

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2016.0072

季凤云, 明红霞, 李洪波, 等. 2016. 南海表层海水参与卡尔文循环的固碳基因多样性研究[J]. 环境科学学报, 36(11): 4037-4043

Ji F Y, Ming H X, Li H B, et al. 2016. Diversity of CO<sub>2</sub> fixation gene in the surface waters of northern South China Sea in the Calvin cycle[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 36(11): 4037-4043

## 南海表层海水参与卡尔文循环的固碳基因多样性研究

季凤云<sup>1,2</sup>, 明红霞<sup>1</sup>, 李洪波<sup>1</sup>, 咎帅君<sup>3</sup>, 王建宁<sup>4</sup>, 苏洁<sup>1</sup>, 郭立梅<sup>1,2</sup>, 常永凯<sup>1,2</sup>, 石岩<sup>1,2</sup>, 关春江<sup>1</sup>, 樊景凤<sup>1,\*</sup>

1. 国家海洋环境监测中心, 大连 116023

2. 大连海洋大学, 大连 116023

3. 大连理工大学环境学院, 大连 116023

4. 厦门大学海洋与地球学院, 厦门 361005

收稿日期: 2016-01-14

修回日期: 2016-02-24

录用日期: 2016-02-24

**摘要:** 为揭示南海北部表层海水中参与卡尔文循环的固碳基因多样性及其与环境因子的关系, 本研究以卡尔文循环中的关键酶核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RubisCO)的 I、II 型基因(*cbbl*、*cbm*)作为分子标记, 采用 Illumina Miseq 高通量测序技术对海水中的固碳基因多样性进行分析, 并结合多元统计分析的方法, 探讨了固碳基因多样性与环境因子的关系。结果显示, 在南海北部表层海水中, 含 *cbbl* 基因固碳基因主要归属于变形菌门(Proteobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes), 其中, 优势亚群分别是  $\gamma$ -变形菌亚门(45.3%)、蓝细菌(30.9%)和  $\beta$ -变形杆菌亚门(23.8%); 而含 *cbm* 基因的固碳菌群未检测到; 近岸的 A9 站与其他站位物种组成有一定的差异, 异着色菌属(*Allochromatium*)、硫杆菌属(*Thiobacillus*)和硫单胞菌属(*Thiohalomonas*)为其特有属。相关性和冗余分析(RDA)结果显示, 含 *cbbl* 基因的固碳基因丰度与水温、盐度呈显著负相关( $p < 0.01$ ), 与硝酸盐、亚硝酸盐、硅酸盐呈显著正相关( $p < 0.01$ )。

**关键词:** 珠江口; 卡尔文循环; *cbbl* 基因; *cbm* 基因; 固碳基因多样性

文章编号: 0253-2468(2016)11-4037-07

中图分类号: X172

文献标识码: A

## Diversity of CO<sub>2</sub> fixation gene in the surface waters of northern South China Sea in the Calvin cycle

Ji Fengyun<sup>1,2</sup>, Ming Hongxia<sup>1</sup>, Li Hongbo<sup>1</sup>, Zan Shuaijun<sup>3</sup>, Wang Jianning<sup>4</sup>, Su Jie<sup>1</sup>, Guo Limei<sup>1,2</sup>, Chang Yongkai<sup>1,2</sup>, Shi Yan<sup>1,2</sup>, Guan Chunjiang<sup>1</sup>, Fan Jingfeng<sup>1,\*</sup>

1. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023

2. Dalian Ocean University, Dalian 116023

3. School of Environmental Science & Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116023

4. College of Ocean and Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361005

Received 14 January 2016;

received in revised form 24 February 2016;

accepted 24 February 2016

**Abstract:** To elucidate the diversity of CO<sub>2</sub> fixation and its relationship with environmental factors in surface water of northern South China Sea, the coding gene form I (*cbbl*) and form II (*cbm*) (that encodes Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) were chosen as biomarkers in Calvin-Benson-Bassham cycle (a common carbon fixation pathway for chemolithoautotrophic microorganisms) to analyze the carbon sequestration gene diversity. The Illumina Miseq sequencing method and multivariate statistical analysis were employed. The *cbm* gene was not detected in any of samples, while the *cbbl* gene was found in all samples. The *cbbl*-containing genetic communities were dominated by Proteobacteria, Cyanobacteria and Firmicutes, in which  $\gamma$ -Proteobacteria (45.3%), Cyanobacteria (30.9%),  $\beta$ -Proteobacteria (23.8%) were predominant subpopulation. There were differences between the nearshore station of A9 with other stations, in which *Allochromatium*, *Thiobacillus* and *Thiohalomonas* were unique species in A9 station. Relativity and redundancy analysis suggest that water temperature, salinity, nitrate, nitrite, silicate were highly statistically significant factors.

