



## 评述

# 从微生物功能类群研究到海洋储碳机制的新认识 ——方法创新带动科学发现的一个典型案例

张飞<sup>①</sup>, 刘纪化<sup>①②</sup>, 李强<sup>①</sup>, 邹丽洁<sup>①</sup>, 张瑶<sup>①\*</sup>

① 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361102;

② 山东大学海洋研究院, 济南 250100

\* 通讯作者, E-mail: yaozhang@xmu.edu.cn

收稿日期: 2015-06-17; 接受日期: 2015-09-06; 网络版发表日期: 2015-12-23

科技部创新方法工作专项项目(编号: 2011IM010700)、国家自然科学基金项目(编号: 41422603, 41176095, 91428308)和国家海洋局专项项目(编号: GASI-03-01-02-03)资助

**摘要** 海洋微生物是海洋生物地球化学循环的主要驱动者,也是海洋能量代谢的主要参与者,在海洋生态系统中发挥着举足轻重的作用.好氧不产氧光合异养细菌(AAPB)是海洋中一类重要的功能类群,在海洋中广泛分布,它们可以利用光能补充自身的能量代谢,在海洋碳循环中发挥着重要而特殊的作用.在21世纪初,由于微生物显微荧光定量方法的弊端,人们对于AAPB分布规律的认识存在着一定的偏差.“时间序列红外荧光显微数字化方法”(TIREM)的建立,修正了AAPB定量偏差,揭示了海洋中AAPB分布的真正规律.之后,对AAPB生态分布调控因素的进一步研究表明:相对于光照,溶解有机碳(DOC)对AAPB绝对丰度和相对丰度的影响更重要.此认识推翻了“AAPB通过利用光能就可以赢得与普通异养细菌竞争”这一“想当然”的理论推测.而对AAPB碳源利用特点的研究表明,此功能类群具有重要的碳分馏作用,即AAPB在碳代谢过程中,部分碳源并非简单的沿着传统生物泵方向传递.在此基础上的海洋微生物与DOC相互作用关系研究,最终导致海洋储碳新机制——微生物碳泵(MCP)的提出,它解释了海洋中巨大溶解有机碳库存在的原因和机制,实现了海洋储碳机制理论上的新突破.

**关键词** 海洋微生物,好氧不产氧光合异养细菌,时间序列红外荧光显微数字化技术,微生物碳泵,海洋碳循环

## 1 引言

海洋微生物是海洋生物地球化学循环的主要

驱动者,也是海洋能量代谢的主要参与者,在全球海洋生态系统中发挥着举足轻重的作用.好氧不产氧光合异养细菌(Aerobic Anoxygenic Phototrophic

中文引用格式: 张飞, 刘纪化, 李强, 邹丽洁, 张瑶. 2016. 从微生物功能类群研究到海洋储碳机制的新认识——方法创新带动科学发现的一个典型案例. 中国科学: 地球科学, 46: 9-17, doi: 10.1360/N072014-00516  
英文引用格式: Zhang F, Liu J H, Li Q, Zou L J, Zhang Y. 2016. The research of typical microbial functional group reveals a new oceanic carbon sequestration mechanism—A case of innovative method promoting scientific discovery. Sci China Earth Sci, doi: 10.1007/s11430-015-5202-7

Bacteria, AAPB)是海洋微生物中重要的功能类群, 它们兼有好氧异养生长和利用光能的能力, 可以通过消耗有机底物为自身的生命活动提供能量, 也可以利用光能来补充自身的能量需求. 与常见的厌氧光合细菌相比, AAPB对氧气有不同的适应机制, 并且兼具自养和异养细菌的特点, 因此它们在全球海洋真光层中广泛存在. AAPB虽然可以利用光能, 但其机制有别于浮游植物, 它缺乏卡尔文循环的关键酶——1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶, 因而不能利用光能有效固定CO<sub>2</sub>. AAPB具有光捕集系统I (Light harvesting complex I, LHI), 能够产生ATP, 实现光能向化学能的转化(Yurkov和Beatty, 1998), 这可以减少细胞代谢对有机碳的消耗, 从而使更多有机碳保存在环境中. 这类微生物的微观活动可能产生宏观上的重要效应(图1). 据估计, 近岸和大洋水体中, AAPB利用光能产生的能量, 可以分别节省2.4%和5.4%对初级生产力的消耗(Jiao等, 2010a). 同时, AAPB细胞尺寸通常比普通异养细菌大(Sieracki等, 2006), 导致其更容易被捕食, 因此能够将更多的生物量传递至上层营养级. 此外, 有些AAPB能够产生胞外分泌物, 其粘性很强, 容易形成较大的细菌集群或与其他颗粒物形成聚合物, 客观上有利于基于颗粒沉降的海洋生物泵的作用. 由此可见, AAPB在海洋生态系统的能流传递与碳循环中具有重要意义(焦念志, 2009).

