

# 四川黄龙钙华沉积区附生藻垫生物与水环境因子相关性分析

赵晓夏<sup>1</sup>, 李琼芳<sup>\*1</sup>, 代群威<sup>2</sup>, 孙庚<sup>3</sup>, 张强<sup>4</sup>, 车明轩<sup>1</sup>, 董鹏举<sup>1</sup>, 任亚珍<sup>1</sup>

1 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010

2 西南科技大学环境与资源学院, 四川 绵阳 621010

3 中国-克罗地亚生物多样性和生态系统服务“一带一路”联合实验室 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041

4 中国地质科学院岩溶地质研究所, 广西 桂林 541000

赵晓夏, 李琼芳, 代群威, 孙庚, 张强, 车明轩, 董鹏举, 任亚珍. 四川黄龙钙华沉积区附生藻垫生物与水环境因子相关性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 924-937.

ZHAO Xiaoxia, LI Qiongfang, DAI Qunwei, SUN Geng, ZHANG Qiang, CHE Mingxuan, DONG Pengju, REN Yazhen. Analysis of epiphytic algal mats and the correlation with aquatic environmental factors in Huanglong travertine area, Sichuan[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 924-937.

**摘要:**【背景】近年来, 四川省黄龙风景区钙华沉积地貌上藻垫大面积滋生, 厚度达 3–5 cm, 严重影响了钙华的持续沉积及欣赏价值。【目的】为有效控制藻类过度生长, 并提出相关治理方法措施, 需要对藻垫的结构特征及滋生原因进行深入分析。【方法】利用 PE-250 高通量测序平台对黄龙钙华沉积区典型附生藻垫剖面的不同层次进行真核物种组成分析, 同时通过场发射扫描电子显微镜对其微观形貌进行表征, 并且对藻垫的生长厚度与水环境参数进行了相关性分析。【结果】藻垫内的真核生物有 400 种左右, 优势藻类主要为硅藻门(*Diatomea*)、轮虫动物门(*Rotifera*)和链型植物门(*Streptophyta*), 硅藻门主要为桥弯藻属(*Cymbella*)。非度量多维尺度分析(non-metric multidimensional scaling, NMDS)统计和聚类分析表明, 藻垫的中层和底层真核物种组成具有较高的相似性。场发射扫描电子显微镜的结果显示, 硅藻主要分布在藻垫上层, 中层主要为丝状藻类, 底层为钙华颗粒填充在丝状藻构成的网状结构中。水质参数与藻垫生长的相关性分析表明, 藻垫厚度主要与水体中的总氮(total nitrogen, TN)、总磷(total phosphorous, TP)和溶解氧(dissolved oxygen, DO)呈正相关( $P < 0.05$ )。【结论】黄龙钙华附生藻垫物种组成较为丰富, 但在门水平上较为简单,

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFE0203200); 国家自然科学基金(U21A2016, 41877288); 自然资源部岩溶生态系统与石漠化治理重点实验室开放课题(YRSW2021634)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFE0203200), the National Natural Science Foundation of China (U21A2016, 41877288), and the Open Foundation of Key Laboratory of Karst Ecosystem Treatment of Rocky Deserification (YRSW2021634).

\*Corresponding author. E-mail: liqiongfang1992@126.com

Received: 2022-06-14; Accepted: 2022-08-30; Published online: 2022-11-25

具有物种组成及微观结构上的分层特性, 水体营养化可能是促进藻垫生长的重要原因之一。本研究结果可为黄龙景区藻类滋生治理提供理论基础及依据。

关键词: 黄龙风景区; 钙华; 附生藻垫

## Analysis of epiphytic algal mats and the correlation with aquatic environmental factors in Huanglong travertine area, Sichuan

ZHAO Xiaoxia<sup>1</sup>, LI Qiongfang<sup>\*1</sup>, DAI Qunwei<sup>2</sup>, SUN Geng<sup>3</sup>, ZHANG Qiang<sup>4</sup>, CHE Mingxuan<sup>1</sup>, DONG Pengju<sup>1</sup>, REN Yazhen<sup>1</sup>

1 School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan, China

2 School of Environment and Resource, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan, China

3 China-Croatia "Belt and Road" Joint Laboratory on Biodiversity and Ecosystem Services, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, Sichuan, China

4 Institute of Karst Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Guilin 541000, Guangxi, China

**Abstract: [Background]** In recent years, Huanglong travertine landscape has seen large-scale growth of algal mats with thickness of 3–5 cm, posing a threat to the travertine deposition and affecting the ornamental value of the landscape. **[Objective]** To dissect the structure of the algal mats and the reasons for the large-scale growth, thereby to control the growth of algae, and to propose management methods. **[Methods]** The composition of eukaryotic species in different layers of typical epiphytic algal mats in the Huanglong travertine area was analyzed based on PE-250. Their morphology was characterized via the field emission scanning electron microscope, and the correlation between the thickness of algal mats and water environment parameters was examined. **[Results]** The algal mats were home to about 400 species of eukaryotes, with the dominant algae of *Diatomea* (mainly *Cymbella*), *Rotifera*, and *Streptophyta*. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis and clustering analysis showed that the composition of eukaryotic species in the middle layer of the algal mats was highly similar to that in the lower layer. Diatoms dominated the upper layer, and the middle layer was mainly composed of filamentous algae. For the lower layer, travertine particles were seen in the reticular structure composed of filamentous algae. The thickness of algal mats was mainly in positive correlation with the total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), and dissolved oxygen (DO) in the water ( $P < 0.05$ ). **[Conclusion]** The algal mats boast abundant species in a few phyla. The three layers of the mat are distinct from each other in species composition and microstructure and water eutrophication can explain the rapid growth of algal mats. This study lays a theoretical basis for the management of algal blooms in Huanglong Scenic and Historic Interest Area.

**Keywords:** Huanglong Scenic and Historic Interest Area; travertine; epiphytic algal mats

四川省黄龙风景区以其独特和多样化的钙华景观而享誉世界, 1992 年被联合国教科文组织列为世界自然遗产<sup>[1]</sup>。然而, 近年来黄龙钙华景观正经历着严重的退化, 如钙华的黑化、沙化及藻类暴发式增长等<sup>[2]</sup>。尤其是在钙华壁上形成了由藻类交织而成的藻垫, 极大地影响了钙华的美学价值, 并对钙华世界遗产的保护和当地的旅游经济产生了较严重的影响。

藻垫(alga mat, 又称藻席)广泛存在于各类水体中, 尤其是富营养化的水体, 包括一些极端环境, 如高寒喜马拉雅山冰川环境<sup>[3]</sup>、北冰洋群岛极地环境<sup>[4]</sup>、硫磺泉和盐湖中都发现有藻垫存在<sup>[5-6]</sup>。藻垫主要是由丝状藻类交织而形成的垫状生物聚合体, 这些丝状藻类多数为绿藻和蓝藻<sup>[6]</sup>。除了蓝藻和绿藻, 某些硅藻也能够发育形成藻垫, 底栖类硅藻岩鼻藻(*Didymosphenia geminata*)能够通过细胞外的多糖茎附着在石头等基质上, 并且多糖茎会随着细胞分裂形成分枝, 最终形成了厚达几厘米的致密藻垫<sup>[7]</sup>。藻垫的存在改变了水环境中的生物特征和水体理化性质, 使这些指标表现出十分明显的垂直异质性<sup>[8]</sup>。有研究表明, 在某些极端环境下, 如营养限制、强烈且持续的阳光直射等因素下, 藻垫已经形成了一系列完整的应对机制<sup>[9]</sup>。例如, 在不利生存条件下双星藻(*Zygnema* sp.)会形成不同特化细胞类型如单性孢子; 当双星藻暴露在紫外线下时, 长丝会累积酚类化合物来保护自己免受紫外线辐射损害<sup>[9-10]</sup>。

