

# 贵州红枫湖沉积物有机质的酶及 微生物降解\*

梁小兵 朱建明 刘丛强 魏中青 汪福顺  
万国江 黄荣贵

(中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002)

**摘要** 文章通过 DNA、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和硫酸盐还原菌等的变化,研究了贵州红枫湖沉积物中有机质的酶及微生物降解。有机质在微生物及其分泌的胞外酶的作用下被降解,在沉积物深度 11cm 以下被降解到相对较低的含量。DNA 的分布表明表层 9cm 的沉积物深度内微生物的活动较为强烈,是微生物降解有机质的主要位置。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶在悬浮层含量最高,达  $0.75 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$  干沉积物,提示有机质中的淀粉和糖原等物质在悬浮层降解较为激烈,被大量分解;随着沉积物深度的增加  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性减弱,在有机质降解明显开始变缓的 11cm 沉积物中, $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性已降低到  $0.17 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$  干沉积物。分子生物学的研究表明红枫湖沉积物表层 7cm 是硫酸盐还原菌的主要分布位置,结合有机质和  $\text{SO}_4^{2-}$  含量的研究结果,提示红枫湖沉积物中  $\text{SO}_4^{2-}$  不可能成为有机质氧化的主要电子受体,硫酸盐还原的限制因素也不是有机质供应。

**关键词** 沉积物 有机质 酶 微生物 红枫湖

## 1 引言

在微生物和胞外酶的作用下的有机质降解不但影响湖泊沉积物的早期成岩作用,而且影响 C, N, P, S, Fe, Mn 循环和微生物群落的分布及活动,是重要的生物地球化学过程。对沉积物中有机质的变化的研究已有大量报道<sup>[1-3]</sup>,但由于有机质化学组成复杂,需要进一步研究有机质降解的微生物及酶学机理,深入研究有机质各组成成分的变化规律。

在厌氧的条件下,海洋沉积物中  $\text{SO}_4^{2-}$  是微生物氧化有机质的重要电子受体,在沉积速率较大时硫酸盐还原可能控制有机质的氧化<sup>[4-7]</sup>。因此,硫酸盐还原菌的分布与有机质降解有密切的关系。根据 16S rDNA 构建的系统发生树将硫酸盐还原菌(SRB)分为 6 个主要的类群(group),即:脱硫肠菌属(*Desulfomaculum*)、脱硫叶菌属(*Desulfobubus*)、脱硫杆菌属(*Desulfobacterium*)、脱硫细菌属(*Desulfobacter*)、脱硫球菌-脱硫线菌-脱硫八叠菌属(*Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*)和脱硫弧菌-脱硫微菌属(*Desulfovibrio-Desu-*

第一作者简介:梁小兵 男 39 岁 副研究员 环境地球化学与生物地球化学专业 E-mail: xbliang@163.net

\* 国家自然科学基金项目(批准号:40173038)、中国科学院知识创新工程项目(批准号:KZCX2-105)和 2003 年贵州省科学技术基金项目资助

2003-04-21 收稿,2003-05-27 收修改稿

*lfomicrobium*)。用分子生物学的方法可以获得它们在湖泊沉积物中分布的信息。以往的研究对沉积物中有机质的化学组成、富集、保存和变化与硫及硫酸盐还原之间的关系做了大量的工作<sup>[8-10]</sup>,但缺乏对各个类群的硫酸盐还原菌在沉积物中的分布与有机质变化关系的研究。

碳水化合物是有机质的重要组成部分,有机质在沉积物中的埋藏和变化影响全球碳循环。碳水化合物代谢是所有代谢过程的中心并且碳水化合物是微生物的主要碳源和能源<sup>[11]</sup>。湖泊沉积物中的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶是微生物分泌的胞外酶,能降解多种碳水化合物,对有机质的降解起重要的作用。胞外酶活性变化对有机质降解的影响和相互关系已有一些报道<sup>[12-15]</sup>。胞外酶将大分子的有机质降解成小分子物质,为微生物的生长提供了必要的营养源。湖泊沉积物中胞外酶的垂直变化规律对于研究它们与有机质降解的关系具有重要意义,本文测定了红枫湖沉积物每 1cm 深度 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的变化。