## 2 AAPB 常规计数方法的偏差及 TIREM 方法的建立

由于AAPB计数方法准确性的原因, 人们对AAPB生态分布规律的认识并不是一帆风顺的. 最初普遍使用的计数方法为红外落式荧光显微镜技术 (InfraRed Epifluorescence Microscopy, IREM)(Kolber等, 2001; Schwalbach和Fuhrman, 2005), 它通过识别AAPB特征色素BChl *a*的红外荧光对AAPB进行计数定量. 基于此方法, 研究人员发现在贫营养的大洋环境中AAPB比其他异养细菌(non-AAPB)更具生存优势. 如Kolber等在东北太平洋(48°N, 128°W)的调查结果显示: 在真光层水域中, AAPB占整个微生物群落的(11.3±1.7)%, 细菌叶绿素与叶绿素的比率(BChl *a*/Chl *a*)约为0.008; 而在贫营养区域(14°N,

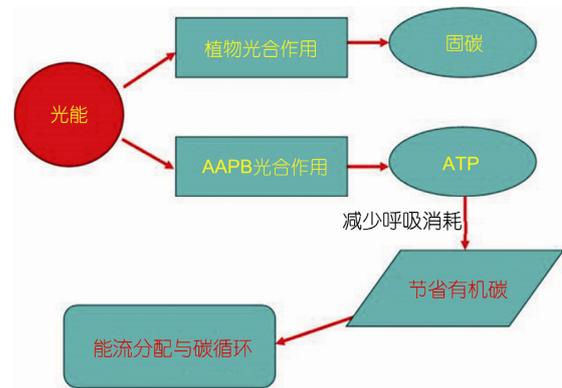


图1 AAPB和浮游植物的能流示意图比较

ATP, 三磷酸腺苷, 代表能量. 焦念志(2009)

104°W), BChl<sub>a</sub>/Chl<sub>a</sub>值增加到0.1, 并且认为全球BChl<sub>a</sub>/Chl<sub>a</sub>平均值为5%~10%. 据此, Kolber等(2001)推测, 在寡营养的大洋环境中, AAPB的丰度比例可能会远高于10%. 同时, 他们也给出了看似合理的理论解释: 大洋水体中溶解有机碳(Dissolved Organic Carbon, DOC)的浓度很低, 相对于其他不能利用光能的浮游细菌, AAPB具有更强的生存优势(Kolber等, 2000, 2001).

然而更细致的研究发现: AAPB计数方法, 在通用的IREM设置下, 蓝细菌会导致AAPB计数的阳性误差, 使得AAPB计数值显著高于实际值(Zhang和Jiao, 2004; Schwalbach和Fuhrman, 2005). 究其原因, 是因为在通用IREM设置下, 所有红外荧光信号都能够被捕捉; 而新的方法学研究表明: 蓝细菌所包含的特征色素Chl *a*的荧光, 在红外波段存在某种程度的拖尾, 因而也能被电子耦合装置(Charge-Coupled Device, CCD)捕捉到红外荧光信号, 这一信号会被误认为是由AAPB发出的, 从而造成AAPB计数中显著的阳性误差. 蓝细菌(主要包括原绿球藻和聚球藻)在海洋中广泛分布且丰度较高, 因此由蓝细菌引入的误差会严重干扰计数结果(图2)(Zhang和Jiao, 2004).

理论上AAPB的正确计数方法应为: 总红外荧光阳性计数和总蓝细菌叶绿素荧光计数的差值. 虽然理论上可行, 但是在方法可行性研究中发现, 将AAPB准确计数并不简单. 在落式荧光显微镜下曝光的初期, 聚球藻叶绿素的荧光强度会显著高于原绿球藻的荧光强度. CCD如果在此时捕获叶绿素荧光信号, 聚球藻荧光信号将覆盖部分原绿球藻的信号, 使

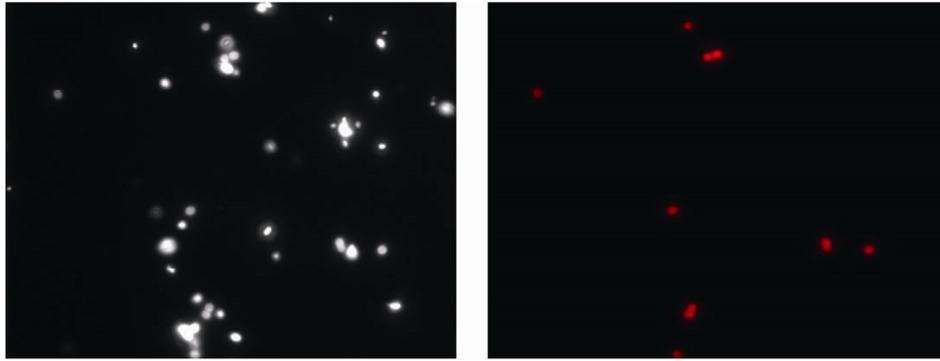


图2 左图的聚球藻给右图 AAPB 的计数所带来的误差约为 28%

Zhang 和 Jiao(2004)

得捕获的蓝细菌叶绿素荧光信号偏少, 即应该被扣除的总蓝细菌计数偏少, 进而导致AAPB的丰度被高估. 这种现象导致的误差在寡营养大洋海区尤为严重. 此“荧光屏蔽效应”类似于常见的“月明星稀”现象: 若明月当空照, 则可见的星星数量相对较少(图3) (焦念志, 2009).