近年来, 由于人类旅游等活动的影响, 造成了黄龙钙华沉积区水体局部富营养化<sup>[11]</sup>, 有利于藻类的生长, 而过度生长的藻垫会破坏钙华沉积微环境, 影响钙华沉积层的结构致密性, 并降低了钙华景观的美学价值。国内外对藻垫的研究主要集中在富营养化的江、海、湖泊中, 而对黄龙景区这种高寒极端环境下藻垫的研究几乎无报道。因此, 对黄龙世界自然遗产藻垫滋生原因的研究十分必要且迫切, 研究结果将对钙华景观的保育和维护提供直接的理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区域概况

黄龙风景区位于四川省阿坝藏族羌族自治州松潘县内, 是闻名世界的钙华沉积地点, 景区海拔范围为 3 100–3 600 m, 年平均温度为 3–7 °C, 其地质构成主要为钙华、古生代碳酸盐岩、中生代碎屑岩、新生代冲积砾石和冰川冰砾<sup>[1]</sup>。

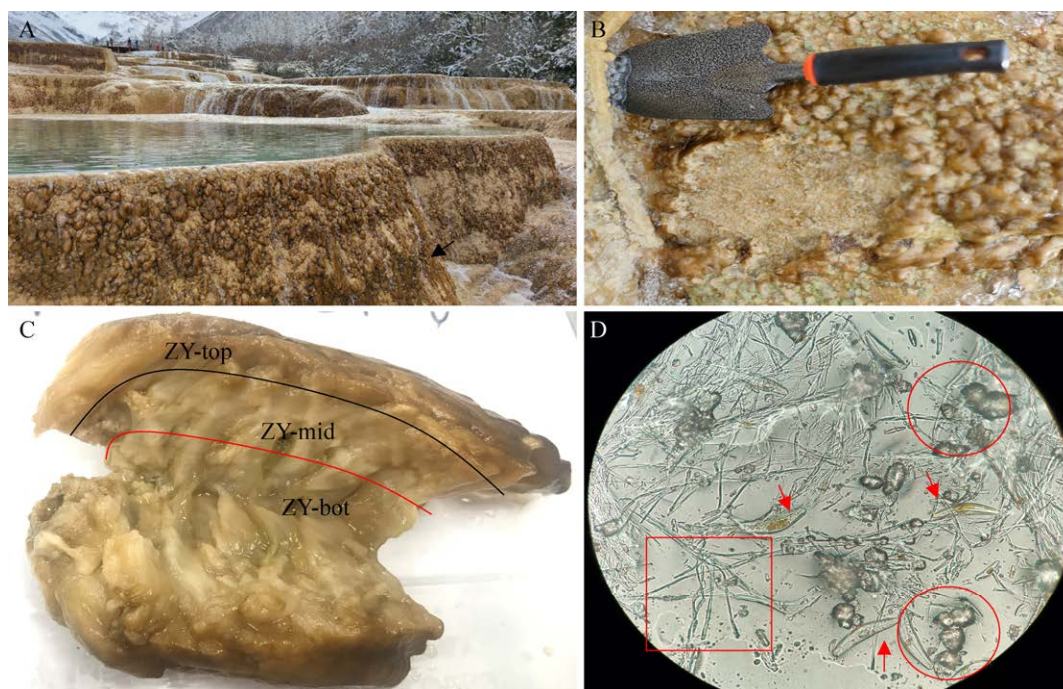
### 1.2 样品采集

采样时间为 2020 年 11 月, 采样点在钙华沉积区争艳彩池边石坝, 坐标为 103°49'52"N、32°44'26"E。藻垫海绵状, 褐色, 厚度约为 3 cm, 彩池水体 pH 8.28, 温度 4.90 °C (其余水质数据见表 1)。用无菌铁铲从争艳彩池边石坝截取一块 10 cm×15 cm 的藻垫, 放入无菌采样袋中, 随后放置于便携式液氮桶内保存, 运回实验室内(图 1)。

表 1 采样点水体理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of water at sampling point

日期 Date	pH	Temperature (°C)	无机离子含量 Inorganic ion content (mg/L)					水质参数 Water quality parameters (mg/L)				
			Ca <sup>2+</sup>	Si <sup>4+</sup>	Al <sup>3+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	DO	TP	TN	TOC	COD
2020-11	8.30	3.10	161.53	2.21	0.27	16.88	323.41	6.55	1.806	2.91	12.65	5.37
2021-06	8.28	4.90	157.30	2.34	0.34	17.52	358.49	5.29	0.015	0.36	14.03	5.21



**图 1 藻垫采样点、分层切片及显微镜观察** A: 冬季附着在争艳彩池边石坝上成片的褐色藻垫. B: 藻垫采集处, 底部为坚硬的钙华. C: 藻垫进行分层切片, 表面呈褐色, 中下层为灰白色(上层为 ZY-top, 中层为 ZY-mid, 下层为 ZY-bot). D: 藻垫中的硅藻(箭头所示)、碳酸钙结晶(圆圈)和丝状生物(方框)

Figure 1 Algal mat sampling points, stratified sections and microscopic observation. A: Patches of brown algae mat attached to the stone dam beside the Zhengyancai pool in winter. B: At the collecting place of algal pad, the bottom is hard travertine. C: The algal pad was sectioned in layers, with brown surface and gray white middle and lower layers (ZY-top for upper layer, ZY-mid for middle layer and ZY-bot for lower layer). D: Diatoms (arrows), calcium carbonate crystals (circles) and filamentous organisms (boxes) in algal mat.

### 1.3 主要试剂和仪器

4% (质量体积分数)的蔗糖配制: 称取 4 g 蔗糖, 溶解到 100 mL 蒸馏水中; 磷酸盐缓冲盐溶液(PBS):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.44 g,  $\text{NaCl}$  8 g,  $\text{KCl}$  0.2 g, 加入双蒸水 1 000 mL, 玻璃棒搅拌至全部溶解后, pH 值调至 7.4, 使用 0.24  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌分装, 4  $^\circ\text{C}$  冰箱储存备用。

光学显微镜、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM), 徕卡微系统上海有限公司; 便携式 pH 计, GeneTest 公司; H1101 溶氧仪, 上海雷磁仪器有限公司; HH-3 COD 分析仪和总磷总氮快速测定仪, HACH 公司; 总有机氮分析仪, Elementar 公司。

### 1.4 方法

水质理化性质分为现场测定和实验室分析两部分。现场采集同一位点的 3 个不同方位的水样混合后, 使用便携式 pH 计和 H1101 溶氧仪现场测定水体的 pH、温度和 DO。使用相同的方法采集 2 瓶(500 mL)水样, 并用 0.45  $\mu\text{m}$  纤维滤膜过滤, 其中一瓶水样滴加 1–2 滴 0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  防止钙离子沉淀, 依据《水和废水监测分析方法》<sup>[12]</sup>现场对  $\text{HCO}_3^-$  含量进行滴定, 将水样带回实验室后对水中的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Si}^{4+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、DO、TP、TN、总有机碳(total organic carbon, TOC)、化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)进行分析测定。

藻垫样品带回实验室后,使用光学显微镜对其进行观察,倍数为400倍。为了进一步确定其微观形貌,取一块约为5 cm×5 cm的藻垫样品,首先使用3%戊二醛固定48 h,其次用PBS洗涤2次,每次5 min,用4% (质量体积分数)的蔗糖溶液洗涤1次,时间为5 min;最后依次用浓度为30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%的乙醇脱水,每个梯度10 min。冷冻干燥后,切取0.5 cm×0.5 cm左右的样品,用导电胶固定在盖玻片上,干燥后真空喷镀,使用场发射扫描电镜观察藻垫微观形貌<sup>[13]</sup>。

