

学校编码: 10384
学号: 22320141151349

密级_____

廈門大學

硕士学位论文

基于非培养和可培养方法研究台湾龟山岛
浅海热液微生物与基因多样性

Cultivation-independent and -dependent analysis of
microbial and gene diversity in the shallow-sea
hydrothermal system off Kueishantao Island, Taiwan

林丹

指导教师姓名: 汤凯 副教授

专业名称: 海洋生物学

论文提交日期: 2017年5月

论文答辩时间: 2017年5月

2017年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人声明所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

摘要.....	1
Abstract.....	111
第一章 绪论.....	1
1.1 热液与浅海热液.....	1
1.2 浅海热液微生物生态.....	3
1.2.1 浅海热液微生物群落调查.....	4
1.2.1 龟山岛浅海热液及微生物群落研究.....	6
1.3 海洋异养细菌.....	8
1.3.1 海洋异养细菌的主要类群.....	9
1.3.2 海洋异养细菌的生态功能.....	10
1.4 海洋溶原性噬菌体.....	10
1.4.1 海洋溶原性噬菌体重要性.....	10
1.4.2 海洋溶原性噬菌体的分离和基因组学研究进展.....	12
1.5 本论文的设计与研究意义.....	14
第二章 基于非培养和可培养方法研究台湾龟山岛浅海热液微生物与 基因多样性.....	16
2.1 研究背景.....	16
2.2 材料与方法.....	17
2.2.1 样品采集.....	17
3.2.2 样品总 DNA 提取.....	19
3.2.3 分子生态测序.....	20
3.2.3 宏基因组测序.....	22
3.2.4 生物信息学分析.....	23
3.2.4 细菌的分离培养.....	23

3.2.5 荧光原位杂交.....	24
2.3 结果与讨论.....	26
2.3.1 环境因子分析.....	26
2.3.2 浅海热液的细菌密度.....	28
2.3.3 浅海热液系统的细菌群落组成.....	29
2.3.4 浅海热液微生物群落的代谢潜能以及功能性标记.....	31
2.3.5 可分离培养细菌的分类研究.....	37
2.3.6 龟山岛基因数据上传.....	40
第三章 三个诱导噬菌体的基因组研究	42
3.1 研究背景.....	42
3.2 材料与方法.....	43
3.2.1 宿主菌的培养.....	43
3.2.2 原噬菌体的诱导与纯化.....	43
3.2.3 噬菌体的透射电镜观察.....	44
3.2.4 噬菌体基因组的提取.....	44
3.2.5 噬菌体及宿主生长曲线的测定.....	45
3.2.6 噬菌体基因组测序方法.....	45
3.3 结果与讨论.....	47
3.3.1 噬菌体形态分析.....	47
3.3.2 诱导过程中细菌和噬菌体的丰度变化.....	48
3.3.3 基因组分析.....	49
3.3.4 噬菌体基因组序列号.....	55
第四章 总结、创新点、不足与展望	57
4.1 本研究的主要结论.....	57
4.2 创新点.....	58
4.3 不足点与展望.....	59
参考文献.....	60

硕士期间已发表的论文	70
致谢.....	71

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract (in Chinese)	I
Abstract (in English).....	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Hydrothermal vent and shallow sea hydrothermal vent	1
1.2 Shallow sea hydrothermal microbial ecosystems	3
1.2.1 Investigations of microbial communities in shallow sea hydrothermal vents	4
1.2.1 Research of microbial ecosystems in Kueishantao shallow-sea hydrothermal system.....	6
1.3 Marine heterotrophic bacteria	8
1.3.1 Main phylogenetic group of heterotrophic bacteria.....	9
1.3.2 Heterotrophic bacterial role in marine ecosystem	10
1.4 Marine prophage	10
1.4.1 The importance of marine prophage	10
1.4.2 Marine prophage induce and genomics..	12
1.5 Design of this thesis and research significance.....	14
Chapter 2 Cultivation-independent and -dependent analysis of microbial and gene diversity in the shallow-sea hydrothermal system off Kueishantao Island, Taiwan	16
2.1 Background.....	16
2.2 Materials and methods	17
2.2.1 Sampling	17
2.2.2 DNA extraction	19
2.2.3 16S rRNA gene sequencing	20
2.2.3 Metagenome sequencing.....	22
2.2.4 Bioinformatic analysis	23