时间序列红外荧光显微数字化方法(Time-series observation based Infrared Epifluorescence Microscope,

TIREM)的建立, 彻底解决了“荧光屏蔽效应”的影响 (Jiao等, 2006), 实现了AAPB的准确定量, 即AAPB细胞数等于红外荧光时间序列成像时处于稳定期的红外阳性细胞数减去红色荧光时间序列成像时处于稳定期的蓝细菌细胞数. 与普通IREM方法相比, TIREM方法具有以下优点:

(1) TIREM通过时间序列观测, 在各类微型生物的荧光信号到达平台期时取值. 而IREM因担心“荧

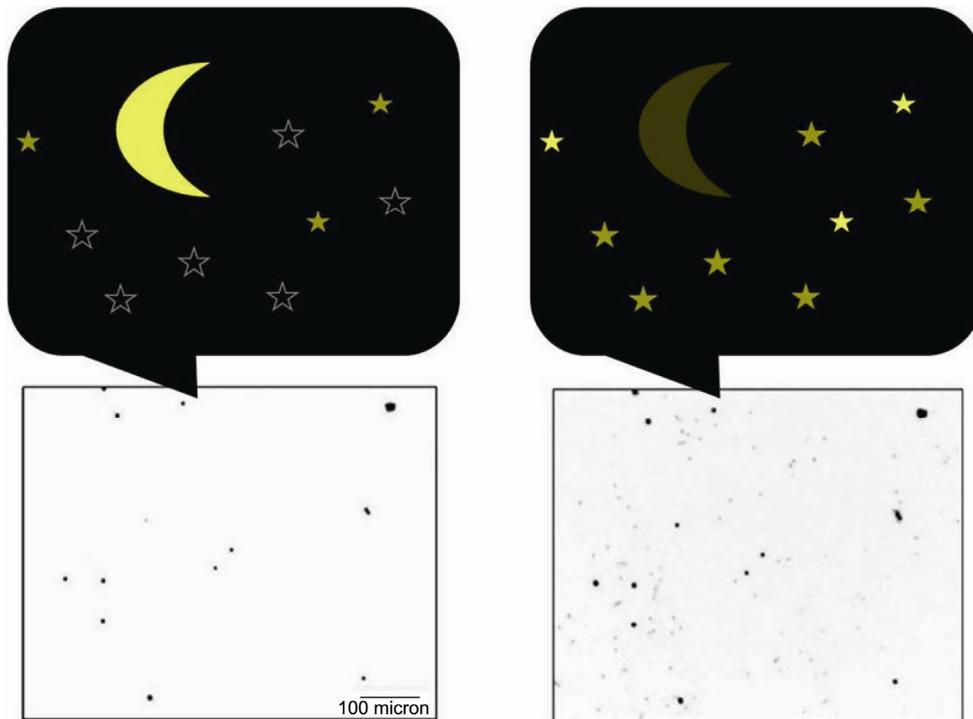


图3 以“月明星稀”示意“荧光遮蔽效应”

左下图为显微镜下最初曝光时间下的红色荧光信号; 右下图为显微镜下曝光稳定后的红色荧光信号

光淬灭”效应而急于取值, 而忽略了“荧光遮蔽效应”, 导致原绿球藻无法被有效计量、甚至无法被观测到; TIREM方法有效解决了此问题(图4, Jiao等, 2006).

(2) 运用数字化处理方法, 将所有微生物个体的荧光信号转化为数字信号(0或1), 避免了不同人在不同时间观察造成的误差, 使数据更可比; 同时, 这也解决了IREM方法中, 由色素荧光强度来确定生物量所造成的严重误差, 即生物量相同的细胞, 其色素含量随时间、水深的变化而不同, 有时甚至高达数量级差异.

(3) 解决AAPB定量误差的同时, 也实现了原绿球藻的显微定量.

对比先前IREM的检测结果, 应用TIREM方法检测来自河口、陆架、东海、南海及大洋的样品的结果表明, IREM方法的确会引入严重的阳性误差(表1). 尤其在寡营养的大洋环境, 原绿球藻的丰度很高, 这

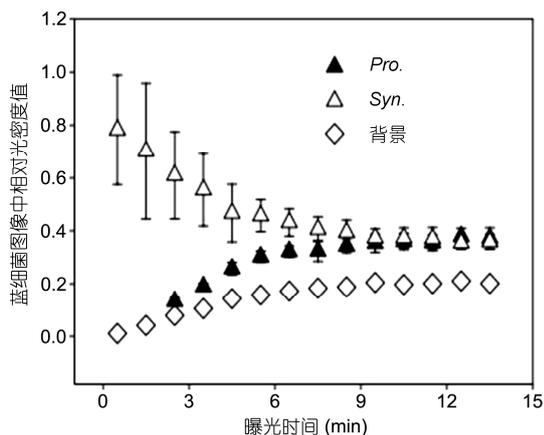


图4 时间序列 CCD Cyano-图像中 *Synechococcus* CCMP 840 和 *Prochlorococcus* CCMP1375 荧光及背景的光密度值随时间变化情况

