

高浓度氮磷对自然生物膜群落功能和结构的影响

王金花^{1,2}, 吴永红¹, 冯彦房^{1,2}, 陆海鹰^{1,2}, 周徽^{1,2}, 杨林章^{3*}

1. 中国科学院南京土壤研究所, 江苏 南京 210008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 江苏省农业科学院, 江苏 南京 210014

摘要: 自然生物膜在生态工程污染物的去除中发挥十分重要作用, 但是很少有关于高浓度氮磷水体与自然生物膜之间关系的研究。使用 Biolog 和磷脂脂肪酸技术来研究生物膜对高浓度氮和磷的反应, 主要从生物膜微生物群落组成和微生物利用碳源利用的多样性角度进行探究。结果表明, 对于不同富营养化状态, 生物膜在微生物群落结构组成和功能多样性方面的反应不同。添加高浓度氮磷侵扰 27 d 后, 仅影响了生物膜局部微生物群落结构, 其中细菌中的 G⁻ 为优势菌群, 对于局部群落结构组变化影响较大。添加高浓度氮磷侵扰 38 d 后, 随着氮磷浓度的增加, 生物膜微生物对碳源利用能力提高。处理组碳源利用的微生物易于与对照组区分, 但是处理组间对碳源利用能力相似。碳源的优先利用顺序依次为氨基酸、羧酸、糖类、多聚物、酚酸和胺类。其中对羧酸和多聚物的利用不同导致对照组与处理组对碳源利用能力的差异。

关键词: 富营养化; 自然生物膜; 群落组成; 功能多样性

中图分类号: X52

文献标志码: A

文章编号: 1674-5906 (2013) 07-1236-08

引用格式: 王金花, 吴永红, 冯彦房, 陆海鹰, 周徽, 杨林章. 高浓度氮磷对自然生物膜群落功能和结构的影响[J]. 生态环境学报, 2013, 22(7): 1236-1243.

WANG Jinhua, WU Yonghong, FENG Yanfang, LU Haiying, ZHOU Hui, YANG Linzhang. Effects of hyper-entrophic nitrogen and phosphorus additions on the functional and formational diversity of periphyton biofilms [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2013, 22(7): 1236-1243.

近年来我国水华现象比较普遍, 其中滇池、巢湖、太湖等几大淡水湖泊也遭受严重水华^[1]。水体富营养化是有害藻类水华发生的物质基础, 特别是氮、磷营养浓度增加。在控制水体富营养化技术中, 生物膜法因其具有高效率、低成本、无二次污等优势备受大家关注, 在富营养水质处理过程中起着重要的作用^[2]。自然环境中生物膜存在于几乎所有暴露于水中的固体表面上, 是一类微生物聚集体, 其中包含各种寄居者, 如固着细菌、原生动物、真菌和藻类等, 是水生态系统中无脊椎动物、蝌蚪、鱼类等的重要食物来源^[3], 这种生物膜就是俗称的自然生物膜 (Periphyton biofilm)。

通常我们对于生物膜的研究主要集中在生物膜对富营养化水体的净化作用, 但随着生物膜法在污水处理中不断扩大应用, 其去除效率却提升较慢等不少弊端的出现, 生物膜与污水中的营养物质之间关系的研究也逐渐引起了人们的注意^[3-4]。已有研究表明, 不同类型和不同层次营养物质对生物膜组成成分、结构以及功能有不同程度的影响^[5-7], 其中

对不同浓度的氮和磷设置上主要有两种: 一种是氮磷的共同作用^[8-9]; 另一种是对氮或磷的单独作用^[10-12], 但是这些研究主要集中在正常营养水平水体条件下^[8-9]。众所周知, 高浓度的氮磷在实际生产中也较为常见, 尤其在网箱水产养殖水域中, 氮和磷含量是相当高, 水体处于富营养化或超营养化水平^[13-15]。对于富营养化水体对生物膜的影响过程研究甚少, 而且生物膜对频繁超营养化水体的氮与磷共同作用的反应方面的研究也几乎未见报道。

已有研究表明, 传统的微生物方法在生物膜的群落结构组成和微生物功能多样性上存在很大的局限性^[6,8-9]。本研究将采用被公众普遍认可的 PLFA 和 Biolog 技术。PLFA 常被应用于微生物生态学的研究中, 定量地描述土壤、底泥及海水等环境中微生物的群落结构^[16-17], 也被广泛应用于地下水、人工湿地、作物根际等微生物群落的研究中。其中 Small 等^[18]曾采用 PLFA 技术通过 238U 元素来对水生生态系统进行评估和预测的研究。Biolog 方法是通过同时测定微生物对不同单一碳源的利

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41171363); 国家自然科学基金项目 (41030640); 中国科学院知识创新工程重大项目 (KZCXZ-EW-QN401)

作者简介: 王金花 (1988 年生), 女, 硕士研究生, 主要从事富营养水质对生物膜的响应过程方面研究。E-mail: wangjh@issas.ac.cn 或 huawangjin@163.com

*通信作者: 杨林章 (1958 年生), 男, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事农田生态系统中营养物质的循环及其对环境的影响, 农村面源污染发生机制、负荷量估算及控制技术等的研究。E-mail: lzyang@issas.ac.cn

