

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22320131151415

南海氨氧化古菌对初级生产力的贡献

李皓

指导教师

张瑶教授

厦门大学

厦门大学

硕士学位论文

南海氨氧化古菌对初级生产力的贡献

The contribution of ammonia-oxidizing archaea to primary
production in the South China Sea

李皓

指导教师姓名: 张瑶 教授

专业名称: 海洋生物学

论文提交日期: 2016年 月

论文答辩时间: 2016年 月

2016年5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 1 章 前 言	1
1.1 海洋初级生产力.....	1
1.1.1 初级生产力的定义.....	1
1.1.2 海洋初级生产力.....	1
1.1.3 海洋初级生产力的研究意义.....	2
1.1.4 影响海洋初级生产力的因素.....	3
1.1.5 我国海洋初级生产力的研究现状.....	3
1.1.6 海洋初级生产力的研究方法.....	5
1.1.7 黑暗海洋碳循环的研究现状.....	6
1.2 自养固碳途径.....	7
1.3 浮游奇古菌自养固碳.....	15
1.3.1 古菌的重要性与研究领域.....	15
1.3.2 奇古菌的氨氧化与自养固碳机制.....	17
1.4 本论文的设计与研究意义.....	19
第 2 章 利用 $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ 标记技术研究中国南海原核生物对初 级生产力的贡献.....	20
2.1 研究背景.....	20
2.2 材料与方法.....	22
2.2.1 采样.....	22
2.2.2 $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ 添加培养实验步骤.....	24
2.2.3 数据处理.....	27
2.2.4 本研究使用的主要试剂和仪器设备.....	28
2.3 结果.....	29
2.3.1 环境因子分析.....	29

2.3.2 南海初级生产力的分布特征.....	30
2.3.3 大肠杆菌 $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ 培养验证实验.....	35
2.4 讨论.....	36
2.4.1 南海原核生物自养固碳在黑暗海洋对初级生产力的贡献.....	36
2.4.2 利用 $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ 研究原核生物对初级生产力贡献	37
第 3 章 南海古菌 <i>accA</i> (乙酰辅酶 A 羧化酶) 基因多样性、丰度及群落结构研究.....	39
3.1 研究背景.....	39
3.2 材料与方法.....	41
3.2.1 采样.....	41
3.2.2 DNA 提取.....	43
3.2.3 PCR 和 qPCR 分析	44
3.2.4 多样性和系统发育分析.....	45
3.2.5 本研究使用的主要仪器设备和数据分析软件.....	45
3.3 结果.....	47
3.3.1 环境因子分析.....	47
3.3.2 多样性和系统发育分析.....	47
3.3.3 群落结构聚类分析.....	52
3.3.4 基因丰度的时空变化.....	52
3.3.5 原核生物固碳速率与奇古菌 <i>accA</i> 基因丰度的回归性分析.....	54
3.4 讨论.....	55
3.4.1 南海奇古菌是深海初级生产力的重要贡献者.....	55
3.4.2 古菌 <i>accA</i> 的分布特点与多样性.....	56
3.4.3 Cren529F/Cren981R 引物测定奇古菌 <i>accA</i> 基因的偏好性.....	57
第 4 章 珠江口古菌 <i>accA</i> 基因丰度研究.....	59
4.1 研究背景.....	59
4.2 材料与方法.....	59
4.2.1 采样.....	59

4.2.2 DNA 提取.....	60
4.2.3 qPCR 分析.....	60
4.2.4 本研究使用的主要仪器设备和数据分析软件.....	60
4.3 结果与讨论.....	61
4.3.1 珠江口古菌 <i>accA</i> 基因的水平分布特点.....	61
4.3.2 珠江口古菌 <i>accA</i> 基因的垂直分布特点.....	62
第 5 章 主要结论、创新点、不足与展望	64
5.1 主要结论.....	64
5.2 创新点.....	66
5.3 不足与展望.....	66
参考文献.....	68
致谢.....	82