基金项目: 全球变化与海气交互作用专项(No. GASI-03-01-02-05); 海洋公益性行业科研专项(No. 201305030 201405007)

Supported by the Special Fund of the Global Change and the Air-Sea Interaction(No. GASI-03-01-02-05) and the Special Public Welfare Interest of Marine Scientific Research(No. 201305030 201405007)

作者简介: 季凤云(1988—)女, E-mail: jifengyun321@126.com; \* 通讯作者(责任作者), E-mail: jffan@nmemc.org.cn

Biography: Ji Fengyun(1988—) female, E-mail: jifengyun321@126.com; \* Corresponding author, E-mail: jffan@nmemc.org.cn

Temperature and salinity were positively ( $p < 0.01$ ), while the other three factors negatively influenced  $\text{CO}_2$  fixation gene of *cbbL* gene abundance ( $p < 0.01$ ).

**Keywords:** Pearl River estuary; Calvin-Benson cycle; *cbbL* gene; *cbbM* gene; carbon sequestration genetic diversity

## 1 引言( Introduction)

固定  $\text{CO}_2$  的细菌一般有两类: 光能自养型细菌和化能自养型细菌(周集体等, 1999). 卡尔文循环是光能自养生物和化能自养生物同化  $\text{CO}_2$  的主要途径, 其中, 核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RubisCO) 是卡尔文循环中的关键酶( Tabita *et al.*, 1999). RubisCO 酶含有大小两个亚基, 最保守的位点位于大亚基, 而 RubisCO 酶大亚基 I 型和 II 型分别由 *cbbL* 和 *cbbM* 基因编码, 因此, 可以用这两种基因进行保守区序列的扩增、比对和系统发育分析( Watson *et al.*, 1997). *cbbL* 基因也被许多学者用于环境样品的固碳细菌多样性研究, 研究热点从陆地生态系统延伸到了水生生态环境( Yuan *et al.*, 2012; Giri *et al.*, 2004). 与 16S rRNA 基因标记相比, 功能基因可直接靶向环境中具有特定生理或生物地球化学功能的类群, 从而在系统发育分析方面更具有优势( Paul *et al.*, 1998), 因此, 通过研究 *cbbL* 和 *cbbM* 基因的多样性可以反映主要固碳细菌的群落结构.

近年来, 用 RubisCO 基因( *cbbL* 和 *cbbM*) 来反映固碳细菌多样性的研究主要集中在土壤( Yuan *et al.*, 2012)、深海热液口( Hügler *et al.*, 2010)、地下水( Alfreider *et al.*, 2009)、湖泊( Giri *et al.*, 2004), 而在河口区( 近海生态系统) 其相关研究较少. 与深海大洋相比, 近海生态系统仅占全球海洋面积的 7% ~ 8%, 但其有机碳埋藏量占整个海洋碳埋藏量的 90%, 并且至少有 50% 的颗粒无机碳沉积于此. 此外, 近海海洋环境易受人为活动影响, 大量有机质和营养盐通过河流排入并汇集于此. 因此, 陆架边缘海域在全球碳循环中的作用不容忽视( Song *et al.*, 2011). 因南海北部是国内最大的边缘海之一, 在北部的陆架区珠江口有大量淡水注入, 使微生物组成、多样性受其影响, 其独特的地理环境在很大程度上影响着该海域海洋水文和环流状况( 袁梁英等 2005). 因此, 本文选取珠江口附近海域到南海北部水域的 6 个站位, 采用高通量测序技术对 *cbbL*、*cbbM* 基因多样性进行分析, 研究其固碳基因多样性组成和分布特征, 并进一步探讨其与环境因子的关系.

## 2 方法与材料( Materials and methods)

### 2.1 样品采集和化学指标测定

本研究搭载中国科学院南海海洋研究所“实验 1”科考船, 于 2014 年 8 月 20 日—9 月 4 日进行样品采集, 根据离岸距离布设 6 个站位: A9、J2、J4、I1、K3、Seats. 具体采样站位如图 1 所示.

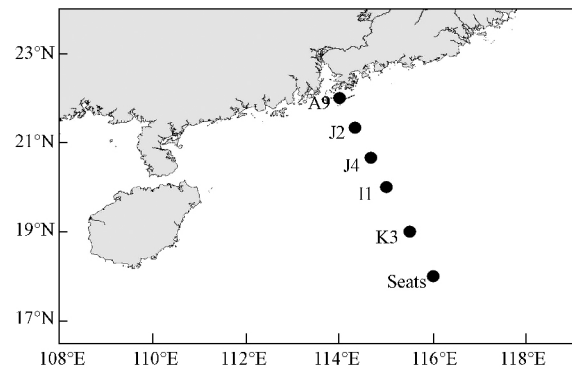


图 1 采样站位分布

Fig. 1 Distribution of sampling stations

使用卡盖式便携采水器对表层海水进行采集, 每个站位采集 3 个平行样, 每个平行样采集 2 L 海水, 充分混匀后, 取 2 L 水经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤, 滤膜液氮保存, 用于 *cbbL* 和 *cbbM* 基因的群落结构分析.