3.2.4 Strain isolation and culture	23
3.2.5 CARD-FISH	24
2.3 Results and discussion	26
2.3.1 Analysis of environmental factors	26
2.3.2 Cell densities	28
2.3.3 Bacterial community composition	29
2.3.4 Metabolic potentials and functional biomarkers of microbial communities	31
2.3.5 Taxonomic assignment of the isolated strains	37
2.3.6 Nucleotides sequence accession numbers	41
Chapter 3 Genome sequences of three inducible phages	42
3.1 Background	42
3.2 Materials and methods	43
3.2.1 Host culture	43
3.2.2 Induce and purification of prophages	43
3.2.3 Transmission electronic microscopy for phage observation	44
3.2.4 DNA extraction of prophage	44
3.2.5 Growth curve	45
3.2.6 Genome sequencing	45
3.3 Results and discussion	46
3.3.1 Morphology of prophage	46
3.3.2 Growth curve	47
3.3.3 Genome analyses of prophage	49
3.3.4 Nucleotides sequence accession numbers of prophage	55
Chapter 4 Conclusions, innovations and defects	57
4.1 Main conclusions	57
4.2 Innovations	58
4.3 Defects	59

Reference	60
List of publications	70
Acknowledgements.....	71

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

由于海水的不断涌入，浅海热液环境的物理化学条件不断波动变化，形成多样化的栖息地，影响着微生物群落的结构组成和代谢潜能。到目前为止，对浅海热液的研究的关注点主要还是在化能自养微生物，缺少对异养微生物的研究。本论文通过酶联放大-原位荧光杂交，16S rRNA 基因扩增子高通量测序，宏基因组，异养细菌培养技术来调查位于台湾龟山岛浅海热液的微生物群落组成与异养细菌的生物性。主要研究内容及结果如下：

1. 酶联放大-原位荧光杂交调查表明龟山岛浅海热液系统水体中的微生物丰度基本在 10^6 cells mL⁻¹ 左右，较普通海水的微生物群落丰度要高，且白泉热液区水体的微生物丰度高于黄泉热液区的。

2. 16S rRNA 基因扩增子高通量测序表明，沉积物样品和水体样品的细菌群落组成在统计学上存在明显差异；而白泉和黄泉两个热液口的水体样品没有较大差异。沉积物中 *Epsilonproteobacteria* 相对丰度较高，而水体中则是 *Gammaproteobacteria* 与 *Alphaproteobacteria* 这两类菌的相对丰度高。

3. 在宏基因组数据中，发现硫氧化和碳固定的相关编码基因，表示在浅海热液系统中进行硫和碳的物质代谢循环。另外还发现多种转运子，糖苷水解酶，肽酶的编码基因，这些基因的存在表示浅海热液的微生物能够利用有机底物，进行异养作用的潜能。

4. 通过异养细菌的分离培养技术，共得到 408 株异养细菌，其中寡营养细菌，富营养细菌，光营养细菌的丰度较高。通过这些可培养和不可培养的方法发现，在所调查的龟山岛区域，*Alphaproteobacteria* 和 *Gammaproteobacteria* 的异养细菌占主要类群。

5. 对诱导自浅海热液及深海的噬菌体进行分析，发现都为长尾噬菌体科，基因组测序结果表明三个噬菌体都为 dsDNA 病毒，其中噬菌体 vB_ThpS-P1 基因组大小为 39.6 Kbp，GC 含量为 66.7%，共有 52 个 ORFs，噬菌体 vB_PeaS-P1 基因组大小为 38.7 Kbp，GC 含量为 63.8%，共有 51 个 ORFs。而噬菌体 vB_RhkS_P1 基因组大小为 38.8 Kbp，GC 含量为 67.5%，共有 59 个 ORFs。且三个噬菌体编码头部的基因中都存在与 Mu-like 噬菌体头部同源的基因，但有基