收稿日期: 2013-03-19

用能力,探索微生物群落结构的方法,广泛应用于鉴定和分析不同体系的微生物群落结构^[19]。

本实验针对以上研究的不足以及技术上的缺陷,利用上述两种新型技术拟解决以下2个问题:1)在高浓度氮磷侵扰27 d后,自然生物膜中微生物群落的组成成分变化;2)在高浓度氮磷侵扰38 d后,自然生物膜中微生物的功能多样性的变化。本实验是将原位生物膜系统作为一个整体来进行研究,不考虑原位生物膜系统内部各个体之间的相互作用,以期整体上解读生物膜中各微生物生态组分对富营养化水质响应过程,为提高生物膜去除污染物的效率提供理论和技术支持。

1 材料和方法

1.1 试验材料

实验用水选择南京市玄武湖解放门的水源作为研究对象,水质指标如下:pH 7.8, ρ (总氮)1.9 mg·L⁻¹, ρ (硝态氮)0.73 mg·L⁻¹, ρ (铵态氮)0.53 mg·L⁻¹, ρ (总磷)0.1 mg·L⁻¹, ρ (可溶性无机磷)0.035 mg·L⁻¹。试验所需的生物膜是在将自然生物膜载体在所取的水样的基础上加入BG-11培养基所得。自然生物膜载体采用0.1 M的HCl溶液浸泡12 h之后,然后悬挂在BG-11培养液中挂膜。其中BG-11培养基的成分如下:1.5 g NaNO₃、0.04 g K₂HPO₄、0.075 g MgSO₄·7H₂O、0.036 g CaCl₂·2H₂O、0.006 g 柠檬酸、0.006 g 柠檬酸铁铵、0.001 g EDTA、0.02 g NaCO₃、1.0 mL A₅溶液(每升体积重微量元素溶液A₅含有H₃BO₄ 2.86 g, MnCl₂·4H₂O 1.81 g, ZnSO₄ 0.222 g, Na₂MoO₄ 0.39 g, CuSO₄·5H₂O 0.079 g, Co(NO₃)₂·6H₂O 49.4 g),蒸馏水1 L。生物膜的培养是在5 L的透明玻璃烧杯中进行培养。本实验所采用的自然生物膜载体为弹性填料(江苏省宜兴市南循环保填料有限公司生产),其中该材料的添加对水质以及生物膜的生长没有任何副作用^[20],材料长度均为25 cm。培养过程中,每个烧杯口处用空隙尼龙网包扎以防止小动物以及其他杂质的落入,保证有足够的水分和光照,一旦发现水分不在5 L刻度处时,马上添加。定期观察生物膜长势情况。试验期间温度约在20 °C到38 °C之间(水温测定采用水温计法,根据GB/T 13195—1991《水质水温的测定温度计或颠倒温度计测定法》执行),pH调制7.1±0.2(pH测定用pH计测得)。

1.2 试验方法(材料和方法太过详细,如果是按照别人的方法可以直接引用参考文献)

1.2.1 试验设计

试验于2011年7月23日开始生物膜的扩大培养,即在自然光照下BG-11培养基中培养,均为温室室内静态试验。挂膜两个月后,2011年9月20

日,载体表面形成致密的褐色生物膜,此时生物膜生长成熟,且生长较为旺盛。将原有培养基倒掉,然后将生物膜载体连同富集的生物膜一并取出,用蒸馏水轻轻冲洗6次,尽可能的去除附着的营养物质。在自来水的基础上进行超富营养的氮磷处理,氮是以添加NaNO₃来进行控制,磷是以K₂HPO₄来进行添加,加至刻度为5 L处。pH调制7.1±0.2。设有三个不同处理分别为T1, T2和T3,每个处理重复3次,如表1所示。

表1 不同处理氮磷浓度(处理前/处理后氮磷浓度)

Table 1 Treatments measured nutrient concentrations at the first (the moment when we added N and P) and the end of experiment

处理	ρ (mg·L ⁻¹)			
	TN	NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻	NH ₄ ⁺	TP
T1	153.8/118.5	25.6/24.6	6.2/5.3	2.4/2.15
T2	643.3/581.3	121.4/111.5	11.7/10.1	902.8/311.3
T3	1190/1090	231.1/218.3	62.2/17.5	1629/1174.4

1.2.2 测定方法

每次进行水质取样时,3个重复均在距离水面10 cm下进行采集,指标于每次采样后24 h内进行测定。NH₄⁺、NO₃⁻、NO₂⁻、TN和TP含量的测定采用荷兰Skalar公司SA-4000型流动分析仪。水样的pH和温度测定采用pH-水温计测定(PHS-3CT, Q/SMSB1-2005)。进行生物膜取样时,直接用手将生物膜从载体中取下,以防止破坏生物膜的细胞。取好的样品迅速至于4 °C冰箱内保存,并且在24 h内进行分析测定。

每次进行生物膜取样时,3个重复均用灭好菌的剪刀(0.1M HCl)剪下相同长度的载体,并过20目的尼龙筛子去除多余水分,使其不滴出水为限,此时可认为生物膜含水量处于饱和状态(含水量100%),每次进行测量取样的时候,在40 °C烘干1~2 h后(其含水量约在70%到95%之间),然后测得生物膜和载体的质量。

