

太湖沉积物中解磷细菌分布及其与碱性磷酸酶活性的关系

宋炜, 袁丽娜, 肖琳*, 詹忠, 杨柳燕, 蒋丽娟

(南京大学环境学院污染物控制与资源化国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 分析了太湖沉积物中解磷细菌的丰度, 测定了不同季节、不同采样点、不同取样深度沉积物中碱性磷酸酶的活性, 探讨了了解磷细菌分布与碱性磷酸酶活性的关系. 结果表明, 解磷菌在表层沉积物中普遍存在, 随着深度的增加, 数量逐渐减少. 解磷菌的种类秋季最多, 冬季最少, 但解磷能力较强的菌大部分出现在夏季. 碱性磷酸酶活性范围为 $0.001 \sim 0.006 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$, 酶活性呈现较为明显的季节变动, 不同采样点间酶活性差异较大, 随深度的增加, 碱性磷酸酶活性逐渐降低. 各采样点碱性磷酸酶在 $0 \sim 12 \text{ cm}$ 活性较高且变化较大, 12 cm 以下深度酶活性较低, 基本稳定在 $0.001 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$ 左右. 沉积物中碱性磷酸酶活性与解磷菌数量有一定相关性, 相关系数为 $0.50 \sim 0.85$.

关键词: 沉积物; 微生物; 磷释放; 碱性磷酸酶

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)10-2355-06

ALPase Activity and the Distribution of Phosphate Solubilizing Bacteria and the Relationship Between Them in Sediments of Lake Taihu

SONG Wei, YUAN Li-na, XIAO Lin, ZHAN Zhong, YANG Liu-yan, JIANG Li-juan

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: The abundance of phosphate solubilizing bacteria, together with the alkaline phosphatase (ALPase) activity in the sediment samples of Lake Taihu in different seasons, sites and depths, was analyzed. And the relationship between the distribution of phosphate solubilizing bacteria and the ALPase activity was discussed. Results show that phosphate solubilizing bacteria is universally detected in surface sediments. With the increasing depth, the amount of phosphate solubilizing bacteria decreases. The number of phosphate solubilizing bacteria strains reaches the maximum in autumn while the minimum in winter. ALPase activity ranges from $0.001 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$ to $0.006 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$ and it varies with different sites and seasons and declines with the increasing depth. ALPase activity varies widely above 12 cm , and stabilizes about $0.001 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$ under 12 cm in each site. There is a correlation between ALPase activity and the number of phosphate solubilizing bacteria and the correlation coefficients range from 0.50 to 0.85 .

Key words: sediments; bacteria; phosphorus release; alkaline phosphatase

水体富营养化是当今世界面临的一个严重的环境问题, 其主要表现形式为过量营养元素(尤其是磷)引起的藻类过度生长, 而沉积物中累积的磷(内源磷负荷)与富营养化的关系至为密切, 即使外源负荷削减, 它亦能阻碍湖泊水质的改善^[1], 因此沉积物营养物质的释放是导致水体富营养化的一个重要因子^[2].

磷是促进水体富营养化的重要营养元素, 沉积物中磷的吸附和释放强度受水生生态中各种物理化学及生物过程的影响, 而微生物在底泥释磷过程中具有重要的作用^[3]. 如细菌能自沉积物中的有机磷转化成无机态磷, 并且把不溶性的磷化合物转化为可溶性磷, 而微生物有这样的能力, 依靠的是它们所特有的酶体系. 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALPase)则是该系统中重要的微生物酶之一^[4], 生长在碱性环境中的藻类和细菌通常合成较多的碱性