基因组整体构造上又与 Mu 或 Mu-like 噬菌体有所差别。

关键词：浅海热液；分子生态；宏基因组；异养细菌；微生物群落；溶原性噬菌体

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Shallow-sea hydrothermal systems experience continuous fluctuations of physicochemical conditions due to seawater influx which generates variable habitats, affecting the phyletic composition and metabolic potential of microbial communities. Until recently, studies of submarine hydrothermal communities have focused primarily on chemolithoautotrophic organisms, however, there have been limited studies on heterotrophic bacteria. Here, fluorescence *in situ* hybridization, high throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing, functional metagenomes and heterotrophic bacteria culture were used to assess microbial communities from the shallow-sea hydrothermal system off Kueishantao Island, Taiwan. The main research contents and conclusions are as the following.

1. The result of fluorescence *in situ* hybridization show microbial abundances were on average of the order of 10^6 cells mL⁻¹ of water in the shallow-sea hydrothermal system. The microbial abundances in the white vent area was more than its in the yellow vent area.

2. The result of high throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing display statistically significant differences between bacterial communities in the shallow-sea hydrothermal sediments and water samples, but no significant difference between communities in the white and yellow vents area water samples. *Epsilonproteobacteria* was dominated in sediment samples, but *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria* were dominated in water samples.

3. The potential for marker genes for sulfur oxidation and carbon fixation was detected in the metagenome datasets, suggesting a role for sulfur and carbon cycling in the shallow-sea hydrothermal system. Furthermore, the presence of diverse genes that encode transporters, glycoside hydrolases, and peptidase indicates the genetic potential for heterotrophic utilization of organic substrates.

4. A total of 408 cultivable heterotrophic bacteria were isolated, in which the taxonomic families typically associated with oligotrophy, copiotrophy, and

phototrophy were abundantly found. The cultivation-independent and -dependent analyses performed herein show that *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* represent the dominant heterotrophs in the investigated shallow-sea hydrothermal system.

5. Three prophages namely vB_ThpS-P1 induced from *Thiobacimonas profunda* JLT2016, vB_PeaS-P1 induce from *Pelagibaca abyssi* JLT2014, vB_Rhks_P1 induced from *Rhodovulum* sp. P5 show siphovirus-like morphology. The genome of vB_ThpS-P1 was a size of 39.6 Kbp, 66.7% GC content, and 52 ORFs. The genome of vB_PeaS-P1 was a size of 38.7 Kbp, 63.8% GC content, and 51 ORFs. The genome of vB_Rhks_P1 was a size of 38.8 Kbp, 67.5% GC content, and 59 ORFs. Genomes of three prophages contained Mu-like head structural genes but its genomic content was distinct from Mu or Mu-like phages.

Key words: Shallow-sea hydrothermal system; high throughput sequencing
Metagenomics; Heterotrophic bacteria; Microbial community; Prophage

第一章 绪论

1.1 热液与浅海热液

热液是一种极端的海洋环境，1977年位于加拉帕哥斯裂谷附近热液口第一次被发现，揭开了对海底热液系统研究的序幕^[1]。海洋热液系统通常发现于火山活动频发、活跃的地壳板块地区，大洋洋中脊及弧后盆地、弧前裂谷等。