水温、盐度使用便携式水质分析仪 YSI-556 (USA) 进行走航现场测定, 硝酸盐、硅酸盐、亚硝酸盐、磷酸盐按照国标方法测定( 国家海洋环境监测中心 2007); 细菌生产力( BP) 通过 3H-亮氨酸示踪法测定( Kirchman *et al.*, 1993).

### 2.2 细菌 DNA 提取、PCR 扩增和高通量测序

运用 CTAB 传统方法, 对过滤过海水的微孔滤膜进行总 DNA 提取. 通过分光光度仪测定 DNA 样品的浓度和纯度.

以总基因组 DNA 为模板, 进行 *cbbL* 和 *cbbM* 基因的 PCR 扩增, 采用两步法. *cbbL* 第一轮扩增引物: F ( 5'-GACTTCACCAAAGACGACGA-3') 和 R ( 5'-TCGAACCTTGATTTCTTTCCA-3'), 带有融合引物的 *cbbL* 二轮引物: F ( 5'-CATCATGTTTCGACCAGGACT-3') 和 R ( 5'-TCGAACCTTGATTTCTTTCCA-3') ( Campbell *et al.*, 2004); *cbbM* 扩增引物: F ( 5'-TTCTGGCTGGG

(G/T/C) GG(A/T/C) GA(C/T) TT(C/T) AT(C/T) AA-RAA(A/G) GACGA-3') 和 R(5'-CCGTGRCC(A/G) GC(G/A/C) CG(A/G) TGGTA(A/G) TG-3') (Elsaied *et al.*, 2001). PCR 反应体系为: 2 × Taq PCR Master mix 12.5 μL, 引物 (10 pmol·μL<sup>-1</sup>) 各 0.2 μL, DNA 模板为 2 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL. *cbbL* 基因的 PCR 扩增反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 45 min; 第二轮扩增循环数为 20 次. *cbbM* 基因的 PCR 扩增反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 10 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min. PCR 产物用胶纯化试剂盒 (AMPure XP PCR purification kit) 纯化, 等量混合后送至华大基因运用 Illumina Miseq 平台进行高通量测序.

### 2.3 生物信息分析

下机数据经过数据过滤, 通过检测 3' 端接头和引物, 去除模糊碱基、单碱基高重复区及长度过短的低质量的 Reads, 剩余高质量的 Clean Data 用于后期分析; 利用 Reads 之间的 Overlap 关系, 运用 FLASH 软件将 Reads 拼接成 Tags; 然后通过 USEARCH 软件 (v 7.0.1090) 将拼接好的 Tags 在 97% 的相似度下聚类为 OTU. 利用 RDP Classifier 软件 (v 2.2) 将 OTU 代表序列与数据库比对进行物种注释; 基于 OTU 和物种注释结果进行样品物种复杂度分析及组间物种差异分析. 最后通过 Mothur 软件 (v 1.31.2) 计算样品的 Alpha 多样性值 (Chao、Ace、Shannon 和 Simpson 指数), 并用 R (v 3.0.3) 软件做出相应的稀释曲线图. 地理站位、相关性和冗余分析分别采用软件 Surfer 8.0、SPSS 17.0 和 CANOCO 5.0 完成.

## 3 结果 (Results)

对 *cbbL* 和 *cbbM* 基因进行扩增, 所有样品的

*cbbL* 基因 PCR 扩增结果均为阳性, 且浓度达到上机要求, 可进行高通量测序 (测序所得序列已提交到 NCBI 的 SRA 数据库, 登录号为 SRP070472); 而 *cbbM* 基因的 PCR 扩增为阴性, 未进行后续测序分析.

### 3.1 *cbbL* 固碳基因的多样性

通过计算稀释曲线来表明样品的取样大小是否合理. 分析显示 (图 2), 各样点的稀释曲线都有着趋于平缓的趋势, 表明本次实验测序深度已经能反映出该海域中的绝大多数含 *cbbL* 固碳基因的固碳菌群.