## 2 样品采集和实验方法

### 2.1 样品采集

红枫湖位于贵州省贵阳市郊,海拔 1 108m,长 16km,平均宽 4km,平均湖水面积 32.15km<sup>2</sup>,流域面积为 1 596km<sup>2</sup>。湖泊补给系数是 49.64,最大水深 45m,平均水深 9.3m,湖水寄宿时间为 0.325 年。利用湖泊沉积物-水界面采样装置,采取红枫湖水深 21m 处的沉积物柱芯,沉积物拉长 31cm。沉积物均按 1cm 距离分样,界面水平平均分为 3 个水样,每次采集 5 个沉积物柱芯。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 DNA 的分离提取

沉积物样品经真空冷冻干燥机(Techcomp FD-3-85-MP)干燥,-20℃保存备用或加入 10mg/ml 的溶菌酶溶液浸湿,在恒温培养箱中 37℃下放置 2 小时,其间多次摇动。加入 DNA 提取液,混匀。用冷冻离心机(FD-3-85-MP)在 4℃、4 000 转/分钟条件下离心 30 分钟,上层倾出溶液,分别用等体积的饱和酚、氯仿-异戊醇抽提多次;4℃、3 500 转/分钟条件下离心 30 分钟,取上清液。加入 1/10 体积的 3mol/L 的醋酸钠溶液,用两倍体积的无水乙醇沉淀。DNA 沉淀干燥后保存备用或 TE 中溶解用作下一步实验。

#### 2.2.2 PCR 条件和方法

PCR 引物由华美生物工程公司北京分公司合成。反应总体积为 50 $\mu$ l:包括上游引物(2 $\mu$ l),下游引物(2 $\mu$ l),dNTP 混合液 2 $\mu$ l,Taq 酶 2 $\mu$ l,10 $\times$  Buffer 5 $\mu$ l,MgCl<sub>2</sub> 5 $\mu$ l,DNA 模板 4 $\mu$ l,灭菌去离子水 28 $\mu$ l。

#### 2.2.3 DNA 的检测

采用 1.5% 琼脂糖电泳检测 DNA,电泳缓冲液采用 0.5 $\times$  TBE,用 Tanon GIS-2008 进行凝胶成像分析。

#### 2.2.4 有机碳和 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 的测定

样品除去无机碳后采用元素分析仪(PE2400 II)直接测定有机碳,换算成有机质的含

量(有机碳乘以系数 1.72)。湖泊沉积物孔隙水中  $\text{SO}_4^{2-}$  的测定采用阴离子色谱。

### 2.2.5 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的测定

采用荧光物质 4-甲基伞型酮(MUF)(Sigma 公司产品)测定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性<sup>[13,15]</sup>。样品采用冰冻干燥的沉积物样品,底物用 MUF- $\alpha$ -D-葡萄糖苷(Sigma 公司产品)。设测定样和不加底物的对照样。

## 3 结果与讨论

### 3.1 红枫湖沉积物中有机质和 DNA 的变化特征

湖泊沉积物中有机质由外源输入和内部的生物(微生物、浮游植物等)组成。进入沉积物后,在早期成岩过程中被逐步分解,微生物是有机质降解的重要因素。红枫湖沉积物中有机质逐步被降解,从悬浮层到 11cm 的深度内有机质的变化较为剧烈,11cm 以下的变化趋于平缓,并被降解到相对较低的含量(图 1)。

