

学校编码: 10384

分类号密级

学号: 21620131152489

UDC

廈門大學

硕士学位论文

深海环境中邻苯二甲酸酯降解菌多样性及  
新种 *Pelagibaca nanhaius* sp. nov. D13<sup>T</sup> 分类  
鉴定

Diversity of Phthalate Degrading Bacteria in  
the Deep Sea Environment and Classification  
and Identification of *Pelagibaca nanhaius* sp.  
nov. D13<sup>T</sup>

蔡庆武

指导教师姓名: 徐洵研究员

曾润颖研究员

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2016年04月

论文答辩时间: 2016年05月

学位授予日期: 2016年月

答辩委员会主席:

评阅人:

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(国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室曾润颖研究员)课题(组)的研究成果,获得(“深海微生物酶在环境与食品安全中的应用潜力评价(DY125-15-T-06)”与“深海微生物分离培养与基因资源获取技术研究(2012AA092103)”)课题(组)经费或实验室的资助,在(国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室)实验室完成。

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

深海具有各种极端环境特征，包括温度、压力、pH 等，生存在深海的微生物具有适应这些环境的能力，因此目前深海微生物已成为筛选各种特殊资源的热点。

邻苯二甲酸酯（Phthalates esters, PAEs）类化合物是大宗工业品，主要作为增塑剂添加在各种工业产品中，随着这些商品扩散到环境中，具有环境雌激素的危害，引起了国际社会的广泛关注。中国也已经将邻苯二甲酸二甲酯（Dimethyl Phthalate, DMP）、邻苯二甲酸二乙酯（Diethyl phthalate, DEP）、邻苯二甲酸二辛酯（Dioctyl Phthalate, DOP）这三种常见的 PAEs 确定为优先控制的环境污染物。目前对于 PAEs 的化学降解研究已有不少报道，但在生物降解方面仍有很多工作要做。研究发现每年约有数百万吨塑料垃圾流入海洋，因此本文利用深海原位富集的方式从深海样品中开展了 PAEs 降解微生物的研究。

采用非培养和培养的方法，对深海原位富集获得的 DMP 降解菌群进行了分析。在菌株分离筛选方面，为有效获得可降解 DMP 的菌株，原位富集时用吸附了 DMP 的活性炭作为载体，取样后在实验室中再用 DMP 作为唯一碳源摇瓶驯化四周。筛选到的细菌经 16S rRNA 基因鉴定分别属于 6 属 10 种，均具有良好的降解性能。原位样品涂 2216E 平板（2S 组）、原位样品涂含 DMP 平板（DS 组）、摇瓶驯化后涂 2216E 平板（Y2S 组）、摇瓶驯化涂含 DMP 平板（YDS 组）这四组中 YDS 组的菌群的降解能力最为突出，表明驯化对于目标菌株筛选的重要作用。在非培养分析方面，提取原位富集所获得菌群的总 DNA，利用 PCR 建库的方法对其中的 16S rRNA 基因进行了测序和分析，结果表明 DMP 降解菌群中变形菌门占了最大比例达到 97.1%，其次是厚壁菌门占了 0.017%，其它分类的占 2.9%。

对一株疑似新种进行了鉴定，其 16S rRNA 基因经数据库比对与其他已知物种的 16S rRNA 相似性为 96.83%，经过表型特征、生理生化特征、遗传学特征等分类鉴定，将其命名为 *Pelagibaca nanhaius* sp. nov. D13<sup>T</sup>，并同时完成了该菌的全基因组扫描图并分析了数据。获得了该菌株降解 DMP 的羧酸酯酶的基因，降

解邻苯二甲酸酯的一些特殊代谢途径等。

**关键词：**DMP 降解；新种鉴定；原位富集；深海

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

The deep sea environment is featured with high-salt, high-pressure, partial extreme-acid or extreme-alkaline, cold, little-nutrition. Because deep-sea microbes have inevitably adapted to the environment and have the ability to survive, we human can get great wealth of biological resources in the deep-sea microbial resources.