热液流的形成过程可分为三个阶段：（1）大洋地壳在板块运动过程形成裂缝，海水沿着地壳裂缝处下渗，约能到2-3 km的深处，与内部岩浆接触并逐步被加热。随着海水温度上升到一定阶段时，溶解能力加强，岩石中的多种金属元素和硫化物被淋滤出来，形成富含金属离子且还原度很高的热液流体^[2]。（2）当高温流体与岩石在化学上达到平衡时，形成热液流的物质组成，在地壳内上升过程中，与岩石裂隙系统中海水混合，温度降低，热液流由于压力作用，沿洋壳裂缝处上升并喷出海底^[2,3]。（3）喷薄而出的热液，在热浮力的作用下可上升数百米，与周围海水混合，同时在地形、海洋流等因素的影响下，混合流体同时向两侧扩散，可达数千公里^[3,4]。喷出的热液流体与周围的低温海水混合，由于温度不同以及化学成分的显著差异会发生一系列反应，产生矿物沉淀，海水变黑浊或白浊，形成了外观为浓密黑烟或白烟的热液柱羽状流，即形成“黑烟囱”或“白烟囱”^[5]。

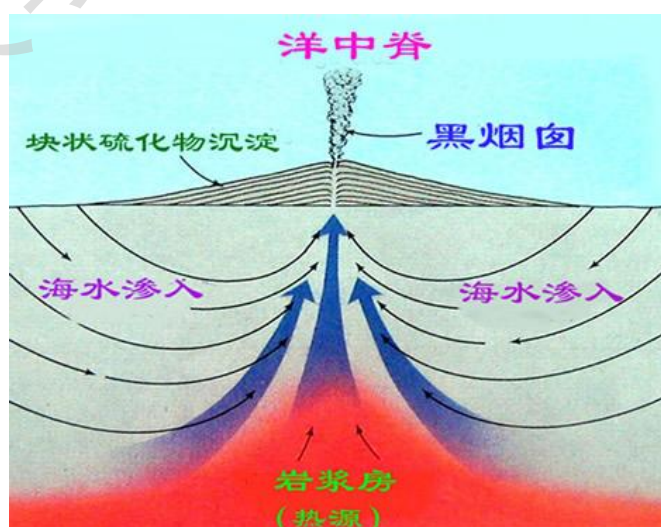


图 1-1 海底热液区示意图

Fig 1-1 Diagram of the hydrothermal vent

不同海底热液区由于所处位置的不同、温度的高低、岩石的组成类别差异以及热液口喷发活动时间的长短等方面有存在差异,导致每个热液口都有自己的特性,但地球上海底热液系统形成的机制是一致的,因此每个热液口生态系统存在着很多相似的地方^[6]。总体来说,在海底热液喷口及周围环境中存在着三个逐渐变化的梯度带,分别是:以喷口为中心,向四周呈逐渐递减的温度梯度带^[5];含有大量的硫化氢(H_2S)、氢气(H_2)、甲烷(CH_4)、氨气(NH_3)、二氧化碳(CO_2)等气体以及铁、铜、锌、铅、银、钙等金属离子的还原性、酸性热液,与低温、氧化的海水混合形成急剧变化的化学梯度带;热液喷口区栖息着高密度的生物群落,以喷口为中心,向四周呈环带状分布的生物梯度带^[7]。

根据海底深度的不同,热液系统分为深海热液和浅海热液,海底深度超过200 m的称为深海热液,海底深度低于200 m的为浅海热液^[8]。以往对热液系统的研究主要集中在深海热液,而对浅海热液的研究最近几年才被重视。

浅海热液在形成机制、地质构造、热液产物和活动强度等方面与深海热液有许多相似之处^[9]。而不同之处除水深外,还如显露地形,深海热液多出现在大洋洋中脊,弧后盆地等,而浅海热液出现的地形介于陆上热泉和深海热液之间,多出现在火山海面下翼部和海底火山顶部^[6,8]。还有在热液影响范围方面,深海热液的喷发通常被限制在热液口附近的狭窄的范围内,而浅海热液的喷发不仅影响喷口周围的环境,而且也会影响热液口上方表层海水,从而影响整个生态系统,其他在热液流体温度,酸碱度,形成矿物和单质方面有存在一定的差别^[8,10]。总体上浅海热液的温度比深海热液低得多,浅海热液的温度范围为10-119 $^{\circ}\text{C}$,其沉积物中温度可以达到95.8 $^{\circ}\text{C}$ ^[8];主要气体与化学物质组成与深海热液大体相同,但浅海热液系统中还富含氧气^[9]。在初级生产力方面,除化能作用外,浅海热液系统还可以通过光合作用进行产能^[11]。在调查的难易程度上,浅海热液较深海热液而言更加容易,只需要通过便携式水下呼吸器(Scuba)等设备就可以进行采样和调查。

