

贵州红枫湖沉积物中有机质的降解与微生物作用

魏中青 刘丛强 梁小兵 汪福顺 王少锋

(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; 中国科学院研究生院, 北京 100039.
E-mail: zhq_wei@hotmail.com)

摘要 对红枫湖沉积物中有机碳, 孔隙水中的 SO_4^{2-} , 以及沉积物中的DNA和类脂化化合物的分布进行了研究. 红枫湖沉积物有机碳的含量($23.3\sim 76.8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)从上到下呈下降趋势, $0\sim 8\text{ cm}$ 含量最高. 沉积物孔隙水中 SO_4^{2-} 含量为 $0.89\sim 40.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 表层 4 cm 深度内迅速下降至 $12\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 4 cm 后基本不变. 硫酸盐还原指数代表硫酸盐还原细菌对硫酸盐的还原强度, 表征 SO_4^{2-} 作为一种电子受体在有机质降解过程中被利用的程度. 对硫酸盐还原指数SRI的计算表明有机质保留年限为14年, 与孔隙水中 SO_4^{2-} 含量相对应. 沉积物中微生物的总DNA凝胶图像显示, DNA在 $0\sim 9\text{ cm}$ 含量相对较高, 9 cm 后相对较低, 与有机碳的变化规律和SRI值一致, 表明微生物在湖泊沉积物有机质降解过程中发挥了重要作用; 缺氧条件下, SO_4^{2-} 是重要的电子受体被微生物利用; 沉积物中微生物的总DNA分析为分子生物地球化学研究能为湖泊营养元素循环及湖泊富营养盐化的研究提供重要手段.

关键词 DNA 有机碳 SRI 类脂化合物

湖泊沉积物作为流域地表运移物质, 大气沉降物质和湖泊内源物质的共同宿体, 如实地记录了全球与流域环境信息, 具有连续性好、分辨率高、包含信息丰富的特点, 是研究环境变化的重要档案馆^[1]. 碳作为湖泊沉积物的主要组分和生物地球化学循环必不可少的元素之一, 与氮、磷、硫和微量元素的研究一直是科学界研究的热点之一^[2,3]. 随着大气 CO_2 浓度的增高, 及由此引起的温室效应, 大量的研究集中在碳的源和汇上, 除了泥炭、矿物土壤和植被, 海洋和湖泊沉积物也成为研究碳循环不可忽视的一点. 喀斯特地区湖泊沉积物中有机质的矿化和保存, 对于全球碳平衡有重要意义.

有机质沉降到湖泊沉积物-水界面附近, 大部分通过微生物作用被矿化, 少量暂时保存在沉积物中^[4]. 微生物在湖泊沉积物有机质的早期成岩过程中扮演着重要的角色, 其多样性在碳的生物地球化学过程中起着重要的作用^[5]. 沉积物中微生物的种类和活性能够指示湖泊生态功能的变异程度^[6]. 研究表明, 通过传统的培养方法却无法对环境中的绝大多数的微生物进行分离和培养, 对微生物活动的研究尤为困难^[7,8]. 自然环境中微生物DNA的分离技术已经成为环境研究中新兴而且重要的工具^[9]. 沉积物中微生物DNA的分离技术可以克服和弥补传统的培养技术的不足与测定的偏差, 能更精确和全面的探索微生物在自然环境中的作用. 本文采用DNA提取和纯化方

法, 初步研究了红枫湖沉积物中有机质的降解规律和微生物在有机质的降解过程的作用.

1 样品和方法

1.1 研究区概况

红枫湖位于 106.24°E , 26.32°N , 是贵州高原最大的人工湖, 湖周围岩溶地貌发育, 石灰土和黄壤广泛分布. 湖泊水面面积 57.2 km^2 , 流域面积 1596 km^2 , 湖泊补给系数49.6, 最大水深45 m, 湖水滞留时间 0.325 a , 沉积速率平均 $0.17\text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$ ^[10].

