

黑臭底泥硝酸钙原位氧化的温度影响及微生物群落结构全过程分析

王霖, 种云霄, 余光伟*, 龙新宪

(华南农业大学资源环境学院环境科学与工程系, 广州 510642)

摘要:为探明低温的影响,在室温下(12~22℃)模拟研究了投加硝酸钙进行底泥原位修复反硝化除硫的效果,同时在恒温条件(30℃)下研究了硝酸钙投加后、反硝化期间和硝酸盐耗尽后底泥微生物群落结构全过程变化。结果表明,硝酸钙对底泥硫化物有明显的去除效果,其中温度是影响硫化物去除的关键因素,当温度低于15℃,硫化物去除缓慢。DGGE联合克隆测序结果显示投加硝酸钙促进了底泥微生物多样性的增加,原泥、投加硝酸钙当天、反硝化期间和硝酸盐耗尽后4个时期底泥微生物群落结构存在明显差异。原底泥以兼性硫氧化菌 *Sulfuricurvum* sp.(相似度96%)为主,投加硝酸钙后,异养反硝化菌 *Thermomonas* sp.(相似度99%)数量增加;而在硝酸盐耗尽末期,反硝化菌条带变弱,而具备丙酸盐氧化功能的 *Smithella* sp.(相似度97%)逐渐成为优势菌群。研究结果可为黑臭底泥硝酸钙原位氧化提供技术参考,同时从微生物学角度进一步解释了硝酸钙对底泥硫化物和有机物的去除机理。

关键词:黑臭底泥;硝酸钙;温度;微生物群落结构;DGGE

中图分类号:X52 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2015)06-1187-09 doi:10.11654/jaes.2015.06.024

Temperature Effect on and Microbial Community Structure Dynamics During In-situ Oxidation of Black and Odorous Sediment by Calcium Nitrate

WANG Lin, ZHONG Yun-xiao, YU Guang-wei*, LONG Xin-xian

(Department of Environmental Science and Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Black and odorous river sediment contain large amount of sulfides. Calcium nitrate is an effective agent for in-situ oxidation remediation. A simulated experiment was designed to investigate the effects of low temperatures (12℃ to 22℃) on sulfur oxidation-denitrification. Changes of microbial community structure in sediments at different stages of oxidation process were also investigated at a constant temperature of 30℃ using DGGE combined with clone and sequencing techniques. Results showed that an effective sulfide removal by calcium nitrate occurred during the denitrification process, and the temperature was a key factor. The removal rate of sulfide was very low at temperature lower than 15℃. Calcium nitrate addition increased the microbial diversity in the treated sediment. Significant differences of microbial community structure were observed between day 0 (initial untreated sediment), day 1, day 3-14 (denitrification process) and day 50 (calcium nitrate exhausted) of calcium nitrate addition. Sulfur-oxidizing bacterium *Sulfuricurvum* sp. (96% similarity) was found to be the main strain in the original sediments, whereas heterotrophic denitrifier *Thermomonas* sp. (99% similarity) increased with the progress of denitrification. However, the band intensity of *Sulfuricurvum* sp. and *Thermomonas* sp. became quite weak when calcium nitrate was exhausted, but *Smithella* sp. (97% similarity), a propionate oxidizing bacterium, gradually became the dominant species. These findings advance our understanding and application of the calcium nitrate in-situ oxidation technology.

Keywords: black and odorous sediment; calcium nitrate; temperature; microbial community structure; DGGE

收稿日期:2015-01-07

基金项目:国家青年基金项目(51108196);广东省自然科学基金项目(S2011040001251)

作者简介:王霖(1990—),女,广东梅州人,硕士研究生,从事底泥原位修复研究。E-mail: xz10wl@126.com

*通信作者:余光伟 E-mail: yuguangwei@scau.edu.cn

河道黑臭、底泥累积、水质恶化仍是目前南方城市河网的一种普遍现象^[1]。一般认为,底泥有机物长期厌氧分解产生挥发性硫化物(AVS),包括硫化氢和重金属硫化物,是造成黑臭的主要原因^[2]。通过原位投加硝酸钙来消除底泥黑臭、抑制底泥磷释放、促进底泥有机物降解已经被认为是经济可行的底泥原位修复技术,并广泛应用于海洋、港口和城市河道底泥的原位修复^[2-10]。通常认为底泥硫化物的去除与硝酸根的生物氧化还原过程密切相关,其中硫自养反硝化菌(NR-SOB)和硝酸盐异化还原(DNRA)菌被认为是厌氧底泥硫去除主要的功能微生物^[5,11]。然而功能微生物的类型常因不同的底泥性质而异,因此对于投加硝酸盐可能引起的底泥微生物群落结构的变化是值得探讨的问题。

近几年来,有关投加硝酸钙后底泥微生物群落结构的演化研究逐渐引起关注。现有报道采用的方法主要包括 PCR-DGGE(通常联合克隆测序)、高通量测序及基因芯片^[2,5,12],后两者在底泥微生物群落结构定性和定量研究方面表现出巨大的优势,代表目前研究的发展趋势。但在仅要求定性研究的场合,PCR-DGGE结合克隆测序技术由于其技术稳定成熟仍然有其存在的价值。现有研究主要集中在硝酸盐反硝化过程底泥微生物群落结构的演化,对硝酸盐消耗后底泥微生物群落的变化关注较少。此外,温度是影响微生物活性的主要环境因素,也是底泥原位修复应用的关键控制因素。相关研究认为^[13-15],硫自养反硝化及异养反硝化的适合温度为 15~35 ℃,随着温度上升,反硝化速率有所提高,最佳温度为 28~30 ℃,低于 10 ℃时反硝化速率会受抑制。广州地区的年平均气温在 21 ℃左右,冬季时温度可低于 10 ℃,在一定程度上可能抑制反硝化反应的进行,而现有研究较少涉及低温对底泥硝酸钙原位修复的影响。基于此,本实验选择在冬季回暖时段于室温下(12~22 ℃)模拟研究了投加硝酸钙进行底泥原位修复反硝化除硫的效果;同时在高温条件(30 ℃)下研究了硝酸钙投加后、反硝化期间和硝酸盐耗尽后底泥微生物群落结构全过程变化,以探明气温对底泥硝酸钙黑臭治理效果影响以及不同时段底泥微生物群落特征。实验结果可为底泥原位黑臭治理提供技术参考和微生物学理论借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验底泥

