G + C) mol % 含量的革兰氏阳性细菌, 因其经典菌落形态呈放线状而得名, 广泛分布于自然界, 其中主要聚居于土壤和海洋环境中, 在分类地位上属于原核生物界、细菌域、放线菌门、放线菌纲。大多数放线菌为好氧、化能自养, 少数为厌氧寄生, 也有一些与非豆科植物等生物共生^[1]。放线菌具有多种细胞形态, 如球状、棒状、杆状、分支状等。

放线菌作为一类极其重要的微生物资源, 已被广泛应用于农业、食品、医药、环境等各种领域。特别是以其多种结构复杂的次级代谢产物和良好的医药用价值, 而被广泛用于抗细菌、抗真菌和抗肿瘤药物的研制及利用^[2]。据不完全统计, 目前微生物产生的万余种抗生素中约一半为放线菌所产^[1]。但随着人们对放线菌研究的逐渐深入, 陆生放线菌的新型天然活性化合物筛选率逐步降低, 加上病原微生物耐药性的不断加剧, 近年来人们将目光逐渐投向了海洋, 从中发现并利用海洋中丰富的放线菌资源, 寻找新颖的有价值的天然活性产物^[3]。

1 海洋放线菌的多样性及其应用

海洋约占地球总面积的 71 %, 是地球生物最大的栖息生存空间, 其广阔的空间面积和多样的生态环境也为微生物提供了优质的生长环境^[4]。海洋是珍贵的生物资源宝库, 其海洋微生物的蕴含量是陆地微生物的 20 倍以上^[1]。海洋放线菌作为海洋微生物中重要的组成部分, 是海洋生物及生态研究中的一个重要领域。

1.1 海洋放线菌的多样性

早在上世纪中旬, 科学家们就已经从沿海沉积物样品和海水中分离到了放线菌^[5], 近些年来, 随着分离技术的不断发展和各种免培养方法的应用, 人们对海洋放线菌的资源和分布情况有了更加全面的认识。

海洋放线菌作为海洋微生物中一个重要的生物类群, 广泛的分布于各种海洋环境中, 如各层海水、海岸沙滩、海底沉积物、海绵、珊瑚、海参等各种海洋生物, 甚至在热泉、极地^[6]、结核矿区及海底冷泉区^[7]等地区也发现了放线菌的存

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.