1.2 采样与分析方法

采用自行研制的便携式沉积物采样器^[11], 于2003年3月在红枫湖后五开阔深水区采得沉积物柱芯5根, 平均长度30 cm, 在25 cm左右均见原始土壤, 沉积物柱界面水清澈, 沉积物保存完好, 明显未受到扰动, 表明该沉积物柱能较完整地反映湖泊自然沉积过程. 沉积物在采样现场按1 cm间隔切分, 密封保存. 样品迅速带回实验室, 用冷冻离心机(FD-3-85-MP)在 4°C , 4000转/min条件下离心30 min后取孔隙水并过滤, 用HP1100高效液相色谱测定 NO_3^- 和 SO_4^{2-} . 沉积物样品经真空冷冻干燥器(FD3-85D-MP型冷干仪)干燥后, 研磨过150目筛, 冷冻保存备用. 取沉积物HF0300227-1柱和HF030227-5柱样品进行分析. 干燥沉积物样品用2

mol·L⁻¹ 的盐酸酸化处理后, 采用 PE2400 SERIES 型元素分析仪(美国 PE 公司)进行了有机碳和硫含量的测定, 分析误差小于 5%.

称取 2.00 g 干燥样品, 加入 10 g·L⁻¹ 的溶菌酶溶液浸湿, 37 ℃ 温育 2 h, 期间振荡 5~8 次. 随后加入 DNA 提取液 5 mL, 混匀. 用冷冻离心机(FD-3-85-MP)在 4 ℃, 4000 转/min 条件下离心 30 min 后取出清液. 重复上述过程提取 3 次清液, 混合上清液. 对清液分别用等体积的饱和酚、氯仿-异戊醇提纯多次, 用上述条件离心后取上清液. 最后, 用乙醇沉淀 DNA, 取沉淀, 室温下干燥. 将干燥 DNA 溶解于 100 μL TE 缓冲液溶液中, 取 10 μL 溶液, 加入 2 μL DNA 上样液, 点样于含有 0.5 mg·g⁻¹ 的 EB 的琼脂糖凝胶板孔中, 在 45 V 稳压及 0.5 × TBE 缓冲液中, 进行琼脂糖凝胶电泳, 完毕后, 用 Tanon GIS-2008 成像系统在紫外光下拍摄图像, 然后进行图像处理.

另称取干燥样品 2.00 g, 用滤纸包住置于索氏提取器中, 用石油醚连续萃取 48 h, 利用差值法得到溶剂抽提类脂化合物含量. 所有玻璃器皿洗净, 450 ℃ 灼烧 4 h; 有机溶剂经二次抽提; 滤纸经索氏抽提 72 h; 金属和其他实验用具用石油醚超声清洗, 防止人为污染.

2 结果和讨论

2.1 沉积物有机碳和硫, NO₃⁻, SO₄²⁻的含量分布

红枫湖沉积物中有机碳和硫的含量垂直分布见图 1. 红枫湖春季沉积物中有机碳含量为 23.3~76.8 mg·g⁻¹, 由表层向下逐渐降低. 5~10 cm 有机碳含量出现峰值与这一时期的渔业活动有关. 沉积物柱 26 cm 深处出现原始土壤, 有机碳含量变化偏离总趋势. 15~26 cm 有机碳含量变化不大, 保持在 2 mg/g 左右. 沉积物中有机硫的含量为 1.07~14.12 mg·g⁻¹, 趋势

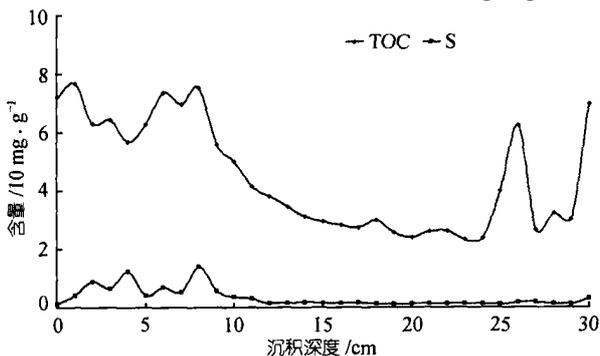


图 1 红枫湖沉积物有机碳和硫含量

与有机碳相似, 10 cm 深度后含量变化不大, 保持在 2 mg·g⁻¹ 左右.

沉积物孔隙水中 SO₄²⁻ 含量为 0.89~40.5 mg·L⁻¹. 由于湖水的稀释作用悬浮层 SO₄²⁻ 含量较低, 0~1 cm 段呈上升的趋势; 1~4 cm 段, SO₄²⁻ 被迅速消耗, 由 40.5 mg·L⁻¹ 迅速下降到 12.0 mg·L⁻¹; 5~15 cm 段缓慢降低, 15 cm 后基本不变(图 2). NO₃⁻ 含量很低, 在 1.0 mg·L⁻¹ 以下, 近于仪器检测限, 基本没有变化.