在高浓度氮磷侵扰时间为27 d后,进行测定PLFA,每个处理均设置了3个平行样。PLFA分析过程文献^[21],其中PLFA的提取过程采用由Bligh和Dyer修订后的方法^[22]。在添加氮磷富营养处理后第38天,进行测定Biolog。采用BiologTM ECO板(Hayward, CA, USA)进行测定生物膜微生物群落功能多样性。首先将生物膜样品至于室温约25 °C下活化,将从冰箱内取出的培养板25 °C下预热;然后,称取2 g自然生物膜(含水量约在80%~95%)加入到18 mL事先灭菌生理盐水(0.85%NaCl)的三角瓶中,并加入灭菌的玻璃珠,室温180 r·min⁻¹振荡30 min后取出静置5 min,在超净工作台中心吸

取样品 5 mL 至 25 mL 事先灭菌的装有生理盐水的比色管中,混匀。八通道移液器吸取 150 μ L 每孔液体样本至 96 孔培养板,25 $^{\circ}$ C 恒温培养,分别于 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h 后,用 ELXS08-Biolog 微孔板读数仪 (BIO-TEK Instruments INC, USA) 测定各孔在 590 nm 波长下的光吸收值。

1.2.3 相关数值的分析与计算

1.2.3.1 PLFA 分析中 PLFA 总量以及相关菌群的计算

微生物群落结构通过 PLFA 类型的多样性来进行分析。i15:0、a15:0、i16:0、i17:0、a17:0、a18:0 等代表革兰氏阳性细菌 (Gram-positive bacteria, GP), 16:l ω 9c、16:l ω 7c、16:l ω 5c、17:l ω 8c、18:1 ω 7c 等代表革兰氏阴性细菌 (Gram-negative bacteria, GN), 并将二者的和计为细菌的生物量^[23]。将 18:1 ω 9c、18:2 ω 6,9c 和 18:3 ω 6c (6,9,12) 三者的和计为真菌的生物量^[24]。16:0(10Me) 多认为是放线菌的特征脂肪酸^[25-26]; 而 20:4 ω 6,9,12,15c, 一般出现在后生动物体内^[27-28]。将碳链长度为 C₁₂-C₂₀ 的所有磷脂脂肪酸标记的总和计为 PLFA 总量即微生物总量。用于分析的脂肪酸 PLFA 总量及各菌群生物量均为其绝对含量,单位为 nmol \cdot g⁻¹。在进行 PLFA 主成分分析其脂肪酸片段为相对含量。

MIDI 微生物鉴定仪测定数据的基本条件: 仪器型号: Agilent 6850, 进样量: 2 μ L, 进样口温度: 250 $^{\circ}$ C, 载气: 氦气, 恒压模式: 22 ps, 分流比: 100 : 1, 色谱柱型号: Agilent 19091B-102E Ultra 25% Phenyl Methyl Siloxane 25.0 m \times 200 μ m \times 0.33 μ m, 程序升温: 170 $^{\circ}$ C、0.00 min、5 $^{\circ}$ C/min、260 $^{\circ}$ C、0.00 min、40 $^{\circ}$ C/min、310 $^{\circ}$ C、1.50 min, 后运行: 170 $^{\circ}$ C、1.50 min, 检测器: FID 温度: 300 $^{\circ}$ C, 氢气流量: 30.0 mL \cdot min⁻¹, 空气流量: 400 mL \cdot min⁻¹, 尾吹气流量 (氦气): 30.0 mL \cdot min⁻¹。

1.2.3.2 Biolog 分析中平均每孔颜色变化率及多样性指数的计算

1) 平均每孔颜色变化率 (average well color development, AWCD) ^[29]。计算公式为: $AWCD = [\Sigma(C-R)]/31$ 。式中: C 为测得 31 个反应孔的吸光值; R 为对照孔的吸光值。

2) Shannon 指数 (H) ^[30]。可以表征土壤中微

生物群落丰富度,计算公式为: $H = -\Sigma(P_i \ln P_i)$ 。式中: P_i 为第 i 孔相对吸光值 ($C-R$) 与所有 31 孔的吸光值总和的比率。

3) Simpson 指数 (D) ^[30]。用于评估土壤中微生物群落优势度,计算公式为: $D = 1/\Sigma(P_i)^2$ 。式中: P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率。

4) McIntosh 指数 (U) ^[30]。是基于群落物种多维空间距离的多样性指数,反映土壤中微生物群落均一性, $U = \Sigma n_i^2$, 式中: n_i 是第 i 孔的相对吸光值。

1.3 数据统计方法

每个处理设有 3 个重复。采用 Excel 2007 对数据进行统计和绘图; 采用 SPSS 16.0 中的 Duncan 法和“Date Reduction”程序分别对数据进行差异显著性分析和主成分分析,所有试验数据均采用平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示,显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 微生物群落结构特征

2.1.1 不同处理下生物膜中总 PLFA 绝对含量变化及生物膜各菌群 PLFA 含量变化

磷脂脂肪酸分析方法是基于不同微生物生物量和微生物脂肪酸片段差异而确定微生物群落结构组成,是一种进行定量分析的方法^[34]。因此,采用磷脂脂肪酸法对微生物生物量以及各菌群进行分析,结果见表 2。