底泥样品取自广州珠江支流车陂涌入河口(明珠

新村段)河道表层 0~30 cm 黑臭底泥,实验前做均化处理。底泥理化性质如表 1 所示。

表 1 实验底泥理化性质

Table 1 Initial characteristics of sediment used

样品	指标	检测值
底泥	AVS/mg·g ⁻¹	2.17±0.48
	有机质/mg·g ⁻¹	76.81±3.04
	KTN/mg·g ⁻¹	2.89±0.02
	含水率/%	53.64±0.08
	pH	6.86±0.03
	ORP/mV	-111.1±6.2
间隙水	NO ₃ -N/mg·L ⁻¹	0.51±0.26
	NO ₂ -N/mg·L ⁻¹	未检出
	SO ₄ ²⁻ /mg·L ⁻¹	22.43±0.50

1.2 底泥原位氧化室温模拟实验

实验在室温下(2013 年 1—3 月)模拟河道^[16]中进行。实验装置如图 1 所示,由 1.5 m×0.5 m×0.5 m PVC 板构成,河道模拟区与蓄水池用挡板隔开,通过潜污泵把河道区泥水抽入或抽出蓄水池实现河道区的水位涨落变化,模拟涨、落潮过程。实验底泥在储泥箱里经过均化处理,去除杂质后按照 2%投加量(硝酸根含量为 0.25 mmol·g⁻¹干泥)投加硝酸钙并混合均匀,然后装入河道模拟装置,其中底泥厚 10 cm,上覆水(河水)30 cm。开启继电器,模拟涨落潮并定期取泥样。采样在最低水位时进行,分别在模拟河道设置上游区、拐弯处、下游区(图 1 三角形位置)三个点取样。采用 100 mL 大号塑料针筒(剪掉前端),缓慢扎入底泥泥下 5 cm 处后抽取底泥样品。样品在带盖离心管里混合后离心,上清液测定间隙水硝态氮、亚硝态氮浓度,泥样测定 AVS 含量,每组做两个平行样。硝态氮和亚硝态氮的测定采用国家标准方法;AVS 测定参考文献方法^[17];温度、pH 值、ORP 采用便携式探头原位测定。

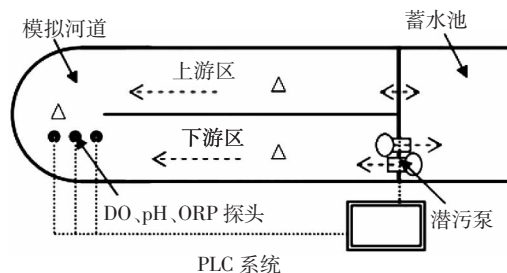


图 1 河道模拟系统

Figure 1 Schematic diagram of experimental facility

1.3 底泥氧化过程微生物群落结构演化实验

1.3.1 实验方法

实验底泥按照 2% 投加量(硝酸根含量为 $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 干泥)投加对应的硝酸钙后混匀后装入一系列 250 mL 遮光塑料瓶,密封放置于恒温培养箱中($30 \pm 1^\circ \text{C}$)遮光培养,定期(第 1、3、7、14、21、28、50 d)取样,原泥作为对照(以第 0 d 表示)。取样时将整瓶底泥多点提取底泥细菌总 DNA 后混合。另一组同条件平行实验测试底泥理化性质(数据本论文未详细给出)。

1.3.2 PCR-DGGE 与克隆测序

采用 Mobio PowerSoil DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories, Inc, Carlsbad, CA)试剂盒从底泥样品中提取总 DNA。以此 DNA 作为模板,选取细菌 16S rRNA 通用引物扩增 16S rRNA V3 区,上游引物为 F338- $5'$ -CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG- $3'$;下游引物为 R518: $5'$ -ATT ACC GCG GCT GCT GG- $3'$ 。PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 5 min;然后进入第一轮循环(94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 25 个循环);接着进入第二轮循环(92°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 10 个循环);最后 72°C 最终延伸 10 min。

DGGE 分析使用 Bio-Rad(美)公司的 Molecular Imager Gel Doc XR+凝胶成像与分析系统。聚丙烯酰胺胶浓度为 8%,变性剂浓度梯度为 40%~60%,每孔加入已经混合好的 PCR 产物 $26.5 \mu\text{L}$ ($20 \mu\text{L}$ 的 PCR 产物和 $6.5 \mu\text{L}$ 的 $6\times$ Loading Buffer),在 60°C $1\times$ TAE、80 V 条件下电泳 13 h,用 0.01% SYBR Green I 染料染色 30 min,最后用凝胶成像系统观察样品的电泳条带并拍照。

切下 DGGE 凝胶上的目的条带浸泡在 $30 \mu\text{L}$ 灭菌超纯水中, 4°C 放置过夜,以此作为模板采用相同 PCR-DGGE 条件进行条带纯化。取 $5 \mu\text{L}$ 最后一次 DGGE 切胶产物为模板按 16S rRNA 基因组总 DNA 扩增体系和扩增程序再次扩增,引物为 F338、R518(不带 GC 夹)。将 PCR 产物用作克隆连接,连接后用化学法进行转化克隆,最终将克隆后的菌液送交测序公司(华大基因)进行测序。

1.4 数据分析

常规理化指标采用 Sigmaplot 绘图,采用 SPSS 软件进行相关性分析。DGGE 图谱首先采用图形分析软件 Image Lab 根据峰图将条带亮度转化为百分比数

值,测序后序列使用 Mothur 软件对照 Silva 细菌数据库对条带基因序列进行分类;接着使用 R 软件将分类结果和百分比数绘制成热图,同时结合 Vegan 软件包进行 α -多样性指标计算、UPGMA 聚类和 PCA 排序分析;最后分类结果通过 NCBI 基因库 Blast 比对,选择参照菌属基因序列,使用 Mega 6.0 软件制作系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 底泥原位氧化室温模拟实验