再取一部分新鲜藻垫,使用灭菌的手术刀将藻垫拆分为上层、中层和底层(图1C)3层,分别包装,送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行高通量测序,测序平台为NovaSeq-PE250。

### 1.5 统计分析

为了研究样本的物种组成,对所有样本的有效片段以97%的一致性进行OTU聚类,然后对OTU的序列进行物种注释。为了分析不同样本之间共有、特有的OTU,绘制出韦恩图(Venn graph);根据物种注释结果,选取每个样本在门和属水平上最大丰度排名前10的物种,使用R包ggplot2绘制堆积柱状图;使用 $\alpha$ 多样性(alpha diversity)指标用于分析样本内的微生物群落多样性<sup>[14-15]</sup>。使用无度量多维标定法(non-metric multidimensional scaling, NMDS)统计反映样本组间差异<sup>[16]</sup>。为了研究不同样本间的相似性,通过非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA)对样本进行聚类分析,构建样本的聚类树<sup>[17]</sup>。绘图使用R语言(V3.6.2),采用 $t$ 检验进行差异分析,选择0.05水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 水体理化性质

黄龙风景区争艳彩池水体呈弱碱性,取样

时水体温度为4.90℃。水体中的Ca<sup>2+</sup>和HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>离子浓度较高,分别为157.30 mg/L和358.49 mg/L。在反映水质的指标中,争艳彩池中的溶解氧含量为11.80 mg/L,总有机碳和化学需氧量分别为14.03 mg/L和5.21 mg/L,而TP和TN在水中的含量很低,分别为0.015 mg/L和0.36 mg/L。

### 2.2 藻垫真核生物群落结构分析

将测序得到的序列通过与数据库Silva132比对,进行物种注释,并对不同分类层级统计,发现测试样品共有695个OTU,其中,能够注释到数据库的数目为658(94.68%),注释到门水平的比例为90.79%,纲水平的比例为87.77%,目水平的比例为84.75%,科水平的比例为79.14%,属水平的比例为73.81%,种水平的比例为56.98%,进一步分析发现,藻垫样品中的真核生物包括27门84属。选取藻垫不同层在门和属水平上最大丰度排名前10的物种绘制成堆积柱状图,结果如图2所示。在门分类水平上,不同层藻垫的物种组成在门水平上相似,主要优势门为硅藻门(*Diatomea*)、轮虫动物门(*Rotifera*)和链型植物门(*Streptophyta*),还存在少量的隐真菌门(*Cryptomycota*)、线虫动物门(*Nematoda*)、缓步动物门(*Tardigrada*)、环节动物门(*Annelida*)和丝足虫门(*Cercozoa*)。但不同层在门水平上的物种组成丰度有较大差异,其中硅藻门在藻垫中层最高(69.13%),底层次之(61.07%),上层最低(48.39%);轮虫动物和链型植物主要分布在藻垫上层,其丰度分别为39.16%和10.24%。在属分类水平上,能够被注释出来的为桥弯藻属(*Cymbella*)、无柄霉属(*Acaulopage*)、根生壶菌属(*Rhizophyidium*)和异形吸虫属(*Tetracladium*)。其中桥弯藻属为藻垫的优势属,在藻垫上层、中层和底层都有分布,丰度分别为48.36%、69.04%和60.95%。

为对比藻垫不同层的真核物种数量及组成

差异, 对所有样本的有效序列进行分析。结果表明, 中层和下层的 OTU 数目较多, 分别为 398 和 416, 上层最少, 为 315 (图 3A)。通过 Wilcoxon 秩和检验, 发现上层和底层(ZY-top-ZY-bot)之间、上层和底层(ZY-top-ZY-bot)之间的 OTU 数目都具有明显的差异( $P < 0.05$ ), 显著性  $P$  值分别为

0.012 3 和 0.030 0。中层和底层(ZY-mid-ZY-bot)的 OTU 数目差异不显著( $P > 0.05$ ),  $P$  值为 0.506 0 (图 3A)。通过韦恩图揭示藻垫不同层之间的共有 OTU, 结果如图 3B 所示。藻垫上层、中层和底层共有 OTU 为 357, 上层和中层的共有 OTU 为 392, 中层和底层的共有 OTU 为 468,

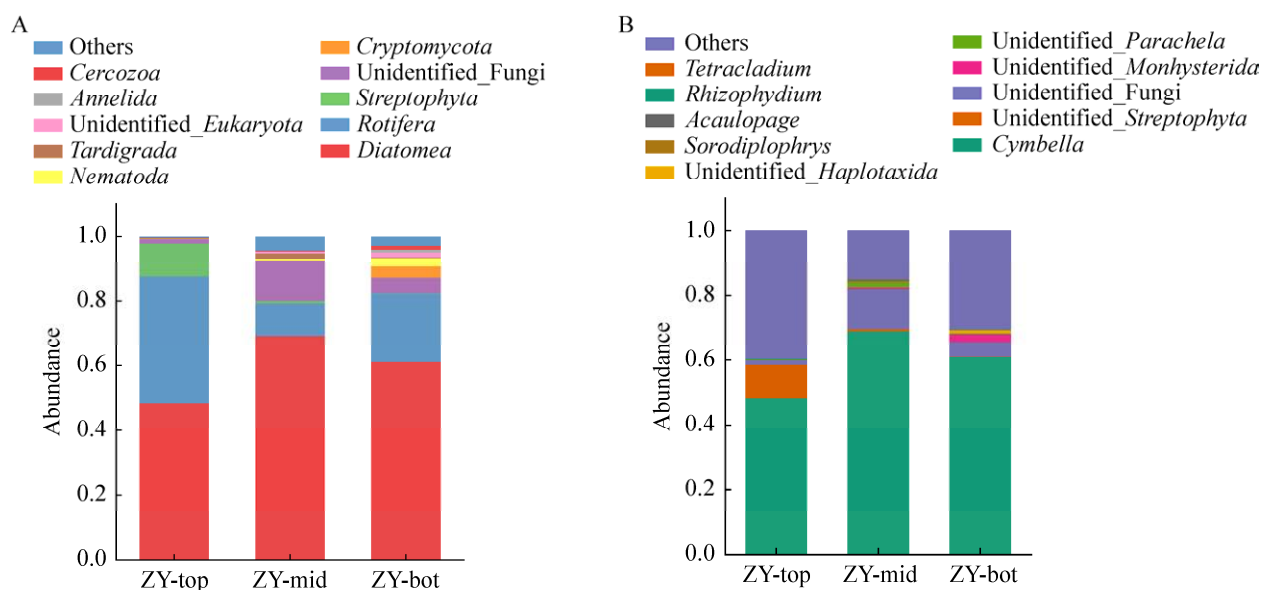


图 2 不同层藻垫在门和属水平上的物种丰富度

Figure 2 Relative abundance of different layers of algal mat at phylum and genus levels.