表1 不同海洋环境中蓝细菌所引入的误差<sup>a)</sup>

	河口	近岸	大洋
红外阳性细胞数 (个/毫升)	(3.5~8.0)×10 <sup>4</sup>	(3.1~19)×10 <sup>4</sup>	(2.2~20)×10 <sup>4</sup>
BCM <sup>a)</sup> 细胞数 (个/毫升)	(3.2~6.6)×10 <sup>4</sup>	(1.1~3.8)×10 <sup>4</sup>	(0.1~1.1)×10 <sup>4</sup>
蓝细菌细胞数 (个/毫升)	(0.4~3.0)×10 <sup>4</sup>	(1.1~17)×10 <sup>4</sup>	(1.2~20)×10 <sup>4</sup>
大致的误差范围	10%~60%	30%~500%	200%~10000%

a) BCM, Bacteriochlorophyll-Containing Microbes, 含细菌叶绿素的微生物. Jiao等(2006)

导致IREM法对AAPB的高估达20倍以上. 因此, 基于IREM方法的AAPB全球分布格局的科学认识, 即认为AAPB在寡营养海区的丰度和比例高于近岸海区是不准确的.

### 3 重新认识 AAPB 分布规律与调控机制

在接下来的研究中, 科学家运用TIREM技术, 综合中国主要海区、太平洋、大西洋和印度洋典型海区的AAPB分布和变化规律的研究, 在全球尺度上揭示了AAPB真正的生态分布模式——AAPB丰度从近海到大洋, 从富营养到寡营养海域呈递减趋势; 同时, 太平洋、大西洋和印度洋的比较研究发现, AAPB丰度及其相对丰度在印度洋典型洋区要高于大西洋及太平洋; 而最低值则出现在太平洋Gyre极端贫营养水域(图5)(Jiao等, 2007).

虽然AAPB全球分布规律得到准确的阐释, 但其调控机制却令人困惑: 为什么AAPB能够利用光能的生存优势, 未能使其在寡营养海域获得更高相对丰度? 此现象背后, 是否存在未被揭示的科学问题?

果然, 之后大量的调查研究发现, AAPB的水平分布与无机营养盐浓度呈负相关, 与叶绿素浓度显著正相关(Jiao等, 2007; Zhang和Jiao, 2007). 并且, 此二者的相关性, 显著高于non-AAPB与叶绿素浓度的相关性, 尤其是AAPB%与叶绿素浓度显著相关. 这表明, 相对其他细菌, AAPB对浮游植物的依赖性更强(图6).

此现象背后又隐藏何种科学问题? 通常认为光照、温度、盐度、营养盐和有机碳供给等, 都应该是调控AAPB分布的重要因素. 基于浮游植物的生态功能, 一个合理的推测得以凸显: AAPB更依赖浮游植物的原因, 可能是更依赖于浮游植物产生的溶解有机碳(Phytoplankton produced DOC, PDOC). 而这一理论推测, 需要严谨的科学实验加以证实.

针对以上推测, 我们在厦门近岸海域开展了现场培养实验, 实验结果如图7所示: 在去除了浮游植物的培养体系中, AAPB丰度和相对丰度被显著抑制, 而普通异养细菌丰度则无显著变化. 培养实验的地点是近岸环境, 其体系中的DOC来源复杂(包括陆源DOC、沉积物DOC等), 足以满足普通异养细菌的需求, 因此实验结果中未观察到其受到去除浮游植物的影响. 而在相同DOC供给下, AAPB则受到显著影

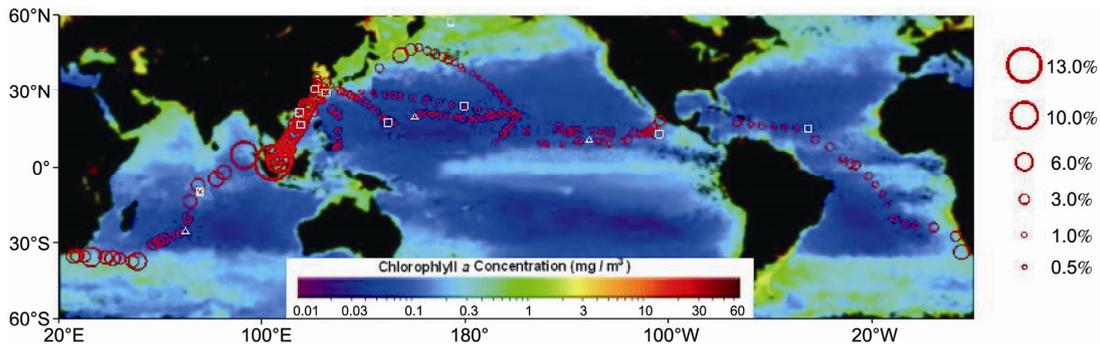


图5 AAPB在总异养细菌中的比例(AAPB%)在全球海洋的分布规律

红色圆圈的位置和大小代表了采样站位以及该站位的AAPB%值,白色三角形代表垂直剖面的采样站位(Jiao等,2007)