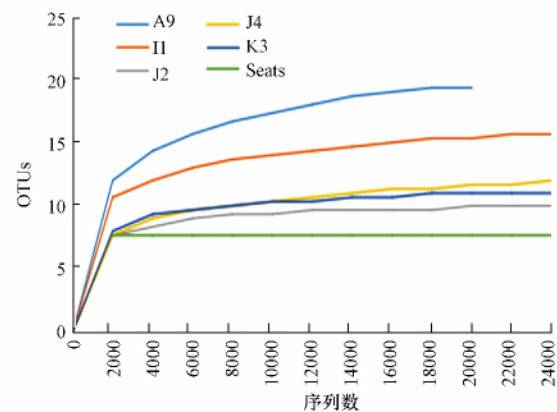


图 2 海水样品的稀释曲线

Fig. 2 Dilution curve of seawater samples

在该海域中, A9 站位的 OTU 数最多, 为 16 个. 通过 RDP Classifier 程序对不同样品的基因序列进行分类, 用 Ace、Chao1 指数反映样品中群落的丰富度, 用 Shannon 和 Simpson 指数来定量描述该水域的生物多样性 (这两个指标反映的是 Alpha 多样性, Shannon 指数与生物多样性成正比, 而 Simpson 指数与之相反, 值越大, 生物多样性越低), 结果见表 1. 由表 1 可知, A9 站位 OTU 数最多, 而其它几个站位变化不大; 在含 *cbbL* 基因的固碳菌群中, A9 站位物种最丰富; A9 站位相较于其他站位具有较高的生物多样性.

表 1 *cbbL* 基因序列分析

Table 1 *cbbL* gene sequence analysis

站位	OTU 数	序列数	Ace 指数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	数量				
							门	纲	目	科	属
A9	16	24018	59	58	1.80	0.274	3	5	9	11	13
J2	8	25892	31	31	1.35	0.361	2	4	5	5	6
J4	11	25995	41	39	1.41	0.306	2	4	7	7	10
I1	14	25921	51	49	1.87	0.230	2	4	8	8	12
K3	11	25749	33	33	1.14	0.469	2	4	6	6	8
Seats	11	25675	41	39	1.22	0.421	2	4	6	7	7

### 3.2 *cbbL* 固碳基因的群落组成特征

本研究共获得 3 个门、5 个纲、9 个目、11 个科、17 个属。在该海域内优势亚群分别是  $\gamma$ -变形菌亚门 ( $\gamma$ -Proteobacteria, 45.3%)、蓝细菌 (Cyanobacteria, 30.9%)、 $\beta$ -变形菌亚门 ( $\beta$ -Proteobacteria, 23.8%)。厚壁菌门 (Firmicutes) 只在 A9 站位发现, 并且变形菌门在 A9 站位 (98.9%) 所占的比例与其他 5 个站位所占比例有很大差异 (J2: 43.4%, J4: 76.7%, I1: 62.9%, K3: 73%, Seats: 67.3%)。

在属水平上细菌的主要组成见图 3, 测序得到 3 个菌群中共包括 17 个属, 其中, 丰度较高的是外硫红螺菌属 (*Ectothiorhodospira*, 58.8%)、亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*, 17.7%)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*, 13.6%)。由图 3 可知, 在本实验所选取的 6 个站位中, 离岸最近的 A9 站位菌群最丰富, 并且与其他站位相比存在其独特的菌属: 异着色菌属 (*Allochromatium*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、硫单胞菌属 (*Thiohalomonas*)。

本研究采用 Miseq 高通量测序的方法, 对南海北部近珠江口水域表层海水中含 *cbbL* 基因的细菌群落结构进行分析, 共获得 3 个门、5 个纲、9 个目、

11 个科、17 个属。在该海域内优势亚群分别是  $\gamma$ -变形菌亚门 ( $\gamma$ -Proteobacteria, 45.3%)、蓝细菌 (Cyanobacteria, 30.9%)、 $\beta$ -变形菌亚门 ( $\beta$ -Proteobacteria, 23.8%)。厚壁菌门 (Firmicutes) 只在 A9 站位发现, 并且变形菌门在 A9 (98.9%) 站位所占的比例与其他 5 个站位所占比例有很大差异 (J2: 43.4%, J4: 76.7%, I1: 62.9%, K3: 73%, Seats: 67.3%)。

在属水平上细菌的主要组成见图 3, 本研究所得到的 3 个菌群共包括 17 个属, 其中丰度较高的是外硫红螺菌属 (*Ectothiorhodospira*, 58.8%)、亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*, 17.7%)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*, 13.6%)。由图 3 中可知, 在本研究所选取的 6 个站位中, 离岸最近的 A9 站位固碳基因多样性最丰富, 并且与其他站位相比存在其独特的菌属: 异着色菌属 (*Allochromatium*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、硫单胞菌属 (*Thiohalomonas*)。

