

沉积物中核酸态有机磷及其矿化过程研究

于 洋, 王晓燕, 吴在兴, 陈伟伟

(首都师范大学资源环境与旅游学院, 北京 100048)

摘 要: 水体沉积物界面中磷的释放机制非常复杂, 生物作用导致的 pH 值和氧化还原条件变化对湖泊沉积物矿化能力有显著影响。普遍认为沉积物中有机磷的矿化过程是对水体富营养化具有重要贡献的环节之一, 而核酸态有机磷可从一定程度上表征微生物水平, 反应微生物对矿化作用的影响。据此采用 DNA 提取的方法对沉积物中核酸态有机磷的含量进行测定, 并模拟沉积物中核酸在不同 pH 和溶解氧条件下的矿化过程。结果表明, DNA 提取方法可以快速、准确提取沉积物中核酸磷; 沉积物中核酸磷含量为 $0.43\sim 0.61\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 占有机磷总量的 $0.27\%\sim 0.37\%$, 精确度为 $1.58\%\sim 3.63\%$ 。模拟实验结果表明, 在两种情况下上覆水中总磷浓度均呈波动式上升, 在 pH 接近 7 时沉积物中核酸磷较低, 有氧条件下核酸磷呈下降趋势。

关键词: 沉积物; 有机磷; 核酸; DNA 提取方法; 矿化过程

中图分类号: X524 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2009)07-1469-04

Mineralization Process of the Organic Phosphorus in Nucleic Acid from Sediment

YU Yang, WANG Xiao-yan, WU Zai-xing, CHEN Wei-wei

(College of Resource Environment and Tourism, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: Mechanism of phosphorus releasing at the sediment-water interface is complex. Microbially induced changes in pH and redox potential strongly affect the ability of mineralization in lake sediments. The mineralization process of organic phosphorus in sediment is important to eutrophication, and organic phosphorus in nucleic acid form may represent the level of micro-organisms which indicates the mineralization process in a certain extent. In this paper, the method of DNA extracted from sediments and total phosphorus releasing from sediment to overlying water at different pH and aerobic/anaerobic conditions by experiments was studied. The method of DNA extracted from sediments used to analyze the organic phosphorus in nucleic acid form. The results showed that the contents of DNA-P are $0.43\sim 0.61\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in sediment, account for about $0.27\%\sim 0.37\%$ of total organic phosphorus, precisions are $1.58\%\sim 3.63\%$. Simulated experiments were set to understand the mineralization process in sediment at different pH and aerobic/anaerobic conditions. Results of two simulating experiments showed that the concentrations of TP in overlying water were fluctuating with increasing trend in general. The variation of DNA-P in sediment had no clear trend at different pH and the content of DNA-P in sediment was lower when pH near to 7. The result of aerobic and anaerobic simulated experiments showed that DNA-P in sediment was decreasing at aerobic condition.

Keywords: sediment; organic phosphorus; nucleic acids; DNA extracted method; mineralization process

我国湖泊富营养化问题严重。大量研究发现, 外源磷得到有效控制后, 内源磷的释放仍能使水体的富营养化持续数十年^[1]。沉积物磷释放受到溶解氧、pH 值、氧化还原电位(Eh)、生物的和非生物的过程以及

有机质分解、沉积物中铁含量和扰动状况、甚至气候变化等多种因素的综合影响, 其中微生物的矿化作用是导致沉积物内源磷释放的重要因素^[2-3]。微生物作用引起的 pH 和氧化还原条件变化对湖泊沉积物束缚无机磷的能力有显著影响^[4-5]。有氧条件下, 磷的释放主要取决于无机磷的解吸和有机磷的矿化。相当多的实验结果表明沉积物的磷释放受沉积物上覆水的 pH 值控制^[6]。还原条件或缺氧条件下沉积物中细菌能快速吸收和释放磷^[7]。核酸是由 3,5-磷酸二酯键连接而成的生物大分子, 它具有含磷量高和酸性强的特

收稿日期: 2008-11-04

基金项目: 国家自然科学基金(40871219); 北京市教委科技项目(KM200910028014)

作者简介: 于 洋(1984—), 女, 天津塘沽人, 硕士研究生, 研究方向为水与沉积物的相互作用。E-mail: sxtjyuyang@163.com

通讯作者: 王晓燕 E-mail: cnuwxy@sohu.com

点,是含磷有机质的重要组成成分,在磷的生物地球化学循环中是不可忽视的一个方面。沉积物中核酸磷的矿化能够在一定程度上反映沉积物中有机磷的微生物矿化与合成过程对环境的影响^[8]。

