

愈创木基丙三醇- β -愈创木基醚对土壤中多环芳烃的归趋的影响及微生物群落效应的研究

尹晗¹, 季聪杰¹, 安雪暉², 孙月³, 陈禹竹^{3*}

(1. 中电建路桥集团有限公司, 北京 100048; 2. 清华大学水利水电工程系, 北京 100084; 3. 中国科学院南京土壤研究所, 江苏南京 210008)

摘要 [目的]通过培养试验研究多环芳烃的归趋及降解过程的微生物共代谢机制。[方法]以木质素的一种单体模型愈创木基丙三醇- β -愈创木基醚(GGE)为基质底物、多环芳烃 BaA 为模式污染物,结合同位素示踪和选择性抑制等技术,设立微宇宙培养试验,采用定量 PCR 技术和扩增子测序等方法来分析 GGE 对 BaA 的归趋的影响及其微生物群落效应。[结果]在培养过程中,加入 GGE 作为底物基质,未能显著提升处理组的矿化率。定量 PCR 和高通量测序结果表明,GGE 的加入改变了土壤微生物群落,且 GGE 对细菌群落的影响大于真菌群落。相比于对照,GGE 处理组增加了细菌群落中 α -变形菌纲、拟杆菌门的相对丰度,而 β -变形菌纲和芽单胞菌门有所减少;增加了真菌群落中子囊菌门的相对丰度,而担子菌门的相对丰度有所减少。LEISe 分析表明,GGE 的添加促进了 Hyphomicrobiaceae、Rhodospirillaceae、Acidobacteriaceae、Burkholderiaceae 等细菌科和子囊菌门等真菌的富集。[结论]GGE 的添加在一定程度上提升了降解过程中真菌的贡献率。底物基质的添加可能会引起多环芳烃的不同微生物降解机制,促进真菌和细菌的协同作用。GGE 的添加还富集了一些 PAHs 潜在降解菌,这些微生物的富集可能会在整体上提升芳香族化合物的代谢功能,增强土壤对多环芳烃类污染物的降解能力。

关键词 多环芳烃;愈创木基丙三醇- β -愈创木基醚;归趋;共代谢;微生物群落效应;同位素示踪技术

中图分类号 X172 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)17-0056-06

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.17.014



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Effects of Guaiacylglycerol- β -guaiacyl Ether on the Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Microbial Community in Soils

YIN Han¹, JI Cong-jie¹, AN Xue-hui² et al (1. PowerChina Roadbridge Group Co., Ltd., Beijing 100048; 2. School of Civil Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract [Objective] The fate of PAHs and the mechanism of microbial cometabolism in degradation process were studied by microcosm experiment. [Method] Using GGE, a monomer model of lignin, as the matrix substrate and polycyclic aromatic hydrocarbon BaA as the model pollutant, combined with techniques such as isotope tracing and selective suppression, a microcosmic culture experiment was established, using quantitative PCR technology and expansion methods such as amplicon sequencing are used to analyze the influence of GGE on the fate of BaA and its microbial community effect. [Result] During the incubation, adding GGE as the substrate matrix failed to significantly increase the mineralization rate of the treatment group. The quantitative PCR and high-throughput sequencing results showed that the addition of GGE changed the soil microbial community, and GGE had a greater impact on the bacterial community than the fungal community. Compared with the control, the GGE treatment increased the relative abundance of Alpha-proteobacteria and Bacteroides in the bacterial community, while Beta-proteobacteria and Bacillus phylum decreased. The relative abundance of ascomycetes had increased in the fungal community, while the basidiomycetes decreased. LEISe analysis showed that the addition of GGE promoted the enrichment of bacteria such as Hyphomicrobiaceae, Rhodospirillaceae, Acidobacteriaceae, Burkholderiaceae, and promoted fungi such as Ascomycota. [Conclusion] The addition of GGE increased the contribution rate of fungi in the degradation process to a certain extent. The addition of substrate matrix may cause different microbial degradation mechanisms of PAHs. It also could promote the synergy of fungi and bacteria. The addition of GGE also enriched some potential PAHs degradation microorganism. The enrichment of these bacterial genera may enhance the overall metabolism of aromatic compounds and enhance the ability of soil to degrade PAHs.

Key words PAHs; GGE; Fate; Cometabolism; Microbial community effect; Isotopic tracer technique

多环芳烃(PAHs)是含有2个或2个以上苯环连接在一起的烃类化合物,随着其环数增加、化学结构的变化和疏水性的增强,其化学稳定性、持久性、抗生物降解能力和毒性都会增强,多环芳烃已成为我国土壤中主要的有机污染物之一,被认定为影响人类健康的主要有机污染物^[1]。一些高分子量有机物不能直接作为大部分微生物的唯一碳源和能源,在有其他化合物作为一级底物提供碳源和能源时,该有机物才能作为二级底物被降解,这种现象称为共代谢作用,这类一级底物被称为共代谢底物^[2]。多环芳烃是一类难降解的有机污染物,分子量高,很少有微生物可以直接利用其作为唯一碳源,因此,高分子量多环芳烃通常以共代谢方式进行

