

东湖沉积物中微生物磷脂的垂向分布

冯 峰^{1,2}, 方 涛¹, 刘剑彤^{1,*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 以武汉东湖柱状沉积物为研究对象, 利用磷脂法测定了 3 个采样点各层的微生物量, 同时测定了沉积物中各层的 pH, 简要分析了沉积物中磷脂含量的垂向分布与 pH 垂向分布的相关性。结果表明: 各样点沉积物中磷脂平均含量分别为: 1 号点 59.40nmol/g dw, 2 号点为 20.56nmol/g dw, 3 号点为 31.57nmol/g dw。在沉积物的垂向分布上, 微生物量与 pH 均随着沉积物深度的增加而降低, 并且存在很高的相关系数。

关键词: 东湖; 沉积物; 微生物量; 磷脂

文章编号: 1000-0933(2006)06-1758-05 中图分类号: Q143, Q938.8 文献标识码: A

The vertical distribution of sedimentary microbial biomass in Lake Donghu by phospholipid methods

FENG Feng^{1,2}, FANG Tao¹, LIU Jian-Tong^{1,*} (1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(6): 1758~1762.

Abstract: Sediment samples for phospholipid and pH analysis were collected from three sites in Lake Donghu. Lipids were recovered from all samples by chloroform-methanol extraction. Briefly, the sediment samples were mixed with chloroform, methanol, and phosphate buffer (pH 7.4) at a ratio of 1: 2: 0.8 in colorimetric tube, incubated for 2h, then subjected to centrifugation. The lipid-containing solvent (chloroform) was transferred into separatory funnels. Then partitioned by adding chloroform and buffer till the final ratio of chloroform-methanol-buffer was 1: 1: 0.9. The mixture was allowed to separate for 24h. The lower organic phase was decanted into a test tube and then dried under a gentle steam of nitrogen. Phosphate was liberated from lipids by perchloric acid digestion and heated to 200°C for 2h. Finally, inorganic phosphate released by digestion was determined by the method of Van Veldhoven and Mannaerts. Meanwhile, the pH value of sediments was measured in situ and the relativity between pH value and concentrations of phospholipids was analyzed.

The results showed that the highest concentration of microbial phospholipids occurred in Station 1, which suffered from heavy domestic sewerage and the average concentration is 59.40nmol/g dw. The lowest concentration of microbial phospholipids presented in Station 2, which is located at the centre of Lake Donghu and its concentration is 20.56nmol/g dw. Station 3 was in the middle with its concentration at 31.57nmol/g dw. Vertical distribution of three sample sites indicated that microbial phospholipids decreased along with sediment depth. At the top 10cm layer of the sediments, all of the sampling sites in Lake Donghu were very high. However, along with the increasing of the depth of sediment, the concentrations of microbial phospholipids of the three sampling sites showed great changes, because of the long time precipitation of nutritious matters, the concentrations of microbial phospholipids in station 1 were still high, but it decreased obviously in Station 2 and Station 3, because they are far from heavy domestic sewerage. The pH value of sediments also decreased along with depth and the correlation

基金项目: 国家 973 项目资助项目(2002CB412300); 国家 863 项目资助项目(2002AA601013)

收稿日期: 2005-09-11; 修订日期: 2006-05-12

作者简介: 冯 峰(1982~), 男, 河南卢氏人, 硕士生, 主要从事湖泊生态学研究. E-mail: fengf_2005@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jliu@ihb.ac.cn

Foundation item: The project was supported by National 973 Project(2002CB412300); National 863 Project(2002AA601013)

Received date: 2005-09-11; **Accepted date:** 2006-05-12

Biography: FENG Feng, Master candidate, mainly engaged in lake ecology. E-mail: fengf_2005@163.com

coefficient between them was high, which were $r^1 = 0.9492$, $r^2 = 0.7376$ and $r^3 = 0.9050$ respectively.

Considering the important effect of the concentration of nutritious matters for microbial growth, systematic analyzing the relativities between the concentration of microbial phospholipids and biogenic matters, such as total nitrogen, total phosphorus etc, as well as environmental factor should be done in further study.