Hellmann 等^[32]研究发现微生物生物量的变化与总的 PLFA 含量变化有很好的相关性。不同氮磷处理对生物膜微生物生物量的影响,即各个处理的微生物生物量 PLFA 含量变化。从表 2 中结果表明,与对照组 PLFA 总量相比,处理 2 和处理 3 的 PLFA 总量有所增加,但是均未达到显著水平。即在高浓度氮磷侵扰 27 d 时生物膜的微生物量变化不显著。众所周知,磷脂脂肪酸是所有活体细胞的细胞膜主要组成,占细胞生物量的比例相对恒定^[31,33]。因此可以推断出对成熟期的生物膜高浓度氮磷侵扰第 27 天后对其微生物总体影响不明显。

同时对生物膜中微生物内部群落结构,即细菌、真菌、原生动物、革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌含量以及二者的比值、细菌与真菌的比值进行了分析。结果表明不同处理下生物膜中细菌随着

表 2 不同处理对微生物群落的总 PLFA 和各菌群含量的影响

Table 2 The effects of different treatments on the total PLFA and different groups of periphyton biofilms community

处理	$b/(\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1})$					G+/G-	B/F	
	总 PLFA	细菌	真菌	原生动物	G-			G+
T1	13.49 \pm 8.19a	9.14 \pm 5.57a	4.35 \pm 2.63a	0	8.72 \pm 5.17a	0.42 \pm 0.25a	0.02 \pm 0.01a	1.83 \pm 0.43a
T2	20.14 \pm 4.98a	14.63 \pm 4.84a	0.49 \pm 0.14a	0	11.22 \pm 3.76a	3.41 \pm 1.08a	0.31 \pm 0.01b	28.66 \pm 2.31a
T3	18.54 \pm 11.59a	28.26 \pm 9.14a	3.55 \pm 2.52a	0.34 \pm 0.17	21.22 \pm 7.05a	7.04 \pm 2.11a	0.34 \pm 0.02b	48.52 \pm 41.94a

浓度增加有所增加但是未达到显著水平,而真菌变化不显著。处理 3(较高浓度环境下)出现了原生动动物,说明此时物种开始出现多元化。实验中也出现少许放线菌,但是含量甚微,数据未予添加,因放线菌适宜高热逆境中生长,而本实验的培养温度在 20 °C到 36 °C,并不适于放线菌的生长。但从总体含量来看,细菌的含量明显高于真菌的含量。细菌与真菌的比值可以反映出细菌与真菌相对含量的变化范围^[34]和两个菌群的相对丰富程度^[35]。由表 2 可得,不同处理与对照组相比有所增加,但差异不显著,可能在 3 个平行样品中重复性较差所致。但是细菌与真菌的比值均大于 1,细菌较真菌而言,占据较优势地位。说明施加氮磷处理后均生物膜中细菌的丰富度有所提高,但未达显著水平,生物膜内部群落结构发生细微的变化,此时细菌占主导地位。

针对细菌进行细化,分别对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌细菌进行分析。不难发现革兰氏阴性菌含量较革兰氏阳性菌高。但是各个处理间差异不显著。G+/G-比值变化可以看出,处理 2 和处理 3 较对照组均显著提高,且差异显著,但处理 2 和处理 3 差异不显著。由于革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌同时生长,但是革兰氏阳性细菌长势不如革兰氏阴性细菌长势突出,G-在细菌中成为优势种群。这些结果表明革兰氏阴性细菌的生物量随着营养物质含量水平的提高发生改变较大,成为细菌中的主导群落。

2.1.2 PLFA 主成分分析

为减少误差保证结果可靠性,将相对含量低于 1.0%的单体 PLFA 取出后以及仅出现于单一样品中的脂肪酸后,剩下 19 种较丰裕的脂肪酸。将所提及的 19 种较丰裕脂肪酸进行主成分分析,结果表明与对照组相比,不同处理的高浓度氮磷很大程度上改变了生物膜微生物群落结构。结果如图 1(左)

所示。提取主元向量的前两个主成分(PC1/PC2),累积贡献率达 66.71%。从整体上来看,主成分一和主成分二基本上能把不同处理区分开来,处理 2 与对照组处理 3 部分样品分布相距较近,说明这两种处理的生物膜群落结构较为相似,而处理组均与对照组明显区分开来,说明不同高浓度氮磷处理改变了生物膜群落结构。不同的高浓度氮磷侵扰处理对于生物膜中微生物群落更替有很大的影响。然而当浓度达到一定值后,高浓度的氮磷间群落结构差别不显著,生物膜的群落结构是相似的。其中处理 1 与主成分 1 成高度负相关,处理 2 与主成分 1 成高度正相关,处理 3 与主成分 2 成高度正相关。

对生物膜中每个样品所含的单体磷脂脂肪酸(PLFA)相对含量进行了主成分分析,得到其载荷因子图(图 1 右)。结果显示 19 种不同较丰裕的单体磷脂脂肪酸片段分布在不同象限,但是主要还是集中在第一象限和第三象限。得出与 PC1 强烈正相关的脂肪酸有强饱和脂肪酸如 14:0 和 18:0 和革兰氏阴性细菌(18:0 3OH, 17:1 ω8c, 16:1ω9c, 16:1ω7c)。这表明与 PC1 正相关的处理 2 中的生物膜群落结构主要受到革兰氏阴性菌和强饱和脂肪酸影响比较大。然而真菌代表性脂肪酸 18:2 ω6,9c 和强饱和脂肪酸 16:0 与 PC1 负相关,表明真菌和革兰氏阴性菌(主要为强饱和脂肪酸)影响着对照组的微生物群落组成。与 PC2 强烈正相关的是真菌脂肪酸如 18:1 ω9c,革兰氏阳性菌脂肪酸如 i15:0、i16:0、a15:0 以及革兰氏阴性菌脂肪酸如 14:0 3OH、18:1 ω11-methyl、17:0 等,而处理 3 的大多数平行样品分布于此,表明处理 3 的生物膜受真菌和细菌群落的变化进而影响到其群落结构的变化。