2.1.1 反硝化除硫过程

由图 2 可见,投加硝酸钙之后底泥间隙水硝酸根浓度上升至 $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,经 1 个月持续下降,第 30 d 消耗完毕。在此过程中,硫化物由 $1.94 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 下降至 $0.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,去除率达到 90%,期间亚硝酸出现了累积,最大浓度达到 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (第 18 d)。可见,硝酸钙对硫化物有良好的去除效率,与相关研究结果一致^[4,9]。

图 2a 显示,硫化物的变化经历两个不同的时段,前 12 d 硫化物下降缓慢,第 12 d 之后硫化物快速下降,直至稳定在较低水平。而此过程中,亚硝酸盐累积

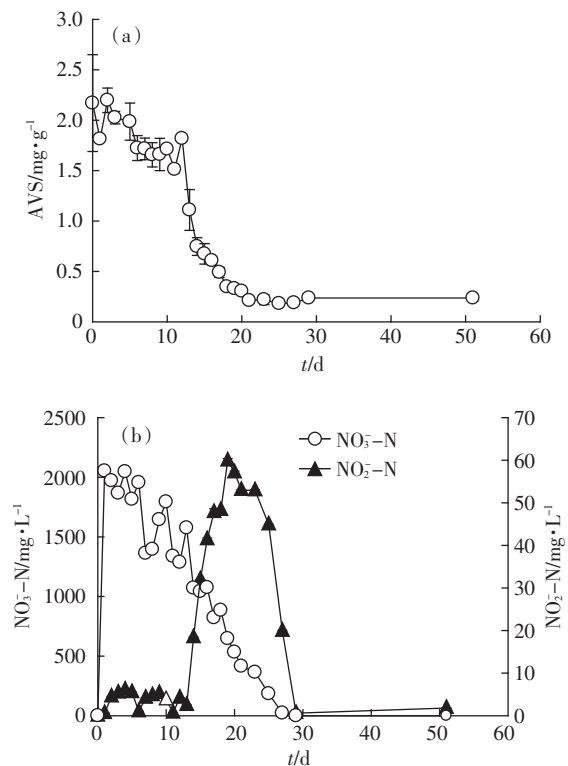
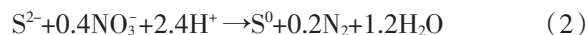
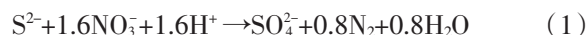


图 2 硫化物、硝态氮及亚硝态氮的变化(第 0 d 为原泥对照值)

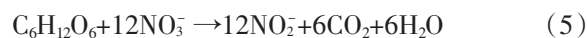
Figure 2 Variations of AVS, nitrate and nitrite during in-situ oxidation of sediment over time (Values at day 0 are those of original sediment)

也出现明显的分界,前12 d 累积现象不明显。硝酸盐变化则没有明显的界限。

反硝化过程根据电子供体的不同通常可分为异养反硝化和自养反硝化。硫自养反硝化菌能将硫化物氧化为单质硫或硫酸盐,其反应如下^[18]:



由图2b推测,第12 d 后出现硫化物迅速下降和亚硝酸的累积,说明此阶段系统可能出现了如方程式(3)或(4)的硫氧化途径。另有研究报道认为,投加硝酸钙可以促进底泥有机物的降解^[19]。这说明投加硝酸钙之后,可以促进异养反硝化。相关反应如下:



由亚硝酸盐变化可以推测(图1b),在反应第20 d 后出现了异养反硝化反应,导致亚硝酸盐的急剧下降,硝酸盐与亚硝酸盐最终消耗完毕。

2.1.2 底泥氧化过程环境参数的变化及相关性分析

由图3可见,温度、ORP 和 pH 值都呈上升趋势。本实验时间选于2013年1月至3月,该期间气温处于回暖阶段。底泥温度由12℃持续上升到22℃。由相关性分析(表2)可见,温度和硫化物、硝酸盐的变化有较高的负相关性,相关系数分别达到-0.904($P < 0.01$)和-0.89($P < 0.01$)。

在第12 d 前,温度低于15℃,对照硫化物的氧化曲线(图3a)可以发现,硫化物在此温度下下降缓慢,可见在此温度以下,硫自养反硝化的速率较为缓慢。然而在此温度下,硝酸盐的降低并未出现明显减缓现象,也并无亚硝酸盐累积现象。前期研究表明^[16],投加硝酸钙后,底泥间隙水硝酸根会持续向上覆水体释放。据此可推测,本研究中硝酸盐的减少可能是由于其向上覆水扩散迁移造成。

对比图3a、图3b可见,第12 d 后温度升至15℃以上,硫化物与硝酸盐的去除速率明显增大,亚硝酸盐也出现了累积,显示温度是影响硫化物去除效率的主要因素。而底泥生化反应进一步影响了ORP 和 pH 值的变化。反硝化过程中,pH 值略有上升,但变化不明显,ORP 则由-90 mV 上升至-30 mV,说明随着硫化物的去除,底泥逐渐由还原态向氧化态过渡。由表2相关性分析可见,ORP 跟硫化物、硝酸盐具有较高的负相关性,相关系数分别为-0.815($P < 0.01$)