Key words: Lake Donghu; sediments; microbial biomass; phospholipid

湖泊是一个具有高度生物活性的特殊环境, 有机质的微生物降解是湖泊生源物质得以再生的主要途径。在传统的微生物生物量的测定中, 平板菌落计数法(CFU)或最大可能自然数法(MPN)计算的微生物的生物量只能代表能够在培养基中生长的那一部分, 直接计数法则不能区别活的生物量和死的生物量^[1]。这些方法测定的生物量只能提供微生物群落信息的一小部分, 分离鉴定到的微生物只占环境微生物总数的 0.1% ~ 10%^[2]。

在适宜的条件下自然微生物群落中细胞磷脂(phospholipid)含量与总微生物量有着相对稳定的比例关系^[3]。因为磷脂类化合物主要存在于所有活细胞膜中, 细胞中磷脂的含量在自然条件下(正常的生理条件下)恒定^[4]。一旦微生物细胞死亡, 其中的磷脂类化合物能够快速转化和降解, 所以磷脂类化合物可以作为微生物生物量的指标。在国外, 利用磷脂来估测土壤或沉积物中的微生物生物量, 在很早就有报导, 如 White 等人于 1979 年进行了提取磷脂来确定河口沉积物微生物生物量的研究^[5], Findlay 等人则于 1989 年用磷脂分析法测定了深海沉积物中的微生物生物量^[6], Frostegard 等人也运用磷脂的总含量检测了不同有机成分土壤的微生物生物量^[7]。国内则仅见一些综述性文章, 研究性报导尚不多见。

本文以东湖柱状沉积物为研究对象, 分析了沉积物中磷脂含量的垂向分布, 估算了沉积物中微生物的生物量, 并对沉积物中的微生物量与 pH 的相关性进行了简要的探讨, 为湖泊生态学和富营养化机理的研究提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

东湖(30°22'N, 114°23'E)是一个典型的富营养湖泊, 位于武汉市武昌区东北部, 是长江中游一个中型浅水湖泊, 水域面积在水位 20.5m 时为 27.9km², 平均水深约 2.21m, 最大水深 4.75m。由于多年来人工围堤的结果, 已被划分成许多小湖区, 目前最大湖区是郭郑湖, 面积 12.34km²。是东湖富营养化较为严重的湖区^[8]。本研究在郭郑湖区设 3 个采样点, 其中 1 号点(30°32.922'N, 114°21.572'E)位于排污区, 2 号点(30°32.989'N, 114°22.679'E)处于湖心位置, 3 号点(30°32.949'N, 114°23.607'E)靠近磨山风景区, 如图 1 所示。

1.2 样品采集与处理

分别于 2004 11, 2004 12 和 2005-3 用自制的柱状采泥器采集 3 个采样点 0~30cm 的样品, 以 2cm 每层现场分割, 并测定各层的 pH, 测定完成后迅速将样品放入聚乙烯塑料袋中密封保存, 随后用便携式冰箱低温运回实验室冷冻保存。将冷冻后的样品放进冷冻干燥仪冷冻干燥 24h 后, 研磨过 100 目筛, -20℃冰箱中保存, 以待分析。

1.3 脂类萃取

脂类的萃取方法采用改进的 Bligh 和 Dyer 萃取方法^[5,9]。简要步骤如下: 称取适量样品放入 100ml 的比色管中, 加 4ml 的磷酸缓冲液(用 1mol/L HCl 中和 11.411g/L 的 K₂HPO₄·3H₂O 到 pH 为 7.4 为止), 然后加

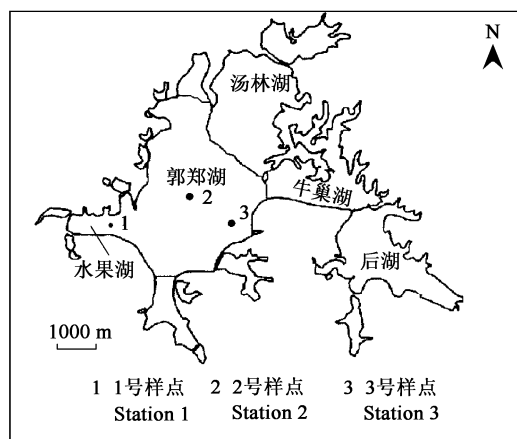


图1 东湖采样位置

Fig. 1 Location of sampling in Lake Donghu, Wuhan

上 10ml 的甲醇和 5ml 的氯仿, 混合均匀后超声萃取 2h, 将超声萃取过后的样品连同溶液移入离心管中, 随后再在原先的比色管中加入 4ml 的磷酸缓冲液, 10ml 的甲醇和 5ml 的氯仿, 洗涤残渣及容器, 震荡充分后一并移入离心管中, 4500r/min 离心 15min, 离心后的上清液移入 125ml 的分液漏斗中, 并向分液漏斗中加 10ml 磷酸缓冲液和 10ml 氯仿, 震荡混合均匀, 静置 24h 后, 分液漏斗中的溶液分层, 上层无色, 下层棕黄色。

