

东湖生物膜的建群过程及其生理特性研究

李双双^{1,2}, 代亮亮³, 郑娇莉⁴, 李敦海²

(1.河北工程大学 能源与环境工程学院, 河北 邯郸 056038;

2.中国科学院水生生物研究所, 中国科学院藻类生物学重点实验室, 湖北 武汉 430072;

3.贵州省生物研究所, 贵州 贵阳 550009;

4.湖北省生物农药工程研究中心, 湖北 武汉 430064)

摘要:为探讨天然水体中生物膜的建群过程及生理特性, 本研究将人工基质大理石投放到东湖沿岸带浅水区域, 分析了生物膜在人工基质上从开始建群直至发育为成熟群落, 并最终衰退的整个过程。结果表明, 建群过程中, 生物膜的生物量(叶绿素 a、蛋白质、干重、无灰干重)、营养物质含量(总氮、总磷)均呈现先上升后下降的趋势, 各指标之间具有显著相关性。低温会减缓生物膜的生长, 弱光会加剧生物膜的衰退, 生物膜的生长发育会影响周围水体氮、磷元素浓度。生物膜中碱性磷酸酶活性与自身生物量呈显著正相关性。水体中氮/磷的比值决定生物膜中氮/磷的比值。刚毛藻属是东湖生物膜的优势物种。对生物膜建群过程及生理特性的研究, 有助于更好地将生物膜应用于污染水体的净化和修复。

关键词:生物膜; 建群过程; 生理特性; 影响因素

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2020)02-0045-08

生物膜在水生态系统中广泛分布, 是水体初级生产力的重要贡献者。生物膜具有极强的污染物吸附、转化能力, 常被应用于污染水体的净化和修复。在处理污水时, 往往使用生长至特定阶段(指数生长期)的生物膜, 以期保持最强的污染物去除能力(Boelee et al., 2014)。因此应用过程中需要对生物膜进行定期收获, 以使大部分的生物膜处于指数生长阶段, 避免其进入衰退期。本研究基于我国目前江河湖泊的水体污染和富营养化客观现状, 为了更加科学有效的应用生物膜法进行污染水体的生态修复, 进而开展生物膜建群过程及生理特性的研究, 具有重要的生态学研究意义与实际应用价值。

建群是指生物在一个新的空间进行定居, 逐步发育为成熟群落的过程(裴国风, 2006)。由于不能准确判断建群开始的时间, 天然基质上生物膜建群过程的研究存在诸多困难。然而, 人工基质却为生物膜建群过程的研究提供了极大的便利。利用人

工基质开展研究的最大优势是明确建群开始的时间, 并且可以提供标准的采样面积和可控制的试验样点(Weitzel, 1979)。生物膜在固体基质上的建群过程大致可以分为5个阶段(Renner & Weibel, 2011; Stoodley et al., 2002), 主要包括: 微生物细胞与固体基质的可逆接触、微生物细胞与固体基质不可逆吸附在一起、生物膜空间结构的初步形成、生物膜逐步成熟、生物膜进入衰退期。生物膜的形成、发育、衰亡过程不断地循环交替重复进行, 即使在同一块固体基质上, 这五个阶段也可以同时进行, 使生物膜可以维持与环境状态相符的厚度和生物活性。生物膜拓殖建群和发育过程受到物理的(光照、温度、水动力学)、化学的(营养物质含量、毒素效应)和生物的(微生物群落结构)等多种因子的影响(Sabater et al., 2002)。光照是生物膜中光营养微生物进行光合作用的必要条件, 温度则会显著影响生物膜微生物群落结构和酶的活性(金梦婷等, 2015), 并进一步影响生物膜对水体营养元素的去除效果。与低水体剪切力相比, 较高的水体剪切力下形成的生物膜表面更加光滑, 结构更加致密, 韧性更强(Liu and Tay, 2001; Stoodley et al., 2001)。水体中营养物质也是影响生物膜的重要因素, 生物膜中的固着生物与水体中浮游植物吸收营养的方式有所不同。浮游植物悬浮在水中, 比生物膜中的微生物更容易接触到水体中的营养, 而生物

收稿日期:2018-10-21

基金项目:邯郸市科学技术研究与发展计划项目(1723209054-2); 国家水污染治理重大专项资助(2017ZX07108-001)。

作者简介:李双双, 1987年生, 女, 博士, 主要研究方向为淡水生物膜参与的污染物迁移转化过程和机理。E-mail:lishuang2010@163.com

通信作者:李敦海。E-mail: lidh@ihb.ac.cn

膜的形状和边界层效应,可能是阻碍其营养吸收的制约因子(Riber & Wetzel, 1987)。水体中营养物质浓度的增加,将会明显增加生物膜的生物量(Hillebrand and Kahlert, 2001)。