2.2 微生物群落功能多样性

2.2.1 利用碳源代谢程度分析

AWCD 即为每孔平均吸光度变化,用来衡量微生物利用不同碳源的整体能力,是一种最常用方

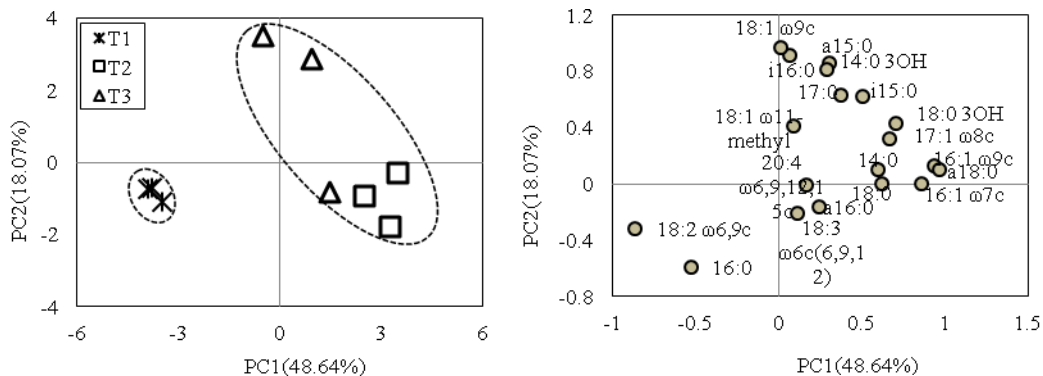


图 1 微生物群落 PLFA 的主成分分析
Fig.1 Principle components analysis of PLFA profiles of microbial community

法,通常经过对一系列读数时间的 AWCD 值变化趋势的差异来分析样品间微生物群落的不同。一般认为变化幅度较大的样品具有较高的碳源利用能力,也往往具有较高的微生物丰度,是能反应出微生物利用不同碳源总体能力的一个重要的指标^[36]。AWCD 值显示微生物群落对不同碳源代谢的总体情况,其变化速率反映了微生物的代谢活性,其最终的 AWCD 值与微生物群落中能利用单一碳源的微生物的数目和种类密切相关^[37]。相应地,基于平均颜色显影变化下的自然生物膜利用不同碳源的新陈代谢强度由图 2 所示。

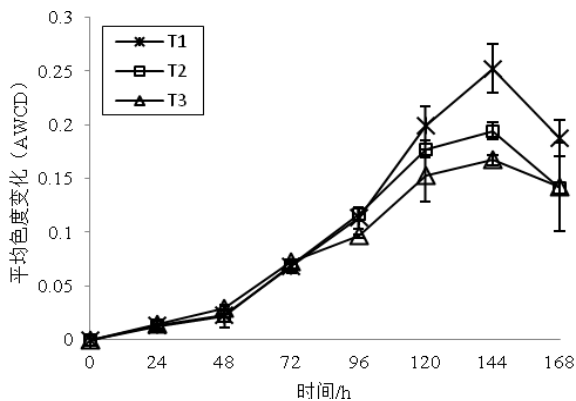


图 2 不同处理 AWCD 值变化曲线

Fig.2 Changes in Average Well Color Development with incubation times of different treatments

添加高浓度氮磷侵扰 38 d 后,随着培养时间从 0 h 到 144 h,随着氮磷浓度不断增加(T1,T2 和 T3) AWCD 是不断增大的。其中 T3 微生物群落对碳源利用程度最高。在 48 h 之前,处于 3 种营养状态下的微生物对碳源的利用都是很低,可能因为一些微生物不适应高浓度氮磷环境而死亡,此时期处于停滞期。之后,它们对碳源的利用是呈几何方式快速增长的,这意味着生物膜的增长进入了对数期,在 72 h 时碳源的利用变化速率最大,120 h 以后趋势逐渐减缓,趋于平稳。在 144~168 h 之间,微生物群落对碳源的利用已经进入衰退期,部分微生物开始死亡,AWCD 的值有所下降。随着 AWCD 的值先增加后平稳再下降,这表明自然生物膜微生物利用碳源能力先趋于不断提高到趋于平稳再到后期下降,可能起初充足的氮磷营养物质刺激了微生物对碳源的利用,至后期生物膜基质达饱和,最后可能产生新微生物群落占有了其摄取的碳源,使其原有基质利用碳源能力下降。