Phthalate esters are the bulk of industrial products, mainly as plasticizers added in a variety of industrial products. With the proliferation of these products into the daily life, phthalate esters have long term environmental estrogens hazards.

It causes widespread concerns in the international community. China also have identified three common PAEs including dimethyl phthalate (Dimethyl Phthalate, DMP), diethyl phthalate (Diethyl phthalate, DEP) and dioctyl phthalate (Dioctyl Phthalate, DOP), as priority control environmental pollutants. At present, there are many reports regarding the degradation of PAEs, but the effective PAEs biodegradation methods remains to be unveiled. Studies have reported that for every year, millions of tons of plastic waste were poured into the ocean, therefore, we use the in-situ enrichment method to analyze the diversities of PAEs degrading microorganisms.

The diversities of PAE degrading microorganisms was analyzed using both cultivation and non-cultivation methods. Based on 16S rRNA gene sequence similarity, 54 strains belonging to 6 genera and 10 species were identified. For cultivation method, four treatments were employed, *i.e.* enriched samples cultivated on 2216E plates (2S group), enriched samples cultivated on DMP plates (DS group), enriched samples cultivated on 2216E plates after selection for DMP resistance (Y2S group), enriched samples cultivated on DMP plates after selection for DMP resistance (YDS group). Among the four groups, YDS group exhibited the most prominent phthalate esters degrading ability, indicating the important role of acclimation in effective isolation of functional bacterium.

High-throughput sequencing results showed that in the level of Phylum, Proteobacteria accounted for the largest proportion of 97.1%, followed by Firmicutes accounted for 0.017%.

A potential new species was identified, since it shared only 96.83% maximum 16S rRNA similarity with known species. Based on physiological and biochemical characteristics, this strain was further identified as *Pelagibaca nanhaius* sp. nov. D13<sup>T</sup>. Besides, the scanned genome of D13<sup>T</sup> strain was sequenced to find genes and pathways involved in phthalates degradation.

**Keywords:** DMP degradation; new bacterial species; classification and identification; deep sea

---

# 目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
<b>1 前言.....</b>	<b>1</b>
1.1 深海生态环境简介.....	1
1.2 深海微生物的研究现状.....	2
1.3 邻苯二甲酸酯的危害及不同防治方式.....	2
1.3.1 邻苯二甲酸酯类几种典型化合物简介.....	2
1.3.2 邻苯二甲酸酯对环境和人的危害.....	3
1.3.3 邻苯二甲酸酯类污染处理方式.....	4
1.4 邻苯二甲酸酯降解相关的羧酸酯酶研究进展.....	5
1.5 海洋细菌及其多样性.....	5
1.6 海洋细菌新种分类鉴定.....	7
1.8 本研究目的及意义.....	9
<b>2 材料与方法.....</b>	<b>10</b>
2.1 实验材料.....	10
2.1.1 样品.....	10
2.1.2 引物.....	10
2.1.3 菌株与质粒载体.....	10
2.1.4 培养基.....	11
2.1.5 常用溶液.....	12
2.1.6 主要仪器和分析软件.....	14
2.2 基本方法.....	15
2.2.1 常规实验方法.....	15
2.3 多样性分析方法.....	18
2.3.1 原位富集菌群中可培养细菌的筛选和分离鉴定.....	18