降解,共代谢过程已作为一种生物技术在芳香族化合物生物降解修复中得到广泛应用^[3]。

木质素是一类复杂的有机聚合物,其化学结构与多环芳烃结构类似,已有研究表明,木质素具有刺激微生物降解芳香族污染物的作用^[4]。木质素解聚产生大量双芳基或单芳基降解产物,它们的进一步代谢会诱导微生物产生胞外酶等物质,这些可能会促进多环芳烃降解。木质素促进芳香族污染物的降解过程,可能涉及共代谢机制,但其具体的微生物共代谢机制尚不明确。木质素在土壤中的降解过程涉及多种微生物,降解的不同阶段也具有不同的共代谢效应^[5]。目前解决多环芳烃的污染问题以及深入地研究木质素促进多环芳烃降解的微生物共代谢机制对研究多环芳烃污染土壤的修复具有重要意义。因此,该研究选择了一种木质素模型二聚体化合物愈创木基丙三醇- β -愈创木基醚(guaiacylglyc-

基金项目 国家自然科学基金项目(41977132)。

作者简介 尹晗(1995—),男,山东济南人,助理工程师,从事工程管理工作。*通信作者,硕士,从事环境微生物研究。

收稿日期 2021-08-10

erol-β-guaiacyl ether, GGE) 为刺激底物, 以多环芳烃苯并[a]蒽(Benz(a)anthracene, BaA) 为模式污染物, 同时结合真菌抑制剂放线菌酮(cycloheximide), 设立微宇宙培养试验, 结合¹⁴C 同位素示踪技术、定量 PCR 技术和扩增子测序来分析 GGE 对 BaA 的归趋的影响及其微生物群落效应。

1 材料与与方法

1.1 土壤样品 土壤采集于南京市郊农田, 自然风干, 研磨后过 2 mm 网筛, 保存于 4 °C, 用于后续培养试验。土壤理化性质: pH 6.84、总碳 12.7 g/kg、总氮 1.3 g/kg、全磷 0.57 g/kg、全钾 19.3 g/kg、田间持水量 33.3%。

1.2 主要化学试剂与仪器 [^{7,12-¹⁴C}] 苯并[a]蒽(¹⁴C-BaA, 10 mCi/mmol, 99% 纯度), 美国 Radiolabeled Chemicals 公司; 苯并[a]蒽(¹²C-BaA, 98% 纯度), 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 真菌抑制剂放线菌酮, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。液体闪烁分析仪(LSC), 美国贝克曼库尔特有限公司; 生物氧化燃烧仪(OX-500), 德国 Zinsser Analytic 公司。

1.3 试验设计 设立 2 组微宇宙培养试验, 2 组处理相同, 微宇宙培养试验在 60 mL 矿化管中进行, 每管加入 5.0 g 土壤样品, 土壤持水量为 60%, 处理组添加 GGE 的含量为 500 μg/g, 真菌抑制剂放线菌酮的含量为 1 mg/g。

第一组通过同位素示踪技术, 检测 GGE 处理组和对照组在有无放线菌酮存在的情况下¹⁴C-BaA 的环境归趋, 每个处理设 3 个平行。添加¹⁴C 标记的 BaA 至土壤样品中^[6], 使其终浓度为 50 μg/g, 放射性为 2.0×10⁵ DPM。在矿化管内放置装有 1 mL 1 mol/L NaOH 溶液的小瓶子, 收集释放的¹⁴CO₂, 培养时间为 70 d, 每 7 d 取样测定培养过程中释放的¹⁴CO₂ 量, 利用液体闪烁分析仪(LSC) 测定 NaOH 溶液吸收的¹⁴CO₂ 含量^[7]。

培养结束后, 将矿化管内的土壤样品风干, 过 2 mm 网筛, 取 2.0 g 用二氯甲烷在 50 °C 下索氏提取 24 h, 将萃取物旋蒸后用环己烷溶解, 经 LSC 测定可提取态(DCM) 含量。不可提取态(NER) 进一步分离为富里酸(FA)、腐殖酸(HA) 和胡敏素(HU) 结合态。参照 Shan 等^[8-9] 的方法, 将 DCM 提取后的土样风干, 用 0.1 mol/L 无氧 NaOH 在 250 r/min 下振荡提取 24 h, 12 000 r/min 离心 30 min, 所得沉淀为胡敏素, 上清液为富里酸和腐殖酸的混合溶液, 在上清液中加入 6 mol/L HCl 调节混合溶液 pH 至 1, 4 °C 下沉淀 24 h, 7 000 r/min 离心 30 min, 上清液为 FA 组分, 利用 LSC 检测 FA 和 HA 组分的放射性, 得到 FA、HA 结合态的含量。将胡敏素沉淀冷冻干燥后, 用生物氧化燃烧仪在 900 °C 下完全氧化 4 min, 收集氧化后产生的¹⁴C 标记的 CO₂, 并用 LSC 检测 HU 组分放射性, 得到 HU 结合态的含量。