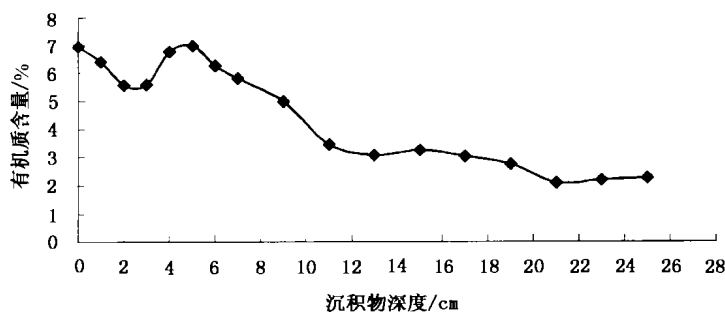


图 1 红枫湖沉积物有机质的垂直变化

Fig.1 The variation of organic matter in sediments of Lake Hongfeng with depth

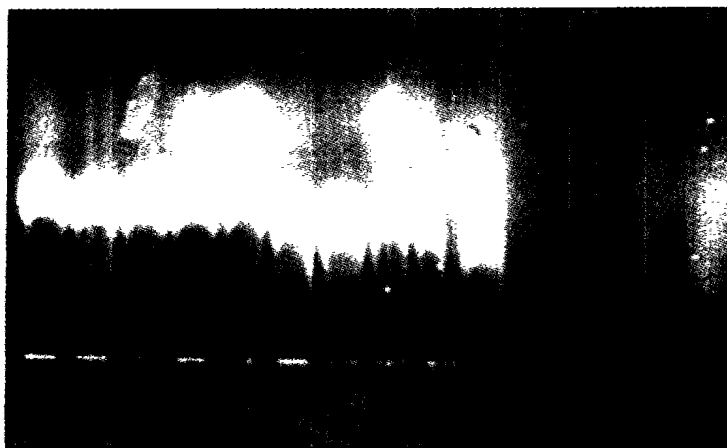


图 2 红枫湖沉积物中 DNA 的垂直分布

0~13 表示从悬浮层到 13cm 深度的沉积物样品的点样位置

Fig.2 The vertical variation of DNA in sediments of Lake Hongfeng

有机质的降解是在微生物的作用下进行的,将红枫湖不同沉积深度的微生物细胞破碎后,进行 DNA 垂直分布的研究,代表了微生物生物量的多少。微生物生物量多,则 DNA 含量就高,与溴化乙锭(EB)结合后产生的荧光强度较大。红枫湖沉积物中 DNA 的垂直分布显示 DNA 含量表层 9cm 内较高,9cm 以后明显降低,相对前 9cm 含量低得多(图 2)。说明微生物在红枫湖沉积物 9cm 内的数量较多,9cm 以下明显减少。而有机质也在 11cm 以下逐步被降解到较低水平(见图 1)。这一结果提示在表层 9cm 的沉积物深度内微生物的活动较为强烈,是微生物降解有机质的主要位置。

### 3.2 红枫湖沉积物中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的垂直变化与有机质降解的关系

有机质中的重要物质淀粉、糖原和麦芽糖等都是由  $\alpha$ -葡萄糖苷键连接而成<sup>[16]</sup>, $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的大小代表了这类有机质的降解状况。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶在红枫湖沉积物中垂直变化规律显示(图 3): $\alpha$ -葡萄糖苷酶在悬浮层含量最高,达  $0.75\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$  干沉积物,提示有机质中的淀粉和糖原等物质在悬浮层降解较为激烈,被大量分解;随着沉积物深度的增加, $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性有减弱的趋势。在 DNA 含量明显降低的 9cm 的沉积物中, $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性已降低到  $0.18\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$  干沉积物;在有机质降解明显开始变缓的 11cm 沉积物中, $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性已降低到  $0.17\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$  干沉积物。