2.3.2 多样性高通量测序.....	18
<b>2.4 海洋细菌新种鉴定方法.....</b>	<b>18</b>
2.4.1 16S rRNA 基因分析和系统发育树的构建.....	18
2.4.2 表型特征鉴定.....	19
2.4.3 生理生化特征.....	19
2.4.3 化学成分分析.....	23
<b>3 结果与分析.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 深海海水中邻苯二甲酸酯降解菌的多样性分析.....</b>	<b>28</b>
3.1.1 非培养微生物多样性分析.....	28
3.1.2 可培养微生物多样性分析.....	30
<b>3.2 深海海水中邻苯二甲酸酯降解菌的降解能力.....</b>	<b>31</b>
3.2.1 菌种不同的培养方式和差异性介绍.....	31
3.2.2 DS 组可培养细菌种类和降解能力分析.....	32
3.2.3 YDS 组可培养细菌种类和降解能力分析.....	33
3.2.4 DS 组和 YDS 组可培养细菌种群和降解能力分析.....	33
<b>3.3 <i>Pelagibaca nanhaius</i> sp. nov. 新种分类鉴定.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4 全基因组测序及结果分析.....</b>	<b>40</b>
3.4.1 测序结果质控.....	40
3.4.2 测序结果组装.....	42
3.4.3 测序结果组成分析.....	43
3.4.4 测序结果 COG 分析.....	44
3.4.5 测序结果 GO 分析.....	45
3.4.6 测序结果 KEGG 分析.....	46
3.4.7 糖酵解和糖异生途径.....	47
3.4.8 TCA 循环.....	48
3.4.9 D13 的脂肪酸分解途径.....	49
3.4.10 菌株 D13 的邻苯二甲酸分解途径.....	50

4 讨论与展望 .....	53
4.1 样品多样性分析和菌株应用价值发掘 .....	53
4.2 羧酸酯酶的克隆表达 .....	53
4.3 可培养微生物新种的分类鉴定 .....	54
参考文献 .....	55
附录一：羧酸酯酶 DMP-2 基因序列 .....	64
附录二：英文缩写对照表 .....	65
致谢 .....	66

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Contents

<b>Chinese Abstract.....</b>	<b>I</b>
<b>English Abstract.....</b>	<b>III</b>
<b>1. Introductions .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introduction of deepsea environment .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Genera research of deepsea microorganisms .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Harm of phthalates and different ways of prevention.....</b>	<b>2</b>
1.3.1 Profile of Several typicalphthalates compound .....	2
1.3.2 The harm of phthalates.....	3
1.3.3 The ways to deal with the pollution of phthalates .....	4
<b>1.4 The overview of carboxylesterase.....</b>	<b>4</b>
<b>1.5 Marine bacteria and their diversity .....</b>	<b>5</b>
<b>1.6 The identification of marine bacteria.....</b>	<b>7</b>
<b>1.8 The Aim of this study .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Material and methods.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Samples .....	10
2.1.2 Primers .....	10
2.1.3 Strains annd plasmid vectors .....	10
2.1.4 Medium .....	11
2.1.5 Solutions .....	12
2.1.6 Instrumentations and analysis software .....	14
<b>2.2 Methods.....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Common methods .....	15
<b>2.3 Methods of Diversity.....</b>	<b>18</b>
2.3.1 Screening and identification of bacteria .....	18
2.3.2 High-throughput sequencing of diversity .....	18

<b>2.4 The way to define a new species.....</b>	<b>18</b>
2.4.1 Analysis of 16S rRNA gene and construction of phylogenetic tree....	18
2.4.2 Phenotypic characterization .....	19
2.4.3 Physiological and biochemical characteristics.....	19
2.4.3 Chemical analysis .....	23
<b>3 Results and analysis.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Analysis of diversity of bacteria and ability of degradation .....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Analysis of non-cultured microbial diversity.....	28
3.1.2 Analysis of cultured microbial diversity .....	30
<b>3.2The ability of deep sea waters phthalate degrading bacteria degradation .....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Analysis of species and degradation in goup YDS .....	31
3.2.2 Analysis of species and degradation in goup DS andYDS .....	32
3.2.3 Extraction of metagenomic DNA .....	33
3.2.4Diversity of gene sequencing.....	33
<b>3.3 Identification of new species of bacteria .....</b>	<b>34</b>
3.3.1 <i>Pelagibaca nanhaius</i> sp. nov. identification.....	34
<b>3.4 Analysis of whole genome sequencing.....</b>	<b>40</b>
3.4.1 QC sequencing results.....	40
3.4.2 Sequencing assembly .....	42
3.4.3 Composition Analysis of sequencing results .....	43
3.4.4 COG analysis of sequencing results .....	44
3.4.5 GO sequencing analysis.....	45
3.4.6 Analysis of sequencing results KEGG .....	46
3.4.7 Glycolysis and gluconeogenesis .....	47
3.4.8 TCA cycle .....	48
3.4.9 D13 fatty acid decomposition pathways.....	49
3.4.10 Phthalic acid decomposition pathways.....	50