东湖(30°33'N, 114°23'E), 位于湖北省武汉市, 水域面积 33 km², 是长江中下游的一个中型浅水湖泊, 也是中国最大的城市内湖。近 50 年来, 由于大量携带氮、磷及有机质的污水排入, 水体遭到严重污染, 湖泊富营养化严重。目前, 东湖已经被人工分为若干个子湖, 各个湖区的环境因子差别明显。本研究在东湖的团结湖湖区, 分析了生物膜在人工基质上开始建群至生长发育为成熟群落, 并最终衰退的整个过程, 旨在掌握生物膜在天然水体中建群规律, 更加真实的反应其建群特点及生理特性, 分析影响生物膜建群的环境因素, 为将生物膜应用于污染水体的净化和修复提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验设计

使用 20 cm×10 cm×1.5 cm 的毛面大理石作为人工基质, 在大理石的一端制作凹槽, 以方便固定尼龙绳, 在尼龙绳的另一端系上 0.2 mL 的离心管作为浮标。

2013 年 2 月, 在中国科学院武汉植物园旁的东湖团结湖区进行生物膜建群试验, 将 40 块大理石人工基质投放沿岸带约 30 cm 深的水体中。每 1-2 周取样一次, 每次随机取 3 块人工基质, 直到生物膜生物量达到最高峰并出现下降趋势为止。试验总共进行了 14 周, 在生物膜建群的第 4、7、9、10、11、12、14 周进行取样。

1.2 水体指标测定

采样时, 使用 YSI Professional Plus 多参数水质分析仪现场测定水温(WT)、pH 和电导率(Cond), 并原位采集投放人工基质区域的上覆水, 运回实验室后进行分析处理。水体总氮(TN)、总磷(TP)、氨盐(NH₄⁺-N)、硝酸盐(NO₃⁻-N)、正磷酸盐(SRP)和叶绿素 a (Chl-a)的测定采用标准方法进行(APHA, 1998)。水体中碱性磷酸酶活性(APA)的测定参考曹秀云(2005)的方法, 利用比色法测定。

1.3 生物膜各生物和理化指标的测定及藻类鉴定

每次采样时, 随机选取 3 块人工基质, 用无菌的牙刷和刀片将生物膜样品刮下并分别装入到采样瓶中, 定容到 250 mL, 将样品置于冰盒中运回

试验室。将样品混匀后, 用于营养物质(N、P)含量, 生物量(Chl-a、DW、蛋白质)和碱性磷酸酶活性的测定。

生物膜的总氮(TN)、干重(DW)、无灰干重(AFDW)测定参考 APHA (1998) 的方法; 总磷(TP)采用钼蓝比色法测定(Murphy and Riley, 1962); Chl-a 测定使用 90% 丙酮溶液抽提(Arar, 1997), 单位为 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 生物膜可溶性蛋白质含量测定使用考马斯亮蓝 G-250 染色法(Bradford, 1976)。

生物膜 APA 测定与水体样品类似, 在加入所有试剂后, 先将样品置于培养箱中, 以 200 r/h 的频率振荡培养 1 h, 然后再置于培养箱中保温 3 h, 再利用比色法测定。

使用光学显微镜对生物膜的藻类群落进行分类行鉴与计数, 鉴定标准参照《中国淡水藻类》(胡鸿钧和魏印心, 2006)。

1.4 数据统计分析

水体和生物膜各指标测定均设置 3 个平行, 数据用平均值±标准偏差表示。采用 Office 2010 Microsoft Excel 和 Origin 软件进行绘图。生物膜样品不同数据指标以及生物膜样品与水体之间的相关性采用 Spearman's rho 相关性分析, 数据统计分析采用 SPSS 13.0 软件。

2 结果与分析

2.1 生物膜建群过程中表观形态变化

试验初期, 由于温度较低(平均水温约 6℃), 生物膜建群过程缓慢, 第 4 周时, 才有较少的生物量, 生物膜呈现棕褐色(图 1)。之后随着温度的

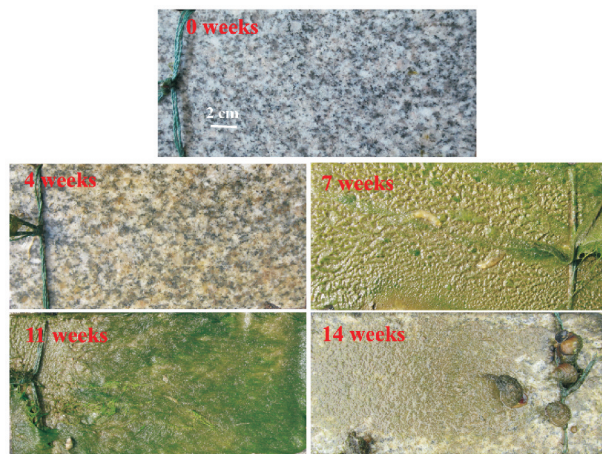


图 1 东湖生物膜建群过程中表观形态变化

Fig.1 Change in biofilm morphology during colonization in East Lake

升高,生物膜生长加快,生物量也逐渐增加。第 7 周时,生物膜生物量增加明显,并且表面开始出现少量刚毛藻。到第 11 周时,长出大量的刚毛藻。第 12 周时,投放人工基质的水域中,湖面覆盖大量浮萍,导致水面下光照强度急剧下降。第 14 周时,浮萍覆盖度明显减少,生物膜大量脱落,生物量明显下降。