第二组添加未标记的¹²C-BaA 至土壤样品中, 使其终浓度为 50 μg/g, 用于检测培养过程中的微生物变化, 每个处理 6 个重复, 分别在培养中期(第 42 天) 和培养结束(第 70 天) 时, 各取 3 支破坏性取样。土壤样品置于 -20 °C 保存, 用于后续微生物分析。使用 FastDNA SPIN Kit for Soils 土壤 DNA

提取试剂盒, 参照试剂盒说明书操作, 提取土壤样品中的 DNA。测定 DNA 浓度后, 置于 -20 °C 保存。

采用定量 PCR 的方法, 测定各样品中细菌 16S rRNA 基因、18S rRNA 基因、甲醇脱氢酶 *mxoF/xoxF* 基因和革兰氏阳性菌多环芳烃双加氧酶 GP PAH-RHDα 基因表达丰度。土壤样品总 DNA 稀释至 10⁻¹ 浓度, 作为定量模板, 定量 PCR 反应体系 (20 μL): Top Green qPCR SuperMix (SYBR Green) 10.0 μL, 正、反向引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, ddH₂O 7.2 μL, 模板 DNA 2.0 μL。采用细菌 16S rRNA 基因序列 PCR 通用引物 Eub338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 Eub518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), 扩增目的片段^[10]; 定量 PCR 扩增程序: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。采用真菌 18S rRNA 基因序列 PCR 通用引物 nu-SSU-0817 (5'-TTAGCAT-GGAATAATRRAATAGGA-3') 和 nu-SSU-1536 (5'-ATTG-CAATGCYCTATCCCCA-3'), 扩增目的片段^[11]; 定量 PCR 扩增程序: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。采用 *mxoF/xoxF* 基因序列 PCR 通用引物 mdh1 (5'-GCGGIWSCAICTGGGGYT-3')、mdh2 (5'-GCG-GIWSGAICTGGGGYT-3') 和 mdhR (5'-GAASGGYTC-SYARTCCATGCA-3'), 扩增目的片段^[12]; 定量 PCR 扩增程序: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min, 40 个循环; 72 °C 10 min。采用 GP PAH-RHDα 基因序列 PCR 通用引物 GP RHDα F (5'-CGGCGCCGACAAYTTYGTNGG-3') 和 GP RHDα R (5'-GGGGAACACGGTGCCRTGDATRAA-3'), 扩增目的片段^[13]; 定量 PCR 扩增程序: 95 °C 3 min; 95 °C 20 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 10 min。

利用 Illumina Miseq 高通量测序技术, 对细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 基因测序, 分析土壤细菌和真菌群落组成。测序工作送至上海美吉生物医药科技有限公司完成。所得原始数据使用 QIIME (V1.9.1) 和 USEARCH (V8.1.1861) 流程进行分析, 序列经拼接、过滤和质控后, 在 97% 相似性水平划分操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU), 细菌序列通过与 SILVA 数据库 (<https://www.arb-silva.de>) 比对确定系统学分类, 真菌序列通过与 Unite 数据库 (<http://unite.ut.ee/>) 比对确定系统学分类, 得到每个样品的 OTUs 和物种注释的基本分析结果, 同时对物种注释在各个分类水平上进行组成结构的统计分析。再对 OTUs 进行丰度、多样性指数等分析。

1.3 数据分析 利用 SPSS 20.0、Excel 2019 和 Graphpad Prism 8 对数据进行整理分析与作图, 利用 Galaxy 平台 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) 进行 LefSe 分析。

2 结果与分析

2.1 BaA 在土壤中的归趋 通过同位素示踪技术, 测定¹⁴C-BaA 在土壤中的归趋情况, 如图 1 所示。在培养的前期阶段, 矿化率呈现 CK>GGE>CK-cycloheximide>GGE-cycloheximide 的趋势, 在 70 d 的培养结束后, GGE 的矿化率最高, 达到 4.61%, CK 的矿化率为 4.43%, 略低于 GGE。除矿化部分

外,大部分的 ^{14}C -BaA 可被二氯甲烷提取,CK 组和 GGE 处理组中的可提取态 ^{14}C -BaA 分别为 71.17% 和 70.23%。不可提取态进一步细分为富里酸(FA)、腐殖酸(HA)和胡敏素(HU)结合态,在 CK 组中,与富里酸、腐殖酸和胡敏素结合的比例分别为 3.37%、6.55% 和 14.10%,在 GGE 处理组中,与富里酸、腐殖酸和胡敏素结合的比例分别为 3.13%、6.78% 和 14.75%。