磷酸酶. 该酶能催化有机磷分解释放正磷酸盐, 这种转化是生物可利用性磷的重要补充途径^[5], 所以碱性磷酸酶对于磷的生物地球化学循环过程起重要作用, 在水生生态系统磷循环, 尤其是以微生物为主体的湖泊沉积物生态系统中具有重要的作用. 范成新等^[6]的研究表明, 在生物促进环境下, 有机态磷的生化作用明显增强, Jones 等^[7]的研究证明, 英国 16 个富营养湖泊水体中碱性磷酸酶活性(ALPase activity, APA)与富营养化程度成正相关, 美国田纳西州的 Melton Hill 水库沉积物中碱性磷酸酶活性与细菌总量正相关^[8]. 因此研究沉积物中微生物种群

收稿日期: 2006-11-20; 修订日期: 2007-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(40371102); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB412307)

作者简介: 宋炜(1981~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物及分子生物学等, E-mail: swing_402@163.com

* 通讯联系人, E-mail: xiaolin@nju.edu.cn

特征和碱性磷酸酶的活性及其对磷行为的影响,将有助于阐明湖泊内源营养循环机理,同时了解碱性磷酸酶与相关微生物种群对于内源磷负荷的贡献,对于控制内源磷污染,防治水体富营养化具有重要的意义.近年来水体及沉积物中碱性磷酸酶活性的研究正逐步受到重视,但是,微生物的种群结构及功能在沉积物中磷的地球化学循环中的作用和机理的研究还鲜见报道.本研究分析了相应沉积物样品中细菌种群的丰度组成,检测了不同位点、不同取样深度的太湖沉积物中碱性磷酸酶的活性,探讨了碱性磷酸酶活性、微生物种群与磷迁移转化的关系.

1 材料与方法

1.1 采样地点

样品采自太湖,分别于 2005-06、2005-09、2005-12 及 2006-03 采集自太湖梅梁湾 2 个采样点(2 号: N31°30.306', E120°13.370', 4 号: N31°30.181', E120°12.566')和贡湖湾草型湖泊 1 个采样点(5 号: N31°23.767', E120°19.471', 图 1). 现场利用柱状采样器采集表层 30 cm 沉积物,前 10 cm 每 1 cm 1 个样品, 10~20 cm 每 2 cm 1 个样品, 20 cm 以下每 5 cm 1 个样品,分别装入封口袋并贴上标签,置冰箱内保存.

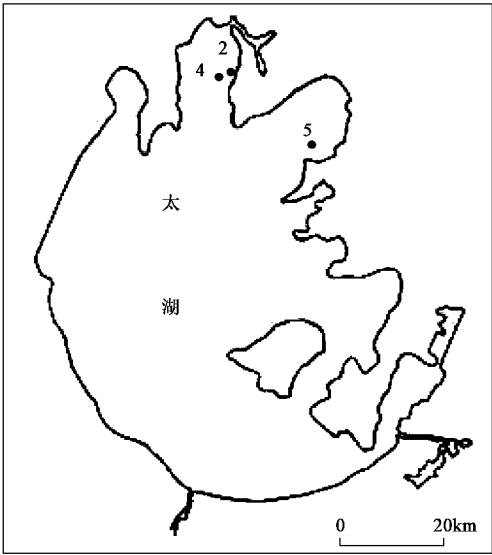


图 1 太湖采样点位置示意

Fig.1 Sketch map of sampling sites in Lake Taihu

1.2 解磷菌的筛选

取沉积物样品稀释至合适浓度,分别移取稀释液 0.1 mL 均匀涂布于牛肉膏蛋白胨平板^[9],倒置培养 3 d,挑取单菌落,划线分离纯化,保存待测.将分

离得到的菌株分别点植于蒙金娜无机磷平板和蒙金娜有机磷平板^[10,11],每板 4 个点,倒置培养 7 d,菌落周围出现透明圈,根据解磷圈的大小初步判断其解磷能力的大小^[12].