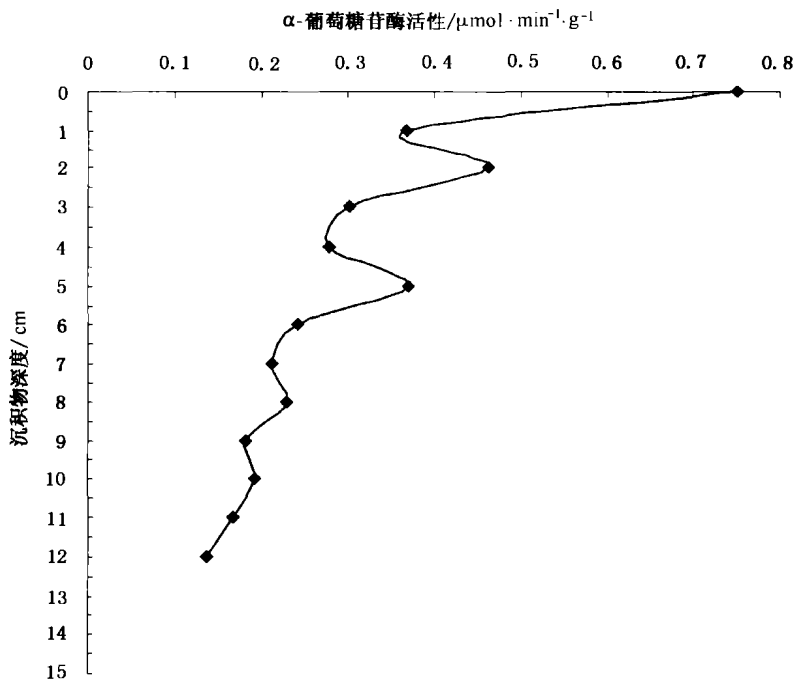


图 3 红枫湖沉积物  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的垂直变化

Fig. 3 The variation of  $\alpha$ -glucosidase in sediments of Lake Hongfeng with depth

目前将湖泊、海洋等水环境中的有机质分为溶解有机质(dissolved organic matter, 简称 DOM)、颗粒有机质(particulate organic matter, 简称 POM)和有机聚合物(organic aggregates)

等;按元素分为溶解有机碳(dissolved organic carbon, 简称 DOC)、溶解有机氮(dissolved organic nitrogen, 简称 DON)和溶解有机磷(dissolved organic phosphorus, 简称 DOP)等<sup>[17-22]</sup>。这些分类在某些情况下有利于对有机质的研究,但在研究有机质的变化机理方面却略显粗糙,不能从分子水平反映有机质的生物化学组成。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶从有机质的生物化学组成上反映了淀粉等易降解的有机质成分在红枫湖沉积物中的变化规律。刚进入沉积物的有机质相对于下层含有较多的易于降解的淀粉类物质,悬浮层  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性最高,它们被大量分解,为微生物的生长提供了必要的 C 源和能量。表层几厘米酶活性也相对较高,说明了淀粉类物质水解也相对较多。由于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶对淀粉类有机质的水解,随着沉积深度的增加,红枫湖沉积物中淀粉类的有机质含量逐渐减少,淀粉类物质在有机质的化学组成缺失,有机质的生物化学组成发生了变化。

### 3.3 红枫湖沉积物中硫酸盐还原菌的垂直分布特征与有机质降解

硫酸盐还原菌是重要的微生物生理群,与有机质降解有密切的关系。由于存在于沉积物中的硫酸盐还原菌很多不能在实验室中获得纯培养,采用分子生物学方法对红枫湖沉积物中 6 个类群的硫酸盐还原菌进行了研究。红枫湖沉积物中硫酸盐还原菌各个类群的分布(表 1)显示(+代表阳性检出):表层 7cm 是硫酸盐还原菌的主要分布位置,在 7cm 以后未检测到任何一个硫酸盐还原菌类群的存在;脱硫细菌属和脱硫弧菌-脱硫微菌属是主要的硫酸盐还原菌类群,前者在表层 6cm 中均检测到,后者在悬浮层和 3cm, 5cm, 7cm 可见阳性结果;各个类群的分布是不均一的,具有类群的差异和优势。红枫湖沉积物硫酸盐还原菌的分布深度在 DNA 的分布深度内,但 DNA 在 9cm 以内含量仍然较高(见图 2),提示其他种类的微生物的分布与硫酸盐还原菌不同,主要分布区域可以到达比硫酸盐还原菌更深的位置。