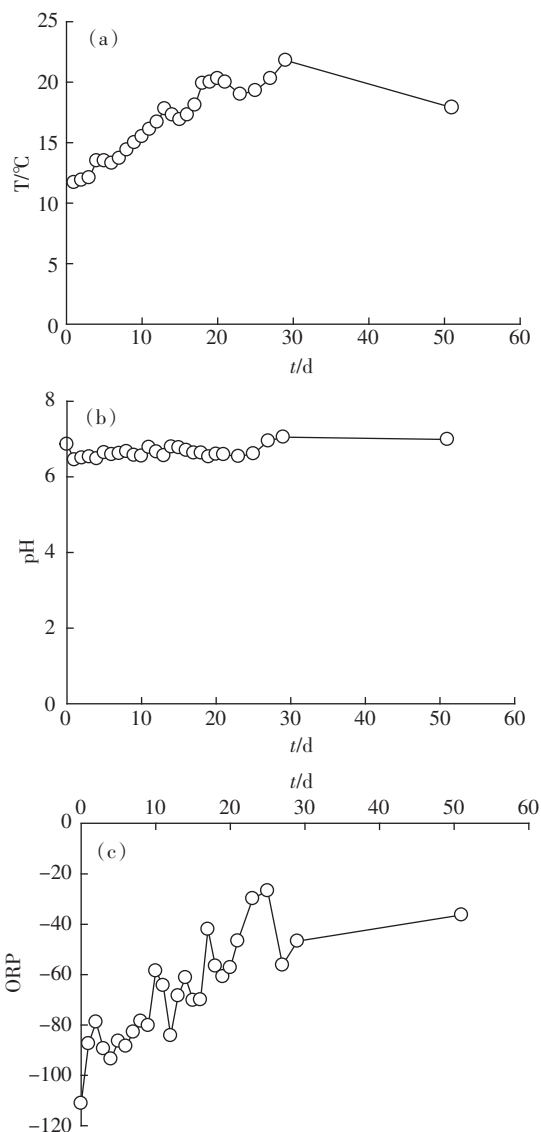


图3 原位氧化过程中温度、pH 及 ORP 的变化
(第0 d 为原泥对照值)

Figure 3 Variations of temperature, pH and ORP during in-situ oxidation of sediment
(Values at day 0 are those of original sediment)

表2 各个指标之间相关性分析

Table 2 Correlation analysis between various parameters

	pH	ORP	AVS	NO ₃ -N	NO ₂ -N
T	0.492*	0.786**	-0.904**	-0.890**	0.641**
pH	—	0.384	-0.439*	-0.631**	-0.149
ORP	—	—	-0.815**	-0.851**	0.576**
AVS	—	—	—	0.894**	-0.721**
NO ₃ -N	—	—	—	—	-0.555**

和-0.851($P < 0.01$)。有研究认为 NO 和 N₂O 等硝酸盐还原的中间产物增加了底泥的 ORP^[20]。另外,较高的

ORP 也会在一定程度上抑制硫酸盐还原菌的生长^[9],抑制了硫化物再生。可见,投加硝酸钙可影响底泥环境参数,而环境参数的改变又可能影响底泥微生物群落的组成。

2.2 底泥微生物群落结构演化研究

2.2.1 DGGE 图谱及测序结果分类

底泥原位氧化过程 DGGE 谱图如图 4a 所示。实验中一共出现了 16 条明显的条带,且各主要的条带在不同时间点出现弱化或强化的现象。如第 0 d 的第 6 条带,在投加硝酸钙后明显出现弱化现象,而在第 7 d 和第 14 d 再次强化;条带 10 在投加硝酸钙后则明显加强,后逐渐弱化,而在硝酸钙消耗后第 50 d 亮度增大,成为主要条带;条带 14 只在第 7 d 之后才明显出现。DGGE 谱图最大的特点正是通过这些代表不同菌群的条带的强弱变化,直观地描述微生物群落结构的变化。同条件平行实验结果表明,投加 2%硝酸钙后,硝酸盐在第 14 d 耗尽,在此过程中 95%的底泥硫化物被氧化。对比图 4a 可见,投加硝酸钙之后,不同时段微生物群落组成发生了明显的变化。如在原泥中,条带 4 和 6 是主要条带,而投加硝酸钙后条带 1、

条带 2 和条带 10 为主要条带,至反硝化结束时(第 14 d)条带 9、11、13、14 为主要条带,反硝化结束后(第 50 d)主要条带则改变为条带 5、9、10、13、14。

为了客观地描述底泥氧化过程微生物群落变化情况,国内外有学者提出,通过提取 DGGE 条带亮度数据来近似表征该条带所代表菌群的相对量,从而实现了 DGGE 数据的多元统计分析^[21-24]。本实验采用 Image Lab(Bio-Rad 自带)软件提取各泳道条带亮度峰值(转化占泳道百分比,并移除数值低于 1%的条带),用于定性地表示各条带菌群的相对丰度。同时,对 DGGE 图谱 16 条带进行回收、克隆后测序,克隆测序得到的 16 组基因序列片段长度为 164~329 bp,平均长度为 195 bp。采用 Mothur 软件(<http://www.mothur.org/>)classify.seqs 功能,以 Silva 细菌数据库为对照对基因序列进行分类;最后采用 R 软件(<http://www.r-project.org/>)heatmap.2 函数和 vegan 软件包对所取得的分类数据绘制热图,并计算 α -多样性指标。结果如图 4b 和表 2 所示。

由表 3 可见,底泥中投加硝酸钙后主要条带(>1%)数略有增加,Shanon-Wiener 指标和 Simpson 指标都

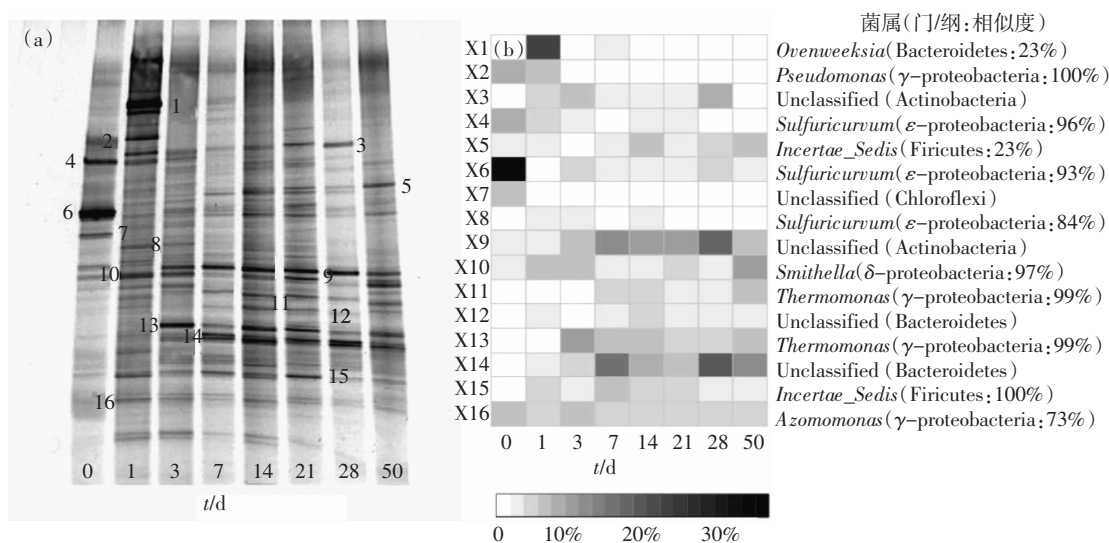


图 4 底泥氧化过程 DGGE 图谱(a)和基因序列分类热图(b)