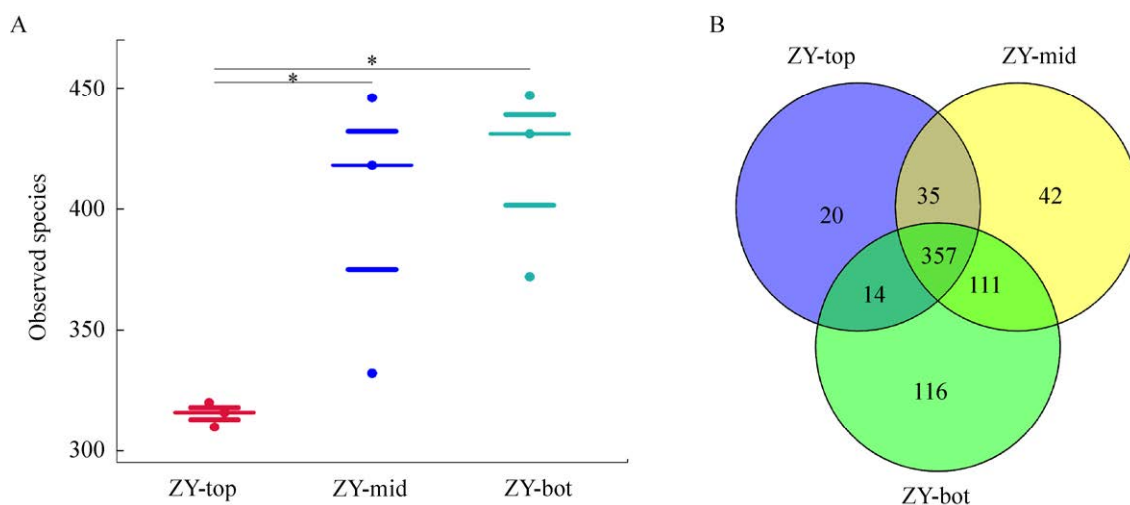


图 3 不同层藻席中物种数蜜蜂群图(A)和韦恩图(B)

Figure 3 Beeswarm (A) and Venn diagram (B) of species in different layers of algae mat. \*:  $P < 0.05$ .

上层和底层的共有 OTU 为 371, 表明中层和底层的物种相似性较高, 而上层和底层差异较大, 该结果与 Wilcoxon 秩和检验结果相互印证。

### 2.3 藻垫真核生物群落 $\alpha$ 多样性分析

$\alpha$  多样性用于分析样本内的微生物群落丰富度和多样性, 其包括多样性指标 Simpson 指数和 Shannon 指数, 均匀度指标 ACE, 丰富度指标 Chao1, 结果见表 2。由表 2 可知, 不同层藻垫的测序深度都达到了 99% 以上, 藻垫底层各项指标数值明显高于中层和上层, 说明底层的物种丰富度和多样性最高。藻垫不同层之间的 Shannon 指数和 Simpson 指数无显著差异, Chao1 指数显示出藻垫底层和中层无显著差异, 而上层与中层、底层之间差异显著, 藻垫的底层与上层间 ACE 指数也表现出显著差异, 表明随着藻垫加厚生长及相应的微环境变化, 从而导致不同层次物种组成和分布出现差异。

### 2.4 藻垫真核生物群落 $\beta$ 多样性分析

$\beta$  多样性是指沿环境梯度、不同生境群落之间物种组成的相异性或物种沿环境梯度的更替速率, 用于研究群落之间物种更替或物种组成的差异。结果如图 4 所示, NMDS 分析发现, 藻垫不同层在物种组成及结构上可以明显区分开来, 上层藻垫 3 个样本聚集在一起, 表明藻垫表层的物种组成高度相似, 而中层重复样出现了一定变化, 底层的差异更为明显。结果

同时说明藻垫表层结构较为稳定, 而随着厚度增加, 不同点的藻垫底层物种组成和结构发生了差异性变化, 原因可能与藻垫内部微环境相关。

为了进一步确定不同层藻垫之间的相似性, 对样本进行聚类分析, 以 Unweighted UniFrac 距离矩阵做 UPGMA 聚类分析, 并将聚类结果与各样本在门水平上的物种相对丰度整合展示, 结果如图 4B 所示。不同层藻垫的聚类分析结果表明, 藻垫中层和底层真核生物群落具有高度的相似性, 而上层藻垫的真核生物组成与中层和底层之间存在一定的差异性。

### 2.5 藻垫形貌结构表征

为了进一步揭示藻垫的微观结构特征, 利用 SEM 对藻垫的上层、中层和底层分别进行观察, 结果如图 5 所示。结果表明藻垫主要由单细胞的硅藻、丝状藻类和钙华颗粒三者交联组成, 但在藻垫的不同层中, 三者分布具有一定的差异。可以明显观察到硅藻较多分布在上层藻垫中; 而在中层藻垫, 主要是具有生长方向性的丝状藻类, 推测其可能是链型植物(图 2A)。同时在中层藻垫中还存在少量的硅藻和钙华颗粒; 藻垫底层夹杂了大量的钙华颗粒, 这些颗粒和丝状藻类紧密缠绕在一起, 可以明显观察到钙华颗粒上有规则的圆柱形孔道, 从孔径大小判断很可能是丝状藻从其上剥落后遗留的痕迹。

表 2 不同层次藻垫真核微生物  $\alpha$  多样性分析

Table 2 Alpha diversity analysis of eukaryotic microbe in algal mat of different layers

Simple	测序深度指数 Sequencing depth index	香农威纳指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index
ZY-top	0.999	2.289a	0.653a	333.897b	337.840b
ZY-mid	0.999	2.830a	0.640a	429.780a	441.473ab
ZY-bot	0.999	3.017a	0.677a	444.527a	450.423a

不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平上差异显著

Different lowercase letters indicate significant differences at the level of  $P < 0.05$ .