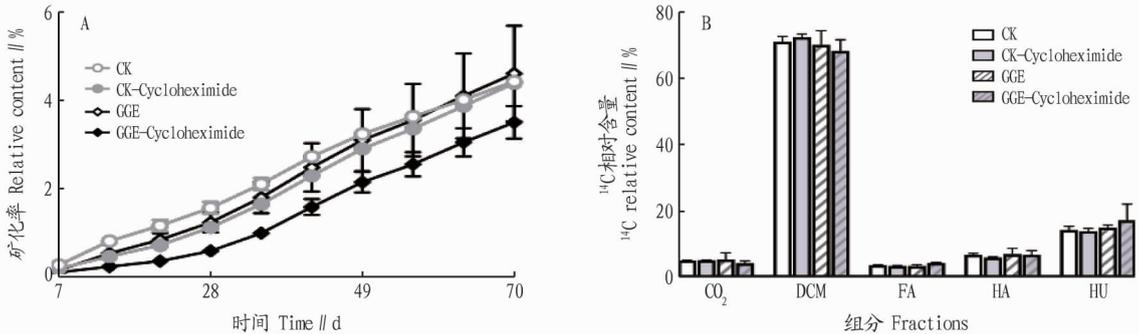


图1 培养过程中的 $^{14}\text{CO}_2$ 矿化情况(A)以及培养结束时 ^{14}C -BaA 的归趋(B)

Fig. 1 The mineralization of $^{14}\text{CO}_2$ during the incubation(A) and the distribution of ^{14}C -BaA at the end of incubation (B)

2.2 基因表达丰度 采用定量 PCR 的方法,检测了土壤中细菌 16S rRNA 基因、18S rRNA 基因和革兰氏阳性细菌多环芳烃双加氧酶 GP PAH-RHD α 基因,结果如图 2 所示。不添加放线菌酮的情况下,细菌 16S rRNA 基因中,在 CK 组和 GGE 处理组的培养中期的基因拷贝数分别为 1.02×10^9 和 8.89×10^8 copies/g,培养结束后的基因拷贝数分别为 3.57×10^8 和 3.92×10^8 copies/g,CK 和 GGE 处理之间未见显著差异;真菌 18S rRNA 基因中,GGE 处理组相对于 CK 组提高了基因拷贝数,从 1.92×10^7 copies/g 提高至 2.70×10^7 copies/g,培养结束后,拷贝数均明显下降,且处理间相差不大;与 CK 组相比,GGE 处理组也提高了甲醇脱氢酶 *mxoF/xoxF* 的基因拷贝数,在培养期间从 1.09×10^7 copies/g 提高至 1.79×10^7 copies/g,培养结束后整体上拷贝数减少;在 GP PAH-RHD α 基因中,随着培养的进行,CK 组的基因拷贝数逐渐减少,从 1.78×10^6 copies/g 减少至 1.17×10^6 copies/g,而 GGE 处理组的拷贝数逐渐增加,从 1.33×10^6 copies/g 增加至 1.75×10^6 copies/g。放线菌酮添加的情况下,整体上并没有明显减少土壤中细菌 16S rRNA 基因、真菌 18S rRNA 基因和 *mxoF/xoxF* 基因的数量,但在 GP PAH-RHD α 基因中,放线菌酮的添加显著抑制了 GGE 处理组中基因丰度。

2.3 微生物群落 对细菌 16S rRNA 基因的高通量测序结果进行分析,一共获得了 55 万条序列,经质量控制,单个样品的序列数在 15 978~34 374,在 97% 序列相似性水平上获得 24 750 个 OTU。对真菌 ITS 基因的高通量测序结果进行分析,一共获得了 78 万条序列,经质量控制,单个样品的序列数在 24 393~71 441,在 97% 序列相似性水平上获得 1 579 个 OTU。