Figure 4 DGGE profile and classification heatmap during in-situ oxidation of sediment

表 3 不同时间点底泥 α -多样性指标

Table 3 α -diversity indexes of sediment at different time points

Index	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	50 d
Richness	11	14	15	13	14	13	13	12
Shanon-Wiener	1.84	2.32	2.58	2.34	2.58	2.53	2.31	2.42
Simpson	0.74	0.85	0.91	0.88	0.92	0.91	0.87	0.90
Pielous evenness	0.74	0.86	0.93	0.89	0.95	0.96	0.88	0.94

有增加的趋势,说明投加硝酸钙后,底泥微生物多样性明显增加。特别是投加硝酸钙的第1 d,各项指标都达到一个较高的数值;之后缓慢增加,到第14 d,也就是硝酸盐消耗尽,达到最大;之后波动中略有下降,但其值均高于原底泥指标。这反应了底泥投加硝酸钙后微生物群落具有较高的丰富性和多样性。刘树娟等^[8]在2012年对投加硝酸钙底泥的样品进行DGGE分析得到的条带数在15~20之间,且投加硝酸钙之后Shanon-Wiener指数较之原泥有明显增加,与本研究结果相近。

如图4b所示,16条主要条带分属于放线菌 Actinobacteria(2条)、Bacteroidetes(3条)、Chloroflexi(1条)、Firmicutes(2条)和 Proteobacteria(8条)5个主要门类。其中有11条带可归类于6个已知菌属,两条条带(X5、X15)属于 Firmicutes 门的未定位菌属(Incertae_Sedis),5条条带(X3、X7、X9、X12、X14)未被分类(Unclassified)。本实验出现的5个主要门类,在有关硝酸钙底泥修复的研究中常见报道^[2,25],特别是 Proteobacteria 门的 ϵ -、 δ -、 γ - Proteobacteria 亚群。然而,不同门类在不同时间点底泥中的分布以及其分类或 Blast 得到的拟似菌属却存在差异。如本试验中原泥的主要类群以 ϵ -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 和 Actinobacteria 为主,拟似菌属以 *Sulfuricurvum*, *Pseudomonas* 为主,与相关研究结果略有差别。可见,不同来源底泥因为其性质差异,微生物群落结构不尽相同。然而,投加硝酸钙后河道底泥中出现的主要微生物群类却较为接近,又说明了这几种主要门类的菌群均与硝酸盐促发的生化反应有关。

现有报道认为,硝酸钙在底泥中可能促进的生化反应包括异养反硝化^[26]、硫自养反硝化^[5,27]、硝酸盐异质还原生成氨^[28-29]、亚铁氧化反硝化^[30]、厌氧氨氧化^[12]等。每一类生化反应的功能微生物菌有所差别,从而构成底泥微生物群落结构的差异,而这些生化反应的发生与环境因素如 pH、温度以及初始硫化物、亚铁、硝酸根的含量有关^[4,11]。这就造成不同的底泥性质,尽管投加相同的硝酸钙,其主要的菌群也会存在差异。由图4b可见,原泥中主要以 *Sulfuricurvum*(ϵ -Proteobacteria)菌属为主要丰度菌属。投加硝酸钙后第1 d,底泥中主要以 *Owenweeksia*(Bacteroidetes,相似度仅23%)、*Pseudomonas*(γ -Proteobacteria)、*Smithella*(δ -Proteobacteria)为主,反硝化期间,*Thermomonas*(γ -Proteobacteria)、Actinobacteria 和 Bacteroidetes 丰度逐渐增加,而在反硝化结束后,条带呈均匀分布(如表1

所示,Pielous evenness 值为0.94),*Smithella*(δ -Proteobacteria)、Actinobacteria、Bacteroidetes、*Thermomonas*(γ -Proteobacteria)均有较高的丰度值。此外,具有固氮作用的氮单胞菌属(*Azomonas*)在原泥及底泥氧化过程俱保持相当的丰度值,说明硝酸钙对该菌属的影响不明显。

2.2.2 系统发育树与优势菌群功能分析

条带基因序列根据分类结果和 Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对结果构建系统发育树如图5所示。根据参考文献报导,选择相关硫氧化微生物作为对照,其中包括常见的硫自养反硝化菌 *S. denitrificans* 和 *T. denitrificans*,以及其他反硝化菌如 *Pseudomonas denitrificans* 和硫氧化菌 *Thiobacillus thioparus* 和 *Sulfuricurvum kujiense*。一般认为Bootstrap 检验值大于70%较为可信^[31]。图5所示的条带基因和目标基因均有较高的 Bootstrap 值(82%~100%),图4b也显示了主要目标功能条带基因与分类结果有较高的相似度(菌属在93%以上,门分类均为100%),分类结果较为可靠。

