

学校编码：10384

密级_____

学号：33320130153901

廈門大學

博士学位论文

海洋浮游病毒和深部生物圈病毒
的生态特性

Ecological characteristics of marine virioplankton and
viruses in the deep biosphere

蔡兰兰

指导教师姓名：焦念志 教授

张 锐 教授

郑 强 助理教授

专 业 名 称：环 境 科 学

论文提交日期：2016 年 05 月

论文答辩时间：2016 年 05 月

2016 年 06 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）：

蔡兰兰

2016 年 09 月 18 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）：

蔡兰兰

2016 年 09 月 18 日

摘要.....	I
Abstract.....	IV
第一部分 文献综述与论文设计	1
第 1 章 绪论	2
1.1 海洋病毒	2
1.1.1 海洋病毒研究的发展历程.....	2
1.1.2 病毒简介及海洋病毒的基本特征.....	3
1.1.3 海洋病毒的形态结构.....	3
1.1.4 海洋病毒的增殖方式.....	9
1.2 海洋病毒生态学	11
1.2.1 海洋病毒的生态重要性.....	11
1.2.2 海洋病毒的生态分布.....	16
1.2.3 海洋病毒生产力.....	17
1.2.4 海洋病毒多样性.....	19
1.3 深海深部生物圈病毒	22
1.3.1 深海深部生物圈简介.....	22
1.3.2 深海深部生物圈病毒研究进展.....	23
1.4 本论文的研究内容和意义	24
第二部分 海洋浮游病毒浓缩方法评估	26
第 2 章 基于切向流过滤法评估海洋浮游病毒的浓缩和分离效率....	27
2.1 前言	27
2.2 材料和方法	29
2.2.1 采样站位.....	29
2.2.2 切向流过滤.....	34
2.2.3 浮游病毒和浮游细菌的丰度检测.....	37

2.2.4 数据统计分析.....	39
2.3 结果和讨论	39
2.3.1 浮游细菌过滤效率.....	39
2.3.2 浮游病毒过滤效率.....	42
2.3.3 膜包对浮游细菌和病毒的吸附性.....	44
2.4 本章小结	45
第三部分 海洋浮游病毒多样性研究	46
第 3 章 三株海洋玫瑰杆菌 <i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL12^T 病毒的分离鉴定与全基因组序列分析	47
3.1 前言	47
3.2 材料与方法	49
3.2.1 宿主菌株的培养.....	49
3.2.2 噬菌体的分离.....	49
3.2.3 噬菌体的浓缩纯化.....	51
3.2.4 形态观察.....	52
3.2.5 基因组提取及测序.....	52
3.2.6 氯仿敏感性检测.....	53
3.2.7 宿主范围检测.....	53
3.2.8 一步生长曲线.....	53
3.2.9 基因组序列的生物信息学分析.....	53
3.3 结果和讨论	54
3.3.1 噬菌体的分离及形态观察.....	54
3.3.2 宿主专一性.....	55
3.3.3 氯仿敏感性.....	57
3.3.4 一步生长曲线.....	57
3.3.4 基因组分析.....	58
3.3.5 噬菌体在数据库和环境中的分布.....	64
3.4 本章小结	65

第 4 章 九龙江河口区域浮游病毒的宏基因组分析	66
4.1 前言	66
4.2 材料和方法	68
4.2.1 样品采集.....	68
4.2.2 微生物丰度检测.....	69
4.2.3 浮游病毒形态观察.....	69
4.2.4 病毒宏基因组样品处理.....	69
4.2.5 生物信息学分析.....	71
4.3 结果	71
4.3.1 环境参数及微生物丰度.....	71
4.3.2 浮游病毒形态多样性.....	72
4.3.3 JRE 宏病毒组.....	75
4.3.3 物种分类.....	75
4.3.4 功能分析.....	77
4.3.5 拼接序列分析.....	78
4.3.6 与其它病毒宏基因组比较.....	79
4.4 讨论	80
4.4.1 JRE 宏病毒组概况.....	80
4.4.2 海洋潮流对 JRE 病毒库的影响.....	81
4.4.3 九龙江径流对 JRE 病毒库的影响.....	82
4.5 本章小结	82
第 5 章 中国南海表层浮游病毒的宏基因组分析	84
5.1 前言	84
5.2 材料和方法	85
5.2.1 样品采集.....	85
5.2.2 微生物丰度检测.....	85
5.2.3 病毒宏基因组样品处理.....	85
5.2.4 生物信息学分析.....	85
5.3 结果和讨论	85

