

# 辽河口沉积物中参与主要生物地化循环的 微生物功能基因分析\*

宋吉雪<sup>1,2</sup> 明红霞<sup>1,2</sup> 石婷婷<sup>1,2</sup> 苏洁<sup>1,2</sup> 陈泉睿<sup>1,2,3</sup>  
金媛<sup>1,2</sup> 樊景凤<sup>1,2</sup>

(1. 国家海洋环境监测中心 大连 116023; 2. 国家海洋环境保护近岸海域生态环境重点实验室 大连 116023;  
3. 厦门大学海洋与地球学院 厦门 361005)

**摘要** 辽河口区域丰富的生物多样性在生物地球化学循环和维持生态系统功能等方面发挥着极其重要的作用。研究辽河口表层沉积物中参与常见地球化学循环的功能基因及其关键影响因子,对揭示和预测辽河口沉积物微生物的功能代谢潜力和受环境变化的影响具有重要意义。应用功能基因芯片(GeoChip 4.0)技术开展微生物功能基因多样性研究。结果表明:在 6 个沉积物样品中,检测到各类型功能基因 48 742 个,反映了 9 个微生物介导的关键生物过程。其中,碳循环相关功能基因最多,其次是氮循环和硫循环,而磷循环相关功能基因较少。各站位生物过程相关的功能基因数量和荧光信号值整体呈由远海到近海上升的趋势,即河相区的微生物功能基因较海相区与混合区普遍丰富。碳循环中参与碳固定的基因荧光信号值最高。氮循环中反硝化功能基因荧光信号值最高。总磷与硝酸盐是影响微生物功能基因多样性分布格局的重要因素。该研究有助于了解环境变化对辽河口沉积物生态系统结构和功能的影响,为研究辽河口表层沉积物微生物介导的生物地球化学循环提供科学依据。

**关键词** 辽河口; 表层沉积物; 微生物; 基因芯片; 功能基因

中图分类号 P736.21 doi: 10.11693/hyhz20201200341

辽河口位于渤海辽东湾北部,是辽宁省最大的入海河流,每年向辽东湾输入大量营养盐和泥沙,具有明显的丰水期与枯水期两个季节性变化,是研究元素生物地球化学循环的热点区域(Canuel *et al.*, 2016; 赵美训等, 2017)。辽河口又作为一个淡咸水过渡区域,大量陆源元素输入和环境因子的共同影响使得沉积物中的微生物更加复杂多样。目前对河口细菌群落的组成已经有了大量的研究,包括德国派克河口(Crump *et al.*, 2004)、法国罗纳河口(Troussellier *et al.*, 2002)、葡萄牙阿维罗河口(Henriques *et al.*, 2006)、中国长江口(Sekiguchi *et al.*, 2002)和美国切萨皮克湾(Kan *et al.*, 2008)。以研究较多的美国切萨皮

克湾为例,其细菌群落呈现出显著的季节性变化和周期性的年际变化特征;这些变化除了受水的滞留时间和细菌生长速度影响外,还可能受其他许多环境因子的影响(Kan *et al.*, 2008; 阚金军等, 2011)。近年来,科学家们正在利用高通量基因组学、转录组学和蛋白质组学等技术去研究自然条件下微生物群落错综复杂的基因多样性和表达,提供了揭示水环境中微生物群落组成和新功能基因的途径。国内目前对于辽河口区域的研究也多集中于反硝化相关功能基因的丰度和多样性分析。因此研究辽河口表层沉积物中功能基因多样性及其变化,对了解和预测辽河口沉积物微生物的功能代谢潜力和受环境变化的影响具

\* 国家重点研发计划“全球变化及应对”专项项目, 2016YFA0601401 号; 国家自然科学基金, 41676115 号; 海洋赤潮灾害立体监测技术与应用国家海洋局重点实验室开放基金, MATHAB201815 号。宋吉雪, 硕士, E-mail: 1602388949@qq.com

通信作者: 樊景凤, 博士生导师, 研究员, E-mail: jffan@nmemc.org.cn

收稿日期: 2020-12-25, 收修改稿日期: 2021-04-25

有重要意义。

近年来,高通量基因组学技术的快速发展,极大地促进了微生物群落的相关研究。与高通量测序技术相比,微生物功能基因芯片“GeoChip”的优势是根据微生物相关的各类功能基因独立设计特异性探针,极大地降低了特殊样品中动植物宿主基因组对微生物群落功能检测的影响(Yang *et al.*, 2014)。GeoChip 4.0 是由周集中教授(Bai *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2014)及其团队研发,包括 570 042 多种寡聚核酸探针,靶向与生物地球化学循环相关的代谢途径(如碳、氮、硫和磷循环、金属电阻、抗生素耐药性和有机修复等)中 2 433 多种功能基因家族及 268 059 多种编码基因。目前关于微生物的功能特征如与代谢途径相关的功能基因、基因在生态系统过程中的代谢潜力等方面开展的研究已有很多(Rui *et al.*, 2015; 张欣等, 2017)。例如利用包含 24 243 个寡核苷酸探针(10 000 多个与氮、碳、硫和磷循环和有机污染物降解相关的功能基因)的功能基因芯片研究了不同纬度上的南极土壤微

生物群落变化等(Zhang *et al.*, 2017)。

本研究利用 GeoChip 4.0 技术,以辽河口为研究区域,研究其表层沉积物微生物功能基因多样性,进而了解影响微生物功能基因多样性的主要环境因子,为揭示和预测辽河口表层沉积物微生物介导的生物地球化学循环提供科学依据,同时为辽河口区域生态环境治理提供了理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

根据辽河口水文特征及相关地理信息,于 2018 年 6 月 12 日至 15 日期间在辽河口海域进行表层沉积物样品采集。共设置 6 个站位(图 1),分别表示海相区(S1、S2,水深 7—14 m),混合区(S3、S4,水深 4—5 m),河相区(S5、S6,水深 3—6 m)。使用抓斗采泥器采集沉积物表层 0—10 cm 处样品,采样面积为 0.1 m<sup>2</sup>,且每个站位重复采样 3 次,混匀均质化后保存于无菌自封袋中,−20 °C 条件下运回实验室。

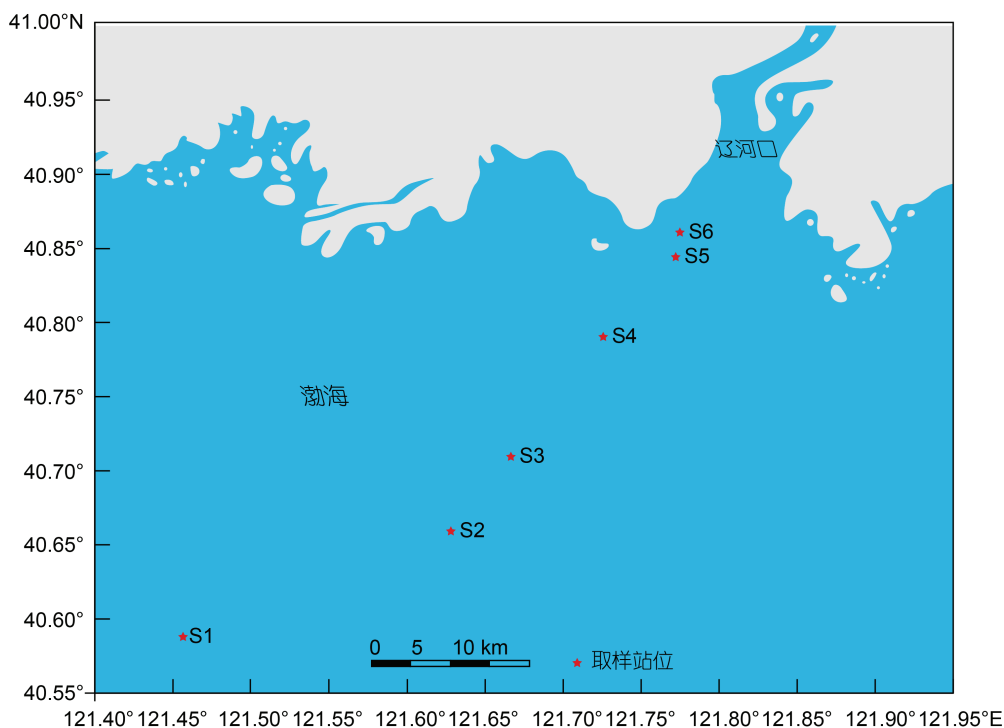


图 1 采样站位图

Fig.1 Deployment of sampling stations

### 1.2 环境参数测定

环境因子中水体盐度、酸碱度(pH)、溶解氧浓度(DO)、温度、电导率通过美国 YSI 556MPS 便携式多参数水质测量仪现场测定。硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ )、亚硝酸盐