结合热图分析和发育树结果可以发现,*Sulfuricurvum*(条带X4、X6、X8)是原底泥主要功能菌,与其 Blast 比对最接近的 *Sulfuricurvum kujiense* 属于化能自养的兼性硫氧化菌^[32]。该菌属能以氧气或硝酸盐作为电子受体而氧化硫化物。通常认为底泥黑臭物质如硫化物是硫酸盐还原菌(SRB)还原硫酸盐的结果,因此在一些报道中,硫酸盐还原菌是黑臭底泥主要微生物群落之一^[25]。而在本例中,由于实验底泥采集于车陂涌表层底泥,车陂涌在该河段已实现沿岸截污,水质得到提升,加上退潮时底泥裸露,表层底泥常处于有氧状态。有研究发现,随着上覆水体溶解氧上升,底泥硫化物会逐渐被氧化^[33]。本研究中发现 *Sulfuricurvum kujiense* 具备氧化硫化物的功能,验证了这一研究结果。另外,现有报道认为,投加硝酸钙后底泥硫化物主要通过硫生物氧化去除,硫自养反硝化菌(NR-SOB)和硝酸盐异质氨化(DNRA)菌被认为是厌氧底泥硫去除的主要功能微生物。Zhang 等研究发现投加硝酸钙后,*S. denitrificans* 是主要硫氧化功能菌群^[5];Brunet 和 Garcia-Gil 认为在富硫底泥中,*T. denitrificans* 或 *D. desulfuricans* 等微生物能促进 DNRA 过程,进而达到除硫的目的^[11],而部分 DNRA 菌如 *D. desulfuricans*,还同时具备硫酸盐还原的功能。这些微生物在本实验中均未出现,主要原因是与底泥的初始状态有关。

另一个与反硝化过程有关的菌属是 *Thermomonas*

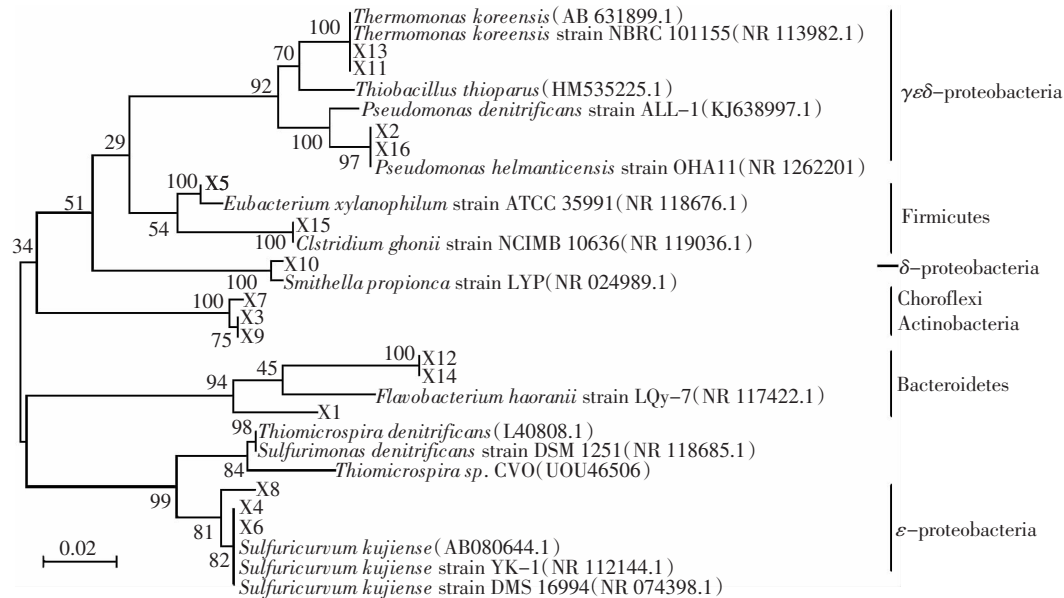


图 5 DGGE 条带基因序列与 Blast 比对序列系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree for DGGE band sequences and Blast sequences

菌属(条带 X11、X13)。与之相近的 *Thermomonas koreensis* 属于异养菌,可以利用硝酸盐作为电子受体参与反硝化作用并分解有机物^[34]。该菌属在投加硝酸钙之后第 3 d 条带变亮,成为优势菌,而随着硝酸盐的耗尽,条带逐渐变弱。这说明硝酸钙的投加不仅促进了硫氧化微生物的除硫作用,还会促进异养反硝化菌的繁殖,藉此可促进有机物的降解。

值得注意的是,在投加硝酸钙当天原泥中的优势条带均变弱,而产生其他多个条带。这是造成其多样性指标增加的原因。其中条带 X10 *Smithella* 属于互营菌科,是常见的丙酸氧化菌^[35]。该条带在投加硝酸钙后变强,而在反硝化期间变弱,到硝酸盐消耗后第 50 d 再次强化成为主要菌群,说明投加硝酸钙后促进了低分子有机酸的降解。Sun 和 Cupples 在投加硝酸盐的系统发现 *Smithella*^[36],而在投加硫酸盐的系统并未出现,可见该微生物极可能与硝酸盐反硝化过程有关。

此外,在反硝化及结束期间(第 7~28 d),条带 X9 和 X14 一直处于优势状态。X9 属于放线菌门(Actinobacteria),X14 属于拟杆菌门(Bacteroidetes),由于均未获得其菌属分类,其功能尚未清晰。但是,从本研究中分类及发育树结果所反映微生物群落的变化,已从微生物角度阐明投加硝酸钙解决底泥黑臭问题的可行性。

2.2.3 聚类、排序分析与微生物群落变化

采用 R 语言结合 Vegan 软件对 DGGE 条带数据

包进行聚类 and 排序分析。聚类方法选择 UPGMA(average)。排序分析时,先用 Decorana 函数获得前 4 个轴 Axis lengths 最大值为 1.87,因小于 3,故选择线性模型 PCA 分析。分析结果如图 6 所示。

从 UPGMA 聚类分析可以看出原泥(0 d)、投加硝酸钙当天(1 d)和投加硝酸钙以后(3~50 d)底泥微生物群落出现明显的差异,而投加硝酸钙之后,反硝化起始阶段(3 d)、硝酸钙消耗后一个半月(50 d)和中间时段(7 d、14 d、21 d 和 28 d)也存在差异。值得一提的是,反硝化第 7 d、第 14 d 分别与反硝化结束后第 28 d、第 21 d 相似,说明群落变化随着硝酸盐的消耗有反复现象。然而,从第 50 d 聚类结果来看,这种反复并未回到初始状态,而是形成新的群落特征。可见,从时间段变化来看,原泥、投加硝酸钙当天、反硝化期间及反硝化结束后微生物群落菌有明显差异。