表 1 红枫湖沉积物硫酸盐还原菌分布

Table 1 Distribution of SRB in sediments of Lake Hongfeng

深度 还原菌类群	悬浮层	1cm	2cm	3cm	4cm	5cm	6cm	7cm	8cm	9cm
脱硫肠菌属										
脱硫叶菌属										
脱硫杆菌属	+			+	+					
脱硫细菌属	+	+	+	+	+	+	+			
脱硫球菌 - 脱硫线菌 - 脱硫八叠菌属	+					+				
脱硫弧菌 - 脱硫微菌属	+			+		+		+		

硫酸盐还原作用与有机质降解之间关系密切。在厌氧的海洋沉积物中  $\text{SO}_4^{2-}$  (也包括铁氧化物和锰氧化物)是微生物氧化有机质的重要电子受体,许多海洋沉积物中硫酸盐还原作用可能控制有机质氧化;另一方面,对有机质和  $\text{SO}_4^{2-}$  (约为海水含量的 1/3)含量较高

的浅水湖泊(水深少于1m)的研究表明硫酸盐还原受有机质供应的限制<sup>[23]</sup>。红枫湖沉积物中  $\text{SO}_4^{2-}$  含量较海洋低得多,最高值为  $0.65\text{mmol/L}$ ,而海洋为  $29.3\text{mmol/L}$ <sup>[24]</sup>。因此,与海洋沉积物不同,红枫湖沉积物中  $\text{SO}_4^{2-}$  不可能成为有机氧化的主要电子受体。红枫湖沉积物中有机质降解的方式是在多种微生物及其分泌的胞外酶的作用下进行, $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的变化也提示这种有机质降解的方式。红枫湖沉积物表层7cm有机质含量较为丰富,在5.55%~6.97%之间,而硫酸盐还原菌主要分布在这一沉积深度内, $\text{SO}_4^{2-}$  则迅速减少到较低的量(图4),说明  $\text{SO}_4^{2-}$  在此沉积深度内被还原而几乎耗尽,而  $\text{SO}_4^{2-}$  的消耗与硫酸盐还原菌的分布没有受到影响,因此,红枫湖沉积物有机质来源充足,在表层7cm内的含量相对较高,硫酸盐还原的限制因素不是有机质供应。

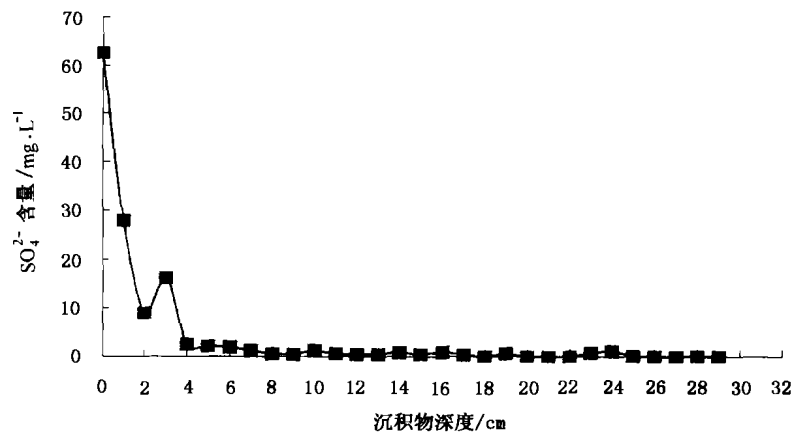


图4 红枫湖沉积物孔隙水  $\text{SO}_4^{2-}$  垂直分布

Fig.4 The variation of  $\text{SO}_4^{2-}$  in sediments of Lake Hongfeng with depth