( $\text{NO}_2^-$ )和氨盐( $\text{NH}_4^+$ )浓度通过使用氯化钾溶液提取后进行分光光度法测定,参照 2012 年中华人民共和国环境保护标准(HJ 634-2012)“土壤,氨氮,亚硝酸盐氮,硝酸盐氮的测定:氯化钾溶液提取-分光光度

法”。磷酸盐( $\text{PO}_4^{3-}$ )采用磷钼蓝分光光度法测定, 参照 2007 年中华人民共和国国家标准(GB 17378.4—2007)“海洋监测规范, 第 4 部分: 海水分析”。

沉积物中总磷(TP)通过分光光度法测定(姜峰等, 2017), 总有机碳(TOC)通过重铬酸钾氧化-还原容量法测定(李旭冉, 2015), 总氮(TN)通过凯氏定氮法测定(高一亮等, 2015), 沉积物中粒度使用激光衍射粒度分析仪(LS13320SW, 美国)测定, 参照 2007 年中华人民共和国国家标准(GB 17378.5-2007)“海洋监测规范, 第 5 部分: 沉积物分析”。

### 1.3 基因芯片测试与数据分析

将每个站位沉积物样品解冻混匀后, 称取约 0.30 g, 使用 DHeasy PowerSoil Kit 试剂盒(QIAGEN 公司)进行 DNA 提取, 各站位取 3 组平行样品。用微量紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 并使用 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳检验。将检测合格的 DNA 样品进行荧光标记、芯片杂交、芯片扫描与成像(基因芯片实验每组进行三个重复)。

基因芯片具体步骤如下, 采用随机引物法用荧光染料 Cy-5 对 DNA 样品进行荧光标记(Tu *et al.*, 2014)。采用 QIA 试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)纯化荧光标记后的 DNA, 将标记成功的放入真空干燥机, 45 °C 下干燥 45 min; 接着在标记后的 DNA 样品中加入 120  $\mu\text{L}$  杂交缓冲液(40%甲酰胺, 3 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 10  $\mu\text{g}$  未标记的 Herring Sperm DNA), 待完全溶解后 95 °C 下变性 5 min, 然后置于 50 °C 培养箱中保存; 在 MAUI 杂交平台(Bio Micro, Salt Lake City, UT, USA) 42 °C 培养箱中进行杂交 16 h; 用 Nimble Gen MS 200 扫描仪(Roche, Madison, WI, USA)对杂交后的芯片进行扫描。扫描得到的图像由 ImaGene

(Biodiscovery Inc, El Segundo, CA, USA)进行预处理后, 进行信号强度的标准化。

数据的标准化处理包括片间归一化和去假阳性。把各个样本光强总和调整到同一批次光强最高的样本的水平。去掉信噪比(SNR)小于 2.0 的低质量点; 将信号值标准化, 即先将每个点的信号值除以相应微阵列的所有信号值的总和, 再乘以所有微阵列的平均值; 最后转化为自然对数(Zhang *et al.*, 2017)。采用 Excel 和 SPSS 21.0 等软件对功能微生物基因类群进行统计分析。使用生物统计学软件 R 软件中的 Vegan 软件包对表层沉积物微生物功能基因与环境因子的关系进行 RDA 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 环境因子的理化特征

辽河口各环境因子的理化参数如表 1 所示。水体温度相对恒定(26—27 °C), 溶氧量相对稳定(6.1—6.3 mg/L), 水体偏碱性(pH 7.72—8.00), 盐度在 S1 站位最高, S6 站位最低。从 S1 至 S6 站位, 电导率逐渐降低; 铵盐( $\text{NH}_4^+$ )浓度逐渐增大; 亚硝酸盐( $\text{NO}_2^-$ )和硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ )、磷酸盐( $\text{PO}_4^{3-}$ )浓度逐渐增大。

辽河口表层沉积物的粒径主要是由淤泥(Silt)、黏土(Clay)和砂(Sand)三种物质组成, 其中 S1 站位的黏土(Clay)含量占比最高为 31.18%, S3 站位的淤泥(Silt)含量占比最高为 60.13%, S4 站位的砂(Sand)含量占比最高为 28.76%。总有机碳(TOC)含量在海相区高于河相区; 总磷(TP)浓度在海相区(57.2—185  $\mu\text{g/g}$ ) >河相区(84.4—117  $\mu\text{g/g}$ ) >混合区(90.3—99.6  $\mu\text{g/g}$ ); 总氮(TN)浓度在混合区(60.5—298  $\mu\text{g/g}$ ) >河相区(76.5—90.5  $\mu\text{g/g}$ ) >海相区(34.7—40.2  $\mu\text{g/g}$ )。

表 1 环境因子的理化特征  
Tab.1 Physical and chemical characteristics of environmental factors

站位	温度 (°C)	盐度	电导率 (ms/cm)	pH	溶解氧 (mg/L)	铵盐 $\mu\text{mol/L}$	亚硝酸盐 ( $\mu\text{mol/L}$ )	硝酸盐 ( $\mu\text{mol/L}$ )	磷酸盐 ( $\mu\text{mol/L}$ )	总有机 碳(%)	总磷 ( $\mu\text{g/g}$ )	总氮 ( $\mu\text{g/g}$ )	黏土 (%)	淤泥 (%)	砂 (%)
S1	26.2	31.5	47.3	8.00	6.3	1.08	0.24	0.80	0.11	0.82	185.0	34.7	31.18	58.48	10.34
S2	27.0	28.7	44.6	7.99	6.3	1.11	0.32	7.27	0.13	0.43	57.2	40.2	23.53	51.55	24.92
S3	26.7	25.5	40.0	7.94	6.1	1.49	0.48	12.32	0.01	0.56	90.3	60.5	31.01	60.13	8.85
S4	27.0	20.7	33.1	7.92	6.1	5.61	0.35	15.27	0.20	0.70	99.6	298.0	14.57	56.67	28.76
S5	26.5	13.1	21.8	7.72	6.3	9.50	0.61	15.23	0.27	0.14	117.0	76.5	12.60	59.54	27.87
S6	25.9	2.4	4.5	7.54	6.2	13.61	0.94	21.98	0.31	0.46	84.4	90.5	18.47	53.82	27.71

### 2.2 辽河口表层沉积物微生物功能基因多样性

Geochip 检测到辽河口表层沉积物中各类型功能基因 48 742 个, 反映了 9 个微生物介导的关键生

物过程。其中, 碳循环相关的功能基因有 22 320 个、氮循环相关的功能基因有 6 154 个、磷循环相关的功能基因有 2 003 个、硫循环相关的功能基因有 4 282

个(表 2)。统计 6 个站位的沉积物在功能大类(gene\_category)层级的探针检出数及信号强度(图 2, 3), 发现与碳循环相关的探针数量最多、信号强度最强, 氮、硫和磷相关的探针数量较少、信号强度较弱。这表明, 在功能大类层级中, 与碳循环相关的功能基因最多, 且每个站位参与不同生物地化循环的功能基因数量变化趋势基本相同。

表 2 表层沉积物中功能基因的组成  
Tab.2 Composition of functional genes in surface sediments

功能基因	基因数量(个)
碳循环	22 320
金属稳态	3 400
氮循环	6 154
有机修复	9 403
毒力	769
磷循环	2 003
次级代谢	86
硫循环	4 282
其他	325

对不同站位检测到的功能基因进行了特有和共有基因数量比较, 发现不同站位含有的特有基因数量和所占总数量的比例不一致。如图 4 可知, 6 个站位共有的基因数量一共 42 722 个, S4 站位特有的基因数量最多, 具有 386 个, 占总量 0.80%; S3 站位特有的基因数量最少, 具有 16 个, 占总量的 0.03%。