<b>4Discussion and Outlook.....</b>	<b>53</b>
4.1 Samples Diversity.....	53
4.2 Cloning and expression of carboxylesterase.....	53
4.3 Identification of new species .....	54
<b>References .....</b>	<b>55</b>
<b>Appendix 1: carboxylesterase gene sequence of DMP-2.....</b>	<b>64</b>
<b>Appendix 2: References of abbreviation.....</b>	<b>65</b>
<b>Acknowledge.....</b>	<b>66</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要

# 1 前言

## 1.1 深海生态环境简介

地球是人类所知的唯一有生物活动的天体，人类赖以生存的家园，在几十亿年前海洋是生命的摇篮。地球的总表面积约为  $5.1 \times 10^8 \text{km}^2$ ，其中海洋面积大约为  $3.61 \times 10^8 \text{km}^2$ ，这一比例达到了惊人的 70.8%，剩余的 29.2% 为陆地，相对陆地而言人类对海洋的了解和探索较少，更不要说深海里的巨大空间<sup>[1, 2]</sup>，那里有各种各样的资源，特别是其中的生物资源，无论在量上和种类上都无比丰富，成为了人类探索自然的新领域。海洋的平均深度超过 2000m，平均盐度约为 30‰，由于太阳的光能、地球的自转、月球引力等因素，形成了强大的洋流、潮汐，调节整个地球的气候，交换这各种各样的资源，为生物的孕育、生存、发展提供了极好的环境。

深海的环境相对于表层浅海来说有以下几个特点：高压，由于水的密度远大于空气，所以深海海底的压强超过 400 个大气压；低温，阳光很难穿透 200m 以上的海水，深海的海水又缺乏有效的对流，气温度一般保持在 3°C 左右，地质活动旺盛的火山口附近却有 100~400°C 的高温，这里生活着地球上最耐高温的微生物；黑暗，没有阳光照射进来，深海只有同位素射线，这里的生物没有光合作用，却有着利用各种化学能的微生物，如硫化细菌、硝化细菌；有机物密度低，只有极少量的海洋表面的有机物会在重力作用下缓慢沉积到海底，所以深海的有机物密度极低；盐度，深海盐度比浅海略高约为 35‰。

深海有着以上所描述的完全不同于浅海的各项物理化学环境，开始人类是不相信深海是有生物存在的。在近一百年的努力探索中，人类发现深海有着完全不同于陆地的生存条件和适应这些条件的形形色色的生物，海水表面到 10860m 深的海底淤泥中都存在着微生物的活动<sup>[3]</sup>。深海完全不同的能量利用体系决定了这里的生物与陆地上和浅海的生物有着巨大的区别，随着人们对深海探索的不断加深，发现了很多有用的微生物和它们所携带的特殊的基因，人类发现了一个全新的丰富多彩的生物资源宝库。

## 1.2 深海微生物的研究现状

深海环境的极端特殊性决定了深海微生物利用物质和能量的特殊性，在“自然选择”规律的作用下，这些微生物对极端环境有着很好的适应性，我们称这类微生物为极端微生物<sup>[4-6]</sup>。同时，深海又有着极为广大的面积和令人惊叹的深度，所以深海的生物生存的空间  $1.027 \times 10^9 \text{km}^3$ ，远远大于陆地和浅海的空间。

目前已知的深海微生物类群有：古菌、酵母菌、放线菌、真菌、细菌及病毒等<sup>[7]</sup>。深海生物圈中古菌和细菌的数量相当于全球生物圈里原核生物总量的 70%<sup>[8]</sup>，同时占有  $1/10^{[9]}$ ~ $1/3^{[10]}$  的地球总生物量。深海里的这些细菌有着各种各样利用化学能的能力，所以它们所具有的非常特殊的基因和酶成了科研领域的热点。