此外, 各站位中都含有一些无法确定其分类位置的序列, 表明该海域存在一些未被认知的固碳菌群。

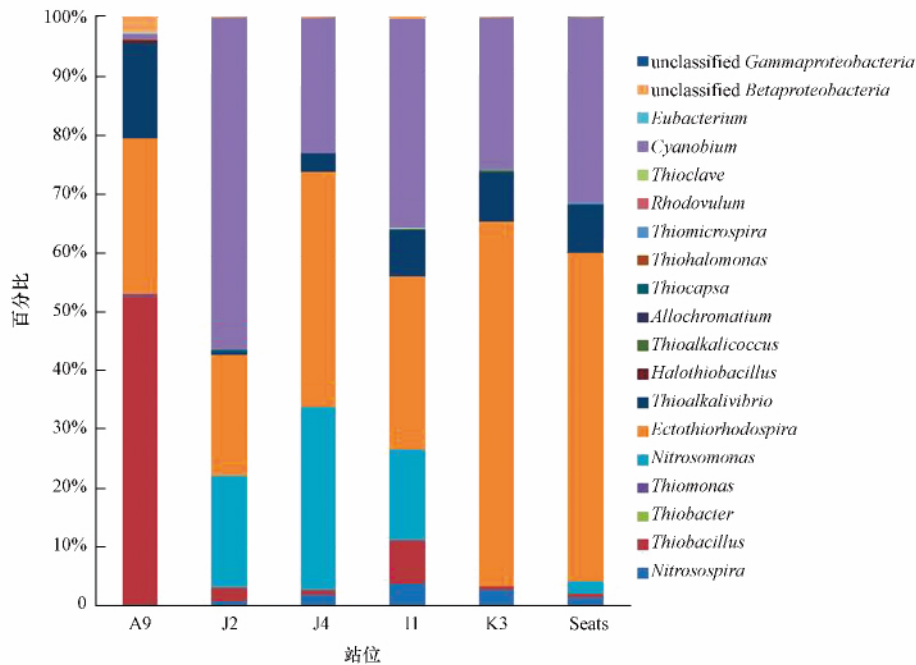


图 3 属水平上的群落组成

Fig. 3 Community composition on the genus level

PCA 分析是指运用方差分解的方法, 将多组数据的差异反映在二维坐标图上, 如果两个样品距离越近, 则表示这两个样品的组成越相似。为进一步

分析各站位之间细菌组成的差异和距离, 对不同样品 OTU (97% 相似性) 组成进行了 PCA 分析。由图 4 可以看出, A9、J2 站位与其他 4 个站位物种组成有

较大的差异, J4、I1、K3、Seats 距离较近, 物种组成也较相似。

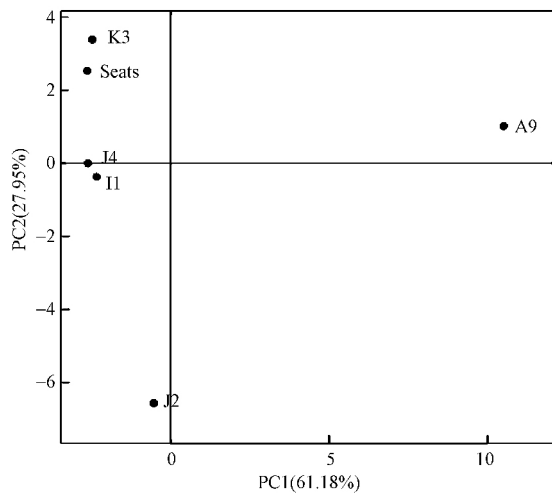


图4 基于 OTU 丰度的 PCA 分析

Fig. 4 PCA analysis based on the abundance of OTU

### 3.3 含 *cbbL* 基因的固碳细菌与环境因子相关性

由上述分析可知, 不同站位之间细菌群落结构差异较大. 为了解这种差异的形成原因, 对其主要影响因子进行了分析. 夏季南海北部表层海水测得的环境因子如表 2 所示. 由表 2 可知, 近珠江口的 A9 站位的水温、盐度均低于其他 5 个站位, A9 站位的硝酸盐、硅酸盐、亚硝酸盐和细菌生产力均高于离岸较远的其他 5 个站位.

为研究该海域环境因子对含 *cbbL* 基因的固碳细菌群落组成的影响, 对环境因子和主要固碳菌群进行了 Pearson 相关性分析和冗余分析 (Redundancy Analysis, RDA) 结果如图 5 所示. 由图 5 可知, 硫碱弧菌属 (*Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、盐硫杆菌属 (*Halothiobacillus*)、异着色菌属 (*Allochromatium*)、硫单胞菌属 (*Thiohalomonas*)、硝化菌属 (*Thiobacter*) 与水温 and 盐度呈显著负相关 ( $p < 0.01$ ), 与硝酸盐、亚硝酸盐、硅酸盐、细菌生产力呈显著正相关 ( $p < 0.01$ ).