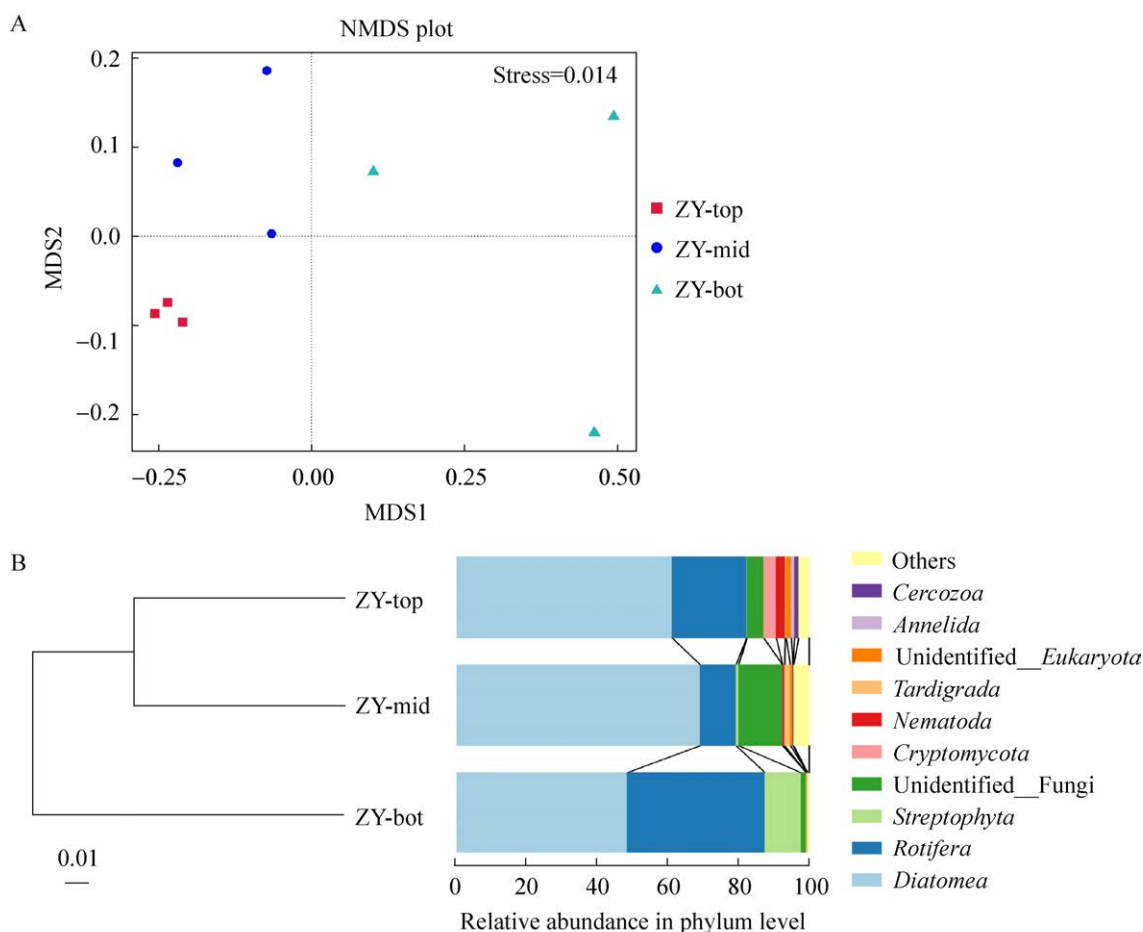


图 4 不同层藻垫 NMDS 分析和 UPGMA 分析 A: 每个点表示一个样品, 点与点之间的距离表示差异程度, 同一个组的样品使用同一种颜色表示; stress 越小( $<0.2$ ), 说明 NMDS 越可以准确反映样品间的差异程度. B: 通过 Unweighted UniFrac 距离矩阵做 UPGMA 聚类分析, 并将聚类结果反应在门水平上

Figure 4 Beeswarm and Wayne diagram of species in different layers of algae mat. A: Each point in figure a represents a sample, the distance between points represents the degree of difference, and the samples of the same group are represented by the same color; The smaller the stress ( $<0.2$ ), the more accurate NMDS can reflect the degree of difference between samples. B: Unweighted UniFrac distance matrix is used for UPGMA clustering analysis, and the clustering results are presented at the phylum level.

## 2.6 水质与藻垫形成之间的相关性

为了探究藻垫形成的可能原因, 对藻垫厚度与水质参数之间做相关性分析, 结果如图 6 所示。争艳彩池边石坝上的藻席在 11 月暴发(图 1A), 厚度约为 3 cm, 而在次年 6 月(图 6A), 藻垫平均厚度仅不到 1 cm 且两者之间差异显著( $P<0.05$ )。相关性分析表明, 水体中 TP、TN 和 DO 与藻垫厚度之间存在极

显著的正相关关系, 相关系数分别为 0.93, 0.91 和 0.87 (图 6B)。对 2016–2020 年 6 月和 11 月水质中 TP、TN 含量的分析表明, 11 月水体中 TP 和 TN 含量皆要高于 6 月, 并且 TP 的含量在 6 月最少, 几乎为 0, 11 月水体中 TN 的含量约为 6 月的 3 倍。由此推断, 水体中氮磷元素含量的增加是藻垫暴发生长的重要原因之一。



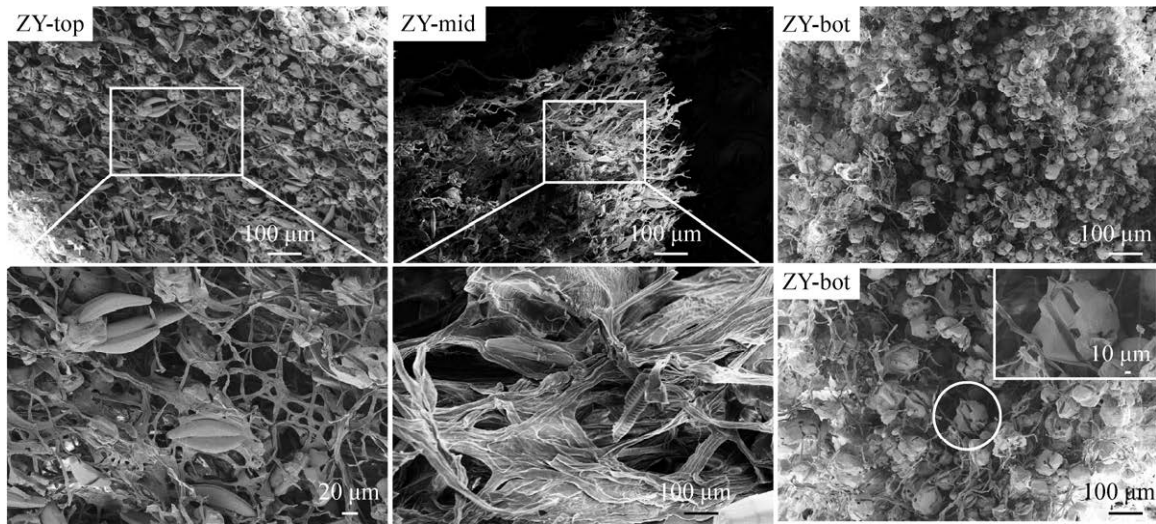


图5 不同层藻垫形貌表征

Figure 5 Morphological characterization of different layers of algae.

### 3 讨论

#### 3.1 藻类垫状结构形成的原因

沼泽、湖泊中的藻垫，主要由 *Spirogyra*、*Zygnema* 和 *Cladophora* 属的绿藻形成，而蓝藻（如 *Tribonema* sp.、*Microcoleus* 等）形成的藻垫多出现在极端环境中，其他单细胞藻类如硅藻被其缠绕在其中，所以藻垫多呈现出绿色<sup>[4,18-20]</sup>，而黄龙钙化沉积区的藻垫表面为黄褐色，内部为灰白色（图 1C），藻垫显现出的颜色可能是由于硅藻含有丰富的黄色脂质体所造成的。由于黄龙环境的特殊性，而硅藻具有广泛的温度适应性（4–35 °C），能够适应紫外线强的环境等特征，因此成为这一地区的优势物种。在贫营养和水流速度快等恶劣环境河流中，对于底栖自养生物来说，生物体必须抵抗或者减少水流阻力，同时获得营养以保证其生长<sup>[21]</sup>。形成矮小、高柔韧性、聚集成低比表面的形态结构，均为了减少水流阻力<sup>[22-23]</sup>。

图 4A 的结果表明，不同的藻垫中层物种组成无明显变化而底层则有较大变化。这可能

与上层藻垫功能有关，链型植物门主要分布在藻垫上层，表明上层的主要作用是维持藻垫的网格结构稳定，在藻垫整体的结构形成过程中起到了重要作用，而其中贡献度最大的是链型植物门形成的网格结构（图 3，图 4）。不同点中层和底层的其他生物在藻垫结构稳定上的作用较小，所以较上层出现了明显差异，有更多的单细胞藻类出现，如硅藻门的桥弯藻属。此外，图 4A 右上角显示了 NMDS 的 stress 值， $stress < 0.05$ ，表明分析结果具有极好的代表性。

许多其他藻类、蓝细菌和苔藓植物也会形成密集的地席，以减少近床层的应力和湍动能，从而降低发生剥离的风险<sup>[24-25]</sup>。同时，垫状结构有助于加强营养物质从水流畅向其表面输送，以及营养物质在垫状表面中的保留和循环时间。Larned 等<sup>[26]</sup>研究发现，岩鼻藻（*Didymosphenia geminata*）形成的垫状结构可以减小形状诱导应力和近床层湍流速度的波动，从而降低滑脱的风险。同时，这种结构也增加了席面上方的湍流剪切应力，这可能会加强水流与藻垫之间的溶质交换。

在水生生态系统的状况评估中，丝状藻类

(形态学分类)的出现与水生态系统的高度营养化有关,同时,丝状藻类也可作为评估环境状况和营养物质及重金属污染的生物指标<sup>[27-28]</sup>。早期的研究表明,丝状藻类形成的垫状结构与人源的正磷酸盐、硝酸盐、氯化物和总溶解固体(total dissolved solids, TDS)相关<sup>[29]</sup>,这与我们

