

学校编码:

密级

学号: 22320131151451

廈門大學

硕士学位论文

海洋微生物群落、呼吸速率及受控因素的研究

Study on Marine Microbial Community, Respiration Rate
and Controlled Factors

张庆花

指导教师姓名: 焦念志 教授

党宏月 教授

专业名称: 海洋生物技术

论文提交日期: 2017年 月

论文答辩时间: 2017年 月

2017年 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):

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.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 海洋微生物.....	1
1.2.1 海洋微生物的概念.....	1
1.2.2 海洋微生物的生态意义.....	3
1.2.3 海洋微生物与碳循环.....	5
1.3 海洋微生物呼吸作用.....	6
1.3.1 微生物呼吸作用的概念.....	6
1.3.2 呼吸作用检测方法的发展.....	7
1.4 海洋微生物呼吸速率研究现状.....	10
1.4.1 河口区的微生物呼吸作用.....	10
1.4.2 外海区的微生物呼吸作用.....	11
1.4.3 海洋中的微生物呼吸速率的影响因素.....	11
1.5 本论文的科学意义及研究目标.....	15
第二章 南海北部水体呼吸速率空间分布特征及受控因子分析.....	18
2.1 研究背景.....	18
2.2 材料与方法.....	19
2.2.1 采样站位.....	19
2.2.2 实验准备.....	20
2.3 样品检测.....	21
2.3.1 环境参数样品检测.....	21
2.3.2 呼吸速率样品预处理.....	21
2.3.3 呼吸速率样品检测.....	24
2.3.4 本实验所用的主要仪器设备.....	24
2.4 实验结果.....	25

2.4.1 环境因子分布特征.....	25
2.4.2 呼吸速率分布特征.....	28
2.4.3 呼吸速率受控因子分析.....	31
2.5 讨论.....	34
2.6 小结.....	37
第三章 南海北部水体细菌和古菌对呼吸速率作用的初探.....	38
3.1 研究背景.....	38
3.2 材料与方法.....	39
3.2.1 采样与实验站位.....	39
3.2.2 DNA 提取	39
3.2.3 PCR 扩增.....	41
3.2.4 Illumina Miseq 测序.....	41
3.2.5 序列数据分析.....	42
3.2.6 本研究使用的主要仪器设备.....	43
3.3 实验结果.....	43
3.3.1 环境因子分析.....	43
3.3.2 序列多样性分析	44
3.3.3 细菌与古菌类群分析.....	47
3.3.4 细菌与古菌群落的影响因子分析.....	55
3.3.5 细菌与古菌群落对群落呼吸速率的作用.....	59
3.4 讨论.....	59
3.5 小结.....	62
第四章 模拟体系中时间序列下呼吸速率分布及受控因子分析.....	63
4.1 研究背景.....	63
4.2 材料与方法.....	64
4.2.1 采样位点.....	64
4.2.2 实验流程.....	65
4.2.3 样品采集.....	66
4.2.4 样品检测.....	66

4.2.5 本研究使用的主要仪器设备.....	66
4.3 实验结果.....	68
4.3.1 环境因子分析.....	68
4.3.2 原核生物丰度分析.....	69
4.3.3 呼吸速率分析.....	70
4.3.4 原核生物丰度对呼吸速率的影响.....	72
4.3.5 呼吸速率受控因子分析.....	73
4.4 讨论.....	75
4.5 小结.....	76
第五章 主要结论、创新点、不足与展望.....	78
5.1 主要结论.....	78
5.2 创新点.....	78
5.3 不足与展望.....	79
参考文献	81
致谢.....	94

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Overview	1
1.2 Marine microbes	1
1.2.1 What are marine microbes	1
1.2.2 Why we should study marine microbial ecology.....	3
1.2.3 Marine microbes and carbon cycle	5
1.3 Marine microbe respiration rate	6
1.3.1 What is marine microbes respiration rate.....	6
1.3.2 The development of marine microbes respiration rate detection.....	7
1.4 The research status of respiration	10
1.4.1 Respiration in estuary	10
1.4.2 Respiration in the open ocean	11
1.4.3 The control factors of respiration rate.....	11
1.5 The significance and the goal of research	15
Chaper 2 The spatial distribution and control factors of respiration rate in the northern South China Sea	18
2.1 Background	18
2.2 Material and method	19
2.2.1 Sampling stations	19
2.2.2 The preparation for experiment	21
2.3 The detection of samples	21
2.3.1 The detection of environment factors	21
2.3.2 The pretreatment of respiration samples.....	21
2.3.3 The detection of respiration samples	24
2.3.4 The instrument for samples detection.....	25