表 2 不同站位主要环境因子

Table 2 Main environmental factors of different stations

站位	水温/°C	盐度	硝酸盐/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	硅酸盐/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	亚硝酸盐/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	磷酸盐/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	BP/ ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ )
A9	27.7	20.0‰	59.29	56.24	5.677	0.40	0.40
J2	29.3	33.3‰	0.09	0.63	0.015	0.19	0.18
J4	30.0	33.5‰	0.09	0.25	0.013	0.17	0.03
I1	29.9	33.7‰	0.14	0.91	0.010	6.95	0.14
K3	29.8	33.4‰	0.06	1.29	0.016	0.19	0.08
Seats	29.6	33.3‰	0.13	0.75	0.003	0.20	0.18

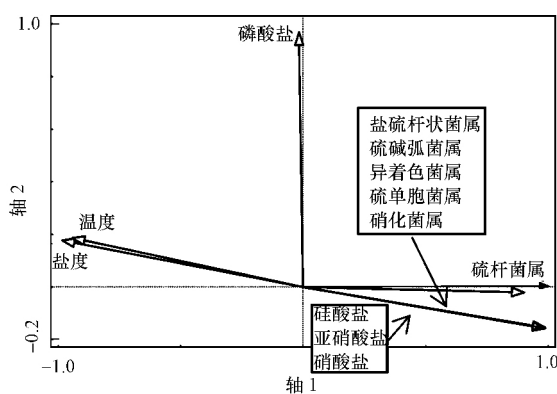


图5 固碳细菌群落与环境因子的 RDA 分析

Fig. 5 Carbon sequestration bacterial communities and environmental factors RDA analysis

## 4 讨论 (Discussion)

### 4.1 含 *cbbL* 基因的固碳细菌群落结构分析

本文以探索近珠江口到南海北部水域表层海水中含 *cbbL* 基因多样性为研究目的, 获得了丰富的固碳细菌群落, 这些菌群归属于 3 大门类: 变形菌门、蓝藻门和厚壁菌门. 其中, 变形菌门在 6 个站位中都占有重要的比例 (43.4% ~ 98.9%), 这一结果与其他学者的研究结果一致 (Alfreider *et al.*, 2012). 在本研究中, 变形菌门的  $\gamma$ -和  $\beta$ -亚群是该海域表层海水中的优势菌群, 其中  $\gamma$ -变形菌在细菌中所占的比例是目前所知最多的一类亚群, 它包括一些重要的类群 (Kovaleva *et al.*, 2011); 如在本研究各站位中都具有较大比例的外硫红螺菌属, 该菌属

可以利用光能,固定二氧化碳,这与其所发挥的生态功能十分吻合,与此同时,该菌属在本研究中也属于 $\gamma$ -变形菌亚门最多的一个属.本研究中还发现了大量属于 $\beta$ -变形菌亚门的硫杆菌属,有学者利用不含有有机碳源的硫代硫酸钠培养基进行硫杆菌的富集和分离,并进行功能基因的扩增得到了*cbbL*基因,推测可能是由于菌株利用无机碳进行固碳,从中取得能量并进行微弱生长(李少能等,2012).由此可见,这些变形菌群在海洋碳循环中具有重要作用.该研究水域中蓝藻门是第二大优势菌群,在6个站位中均有检出,它是一类产氧光合细菌,是海洋生态系统和细菌生产力的重要组成部分(白洁等,2014).蓝藻门在东海海水(Zeng et al., 2004)、地下水(国家海洋环境监测中心,2007)、潮间带和湖泊沉积物(Nigro et al., 2007)中均有发现.厚壁菌门是一类化能营养型菌群,在本研究中只出现在营养盐较高的A9站位,且存在数目较少(0.1%);已有学者证实少数厚壁菌门也参与卡尔文循环,其中,属于厚壁菌门的梭菌目还可以通过还原乙酰辅酶A途径固定CO<sub>2</sub>和产生甲烷生长所需要的醋酸(Caldwell et al., 2007).