### 2.3 表层沉积物中参与碳、氮、磷、硫循环的关键微生物功能基因

碳循环相关的功能基因中, Geochip 检测到与总有机碳降解相关的功能基因最多, 有 16 421 个, 其次是碳固定功能基因 5 422 个和产甲烷功能基因 477 个。鉴于碳循环功能基因的复杂性, 本研究筛选了部分关键基因进行讨论(图 5)。总有机碳降解中的乙酰木聚糖酯酶(*axe*)基因的平均基因芯片荧光信号值在所有基因中最高,  $\alpha$ -淀粉酶(*amyA*)和碳固定中的乙酰辅酶 A (*acc\_arch*)基因、转酮醇酶(*tktA*)基因较高。其中 *acc\_arch* 基因是 3HP/4HB 途径中的关键功能基因; *tktA* 基因是芳香族氨基酸生物合成中心途径的关键酶基因。甲烷氧化过程中的可溶性甲烷单加氧酶(*mmoX*)基因的平均基因芯片荧光信号值从远海到近海是逐渐上升的, 并在 S6 站位达到最大值。而对于铁氧化还原蛋白基因酶(*oorA*)基因来说, 它的平均基因芯片荧光信号值在不同站位中无明显变化。实验选取 6 个站位中的最远点 S1 站位和最近点 S6 站位, 比较分析碳循环功能基因的荧光信号值差异。结果显示(图 6), *axe* 基因、*protease\_aspartate\_fungi*、*amyA*、*mmoX* 基因、*pmoA* 基因、*mcrA* 基因在 S1 和 S6 站位的荧光信号值差异性显著( $P < 0.05$ )。

Geochip 检测到与氮循环相关的功能基因, 从远岸点 S1 向近岸点 S6 靠近时, 所有功能基因的平均基因芯片荧光信号值均呈现出由远海向近海上升的趋

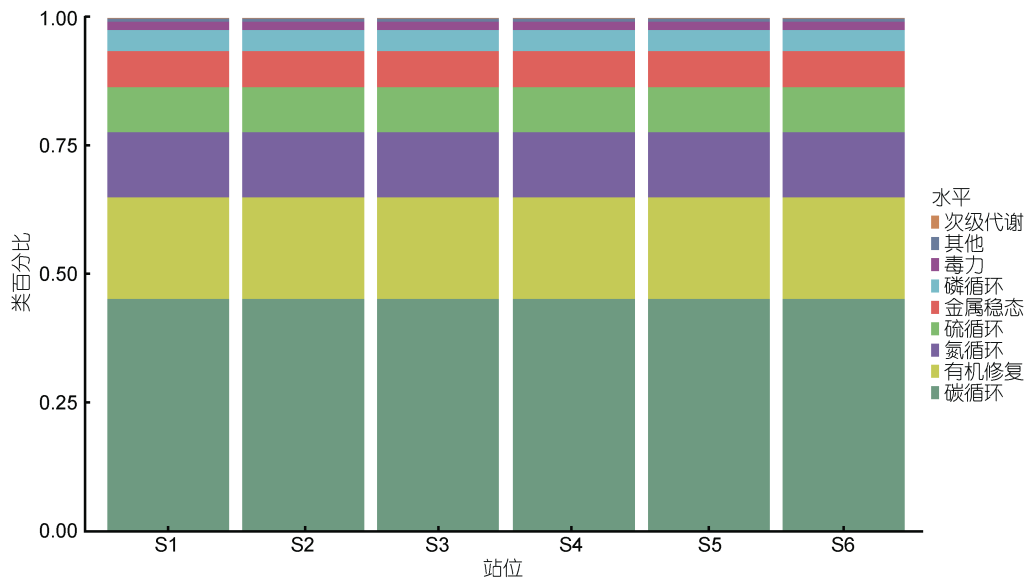


图 2 功能大类层级各大类所包含探针的检出数百分比柱状图

Fig.2 Histogram of the percentage of detections of the probes contained in each category at the Gene\_category level

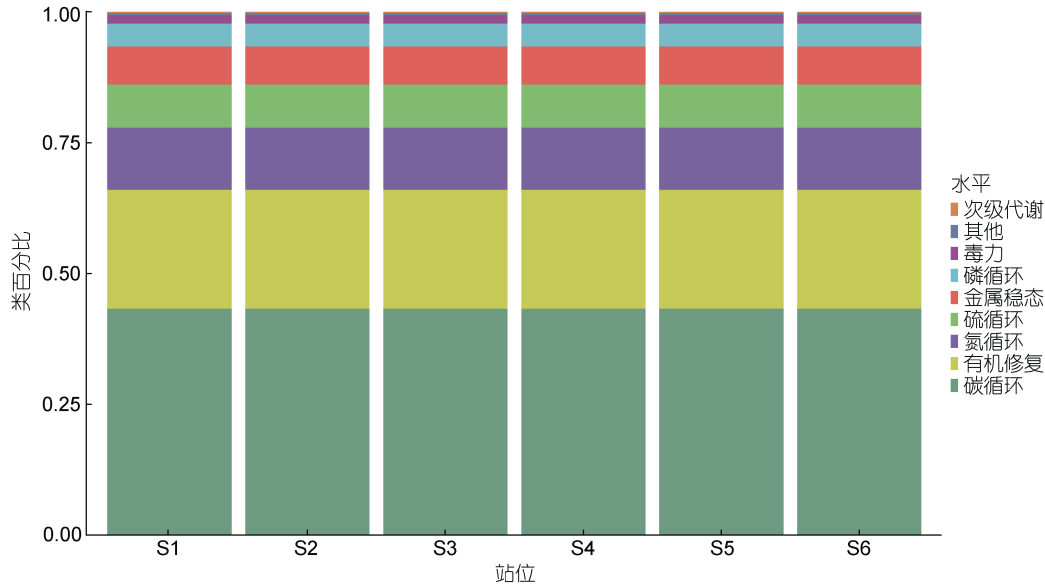


图 3 功能大类层级各大类所包含探针的信号强度柱状图  
Fig.3 Signal strength histogram of probes contained in each category at the Gene category level

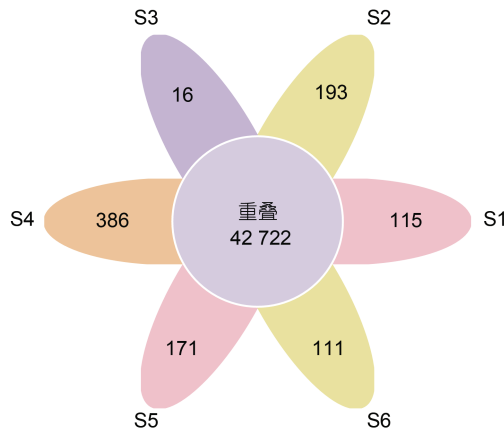


图 4 不同站位特有和共有功能基因数目分布花瓣图  
Fig.4 Petal map of the number of unique and shared functional genes at different sites

势(图 7)。即在河相区的近海点拥有更为丰富的氮循环微生物群落。厌氧氨氧化的联氨合成酶(*hzsA*)基因的荧光信号值在所有氮循环功能基因中相对较弱,但其荧光信号值在 S1 和 S6 站位中差异性显著( $P < 0.05$ )(图 8)。反硝化功能基因中,编码硝酸盐还原酶(*narG*)基因的荧光信号值最高,其余依次是编一氧化氮还原酶(*norB*)基因、编码含铜亚硝酸盐还原酶(*nirK*)基因、编码氧化亚氮还原酶(*nosZ*)基因和编码含细胞色素的亚硝酸盐还原酶(*nirS*)基因,且 *narG* 基因的荧光信号强度是氮循环所有功能基因中最高的。

硫循环相关的功能基因中,Geochip 检测到所有功能基因的平均基因芯片荧光信号值均呈现由远海向近

海上升的趋势(图 9),说明较于海相区和混合区,河相区拥有更为丰富的硫循环微生物群落。亚硫酸盐还原酶中的 *Sir* 基因是硫循环功能基因中荧光信号强度最高的。硫氧化过程中, *SoxC* 的荧光信号值最高, *SoxB*、*SoxA*、*SoxV*、*SoxY* 依次之,它们的平均基因芯片荧光信号值从远海到近海均呈现出上升的趋势。统计学分析发现(图 10),除了 *SoxC* 基因,其余功能基因的荧光信号值都在 S1 和 S6 站位中差异性显著( $P < 0.05$ )。