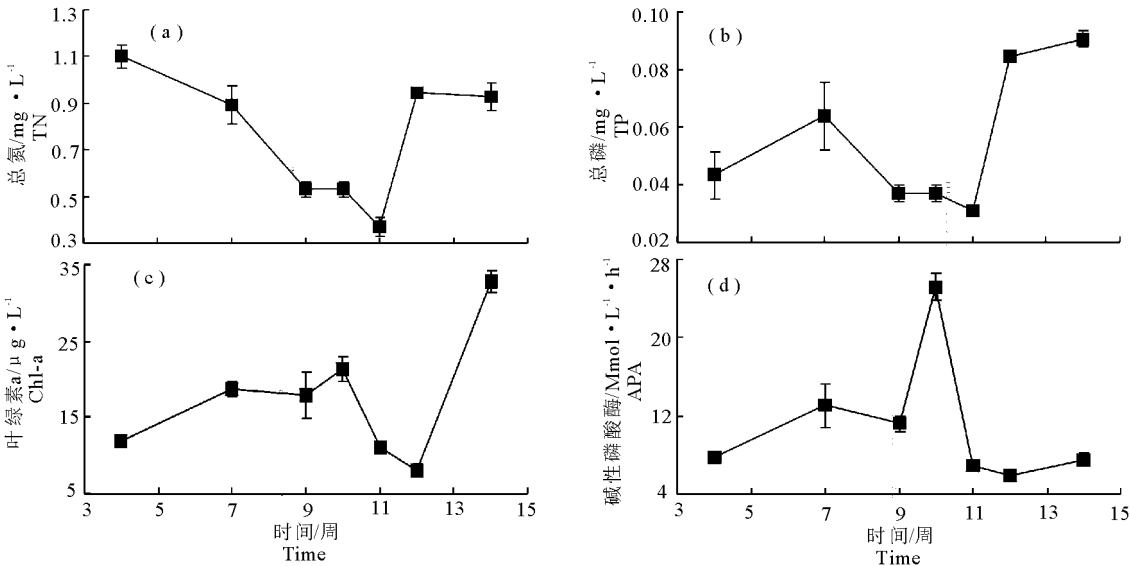
2.2 水体理化因子

本试验始于冬末止于夏初(2-5月),水体温度的变化范围约为 5~24℃(表 1)。由图 2 可以看出,在此过程中,水体中 TN 浓度在试验开展至第 11 周之前均在持续下降,且第 9-11 周期间 TN 值非常低,之后才开始逐渐上升。TP 浓度也是在第 11 周时达到最低值,之后开始上升。Chl-a 浓度在建群第 10 周之前维持在一个相对较高的水平,而

后开始下降,下降发生在水体 TN 和 TP 浓度达到较低值之后,Chl-a 浓度在第 12 周时达到最低值,后又开始上升。水体中 APA 仅在第 10 周时具有较高的值,其余阶段活性均比较低。

表 1 生物膜建群过程中其周围水体的理化参数变化
Tab.1 Changes in the physicochemistry of surrounding water during biofilm colonization.

采样时间/周	WT/℃	pH	EC/ $\mu\text{m} \cdot \text{S}^{-1}$
0	4.6	7.68	306.1
4	11.0	7.79	311.0
7	15.5	7.95	344.8
9	16.2	8.14	350.9
10	21.6	8.19	385.4
11	16.2	7.73	344.3
12	24.1	7.80	397.5
14	23.7	8.03	374.8