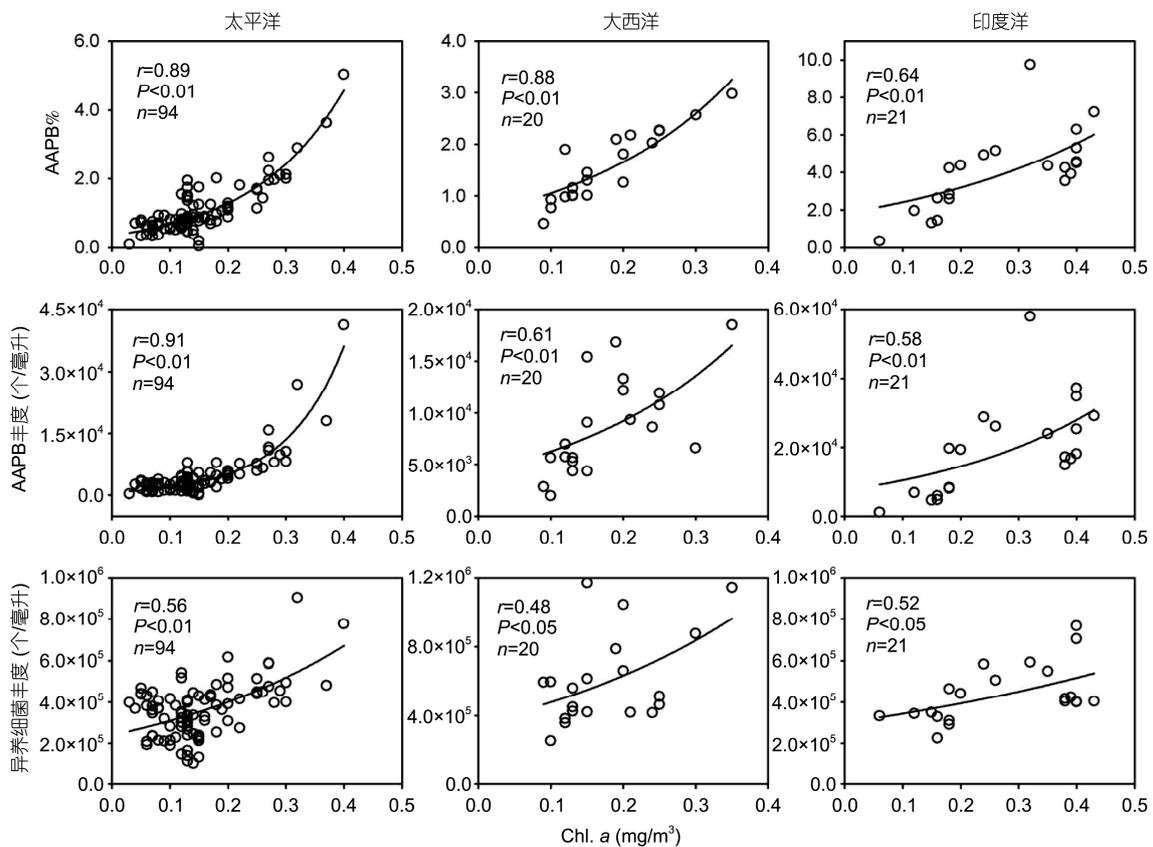


图6 太平洋、大西洋和印度洋表层水中AAPB丰度、AAPB比例、non-AAPB丰度与叶绿素的相关性

回归方程式为  $y=ae^{bx}$ (Jiao等,2007)

响,背后的机理不言而喻:可供AAPB利用的DOC,的确主要来自浮游植物.这是否意味着可供AAPB利用的碳源种类少于non-AAPB的?相对于non-AAPB,AAPB是否更“挑食”?

为了进一步回答以上的问题,我们对典型的

AAPB和non-AAPB进行了BIOLOG碳源检测分析.实验结果表明AAPB可利用碳源的种类确实显著少于non-AAPB(图8).至此,结合上述一系列逻辑推理和实验结果,看似矛盾的现象最终得到了解释:表面上AAPB具有利用光能的生理优势,但因为其“挑

食”(较窄的碳源利用谱), 导致了其在寡营养大洋环境中的丰度和相对丰度要远小于近岸富营养的环境 (Jiao等, 2007, 2008).

至此, 关于AAPB准确的全球分布规律及其环境调控机制的科学故事得到了圆满阐述. 然而, 科学家并没有止步于此, 因为科学的发展是在不断探寻真相的基础上, 思考、总结并提炼其背后更具有普遍规

律的科学理论.