国内现有的研究集中于湖泊磷的地球化学特征^[9]、水体磷循环与富营养化关系^[10]、沉积物磷形态与生物有效性^[11]、界面磷的再生与迁移机制^[12]、内源磷负荷的估算与污染治理等方面^[13],主要围绕无机磷展开,对于沉积物中有机磷的研究多是采用分级提取的方法^[10,14]将有机磷作为一个整体来研究。但是这些分级方法只是基于操作上的便利而非化学计量或结构上的研究,无法对各种形态的有机磷进行分析,缺乏对有机磷深入探讨。目前普遍采用的以钼蓝比色法为基础的传统分析方法只能得到有机磷的总量,不能获取组成信息。针对这一不足,国外已发展³¹P核磁共振^[15]、软射线荧光光谱显微技术^[16]、高效液相色谱^[17]、酶解、化学分离和提纯等方法用于分析有机磷的组成及其成分,而国内鲜见有机磷成分的分析研究。

本文利用生物学 DNA 提取的方法将沉积物中的 DNA 片段提取出来,对核酸磷总量进行测定,以便计算出核酸形态的有机磷含量。大量的研究结果表明,pH 和氧化还原条件是对沉积物-水体中磷迁移较为重要的两个条件,所以本文针对 pH 值和溶解氧条件对上覆水中磷含量以及沉积物中核酸磷含量的影响进行研究。

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

采样点均布设在北京八一湖的西湖,利用 ETC-1 深水采样器采集表层 10 cm 的沉积物样品,采样点周围分别取 2 个位置的点作为平行,搅拌均匀,作为供试沉积物,并测定最初状态的核酸含量。同时采集沉积物的上覆水,测定水中总磷浓度。沉积物样品无需冷冻干燥,离心后直接用 DNA 提取试剂盒提取,测定核酸含量。

1.2 测定条件

将约 2 kg 沉积物,分别置于 1 000 mL 烧杯中,将上覆水缓慢倾倒入烧杯中,保持水土比为 1:1。将 3 个烧杯中的上覆水的 pH 值分别调节为 7、8、9,并作一组平行。另外将 2 个烧杯分别置于厌氧袋中和置于空气中,分别作一组平行。在第 5、10、15 d 测定上覆水中总磷含量及沉积物中核酸含量。

1.3 分析方法

上覆水的总磷含量测定采用磷钼蓝比色法^[18],

沉积物中核酸磷含量采用基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取。

准确称量 0.3~0.6 g 新鲜沉积物到干净的离心管中,加入 1 mL 抽提液,加入 10 μ L 溶液 A,充分混匀;加入 200 μ L 溶液 B,充分混匀后 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min;10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min 取上清液至新的 1.5 mL 离心管;加入 1/2 体积的蛋白沉淀液,充分颠倒混匀;13 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min 取上清液;在上清液中加入 500 μ L 的溶液 C,充分颠倒混匀;将混合液加入到纯化柱中,10 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 1 min 过滤,收集下滤液(下滤液含有 DNA);准确估计下滤液的体积,加入 0.6 倍体积的异丙醇,充分混匀,13 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min,小心倒掉上层悬液,70%乙醇洗涤沉淀一次;弃上清液,将沉淀吹干,溶于 30 μ L 超纯水中,65 $^{\circ}$ C 水浴 5~10 min,用 Spectrophotometer ND-1000 测定 DNA 浓度。DNA 提取试剂盒不需要借助玻璃珠破壁,有效保证了基因组 DNA 的完整性,经过特殊处理的纯化柱能有效去除杂质和腐植酸,极大地提高了 DNA 的纯度。提取过程中不需要使用有毒的苯酚等试剂,也不需要乙醇沉淀等步骤,操作简单,提取纯度高。

2 结果与分析

2.1 核酸类有机磷的提取分析

DNA 用紫外分光光度仪测定含量和纯度,测定 260 nm 和 280 nm 的 OD 值,260 nm/280 nm 的 OD 值在 1.8~2.0 之间说明蛋白质干扰比较小,结果较好。沉积物样品提取的 DNA 纯度为 1.78~2.07,基本符合 DNA 提取的要求。用核酸标准品做加标回收率试验,回收率为 68.9%。回收率偏低是由于标准品中部分短链 DNA 难以提取,而对于沉积物样品本身多数是长链 DNA,提取率要高于核酸标准品,所以此方法的提取率应高于 68.9%,结果可以代表沉积物中的核酸含量。