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract (in Chinese)	I
Abstract (in English)	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Marine primary production	1
1.1.1 The definition of primary production	1
1.1.2 Marine primary production	1
1.1.3 The research significance of marine primary production	2
1.1.4 The influencing factors of marine primary production	3
1.1.5 The research status of marine primary production in our country	3
1.1.6 Research methods of marine primary production	5
1.1.7 The research status of dark ocean	6
1.2 Carbon fixation pathways	7
1.3 Autotrophic carbon fixation in planktonic <i>thaumarchaeota</i>	15
1.3.1 The importance and research field of archaeae	15
1.3.2 Amonia oxidation and autotrophic carbon fixation in <i>thaumarchaeota</i>	17
1.4 Design and research significance of this thesis	19
Chapter 2 Using $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ method to investigate the contribution of prokaryotes to the primary production	20
2.1 Background	20
2.2 Materials and Methods	22
2.2.1 Sampling	22
2.2.2 The process of $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ incubation experiment	24
2.2.3 Data analysis	27
2.2.4 Reagents and devices involved in the experiment	28
2.3 Results	29
2.3.1 Analysis of environmental factors	29

2.3.2 The distribution of prokaryotes mediated primary production in the South China Sea.....	30
2.3.3 Verification test of ^{14}C - NaHCO_3 incubation experiment	35
2.4 Discussion.....	36
2.4.1 The contribution of prokaryotic carbon fixation to primary production in the dark ocean of the South China Sea	36
2.4.2 The strength and weakness of ^{14}C - NaHCO_3 method.....	37
Chapter 3 Diversity, spatial distribution and community structure of archaeal <i>accA</i> gene in the South China Sea.....	39
3.1 Background	39
3.2 Materials and methods	41
3.2.1 Sampling	41
3.2.2 DNA extraction.....	43
3.2.3 PCR and qPCR analysis.....	44
3.2.4 Statistical analysis.....	45
3.2.5 Devices involved in the experiments and softwares for data analysis	45
3.3 Results.....	47
3.3.1 Analysis of environmental factors	47
3.3.2 Diversity and phylogenetic analysis	47
3.3.3 Community classification analysis	52
3.3.4 Spatial dynamics of gene abundance	52
3.3.5 Correlation analysis of prokaryotic carbon fixation rate and abundance of archaeal <i>accA</i> gene.....	54
3.4 Discussion.....	55
3.4.1 Ammonia-oxidizing archaea makes significant contribution to primary production in the dark ocean of the South China Sea.....	55
3.4.2 Distribution and diversity of archaeal <i>accA</i> gene	56
3.4.3 The preference of primers Cren529F and Cren981R.....	57

Chapter 4 Abundance of archaeal *accA* gene in the Pearl River

Estuary	59
4.1 Background	59
4.2 Materials and Methods	59
4.2.1 Sampling	59
4.2.2 DNA extraction.....	60
4.2.3 qPCR analysis	60
4.2.4 Devices involved in the experiments and softwares for data analysis	60
4.3 Results and discussion	61
4.3.1 Horizontal distribution of archaeal <i>accA</i> gene in the Pearl River Estuary	61
4.3.2 Vertical distribution of archaeal <i>accA</i> gene in the Pearl River Estuary	62
Chapter 5 Conclusions, remarks, deficiencies and prospects	64
5.1 Conclusions	64
5.2 Remarks	66
5.3 Deficiencies and prospects	66
References	68
Acknowledgements	82

摘要

海洋初级生产力是供养和维持海洋巨大生物资源的物质基础,同时能够通过驱使大气 CO₂ 向海洋转移,来实现对全球气候变化的调节作用,因此加深对海洋初级生产力的认识将有助于我们对海洋生态系统、海洋生物地球化学循环及全球变化等问题的认识。然而目前关于初级生产力的研究主要集中在真光层,而对于占海洋水体近 75%的真光层以下水体的研究则严重落后。另一方面,奇古菌作为古菌的突出代表,既具有海洋中分布的广泛性与高丰度的特点,同时还具有自养碳固定和氨氧化的功能,使得它在海洋碳、氮生物地球化学循环中扮演着重要的角色。因此,本论文运用 ¹⁴C-NaHCO₃ 标记技术测定中国南海黑暗海洋中原核生物对初级生产力的贡献,并利用专一性存在于氨氧化古菌中的 3-羟丙酸/4-羟丁酸循环的关键酶基因 *accA* 作为生物标记,探究氨氧化古菌对于初级生产力的贡献、氨氧化古菌 *accA* 的多样性和群落结构组成,以及珠江口由内到外 *accA* 基因的丰度分布特点。