(a)总氮;(b)总磷;(c)叶绿素 a;(d)碱性磷酸酶活性

图 2 试验期间水体中环境参数变化

(a)TN, (b)TP, (c)Chl-a, (d)APA

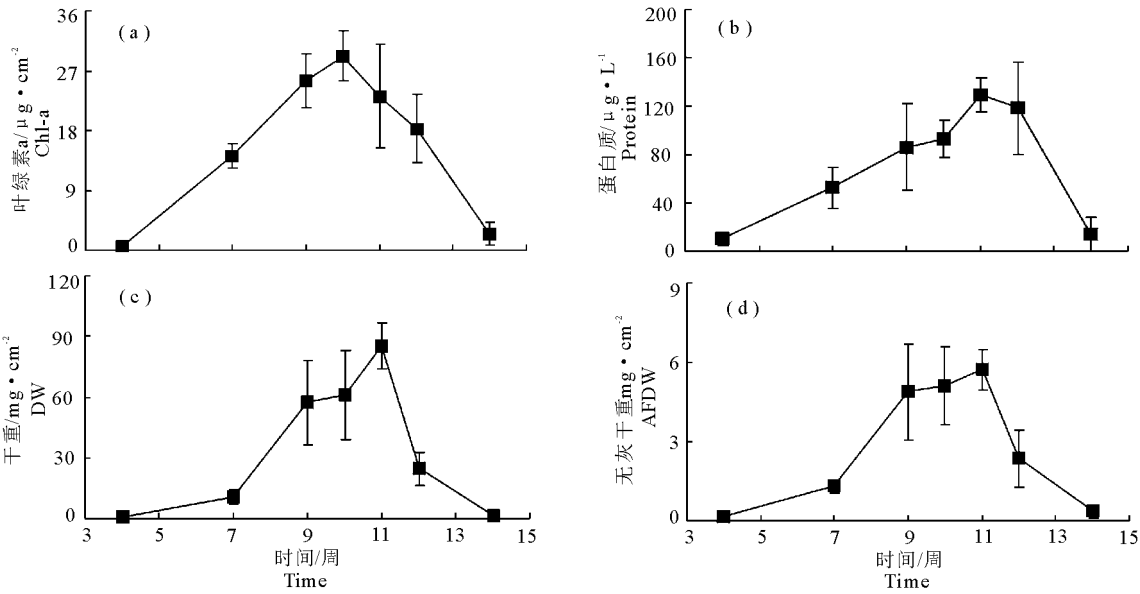
Fig.2 Variation of water chemical parameters during the experimental period

2.3 生物膜特性及藻类群落

生物膜建群过程中,其单位面积上的 Chl-a 含量、蛋白质含量、干重(DW)和无灰干重(AFDW)四项指标的变化趋势一致(图 3),均呈现先上升后下降的趋势,各指标之间具有显著正相关性($P<0.01$)。初始阶段时,随着生物膜的发育,单位面积内 Chl-a、蛋白质、干重、无灰干重含量均不断上升,到第 10 周时,Chl-a 开始下降,到第 11 周时,其余 3 个开始出现下降趋势到 14 周时,生物膜的生物量下降到最低值,这与肉眼观察到的表观现象一致。

生物膜中营养物质 TN、TP 的变化趋势与生物量变化趋势基本一致,二者之间具有显著正相关性($P<0.01$)(图 4),也是呈现先上升后下降的趋势,建群第 11 周时,TN、TP 含量开始急剧下降。

生物膜单位面积 APA 变化也呈现先上升后下降的趋势(图 5a),也是在建群第 10 周时达到最高,其后酶活性开始急剧下降。但是,单位干重中 APA 变化则呈现出相反的趋势(图 5b),初始值较高,之后开始持续下降,并维持在较低的水平,直到第 11 周之后,才出现缓慢的上升趋势。

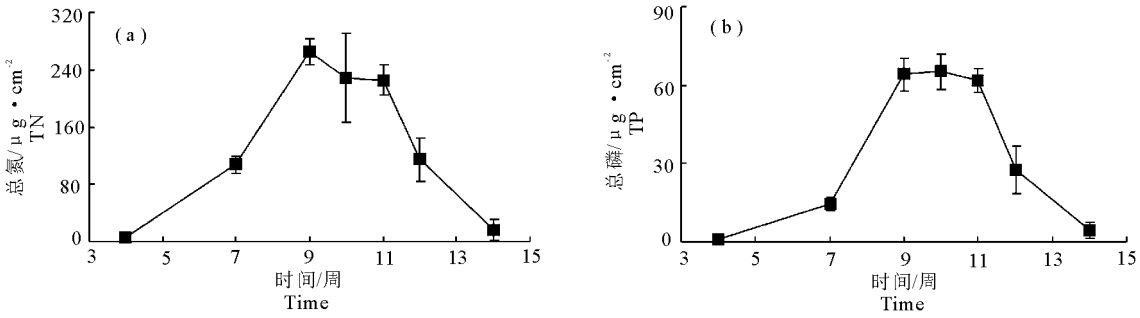


(a)叶绿素 a; (b)蛋白质; (c)干重; (d)无灰干重

图 3 生物膜建群过程中生物量变化

(a) Chl-a, (b) protein, (c) dry weight (DW), (d) ash-free dry weight (AFDW)