通过 PCA 分析也可以找到类似的结果。如图 6b 所示,两个轴贡献了 60.2% 的信息量。从采样时间分布来看,相对于原泥(0 d)而言,1 d 距离最远,说明采用混合投加硝酸钙的方式会造成较大的差异;7 d 和 28 d、14 d 和 21 d 与 0 d 距离均较为相近,说明这些时间点之间底泥微生物群落差异较不明显。从采样时间与微生物关系来看,主要功能条带包括具有硫氧化功能的条带 X6(*Sulfuricurvum*),具有异氧反硝化功能的条带 X13(*Thermomonas*)和具有丙酸盐氧化功能的 X10(*Smithella*)条带,其在不同时间段排序如下:①

X6:0 d>3 d>50 d>7 d、14 d、21 d、28 d>1 d; ②X13:7 d>28 d>50 d>14 d>21 d>3 d>1 d>0 d; ③X10:1 d>3 d、14 d、21 d>7 d>28 d>50 d>0 d。这反映了这3类菌群相对丰度在0 d、1 d、50 d和其他时间段均有明显的差别。显然,这3类菌群的变化均与硝酸钙的投加密切相关。

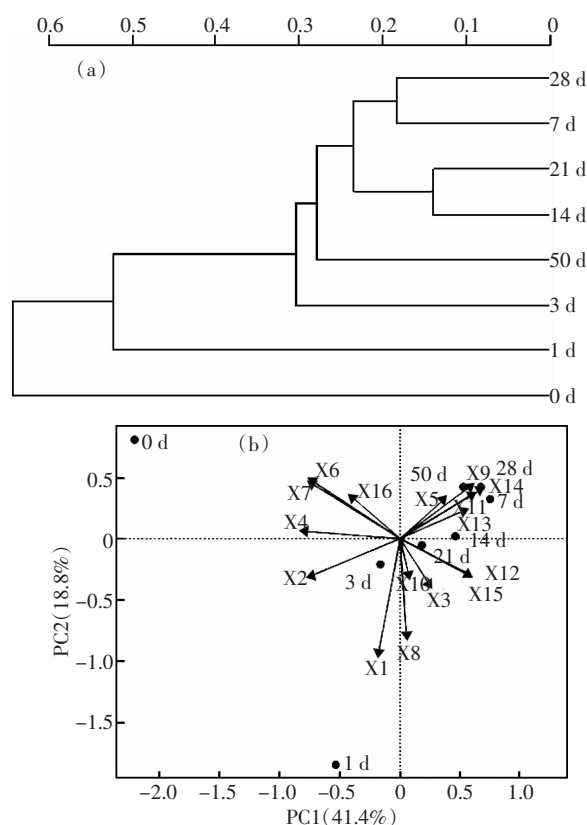


图6 UPGMA 聚类图(a)和PCA 排序图(b)

Figure 6 UPGMA cluster(a) and PCA ordination analysis(b)

3 结论

研究结果表明硝酸钙对底泥硫化物有明显的去除效果:温度是影响硫化物去除的关键因素,当温度低于15℃,硫化物去除缓慢;投加硝酸钙促进底泥微生物多样性,原泥、投加硝酸钙当天、反硝化期间和硝酸盐消耗后4个时期微生物群落结构有明显的差异性。微生物群落中与底泥硝酸盐生化反应过程相关的微生物包括硫氧化菌属 *Sulfuricurvum*(ϵ -Proteobacteria),异养反硝化 *Thermomonas*(γ -Proteobacteria)菌属,以及具有丙酮盐氧化功能的 *Smithella*(δ -Proteobacteria)菌属。

参考文献:

[1] 许炼烽,邓绍龙,陈继鑫,等.河流底泥污染及其控制与修复[J].生态

环境学报.2014(10):1708-1715.

- XU Lian-feng, DENG Shao-long, CHEN Ji-xin, et al. River sediment pollution and its control and restoration[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2014(10):1708-1715.
- [2] 刘近,邓代永,孙国萍,等.硝酸盐对沉积物中有机物氧化减量及微生物群落结构的影响[J].环境科学,2013(7):2847-2854.
- LIU Jin, DENG Dai-yong, SUN Guo-ping, et al. Effects of nitrate on organic removal and microbial community structure in the sediments[J]. *Environmental Science*, 2013(7):2847-2854.
- [3] Murphy T P, Lawson A, Kumagai M, et al. Review of emerging issues in sediment treatment[J]. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 1999, 2(4):419-434.
- [4] Shao M, Zhang T, Fang H H, et al. The effect of nitrate concentration on sulfide-driven autotrophic denitrification in marine sediment[J]. *Chemosphere*, 2011, 83(1):1-6.
- [5] Zhang M, Zhang T, Shao M F, et al. Autotrophic denitrification in nitrate-induced marine sediment remediation and sulfurimonas denitrificans-like bacteria[J]. *Chemosphere*, 2009, 76(5):677-682.
- [6] Yamada T M, Sueitt A P E, Beraldo D A S, et al. Calcium nitrate addition to control the internal load of phosphorus from sediments of a tropical eutrophic reservoir: Microcosm experiments [J]. *Water Research*, 2012, 46(19):6463-6475.
- [7] Yu G, Lei H, Bai T, et al. In-situ stabilisation followed by ex-situ composting for treatment and disposal of heavy metals polluted sediments[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(7):877-883.
- [8] 刘树娟,陈磊,钟润生,等.硝酸钙对河流底泥中含硫化物臭味原位控制[J].环境科学研究,2012(6):691-698.
- LIU Shu-juan, CHEN Lei, ZHONG Run-sheng, et al. In situ control of odor in sulfide-containing compounds with calcium nitrate in river sediments[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2012(6):691-698.
- [9] 陈磊,王凌云,刘树娟,等.硝酸钙对深圳河底泥臭味及生物化学特性的影响[J].哈尔滨工业大学学报,2013(6):107-113.
- CHEN Lei, WANG Ling-yun, LIU Shu-juan, et al. Effect of calcium nitrate on odor and properties of chemistry in sediment of Shenzhen River [J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2013(6):107-113.
- [10] Ripl W. Biochemical oxidation of polluted lake sediment with nitrate: A new lake restoration method[J]. *Ambio*, 1976, 5(3):132-135.
- [11] Brunet R C, Garcia-Gil L J. Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1996, 21(2):131-138.
- [12] Xu M, Zhang Q, Xia C, et al. Elevated nitrate enriches microbial functional genes for potential bioremediation of complexly contaminated sediments[J]. *Isme Journal*, 2014, 8(9):1932-1944.
- [13] 马娟,彭永臻,王丽,等.温度对反硝化过程的影响以及pH值变化规律[J].中国环境科学,2008,28(11):1004-1008.
- MA Juan, PENG Yong-zhen, WANG Li, et al. Effect of temperature on denitrification and profiles of pH during the process[J]. *China Environmental Science*, 2008, 28(11):1004-1008.
- [14] 徐亚同. pH值、温度对反硝化的影响[J].中国环境科学,1994,14(4):308-313.
- XU Ya-tong. The influence of pH values and temperature on denitrifi-