收集下层的有机相, 移入试管中, 加热(不超过 40℃)并用氮气吹干有机相, 氯仿必须完全除去否则可能会在消解过程中引起爆炸。干燥后的脂类可以在充入氮气后于 -20℃ 条件下保存。

1.4 磷脂消解与含量测定

向经氮气吹干后仅含脂类的试管中加入 35% 的高氯酸(浓高氯酸加水 1:1 混合) 1.5ml, 并在试管顶部放上小漏斗, 加热到 200℃ 消解 2h。消解后的消化液为无色澄清液体。冷却后的消化液转入 25ml 的比色管中, 并用蒸馏水冲洗试管壁 2~3 次, 冲洗液全部转入比色管中, 定容至 10ml; 加 1 滴酚酞指示剂, 用 10mol/L NaOH 溶液滴定至溶液刚显红色为止, 再用 1mol/L H₂SO₄ 滴定至红色消失, 随后定容至 25ml, 向比色管中加入 0.5ml 10% 抗坏血酸溶液, 混匀。30s 后加 1ml 钼酸盐溶液充分混匀, 放置 15min。用 20mm 比色皿, 于 700nm 波长处, 测定其吸光值。

1.5 标准曲线的绘制

标准曲线的绘制参考总磷的钼酸铵分光光度法^[10]。

2 结果和讨论

2.1 3 个采样点沉积物 pH 的垂直分布

如图 2 所示, 3 个采样点柱状沉积物的 pH 值具有同步变化趋势, 其大小随深度的增加而逐渐下降并最终趋于稳定。在沉积物表层 3 个采样点的 pH 值比较接近, 约为 7.5。稳定后 1 号点 pH 值约为 6.98, 2 号点 pH 值约为 6.57, 3 号点 pH 值约为 6.76, 三者关系是 1 号点 > 3 号点 > 2 号点。

2.2 3 个采样点沉积物中磷脂含量的垂向分布

每个样品的磷脂含量均平行测定 3 次, 最后取平均值并计算标准差, 如图 3 所示。在 3 个采样点磷脂的垂直分布上, 表层沉积物的磷脂含量非常高, 其中 1 号点磷脂含量为 101.6nmol/g dw, 2 号点为 84.97nmol/g dw, 3 号点为 107.19nmol/g dw。

随着深度的增加, 微生物磷脂含量都呈明显的下降趋势, 这与 Haglund 等研究发现微生物的活性与数目均随着沉积物深度的增加而下降相一致^[11]。在表层 10cm 部分, 各样点的磷脂含量均较高, 而在 10cm 以下的部分, 则只有 1 号点仍呈高的磷脂含量, 而 2 号和 3 号点的磷脂含量则明显减少, 并且在垂向分布上无太大变化。由于 1 号点处于有大量生活污水排入的湖湾区, 湖湾使得水流速缓慢, 大量的外源营养物质不能够及时扩散到郭郑湖整个湖区, 大部分都会沉淀下来, 这样各种营养物质含量在沉积物的垂向分布上都非常的高^[12], 丰富的营养物质给微生物提供了充足的养分, 因此其磷脂含量在垂直分布上就显得非常的高。对于 2 号点和 3 号点, 处于远离湖湾区的地方, 受水体的混合稀释作用及浮游生物对营养成分吸收的影响, 能够沉淀下来特别是在底层所能沉淀的有机质就很少, 因而其磷脂含在底层部分就下降很快。