2.2.2 微生物群落碳源利用的多样性的主成分分析

为研究生物膜微生物群落碳源利用多样性的特点,选择 72 h 作为取样时间点,对 Biolog 所测得数据进行标准化变换后,实施主成分分析。提取

的主向量的前两个主成分(PC1/PC2)的累计贡献率为 57.44%。将前两个主成分得分作图,表征不同微生物群落的代谢特性^[38-39](图 3)。其中与 PC1 和 PC2 相关性较大的碳源见表 3。其中 PC2 轴能将处理 2 和处理 3 与对照组较明显的区分开,说明不同氮磷侵扰后其碳源利用出现差异,处理 1 样品点分布趋向于 PC1 正轴,也与 PC2 有关联;但是处理 2 和处理 3 位置相近,碳源利用相近,均与 PC1 强烈负相关。从表 3 可以看出,与 PC1 关联的碳源有 6 种与 PC2 关联的碳源有 6 种。在 PC1 负轴上处理得分是处理 2 和处理 3,其对 γ -羟基丁酸的利用能力要高于对照组,可能因为对此类羧酸利用较多而导致其利用多样性的产生。但是处理 2 和处理 3 之间微生物对不同碳源利用无明显差异。其中对照组对氨基酸类(如 L-精氨酸、L-苯基丙氨酸、L-天冬酰胺酸及 L-丝氨酸)和多聚物(如肝糖等)利用较多。

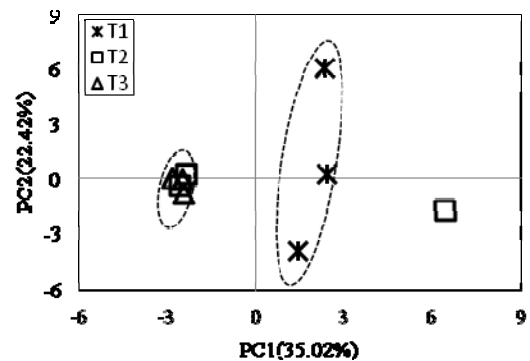


图 3 不同处理生物膜中的微生物群落碳源利用主成分分析

Fig.3 Principal component analysis on microbial community of periphyton biofilms

2.2.3 生物膜对不同碳源代谢能力的差异分析

Biolog-ECO 板具有 31 种类型碳源,可以分为 6 大类(4 种多聚物,10 种碳水化合物,7 种羧酸,6 种氨基酸,2 种胺类以及 2 种酚酸)^[42]。以 72 h 的光密度标准化值 R_{si} 来评价微生物群落对不同碳源的利用程度,结果见表 4。

结果表明,在 6 类碳源中,所有处理在培养第 72 h 表现出不同样点对碳源的利用不同。总体而言,不同处理下生物膜微生物均对氨基酸和羧酸有较强利用能力,其次是糖类和多聚物,对酚酸以及胺类利用能力较低。同时,随着氮磷浓度的增加,不同处理生物膜微生物对羧酸代谢能力不断增加,并达到显著差异($P < 0.05$),但是,对于多聚物的利用,规律却与羧酸正好相反,也达到显著差异($P < 0.05$)。对其他的碳源的利用变化不显著。正好与表 3 成分也对应,即对照组对多聚物(如肝糖)利用较多,而处理组则对羧酸类(γ -羟基丁酸)利用较多,从

表 3 主成分分析与因子 1 或因子 2 相关性较大的碳源种类 ($R > 0.70$)

Table 3 Correlation coefficients between main carbon source group and PC1 or PC2 at 72 hours

主成分 1		相关系数	主成分 2		相关系数
氨基酸	L-精氨酸	0.94	氨基酸	L-天冬酰胺酸	0.91
氨基酸	L-苯基丙氨酸	0.83	氨基酸	L-丝氨酸	0.85
羧酸	γ -羟基丁酸	-0.86	多聚物	肝糖	0.88
羧酸	丙酮酸甲酯	0.85	碳水化合物	D-甘露醇	0.86
碳水化合物	D-木糖	0.85	碳水化合物	N-乙酰基-D-葡萄糖胺	0.71
碳水化合物	I-赤藻糖醇	0.75	羧酸	D-苹果酸	0.80

表 4 不同碳源在 72 h 时的代谢程度 (以 Rsi 均值表征) 统计结果

Table 4 Average well color development for different C source group at 72 h

	碳水化合物	氨基酸	多聚物	酚酸	羧酸	胺类
T1	0.044±0.007a	0.174±0.056a	0.096±0.024a	0.002±0.001a	0.065±0.020a	0.002±0.001a
T2	0.032±0.003a	0.130±0.025a	0.052±0.009ab	0.001±0.001a	0.120±0.030ab	0.003±0.002a
T3	0.031±0.003a	0.116±0.016a	0.039±0.008b	0.006±0.002a	0.159±0.016b	0.001±0.001a

数值后面不同字母表示经 LSD 检验差异达显著水平 ($P < 0.05$), 下同

而造成了对照组与处理组间微生物对碳源代谢能力的差异。

2.2.4 微生物群落功能多样性指数比较分析

Shannon 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数分别从微生物群落物种丰富度、常见物种和物种均一性单个方面反映了微生物群落功能多样性, 本研究采用 72 h 的 Biolog 数据计算出此 3 种指数, 结果见表 5。在添加高浓度氮磷侵扰 38 d 后, 处理 1、处理 2 和处理 3 之间的 3 种指数之间并没有显著性差异, 说明不同处理下不同生物膜微生物群落物种丰富度以及微生物群落的异质性影响不显著。这与 PLFA 结果分析中的微生物总量变化不显著结果相似, 可能是因为较高浓度氮磷对生物膜微生物总体群落结构影响不大, 只是在局部影响所致。