2.4 Results	25
2.4.1 The results of environment factors	25
2.4.2 The results of nutrients.....	28
2.4.3 The control factors of respiration rate.....	31
2.5 Discussion	34
2.6 Conclusion	37
Chapter 3 The role of bacteria and Archaea community structure to respiration in South China Sea	38
3.1 Background	38
3.2 Material and method	39
3.2.1 Sampling sites	39
3.2.2 DNA extraction	39
3.2.3 PCR amplication	41
3.2.4 Miseq Illumina.....	41
3.2.5 Sequence analysis	42
3.3.6 The main instrument and software.....	43
3.3 Results	44
3.3.1 Environment factor analysis	44
3.3.2 Diversity analysis	44
3.3.3 Bacteria and Archaea community analysis.....	48
3.3.4 Bacteria and Archaea community control factors analysis	55
3.3.5 The role of bacteria or Archaea for respiration.....	59
3.4 Discussion	59
3.5 Conclusion	62
Chapter 4 The temperal distribution and control factors of respiration rate in simulation system	63
4.1 Background	63
4.2 Material and method	64

4.2.1 Sample sites	64
4.2.2 The process of the experiment	65
4.2.3 Collect the samples	66
4.2.4 The samples detection.....	66
4.2.5 The main instrument and software.....	66
4.3 Results	68
4.3.1 Environment factor	68
4.3.2 Microbial abundance.....	69
4.3.3 Respiration rate	70
4.3.4 The influence of microbial abundance to respiration	72
4.3.5 The control factors of respiration rate.....	73
4.4 Discussion	75
4.5 Conclusion	76
Chapter 5 Conclusions, remarks, deficiencies and prospects	78
5.1 Conclusions.....	78
5.2 Remarks	78
5.3 Deficiencies and prospects.....	79
References.....	81
Acknowledgements	94

摘要

海洋在全球气候变化中扮演着举足轻重的作用，具有吸收和储藏CO₂的能力，对海洋碳循环的研究已经成为当今的热点。微型浮游生物在海洋呼吸作用中发挥了很大的作用，且主要通过代谢活动实现碳在海洋生态系统中循环。呼吸作用代表着海洋中有机物的消耗及循环流通，对于有机碳在沉积物中的积累，或者输出到大气中的CO₂的量是十分重要的，这对于衡量生态系统中碳收支平衡必不可少。因此，海洋微型生物呼吸作用的研究为我们更好地了解海洋生态系统的碳通量提供了依据。微生物呼吸速率的研究已经在迅速发展，同时环境因素对原核生物呼吸速率的影响也得到了一定的证实。但由于测定方法的不同及不同水体生态系统中呼吸速率对环境因子响应存在差异，这对我们理解微型浮游生物呼吸速率与受控因子之间的关系仍然有很大的限制。因此，对这些微生物群落的呼吸作用以及影响因素的研究对于充分了解碳通量是至关重要的。

为了阐明南海珠江口到南海海盆区微型生物群落呼吸速率的分布及影响因素；本研究采用电子传递体系统（Electron Transport System, ETS）活性检测方法，开展了微型生物群落呼吸（Microbial community respiration, MCR）、海洋浮游生物中细菌和古菌类群多样性及受控因子的调查研究；为了说明模拟体系中不同层位、不同粒径微生物群落呼吸速率对于藻液添加的响应及其呼吸速率的受控因子影响，在Aquatron模拟实验体系中通过藻液碎片的添加，长时间序列下监测了表层和底层（10 m）呼吸速率的响应。揭示了大于0.2 μm 的MCR（0.2 MCR）与大于0.8 μm 的MCR（0.8 MCR）两种粒径范围中的微型生物代谢对添加的藻液的直观响应，为我们更好地了解碳通量提供了基础。研究结果如下：