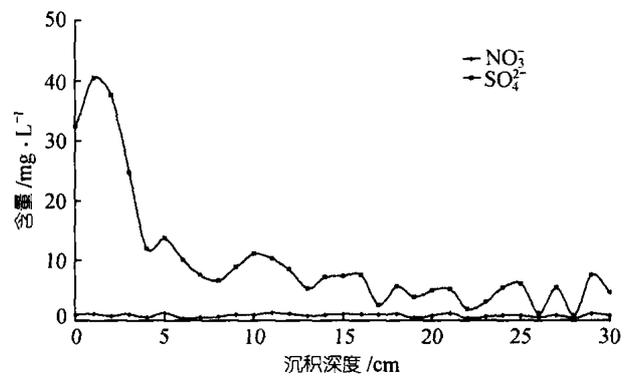


图 2 红枫湖沉积物孔隙水中 SO₄²⁻ 和 NO₃⁻ 的含量分布

2.2 沉积物 DNA 的分布规律

红枫湖沉积物中 DNA 的总含量可以代表微生物的生物量, 能够反映有机质的降解程度. 红枫湖沉积物中 DNA 随沉积深度变化的凝胶紫外图像(图 3)中, 0~9 cm 图像亮度较高, 9 cm 后亮度降低. 由此可知, 红枫湖沉积物中 0~9 cm DNA 含量相对较高, 微生物丰富, 9 cm 以下 DNA 含量低, 微生物贫乏.



图 3 红枫湖沉积物中 DNA 的分布

2.3 沉积物中类脂化合物的含量分布

红枫湖沉积物中类脂化合物的含量为 8~30 mg·g⁻¹, 占有机质的 30%~50%. 从表层向下逐渐降低, 整体变化与有机碳的含量分布基本一致(图 4).

2.4 沉积物硫酸盐还原作用与有机质的降解

Kristensen 等^[12]发现, 在缺氧的天然浅水沉积物

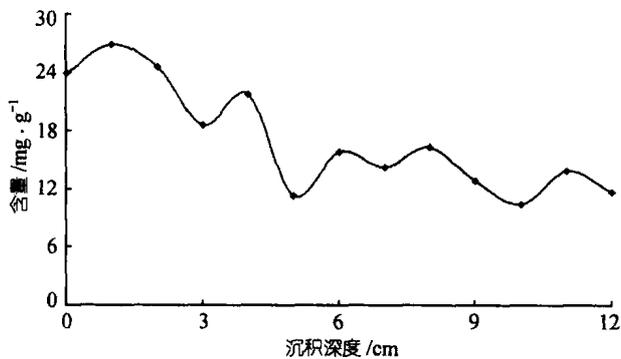


图4 红枫湖沉积物中类脂化合物的含量分布

中的有机质分解速率稍高于有氧条件下的有机质,但缺氧条件下厌氧微生物对复杂有机分子的破坏力较小,降解有机质主要以难氧化的分子为主,故作为厌氧微生物主要电子受体的硫酸盐等其他的氧化剂也可以起到和氧气相当的作用.硫含量及硫酸盐还原强度是反映有机质保存条件的重要指标.硫酸盐还原作用强度可用硫酸盐还原指数 SRI 表示^[13]:

$$SRI = (TOC + C_{loss}) / TOC$$

其中, C_{loss} 为硫酸盐还原作用中被降解的有机质的量, $S(\%)$ 为硫的百分含量, TOC 为有机碳含量, C_{loss} 可表示为:

$$C_{loss} = S(\%) \times 0.75$$

SRI 值高,即硫酸盐还原程度高.红枫湖是季节性厌氧型湖泊,春季沉积物表层有氧气的供应,需氧微生物的呼吸作用就会导致氧的快速分解和连续消耗,有机质快速氧化分解,沉积物悬浮层出现明显的氧化层,因此悬浮层 SRI 值较低.由于 NO_3^- 含量很低,硝化作用很弱,随深度的增加,氧气被耗尽,硫酸盐便成为第一氧化剂.沉积物孔隙水中 SO_4^{2-} 作为主要的电子受体,被微生物利用,有机质被进一步降解.在表层 4 cm 深度中,微生物生物量相对较高, SO_4^{2-} 作为微生物的电子受体强烈降解有机质, SO_4^{2-} 含量迅速降低, SRI 值达到峰值.如前所述, 8 cm 出现的峰值,是由于当地水产养殖活动导致大量 TOC 沉积,提供丰富的电子供体,促使硫酸盐还原,因而出现高的 SRI 峰值. 10 cm 后, SO_4^{2-} 含量和 DNA 量相对表层很低,基本没有变化,硫酸盐还原程度自然较低.有机碳的含量与硫酸盐还原指数呈现较明显的反相关关系(图 5),有机碳的低值对应硫酸盐还原指数的峰值,有机碳的峰值对应硫酸盐还原指数的低值.由此可见,在厌氧条件下硫酸盐还原细菌对于有机质的

降解起着至关重要的作用.