1.3 碱性磷酸酶活性(APA)的测定

参照刘兵钦等^[13]的方法并加以改进,以对-硝基苯磷酸二钠盐(*p*-NPP)作底物,取相当于 0.15 g 干样的沉积物匀浆,加入 0.25 mL 1 mmol·L⁻¹底物, 37℃ 恒温水浴 1 h 后加入 0.5 mL 0.5 mol·L⁻¹ CaCl₂ 与 2 mL 0.5 mol·L⁻¹ NaOH, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液利用分光光度法测定碱性磷酸酶的活性,每点取 3 个平行,另设无底物对照.碱性磷酸酶活性以每 g 干燥沉积物每 min 生成的对硝基酚(*p*-NP)的量表示,单位 mmol·(g·min)⁻¹.

以 Origin 及 SPSS 数据处理软件对实验数据加以分析.

2 结果与分析

2.1 解磷细菌的分布

通过对沉积物样品稀释涂布初筛与蒙金娜有机及无机磷平板复筛,于不同季节得到的解磷菌菌株数如表 1 所示.

表 1 不同季节解磷菌的菌株数

Table 1 Number of phosphate solubilizing bacteria strains in different seasons

采样时间 /年-月	初筛得到的 总菌株数	复筛得到的			既可解有机磷也可解无机磷的 菌株数
		复筛得到的 可解有机磷 的菌株数	复筛得到的 可解无机磷 的菌株数	既可解有机磷也可解无机磷的 菌株数	
2005-06	31	6	2	2	2
2005-09	26	10	2	2	2
2005-12	19	4	—	—	—
2006-04	16	3	2	—	—

分析不同采样点和不同剖层深度中好氧异养菌总数发现,随深度增加,总量减少,夏季表层好氧菌总数可达每 g 湿泥 10⁶ 个,到达 5 cm 处,数量锐减至每 g 湿泥 10⁵ 个.这是由于随着深度增加,氧化还原电位逐渐降低,环境条件趋向厌氧,不适于好氧菌的生存^[14],因此其数量逐渐减少.细菌总数夏季最大,秋季总数约为夏季的 70% 左右,而冬季及春季仅为夏季的 50%.这是由于大部分细菌是嗜中温菌,随着温度的降低,细菌的代谢速率和生长、繁殖速率减缓^[14],导致数量下降.同时由于表层及夏季时有机物含量高,为微生物的酶促反应提供了丰富的底物,促进了微生物的新陈代谢,加速了微生物的繁衍^[14],因此,表层及夏季好氧异养菌总数

较高.值得指出的是,5号点的好氧菌种类较少,往往是一种优势菌占主导,这可能与其水生植物丰富有关.因此某采样点中好氧菌总量受该点位沉积物环境和营养成分含量的影响.

比较解磷细菌的种群数量发现,各采样点沉积物表层解磷菌的种类与数量较多,随着深度的增加,解磷菌数量逐渐减少;2号点解磷菌主要存在于表层1cm及4~6cm处,4号点与其类似,而5号点解磷菌种类最少,且其种类最多的点位于6~8cm.解磷菌的种类秋季最多,冬季最少,但解磷能

力较强的菌大部分出现在夏季.这是由于夏季温度升高,酶促反应速度也相应提高^[14],同时,夏季藻类大量繁殖,导致水体中磷酸盐含量下降,沉积物中的磷酸盐不断释放到上覆水中而使得沉积物中磷酸盐含量下降,而碱性磷酸酶是一种诱导酶,磷酸盐含量低时,酶被诱导产生,因此夏天解磷能力强的菌较多.

2.2 碱性磷酸酶活性的时空分布

在本实验条件下,3个采样点4个季度沉积物中,碱性磷酸酶活性的垂直分布如图2~4所示.