Fig.3 Variation of biofilm physicochemical parameters during colonization

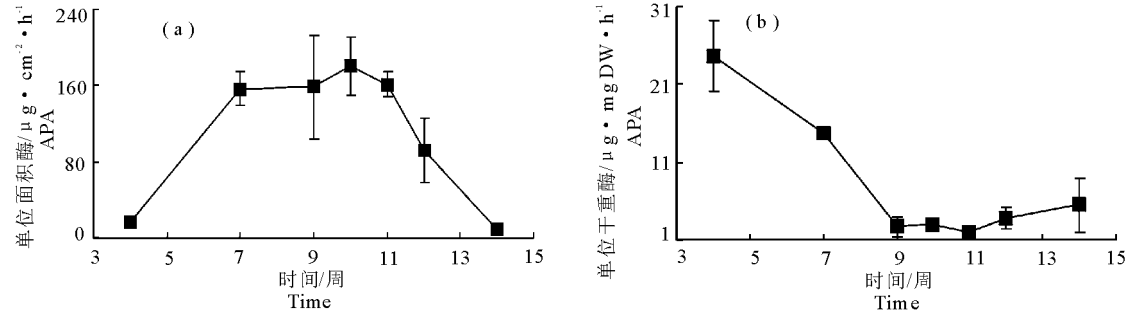


(a)总氮; (b)总磷

图 4 生物膜建群过程中营养物质 TN 和 TP 含量变化

(a) TN, (b) TP

Fig.4 Change in biofilm nutrient content during colonization



(a)单位面积酶活性; (b)单位干重酶活性

图 5 生物膜建群过程中碱性磷酸酶活性变化

(a) APA values normalized to surface area, (b) APA values normalized to dry weight

Fig5 Change in biofilm APA during colonization

生物膜建群过程中,绿藻门的刚毛藻属是生物膜中的绝对优势种,其细胞数量占生物膜细胞总数的85%以上。此外生物膜中还有少量绿藻门的鞘藻、珊藻,硅藻门的变异直链藻、异极藻、桥弯藻等,它们与刚毛藻吸附、交织在一起。

2.4 相关性分析

生物膜的 APA 与 Chl-a 含量之间的相关性见图 6a。Speaman's 相关性分析结果表明, 二者之间具有显著的正相关性 ($R=0.795, P<0.01$), 说明生物量是影响 APA 的一个主要因素。同样, 生物膜 APA 与 TP 含量之间也具有显著的正相关性 ($R=0.730, P<0.01$) (图 6b)。

生物膜中 TN 含量的变化趋势与水体中的正好

相反, 相关性分析也表明二者之间存在显著的负相关关系 ($R=-0.822, P<0.01$)。同样, 生物膜中 TP 含量与水体中 TP 浓度之间也存在显著的负相关关系 ($R=0.600, P<0.01$)。对生物膜中与水体中 TN/TP 的比值之间的关系分析结果表明, 两个比值的变化趋势相似, Speaman's 相关性分析表明二者之间具有显著的正相关关系 ($R=0.782, P=0.038$) (图 7)。

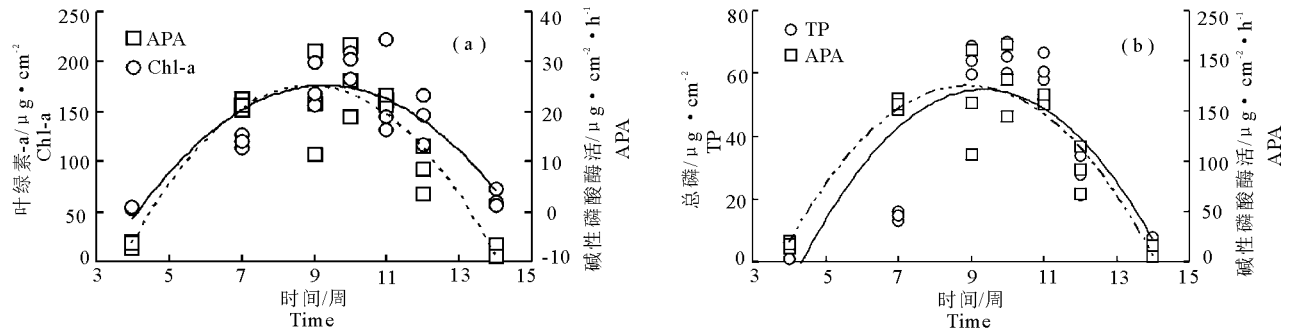


图 6 生物膜 APA 与叶绿素 a、总磷的相关性

Fig.6 Correlation of biofilm APA with biofilm Chl-a and TP

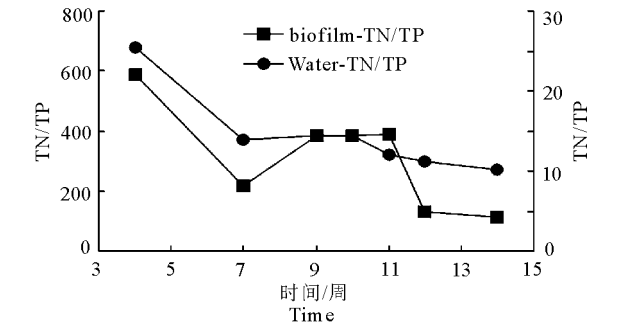


图 7 生物膜中与水体中 TN/TP 的相关性

Fig.7 Correlation of the biofilm TN/TP ratio with the water TN/TP ratio during colonization