表 1 沉积物中核酸含量

采样点	DNA/ μ g $\cdot$ g $^{-1}$	DNA-P/ μ g $\cdot$ g $^{-1}$	DNA-P 占 OP 比例/%
T1	3.44	0.61	0.27
T2	3.40	0.60	0.37
T3	2.42	0.43	0.27
T4	3.27	0.58	0.32

结果表明,沉积物中核酸含量 2.42~3.44 μ g $\cdot$ g $^{-1}$,核酸态磷的含量 0.43~0.61 μ g $\cdot$ g $^{-1}$,占总有机磷的 0.27%~0.37%。对 4 个采样点的样品进行平行测定,

精密度 RSD 为 1.58%~3.63%, 该方法精确度较好。

2.2 pH 对沉积物中核酸磷释放的影响

在所采样的水体中, pH 一般为 7.9~8.9, 偏碱性。所以实验选取 pH 分别为 7、8、9 三个条件, 研究上覆水中总磷浓度的变化和沉积物中核酸含量的变化。结果见图 1。

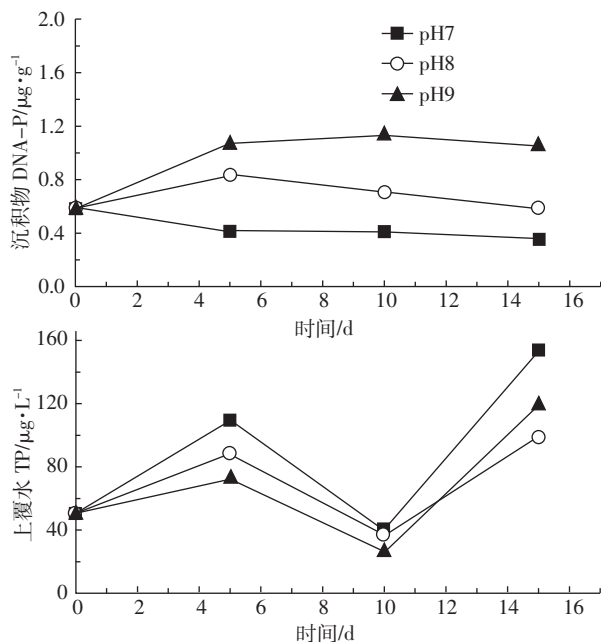


图 1 不同 pH 条件下核酸磷矿化

Figure 1 Mineralization of DNA-P at different pH condition

如图 1 所示, 上覆水中总磷的含量在实验结束后高于起始浓度, 而沉积物中核酸磷含量变化则与 pH 有关。上覆水中总磷浓度随 pH 升高而降低, 而沉积物中核酸磷含量随 pH 升高而升高。在培养第 15 d, 上覆水中总磷浓度明显高于初始时的数值, 其随时间的变化规律说明, 培养初期沉积物中微生物活动较为活跃, 上覆水中总磷浓度在第 10 d 降低可能是由于微生物的增殖增加了对水体中磷的利用, 但是随着时间的延长, 微生物死亡分解, 又会对水体中的磷起到贡献。

pH 条件对沉积物中核酸磷含量仅在第 5 d 时有一定影响。之后, 除 pH 为 8 的条件下核酸磷含量有所减少外, 其他 pH 条件下的变化不大。总体效果上, pH 为 7 条件下, 沉积物中核酸磷含量表现为降低, 而 pH 为 9 条件下表现为增加。