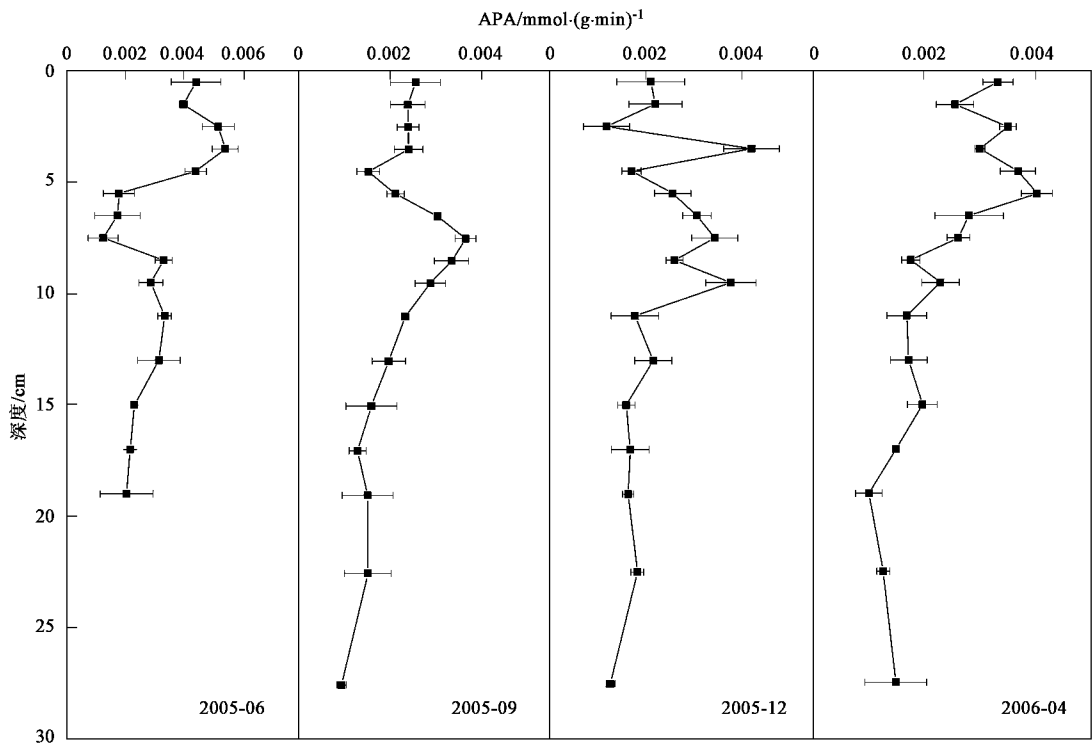


图2 2号点沉积物中碱性磷酸酶活性垂直分布

Fig.2 Vertical distribution of ALPase activity in the second site

由图2~4可看出,碱性磷酸酶活性由高到低依次为:2号点夏季为0.003~0.006mmol·(g·min)⁻¹,秋冬春季为0.002~0.004mmol·(g·min)⁻¹;4号点夏季为0.003~0.006mmol·(g·min)⁻¹,冬春季为0.0015~0.0025mmol·(g·min)⁻¹,秋季为0.001~0.00175mmol·(g·min)⁻¹;5号点夏季为0.001~0.004mmol·(g·min)⁻¹,秋冬季为0.001~0.002mmol·(g·min)⁻¹,春季为0.001mmol·(g·min)⁻¹左右.各采样点碱性磷酸酶在0~12cm活性较高且变化较大,12cm以下深度酶活性较低,且基本稳定在0.001mmol·(g·min)⁻¹左右.

2.2.1 不同位点沉积物中的碱性磷酸酶活性的比较

各位点酶活性由高到低分别为2号、4号、5号.5号点位于贡湖湾,水生植物丰富,好氧异养菌和解磷菌数量以及碱性磷酸酶活性均低于梅梁湾.梅梁湾沉积物中总磷及有机质含量高于贡湖湾^[15],为酶的作用提供了丰富的底物,且其解磷菌较多,可分泌较多的碱性磷酸酶,有效地将有机磷转化为无机磷,并通过物质交换释放到间隙水中去,因此其间隙水中磷酸盐含量较高.碱性磷酸酶是诱导酶,低的磷酸盐浓度会诱导其产生,但有报道指出水生植物对磷酸酶具有抑制效应^[16].Kalinowska^[17]发现在水生植物占优势的湖泊中,磷酸酶对有机磷的分