#### 4 提出“海洋微生物碳泵(MCP)”理论框架

对科学问题不断探索的本身, 同样会产生重要的科学思想: 既然AAPB功能类群存在较专一的碳源利用谱, 那么多样性如此之高的异养细菌类群是否

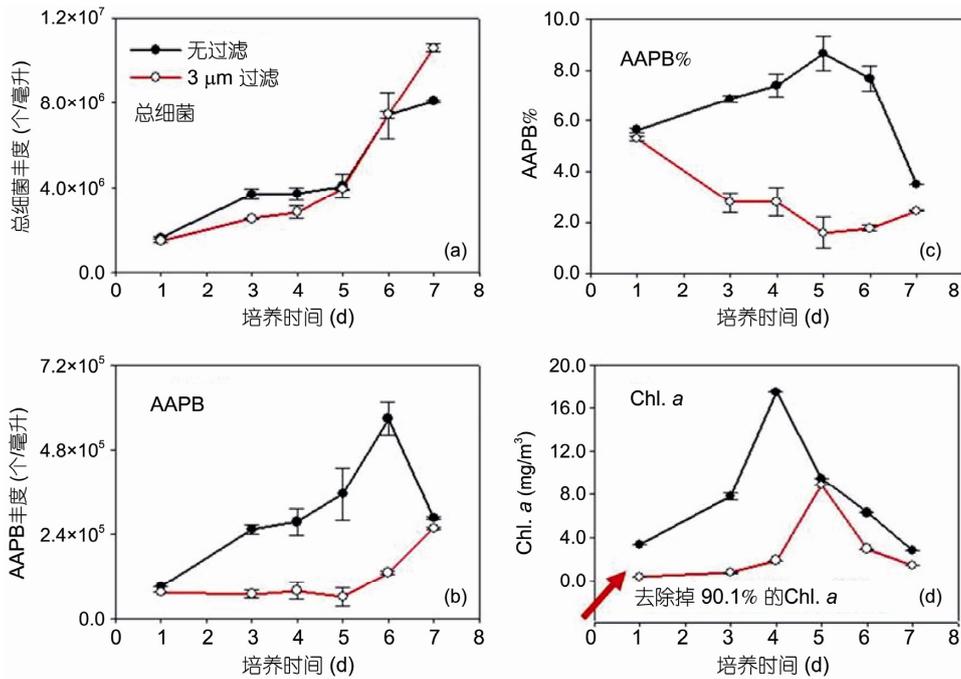


图7 厦门近岸现场培养实验

上图红色线条表示经过 3 μm 预过滤去除浮游植物的实验组, 黑色线条表示未经过滤保留浮游植物的对照组; (a)~(d) 分别表示总细菌丰度、AAPB 丰度、AAPB 所占总细菌比例和叶绿素浓度随时间变化情况

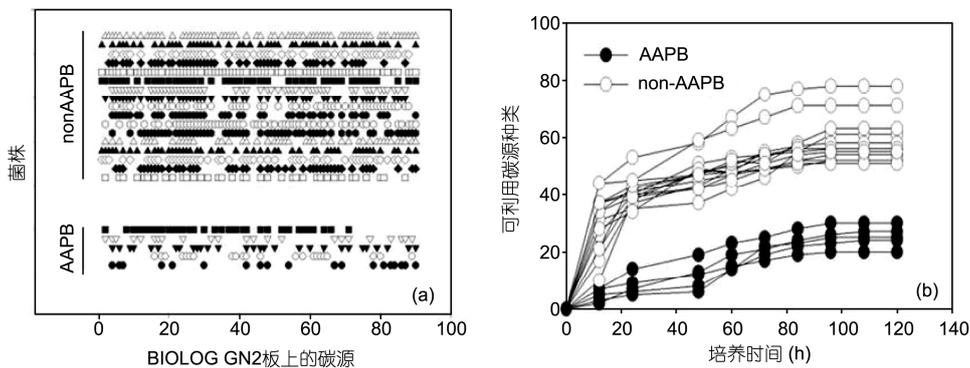


图8 典型 AAPB 菌株和 non-AAPB 菌株对于 BIOLOG 不同碳源的利用情况对比

(a) 每一横排标志代表一株菌对于 BIOLOG GN2 板上 96 种碳源的利用情况, 有标志出现则代表可以利用该种碳源, 无标志则代表不能利用该种碳源; (b) 不同培养时间点下各菌株利用碳源的种类

也具有各自碳源利用特异性呢? 这种微型生物介导的碳分馏和转化效应在海洋碳循环中有何重要意义? 海洋中为什么会存在巨大的溶解有机碳库? 其来源是什么? 什么因素会影响此有机碳库的变化?

对这些科学问题及其相关海洋科学问题的探索, 科学家创新性的提出了“微生物碳泵”(Microbial Carbon Pump, MCP)理论框架(图9和图10), MCP从全新的视角, 解释了上述海洋碳循环的众多科学问题(Jiao等, 2010b). 海洋微型生物(细菌为主)能够快速利用活性溶解有机碳(Labile DOC, LDOC, 如PDOC), 同时产生相对惰性的溶解有机碳(Refractory DOC, RDOC), RDOC不易被利用, 因此能够长期存在于海洋环境中, 最终实现了海洋储碳. 由于MCP储碳机制不同于依赖颗粒沉降的生物泵, 所以亦被称为“非沉降生物泵”.