磷循环相关的功能基因中,Geochip 只检测到三个基因种类,分别是植酸水解中的植酸酶(*phytase*)基因、多磷酸盐合成中的多聚磷酸盐激酶(*ppk*)基因和多磷酸盐降解中的多聚磷酸盐水解酶(*ppx*)基因。如图 11 可知,除了 *ppx* 基因的平均基因芯片荧光信号值在不同站位中并没有表现出较大变化外, *phytase* 和 *ppk* 基因的荧光信号值均呈现出由远海向近海依次上升的趋势,其中 *ppk* 基因的荧光信号值最高。且从图 12 可知, *phytase* 和 *ppk* 基因的荧光信号值在 S1 和 S6 站位中差异性显著( $P < 0.05$ )。

#### 2.4 表层沉积物微生物功能基因与环境因子的相关性

基于各环境因子与 Gene\_category 层级间 Spearman 相关系数的  $R$  值和  $P$  值,挑选  $|R| > 0.8$ ,  $P < 0.05$  的结果制作 heatmap,如图 13 可知,碳循环、氮、磷、硫化物等各类功能基因均与 pH、盐度(Salinity)、电导率(Cond)、黏土(Clay)显著负相关,与 TN、 $\text{NH}_4^+$ 、硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ )、亚硝酸盐( $\text{NO}_2^-$ )、 $\text{PO}_4^{3-}$  显著正相关,与淤泥(Silt)、溶解氧(DO)、总磷(TP)等无显著相关性。

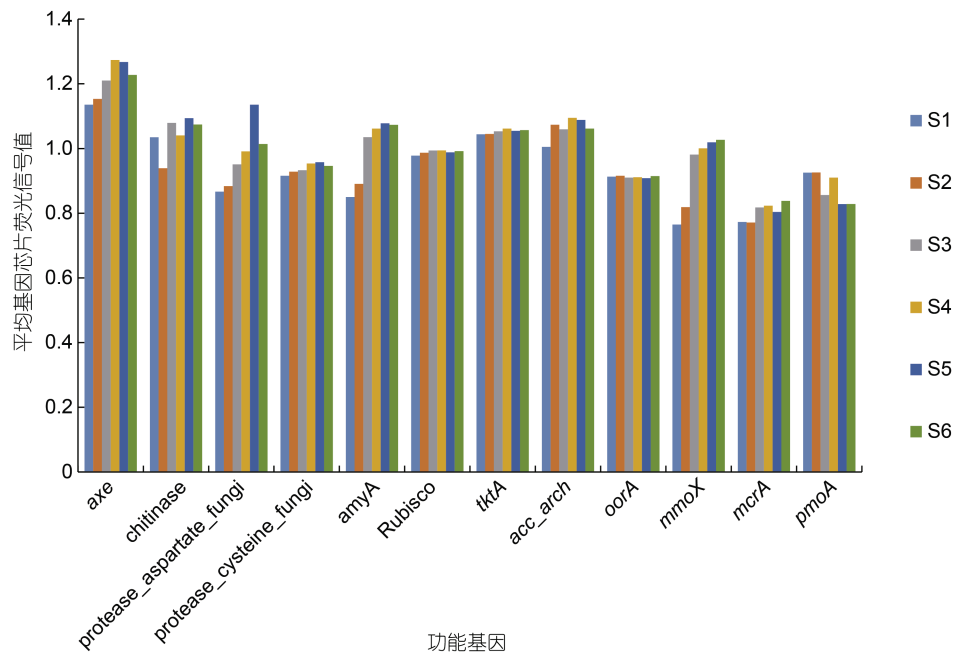


图 5 碳循环功能基因的平均基因芯片荧光信号值

Fig.5 Average Gene Chip Fluorescence Signal Values for Carbon Cycle Functional Genes

注: *axe*: 乙酰木聚糖酯酶基因; *chitinase*: 几丁质酶; *protease\_aspartate\_fungi*: 天冬氨酸蛋白酶; *protease\_cysteine\_fungi*: 半胱氨酸蛋白酶; *amyA*:  $\alpha$ -淀粉酶; *Rubisco*: 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶; *tktA*: 转酮醇酶基因; *acc\_arch*: 乙酰辅酶 A 基因; *oorA*: 铁氧化还原蛋白酶基因; *mmoX*: 可溶性甲烷单加氧酶基因; *mcrA*: 产甲烷菌甲基辅酶 M 还原酶  $\alpha$  亚基基因; *pmoA*: 颗粒性甲烷单加氧酶基因

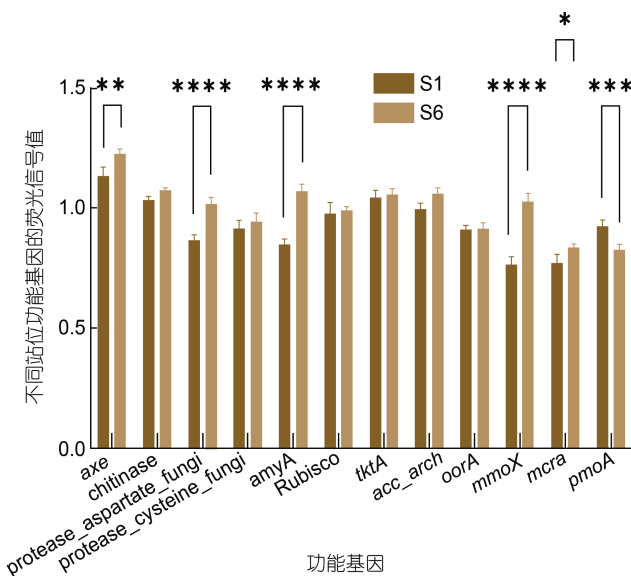


图 6 碳循环不同功能基因在不同站点间的差异性分析

Fig.6 Analysis of the difference of different functional genes of carbon cycle among different stations

注: *axe*: 乙酰木聚糖酯酶基因; *chitinase*: 几丁质酶; *protease\_aspartate\_fungi*: 天冬氨酸蛋白酶; *protease\_cysteine\_fungi*: 半胱氨酸蛋白酶; *amyA*:  $\alpha$ -淀粉酶; *Rubisco*: 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶; *tktA*: 转酮醇酶基因; *acc\_arch*: 乙酰辅酶 A 基因; *oorA*: 铁氧化还原蛋白酶基因; *mmoX*: 可溶性甲烷单加氧酶基因; *mcrA*: 产甲烷菌甲基辅酶 M 还原酶  $\alpha$  亚基基因; *pmoA*: 颗粒性甲烷单加氧酶基因

利用冗余图(RDA)和 BioEnv 法共同进一步探究环境因子变量与各站点功能基因组成的关系。RDA(图 14)共解释 70.91 % 的功能基因变化, 结果发现, 主要影响因子因站点不同而有所差异, 主要是总磷(TP), 其次是硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ )。采用 BioEnv 法(表 3)归纳出与各站点功能基因组成相关性最高的环境因子组合为  $\text{NO}_3^-$ 、TP、TOC、Silt。

### 3 讨论

#### 3.1 辽河口表层沉积物中微生物功能基因的组成

基因芯片的杂交信号强度与微生物群落基因组 DNA 和细胞总量均有良好的线性正相关性(Rhee *et al.*, 2004)。因此, 杂交信号强度能在一定程度上直接反映环境微生物的丰富度, 还能够有效地将生态系统过程与微生物群落的功能结构联系起来。在本研究中, 共检测到辽河口表层沉积物中各类型功能基因 48 742 个, 包括有机碳降解、碳固定、硫还原、氮固定、磷利用等, 表明在辽河口表层沉积物中含有复杂的微生物介导的生物地球化学循环过程。其中, 与碳循环相关的功能基因数目及荧光信号强度在所有站点检测到的基因中为最高, 表明辽河口表层沉积物的微生物群落具有强大的碳代谢潜力。在对东海陆架