## 4 结论

(1) 红枫湖沉积物中有机质在微生物及其分泌的胞外酶的作用下被降解,从悬浮层到11cm的深度内有机质的变化较为剧烈,11cm以下的变化趋于平缓,并被降解到相对较低的含量。DNA的分布表明表层9cm的沉积物深度内微生物的活动较为强烈,是微生物降解有机质的主要位置。

(2)  $\alpha$ -葡萄糖苷酶在红枫湖沉积物悬浮层含量最高,提示有机质中的淀粉和糖原等物质在悬浮层降解较为激烈并被大量分解;在有机质降解明显变缓的11cm沉积物中, $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性已降低很多,说明有机质经历长时间的降解减少后,其中的淀粉类物质也被耗尽。

(3) 分子生物学的研究表明红枫湖沉积物表层7cm是硫酸盐还原菌的主要分布位置,与该区域的  $\text{SO}_4^{2-}$  和有机质的垂直变化的比较研究提示:与海洋或有机质和  $\text{SO}_4^{2-}$  含量较高的浅水湖泊不同, $\text{SO}_4^{2-}$  不可能成为有机氧化的主要电子受体,硫酸盐还原的限制因素也不是有机质供应。

## 参 考 文 献

- 1 Burdige D J, Gardner K G. Molecular weight distribution of dissolved organic carbon in marine sediment pore waters. *Marine Chemistry*, 1998, **62**: 45 ~ 64
- 2 Arthur M A, Dean W E, Laarkamp K. Organic carbon accumulation and preservation in surface sediments on the Peru margin. *Chemical Geology*, 1998, **152**: 273 ~ 286
- 3 万国江, 白占国, 王浩然等. 洱海近代沉积物中碳-氮-硫-磷的地球化学记录. *地球化学*, 2000, **29**(2): 189 ~ 197
- 4 Jorgensen B B. Mineralization of organic matter in the seabed: The role of sulphate reduction. *Nature*, 1982, **296**: 643 ~ 645
- 5 Canfield D E. Factors influencing organic carbon preservation in marine sediments. *Chemical Geology*, 1994, **114**: 315 ~ 329
- 6 Coates J D, Anderson R T, Woodward J C *et al.* Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate-reduction and artificially imposed iron-reducing conditions. *Environmental Science & Technology*, 1996, **30**: 2 784 ~ 2 789
- 7 Gerritse R C. Sulphur, organic carbon and iron relationships in estuarine and freshwater sediments: Effects of sedimentation rate. *Applied Geochemistry*, 1999, **14**: 41 ~ 52
- 8 Schubert C J, Ferdelman T G, Strotmann B. Organic matter composition and sulfate reduction rates in sediments off Chile. *Organic Geochemistry*, 2000, **31**: 351 ~ 361
- 9 Luckge A, Horsfield B, Lütkec R *et al.* Organic matter preservation and sulfur uptake in sediments from the continental margin off Pakistan. *Organic Geochemistry*, 2002, **33**: 477 ~ 488
- 10 Muller A. Organic carbon burial rates, and carbon and sulfur relationships in coastal sediments of the southern Baltic Sea. *Applied Geochemistry*, 2002, **17**: 337 ~ 352
- 11 Portais J C, Delort A M. Carbohydrate cycling in microorganisms: What can <sup>13</sup>C-NMR tell us? *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, **26**: 375 ~ 402
- 12 Boschker H T S, Cappenberg T E. Patterns of extracellular enzyme activities in littoral sediments of Lake Gooimeer, The Netherlands. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **25**: 78 ~ 86
- 13 Deboz K, Rasmussen P H, Pedersen A R. Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: Effects of organic matter input. *Applied Soil Ecology*, 1999, **13**: 209 ~ 218
- 14 Alvarez S, Guerrero M C. Enzymatic activities associated with decomposition of particulate organic matter in two shallow ponds. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, **32**: 1 941 ~ 1 951
- 15 Katherine E D, Richard R K, Carol M T *et al.* Depth variation of bacterial extracellular enzyme activity and population diversity in the northeastern North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research II*, 2001, **48**: 1 003 ~ 1 017
- 16 沈 同, 王镜岩主编. 生物化学. 北京: 高等教育出版社(第二版), 1990. 10 ~ 43
- 17 Alber M, Valiela I. Biochemical composition of organic aggregates produced from marine macrophyte-derived dissolved organic matter. *Limnology & Oceanography*, 1994, **39**: 717 ~ 723
- 18 Suzumura M, Ishikawa K, Ogawa H. Characterization of dissolved organic phosphorus in coastal seawater using ultrafiltration and phosphohydrolytic enzymes. *Limnology & Oceanography*, 1998, **43**: 1 553 ~ 1 564
- 19 Dauwe B, Middelburg J J. Amino acids and hexosamine as indicator of organic matter degradation state in North Sea sediments. *Limnology & Oceanography*, 1998, **43**: 782 ~ 798
- 20 Dauwe B, Middelburg J J, Herman P M J *et al.* Linking diagenetic alteration of amino acids and bulk organic matter reactivity. *Limnology & Oceanography*, 1999, **44**: 1 809 ~ 1 814
- 21 Stepanauskas R, Leonardson L. Bioavailability of wetland-derived DON to freshwater and marine bacterioplankton. *Limnology & Oceanography*, 1999, **44**: 1 477 ~ 1 485
- 22 Obernosterer I, Herndl G J. Differences in the optical and biological reactivity of the humic and nonhumic dissolved organic carbon component in two contrasting coastal marine environments. *Limnology & Oceanography*, 2000, **45**: 1 120 ~ 1 129
- 23 Hadas O, Pinkas R, Malinsky-Rushansky N *et al.* Sulfate reduction in Lake Agmon, Israel. *The Science of the Total Environ-*