2.3 沉积物中磷脂含量与微生物生物量的对应关系

通常用一个平均转换因子将磷脂脂肪酸的量转换为细胞的数量, 由于受到各种环境生态因子的限制, 目

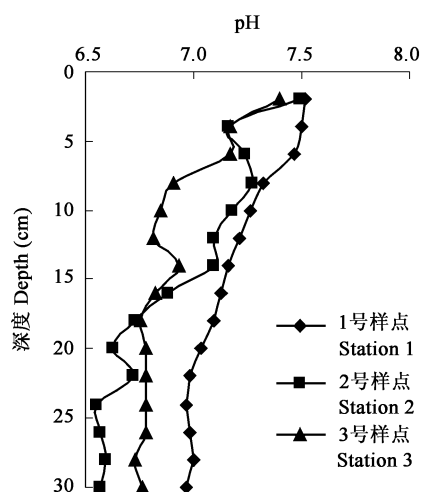


图2 3 个采样点沉积物 pH 的垂直分布

Fig.2 Vertical profiles of pH in sediments of three sampling sites

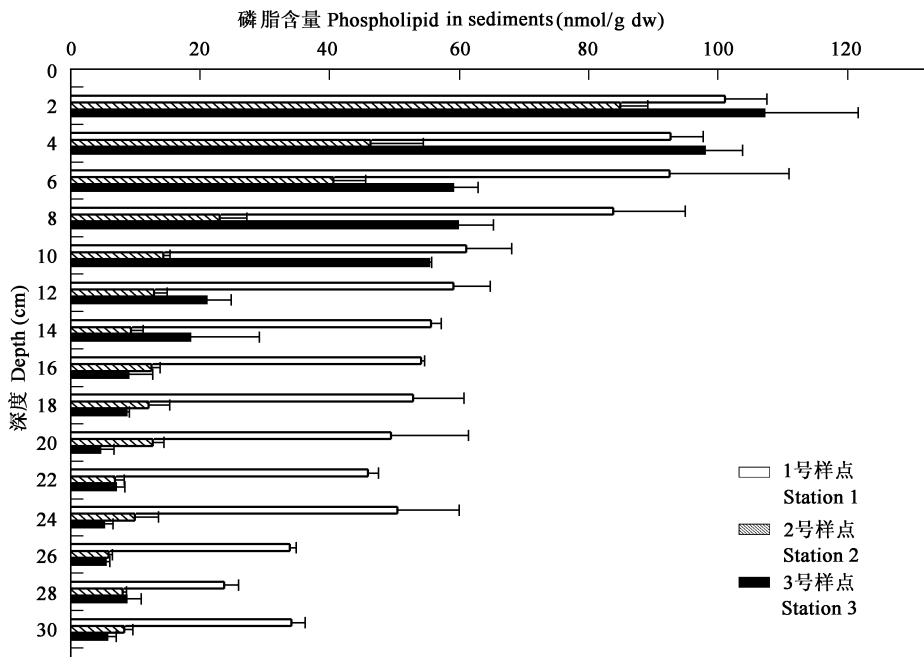


图3 3个采样点沉积物磷脂含量的垂直分布

Fig.3 Vertical profiles of phospholipid in sediments of three sampling sites

前还没有一个统一的定论。White 等通过对大肠杆菌(*E. coli*)等的分析, 计算出其转换因子介于 $4 \times 10^7 \sim 2 \times 10^9$ 个/nmol 之间, 为克服纯培养不能反映出环境中真实条件的限制^[13,14], Findlay 等经过对沉积物进行多次加富培养, 将回收到的细胞经过洗涤后计算出其中磷脂含量和微生物数量的转换因子为 1nmol 磷相当于 3.4×10^7 个微生物细胞^[15]。尽管不同生境下的自然群落中微生物个体大小不同, 种属不同, 这个转换因子并不能非常准确地反映出群落中的微生物量, 但是由于本方法与直接计数法和 MPN 法相比, 该方法能够提供活微生物生物量的较完整的信息, 并且操作相对简便, 因而是一种快捷、可靠的分析方法, 本试验中 3 平行的标准差较低也从一个侧面证明了其可靠性。从表 1 磷脂含量按照 Findlay 给出的转换因子估算出各样点的平均微生物量为 1 号点 2.02×10^9 个/g dw, 2 号点为 7.00×10^8 个/g dw, 3 号点为 1.07×10^9 个/g dw。3 个采样点微生物量的关系是 1 号点> 3 号点> 2 号点。

2.4 沉积物微生物量与 pH 的相关性分析

沉积物中的微生物在水体营养物质的循环和能量的流动中具有极其重要的作用, 其含量与生长环境中的营养盐含量有重要关系, 同时, 微生物的生物量又受到环境因素, 特别是 pH 的影响, 因此, 对各种因素与微生物量之间的相关性分析就显得很重要。3 个采样点微生物量与 pH 的相关系数分别是: 1 号点 $r = 0.9492$, 2 号点 $r = 0.7376$, 3 号点 $r = 0.9050$, 从相关性分析中可以看出, 3 个采样点的 pH 与微生物量存在很高的相关性, 但是由此并不能确定是 pH 的高低影响了微生物量, 还是微生物量的高低影响了 pH, 此外, 微生物生长环境中的营养盐含量也对微生物量有着重要影响, 因而有必要对参与生源要素循环的微生物量与环境影响因素的关系进行系统的试验, 同时对于生源要素的垂向分布和微生物的垂向分布的相关性也需要进行深入的探讨。