对藻垫和水质分析的结果相似(图 6)。黄龙钙华沉积区争艳彩池边石坝附生藻垫在每年的 11 月暴发,这与水体中氮、磷含量的增加密切相关。在对水生生态系统的研究中, Kleinteich 等<sup>[30]</sup>的研究表明垫状结构可以被认为是淡水富营养化的生物指标之一。

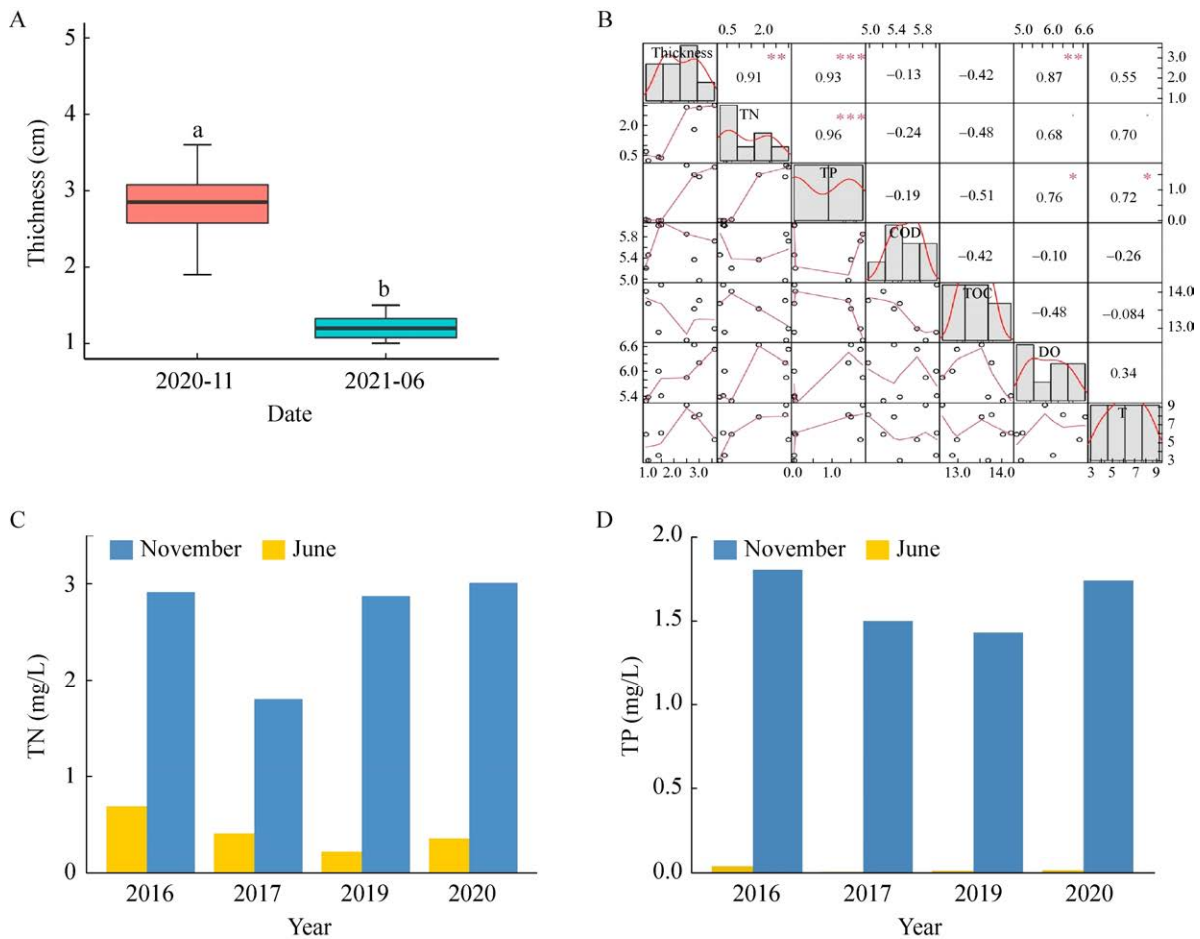


图 6 藻垫厚度与水质变化之间的相关性 A: 6 月和 11 月藻垫厚度的差异情况. B: 藻垫厚度与水质参数之间的相关性分析. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ; 左下角部分表示两两指标间相关性的散点分布图; 对角线处的柱状图对应该指标的正相关分布图. C 图和 D 图分别为 2016–2020 年间每年 6 月和 11 月水体中 TN 和 TP 的变化情况

Figure 6 Correlation between algal mat thickness and water quality change. A: The difference of algal mat thickness between June and November. B: Correlation analysis between algal pad thickness and water quality parameters, the upper right corner indicates significant situation. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; The lower left corner shows the scatter distribution of the correlation between the two indicators; The histogram at the diagonal corresponds to the positive correlation distribution of the index. C, D: The changes of TN and TP in June and November in water each year from 2016 to 2020, respectively.

### 3.2 藻垫对钙华的潜在影响

藻垫对钙华的影响主要分为微观影响和宏观影响。在微观上,一方面藻垫中的藻类能够充当钙华的沉积模板,促进钙华的形成,Shiraishi 等<sup>[31]</sup>的研究发现,钙华包裹在蓝藻外围形成钙化纤维,这些纤维起着过滤器的作用截留碳酸钙颗粒,促进钙华的堆积过程。特别是具有非酸性鞘的丝状蓝藻有助于碳酸钙颗粒的捕获、结合和空隙空间的产生<sup>[32]</sup>。另一方面,对于藻垫本生主要是由光自养生物组成,这些生物在进行生命活动过程中会影响水化学,促进水体中 CO<sub>2</sub> 的溢出,进而促进钙华沉积<sup>[8]</sup>。藻类具有丰富的胞外产物中和代谢产物<sup>[33-34]</sup>,这些生物大分子如多糖,氨基酸和有机酸能够调控碳酸钙颗粒的晶型,从而影响钙华沉积<sup>[35-37]</sup>。在钙华沉积系统中,沉淀物的类型和晶体形态微观形态的变化和这些系统中常驻的微生物群与它们产生的物质有关,不同的方解石中晶体是通过生物膜内纳米晶体的定向附着进化而来的<sup>[38-40]</sup>。我们的研究发现,在黄龙藻垫中并未形成完整的立方体形状方解石型碳酸钙,在藻垫的中层和底层充满了椭球体形状的碳酸钙颗粒(图 5)。Jones 等<sup>[41]</sup>在对冰岛温泉钙华的研究中发现,方解石晶体生长在藻垫的范围内,在藻垫的影响下形成了多种

构象有三角棱柱状、十二面体、板状、菱形和树枝状。我们的研究也发现,在黄龙藻垫中并未形成完整的立方体形状方解石型碳酸钙,在藻垫的中层和底层充满了椭球体形状的碳酸钙颗粒(图 5)。

藻垫的生长在宏观上也对钙华沉积和钙华景观的观赏价值产生了较大的影响。黄龙的枯水季为每年的 11 月到次年的 4 月<sup>[42]</sup>,岩溶水的减少导致钙华的沉积速率变慢,新生钙华无法快速遮盖在藻垫表面,无遮蔽地暴露于空气中的环境条件给藻垫提供了良好的发育时机,同时由于黄龙高的紫外线强度,导致藻垫内部生物发生氧化应激反应<sup>[43]</sup>,在藻垫表面堆积了大量的色素,进一步降低钙华观赏程度(图 1A)。因此,藻垫的存在一方面会大大降低钙华的观赏价值,另一方面藻垫会成为钙华沉积层的组成层,形成了独特的白-褐两种颜色交织的纹层钙华(图 7)。冯晨旭等<sup>[44]</sup>的研究表明,在钙华沉积过程中,微生物会向钙华中输入大量的有机质,从而形成钙华纹层中的褐色纹层,并且白色钙华纹层显示出致密的块状方解石晶体,而褐色的纹层相对较为疏松,结晶度较差。以上结果揭示,过厚藻垫的生成会促进钙华内部微观孔隙的形成,增强钙华的渗水特性,减弱钙华的强度和稳定性<sup>[45]</sup>。