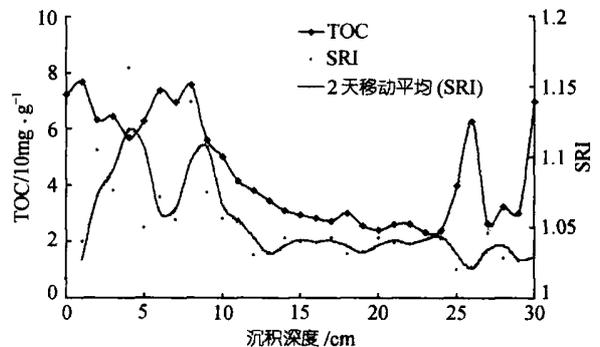


图5 有机碳(TOC)与硫酸盐还原指数(SRI)的变化关系

2.5 沉积物有机碳与 DNA 的关系

红枫湖表层沉积物中 DNA 含量较高,说明微生物生物量高,对有机质的降解活动剧烈.由于红枫湖是季节性厌氧型湖泊,有机质厌氧降解所需的电子受体迅速耗尽,使得有机质的降解速率相对缓慢.从 DNA 的分布上也可以看出 15 cm 深度以下,基本没有微生物的活动.难以降解的有机质或是交换达到平衡的有机质得以保存,基本不再发生变化.

微生物在有机质的降解过程中起着重要的作用,但有机质不仅对于微生物的活性有制约效应,而且还是控制微生物的生物量的主要因素之一. Boetius 和 Damm 等^[14]认为有机质与微生物的多样性有关.本研究显示,两者存在较明显的正相关关系.沉积物有机碳含量高的沉积深度范围, DNA 含量相对也高;而有机碳含量低的区域, DNA 含量相对也低.有机质含量高,营养丰富,食物量多,微生物的种群数量多,对于物质的竞争相对较弱,微生物的生物量和活性相对较高;反之,有机质贫乏,微生物则相对较少.

红枫湖有机碳整体呈指数下降的趋势,可以根据下降的程度估算有机碳的分解速率常数^[15].设有有机碳的分解为一级反应, Z 表示沉积深度(cm), 则

$$K = \ln(C_0 / C_z) / (Z / S),$$

其中, C_0 , C_z 分别表示深度为 0 cm 和 Z cm 深度处的含量, K 为分解速率常数(a^{-1}), S 为沉积速率($cm \cdot a^{-1}$).由采样平均柱长 36 m 和明确的沉积年限(1961 年)可以计算平均沉积速率 S 约为 $1 cm \cdot a^{-1}$,与万国江和陈振楼^[16]的计算结果($0.94 cm \cdot a^{-1}$)一致.计算得出红枫湖沉积物有机碳的分解速率常数约为 $0.07 a^{-1}$.分解

速率常数还可以作为判断有机质在沉积物中保存时间的指标。分解速率常数越大,表明其降解反应迅速,为相对年轻的沉积物,其保存时间也越短。根据计算,红枫湖沉积物中有机碳的寄宿时间(保存时间)约为 14 a。红枫湖与洱海水深相差不大,但红枫湖有机质含量较高,微生物量高,对有机质的降解程度比洱海剧烈,所以洱海有机碳的分解速率约为 0.017 a^{-1} 较小,有机碳的寄宿时间为 40 a 比红枫湖有机碳寄宿时间长。

3 结论

沉积物孔隙水中 SO_4^{2-} 含量变化为 $0.89\sim 40.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 在表层 5 cm 呈快速下降趋势, 5 cm 以下缓慢下降, 表明硫酸盐在好氧环境中基本没有被微生物作为电子受体利用, 而有机碳才是主要的电子受体, 与硫酸盐还原指数(SRI)和有机硫的结果相对应。 NO_3^- 含量近于仪器检测限, 总体上无明显变化。