#### 4.2 未检测到*cbbM*固碳基因的原因分析

本研究中对表层海水中*cbbM*基因的检测结果均为阴性,Giri等(2004)在美国莫诺德湖也未检测到该基因.分析原因可能有以下两方面:①含*cbbM*基因的固碳菌群广泛分布于厌氧的 $\alpha$ -变形菌门中(English et al., 1992),而本研究采集的是南海北部海域表层海水,厌氧菌较少,同时分析本研究中*cbbL*基因多样性表明, $\gamma$ -和 $\beta$ -变形菌亚门是该海域表层海水中的优势亚群,而非 $\alpha$ -变形菌亚门,所以未能扩增出*cbbM*的目的条带;②Alfrider等(2012)和Videmšek等(2009)研究表明,低CO<sub>2</sub>浓度的环境有利于含*cbbL*固碳基因的固碳细菌的生长,但不利于含*cbbM*固碳基因的细菌生长.*cbbL*多在好氧细菌中被发现,而*cbbM*在低氧和高二氧化碳浓度下有较高活性(Badger et al., 2008);另有研究表明,南海海水中表层含氧量较高(刘小涯等,2006).因此可以推测,本研究中表层海水中未扩增出*cbbM*基因的原因可能与表层海水中溶解O<sub>2</sub>和CO<sub>2</sub>含量有关(Alfrider et al., 2012).

#### 4.3 含*cbbL*基因的固碳细菌群落与环境因子的关系

近岸营养盐丰富,硝酸盐、亚硝酸、磷酸盐和硅

酸盐是细菌生长繁殖所必需的营养物质,加之细菌较大的表面积,对营养物质具有高亲和力,为固碳细菌的生存和发展提供了适宜的条件;并且前期已有研究表明,无机营养物可能是细菌生长的影响因子(Chrzanowski et al., 1995),因此,近岸A9具有较复杂的群落结构和高细菌生产力.通过Pearson相关性和冗余分析进一步分析表明,含*cbbL*基因的固碳细菌丰度与硝酸盐、亚硝酸盐、硅酸盐呈显著正相关( $p < 0.01$ ),这一研究结果与前期研究一致(Gontero et al., 2014).此外,含*cbbL*基因的固碳细菌丰度与水温、盐度呈显著负相关( $p < 0.01$ ),表明该海域固碳菌群还受水温、盐度的影响.在近珠江口区,由于陆源淡水注入,使离岸最近的A9站位构成了低盐、高营养盐特点,为异着色菌属(*Allochromatium*)、硫杆菌属(*Thiobacillus*)、硫单胞菌属(*Thiohalomonas*)提供了特有的生存条件,使得这些菌群只在调查海域的A9站位附近的水域生存.

#### 5 结论(Conclusions)

1) 在珠江口到南海北部海域表层海水中,存在的固碳基因主要以*cbbL*为主,这说明含*cbbL*基因的固碳细菌是该海域表层海水中参与卡尔文循环途径的主要菌群.

2) 珠江口到南海北部水域中以*cbbL*为固碳基因的固碳菌群主要归属于3个类群,分别为变形菌门(69.1%)、蓝藻门(30.8%)和厚壁菌门(0.1%),其中,优势亚群为 $\gamma$ -变形菌亚门(45.3%)、蓝细菌(30.9%)、 $\beta$ -变形菌亚门(23.8%).

3) 该海域水温、盐度、硝酸盐、亚硝酸盐、硅酸盐等因素是影响*cbbL*固碳细菌群落结构的主要因素.

责任作者简介:樊景凤(1972—),女,研究员,主要研究方向为海洋细菌学和海洋生态学. E-mail: jffan@nmemc.org.cn.

致谢:厦门大学海洋与地球学院为本研究提供了航次营养盐及温度盐度资料,中科院南海海洋研究所“实验1号”船长及全体船员在样品采集过程中给予了很大的帮助,在此一并表示感谢.

#### 参考文献(References):

Alfrider A, Schirmer M, Vogt C. 2012. Diversity and expression of different forms of RubisCO genes in polluted groundwater under