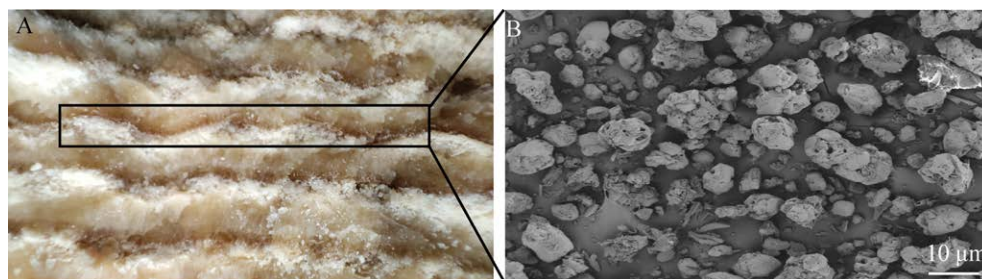


图 7 纹层钙华形貌特征 A: 由白色和褐色结晶交替的纹层钙华. B: 纹层钙华中褐色部分的微观形貌特征

Figure 7 Morphological characteristics of laminar travertine. A: Lamellar travertine with alternating white and brown crystals. B: The micromorphology of the central brown part of lamellar travertine.

## 4 结论

对黄龙钙华沉积区彩池边石坝上采集的藻垫生物组成、结构特征和微观形态的分析表明: (1) 藻垫具有明显的层次结构, 并由丝状藻类构成网格结构, 单细胞藻类和钙华颗粒镶嵌其间, 为藻类和钙华的复合体。(2) 藻垫的暴发与水环境中氮、磷含量和 DO 升高有关, 并随季节的变化而表现为周期性暴发。藻垫存在会影响钙华的可持续性沉积以及钙华景观的观赏价值。因此, 针对黄龙钙华的保育措施, 应着重加强附生藻垫的治理。

## REFERENCES

- [1] ZHANG JL, WANG HJ, LIU ZH, AN DJ, DREYBRODT W. Spatial-temporal variations of travertine deposition rates and their controlling factors in Huanglong Ravine, China—a world's heritage site[J]. *Applied Geochemistry*, 2012, 27: 211-222.
- [2] 张金流, 王海静, 董立, 赵德猛. 世界遗产: 四川黄龙钙华景观退化现象、原因及保护对策分析[J]. *地球学报*, 2012, 33(1): 111-120.  
ZHANG JL, WANG HJ, DONG L, ZHAO DM. An analysis of travertine landscape degradation in Huanglong ravine of Sichuan, a world's heritage site, and its causes and protection countermeasures[J]. *Acta Geoscientica Sinica*, 2012, 33(1): 111-120 (in Chinese).
- [3] TAKEUCHI N, KOHSHIMA S, SEKO K. Structure, formation, and darkening process of albedo-reducing material (cryoconite) on a Himalayan glacier: a granular algal mat growing on the glacier[J]. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 2001, 33(2): 115-122.
- [4] RIPPIN M, PICHRTOVÁ M, ARC E, KRANNER I, BECKER B, HOLZINGER A. Metatranscriptomic and metabolite profiling reveals vertical heterogeneity within a *Zygnema* green algal mat from Svalbard (High Arctic)[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(11): 4283-4299.
- [5] ROMANO I, GIORDANO A, LAMA L, NICOLAUS B, GAMBACORTA A. *Planococcus rifietensis* sp. nov., isolated from algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy)[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(3): 357-366.
- [6] ZEDLER J. Salt marsh algal mat composition: spatial and temporal comparisons[J]. *Bulletin, Southern California Academy of Sciences*, 1982, 81: 41-50.
- [7] BOTHWELL M L, SPAULDING S A, KIRKWOOD A E, JACKSON L J, MCCAULEY E. *Didymosphenia geminata* distribution and bloom formation along the south-eastern slopes of the Canadian Rockies[J]. *On Didymosphenia geminata*, 2005: 22.
- [8] PIKOSZ M, MESSYASZ B, GĄBKA M. Functional structure of algal mat (*Cladophora glomerata*) in a freshwater in western Poland[J]. *Ecological Indicators*, 2017, 74: 1-9.
- [9] STANCHEVA R, SHEATH RG, HALL JD. Systematics of the genus *zygnema* (zygnematophyceae, charophyta) from Californian watersheds1[J]. *Journal of Phycology*, 2012, 48(2): 409-422.
- [10] HOLZINGER A, ALBERT A, AIGNER S, UHL J, SCHMITT-KOPPLIN P, TRUMHOVÁ K, PICHRTOVÁ M. Arctic, antarctic, and temperate green algae *Zygnema* spp. under UV-B stress: vegetative cells perform better than pre-akinetes[J]. *Protoplasma*, 2018, 255(4): 1239-1252.
- [11] 邓远明. 九-黄景区典型人为与自然源碳氮磷贡献与钙华沉积特征研究[D]. 绵阳: 西南科技大学硕士学位论文, 2020.  
DENG YM. Studies on the contributions of carbon, nitrogen and phosphorus from typical anthropogenic and natural sources and travertine deposition in Jiuzhai and Huanglong scenic area[D]. Mianyang: Master's Thesis of Southwest University of Science and Technology, 2020 (in Chinese).
- [12] 魏复盛. 国家环境保护总局, 水和废水监测分析方法编委会编. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.  
WEI FS. Water and Waste Water Monitoring and Analysis Method[M]. 4th ed. Beijing: China Environment Science Press, 2002 (in Chinese).
- [13] 李培京. 扫描电镜生物样品制备与观察[J]. *现代科学仪器*, 2008(3): 124-125.  
LI PJ. Preparation and observation of biological sample by scanning electron microscope[J]. *Modern Scientific Instruments*, 2008(3): 124-125 (in Chinese).
- [14] LI B, ZHANG XX, GUO F, WU WM, ZHANG T. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis[J]. *Water Research*, 2013, 47(13): 4207-4216.
- [15] SHANNON CE, WEAVER W. The Mathematical