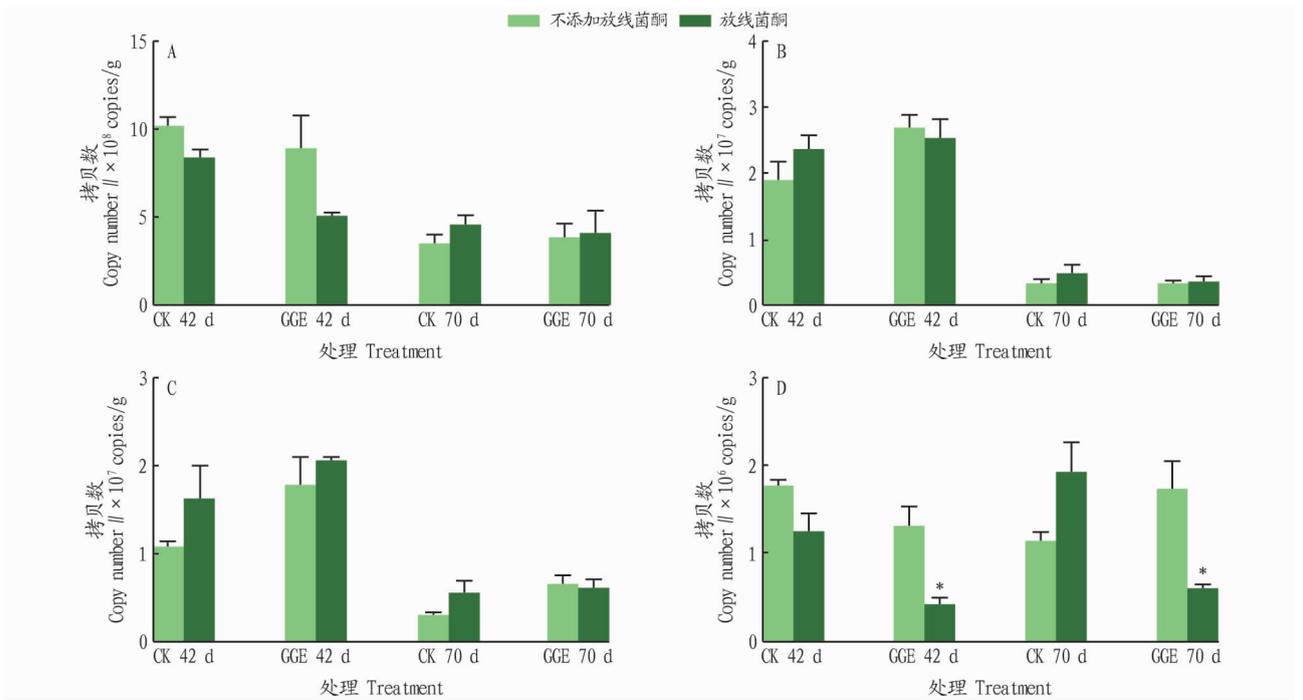
对相对丰度 >1% 的细菌门/纲类进行分析,结果发现(图 3A),在第 42 天,CK 组中主要为 α -变形菌纲(Alpha-proteobacteria)、 β -变形菌纲(Beta-proteobacteria)、酸杆菌门

在 CK 组和 GGE 处理组中,真菌抑制剂放线菌酮(cycloheximide)的添加对 BaA 在土壤中的归趋有不同程度的影响。CK 组受到放线菌酮的影响较小,矿化基本未受影响,除腐殖酸结合态减少了 13.13%,其他组分变化很小。在 GGE 处理组中,加入放线菌酮后,矿化率减少,仅为 3.50%,矿化率降低了 22.35%,富里酸结合态增加了 29.71%,胡敏素结合态增加了 15.39%。

(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和 γ -变形菌纲(Gamma-proteobacteria),占比分别为 14.47%、17.07%、21.47%、12.14%、5.93% 和 4.97%。GGE 处理组增加了 α -变形菌门、拟杆菌门(Bacteroidetes)的相对丰度,而 β -变形菌纲和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)则有所减少。各类细菌门/纲的相对丰度在培养时间上也存在着一定的变化,第 70 天与第 42 天相比,CK 和 GGE 处理下酸杆菌门和 α -变形菌纲的相对丰度明显增加, β -变形菌纲、放线菌门和厚壁菌门的比例均有减少。

对真菌在门水平上进行分析,结果发现(图 3B),在第 42 天时,CK 组中主要真菌为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和壶菌门(Chytridiomycota),占比分别为 63.67%、23.60% 和 2.28%,GGE 处理组与 CK 组相比,子囊菌门的相对丰度增加至 73.85%,担子菌门的相对丰度减少,为 11.58%。各类真菌的相对丰度在培养时间上也存在着一定的变化,到第 70 天时,CK 和 GGE 处理中的子囊菌门的相对丰度有所减少,CK 组与第 42 天相比,被孢霉门(Mortierellomycota)明显增加,GGE 处理组中被孢霉门和球囊菌门(Glomeromycota)的相对丰度明显增加。

在 OUT 水平上,对细菌和真菌的群落进行非度量多维尺度(NMDS)分析(基于 Bray-Curtis 距离),如图 4 所示。在细菌群落中,第 42 天和第 70 天的样品存在很明显的分离,表明样品在培养期间存在时间上的演替,GGE 处理组的大部分样品能相对集中在一起,且与 CK 组之间呈现出一定的分离,表明 GGE 的添加对细菌群落组成产生了一定的影响。在真菌群落中,GGE 处理对真菌群落影响较小,2 组样品未发生分别聚类,与 CK 组的群落结构相似,在不同的培养时间分布上,CK 组未出现明显分离,而 GGE 处理组呈现了一定程度的分离。



注：* 表示在 0.05 水平上放线菌酮处理间差异显著

Note: * indicates significant difference between cycloheximide treatments at the 0.05 level

图 2 细菌 (A)、真菌 (B)、甲醇脱氢酶 *mxoF/soxF* (C) 和 GP PAH-RHDα (D) 基因的定量 PCR 结果

Fig. 2 Quantitative PCR results of bacteria (A), fungi (B), methanol dehydrogenase *mxoF/soxF* (C) and GP PAH-RHDα genes (D)