¹⁴C-NaHCO₃ 培养实验表明中国南海原核生物对于初级生产力的贡献非常高,甚至可能达到了表层沉降有机碳量的 50%。与北大西洋黑暗海洋初级生产力的研究结果相比,虽然固碳速率范围相当(都在 0.1-56.7 μmol C m⁻³ d⁻¹),但是在 500 m 以下水层,中国南海的固碳速率基本上比北大西洋高 1 个数量级。而分子生态学分析表明氨氧化古菌 *accA* 基因在中国南海的多样性很高、分布较均匀,且多样性在水平方向上陆架 > 远海 > 近岸、垂直方向上深层 > 表层,其基因丰度分布垂直方向上也是深层 > 表层,但是在水平方向上则是远海 > 陆架 > 近岸。同时珠江口内氨氧化古菌 *accA* 基因丰度也表现出深层 > 表层、远河口 > 近河口的趋势,说明较高的有机碳浓度并不利于自养氨氧化古菌的生长甚至可能会抑制其多样性。在富含有机碳的表层和近岸,氨氧化古菌倾向于营异养生长;而在有机碳相对缺乏的深层,氨氧化古菌则主要以自养代谢为主。系统发育分析表明,南海氨氧化古菌 *accA* 基因主要分为了三个大的群组(Shallow cluster、SCM-1 like cluster 和 Deep cluster),其中 Shallow cluster 又分为五个 clade, Deep cluster 分为了四个 clade,而 SCM-1 like cluster 则单支成群。在分布上各个分支也具有一定的特异性: Shallow cluster 从近岸到远海以及从表层到底层的分布存在一定的过渡性; Deep cluster 在各站位的分布相对比较平均,且都专一性地存在于陆架

(深层)和远海(深层);而 SCM-1like cluster 主要分布在近岸(表层)和陆架(表层),在深海站位分布较少。群落结构聚类分析表明,在近河口这种特殊的水体环境中,氨氧化古菌 *accA* 基因群落聚为三个类群且与系统发育分析结果相对应,说明有机碳对于氨氧化古菌的种群分化也存在一定的导向作用,促使氨氧化古菌由 Deep cluster 向 Shallow cluster 转化。

关键词:初级生产力;3-羟丙酸/4-羟丁酸循环;*accA* 基因; $^{14}\text{C-NaHCO}_3$;多样性;丰度

Abstract

Marine primary production is the material basis to support and maintain the huge resources of the marine. It can transfer CO₂ from atmosphere into marine, and as a result, marine primary production can play a key role in dealing with the atmospheric problems. So broaden our knowledge about marine primary production can help us to promote the research about marine ecology, marine biogeochemistry and global change. There were a great number of researches related to marine primary production, but most of them are concerning on euphotic layer. The dark ocean comprises nearly 75% of the global ocean's volume, while the studies aimed at this region is rare and our understanding of the dark ocean's carbon cycle remains rudimentary. Compared with bacteria, the knowledge of archaea was limited and together with its extensive distribution (especially in meso- and bathy-pelagic) and high diversity in the marine environment, archaea was encouraged to become the hotspot of marine ecology research. Being as a special archaea, *thaumarchaeota* not only contained the features mentioned above, but also harbored the potential in carbon fixation and ammonia oxidation. All of these features implied that *thaumarchaeota* may play a crucial role in marine carbon and nitrogen biogeochemical cycles. In order to get a deeper understanding of the carbon cycle in the South China Sea, we investigated the contribution of prokaryotes to the primary production using ¹⁴C-NaHCO₃ method. And the key gene (*accA*, acetyl-CoA carboxylase α subunit) of 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle which uniquely exists in *thaumarchaeota* was analyzed to explore the contribution of *thaumarchaeota* to prokaryotic carbon fixation and the diversity, abundance and community composition of *thaumarchaeota*. We also investigated the abundance of *thaumarchaeota accA* in the Pearl River Estuary.