3 讨论

3.1 生物膜建群过程的特点

本试验分析了生物膜在人工基质上开始建群到生长发育为成熟群落, 并逐渐衰退的整个过程。生物膜在大理石人工基质上的建群过程符合天然水体中生物膜建群的自然规律。建群初期时(前 4 周), 生物膜生长缓慢, 生物量较低。一方面是因为新拓殖建群的生物膜生长会具有延滞期(刘雨果等, 2013), 并且生物膜微生物与基质的最初接触过程是可逆的, 微生物细胞松散的附着, 随时有可能从固体基质表面再次脱落(Renner and Weibel, 2011; Stoodley et al., 2002);另一方面是因为生物膜建群初期处于冬季, 环境温度非常低, 而水温对生物膜生长具有重要的影响(Sabater et al.,

2002)。第 4-11 周, 生物膜迅速生长, 生物量及营养物质的积累快速增加, 逐渐发育为成熟群落。此阶段中, 刚毛藻属是优势物种, 生物膜微生物细胞分泌胞外聚合物, 将微生物更加牢固的吸附在固体基质表面, 使生物膜与基质的接触变为不可逆过程。随着微生物种类和数量的增加, 生物膜形成复杂的空间结构, 并分布有孔道、毛细孔等结构, 供营养物质运输(Davies et al., 1998)。11 周之后, 生物膜逐渐进入衰退期, 最明显的表现是生物量下降, 并且微生物群落结构也发生了改变, 刚毛藻大量脱落。生物膜的衰退不仅是自身生长发育的必然阶段, 同时也受到外界环境条件, 如光照的影响。湖面大量浮萍出现, 导致水下光强减弱, 加剧了生物膜的衰退进程。

3.2 环境因素对生物膜建群过程的影响

温度对生物膜生长发育具有重要影响。温度的变化会影响生物膜微生物的组成、状态和代谢活性。一定范围内, 温度越高越有利于微生物的生长, 生物膜的生物量就会越大, 当水体温度低于 4℃时, 生物膜的生长将极其缓慢(陈建贞, 2013; 杨帆, 2005)。生物膜建群初期, 水温较低, 在一定程度上抑制了生物膜的快速生长; 建群 4 周之后, 随着温度的升高, 生物膜开始迅速生长。此外, 温度变化还可以通过多种方式影响水体营养物质循环, 高温会增加底泥中 N 和 P 的释放。

光照也是影响生物膜生长发育的重要环境因素

之一。藻类等自养微生物是生物膜的重要组成部分,它们的新陈代谢和生物量的积累都依赖于光照(Hill and Fanta, 2008)。生物膜中的非自养微生物虽然不受光直接作用,但却需要利用自养的藻类在有光条件下产生的胞外有机分泌物进行生存(李红敬等, 2013)。光照对生物膜生物量的影响,甚至超过 N、P 等营养元素(Bowes et al., 2012),无光照条件下,生物膜厚度和生物量的增加都会受到抑制(李红敬等, 2013; Rao et al., 1997)。本试验中,生物膜建群第 12 周时,投放生物膜基质的水体表面覆盖了大量的浮萍,覆盖度高达 90% 以上,严重影响到水下的光照,这可能也是加剧生物膜进入衰退过程的一个因素。Lorenz 等(1991)在伊利湖的研究也发现平均光照强度低于 $28 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{sec})$ 时,会限制刚毛藻的生长。此外,浮萍的遮光作用,以及水体中 N、P 浓度的持续下降,直接影响了浮游植物的生长,水体中浮游植物生物量(Chl-a 浓度)降到了最低值。建群第 14 周时,浮萍覆盖度明显减少,并且水体中总氮 N、P 浓度升高,浮游植物的生物量(Chl-a 浓度)明显升高。

刚毛藻是东湖沿岸带春季时的优势种(裴国凤等, 2007),其生长发育过程可以促进水生态系统营养元素的生物地球化学循环(刘霞等, 2018)。本试验中,建群第 7 周时,人工基质上就开始长出刚毛藻,之后一段时间内(7-11 周)刚毛藻属一直是生物膜中的优势物种,并且周围水体中也分布有大量的刚毛藻。在此过程中,我们发现生物膜的生物量、TN、TP 浓度持续增加,并维持在较高的水平,而周围水体中 TN 和 TP 浓度则不断下降,二者之间具有显著的负相关性。研究表明刚毛藻的存在可以有效去除水体中 N、P 等营养元素,刚毛藻在净化污染水体和防治水体富营养化方面具有潜在的应用前景(况琪军等, 2007; 张新龙等, 2017)。因此,我们推测生物膜和周围水体中的刚毛藻的大量生长是此阶段水体中 TN 和 TP 浓度下降的原因之一。生物膜本身具有的吸附特性以及生物膜中刚毛藻和其他微生物对水体中 N、P 元素的大量吸收,导致了生物膜 N、P 含量的明显提高。此后(12-14 周),生物膜及周围水体中刚毛藻数量大幅减少,生物膜生物量、TN、TP 含量下降,而水体中 TN、TP 浓度则开始上升。这说明不仅生物膜的建群过程受到外界环境条件的影响(金梦婷等, 2015; Sabater et al., 2002),反过来,生物膜也会影响其周边部分环境因素的变化。