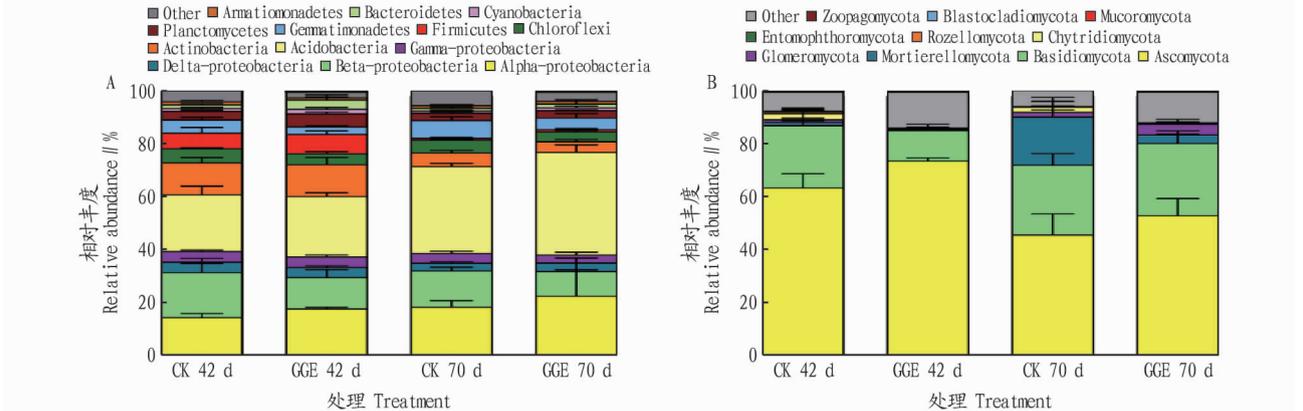


图 3 细菌 (A) 和真菌 (B) 在门/纲水平上的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of bacteria (A) and fungi (B) at phylum or class level

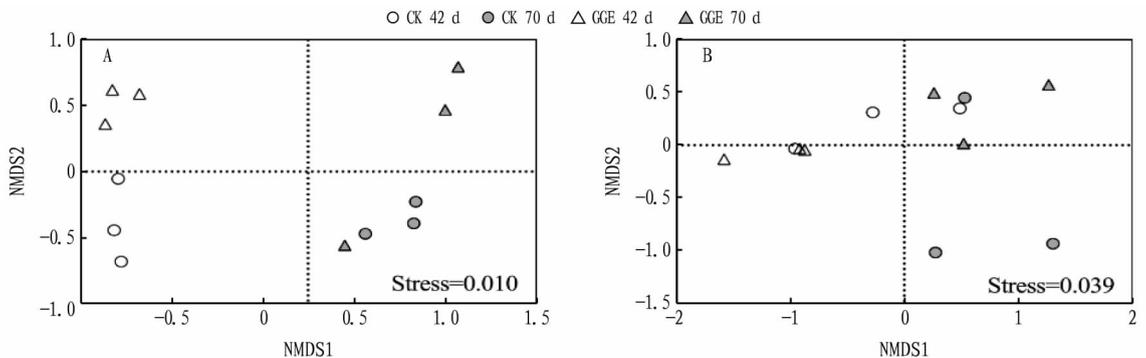


图 4 细菌 (A) 和真菌 (B) 的非度量多维尺度 (NMDS) 分析

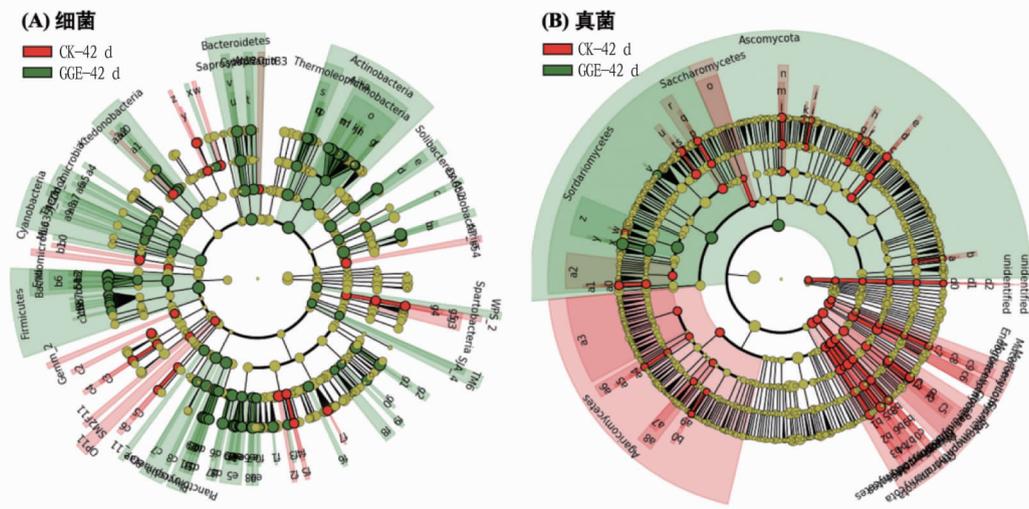
Fig. 4 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis of bacteria (A) and fungi (B)