- different redox conditions [J]. *FEMS Microbiology Ecology* ,79( 3) : 649-660
- Alfreider A ,Vogt C ,Geiger-Kaiser M , *et al.* 2009. Distribution and diversity of autotrophic bacteria in groundwater systems based on the analysis of RubisCO genotypes [J]. *Systematic and Applied Microbiology* ,32( 2) : 140-150
- 白洁 ,刘小沙 ,侯瑞 ,等. 2014. 南海南部海域浮游细菌群落特征及影响因素研究[J]. *中国环境科学* ,34( 11) : 2950-2957
- Badger M R ,Bek E J. 2008. Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO<sub>2</sub> acquisition by the CBB cycle [J]. *Journal of Experimental Botany* ,59: 1525-1541
- Caldwell P E ,MacLean M R ,Norris P R. 2007. Ribulose biphosphate carboxylase activity and a Calvin cycle gene cluster in *Sulfobacillus* species [J]. *Microbiology* ,153( 7) : 2231-2240
- Campbell B J ,Cary S C. 2004. Abundance of reverse tricarboxylic acid cycle genes in free-living microorganisms at deep-sea hydrothermal vents [J]. *Applied and Environmental Microbiology* ,70 ( 10) : 6282-6289
- Chrzanowski T H ,Stern R W ,Elser J J. 1995. Nutrient enrichment and nutrient regeneration stimulate bacterioplankton growth [J]. *Microbial Ecology* ,29( 3) : 221-230
- Elsaied H ,Naganuma T. 2001. Phylogenetic diversity of ribulose-1 ,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from deep-sea microorganisms [J]. *Applied and Environmental Microbiology* ,67 ( 4) : 1751-1765
- English R S ,Williams C A ,Lorbach S C , *et al.* 1992. Two forms of ribulose-1 ,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Thiobacillus denitrificans* [J]. *FEMS Microbiology Letters* ,94( 1/2) : 111-119
- Giri B J ,Bano N ,Hollibaugh J T. 2004. Distribution of RuBisCO genotypes along a redox gradient in Mono Lake ,California [J]. *Applied and Environmental Microbiology* ,70( 6) : 3443-3448
- Gontero B ,Salvucci M E. 2014. Regulation of photosynthetic carbon metabolism in aquatic and terrestrial organisms by Rubisco activase , redox-modulation and CP12 [J]. *Aquatic Botany* ,118: 14-23
- 国家海洋环境监测中心. 2007. GB17378.4-2007. 海洋监测规范第4部分: 海水分析[S]. 北京: 中国标准出版社
- Hügler M ,Gärtner A ,Imhoff J F. 2010. Functional genes as markers for sulfur cycling and CO<sub>2</sub> fixation in microbial communities of hydrothermal vents of the Logatchev field [J]. *FEMS Microbiology Ecology* ,73( 3) : 526-537
- Kirchman D L. 1993. Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria [J]. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* ,509-512
- Kovaleva O L ,Tourova T P ,Muyzer G , *et al.* 2011. Diversity of RuBisCO and ATP citrate lyase genes in soda lake sediments [J]. *FEMS Microbiology Ecology* ,75( 1) : 37-47
- 李少能. 2012. 南大西洋深海硫氧化细菌的分离鉴定与多样性初步分析[D]. 福州: 福建农林大学
- 刘小涯 ,潘建明 ,张海生 ,等. 2006. 南海海水中 DO 的平面 ,垂直分布以及海-气交换通量[J]. *海洋学研究* ,23( 4) : 41-48
- Nigro L M ,King G M. 2007. Disparate distributions of chemolithotrophs containing form IA or IC large subunit genes for ribulose-1 ,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in intertidal marine and littoral lake sediments [J]. *FEMS Microbiology Ecology* ,60( 1) : 113-125
- Paul J H ,Pichard S L. 1998. Phytoplankton Activity through the Measurement of Ribulose Bisphosphate Carboxylase Gene Expression ( Rubisco ) //Molecular Approaches to the Study of the Ocean [M]. Netherlands: Springer. 207-225
- Ragsdale S W ,Wood H G. 1991. Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO<sub>2</sub> fixation [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* ,26( 3/4) : 261-300
- Song J. 2011. Biogeochemical Processes of Biogenic Elements in China Marginal Seas [M]. Berlin: Springer Science & Business Media
- Tabita F R. 1999. Microbial ribulose 1 ,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase: a different perspective [J]. *Photosynthesis Research* ,60 ( 1) : 1-28
- Videmšek U ,Hagn A ,Suhadolc M , *et al.* 2009. Abundance and diversity of CO<sub>2</sub>-fixing bacteria in grassland soils close to natural carbon dioxide springs [J]. *Microbial Ecology* ,58( 1) : 1-9
- Watson G M F ,Tabita F R. 1997. Microbial ribulose 1 ,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a molecule for phylogenetic and enzymological investigation [J]. *FEMS Microbiology Letters* ,146( 1) : 13-22
- Yuan H ,Ge T ,Chen C , *et al.* 2012. Significant role for microbial autotrophy in the sequestration of soil carbon [J]. *Applied and Environmental Microbiology* ,78( 7) : 2328-2336
- 袁梁英. 2005. 南海北部营养盐结构特征[D]. 厦门: 厦门大学
- Zakharchuk L M ,Egorova M A ,Tsaplina I A , *et al.* 2003. Activity of the enzymes of carbon metabolism in *Sulfobacillus sibiricus* under various conditions of cultivation [J]. *Microbiology* ,72( 5) : 553-557
- Zeng Y H ,Jiao N Z ,Cai H Y , *et al.* 2004. Phylogenetic diversity of ribulose-1 ,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit genes of bacterioplankton in the East China Sea [J]. *Acta Oceanol Sin* ,23: 673-685
- 周集体 ,王竞. 1999. 细菌固定 CO<sub>2</sub> 的研究进展 [J]. *环境科学进展* ,7 ( 1) : 1-9