5.3.1 环境参数及微生物丰度.....	85
5.3.2 南海表层宏病毒组.....	85
5.3.3 物种分类.....	86
5.3.4 功能分析.....	91
5.3.5 病毒宏基因组比较.....	91
5.4 本章小结	93
第 6 章 中国南海和西太平洋深海病毒宏基因组分析.....	94
6.1 前言	94
6.2 材料和方法	95
6.2.1 样品采集.....	95
6.2.2 微生物丰度检测.....	95
6.2.3 病毒宏基因组样品处理.....	95
6.2.4 生物信息学分析.....	95
6.3 结果和讨论	95
6.3.1 环境参数及微生物丰度.....	95
6.3.2 深海宏病毒组.....	96
6.3.3 物种分类.....	97
6.3.4 功能分类比较.....	103
6.3.4 病毒宏基因组比较.....	104
6.4 本章小结	104
第四部分 深部生物圈病毒生态特性研究	106
第 7 章 波罗的海沉积物病毒的丰度、形态及生产力研究.....	107
7.1 前言	107
7.2 材料和方法	109
7.2.1 样品采集及处理.....	109
7.2.2 病毒和原核生物丰度检测.....	109
7.2.3 透射电子显微镜观察.....	111
7.2.4 病毒生产力.....	111

7.2.5 数据统计分析.....	112
7.3 结果和讨论	112
7.3.1 病毒丰度和原核生物丰度.....	112
7.3.2 病毒生产力.....	116
7.3.2 病毒的形态多样性.....	118
7.4 本章小结	121
第 8 章 总结与展望	122
8.1 本论文的主要结论	122
8.2 本论文的创新点	124
8.3 本论文的不足	124
8.4 今后还需要开展的工作	125
参考文献	126
攻读博士学位期间完成的学术论文	142
致谢.....	143

Contents

Abstract in Chinese I

Abstract in English IV

Part I Review and thesis design 1

Chapter 1 Preface..... 2

1.1 Marine virus 2

 1.1.1 Major progresses of marine virus 2

 1.1.2 Brief introduction of virus and basic feature of marine virus 3

 1.1.3 Marine virus morphotypes 3

 1.1.4 Marine viral life cycle 9

1.2 Ecology of marine virus..... 11

 1.2.1 Ecological importance 11

 1.2.2 Distribution 16

 1.2.3 Production 17

 1.2.4 Diversity 19

1.3 Virus in the deep biosphere 22

 1.3.1 Introduction of the deep biosphere 22

 1.3.2 Research progresses of virus in the deep biosphere 23

1.4 Objectives and significance of this thesis 24

Part II Evaluation of the viral recovery method 26

Chapter 2 Evaluation of tangential flow filtration for the concentration and separation of viruses in contrasting marine environments 27

2.1 Introduction 27

2.2 Materials and methods 29

 2.2.1 Study sites 29

2.2.2 Tangential flow filtration	34
2.2.3 Enumeration of microbes	37
2.2.4 Statistical analysis	39
2.3 Results and discussion	39
2.3.1 Bacterial filtration efficiency	39
2.3.2 Viral filtration efficiency	42
2.3.3 Sorption	44
2.4 Summary	45
Part III Diversity of marine virioplankton	46
Chapter 3 Isolation and genome sequences of three marine phages infecting <i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL12^T	47
3.1 Introduction	47
3.2 Materials and methods	49
3.2.1 Incubation of host strain	49
3.2.2 Isolation of phages	49
3.2.3 Purification of phages	51
3.2.4 Morphological observation	52
3.2.5 DNA extraction and sequencing	52
3.2.6 Chloroform sensitivity test	52
3.2.7 Cross infection	53
3.2.8 Growth curve	53
3.2.9 Bioinformatic analysis of the phage genomes	53
3.3 Results and discussion	54
3.3.1 Phage isolation and morphological observation	54
3.3.2 Host ranges	55
3.3.3 Chloroform sensitivity	57
3.3.4 Growth curve	57
3.3.4 General features of phage genomes	58
3.3.5 Distribution of phage sequences in the databases	64