将 GGE 处理组与 CK 组进行 LEISe 分析 ($P < 0.05$), LDA 默认大于 2。如图 5 所示,在细菌方面,GGE 处理组与 CK 组

相比,其显著富集的结点达到 142 个,包含 39 个变形菌门、32 个放线菌门、17 个浮霉菌门、15 个厚壁菌门、11 个酸杆菌门

等。其中相对丰度大于 1% 的科主要包括 Koribacteraceae、Bacillaceae、Rhodospirillaceae、Gaiellaceae、Hyphomicrobiaceae、Solibacteraceae、Sinobacteraceae、Oxalobacteraceae、Streptomyctaceae、Acidobacteriaceae、Burkholderiaceae 等,在 GGE 处理组

中占比分别为 5.36%、4.83%、4.71%、4.56%、3.14%、3.02%、2.49%、2.49%、1.70%、1.60%、1.44%、1.34%。在真菌方面,GGE 处理组与 CK 组相比,其显著结点有 6 个,均属于子囊菌门粪壳菌纲(Sordariomycetes)。



注:图中结点从内圈至外圈代表各个分类水平(界、门、纲、目、科、属),不同颜色代表在各自处理中显著富集的菌属

Note: The nodes in graphs from the inner ring to the outer ring represent the different taxonomic levels (domain, phylum, class, order, family and genus), different colors represent the significant enrichment in respective treatments

图 5 不同处理的微生物群落 LefSe 分析

Fig. 5 LefSe analysis of microbial communities from different treatments

3 讨论与结论

木质素是一种芳香性聚合物,被解聚后会有不同的芳基单体产生,因其与多环芳烃都含有芳香性结构,可能会成为多环芳烃降解过程中的共代谢底物,从而促进污染物的代谢。在该研究中,通过比较对照(CK)组和添加木质素的一种模式化合物的 GGE 处理组对土壤中 BaA 归趋的影响,并通过添加真菌抑制剂,来验证污染物归趋过程中细菌和真菌的贡献。从 BaA 的归趋结果来看,CK 组与 GGE 处理组的矿化率相近,在 CK 组中加入放线菌酮对矿化几乎没有影响,而与 CK 组相比,GGE 处理受到了放线菌酮的抑制,矿化率减少了 22.35%。矿化过程主要与微生物群落有关,认为在 CK 组中真菌起到的作用不大,但是加入了 GGE 之后,真菌的作用增大,尽管矿化结果并没有显著变化,但结合微生物群落的变化,GGE 的加入在一定程度上使得真菌的贡献在提升。

目前已知真菌与细菌使用完全不同的途径对多环芳烃进行转化,真菌转化多环芳烃的途径主要是胞内 P450 氧化酶系转化途径和胞外木质素氧化酶转化途径^[14];而细菌对多环芳烃的转化一般属于好氧降解途径,其中双加氧酶途径是细菌降解多环芳烃最常见的方式^[15]。这些不同导致 PAHs 在转化的中间产物和转化效率等方面存在很大差异。该研究土壤微宇宙中 BaA 的矿化可能涉及真菌和细菌的协同作用。从定量的分析结果可以看到,在 CK 处理中加入放线菌酮,并未对多环芳烃双加氧酶 GP PAH-RHD α 基因的丰度产生明显影响,而在 GGE 处理中加入放线菌酮,则显著抑制了双加氧酶基因的丰度。真菌对 PAHs 的作用是多样的,但真菌较少能直接利用高分子量的多环芳烃,更多是以共代

谢机制降解 PAHs,即利用其他碳源生长的同时,在次级代谢过程中转化 PAHs^[16]。培养体系中 GGE 的加入可能会刺激土壤中的真菌,使其先被利用,转化成某些中间体化合物,它们的进一步代谢可能会诱导土壤中的细菌表达双加氧酶等,这些酶类会作用于污染物,促进降解过程。底物基质的添加可能会引起多环芳烃的不同微生物降解机制。

根据该研究对微生物群落的分析结果,GGE 的添加相比于真菌对细菌群落的影响更大。定量 PCR 的结果显示,在 GGE 处理下,*maxA/soxF* 基因有一定程度的增加,甲醇脱氢酶是微生物甲基代谢的关键酶之一,LEfSe 的分析结果也表明,GGE 处理组显著富集了 Hyphomicrobiaceae,已有研究发现 *Hyphomicrobium* 为一种甲基营养菌^[17],一些甲基营养菌已被证明可降解石油碳氢化合物^[18]和芳香族碳氢化合物^[19],还可以利用废气中的多环芳烃^[20],甲基营养菌这类潜在降解菌的富集,可能也会对多环芳烃的降解有潜在能力。GGE 处理组还显著富集了 Rhodospirillaceae、Sinobacteraceae、Acidobacteriaceae、Burkholderiaceae 等与有机物降解相关的细菌科,真菌的富集主要集中在子囊菌门粪壳菌纲。已有研究表明,子囊菌门是污染环境中的主要真菌,具有转化或去除 PAHs 的能力^[21]。张娟琴等^[22]从工厂附近的土壤中分离到一株可以降解 PAHs 的伯克氏菌(*Burkholderia*),且菌株具有较高的双加氧酶活性。Rhodospirillaceae 和 Acidobacteriaceae 等菌科也被研究发现有 PAHs 的潜在降解菌^[23-24]。这些微生物的富集可能会在整体上提升土壤中的芳香族化合物的代谢功能,增强对多环芳烃类污染物的降解能力。