表 5 72 h 时的基质微生物群落功能多样性

Table 5 Functional diversity of BIOLOG substrate utilization under different treatments at 72h

处理	Shannon 指数	Simpson 指数	McIntosh 指数
T1	1.81±0.30a	4.30±1.91a	1.11±0.91a
T2	1.76±0.40a	4.37±2.20a	1.10±0.55a
T3	1.72±0.12a	4.12±0.47a	1.11±0.35a

3 结论

在本研究条件下, 初步可以得到结论如下。

1) 添加高浓度氮磷侵扰 27 d 后, 对生物膜微生物总量影响不大, 但是影响了生物膜群落结构变化 (是微生物群落结构, 或者组成生物膜微生物的群落结构)。其中细菌中的 G 为优势菌群, 影响局部群落结构组成的变化。对照组与处理组间微生物群落结构出现显著性差异, 但是处理 2 和处理 3 之间群落结构相似。随着氮磷浓度的增加到一定程度, 群落结构的变化不大。

2) 添加高浓度氮磷侵扰 38 d 后, 影响了基质生物膜微生物对碳源利用的能力, 并且随着氮磷浓度增加提高了各处理的 AWCD。处理组碳源利用的微生物易于与对照组区分, 但是处理 2 和处理 3 之间对碳源利用能力相似。不同处理基质代谢碳源微生物功能趋向相似, 碳源的优先利用顺序依次为氨基酸、羧酸、糖类、多聚物、酚酸和胺类。其中对羧酸和多聚物的利用不同导致对照组与处理组对碳源利用能力的差异。3 个处理间整体物种演替性不大。

3) 为进一步阐明与明确哪些菌种对生物膜群落结构的组成和碳源利用功能造成的影响, 需要结合更多的研究手段, 比如 PCR-DGGE 或者构建基因文库等。

4) 不同的高浓度的氮磷会影响生物膜微生物群落组成, 包括微生物生物量, 细菌生物量, 真菌生物量, 革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌含量等。且营养物质含量不同也会影响微生物群落碳源利用功能的多样性。这些结果系统地解释了微生物群落结构和功能对于不同超富营养水平的响应的过程。这些有价值的信息将会有助于我们根据不同的富营养条件来进行选择不同成分的生物膜组成, 以期能提高生物膜在生态环境工程效益和效率。同时也为高浓度氮磷富营养水体的管理和人工养殖生物膜提供一些指导意义。

参考文献:

- [1] 杨清心. 太湖水华成因及控制途径初探[J]. 湖泊科学, 1996, 8(1): 67-74.
- [2] KARAMANEV, D.G. AND R SAMSON. High-rate biodegradation of pentachlorophenol by biofilm developed in the immobilized soil bioreactor[J]. Environmental Science & Technology, 1998, 32(7):