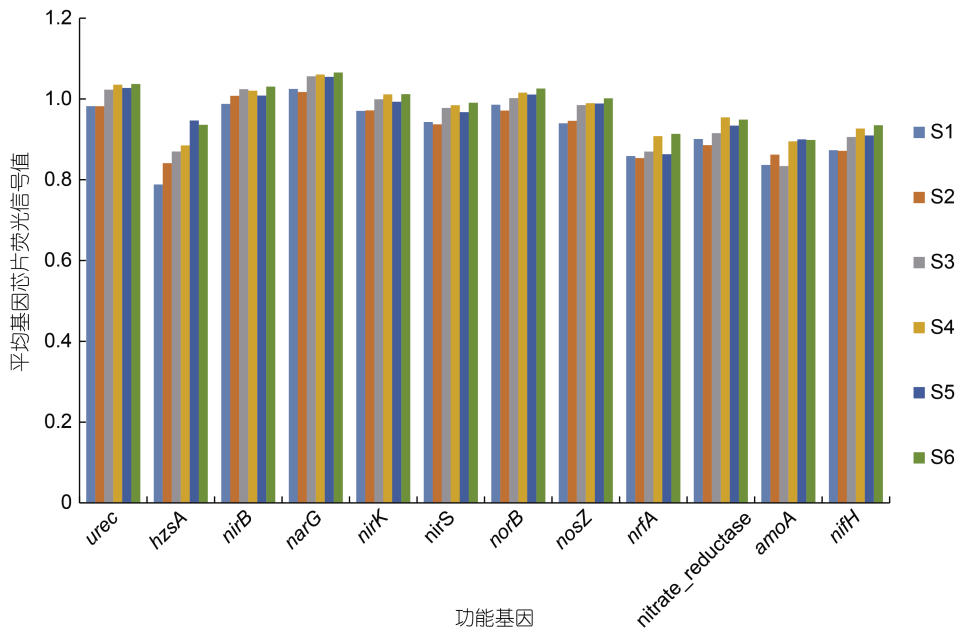


图 7 氮循环功能基因的平均基因芯片荧光信号值

Fig.7 Average gene chip fluorescence signal value of nitrogen cycle function genes

注: *urec*: 脲酶基因; *hzsA*: 厌氧氨氧化的联氨合成酶基因; *nirB*: N 减少同化作用的基因; *narG*: 硝酸盐还原酶基因; *nirK*: 含铜亚硝酸还原酶基因; *nirS*: 含细胞色素 *cdI* 的亚硝酸盐还原酶; *norB*: 一氧化氮还原酶基因; *nosZ*: 氧化亚氮还原酶基因; *nrfA*: 根瘤菌固氮作用的基因; *nitrate\_reductase*: 硝酸还原酶; *amoA*: 氨单加氧酶基因; *nifH*: 土壤微生物固氮基因

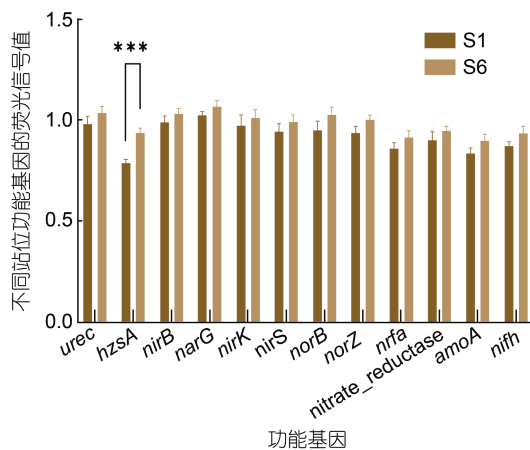


图 8 氮循环不同功能基因在不同站点间的差异性分析

Fig.8 Analysis on the Difference of Different Functional Genes of Nitrogen Cycle in Different Stations

注: *urec*: 脲酶基因; *hzsA*: 厌氧氨氧化的联氨合成酶基因; *nirB*: N 减少同化作用的基因; *narG*: 硝酸盐还原酶基因; *nirK*: 含铜亚硝酸还原酶基因; *nirS*: 含细胞色素 *cdI* 的亚硝酸盐还原酶; *norB*: 一氧化氮还原酶基因; *nosZ*: 氧化亚氮还原酶基因; *nrfA*: 根瘤菌固氮作用的基因; *nitrate\_reductase*: 硝酸还原酶; *amoA*: 氨单加氧酶基因; *nifH*: 土壤微生物固氮基因

区域的研究中, 王煜(2018)利用 Geochip 技术发现东海表层海水微生物群落的功能基因多样性远高于底层海水, 且碳降解中的功能基因对应的微生物群落

也更加复杂。这说明海洋沉积物中碳代谢的潜力不可忽视, 其丰富的微生物信息值得深入挖掘。

### 3.2 辽河口表层沉积物中碳循环的微生物多样性

辽河口沉积物中的固碳微生物在整个辽河生态系统碳循环中起着十分重要的作用, 不同途径针对沉积物中  $\text{CO}_2$  的利用能力不同。卡尔文循环是辽河口沉积物中自养生物固碳的主要途径, 3HP/4HB 循环则是一种存在于严格厌氧环境的微生物固碳途径。共同点是, 它们不仅是辽河口生态系统执行初级生产过程的主要动力, 还在调控大气中  $\text{CO}_2$  浓度方面扮演重要角色。碳固定中的 *Rubisco* 酶是被经常报道的关键酶之一(Alfreider *et al*, 2009)。本文针对辽河口区域检测出的碳循环功能基因进行分析, 发现 *Rubisco* 基因的平均基因芯片荧光信号值远低于 3HP/4HB 途径中关键功能基因 *acc\_arch* 的平均荧光信号值, 且后者的荧光信号值为最高。这为研究者们提供了一个新的思路, 可以对辽河口沉积物中微生物 *acc\_arch* 基因的多样性展开研究, 由于此过程一般发生在古菌中, 所以可进一步分析辽河口沉积物中古菌参与碳循环的多样性。

微生物介导的各类化学反应是地球生物化学循环的基础, 这些生物化学之间的关联性也预示着微

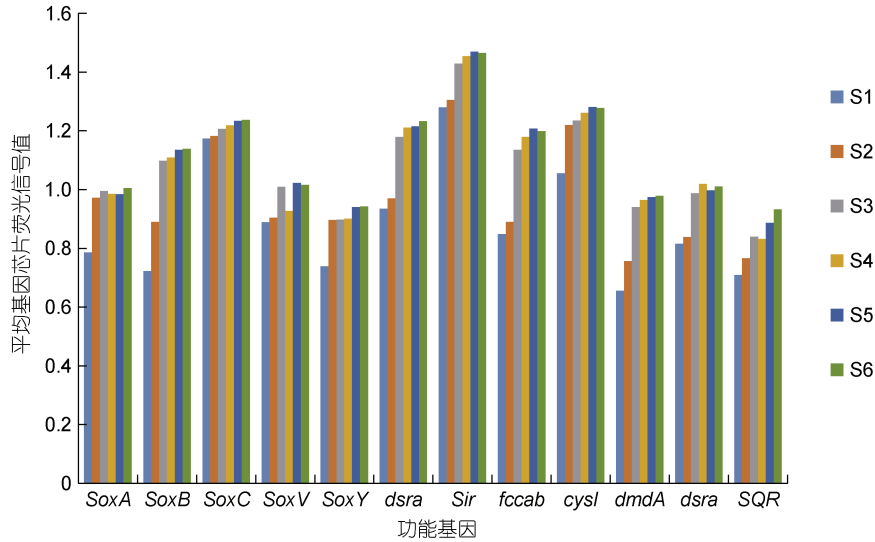


图 9 硫循环功能基因的平均基因芯片荧光信号值

Fig.9 Average Gene Chip Fluorescence Signal Values for Sulfur Cycle Functional Genes

注: SoxA, SoxB, SoxC, SoxV, SoxY: 硫氧化功能基因; dsra, Sir: 亚硫酸盐还原酶基因; fccab: 硫化物氧化的基因; cysI: 硫循环中的其他基因; dmdA: DMSP(二甲基巯基丙酸内盐)降解酶基因; SQR: 硫化物-醌氧化还原酶基因

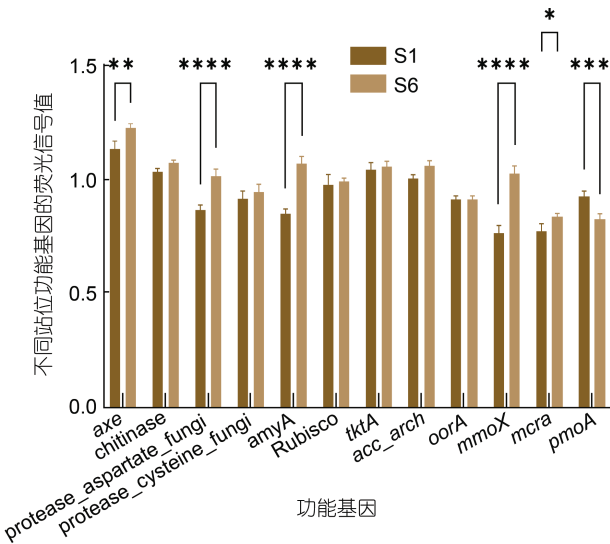


图 10 硫循环不同功能基因在不同站位间的差异性分析

Fig.10 Analysis on the Difference of Different Functional Genes of Sulfur Cycle in Different Stations