尽管水体中的 N、P 浓度与生物膜 N、P 浓度的变化趋势大不相同,呈现负相关关系,但是二者各自的 N/P 值却具有显著的正相关性,这表明天然水体中的 N/P 对生物膜 N/P 有较大的影响。

3.3 生物膜碱性磷酸酶活性变化

一般认为,APA 可以用来表征低营养水体中 P 的限制状态(Healey and Hendzel, 1979; Singh and Tiwari, 2000): 水体 P 浓度越低时,微生物产生的 APA 越高,二者呈负相关关系,但是许多研究与此结论并不一致。本研究中,水体中 APA 并没有完全随 P 浓度的变化而变化。生物膜单位干重的 APA 最能代表单个生物体的酶活性,其变化趋势也没有表现出与水体 P 浓度的负相关关系,这与已有一些研究的观点一致(Jamet et al., 1997; Romani and Sabater, 2001),认为二者之间没有直接的相关关系。但是,生物膜单位面积的 APA,代表的是单位面积内微生物产生的 APA 的总和,其变化趋势与生物膜生物量具有显著的正相关关系,生物量越高,酶活性就越高。Romani and Sabater (2000)的研究也认为以 Chl-a 为代表的生物量是影响生物膜胞外酶活性的关键因子。生物膜单位面积的 APA 与单位面积的 TP 含量也表现出显著的正相关,这可能是因为大部分 P 元素都存在于生物体内或吸附在细胞表面,TP 含量与生物量紧密关联,因此 TP 含量与 APA 才有正相关的关系。

参考文献

- 曹秀云, 2005. 浮游植物胞外磷酸酶在富营养化湖泊磷循环过程中的作用[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所.
- 陈建贞, 2013. 温度、CO₂ 浓度变化对自然生物膜的影响[D]. 南京: 南京林业大学.
- 胡鸿钧, 魏印心, 2006. 中国淡水藻类—系统, 分类与生态[M]. 北京: 科学出版社.
- 况琪军, 凌晓欢, 马沛明, 等, 2007. 着生刚毛藻处理富营养化湖泊水[J]. 武汉大学学报(理学版), 53(02): 213-218.
- 李红敬, 张娜, 李伟, 2013. 环境因子对周丛生物的影响研究进展[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 26(2): 245-249.
- 刘霞, 陈宇伟, 2018. 刚毛藻(Cladophora)生态学研究进展[J]. 湖泊科学, 30(4): 881-896.
- 刘雨果, 潘厚军, 罗皓, 等, 2013. 东江东莞段水体中生物膜生长特性的研究[J]. 实用预防医学, 20(3): 257-259.
- 裴国凤, 2006. 淡水湖泊底栖藻类的生态学研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所.