1、通过对南海珠江口到南海海盆区的微型浮游生物呼吸速率的空间分布特征分析，说明了该地区呼吸作用消耗的碳量；通过调查微型生物的呼吸速率与环境条件的相关关系，揭示了微生物群落呼吸速率的影响因子。南海北部水体呼吸速率的总体分布特征为从近岸到远海，从表层到底层逐渐降低（Seats站除外）。相比于北大西洋，南海北部区域呼吸速率偏低。南海北部群落呼吸速率不仅与原核生物（细菌与古菌）丰度、叶绿素、温度等因素呈现显著正相关，还与磷酸盐、溶解氧、硅酸盐等非生物因素呈现显著负相关性，可能是因为原核生物对于溶解态的营养盐循环十分重要，因为它们可以作为营养盐的分解者存在。

2、在南海北部珠江口近岸到外海的研究中发现，细菌、古菌类群多样性的分布特征对南海珠江口到南海海盆区的环境梯度有一定的响应，古菌类群的分布特征为近岸水体古菌量比较低，含有少量的 MGI; MGII 等为表层海水的优势类群；MGI 等为海洋的 200m 以下的无光层区域的优势类群，叶绿素最大层及陆架区底层主要的优势类群为 MGI 及 MGII。通过群落呼吸速率与微生物群落多样性及原核生物丰度的相关关系分析发现，微生物的群落呼吸作用主要由该环境中的优势类群贡献。南海北部，近岸中对微生物群落呼吸速率贡献比较大的作用细菌类群是放线菌、 δ -变形菌及 γ -变形菌等；陆架区的表层对呼吸速率贡献比较大的作用类群是 γ -及 α -变形菌等；深层无光海水中，主要的作用类群是 α -变形菌及 γ -变形菌等群落。

3、Aquatron 体系克服了“瓶子实验”无法分层等缺点，进行了藻液添加对不同层位呼吸速率影响的分析。通过对 Aquatron 培养条件下微生物群落呼吸速率影响因素的研究发现，表层的 0.2 MCR 与培养体系中原核生物丰度及氧化还原电位呈现显著正相关关系，底层的 0.2 MCR 与原核生物丰度呈现显著的正相关性。破碎藻液的添加为呼吸作用提供了有机物来源，有机物的提供及原核生物丰度对于微生物呼吸速率的影响比较大。藻液添加后，底层 0.2MCR 变化相比于表层的比较小，表明，表层 0.2MCR 对添加的颗粒物质的响应更大，初步分析，可能是受到上层原核生物的对碳消耗作用（呼吸作用）的影响。

4、由上可知，在南海北部，微生物呼吸速率主要受原核生物丰度、叶绿素及温度影响，并且对呼吸速率贡献的主要类群为此环境下的优势类群，如变形菌等。模拟体系的结果显示，表层 0.2MCR 对添加的颗粒物质的响应更大，会受到上层原核生物呼吸作用对颗粒物消耗的影响，同时原核生物丰度对呼吸速率影响也比较大。通过对比自然环境与模拟体系中群落呼吸速率的受控因子发现，二者共同点为原核生物丰度都对呼吸速率呈现正相关关系，都是影响呼吸速率的主要因素，不同点为自然水体中，温度与呼吸速率呈现正相关，影响比较大，而模拟体系中，温度的影响作用不显著。这可能是因为模拟体系的温度相对稳定，变化不大，外源有机物的输入影响了微生物呼吸速率。

关键词：微型生物群落呼吸；异养微生物；ETS 活性检测方法；碳通量；代谢活动

Abstract

The ocean plays an important role in global climate change, with the ability to absorb and store CO₂. The ocean carbon cycle has captured our attention. Marine heterotrophic bacteria play a very important role in ocean carbon cycle with their metabolism activities. The respiration represents the consumption or flux of organic matter in the oceans, which is important for the accumulation of organic carbon in sediments or the output of carbon dioxide to the atmosphere. Respiration is essential for measuring the carbon balance in ecosystems. Thus, the study of marine microbe respiration provides a basis for us to better understand the carbon fluxes of marine ecosystems. The detection method of microbial respiration rate is developing now, and the control factors of the prokaryotic respiration rate has been confirmed. However, because of the different method, the research found that respiration rate has a different response to the environmental factors in various sea water ecosystems. There are still many unknowns about the relationship between the microbe respiration rate and its controlled factor. Therefore, the research of Marine heterotrophic bacterioplankton metabolic activity and the influenced factors of these microbial populations is essential for our understanding of carbon flux.