- cation[J]. *China Environmental Science*, 1994, 14(4):308-313.
- [15] 李艳梅. 硫自养反硝化细菌脱氮除硫性能研究[D]. 大连理工大学, 2012.
- LI Yan-mei. Research of Performances of sulfur autotrophic denitrifying bacteria for nitrate and thiosulfate removal[D]. Dalian University of Technology, 2012.
- [16] Yu G W, Lin P Z, Chong Y X, et al. Release and transformation of nitrogen from sediments during in-situ treatment with calcium nitrate injection for odor control[J]. *Advanced Materials Research*, 2012:518-523, 1396-1401.
- [17] 林玉环, 郭明新, 庄岩. 底泥中酸性挥发硫及同步浸提金属的测定[J]. 环境科学学报, 1997(3):97-102.
- LIN Yu-huan, GUO Ming-xin, ZHUANG Yan. Determination of acid volatile sulfide and simultaneously extracted metals in sediment[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 1997(3):97-102.
- [18] Beristain Cardoso R, Sierra-Alvarez R, Rowlette P, et al. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95(6):1148-1157.
- [19] 宗栋良, 张光明. 硝酸钙在底泥修复中的作用机理及应用现状[J]. 中国农村水利水电, 2006(04):52-54.
- ZONG Dong-liang, ZHANG Guang-ming. The role of calcium nitrate in sediment repair mechanism and application status[J]. *China Rural Water and Hydropower*, 2006(04):52-54.
- [20] Nemati M, Jenneman G E, Voordouw G. Impact of nitrate-mediated microbial control of souring in oil reservoirs on the extent of corrosion[J]. *Biotechnology Progress*, 2001, 17(5):852-859.
- [21] Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, et al. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(11):634-643.
- [22] Fry J C, Webster G, Cragg B A, et al. Analysis of DGGE profiles to explore the relationship between prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2006, 58(1):86-98.
- [23] 倪加加, 余育和, 吴含含, 等. 不同 DGGE 谱带信息提取方法对分析结果的影响[J]. 水生生物学报, 2012(5):1009-1011.
- NI Jia-jia, YU Yu-he, WU Han-han, et al. Effects generated by different band extracting methods in the analysis of DGGE profile[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012(5):1009-1011.
- [24] 孙寓姣, 赵轩, 王蕾, 等. 沔河水系脱氮微生物群落结构研究[J]. 生态环境学报, 2014(9):1451-1456.
- SUN Yu-jiao, ZHAO Xuan, WANG Lei, et al. Study on the microorganisms of nitrogen cycle in Fenghe river[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2014(09):1451-1456.
- [25] 姚丽平. 城市黑臭河道底泥微生物群落结构对人工曝气的响应特征及机理研究[D]. 华东师范大学, 2014.
- YAO Li-ping. Study on mechanism and response of microbial community structure under different artificial aeration in urban black-odorous river sediment[D]. East China Normal University, 2014.
- [26] 郭怡雯, 张明, 陈熙. 硝酸盐(钙)颗粒应用于底泥原位修复的研究[J]. 环境研究与监测, 2009(1):51-55.
- GUO Yi-wen, ZHANG Ming, CHEN Xi. Calcium nitrate(particle) particles in the study of sediment in situ repair[J]. *Environmental Study and Monitoring*, 2009(1):51-55.
- [27] Yang X, Huang S, Wu Q, et al. Nitrate reduction coupled with microbial oxidation of sulfide in river sediment[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2012, 12(9):1435-1444.
- [28] Giblin A E, Tobias C R, Song B, et al. The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium(DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems[J]. *Oceanography*, 2013, 26(3SI):124-131.
- [29] Burgin A J, Hamilton S K. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways[J]. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2007, 5(2):89-96.
- [30] Muehe E M, Gerhardt S, Schink B, et al. Ecophysiology and the energetic benefit of mixotrophic Fe(II) oxidation by various strains of nitrate-reducing bacteria[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2009, 70(3):335-343.
- [31] 薛庆中, 等. DNA 和蛋白质序列数据分析工具(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2012:61.
- XUE qing-zhong, et al. DNA and protein sequence data analysis tool [M]. 3rd edition. Beijing: Science Press, 2012:61.
- [32] Kodama Y, Watanabe K. *Sulfuricurvum kujiense* gen nov, sp nov, a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(6):2297-2300.
- [33] De Jonge M, Teuchies J, Meire P, et al. The impact of increased oxygen conditions on metal-contaminated sediments part I: Effects on redox status, sediment geochemistry and metal bioavailability[J]. *Water Research*, 2012, 46(7):2205-2214.
- [34] Kim M K, Im W, In J, et al. *Thermomonas koreensis* sp nov, a mesophilic bacterium isolated from a ginseng field[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(7):1615-1619.
- [35] Liu Y, Balkwill D L, Aldrich H C, et al. Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen nov, sp nov, and *Syntrophobacter wolnii*[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(2):545-556.
- [36] Sun W, Cupples A M. Diversity of five anaerobic toluene-degrading microbial communities investigated using stable isotope probing[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(4):972-980.