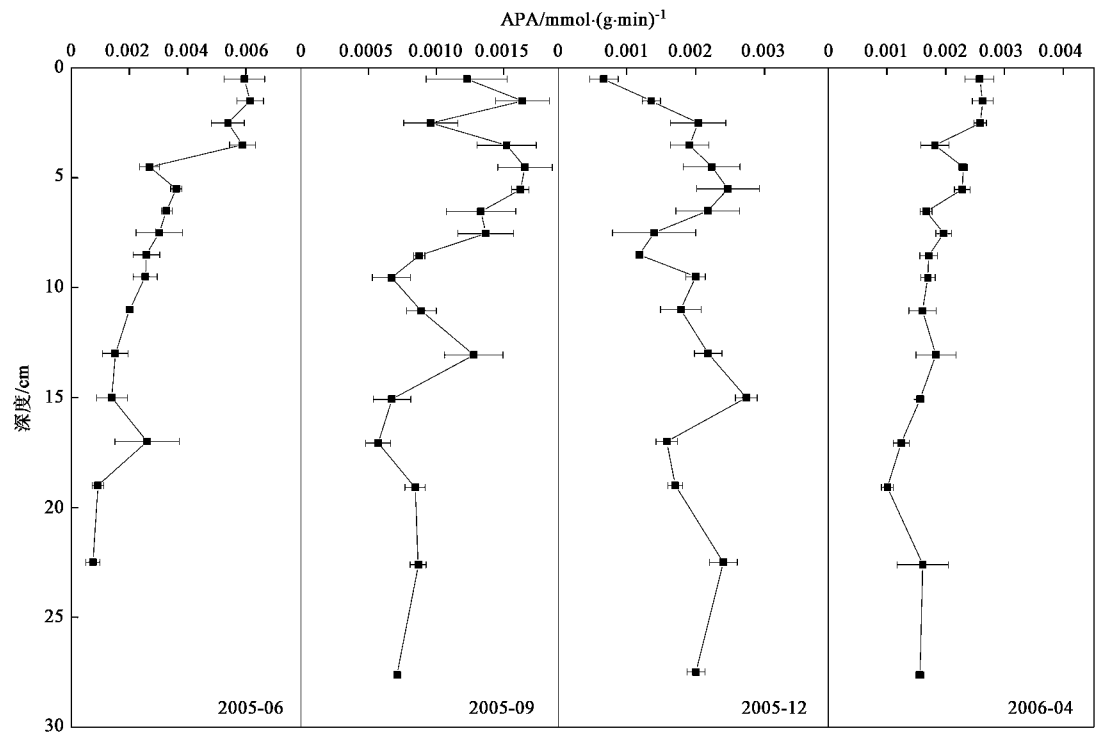


图 3 4号点沉积物中碱性磷酸酶活性垂直分布

Fig.3 Vertical distribution of ALPase activity in the fourth site

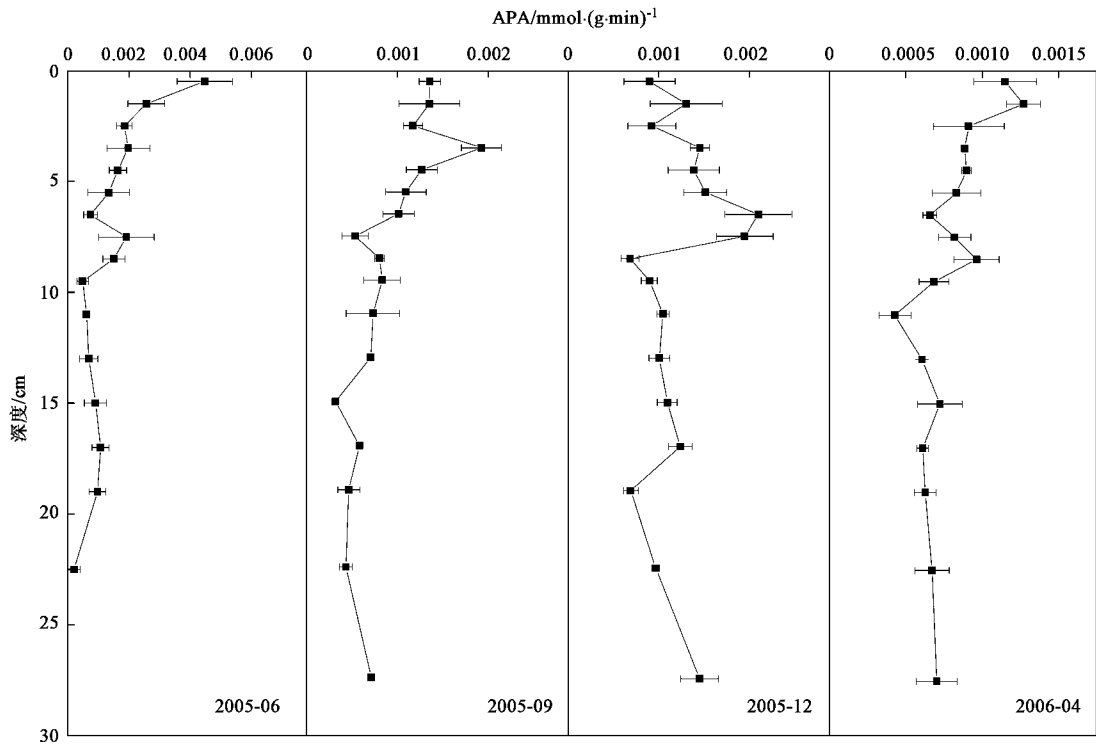


图 4 5号点沉积物中碱性磷酸酶活性垂直分布

Fig.4 Vertical distribution of ALPase activity in the fifth site

解作用几乎可以忽略,其原因在于较多酶因腐殖质的络合作用而失活^[18].贡湖湾水生植物丰富,沉积物腐殖质含量高,因此虽然该点间隙水中磷酸盐浓度较低,但酶因腐殖质的络合作用而失活,导致其酶活性在3个采样点中最低.也有调查显示沉水植物覆盖度高的湖区,其间隙水中磷酸盐的含量明显低于水生植物较少的湖区^[15].因此水生植物种植区表层沉积物的低酶活性使其中有机磷不易矿化,故有助于保持和改善水质.

2.2.2 不同沉积物剖层碱性磷酸酶活性的比较

每个采样点其酶活基本随深度增加而减小(但仍有波动).分析各点不同剖层碱性磷酸酶活性与解磷菌数量的相关性得到,其相关系数在0.50~0.85之间.细菌是沉积物中碱性磷酸酶的重要载体^[8],在解磷菌数量较多的剖层深度,碱性磷酸酶的活性也较高.同时由于不同的解磷菌其解磷能力的差异,碱性磷酸酶活性除与解磷菌数量有关外,也与其解磷菌解磷能力的大小有关.