The results of ¹⁴C-NaHCO₃ incubation experiment indicated that prokaryotes make a significant contribution to primary production in the dark ocean, even amount to half of the phytoplankton export production. The carbon fixation rate of the South China Sea was as the same range of the North Atlantic (0.1-56.7 $\mu\text{mol C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), but

the rate was one magnitude higher than that of the North Atlantic at layers below 500 m. Molecular ecological results showed that archaeal *accA* gene had a high diversity and even distribution in the South China Sea. The distribution trend of archaeal *accA* genetic diversity was shelf > offshore > inshore (horizontal) and subsurface > surface (vertical). The abundance of archaeal *accA* gene showed the same vertical distribution as diversity, but the horizontal distribution was offshore > shelf > inshore. And Pearl River Estuary exhibited the same distribution trend as the South China Sea which implied that high organic carbon concentration produced inhibition of growth and diversity of autotrophic archaea, and it forced autotrophic archaea convert into heterotrophic as well. The phylogenetic analysis divided it into 3 clusters (Shallow cluster, SCM-1 like cluster and Deep cluster). Shallow cluster was comprised of shallow clade I, II, III, IV & V, deep cluster included deep clade I, II, III & IV, while SCM-1 like cluster contained only one clade. Shallow cluster experienced a transition among different clades. Deep cluster was evenly and specifically existed in the bottom of shelf station and the dark ocean of offshore station. And SCM-1 like cluster was mainly distributed in the surface of inshore station and shelf station. The abundance, phylogenetic and Community classification analysis of archaeal *accA* gene suggested a shift in their community structure and ecological function among different stations and different layers.

Key Words: Primary production; 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle; *accA*; ¹⁴C-NaHCO₃ method; diversity; abundance.

第 1 章 前言

1.1 海洋初级生产力

1.1.1 初级生产力的定义

初级生产力是指初级生产者通过同化作用从大气或水体中固定二氧化碳合成有机物的能力。这种二氧化碳的固定作用既可以通过光合作用（以光能为能量来源）来完成，也可以通过化能合成作用（以无机化合物氧化或还原所得到的能量为能量来源）来实现。初级生产力又分为总初级生产力（gross primary productivity, GPP）和净初级生产力（net primary productivity, NPP）。前者是指初级生产者所固定的能量或所制造有机碳量，包括植物呼吸消耗在内的全部生产量；后者是指从初级生产量中减去初级生产者呼吸所消耗的能量，其关系如下：
净初级生产力 = 总初级生产力 - 自养生物的呼吸消耗。

1.1.2 海洋初级生产力

能够进行自养固碳、贡献初级生产力的生物称为初级生产者，他们组成了食物链的基础，地球上所有的生命都直接或间接地依赖于初级生产力。陆地生态系统的初级生产者主要是植物，而在水生生态系统中，其主要的初级生产者是藻类。海洋初级生产力是海洋初级生产者通过同化作用将无机物转化为有机物的能力，它是估算海洋生物资源，反映海洋生态环境特征和质量的一个重要参量。海洋中净初级生产力的贡献约占全球碳循环 46%（Field et al., 1998），在全球碳循环中起着举足轻重的作用。海洋初级生产力和全球生物地球化学循环有着密切的关系，研究海洋初级生产力对我们正确理解海洋生态系统，合理运用和管理海洋生物资源和环境都具有重要的意义（唐世林等，2006）。随着世界性的资源与环境问题日益突出，全球碳循环和气候变化、生物资源潜在生产力的评估以及可持续发展等成为人们关注的研究课题，从而使初级生产力成为生物海洋学家、海洋生态学家、水产资源学家等研究的热点之一。尽管海洋占了地球表面积的 71%，其初级生产力也在全球碳循环中起着重要作用，但是我们对于海洋的了解却非常有限，目前人们对海洋的探索还不足 5%，这严重限制了人们对于海洋初级生产力的认识，尤其是在黑暗海洋（真光层以下的区域），人们对于该部分海洋水体碳代谢的认识基本上处于一片空白。

1.1.3 海洋初级生产力的研究意义

工业时代以后,人类活动使得温室气体(包括二氧化碳、甲烷、一氧化二氮、氯氟碳化合物、臭氧)的排放量大大增加,从而导致气候、环境、经济等多方面受到严重影响,且已成为当今人类社会可持续发展最严峻的挑战之一。气候方面的影响主要是全球气候变暖以及气候带向极地扩展,环境方面的影响包括海平面上升、土地沙漠化、缺氧以及病虫害增加等问题。经济方面的影响主要是,小麦和玉米由于受全球气温上升的影响而减产;沿岸沼泽地区的消失会导致鱼类尤其是贝类的数量减少。而且预计在今后相当长的时间里,大气中 CO_2 浓度升高的趋势不会减小。