3.4 Summary.....	65
Chapter 4 Metagenomic analysis of viroplankton of the subtropical Jiulong River Estuary.....	66
4.1 Introduction.....	66
4.2 Materials and methods	68
4.2.1 Sample collection.....	68
4.2.2 Microbial enumeration.....	69
4.2.3 Morphological observation of viroplankton	69
4.2.4 Virome samples preparation	69
4.2.5 Bioinformatic analysis	71
4.3 Results	71
4.3.1 Environmental characteristics and microbial abundance.....	71
4.3.2 Morphological diversity.....	73
4.3.3 Overview of JRE virome	74
4.3.3 Taxonomic composition.....	75
4.3.4 Functional analysis.....	76
4.3.5 Contig analysis.....	78
4.3.6 Comparison with other viromes.....	79
4.4 Discussion.....	80
4.4.1 The JRE virome	80
4.4.2 Impacts of marine water on the composition of the JRE virome.....	81
4.4.3 Impacts of river outflow on the composition of the JRE virome.....	82
4.5 Summary.....	82
Chapter 5 Diversity of viroplankton from surface water of South China Sea using metagenomic analysis	84
5.1 Introduction.....	84
5.2 Materials and methods	85
5.2.1 Sample collection.....	85

5.2.2 Microbial enumeration.....	85
5.2.3 Virome samples preparation	85
5.2.4 Bioinformatic analysis	85
5.3 Results and discussion	85
5.3.1 Environmental characteristics and microbial abundance.....	85
5.3.2 Overview of SCS surface virome	85
5.3.3 Taxonomic composition.....	86
5.3.4 Functional analysis.....	91
5.3.5 Comparison with other viromes.....	91
5.4 Summary.....	93
Chapter 6 The deep-sea viromes from South China Sea and western Pacific Ocean	94
6.1 Introduction.....	94
6.2 Materials and methods	95
6.2.1 Sample collection.....	95
6.2.2 Microbial enumeration.....	95
6.2.3 Virome samples preparation	95
6.2.4 Bioinformatic analysis	95
6.3 Results and discussion	95
6.3.1 Environmental characteristics and microbial abundance.....	95
6.3.2 Overview of deep-sea viromes.....	96
6.3.3 Taxonomic composition.....	97
6.3.4 Functional analysis.....	103
6.3.4 Comparison with other viromes.....	104
6.4 Summary.....	104
Part IV Ecological characteristics of viruses in the deep biosphere	106

Chapter 7 Activity and diversity of viruses in the Baltic Sea

sediments.....	107
7.1 Introduction.....	107
7.2 Materials and methods	109
7.2.1 Sample collection and processing.....	109
7.2.2 Microbial enumeration.....	109
7.2.3 Morphological observation	111
7.2.4 Viral production	111
7.2.5 Statistical anlysis	112
7.3 Results and discussion	112
7.3.1 Microbial abundance.....	112
7.3.2 Viral production	116
7.3.2 Morphological diversity.....	118
7.4 Summary.....	121
Chapter 8 Conclusions and outlook.....	122
8.1 Major conclusions	122
8.2 Originality.....	124
8.3 Deficiencies	124
8.4 Outlook.....	125
References.....	126
Publications	142
Acknowledgements	143