To elucidate the ecological characteristics of marine microbes in different environmental conditions, Electron Transport System (ETS) activity measurement has gained acceptance as a routine technique to estimate the Microbial community respiration (MCR). Marine heterotrophic bacterioplankton diversity and its control factors were investigated in the Pearl River estuary. To show the result of different particle size microbe respiration rate in different layers and the effect of algal solution and the environment factor, we added the algal to the Aquatron simulation system. The different size (0.2μm and 0.8μm) MCR was studied in Aquatron Tower Tank for 40 days. At the same time, the bacteria abundance and environment factors in different layers were investigated. The results of the study are as follows:

- 1、 Our research showed the carbon flux in the south of South China sea (from the Pearl River to the open ocean) along the contrasting physicochemical characteristics.

The overall distribution of marine microbe respiration in the northern South China Sea is characterized by decreasing from the near shore to the open ocean, from the surface to the bottom (except Seats station). To reveal the relationship between environmental conditions and microbes respiration, we studied the the relationship between respiration rate of microbes in the various stations. The respiration rate was positively correlated with the abundance of bacteria, chlorophyll, temperature, and negatively correlated with phosphate, dissolved oxygen, silicate and other abiotic factors showed a significant negative correlation in the northern South China Sea.

2、 From the coastal area to the open ocean we have got Bacteria and Archaea community and diversity in five stations in the South China Sea. This study found that bacteria and archaea species diversity distribution along the environmental gradient of the Pearl River estuary in South China Sea. We found that the key role for respiration rate of microbes is mainly contributed by the dominant taxa in the environment based on the correlation analysis of microbial abundance, taxonomic diversity and metabolic. The populations of the archaea mainly distributed in the surface seawater is MGII. MGI is the dominant group of the level below 200m in the ocean. The main dominant groups in the continental shelf area and the Depth of Chlorophyll Maximum (DCM) are MGI and MGII. In the surface layer of the continental shelf area was mainly contributed by the γ - and α - proteobacteria; in the deep seawater, the main group is α -proteobacteria and γ - proteobacteria and other groups.

3、 For the culture experiment, the Aquatron system overcomes the shortcomings of the "bottle experiment", simulates the process of particle organic matter sinking. We studied the influencing factors of the respiration rate of microbial groups under Aquatron culture conditions. The results showed that the 0.2MCR showed a significant positive correlation with the abundance and redox potential of the culture system in the Tower tank surface. 0.2 MCR of the bottom and the abundance of bacteria showed significant positive Correlation. The positive correlation between respiration rate and microbial abundance, indicate that the contribution of main microbial population to the 0.2 MCR is heterotrophic microbes. The algae provide the source of organic matter for the respiration rate, and the effect of organic matter on microbial metabolism and

abundance is more important. The 0.2MCR in the bottom is smaller to the surface. Maybe the respiration in the surface influenced the bottom respiration.

4、 In summary, in the northern part of the South China Sea, the microbial respiration rate is mainly affected by microbial abundance, chlorophyll and temperature, and the main contribution to the respiration rate is the dominant group in this environment. Under the dark culture condition, the Aquatron system overcomes the shortcomings of the "bottle experiment" and simulates the sinking of particle organic matter. The results show that the organic particles are affected by the consumption of the upper prokaryotes in the sinking process. Respiratory rate is mainly controlled by microbial abundance. By comparing the respiration rate between the natural sea water and the simulated system, we found that microbial abundance has a positive correlation with the respiration rate, which is the main factor affecting the respiration rate. The difference is in natural sea water the respiration rate showed a positive correlation with temperature, but for the simulation system, the impact of temperature is not significant. This may be due to the relatively stable temperature of the simulation system, and the input of organic matter affects the microbial respiration rate.

Key words: microbial community respiration; heterotrophic microbes; ETS activity detection method; carbon flux; metabolic activity