营养性物质(主要是有机磷)可提供碱性磷酸酶作用的底物,酶活的提高促进微生物的新陈代谢,加速了微生物的繁衍.在富营养化水体的常年作用下,沉积物表层营养成分充足,使各种微生物保持旺盛的新陈代谢,其酶活力也就相对较高.同时由于表层的磷酸盐通过物质交换不断释放到上覆水体中,长期的低磷酸根浓度也对微生物的种群和活性起到选择和驯化作用.然而,并非所有微生物在这类富营养条件下都保持着较高的碱性磷酸酶活性,而是有几种微生物具有较高的碱性磷酸酶活性,且碱性磷酸酶活性的主要贡献就来自于它们.如解磷能力较强的菌主要分布在2号点、4号点以及5号点表层;而5号点,其中解磷菌数量最少,因此,其碱性磷酸酶活性也最低.大部分采样点的酶活性在6~10 cm左右会出现另一高峰,这说明,距表层6~10 cm的中间层面是沉积物磷酸酶的另一重要作用区域.有报道指出^[19],福州西湖2个站点的13~15 cm和11~13 cm深处正是处于厌氧状态的磷酸酶催化的另一重要区域,其机理尚待进一步研究.各点酶活性的变化主要发生在表层沉积物中,12 cm之下的酶活性较低且变化不明显,大致稳定在 $0.001 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$,其原因是较深层的沉积物,受风浪对沉积物再悬浮的作用较小,物质交换不明显,营养水平及有机磷含量变化不大,而酶的产生有赖于底物浓度,因此较深层酶活性变化不明显;调查发现,由于氧化还原电位的降低,无机磷还原解离作用增强,在14 cm深度之下,间隙水磷酸盐浓度