- 裴国凤, 刘国祥, 胡征宇, 2007. 东湖沿岸带底栖藻类群落的时空变化[J]. 水生生物学报, 31(06): 836–842.
- 金梦婷, 朱亮, 朱彧, 等, 2015. 城市缓流水体生物膜群落与环境因子响应关系[J]. 湖泊科学, 27(1): 58–66.
- 杨帆, 2005. 自然水体生物膜上主要组分生长规律及吸附特性[D]. 长春: 吉林大学.
- 张新龙, 孙力平, 钟远, 2017. 刚毛藻对不同形态磷的去除[J]. 环境工程学报, (05): 2743–2747.
- Arar E J, 1997. Method 446.0: In vitro determination of chlorophylls a, b, c1+ c2 and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry[M]. City: United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Exposure Research Laboratory.
- Apha, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association [M]. American Water Works Association and World Environment Federation. 20th Edition, Washington DC.
- Boelee N C, Janssen M, Temmink H, et al. 2014. The effect of harvesting on biomass production and nutrient removal in phototrophic biofilm reactors for effluent polishing. Journal of applied phycology, 26(3): 1439–1452.
- Bowes M J, Ings N L, McCall S J, et al, 2012. Nutrient and light limitation of periphyton in the River Thames: Implications for catchment management[J]. Science of The Total Environment, 434: 201–212.
- Bradford M M, 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 72(1–2): 248–254.
- Davies D G, Parsek M R, Pearson J P, et al, 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm[J]. Science, 280(5361): 295–298.
- Healey F, Hendzel L, 1979. Indicators of phosphorus and nitrogen deficiency in five algae in culture[J]. Journal of the Fisheries Board of Canada, 36(11): 1364–1369.
- Hill W R, Fanta S E, 2008. Phosphorus and light colimit periphyton growth at subsaturating irradiances [J]. Freshwater Biology, 53(2), 215–225.
- Hillebrand H, Kahlert M, 2001. Effect of grazing and nutrient supply on periphyton biomass and nutrient stoichiometry in habitats of different productivity[J]. Limnology and Oceanography, 46(8): 1881–1898.
- Jamet D, Amblard C, Devaux J, 1997. Seasonal changes in alkaline phosphatase activity of bacteria and microalgae in Lake Pavin (Massif Central, France)[J]. Hydrobiologia, 347: 185–195.
- Liu Y, Tay J H, 2001. Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture[J]. Journal of applied microbiology, 90(3): 337–342.
- Lorenz R C, Monaco M E, Herdendorf C E, 1991. Minimum light requirements for substrate colonization by *Cladophora glomerata*[J]. Journal of Great Lakes Research, 17(4): 536–542.
- Murphy J, Riley J P, 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters [J]. Analytica Chimica Acta, 27: 31–36.
- Rao T S, Rani P G, Venugopalan V P, et al, 1997. Biofilm formation in a freshwater environment under photic and aphotic conditions[J]. Biofouling, 11(4): 265–282.
- Renner L D, Weibel D B, 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation[J]. Mrs Bulletin, 36(5): 347–355.
- Riber H H, Wetzel R G, 1987. Boundary-layer and internal diffusion effects on phosphorus fluxes in lake periphyton [J]. Limnology and Oceanography, 32(6): 1181–1194.
- Romani A M, Sabater S, 2001. Structure and activity of rock and sand biofilms in a Mediterranean stream[J]. Ecology, 82(11): 3232–3245.
- Romani A M, Sabater S, 2000. Variability of heterotrophic activity in Mediterranean stream biofilms: A multivariate analysis of physical-chemical and biological factors [J]. Aquatic Science, 62(3): 205–215.
- Sabater S, Guasch H, Romani A, et al, 2002. The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality[J]. Hydrobiologia, 469(1–3): 149–156.
- Singh S K, Tiwari D N, 2000. Control of alkaline phosphatase activity in *Anabaena oryzae* Fritsch[J]. Journal of Plant Physiology, 157(5): 467–472.
- Stoodley P, Jacobsen A, Dunsmore B, et al. 2001. The influence of fluid shear and $AlCl_3$ on the material properties of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Desulfovibrio* sp. EX265 biofilms[J]. Water Science and Technology, 43(6): 113–120.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, et al, 2002. Biofilms as complex differentiated communities[J]. Annual Review of Microbiology, 56: 187–209.
- Weitzel R, 1979. Periphyton measurements and applications [M]. Methods and measurements of periphyton communities: A Review. City: ASTM International.

Colonization Process and Physiological Characteristics of Biofilms in East Lake, Wuhan

LI Shuang-shuang^{1,2}, DAI Liang-liang³, ZHENG Jiao-li⁴, LI Dun-hai²

(1.College of Energy and Environmental Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038,P.R.China;

2.Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072,P.R.China;

3.Guizhou Institute of Biology, Guiyang 550009,P.R.China;

4.Hubei Biopesticide Engineering Research Center, Wuhan 430064,P.R.China)

Abstract: Biofilms play important roles in nutrient dynamics and energy cycling in aquatic ecosystems, and significantly affect the migration and transformation of pollutants. In order to explore the colonization process and physiological properties of biofilms in a natural water body, the process of biofilm formation on an artificial substratum of marbles was studied, from initial colonization through biofilm maturation and decline. Beginning in February 2013, a 14-week biofilm colonization test was carried out in the shallow, near-shore waters of East Lake. Changes in biofilm morphology, biomass, nutrient content, alkaline phosphatase activity (APA) and dominant species were analyzed during the colonization period. As colonization proceeded, changes in the physicochemical parameters of surrounding lake water were monitored, including water temperature (WT), pH, electrical conductivity (EC), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), chlorophyll a (Chl-a) and APA. Both biomass (Chl-a, protein, dry weight (DW), ash-free dry weight (AFDW)) and nutrient content (TN, TP) of biofilms initially increased and then decreased, and correlations between biomass and nutrient content were significant. The biofilm colonization period on the artificial matrix accorded with the natural process of biofilm formation and, as in nature, the process was significantly affected by environmental conditions. Low temperature decreased the biofilm growth rate, and low light intensity aggravated biofilm decline. Biofilm growth affected concentrations of N and P in the surrounding water, as indicated by the significant negative correlations of biofilm concentration of TN and TP with the corresponding TN and TP concentrations in surrounding water. The APA of biofilms was determined primarily by the biomass of biofilms rather than phosphorus availability in the surrounding water. The N : P ratio in the surrounding water determined the N : P ratio in biofilms. Affected by the surrounding water environment, *Cladophora* was the dominant biofilm species in East Lake. The growth of *Cladophora* in biofilms and the surrounding water effectively removed nitrogen and phosphorus from water. This study on the colonization process and physiological characteristics of biofilms will contribute to improved biofilm applications for purifying and remediating polluted water.

Key words: biofilm; biofilm colonization; biofilm physiology; affecting factors