摘要

作为海洋环境中数量最多的生物类群，海洋病毒无时无刻不在影响着海洋生态系统的众多生物化学过程。病毒通过侵染、裂解宿主，将大量胞内物质释放到海洋中，影响营养物质和能量的流动，是海洋生物地球化学循环的主要推动力。通过侵染特定的宿主，病毒对生物的群落结构、多样性以及生物进化具有重要的调控作用。对海洋病毒丰度、生产力、多样性及其与宿主相互关系开展研究，可以为阐明海洋病毒在海洋物质循环和能量流动中的作用、解释海洋环境乃至全球气候变化等重大事件、开发利用海洋微生物资源等方面提供科学依据，有助于人们更清楚地理解海洋病毒的生态重要性，认识现有的生物资源状况，从而为采取适当的保护策略提供正确的理论指导。

本论文首先对海洋病毒收集的基础方法进行系统评估，为海洋病毒生态特性研究奠定基础。接着从可培养病毒入手，以海洋生态系统中具有广泛分布和重要生态地位的 *Roseobacter* 的典型菌株为宿主，从不同海洋环境中分离其烈性噬菌体，探索浮游病毒多样性及病毒与宿主的相互关系；另一方面，从不可培养病毒入手，沿着从近岸到远洋，从表层到深海这一研究思路，分别对具有典型亚热带河口生态特征的九龙江口水域、寡营养海域中国南海表层海水、南海和西太平洋 3,000 m 深海等不同海洋环境中病毒的多样性进行宏基因组分析。此外，本论文以具有较快沉降速率的波罗的海沉积物为研究区域，通过研究不同深度沉积物中病毒的丰度、生产力和形态多样性，以期为深入调查和认识深部生物圈病毒这一独特基因宝库以及病毒起源、进化等一系列重大生物学问题起推动作用。本论文的主要研究结果如下：

1. 系统评估了在不同海洋环境下，两种不同规模的切向流过滤 (Tangential flow filtration, TFF) 系统对海洋浮游细菌及病毒的分离和浓缩效率。结果显示 TFF 过滤效率受膜包材质及样品属性影响。河口环境下的浓缩效率高于大洋环境，深海环境下的浓缩效率最低。相较于聚醚砜 (Polyethersulfone, PES) 材质膜包，聚偏氟乙烯 (Polyvinylidene difluoride, PVDF) 材质膜包具有对病毒高截留，低滤过的特点，表明 PES 材质膜包有利于获取更多的病毒。在小型 TFF 系统中，改良纤维素 (Regenerated cellulose, RCL) 材质膜包对病毒的浓缩效率高于 PES

材质膜包，二者在大型 TFF 系统中的效率没有显著差别。总体而言，PES 材质膜包更适合用于获取病毒前的去除细菌步骤，而 RCL 材质膜包浓缩病毒效率高；此外，PES 材质膜包更建议用于获得无菌无病毒海水。

2. 以玫瑰杆菌的典型菌株 *Dinoroseobacter shibae* DFL12^T 为宿主，通过切向流过滤浓缩，采用双层平板法从厦门黄厝、厦门白城和中国南海三个海域分离出 1 株短尾噬菌体和 2 株长尾噬菌体。基于电镜观察和基因组分析发现，短尾噬菌体 vB_DshP-R2C 隶属于 N4 类噬菌体，并与其它分离环境各异的海洋 N4 类噬菌体具有相似的基因组结构，说明 N4 类噬菌体进化关系比较紧密。虽然同属于长尾噬菌体科，vB_DshP-R4C 和 vB_DshP-R5C 在形态结构、感染特性和基因组信息上都具有显著差异，二者的基因组中都存在大量未知的基因，并与数据库已有的基因相差甚远，说明 R4C 和 R5C 不同于之前分离发现的长尾噬菌体，而可能代表了新的分支。