注: axe: 乙酰木聚糖酯酶基因; chitinase: 几丁质酶; protease\_aspartate\_fungi: 天冬氨酸蛋白酶; protease\_cysteine\_fungi: 半胱氨酸蛋白酶; amyA: α-淀粉酶; Rubisco: 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶; tktA: 转酮醇酶基因; acc\_arch: 乙酰辅酶 A 基因; oorA: 铁氧化还原蛋白酶基因; mmoX: 可溶性甲烷单加氧酶基因; mcrA: 产甲烷菌甲基辅酶 M 还原酶 α 亚基基因; pmoA: 颗粒性甲烷单加氧酶基因

生物之间存在的相互性。实验发现辽河口沉积物中与有机碳降解有关的功能基因很多,说明辽河口沉积物中活跃着大量参与有机碳降解的微生物,这对揭

示辽河口沉积物中有机碳的生产与消耗有一定的参考意义。为了进一步了解河口乃至近海有机碳(DOC)的行为特征,研究者一般通过建立 DOC 与盐度的关系,发现 DOC 在近岸及河口区通常表现为净消耗、净生产或者保守混合的行为(吴凯, 2017)。盐分对辽河口湿地土壤 DOC 浓度及 CO<sub>2</sub> 释放具有显著影响,具体表现为,盐分升高降低了土壤 CO<sub>2</sub> 的释放,土壤 CO<sub>2</sub> 的释放与 DOC 浓度显著正相关(肖颖, 2016)。而在珠江口中、下游的中、高盐度区域会出现 DOC 的保守或净添加行为。同样地,在密西西比河口、亚马逊河口和特拉华河口等大河流影响的区域,人们都发现了 DOC 净生产的行为(Meador et al, 2014)。所以正确认识辽河口沉积物中有机碳的行为特征,对陆地和海洋这两个生态系统的碳循环都有着重要意义。

### 3.3 辽河口表层沉积物中氮循环的微生物多样性

河口区域是氮元素生物地球化学循环最活跃、最复杂的地区,而微生物是驱动氮素生物地球化学循环的重要牵引者。本研究中,发现辽河口表层沉积物氮循环途径中反硝化功能基因的平均荧光信号值较高,且在反硝化功能基因中,编码硝酸盐还原酶(narG)基因的荧光信号值最高。这个检测结果与明红霞等(2020)发现 narG 基因丰度(1.63×10<sup>8</sup>—1.13×10<sup>9</sup> copies/g)最高的结果一致。说明辽河口表层沉积物中具有更为丰富的参与反硝化作用的微生物。反硝化微生物大部分为异养兼性厌氧细菌。目前来说,樊景凤团队对辽



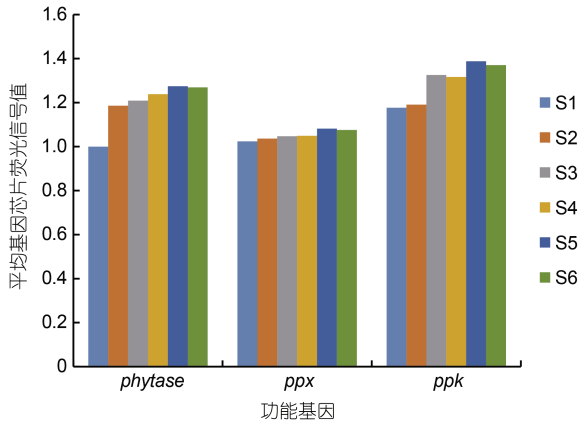


图 11 磷循环功能基因的平均基因芯片荧光信号值  
 Fig.11 Average Gene Chip Fluorescence Signal Value of Phosphorus Cycle Functional Genes

注: *phytase*: 植酸酶基因; *ppx*: 多聚磷酸盐水解酶基因; *ppk*: 多聚磷酸盐激酶基因

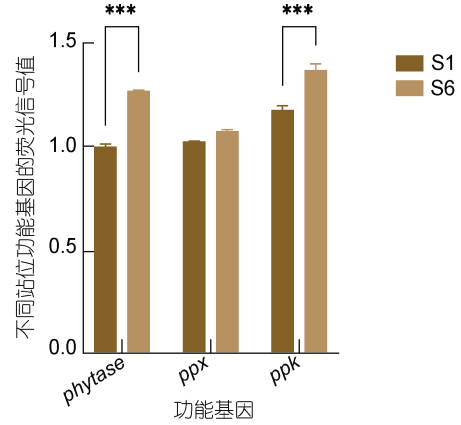


图 12 磷循环不同功能基因在不同站位间的差异性分析  
 Fig.12 Analysis on the Differences of Different Functional Genes of Phosphorus Cycle in Different Stations

注: *phytase*: 植酸酶基因; *ppx*: 多聚磷酸盐水解酶基因; *ppk*: 多聚磷酸盐激酶基因

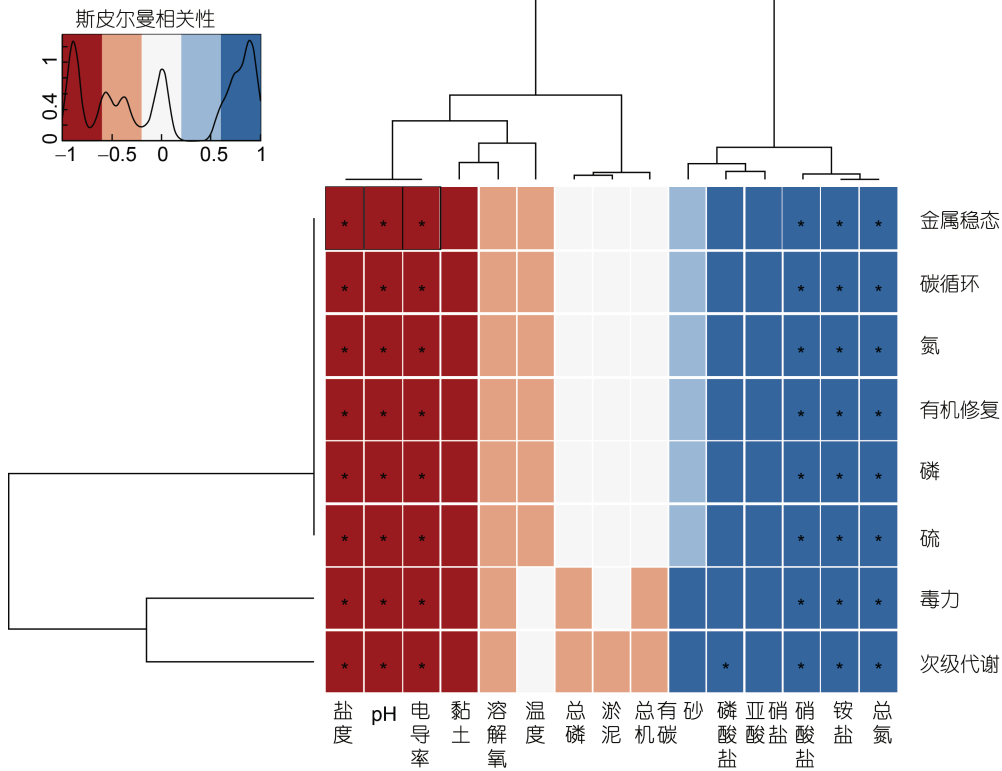


图 13 环境因子与功能大类(Gene\_category)基础相关性热图

Fig.13 Heatmap of the basic correlation between environmental factors and functional category (Gene\_category)

河口沉积物中反硝化细菌进行了大量研究(樊景凤等, 2011; 李博超, 2017; Chen *et al*, 2020), 以 *nirK* 基因作为标记分子, 得出辽河口沉积物中反硝化细菌主要为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)类细菌, 其中变形菌门类细菌占主导地位。