2.3 氧化条件对沉积物中核酸磷释放的影响

水中的溶解氧含量对沉积物磷的释放起着决定性作用, 厌氧状态可大大促进磷在沉积物中的释放和

迁移^[19]。本文在不同溶解氧条件下对沉积物进行培养试验, 一种是将厌氧袋中充入氩气, 模拟缺氧环境, 另一种模拟自然环境。结果见图 2。

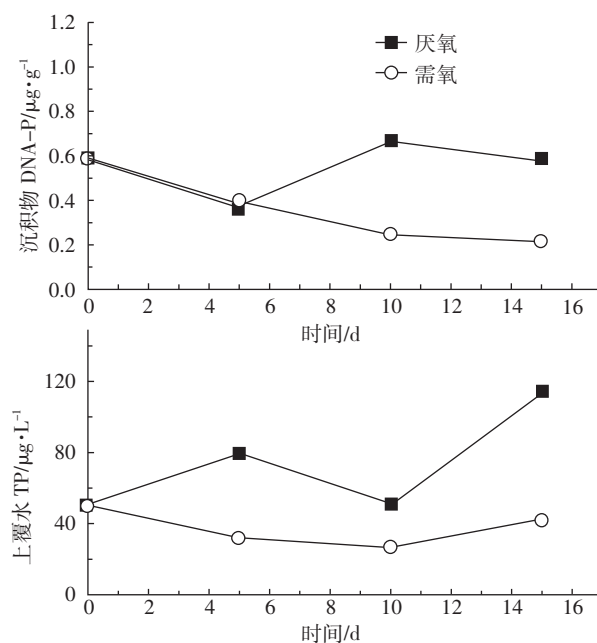


图 2 不同溶解氧条件下核酸磷矿化

Figure 2 Mineralization of DNA-P at different dissolved oxygen condition

在需氧条件下, 沉积物中核酸磷含量呈缓慢连续下降趋势; 在厌氧条件下, 核酸磷先降低, 而后在第 10 d 升高, 第 15 d 呈下降趋势。上覆水中的总磷浓度在需氧条件下于第 5 d 稍有降低, 至第 10 d, 浓度略有升高, 第 15 d 有明显上升。结果表明, 上覆水中总磷含量在总体上呈上升趋势, 且厌氧状态下上覆水中总磷含量明显高于需氧状态, 说明厌氧条件有利于沉积物中有机磷的矿化, 促进磷的释放。而沉积物中核酸含量在厌氧条件下也较高, 说明厌氧状态下微生物活动更加活跃。

由于核酸含量占沉积物有机磷组分很小, 它的含量变化并不能直接反映到上覆水中总磷浓度的变化, 但沉积物中生物活动对磷释放的作用会间接影响到水体中磷的浓度变化。许云台^[20]对沉积物中优势有机磷分解菌做了分离, 但没有对矿化过程中有机磷细菌的变化进行研究。本研究虽然对沉积物矿化过程中核酸磷量进行了测定, 反映了该时间段中沉积物中核酸磷与上覆水中磷含量的变化情况, 但还缺乏对矿化细菌和有机磷分解菌的分子生物学研究, 要精确了解磷释放的机理, 有必要进行进一步的研究。

3 结论

所研究的水体沉积物中,核酸态磷的含量在 $0.43\sim 0.61\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 范围,占总有机磷的 $0.27\%\sim 0.37\%$ 。沉积物在实验室条件下培养 10 d 后,有机磷矿化作用较为显著,pH=7 和有氧的条件有利于沉积物中核酸态磷的矿化,厌氧条件下核酸态磷含量在沉积物中的变化较大,矿化和固定作用较为活跃。

参考文献:

- [1] 吴文颖,袁龙义,厉恩华,等.富营养化湖泊沉积物磷释放特点及水生植物对其的影响[J].湖北农业科学,2007,46(6):1031-1034.
WU Wen-ying, YUAN Long-yi, LI En-hua, et al. Effects of aquatic macrophyte on phosphorus in lake sediment[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2007, 46(6): 1031-1034.
- [2] Lopez P, Lluch X, Vidal M, et al. Adsorption of phosphorus on sediments of the Balearic Islands (Spain) related to their composition[J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1996, 42: 185-196.
- [3] 刘 敏,侯立军,许世远,等.长江河口潮滩表层沉积物对磷酸盐的吸附特征[J].地理学报,2002,57(4):397-406.
LIU Min, HOU Li-jun, XU Shi-yuan, et al. Phosphate adsorption characteristics of tidal flat surface sediments and its environmental effect from the Yangtze estuary[J]. *Acta Geographica Sinica*, 2002, 57(4): 397-406.
- [4] Roden E E, Edmonds J W. Phosphate mobilization in iron-rich anaerobic sediments: Microbial Fe(III) oxide reduction versus iron-sulfide formation[J]. *Arch Hydrobiol*, 1997, 139: 347-378.
- [5] Gächter R, Müller B. Why the phosphorus retention of lakes does not necessarily depend on the oxygen supply to their sediment surface[J]. *Limnol Oceanogr*, 2003, 48: 929-933.
- [6] Koski Vahala J, Hartikainen H, Tallberg P. Phosphorus mobilization from various sediment pools in response to increased pH and silicate concentration[J]. *J Environ Qual*, 2001, 30(2): 546-552.
- [7] Gächter R, Myer J. The role of microorganisms in mobilization and fixation of P in sediments[J]. *Hydrobiologia*, 1993, 253: 103-121.
- [8] 梁小兵.湖泊沉积物中生物大分子的研究[D].贵阳:中国科学院地球化学研究所,2001:22-35.
LIANG Xiao-bing. Study on biological macro-molecules in lake sediments [D]. Guiyang: Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, 2001: 22-35.
- [9] 夏学惠,东野脉兴,周建民,等.滇池现代沉积物中磷的地球化学及其对环境的影响[J].沉积学报,2002,20(3):416-420.
XIA Xue-hui, DONG YE Mai-xing, ZHOU Jian-min, et al. Geochemistry and influence to environment of phosphorus in modern sediment in Dianchi lake[J]. *Acta Sedimentologica Sinica*, 2002, 20(3): 416-420.
- [10] 黄清辉,王东红,王春霞,等.沉积物中磷形态与湖泊富营养化的关系[J].中国环境科学,2003,23(6):583-586.
HUANG Qing-hui, WANG Dong-hong, WANG Chun-xia, et al. Relation between phosphorus forms in the sediments and lake eutrophication[J]. *Environmental Science*, 2003, 23(6): 583-586.
- [11] 张 路,范成新,朱广伟,等.长江中下游湖泊沉积物生物可利用磷分布特征[J].湖泊科学,2006,18(1):36-42.
ZHANG Lu, FAN Cheng-xin, ZHU Guang-wei, et al. Distribution of bioavailable phosphorus (BAP) in lake sediments of the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Journal of Lake Science*, 2006, 18(1): 36-42.
- [12] 王圣瑞,金相灿,赵海超,等.长江中下游浅水湖泊沉积物对磷的吸附特征[J].环境科学,2005,26(3):38-43.
WANG Sheng-rui, JIN Xiang-can, ZHAO Hai-chao, et al. Phosphate adsorption characteristics onto the sediments from shallow lakes in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Environmental Science*, 2005, 26(3): 38-43.
- [13] 秦伯强,朱广伟,张 路,等.大型浅水湖泊沉积物内源营养盐释放模式及其估算方法——以太湖为例[J].中国科学 D 辑地球科学,2005,35(增刊 II):33-44.
QIN Bo-qiang, ZHU Guang-wei, ZHANG Lu, et al. The model of nutrient release from inner source in large shallow lake and the method of estimate: A case study of Tai Lake[J]. *Science in China Series D: Earth Sciences*, 2005, 35(Sup II): 33-44.
- [14] 金相灿,庞 燕,王圣瑞,等.长江中下游浅水湖泊沉积物磷形态及其分布特征研究[J].农业环境科学学报,2008,27(1):279-285.
JIN Xiang-can, PANG Yan, WANG Sheng-rui, et al. Phosphorus forms and its distribution character in sediment of shallow lakes in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(1): 279-285.
- [15] Ingall E D, Van Cappellen P. Relation between sedimentation rate and burial of organic phosphorus and organic carbon in marine sediments[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1990, 54(2): 373-386.
- [16] Amy Townsend-Small, Jorge L Noguera, Michael E McClain, et al. Radiocarbon and stable isotope geochemistry of organic matter in the Amazon headwaters, Peruvian Andes [J]. *Global Biogeochemical Cycles*, 2007, 21: GB2029.
- [17] Mark A Nanny, Seungdo Kim, Roger A Minear. Aquatic soluble unreactive phosphorus: HPLC studies on concentrated water samples [J]. *Water Research*, 1995, 29(9): 2138-2148.
- [18] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:农业科技出版社,2000:133-136.
LU Ru-kun. Analytical techniques of soil agricultural chemistry [M]. Beijing: Chinese Agricultural Sci & Tech Press, 2000: 133-136.
- [19] 韩沙沙,温琰茂.富营养化水体沉积物中磷的释放及其影响因素[J].生态学报,2004,23(2):98-101.
HAN Sha-sha, WEN Yan-mao. Phosphorus release and affecting factors in the sediments of eutrophic water [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23(2): 98-101.
- [20] 许云台.西湖沉积物中微生物对有机磷循环影响研究 [D].杭州:浙江大学,2005:63-77.
XU Yun-tai. The study on the effect of bacteria on organic phosphorus cycling in sediment of Xihu Lake [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005: 63-77.

致谢:感谢中国科学院生态环境研究中心王子健研究员在研究思路的指导以及首都师范大学生命科学学院白素兰老师提供的实验技术支持。