反而升高^[15],高的磷酸盐浓度抑制了碱性磷酸酶的产生,因此其酶活性较低.

2.2.3 不同季节沉积物碱性磷酸酶活性的比较

碱性磷酸酶活性呈现较为明显的季节变化,各位点的碱性磷酸酶活性均在夏天最高,而秋季最低.这是由于碱性磷酸酶是一种诱导酶,沉积物中总磷(TP)、 PO_4^{3-} -P的浓度的变化与碱性磷酸酶的活性的波动有着密切的关系,当 PO_4^{3-} -P浓度较低时,碱性磷酸酶的活性增加,TP部分被水解,释放出 PO_4^{3-} -P,使得沉积物中的可溶性磷的浓度增加;随着 PO_4^{3-} -P浓度的增加,碱性磷酸酶的活性受到抑制,使得磷的分解、释放速率减缓,再加上藻类、细菌的利用,导致 PO_4^{3-} -P浓度的又逐渐减少,最终又使得碱性磷酸酶的活性逐渐增加.夏季藻类大量繁殖,导致水体中磷酸盐含量下降,沉积物中的磷酸盐不断释放到上覆水中而使得沉积物中磷酸盐含量下降,碱性磷酸酶被诱导产生,因此夏天其酶活性也较高.由于温度降低后藻类衰亡,因其沉积在底部^[20],被微生物分解后造成可溶性磷浓度升高,碱性磷酸酶的活性受到抑制,所以秋季的酶活性较低.由于磷酸酶活性与沉积物有机质的积累相联系^[21],在有机质沉积较少发生的冬季,沉积物中的碱性磷酸酶活性较低,以色列的Kinneret湖沉积物中发现了相似的规律^[22].

3 结论

(1)解磷菌在太湖沉积物中普遍存在,各采样点沉积物表层解磷菌的种类与数量较多,随着深度的增加,解磷菌数量逐渐减少.解磷菌的种类秋季最多,冬季最少,但解磷能力较强的菌大部分出现在夏季.

(2)碱性磷酸酶活性范围为 $0.001 \sim 0.006 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$,酶活性呈现较为明显的季节变动,不同采样点间酶活性差异较大,随深度的增加,碱性磷酸酶活性逐渐降低.各采样点碱性磷酸酶在0~12 cm活性较高且变化较大,12 cm以下深度酶活性较低,基本稳定在 $0.001 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$ 左右.

(3)碱性磷酸酶活性与解磷菌数量的相关性分析表明沉积物中碱性磷酸酶活性与解磷菌数量有一定相关性,相关系数为0.50~0.85.

参考文献:

- [1] Sondergrd M, Jensen J P, Jeppesen E. Role of sediment and internal loading of phosphorus in shallow lakes[J]. Hydrobiologia, 2003, 506~509(1-3): 135~145.