ment, 2001, 266: 203 -- 209

- 24 Botcher M E, Schale H, Schnetger B *et al.* Stable sulfur isotopes indicate net sulfate reduction in near-surface sediments of the deep Arabian Sea. *Deep-Sea Research II*, 2000, 47: 2 769 -- 2 783

## ENZYMATIC AND MICROBIAL DEGRADATION OF ORGANIC MATTER IN LAKE HONGFENG OF GUIZHOU PROVINCE

Liang Xiaobing    Zhu Jianming    Liu Congqiang    Wei Zhongqing  
Wang Fushun    Wan Guojiang    Huang Ronggui

(*State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Geochemistry Institute, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002*)

### Abstract

Enzymatic and microbial degradation of organic matter in Lake Hongfeng of Guizhou Province were studied through variations of DNA,  $\alpha$ -glucosidase and sulfate reduction bacteria. Organic matter is degraded by microbes and extracellular enzymes excreted by them, to a relative low content below 11cm of sediment depth. The variation of DNA contents indicated that microbe activities are strong in the upper 9cm which are main locations of organic matter degradation by microbes. Content of  $\alpha$ -glucosidase is highest in suspend layer, it is  $0.75\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$  dry sediments, suggesting starch and heptin of organic matter are degraded strongly with a mass of decomposing. Activities of  $\alpha$ -glucosidase decrease with sediment depth. Below 11cm depth at which organic matter degradation started to slow,  $\alpha$ -glucosidase activity has reduced to  $0.17\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$  dry sediment. Molecular biological research indicated that the main distribution location of sulfate reduction bacteria among 7cm of upper layer sediments layer sediments of Lake Hongfeng. Combined with the research results of variations of organic matter and  $\text{SO}_4^{2-}$ , indicated that  $\text{SO}_4^{2-}$  is not likely to become important electron acceptor and sulfate reduction is not limited by the supply of organic matter in Lake Hongfeng.

**Key words**    sediments, organic matter, enzyme, microbial, Lake Hongfeng