浅海热液流体喷出后,因物理化学条件的骤变,其所携带的矿物质形成沉淀,堆积在喷口处附近。与深海热液相比,由于海水压力、热液温度和流速以及热液流体中物质含量的不同,浅海热液中沉积物难以形成烟囱状结构,或者只形成很低的烟囱状。在沉积物组成方面,组分较深海沉积物简单,单一矿物如硬石膏,

单质元素富集如元素硫等^[9]。

1.2 浅海热液微生物生态

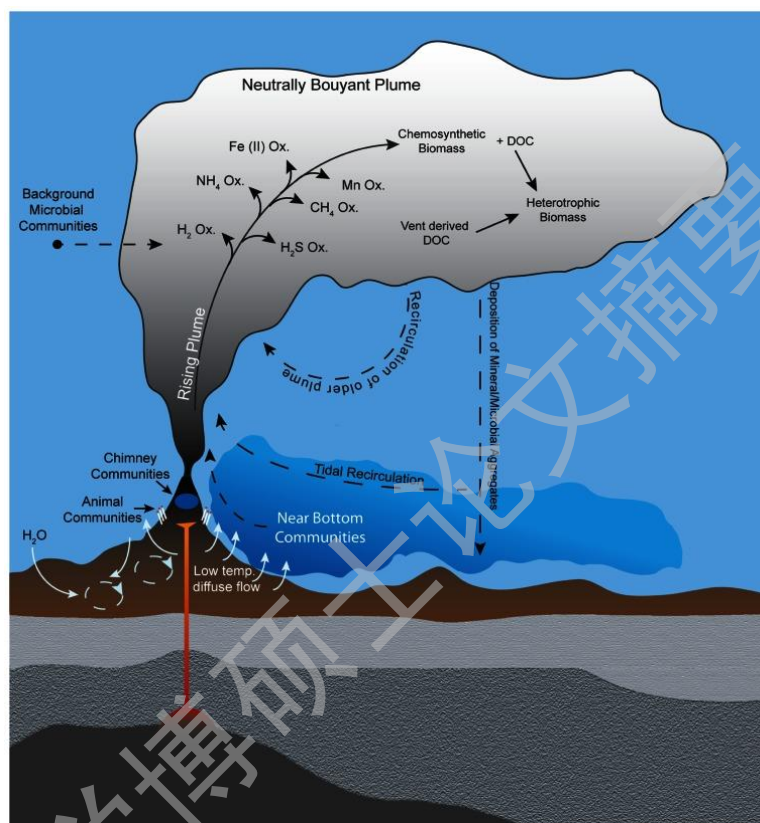


图 1-2 热液系统中不同的微生物环境栖息环境^[12]

Fig. 1-2 Different of microbial habit in hydrothermal system ^[12]

相对于同样深度的其他海底地区，海底热泉附近通常微生物更为繁盛。由于海底热液流的喷发，周围海水的混合，在热口附近形成多种物理化学因子不同的微生物栖息环境，如热液形成的烟囱环境，受热液影响的背景海水环境以及热液口附近海底沉积物环境等（图 1-2）。不同的环境中主要物质组成不同，因此也形成不同的微生物群落。如在热液羽状流的上部分中，化能自养作用形成的生物量和环境中的 DOC 供给异养微生物的代谢底物，因此也在这个环境中形成异养微生物群落^[12]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts 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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库