- Theory of Communication[M]. Urbana: University of Illinois Press, 1949
- [16] KRUSKAL JB. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method[J]. *Psychometrika*, 1964, 29(2): 115-129.
- [17] 李玉鑑, 徐立业. 不加权算术平均组对方法的改进及应用[J]. *北京工业大学学报*, 2007, 33(12): 1333-1339.  
LI YJ, XU LY. Improvement for unweighted pair group method with arithmetic mean and its application[J]. *Journal of Beijing University of Technology*, 2007, 33(12): 1333-1339 (in Chinese).
- [18] DEY I, BANERJEE S, BOSE R, PAL R. Spatiotemporal variations in the composition of algal mats in wastewater treatment ponds of tannery industry[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2021, 193(6): 359.
- [19] JIMEL M, KVÍDEROVÁ J, ELSTER J. Annual cycle of mat-forming filamentous *Alga Tribonem* a cf. *minus* (Stramenopiles, Xanthophyceae) in hydro-terrestrial habitats in the high arctic revealed by multiparameter fluorescent staining[J]. *Journal of Phycology*, 2021, 57(3): 780-796.
- [20] VADEBONCOEUR Y, MOORE MV, STEWART SD, CHANDRA S, ATKINS KS, BARON JS, BOUMA-GREGSON K, BROTHERS S, FRANCOEUR SN, GENZOLI L, HIGGINS SN, HILT S, KATONA LR, KELLY D, OLEKSY IA, OZERSKY T, POWER ME, ROBERTS D, SMITS AP, TIMOSHKIN OLEG, et al. Blue waters, green bottoms: benthic filamentous algal blooms are an emerging threat to clear lakes worldwide[J]. *BioScience*, 2021, 71(10): 1011-1027.
- [21] BIGGS BJF, NIKORA VI, SNELDER TH. Linking scales of flow variability to lotic ecosystem structure and function[J]. *River Research and Applications*, 2005, 21(2/3): 283-298.
- [22] BIGGS BJF, GORING DG, NIKORA VI. Subsidy and stress responses of stream periphyton to gradients in water velocity as a function of community growth form[J]. *Journal of Phycology*, 1998, 34(4): 598-607.
- [23] PLEW DR, COOPER GG, CALLAGHAN FM. Turbulence-induced forces in a freshwater macrophyte canopy[J]. *Water Resources Research*, 2008, 44(2): 187-197.
- [24] LARNED ST. Nitrogen-versus phosphorus-limited growth and sources of nutrients for coral reef macroalgae[J]. *Marine Biology*, 1998, 132(3): 409-421.
- [25] SUREN AM, SMART GM, SMITH RA, BROWN SLR. Drag coefficients of stream bryophytes: experimental determinations and ecological significance[J]. *Freshwater Biology*, 2000, 45(3): 309-317.
- [26] LARNED ST, PACKMAN AI, PLEW DR, VOPEL K. Interactions between the mat-forming alga *Didymosphenia geminata* and its hydrodynamic environment[J]. *Limnology and Oceanography: Fluids and Environments*, 2011, 1(1): 4-22.
- [27] EVA C, JÁN M. Bioaccumulation of heavy metals by green algae *Cladophora glomerata* in a refinery sewage lagoon[J]. *Croatica Chemica Acta*, 2001, 74(1): 135-145.
- [28] BRICKER SB, LONGSTAFF B, DENNISON W, JONES A, BOICOURT K, WICKS C, WOERNER J. Effects of nutrient enrichment in the nation's estuaries: a decade of change[J]. *Harmful Algae*, 2008, 8(1): 21-32.
- [29] PIKOSZ M, MESSYASZ B. Characteristics of *Cladophora* and coexisting filamentous algae in relation to environmental factors in freshwater ecosystems in Poland[J]. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 2016, 45(2): 202-215.
- [30] KLEINTEICH J, GOLUBIC S, PESSI IS, VELÁZQUEZ D, STORME JY, DARCHAMBEAU F, BORGES AV, COMPÈRE P, RADTKE G, LEE SJ, JAVAUX EJ, WILMOTTE A. Cyanobacterial contribution to travertine deposition in the hoyoux river system, Belgium[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74(1): 33-53.
- [31] SHIRAIISHI F, MORIKAWA A, KUROSHIMA K, AMEKAWA S, YU TL, SHEN CC, KAKIZAKI Y, KANO A, ASADA J, BAHNIUK AM. Genesis and diagenesis of travertine, futamata hot spring, Japan[J]. *Sedimentary Geology*, 2020, 405: 105706.
- [32] VALERIANI F, CROGNALE S, PROTANO C, GIANFRANCESCHI G, ORSINI M, VITALI M, SPICA VR. Metagenomic analysis of bacterial community in a travertine depositing hot spring[J]. *The New Microbiologica*, 2018, 41(2): 126-135.
- [33] SASAKI M, TAKAGI A, SASAKI D, NAKAMURA A, ASAYAMA M. Characteristics and function of an extracellular polysaccharide from a green alga *Parachlorella*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 254: 117252.
- [34] KUMAR D, KVÍDEROVÁ J, KAŠTÁNEK P, LUKAVSKÝ J. The green *Alga Dictyosphaerium chlorelloides* biomass and polysaccharides production determined using cultivation in crossed gradients of temperature and light[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2017, 17(9): 1030-1038.
- [35] 王建萍, 李琼芳, 董发勤, 李骐言, 程祥. 3株常见细菌胞外氨基酸对方解石表面性质的影响[J]. *环境科学*

- 与技术, 2015, 38(2): 1-6.
- WANG JP, LI QF, DONG FQ, LI QY, CHENG X. Surface properties effect of calcite caused by three common bacterial extracellular amino acids[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 38(2): 1-6 (in Chinese).
- [36] 王龙, LATIF K, RIAZ M, 刘晓晔. 微生物碳酸盐岩的成因、分类以及问题与展望: 来自华北地台寒武系微生物碳酸盐岩研究的启示[J]. *地球科学进展*, 2018, 33(10): 1005-1023.
- WANG L, LATIF K, RIAZ M, LIU XY. The genesis, classification, problems and prospects of microbial carbonates: Implications from the Cambrian carbonate of North China platform[J]. *Advances in Earth Science*, 2018, 33(10): 1005-1023 (in Chinese).
- [37] GREER HF, ZHOU WZ, GUO L, CÖLFEN H, DISTASO M. Reversed crystal growth of calcite in naturally occurring travertine crust[J]. *Crystals*, 2017, 7(2): 36.
- [38] JONES B, PENG XT. Hot spring deposits on a cliff face: a case study from Jifei, Yunnan Province, China[J]. *Sedimentary Geology*, 2014, 302: 1-28.
- [39] JONES B, PENG XT. Amorphous calcium carbonate associated with biofilms in hot spring deposits[J]. *Sedimentary Geology*, 2012, 269/270: 58-68.
- [40] JONES B, PENG XT. Mineralogical, crystallographic, and isotopic constraints on the precipitation of aragonite and calcite at Shiqiang and other hot springs in Yunnan Province, China[J]. *Sedimentary Geology*, 2016, 345: 103-125.
- [41] JONES B, RENAUT RW. Modern travertine precipitation at lýsuhóll hot springs, Snæfellnes, Iceland: Implications for calcite crystal growth[J]. *Journal of Sedimentary Research*, 2017, 87(11): 1121-1142.
- [42] 王海静, 刘再华, 曾成, 刘香玲, 孙海龙, 安德军, 唐淑, 张清明. 四川黄龙沟源头黄龙泉水及其下游溪水的水化学变化研究[J]. *地球化学*, 2009, 38(3): 307-314.
- WANG HJ, LIU ZH, ZENG C, LIU XL, SUN HL, AN DJ, TANG S, ZHANG QM. Hydrochemical variations of Huanglong Spring and the stream in Huanglong Ravine, Sichuan Province[J]. *Geochimica*, 2009, 38(3): 307-314 (in Chinese).
- [43] VERGARA JJ, PEREZ-LLORENS JL, PERALTA G, HERNANDEZ I, NIELL FX. Seasonal variation of photosynthetic performance and light attenuation in ulva canopies from palmones river estuary1[J]. *Journal of Phycology*, 1997, 33(5): 773-779.
- [44] 冯晨旭, 董发勤, 代群威, 霍婷婷, Belzile N. 黄龙钙华纹层石特征与成因分析[J]. *矿物学报*, 2019, 39(1): 55-63.
- FENG CX, DONG FQ, DAI QW, HUO TT, BELZILE N. Characteristics and genesis of lamina travertine at Huanglong in Sichuan Province, China[J]. *Acta Mineralogica Sinica*, 2019, 39(1): 55-63 (in Chinese).
- [45] 宋韬, 代群威, 李琼芳, 董发勤, 崔杰, 安德军, 罗尧东, Bruce W. Fouke. 黄龙争艳彩池边石坝藻席钙华特性研究及意义[J]. *中国岩溶*, 2021, 40(1): 105-111.
- SONG T, DAI QW, LI QF, DONG FQ, CUI J, AN DJ, LUO YD, FOUKE BW. Study on characteristics and significances of algal mats travertine in Zhengyancai pool marble dam of Huanglong natural reserve[J]. *Carsologica Sinica*, 2021, 40(1): 105-111 (in Chinese).