第一章 绪论

1.1 引言

海洋在全球气候调节中扮演着举足轻重的作用,对海洋碳循环的研究是当今的热点。海洋每年从大气中净吸收大约 22 亿吨的碳,已吸收了工业革命以来人类排放 CO₂ 的~48% (Sabine et al., 2004)。同时是一个巨大的碳库,海洋的碳储量达到大气碳量的 60 倍左右,是陆地生物圈的 20 倍(Denman et al., 2007),仅海洋惰性溶解有机碳库(Recalcitrant dissolved organic carbon, RDOC)中的碳储量(624 GT C)(Hansell et al., 2009)就可以与大气中的二氧化碳量(750 GT C)(Falkowski et al., 2000; Hedges et al., 1992; Ogawa, et al., 2003)相媲美。海洋中的碳循环与大气中 CO₂ 分布比较均匀的情况不同,海洋碳循环主要是指海洋中碳元素的生物地球化学循环。海洋中碳的分布既受海洋环流场的影响,而且还与碳元素在海洋中的生物地球化学代谢过程有关,其过程和机制不仅在于海洋吸收了大气中二氧化碳后所发生的一系列的物理、化学变化层面,还在于生物(包括生态)层面(Azam et al., 1993; Coply, 2002; Azam et al., 2007; Riebesell, 2007; Suttle, 2007; Mou et al., 2008),且生物固碳过程与储碳机制已经成为当前研究焦点(Lal, 2008)。海洋中的呼吸作用代表着海洋中有机物的汇,而微型浮游生物在海洋呼吸作用中占了很大的比重。微型生物的呼吸作用是海洋浮游生态系统中碳循环的重要过程之一(Martínez-García et al., 2009)。因此,在全球气候变暖的背景下,测定海洋中微型生物的呼吸作用,对于更进一步了解海洋生态系统碳循环、海洋中的碳吸收及碳储存机制,寻找增加海洋储碳的途径,营造健康的海洋生态系统有重要作用。

1.2 海洋微生物

1.2.1 海洋微生物的概念

浮游生物(plankton)是Hensen在1887年首次提出来,是指在水流运动下,被动漂浮在水层中的生物群(Willams et al., 2001)。对于海洋中广泛分布的各种单细胞浮游生物,个体极小(小于20微米)的部分,海洋生态学家用一个生态学概念进行了定义--海洋微型生物,它一般指粒径小于 20 μ m的纳微型浮游生物(Nanoplankton, 2~20 μ m)和皮微型浮游生物(Picoplankton, 0.2~2 μ m)(焦念志,

2006; 焦念志, 2009), 这并不是一个严格意义上的生物学概念。通常人们研究的主要包括微型真核自养和异养生物、微型原核自养和异养生物等单细胞生物以及无细胞结构的浮游病毒等多个类群, 它们作为海洋中生物量的主体, 肩负着全球碳循环和能量代谢的重任。

海洋微型生物在驱动海洋碳、磷、氮、铁、硫、硅等生物地球化学元素循环过程中有重要作用 (Azam et al., 2007), 它们小则影响着海洋的局部环境, 大则影响全球的气候变化 (Copley, 2002)。这主要是因为海洋微型生物具有以下特点:

首先, 海洋微型生物是地球上第一批“居民”, 比人类的到来提前了 35~38 亿年 (Brocks et al., 2003)。不仅如此, 它们还能在各种低氧、低光照、高压、高盐等极端环境条件下生存。正是在海洋微型生物的作用下, 使得海洋和大气的成分, 从还原状态的变成富氧的、适合后来生物大量繁衍的环境 (Anbar and Knoll, 2002), 微型生物还跨越了生命的历史长河 (Kasting and Siefert, 2002), 在环境中与其他生物相互作用 (Petsch et al., 2001; Torsvik et al., 2002), 进而有了我们适宜生存的家园。

其次, 微型生物在海洋中生物量十分巨大, 是海洋生物量的主体组分。研究证明, 地球上海洋中的细菌数量高达 10^{29} , 比宇宙中的星体数量 (10^{21}) 还要多, 被视为隐藏在海洋中的“巨人” (Karl, 2002)。在海洋中, 仅细菌的生物量就超出了大型浮游动物及鱼类的总量。海洋微型生物是海洋生物量和生产力的主要贡献者, 其生态作用日益受到重视, 成为海洋碳循环研究中不可或缺的主体。

再次, 海洋微型生物的生命形式是多样化的。例如, 光合浮游植物是光合自养生物, 主要靠光能完成无机物的固定, 这些浮游植物会通过初级生产力为异养生物提供有机物质。光合异养细菌主要在有光条件下通过代谢消耗有机物质进行异养生长。异养细菌主要依靠自养微生物产生的有机物作为能量源和生长的底物。

最后, 微型生物对有机物的能量转换效率高, 且自身具有高生长速率的潜能。海洋微型生物体积小, 因此其大的表面积与体积比, 允许其即使是在营养物质非常低的浓度下也能高效的吸收 (Azam, 1983), 为其快速生长及分裂增殖提供物质基础, 同时也为它们代谢速度快提供了基础。研究指出, 细菌可以消耗 10~50%

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