3.4 辽河口表层沉积物中硫、磷循环的微生物多样性  
 在硫氧化过程中, 本文检测到 *SoxA*、*SoxB*、*SoxC*、

*SoxV*、*SoxY* 功能基因对应的菌属在门水平上都为变形杆菌, 其中以  $\alpha$ -变形菌纲最为丰富。目前, 编码关键酶的功能基因被广泛应用于跟踪硫循环相关的生物分子标记。定量分析显示, 珠江流域中具有 *SoxB* 功能基因的 SOB 比具有 *SQR* 和 *dsrA* 功能基因的 SOB 更丰富, 是硫氧化的主要贡献者(Luo *et al*, 2018)。在辽河口沉积物中, 本文也检测到硫氧化途径的关键

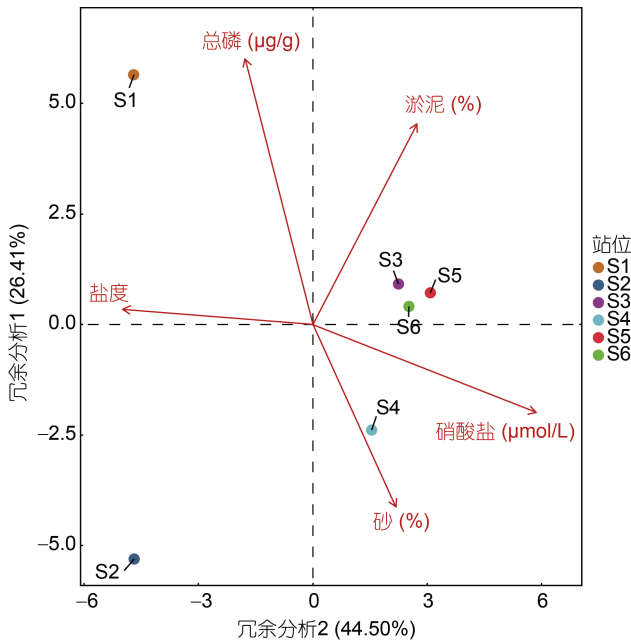


图 14 各站位功能基因与环境因子的冗余度(RDA)分析  
Fig.14 Analysis of Redundancy(RDA)of Functional Genes and Environmental Factors at Each Station

功能基因 *SQR*、*SoxB* 和 *dsrA*, 但其分布情况还待进一步揭示。磷是地球化学循环中的另一个重要元素。大量研究表明, 氮和磷是限制水体富营养化最重要的营养元素(张晋华等, 2014)。因此, 沉积物中的磷循环对上覆水体富营养化的发生具有重要的意义。磷循环还可以耦合碳、氮、硫和金属元素循环(Burgin *et al*,

2011), 在辽河口表层沉积物微生物地球化学循环中起着举足轻重的作用。

### 3.5 辽河口表层沉积物中功能基因与环境因子的关系

辽河口沉积物中各类微生物功能基因与 pH、Salinity、Cond、TN、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$  显著相关, 说明功能基因与环境因子的响应是多种复杂因素共同作用的结果。辽河口位于辽宁省盘锦市河流入海的过渡地带, 受入海淡水影响, 有着水体盐度相对较低、季节性变化较大的特点。有研究表明(张敏等, 2015), 夏季丰水期时, 海水盐度明显降低, 局部河口区盐度可低至 16.28; 而在枯水期, 海水的表层盐度在 29—32 之间。此外, 2017 年的中国海洋环境状况公报中指出辽河携带了 5 209 t 氨氮、45 659 t 硝酸盐氮以及 5 515 t 的亚硝酸盐氮输入到渤海辽东湾海域, 污染物输入量在全国入海河流中位居前列。如此巨大的氮素输入对于河口环境中参与氮循环的微生物群落结构组成无疑是具有重要影响的。沉积物粒径与原位水文条件密切相关, 可以通过河流径流、淡咸水混合强度, 对其他物理化学特性的动态控制(Dang *et al*, 2010)。但在本研究中, 各类功能基因与其并无显著相关性。总磷与硝酸盐是影响辽河口微生物功能基因多样性分布格局的重要因素。辽河口区域作为优质水稻和中华绒毛蟹的主要产地, 每年氮肥和磷肥施用量高达 11.8 万 t, 且该区域 N/P 值的变化较大(李璐等, 2018)。杨志等(2020)最新发现, 辽河口近年来 N/P 值偏高并逐

表 3 BioEnv 分析结果  
Tab.3 Results of the BioEnv analysis

因子	大小	相关性
总磷	1	0.732 1
硝酸盐 总磷	2	0.675 0
硝酸盐 总磷 总有机碳	3	0.685 7
硝酸盐 总磷 总有机碳 淤泥	4	0.700 0
硝酸盐 总磷 温度 总有机碳 淤泥	5	0.685 7
盐度 硝酸盐 总磷 总氮 总有机碳 淤泥	6	0.667 9
盐度 铵盐 硝酸盐 总磷 总氮 总有机碳 淤泥	7	0.635 7
盐度 硝酸盐 总磷 总氮 温度 溶解氧 总有机碳 淤泥	8	0.571 4
盐度 亚硝酸盐 硝酸盐 总磷 总氮 温度 总有机碳 淤泥 砂	9	0.564 3
铵盐 亚硝酸盐 硝酸盐 总磷 总氮 温度 溶解氧 总有机碳 黏土 淤泥	10	0.525 0
盐度 亚硝酸盐 硝酸盐 总磷 总氮 温度 溶解氧 总有机碳 黏土 淤泥 砂	11	0.475 0
盐度 铵盐 亚硝酸盐 硝酸盐 总磷 总氮 温度 溶解氧 总有机碳 黏土 淤泥 砂	12	0.378 9
盐度 pH 铵盐 硝酸盐 总磷 总氮 温度 电导率 溶解氧 总有机碳 黏土 淤泥 砂	13	0.314 3
盐度 铵盐 亚硝酸盐 硝酸盐 磷酸盐 总磷 总氮 温度 电导率 溶解氧 总有机碳 黏土 淤泥 砂	14	0.253 6
盐度 pH 铵盐 亚硝酸盐 硝酸盐 磷酸盐 总磷 总氮 温度 电导率 溶解氧 总有机碳 黏土 淤泥 砂	15	0.132 1

年上升,处于一种磷限制潜在性富营养状态。这一发现与本实验结果:辽河口近岸沉积物中含有大量的N、P元素且总磷的浓度远高于总氮的浓度相一致。同时,除了环境因素以外,人为因素的影响也是造成该区域N/P失衡的原因之一(Liu *et al.*, 2015)。

总之,本研究利用微生物功能基因芯片技术检测了辽河口表层沉积物微生物功能基因的组成,分析了参与碳、氮、磷、硫循环微生物功能基因的多样性和环境因子,有助于了解环境变化对辽河口表层沉积物生态系统结构、功能产生的影响,能为辽河口生态系统的保护和管理提供理论依据,也为碳氮耦合、磷硫耦合以及其他生物介导的生物地球化学循环过程提供了重要依据,对了解辽河口土壤微生物的代谢潜力和预测渤海区域受全球变化的影响有重要意义。

#### 4 结论

在6个沉积物样品中,利用GeoChip 4.0检测到各类型功能基因48 742个,反映了9个微生物介导的关键生物过程。碳循环的功能基因数量在所有站位检测到基因中为最高,表明辽河口表层沉积物微生物群落具有强大的碳代谢潜力。其次是氮循环,氮循环中反硝化功能基因*narG*的荧光信号值最高,说明辽河口表层沉积物中具有更为丰富的参与反硝化作用的微生物。对于硫循环来说,河相区检测到的功能基因数量远大于混合区和海相区的功能基因数量。较于海相区和混合区,河相区拥有更为丰富的硫循环微生物群落,硫循环中功能基因*SoxC*的荧光信号值最高。检测到磷循环的功能基因数量最少,只有三个基因种类,以功能基因*ppk*的荧光信号值最高。环境因子总磷与硝酸盐是影响微生物功能基因多样性分布格局的重要因素。