当前研究热点主要包括：微生物基因和酶的资源的发展性应用研究<sup>[11]</sup>，应用性研究<sup>[12]</sup>，深海微生物基础研究<sup>[13, 14]</sup>，海洋环境的污染和微生物治理研究<sup>[15]</sup>等。深海微生物的种类多，数量也大，是一块值得深度开发的巨大宝藏。可是对于深海微生物的研究却是最近几十年兴起的技术，很多方面都不成熟，也没有系统的有效的研究体系和方案，大多处在探索阶段。由于陆地环境和深海环境的巨大差异，使得科研人员从深海获得的微生物样品到了实验室里不能具有高活性，反过来思考，把陆地上的生物带入到深海中绝大多数也是无法生长的，所以很多未可培养微生物甚至不可培养微生物的资源开发还处在初级阶段。在可培养的微生物中，它们不仅具有基础理论研究上的重大意义，有些又有很强的实用价值。

## 1.3 邻苯二甲酸酯的危害及不同防治方式

### 1.3.1 邻苯二甲酸酯类几种典型化合物简介

邻苯二甲酸酯类化合物是大宗工业品，主要作为增塑剂添加在各种工业产品中，随着这些商品扩散到环境中，并且具有环境雌激素的危害。

表 1 增塑剂毒性比较  
Table1 Toxicity comparison among plasticizers

增塑剂 <sup>[16, 17]</sup>	用途	致癌性 <sup>[18, 19]</sup>	生殖毒性	内分泌干扰物质
DEHP	食品包装袋, 医疗器材, 建筑材料, 增塑剂	动物: 有, 3 类 <sup>[19]</sup>	动物: 有 人类: 待研究	是
DINP	鞋底, 建筑耗材, 增塑剂	动物: 没有列入癌症诱导物	动物: 不明显 人类: 待研究	不是
DNOP	地板胶, 帆布, 增塑剂	没有列入癌症诱导物	动物: 不明显 人类: 待探究	不是
DIDP	电缆线, 胶鞋, 地毯黏胶, 橡胶衬垫	未列入癌症诱导物	动物: 不明显 人类: 待探究	不是
DIBP	油漆, 纸浆, 纸板, 接着剂, 增塑剂, 黏度调整剂	未列入癌症诱导物	动物: 不明显 人类: 待探究	是
DBP	食品包装, 乳胶黏合剂, 溶剂	未列入癌症诱导物	动物: 有 人类: 待探究	是
BBP	建筑材料 (含 PVC), 人造皮革, 汽车内饰, 增塑剂	动物: 有, 3 类 <sup>[19]</sup>	动物: 有 人类: 待探究	是
DEP	溶剂, 护理用品, 油墨	未列入癌症诱导物	动物: 有, 人类: 待探究	是
DMP	溶剂, 个人卫生用品, 护理用品, 油墨	未列入癌症诱导物	动物: 不明显, 人类: 待探究	不是

### 1.3.2 邻苯二甲酸酯对环境和人的危害

邻苯二甲酸酯(Phthalates esters, PAEs)又称酞酸酯, 是一类非常重要的合成有机化合物。由于人类社会大量使用塑料, 邻苯二甲酸酯作为增塑剂<sup>[20]</sup>得以大量添加使用。它可以大大提高塑料的机械性能<sup>[21]</sup>, 如柔韧性、强度等物理属性。PAEs 在各类制品中以游离态存在, 主要借助氢键和分子间作用力结合而不是更加稳定的共价键<sup>[22]</sup>, 随着塑料制品进入人们生活环境的每一个角落<sup>[23]</sup>。增塑剂也搭上“顺风车”扩散到人们接触到的环境中, 大气, 河流, 土地等各种环境中都可以检测到邻苯二甲酸酯的存在<sup>[24]</sup>。已有科学实验证明, 邻苯二甲酸酯具有类似雌激素的化学性质从而干扰内分泌系统, 它广泛扩散在环境中, 成为体外环境雌激素<sup>[25]</sup>。只需要极低的浓度就可以和雌激素受体结合, 途径多样, 通过接触、呼吸以及食



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.