3. 运用流式细胞仪调查了厦门环岛海域浮游病毒的丰度；结果显示，厦门海域表层海水中浮游病毒的丰度为 10^7 mL^{-1} ，呈现出由近岸向外海逐渐递减的趋势。通过透射电子显微镜，初步分析了厦门海域浮游病毒的形态多样性；结果显示，厦门海域病毒形态丰富，且大多数为噬菌体。同时，运用病毒宏基因组学技术研究了九龙江河口区域浮游病毒的群落结构和多样性特征。结果表明，约 79% 的九龙江口病毒序列同数据库中已有序列没有相似性。大部分可匹配序列隶属于有尾病毒目，其中以短尾病毒科居多。物种相对丰度分析发现，丰度最高的两种病毒分别是侵染 SAR11 和 SAR116 细菌的噬菌体 HTVC010P 和 HMO-2011。通过序列组装，我们得到了两条分别与玫瑰杆菌病毒 *Celeribacter* phage P12053L 和珊瑚白化病原菌病毒 *Thalassomonas* phage BA3 基因组结构相似的（近似）完整的基因长片段。与已发表的海洋和淡水病毒宏基因组比较分析显示，相较于淡水环境来源，九龙江河口病毒类群与海洋环境来源的病毒类群更为接近，并与其他近岸病毒宏基因组库具有 $14.14 \pm 1.68\%$ 的基因重叠。

4. 对具有重要研究价值的典型寡营养海域中国南海表层海水进行病毒群落结构和遗传多样性研究。结果表明，南海表层宏病毒库中物种数量约 2,700 个，大部分的序列是未知的，只有 12.02% 的序列同数据库中已有序列具有相似性。可匹配序列以短尾病毒科居多，暗示着南海表层环境中病毒群落由短尾噬菌体所

主导。物种相对丰度分析发现，丰度最高的病毒分别是侵染 SAR11、SAR116 和海洋微型蓝细菌的噬菌体。交叉比对结果显示，南海表层病毒库与其他来源于河口、近岸及大洋表层病毒库的基因相似性为 $9.34 \pm 2.05\%$ 。

5. 通过宏基因组技术对南海和西太平洋深海极端环境中病毒多样性进行初步研究。结果表明，82.73-91.84%的病毒序列同数据库中已有序列没有相似性。深海高密度层 ($1.5-1.7 \text{ g mL}^{-1}$) 病毒多样性高于低密度层 ($1.35-1.5 \text{ g mL}^{-1}$) 病毒多样性，西太平洋深海病毒多样性高于南海深海病毒多样性。除了西太平洋深海高密度层样品中病毒以短尾噬菌体科为主导，这与环境中优势短尾噬菌体 *Thalassomonas phage BA3* 占到了较高的相对丰度有关，其余深海样品中病毒均以长尾噬菌体科为主导。此外，在深海环境中，病毒倾向于选择溶源性生存方式。与已发表海洋病毒宏基因组的聚类分析显示，南海和西太平洋深海病毒库聚在一起，二者具有 52.67%的基因相似性。

6. 调查了波罗的海沉积物垂直剖面中原核生物和病毒的丰度、病毒生产力以及病毒形态多样性。研究结果显示，波罗的海沉积物中病毒丰度较高，变化值在 $2.07 \times 10^8 \text{ cm}^{-3}$ - $1.83 \times 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ 之间。在一定范围内，病毒的丰度会随着沉积物深度的增加有稍微的上升，在 4 mbsf 左右达到最大值，之后，病毒丰度随沉积物深度增加呈逐渐降低的变化趋势。病毒与原核生物丰度比值随沉积物深度的变化较稳定，变化范围在 1.13-2.62 之间。沉积物中病毒丰度和原核生物丰度显著相关 ($p < 0.0001$)。病毒生产力随沉积物深度的变化趋势与丰度变化基本保持一致。裂解性病毒生产力与总病毒生产力具有显著差异，说明溶源性感染是沉积物病毒的主要生存方式之一。在沉积物中除了观察到多种典型的有尾噬菌体形态，同时还检测到丝状、杆状、纺锤状等不同病毒类群颗粒，表明深部生物圈病毒形态丰富。我们的研究表明，沉积物中病毒数量庞大，且具有较高的活性，病毒裂解作用对生物地球化学循环具有重要贡献；由于其独特的生存环境，深部生物圈病毒与海洋浮游病毒具有显著差异。

关键词：海洋病毒，病毒多样性，深部生物圈

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.