- [2] Martin W M. Lake Restoration by Reducing External Phosphorus Loading: the Influence of Sediment Phosphorus Release [J]. *Freshwater Biology*, 1989, **21**: 139 ~ 162.
- [3] 吴根福, 吴雪昌, 金承涛, 等. 杭州西湖底泥释磷的初步研究[J]. *中国环境科学*, 1998, **18**(2): 107 ~ 110.
- [4] 薛雄志, 洪华生, 黄邦钦, 等. 厦门西海域沉积物中碱性磷酸酶活力的分布、动态及其与各形态磷的关系[J]. *海洋学报*, 1995, **17**(5): 81 ~ 87.
- [5] Hernandez I, Perez-Pastor A, Llorens J L P. Ecological significance of phosphomonoesters and phosphomonoesterase activity in a small Mediterranean river and its estuary [J]. *Aquatic Ecology*, 2000, **34**(2): 107 ~ 117.
- [6] 范成新, 张路, 秦伯强, 等. 风浪作用下太湖悬浮态颗粒物中磷的动态释放估算[J]. *中国科学, D 辑*, 2003, **33**(8): 760 ~ 780.
- [7] Tage N, Kobori H. Phosphatase activity in eutrophic Tokyo Bay [J]. *Marine Biology*, 1978, **49**: 223 ~ 229.
- [8] Saylor G S, Puziss M, Silver M. Alkaline phosphatase assay for freshwater sediments: application to perturbed sediment systems [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, **38**: 922 ~ 927.
- [9] 肖琳. 环境微生物实验技术[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004.
- [10] 赵小蓉, 林启美. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. *微生物学通报*, 2001, **28**(1): 1 ~ 4.
- [11] 钟传青, 黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化[J]. *土壤学报*, 2005, **42**(2): 286 ~ 294.
- [12] 姚晓惠, 刘秀花, 梁峰. 土壤中磷细菌的筛选和鉴定[J]. *河南农业科学*, 2002, (7): 28 ~ 31.
- [13] 刘兵钦, 王万贤, 宋春雷, 等. 菹草对湖泊沉积物磷状态的影响[J]. *武汉植物学研究*, 2004, **22**(5): 394 ~ 399.
- [14] 周群英, 高廷耀. 环境工程微生物学[M]. (第二版). 北京: 高等教育出版社, 2000. 83 ~ 127.
- [15] 秦伯强, 胡维平, 陈伟民, 等. 太湖水环境演化过程与机理[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [16] 周易勇, 李建秋, 张敏. 湿地中碱性磷酸酶的动力学特征与水生植物的关系[J]. *湖泊科学*, 2002, **14**(2): 134 ~ 138.
- [17] Kalinowska K. Eutrophication process in a shallow, macrophyte dominated lake-alkaline phosphatase activity in Lake Luknajno (Poland) [J]. *Hydrobiologia*, 1997, **342/343**: 395 ~ 399.
- [18] Wetzel R G. Extracellular enzymatic interactions: storage, redistribution, and interspecific communication [A]. In: Chrose R J, eds. *Microbial enzymes in aquatic environments* [C]. New York: Springer-Verlag, 1991. 6 ~ 28.
- [19] 苏玉萍, 郑达贤, 曾花森, 等. 浅层湖泊沉积物碱性磷酸酶活性垂向特征初探[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2005, **21**(3): 35 ~ 38.
- [20] 文湘华, 钱易, 顾夏声. 生物稳定塘碳、氮、磷物质迁移转化模型的研究[J]. *生态学报*, 1992, **12**(3): 193 ~ 200.
- [21] Romani A M, Sahater S. Structure and activity of rock and sand biofilms in a Mediterranean Stream [J]. *Ecology*, 2001, **82**(11): 3232 ~ 3245.
- [22] Hadas O, Pinkas R. Arylsulfatase and alkaline phosphatase (ALPase) activity in sediments of Lake Kinneret, Israel [J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 1997, **99**(1-4): 671 ~ 679.