红枫湖沉积物中有机碳含量分布为 $23.3\sim 76.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 总体上, 从沉积物表层向下呈指数下降趋势, 表明有机质主要在表层富集, 表层的营养最为丰富, 从沉积物中总的 DNA 看来, 此范围内含量相对也较高, 表明表层 10 cm 微生物含量最为丰富, 微生物对有机质的降解活动剧烈, 有机质呈指数下降; 而 10 cm 后有机碳的含量和 DNA 的总量基本没有变化, 表明其降解活动很微弱, 呈现为有机质的矿化堆积过程, 此阶段有机碳被固定, 对于大气中的 CO_2 来说应为汇, 表明沉积物中有机质的含量控制着微生物的量及活性, 微生物又通过利用有机质而达到降解有机质的目的, 其两者相互影响, 变化一致。

沉积物中有机硫的含量为 $1.07\sim 14.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 脂类化合物为 $8\sim 30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 占有机质量的 30%~50% 左右, 其分布趋势与有机质相似, 降解主要发生在表层 10 cm 内。一度停止的渔业活动在有机质含量剖面有记录, 体现为有机质含量的突然增高, 表明沉积物中有机碳的含量可以记录湖泊活动。微生物是随着有机质的降解而沉积物作为湖泊中物质的归宿, 对于大气中的所有元素有很大的贡献。沉积物中微生物的活动对于营养元素的矿化起着至关重要的作用, 对于大气中的温室气体的增加或者减少都有着直接的影响, 因此沉积物中微生物的活性和种类及其活动的原理是值得进一步研究。

致谢 本工作得到中国科学院创新基金(批准号: KZCX3-

SW-140, KZCX2-105)和国家自然科学基金(批准号: 40173038, 40473050, 40303013)资助。

参 考 文 献

- 1 王苏民, 张振克. 中国湖泊沉积与环境演变研究的新进展. 科学通报, 1999, 44(6): 579~587
- 2 Turley C M, Lochte K, Lampitt R S. Transformations of biogenic particulates during sedimentation in the northeastern Atlantic. Phil Trans R Soc Lond, 1995, B 348: 179~189
- 3 Turley C M, Stutt E D. Depth-related cell-specific bacterial leucine incorporation rates particles and its biogeochemical significance in the Northwest Mediterranean. Limnol Oceanogr, 2000, 45: 419~425
- 4 Polona V. Carbon cycling at the sediment water interface in a eutrophic mountain lake (Jezero na Planini pri Jezeru, Slovenia). Organic Geochemistry, 2003, 34: 671~680
- 5 Denedy A C. Bacterial diversity in agroecosystems. Agric Ecosyst Environ, 1999, 74: 65~76
- 6 Roose-Amsaleg C L, Garnier-Sillam E, Harry M. Extraction and Purification of microbial DNA from soil and sediment samples. Applied Soil Ecology, 2001, 18: 47~60
- 7 Amann R L, Ludwig W, Schleifer K H. Phlogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev, 1995, 59: 143~169
- 8 Orphan V J, Taylor L T, Hafenbradl D, et al. Culture-dependent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 700~711
- 9 Liesack W, Stackebrandt E. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. J Bacteriol, 1992, 174: 5072~5078
- 10 万国江. 现代沉积年分辨 ^{137}Cs 计年——以云南洱海和贵州红枫湖为例. 第四纪研究, 1999, 1: 72~80
- 11 王雨春, 黄荣贵, 万国江. SWB-1 型便携式湖泊沉积物-水界面取样器的研制. 地质地球化学, 1998, 1: 94~96
- 12 Kristensen E, Blackburn T H. The fate of organic carbon and nitrogen in experimental marine sediment systems: influence of bioturbation and anoxia. Journal of Marine Research, 1987, 45: 231~257
- 13 Lallier-Verges E, Bertrand P, Desprairies A. Organic matter composition and sulfate reduction intensity in Oman Margin sediments. Marine Geology, 1993, 112: 57~69
- 14 Boetius A, Damm E. Benthic oxygen uptake, hydrolytic potentials and microbial biomass at the Arctic continental Slope. Deep-Sea Research I, 1998, 45: 239~275
- 15 洪华生, 徐立, 郭劳动, 等. 台湾海峡南部沉积物中 C 有机 N, P 和 Si 的地球化学[A]. 见: 洪华生主编. 海洋生物地球化学研究论文集. 厦门: 厦门大学出版社, 1996. 31~38
- 16 陈振楼, 黄荣贵, 万国江. 红枫湖沉积物-水界面 Fe, Mn 的分布和迁移特征. 科学通报, 1992, 37(21): 1974~1977

(2004-10-08 收稿, 2005-04-08 收修改稿)