3 结论

(1) 利用磷脂法测定东湖柱状沉积物中 3 个采样点的平均微生物磷脂含量分别为: 1 号点 59.40 nmol/g

表 1 东湖三个采样点的磷脂含量 (nmol/g dw)

Table 1 Concentrations of phospholipid in sediments of three sampling sites(nmol/ g dw)			
磷脂含量 Phospholipid concentrations	1 号点 Station 1	2 号点 Station 2	3 号点 Station 3
范围 Range	23.76~ 101.08	5.94~ 84.97	4.62~ 107.19
平均值 Mean	59.40	20.56	31.57

dw, 2 号点为 20.56nmol/g dw, 3 号点为 31.57nmol/g dw。3 个采样点微生物磷脂含量的关系是 1 号点 > 3 号点 > 2 号点。

(2) 在微生物磷脂的垂向分布上, 表层 10cm 部分各样点磷脂含量均较高, 深层部分则随着营养盐含量的不同而差别显著。磷脂含量与 pH 均随着沉积物深度的增加而降低, 并且存在很高的相关系数, 考虑到碳、氮、磷等其它生源因素的影响, 有必要对参与生源要素循环的微生物量与环境因素的关系进行系统的研究。

References:

- [1] Qi H Y, Xue K, Zhang H X. Phospholipid fatty acid analysis and its application in microbial ecology. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(8): 1576~ 1582.
- [2] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, 59: 1143~ 1169.
- [3] Perry G J, Volkman J K, Johns R B, *et al.* Fatty acids of bacterial origin in contemporary sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1979, 43: 1715~ 1725.
- [4] White D C, Bobbie R J, King J D, *et al.* Biochemical measurements of microbial mass and activity from environmental samples. *Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology*. American Society for Testing and Materials, 1979.
- [5] White D C, Davis W M, Nickels J S, *et al.* Determination of the Sedimentary Microbial Biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, 1979, 40: 51 ~ 62.
- [6] Findlay R H, King G M, Watling L. Efficacy of phospholipid analysis in determining microbial biomass in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(11): 2888~ 2893.
- [7] Frostegard A, Unlid A, Baath E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, 14: 151~ 163.
- [8] Liu J K ed. *Ecological research of Lake Donghu*. Beijing: Science Press, 1990. 4~ 25.
- [9] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37: 911~ 917.
- [10] State Environment Protection Bureau. *Methods of monitoring and analysis for water and wastewater*(fourth edition). Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [11] Haglund A L, Lantz P, Tornblom E, *et al.* Depth distribution of active bacteria and bacterial activity in lake sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46: 31~ 38.
- [12] Yang H, Yi C L, Xie P, *et al.* Vertical distribution of carbon, nitrogen and phosphorus of sediments at stations I and II in Lake Donghu, Wuhan. *Geochimica*, 2004, 33(5): 507~ 514.
- [13] White D C. Analysis of microorganisms in terms of quantity and activity in natural environments. *Soc. Gen. Microbiol. Symp.*, 1983, 34: 37~ 66.
- [14] Balkwill D L, Leach F R, Wilson J T, *et al.* Equivalence of microbial biomass measures based on membrane lipid and cell wall components, adenosine triphosphate, and direct counts in subsurface aquifer sediments. *Micro. Ecol.*, 1988, 16: 73~ 84.
- [15] Findlay R T, King G M, Watling L. efficacy of phospholipids analysis in determining microbial biomass in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(11): 2888~ 2893.

参考文献:

- [1] 齐鸿雁, 薛凯, 张鸿勋. 磷脂脂肪酸图谱分析方法及其在微生物生态学领域的应用. *生态学报*, 2003, 23(8): 1576~ 1582.
- [8] 刘建康. *东湖生态学研究(一)*. 北京: 科学出版社, 1990. 4~ 25.
- [10] 国家环保总局《水和废水监测分析方法》编委会编. *水和废水监测分析方法*. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [12] 杨洪, 易朝路, 谢平, 邢阳平, 等. 武汉东湖沉积物碳氮磷垂向分布研究. *地球化学*, 2004, 33(5): 507~ 514.