MCP理论指出, 作为与 DOC联系最密切的生物组份, 海洋微型生物是RDOC的主要贡献者. 众所周知, 自养微型生物可以产生DOC、异养微型生物可以吸收利用DOC. 然而, 人们经常忽视一个重要的过程, 即异养微型生物在利用DOC的同时, 也产生DOC, 这其中包括RDOC, RDOC可以在水体中长期保存和积累, 最终构成海洋中巨大的RDOC碳库. MCP不依赖物理沉降过程, 不会导致海洋酸化, 其储碳周期长达数千年(Jiao等, 2010b).

MCP理论的提出, 不仅解答了海洋中巨大RDOC碳库的来源问题, 而且也为海洋碳循环研究开辟了一个全新的视角, 是海洋科学领域的重要突破, 对于海洋碳循环和全球海洋碳循环机制的研究具有

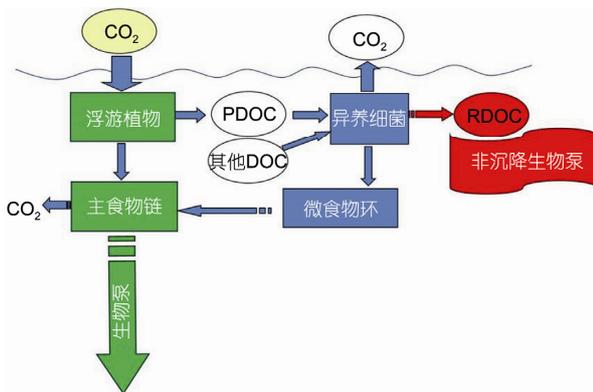


图9 “非沉降生物泵”(红色)与“沉降”生物泵  
焦念志(2009)

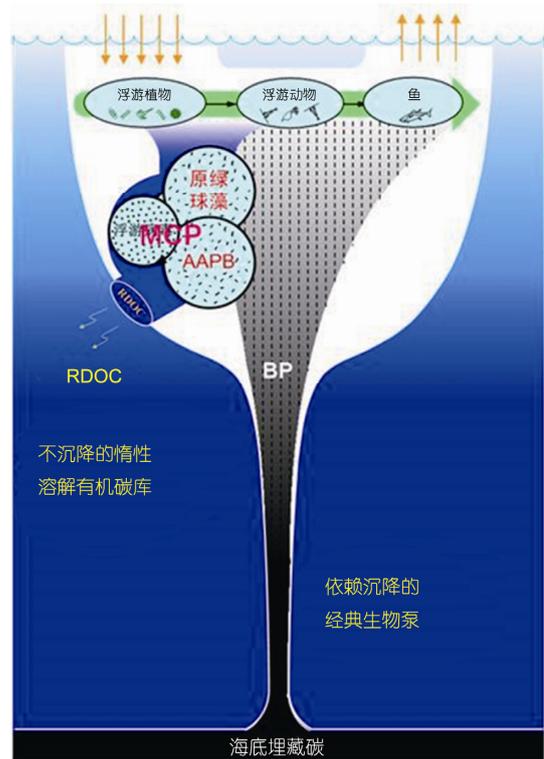


图10 海洋碳循环涉及的主要生物过程, 其中微生物碳泵是构成海洋 DOC 库的关键过程

BP 生物泵, MCP 微生物碳泵, RDOC 惰性溶解有机碳(焦念志, 2012)

重要意义. “微生物碳泵”和“生物泵”相互补充, 涵盖了“非沉降”和“沉降”过程, 形成了对于海洋储碳机制更全面和系统的认识(Jiao等, 2010b; 焦念志等, 2011, 2013; 焦念志, 2012). 基于MCP理论框架的前瞻性, 它被Science评论为“巨大碳库的幕后推手”; Science/AAAS出版了MCP的Science增刊; 国际海洋科学委员会(SCOR)为此设立了MCP科学工作组(WG134), 工作组开展了卓有成效的工作, 取得了令人瞩目的成绩.

## 5 总结

实现科学新发现的途径不止一条, 如实验仪器本身的创新, 长期实验结果到规律的总结等. 然而, 科学创新的源泉多姿多彩, 不乏从科学方法创新到科学理论创新, 这正是科学本身的魅力所在. MCP理论框架的提出(图11)生动地展示了这一科学规律:

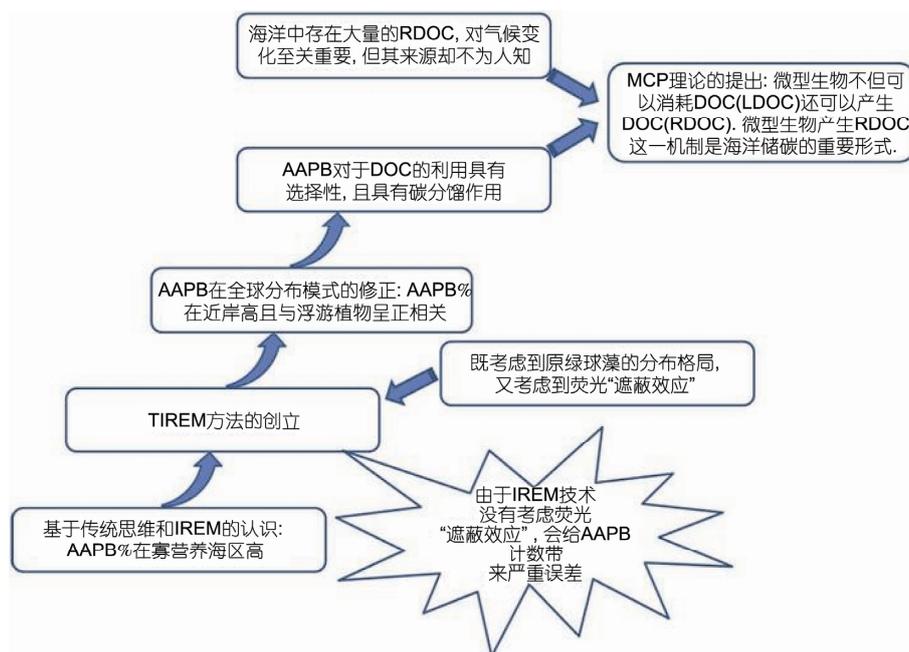


图 11 从 AAPB 计数方法的修正到 MCP 理论的提出示意图

TIREM方法的建立, 解决了IREM方法问题的同时, 实现了AAPB的准确定量, 揭示了AAPB真实的全球分布规律, 但这一规律与逻辑常识“看似矛盾”. 为探索真相, 科学家研究了影响AAPB分布的因素, 发现它们对DOC具有选择利用性. 将在AAPB类群上的这一认识推广到其他海洋异养细菌, 同时结合RDOC在全球海区大量存在的事实, 创造性地提出了MCP理论框架. 回顾整个历程, 不难发现, 科学家对一系列科学问题不懈的探索和思考, 每个过程, 每个步骤, 都生动展示了科学方法创新带动科学理论发现这一规律.

科学创新的大门, 始终为执着于科学的“有心人”敞开着.

**致谢** 两位审稿人及刘燕婷、张翊哲和陈晓炜在文章修改中给予了宝贵的建议, 在此一并谢忱.

### 参考文献

焦念志. 2009. 海洋微生物生态学(第2版). 北京: 现代教育出版社  
 焦念志. 2012. 海洋固碳与储碳——并论微生物在其中的重要作用. 中国科学: 地球科学, 42: 1473-1486  
 焦念志, 骆庭伟, 张瑶, 张锐, 汤凯, 陈峰, 曾永辉, 张永雨, 赵艳琳, 郑强, 李彦玲. 2011. 海洋微生物碳泵——从微生物生

态过程到碳循环机制效应. 厦门大学学报: 自然科学版, 50: 387-401  
 焦念志, 汤凯, 张瑶, 张锐, 徐大鹏, 郑强. 2013. 海洋微生物储碳过程与机制概论. 微生物学通报, 40: 71-86  
 Jiao N Z, Herndl G J, Hansell D A, Benner R, Kattner G, Wilhelm S W, Kirchman D L, Weinbauer M G, Luo T W, Chen F, Azam F. 2010b. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: Long-term carbon storage in the global ocean. Nat Rev Microbiol, 8: 593-599  
 Jiao N Z, Zhang C L, Chen F, Kan J, Zhang F. 2008. Frontiers and technological advances in microbial processes and carbon cycling in the ocean. Biological Oceanography Research Trends. New York: NOVA Science Publishers Inc. 217-267  
 Jiao N Z, Zhang F, Hong N. 2010a. Significant roles of bacteriochlorophylla supplemental to chlorophylla in the ocean. ISME J, 4: 595-597  
 Jiao N Z, Zhang Y, Chen Y. 2006. Time series observation based InfraRed Epifluorescence Microscopic (TIREM) approach for accurate enumeration of bacteriochlorophyll-containing microbes in marine environments. J Microbiol Meth, 65: 442-452  
 Jiao N Z, Zhang Y, Zeng Y H, Hong N, Liu R L, Chen F, Wang P X. 2007. Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean. Environ Microbiol, 9: 3091-3099  
 Kolber Z S, Gerald F, Lang A S, Beatty J T, Blankenship R E, VanDover C L, Vetricani C, Koblizek M, Rathgeber C, Falkowski P G. 2001. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the

- carbon cycle in the ocean. *Science*, 292: 2492–2495
- Kolber Z S, Van Dover C, Niederman R, Falkowski P. 2000. Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature*, 407: 177–179
- Schwalbach M S, Fuhrman J A. 2005. Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR. *Limnol Oceanogr*, 50: 620–628
- Sieracki M E, Gilg I C, Thier E C, Poulton N J, Goericke R. 2006. Distribution of planktonic aerobic anoxygenic photoheterotrophic bacteria in the northwest Atlantic. *Limnol Oceanogr*, 51: 38–46
- Yurkov V V, Beatty J T. 1998. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol Mol Biol R*, 62: 695–724
- Zhang Y, Jiao N Z. 2004. Method for quantification of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Chin Sci Bull*, 49: 597–599
- Zhang Y, Jiao N Z. 2007. Dynamics of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the East China Sea. *FEMS Microbiol Ecol*, 61: 459–469