目前国际上采取的缓解温室效应的措施主要是抑制排放量的增长。这项措施能够从源头上减少温室气体,但是却会严重限制社会的发展与进步,尤其是在我国这样的处在经济发展黄金时期的发展中国家,以牺牲经济发展为代价来换取环境上的改善是不明智也是不现实的,我们需要从其他方面采取措施来降低大气中的温室气体的含量。在这些温室气体中 CO_2 的贡献量最大,达到了 70%,而海洋是地球上最大的碳库,占了地球表面积的 71%,每年能够从大气中净吸收约 22 亿吨碳。同时海洋初级生产力在全球碳循环中起着重要作用,在相当程度上控制着海-气界面二氧化碳的交换,是全球气候变化中的重要内容。Siegenthaler 等 1993 年的研究(Siegenthaler and Sarmiento, 1993)显示,海洋每年吸收约 30-40% 人为排放碳量。因此充分了解与认识海洋初级生产力的贡献量、群落组成、时空变化规律及环境影响因素等,将有助于我们更进一步地认识全球碳循环以及采取更经济、有效的方法来解决人类目前面临的严峻的温室气体问题。

党的十八大提出“提高海洋资源开发能力”,海洋资源作为自然资源的重要组成部分,是支撑沿海地区经济社会可持续发展的关键要素,也是实现“到 2020 年全面建成小康社会宏伟目标”的基本保障。由于海洋水体占据了地球表面积的 71%,因此过去一直认为海洋渔业是取之不尽用之不竭的,但是随着捕捞技术的改进与捕捞力度的加大,海洋渔业资源呈现出资源过度开发与利用不足并存、海洋生态环境压力持续增大等问题。海洋初级生产力作为一个重要的海洋生态指标,能够帮助我们估算海洋资源,从而更好地合理运用和管理海洋生物资源,提升海洋资源的开发水平和利用效率,提高海洋资源对国民经济发展的贡献率,实现海

洋资源的可持续利用。

1.1.4 影响海洋初级生产力的因素

影响海洋初级生产力的因素很多（一汇和崇银，1999），既有理化因素的影响，又有生物因素的影响。理化因素中对于真光层初级生产力来说，最主要的是光照强度和限制性营养盐（氮、磷、铁、锰等），这些因素都严重影响着浮游植物的光合作用效率。而对于海洋深层初级生产力，光照已经不是影响因素，而限制性营养盐以及温盐的影响则更加重要。温度对海洋初级生产力的影响较为复杂，通常情况下在最适温度范围内，自养生物的代谢活性会随着水温升高而升高，其固碳能力也会有所提高，Steemann-Nielsen 等在 1959 年提出的假说认为，浮游植物在亚最适温度的条件下，细胞中固定 CO_2 的酶活性增加。温度还会导致海洋水体产生层化现象，可以通过影响下层营养盐向表层的供给来影响初级生产力。这种现象在四季变化较不显著、温度恒定的海区较为突出，在这些海区，海水的层化现象明显并使水柱水体呈稳定状态，阻碍了深层营养盐向上运输，导致上层自养生物缺乏可利用的营养盐，从而使自养固碳能力维持在一个较低的水平。从全球海洋初级生产力的分布情况可以看出，初级生产力与营养盐浓度之间的关系非常密切。在营养盐浓度较低的开阔大洋，其初级生产力也较低，而在具有上升流的区域，由于上升流可以把富营养的深层水带到上层，从而缓解营养盐对于固碳速率的限制，因此上升流区域的初级生产力则相对较高。

1.1.5 我国海洋初级生产力的研究现状

海洋初级生产力研究在国际上已经经历了大半个世纪。自从 1952 年 Steemann Nielsen 引入了放射性同位素 (^{14}C) 示踪法来测定浮游植物光合作用以来，初级生产力研究出现了长足的进步，不仅对区域性的海洋初级生产力开展了大量观测，而且出现了全球海洋初级生产力的分布图（如图 1-1）。该图是 Koblentz-Mishke 根据 7000 多个观测站取得的数据，并把世界海洋水域分为五种类型统计绘制的。由于世界性的资源和环境等问题和全球碳循环的关注度越来越高，初级生产力在全球碳循环中的重要性也受到越来越高的重视。

我国学者彭作圣等自 60 年代初开始对初级生产力的有关方法进行了研究，但因种种原因而被中断。80 年代初我国海洋初级生产力研究才真正起步，特别是自 1981 年“西太平洋海洋生物学方法论研讨会”之后，我国海洋初级生产力

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 for delivery details.