#### 参 考 文 献

- 王煜, 2018. 典型近岸海洋环境微生物群落种类和功能多样性研究. 厦门: 厦门大学博士学位论文
- 中华人民共和国环境保护部, 2012. HJ 634-2012 土壤 氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的测定 氯化钾溶液提取-分光光度法. 北京: 中国环境科学出版社
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2008. GB 17378.5—2007 海洋监测规范 第5部分: 沉积物分析. 北京: 中国标准出版社
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2008. GB 17378.4—2007 海洋监测规范 第4部分: 海水分析. 北京: 中国标准出版社
- 李璐, 邹立, 杨阳等, 2018. 辽河口芦苇湿地积水营养盐组成和结构的周日变化特征. 海洋湖沼通报, (2): 80—87
- 李旭冉, 2015. 重铬酸钾氧化-还原容量法测定海洋沉积物中有机碳的不确定度评定. 现代农业科技, (24): 207—208, 221
- 李博超, 2017. 辽河口沉积物反硝化相关功能基因丰度和多样性分析. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文
- 杨志, 叶金清, 杨青等, 2020. 辽河口海域浮游动物多样性及对河口环境的指示. 海洋环境科学, 39(1): 25—30
- 肖颖, 2016. 盐分对辽河口湿地土壤有机碳矿化的影响. 沈阳: 沈阳大学硕士学位论文
- 吴凯, 2017. 近海环境中溶解有机物的生产和生物降解过程. 厦门: 厦门大学博士学位论文
- 张欣, 刘静, 沈国平等, 2017. 基于高通量测序研究青藏高原茶卡盐湖微生物多样性. 微生物学通报, 44(8): 1834—1846
- 张敏, 陶然, 杨扬等, 2015. 环境因素对不同工艺人工湿地反硝化功能基因丰度影响. 环境工程学报, 9(6): 2645—2652
- 张晋华, 于立霞, 姚庆祯等, 2014. 不同季节辽河口营养盐的河口混合行为. 环境科学, 35(2): 569—576
- 明红霞, 陈泉睿, 史银银等, 2020. 辽河口沉积物反硝化过程研究-以反硝化功能基因丰度及*nirK*型细菌群落结构分析为例. 海洋学报, 42(12): 82—92
- 赵美训, 丁杨, 于蒙, 2017. 中国边缘海沉积有机质来源及其碳汇意义. 中国海洋大学学报, 47(9): 70—76
- 姜峰, 李亮, 2017. 沉积物中总磷的测定方法对比. 广东化工, 44(10): 197—198
- 高一亮, 黎小鹏, 邓桂添等, 2015. 全自动凯氏定氮仪测定土壤全氮含量不确定度的评定. 现代农业科技, (10): 221—222
- 阚金军, 孙军, 2011. 河口细菌群落多样性及其控制因素: 以切萨皮克湾为例. 生物多样性, 19(6): 770—778
- 樊景凤, 陈佳莹, 陈立广等, 2011. 辽河口沉积物反硝化细菌数量及多样性的研究. 海洋学报, 33(3): 94—102
- 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. Systematic and Applied Microbiology, 32(2): 140—150
- Burgin A J, Yang W H, Hamilton S K *et al.*, 2011. Beyond carbon and nitrogen: how the microbial energy economy couples elemental cycles in diverse ecosystems. Frontiers in Ecology and the Environment, 9(1): 44—52
- Bai S, Li J, He Z *et al.*, 2013. GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of soil microbial communities of mangroves. Appl Microbiol Biotechnol, 97(15): 7035—7048
- Canuel E A, Hardison A K, 2016. Sources, ages, and alteration of organic matter in estuaries. Annual Review of Marine Science, 8(1): 409—434
- Chen Q R, Fan J F, Ming H X *et al.*, 2020. Effects of environmental factors on denitrifying bacteria and functional genes in sediments of Bohai Sea, China. Marine Pollution Bulletin, 160: 111621

- Crump B C, Hopkinson C S, Sogin M L *et al*, 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3): 1494—1505
- Dang T V, Roger D A, Peter W G *et al*, 2010. Phosphorus availability for three crop species as a function of soil type and fertilizer history. *Plant and Soil*, 337(1/2): 497—510
- Gao Y, Wang S P, Xu D P *et al*, 2014. GeoChip as a metagenomics tool to analyze the microbial gene diversity along an elevation gradient. *Genomics Data*, 2: 132—134
- Henriques I S, Alves A, Tacaõ M *et al*, 2006. Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 68(1/2): 139—148
- Kan J J, Evans S E, Chen F *et al*, 2008. Novel estuarine bacterioplankton in rRNA operon libraries from the Chesapeake Bay. *Aquatic Microbial Ecology*, 51(1): 55—66
- Liu D Y, Li X, Emeis K C *et al*, 2015. Distribution and sources of organic matter in surface sediments of Bohai Sea near the Yellow River Estuary, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 165: 128—136
- Luo J F, Tan X Q, Liu K X *et al*, 2018. Survey of sulfur-oxidizing bacterial community in the Pearl River water using *soxB*, *sqr*, and *dsrA* as molecular biomarkers. *Biotech*, 8(1): 73
- Meador T B, Aluwihare L I, 2014. Production of dissolved organic carbon enriched in deoxy sugars representing an additional sink for biological C drawdown in the Amazon River Plume. *Global Biogeochemical Cycles*, 28(10): 1149—1161
- Rhee S K, Liu X D, Wu L Y *et al*, 2004. Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-Mer oligonucleotide microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7): 4303—4317
- Rui J P, Li J B, Wang S P *et al*, 2015. Responses of bacterial communities to simulated climate changes in alpine meadow soil of the Qinghai-Tibet Plateau. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17): 6067—6077
- Sekiguchi H, Koshikawa H, Hiroki M *et al*, 2002. Bacterial distribution and phylogenetic diversity in the Changjiang estuary before the construction of the Three Gorges Dam. *Microbial Ecology*, 43(1): 82—91
- Troussellier M, Schäfer H, Batailler N *et al*, 2002. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France). *Aquatic Microbial Ecology*, 28(1): 13—24
- Tu Q C, Yu H, He Z L *et al*, 2014. GeoChip 4: a functional gene-array-based high-throughput environmental technology for microbial community analysis. *Molecular Ecology Resources*, 14(5): 914—928
- Yang Y F, Gao Y, Wang S P *et al*, 2014. The microbial gene diversity along an elevation gradient of the Tibetan grassland. *The ISME Journal*, 8(2): 430—440
- Zhang Y G, Liu X, Cong J *et al*, 2017. The microbially mediated soil organic carbon loss under degenerative succession in an alpine meadow. *Molecular Ecology*, 26(14): 3676—3686

## ANALYSIS OF MICROBIAL FUNCTIONAL GENES INVOLVED IN MAJOR BIOGEOCHEMICAL CYCLES IN SEDIMENTS OF LIAOHE RIVER ESTUARY

SONG Ji-Xue<sup>1,2</sup>, MING Hong-Xia<sup>1,2</sup>, SHI Ting-Ting<sup>1,2</sup>, SU Jie<sup>1,2</sup>, CHEN Quan-Rui<sup>1,2,3</sup>, JIN Yuan<sup>1,2</sup>,  
FAN Jing-Feng<sup>1,2</sup>

(1. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 2. National Key Laboratory of Coastal Ecological Environment, Marine Environmental Protection, Dalian 116023, China; 3. School of Ocean and Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Rich biodiversity in the Liaohe River estuary region plays a pivotal role in biogeochemical cycles and maintaining ecosystem functions. To understand and predict the functional metabolic potential of microorganisms in the estuary sediments and the impact of environmental changes, functional genes involved in common geochemical cycles and the key influencing factors were studied, for which functional gene chip (GeoChip 4.0) technology was applied to analyze the microbial functional gene diversity. In total, 48 742 functional genes of various types were detected in 6 sediment samples, 9 key biological processes mediated by microorganisms were revealed, among which carbon cycle related functional genes were dominated, followed by nitrogen cycle related, sulfur cycle related, and phosphorus cycle related functional genes. The number and fluorescence signal value of functional genes related to biological process at each station showed an upward trend from offshore to offshore. In other words, the microbial functional genes in river area were more abundant than those in marine and mixed areas. The genes involved in carbon fixation in carbon cycle have the greatest fluorescence signal values. The fluorescence signal value of denitrification function gene was the highest in nitrogen cycle. Total phosphorus and nitrate were important factors affecting the distribution pattern of microbial functional gene diversity. This study is helpful to understand the impact of environmental changes on structure and function of sediment ecosystem in Liaohe River estuary, and provides a scientific basis for studying the biogeochemical cycle mediated by microorganisms in surface sediments in Liaohe River estuary.

**Key words** Liaohe River estuary; surface sediments; microorganism; genechips; functional genes