- 994-999.
- [3] AZIM M E, et al. Periphyton-water quality relationships in fertilized fishponds with artificial substrates[J]. *Aquaculture*, 2003, 228(1/4): 169-187.
- [4] M E, A. Photosynthetic Periphyton and Surfaces[J]. *Encyclopedia of Inland Waters*, 2009: 184-191.
- [5] BOURASSA, N. AND A. CATTANEO. Responses of a lake outlet community to light and nutrient manipulation: effects on periphyton and invertebrate biomass and composition[J]. *Freshwater Biology*, 2000, 44(4): 629-639.
- [6] LIBORIUSSEN, L. AND E. JEPPESEN. Structure, biomass, production and depth distribution of periphyton on artificial substratum in shallow lakes with contrasting nutrient concentrations[J]. *Freshwater Biology*, 2006, 51(1): 95-109.
- [7] BELLINGER B J, et al. Composition of extracellular polymeric substances from periphyton assemblages in the florida everglades[J]. *Journal of Phycology*, 2010, 46(3): 484-496.
- [8] HAVENS K E, et al. Littoral periphyton responses to nitrogen and phosphorus: an experimental study in a subtropical lake[J]. *Aquatic Botany*, 1999, 63(3/4): 267-290.
- [9] OZKAN K, et al. The response of periphyton and submerged macrophytes to nitrogen and phosphorus loading in shallow warm lakes: a mesocosm experiment[J]. *Freshwater Biology*, 2010, 55(2): 463-475.
- [10] MCCORMICK P V, et al. Periphyton responses to experimental phosphorus enrichment in a subtropical wetland[J]. *Aquatic Botany*, 2001, 71(2): 119-139.
- [11] CRAB R, et al. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production[J]. *Aquaculture*, 2007, 270(1/4): 1-14.
- [12] EUGENE B. WELCH, J M Q, CHRISTOPHER W. HICKEYMAY. Periphyton biomass related to point-source nutrient enrichment in seven New Zealand streams[J]. *Water Research*, May 1992, 26(5): 669-675.
- [13] Guo L G, Z J Li. Effects of nitrogen and phosphorus from fish cage-culture on the communities of a shallow lake in middle Yangtze River basin of China[J]. *Aquaculture*, 2003, 226(1/4): 201-212.
- [14] JEGATHEESAN V, S L V C. *Aquaculture Effluent: Impacts and Remedies for Protecting the Environment and Human Health*[J]. *Encyclopedia of Environmental Health*, 2011: 123-135.
- [15] PAERL H W, et al. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N & P) management strategy[J]. *Water research*, 2011, 45(5): 1973-1983.
- [16] DRIJBER R A., et al. Changes in soil microbial community structure with tillage under long-term wheat-fallow management[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32(10): 1419-1430.
- [17] SUSHCHIK N N, et al. Particulate fatty acids in two small Siberian reservoirs dominated by different groups of phytoplankton[J]. *Freshwater Biology*, 2003, 48(3): 394-403.
- [18] SMALL J A, et al. Investigating freshwater periphyton community response to uranium with phospholipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis analyses[J]. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2008, 99(4): 730-738.
- [19] 陈振翔, 于鑫, 夏明芳, 等. 磷脂脂肪酸分析方法在微生物生态学中的应用[J]. *生态学杂志*, 2005, 24(7): 828-832.
- [20] Wu Y H, et al. Environmentally benign periphyton bioreactors for controlling cyanobacterial growth[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(24): 9681-9687.
- [21] CHANG Y J, et al. Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3149-3160.
- [22] WHITE D C, et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate[J]. *Oecologia*, 1979, 40(1): 51-62.
- [23] FROSTEGARD A, E BAATH, A TUNLID. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty-acid analysis[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1993, 25(6): 723-730.
- [24] MCKINLEY V L, A D PEACOCK, D C WHITE. Microbial community PLFA and PHB responses to ecosystem restoration in tallgrass prairie soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(10): 1946-1958.
- [25] LECHEVALIER M P, C W MOSS. Lipids in bacterial taxonomy—a taxonomist's view[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 1977, 5(2): 109-210.
- [26] KROPPESTEDT, R.. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms[M]. *SOC. APPL. BACTERIOL. TECH. SER.*, 1985, 1985.
- [27] HARWOOD J L, N J RUSSELL. *Lipids in plants and microbes*[M]. Ltd, London: George Allen & Unwin Publ, 1984.
- [28] RUESS, L., et al. Fatty acids of fungi and nematodes—possible biomarkers in the soil food chain? [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(6): 745-756.
- [29] GARLAND J L, A L MILLS. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8): 2351.
- [30] WINDING A, R R NN, N B HENDRIKSEN. Bacteria and protozoa in soil microhabitats as affected by earthworms[J]. *Biology and fertility of soils*, 1997, 24(2): 133-140.
- [31] PATRA A K, et al. Unraveling the effects of management regime and plant species on soil organic carbon and microbial phospholipid fatty acid profiles in grassland soils[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(9): 3545-3551.
- [32] HELLMANN B, et al. Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-window composting[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(3): 1011-1018.
- [33] DUBEY S K, A K TRIPATHI, S N Upadhyay. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(17): 2217-2224.
- [34] FROSTEGARD A, E BAATH, A TUNLID. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1993, 25(6): 723-730.
- [35] FEDERLE T. Microbial distribution in soil—new techniques[J]. *Perspectives in microbial ecology*, 1986, 493-498.
- [36] GARLAND J L. Analysis and interpretation of community-level

- physiological profiles in microbial ecology[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 1997, 24(4): 289-300.
- [37] CHOI K H, F C DOBBS. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3): 203-213.
- [38] GARLAND J L, A L MILLS. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8): 2351-2359.
- [39] LI T L, et al. Comparison of the removal of COD by a hybrid bioreactor at low and room temperature and the associated microbial characteristics[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 108: 28-34.

Effects of hyper-eutrophic nitrogen and phosphorus additions on the functional and formational diversity of periphyton biofilms

WANG Jinhua^{1,2}, WU Yonghong¹, FENG Yanfang^{1,2}, LU Haiying^{1,2}, ZHOU Hui^{1,2}, YANG Linzhang^{3*}

1.Nanjing Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2.Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3.Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract: Periphyton biofilm plays an important role in the removal of pollutants in ecological engineering. However, little information is available on the relationship between trophic state (high concentrations of nitrogen and phosphorus) and periphyton biofilm. The experiment was investigated using by Biolog and PLFA technologies. The results showed that the increasing hyper-eutrophic state affected the functional diversity of periphyton biofilm communities and the diversity of biofilm community structure. We got the following conclusions: 1) on the day 27 of addition of high concentrations of nitrogen and phosphorus, only affects biofilm local microbial community structure, only partial community structure was changed. The Gram-negative bacteria (G-) played important roles in the partial periphyton community structure and were sensitive to trophic state shifts. 2) on the day 38 of addition of high concentrations of nitrogen and phosphorus, more carbon source type can be utilized by periphyton biofilms in higher hyper-eutrophic state. The treatment group (CK) carbon utilization microbial easily distinguished between the control group, but similarly with CK. The sequence of carbon sources utilization was amino acids, carboxylic acids, sugars, polymers, phenolic acids and amines. The different utilization of Carboxylic acids and polymers result in the difference of the control group and treatment group on the carbon utilization capacity. This study offers an insight to understand the periphyton-nutrient relationships in hyper-eutrophication waters, as well as providing valuable information to mitigate hyper-eutrophic state by manipulating the periphyton biofilm and nutrient. It also provides theoretical and technical support to improve the pollutant removal efficiency of ecological engineering.

Key words: hyper-eutrophication; periphyton biofilm; community composition; functional diversity