现阶段,鉴于微生物群落的复杂响应,GGE 处理对土壤

微生物群落的调控与多环芳烃的转化关系仍需进一步分析,希望随着研究的深入,将木质素及其代谢产物的共代谢刺激作用机制进一步的完善,为利用微生物群落降解环境污染物提供更多的科学依据。

参考文献

[1] 陈铮,陈勇.多环芳烃降解菌的研究进展[J].浙江万里学院学报,2019,32(3):66-70.

[2] NZILA A. Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria [J]. Environmental pollution,2013,178:474-482.

[3] 郑天凌,骆苑蓉,曹晓星,等.高分子量多环芳烃——苯并[a]芘的生物降解研究进展[J].应用与环境生物学报,2006,12(6):884-890.

[4] WU Y C,DING Q M,ZHU Q H,et al. Contributions of ryegrass, lignin and rhamnolipid to polycyclic aromatic hydrocarbon dissipation in an arable soil [J]. Soil biology and biochemistry,2018,118:27-34.

[5] SUN Y,LIU L M,ZENG J,et al. Enhanced cometabolism of benzo(a)anthracene by the lignin monomer vanillate is related to structural and functional responses of the soil microbiome[J/OL]. Soil biology and biochemistry,2020,149[2021-03-25]. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107908.

[6] WU Y C,ZHU Q H,ZENG J,et al. Effects of pH and polycyclic aromatic hydrocarbon pollution on thaumarchaeotal community in agricultural soils [J]. Journal of soils and sediments,2016,16(7):1960-1969.

[7] WANG Y F,XU J,SHAN J,et al. Fate of phenanthrene and mineralization of its non-extractable residues in an oxic soil[J]. Environmental pollution,2017,224:377-383.

[8] SHAN J,JIANG B Q,YU B,et al. Isomer-specific degradation of branched and linear 4-nonylphenol isomers in an oxic soil[J]. Environmental science & technology,2011,45(19):8283-8289.

[9] SHAN J,JI R,YU Y J,et al. Biochar, activated carbon, and carbon nanotubes have different effects on fate of 14 C-catechol and microbial community in soil[J]. Scientific reports,2015,5:1-11.

[10] FROSSARD A,GERULL L,MUTZ M,et al. Disconnect of microbial structure and function:Enzyme activities and bacterial communities in nascent stream corridors[J]. The ISME journal,2012,6(3):680-691.

[11] BORNEMAN J,HARTIN R J. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples[J]. Applied and environmental microbiology,2000,66(10):4356-4360.

[12] CHAIGNAUD P,MORAWA M,BESAURY L,et al. Methanol consumption drives the bacterial chloromethane sink in a forest soil [J]. The ISME journal,2018,12(11):2681-2693.

[13] CÉBRON A,NORINI M P,BEGUIRISTAIN T,et al. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples[J]. Journal of microbiological methods,2008,73(2):148-159.

[14] CERNIGLIA C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Biodegradation,1992,3:351-368.

[15] 骆苑蓉.多环芳烃降解菌的降解特性与降解途径研究[D].厦门:厦门大学,2008.

[16] 吴宇澄.多环芳烃污染土壤的微生物效应及真菌修复研究[D].南京:中国科学院南京土壤研究所,2007.

[17] SALERNO C,BENNDORF D,KLUGE S,et al. Metaproteomics applied to activated sludge for industrial wastewater treatment revealed a dominant methylophilic metabolism of *Hyphomicrobium zavarzinii* [J]. Microbial ecology,2016,72(1):9-13.

[18] GUTIERREZ T,AITKEN M D. Role of methylophilic bacteria in the degradation of hydrocarbons during the Deepwater Horizon oil spill [J]. The ISME journal,2014,8(12):2543-2545.

[19] JIN C,GENG Z L,PANG X T,et al. Isolation and characterization of a novel benzophenone-3-degrading bacterium *Methylophilus* sp. strain FP-6 [J]. Ecotoxicology and environmental safety,2019,186:1-11.

[20] 晁红军,宋修鹏,孙继华,等.甲基营养菌的研究进展[J].微生物学通报,2009,36(11):1727-1737.

[21] 吴宇澄,林先贵.多环芳烃污染土壤真菌修复进展[J].土壤学报,2013,50(6):1191-1199.

[22] 张娟琴,陈思尹,唐卫红,等.高效多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性分析[J].上海农业学报,2020,36(1):98-104.

[23] CUI Z S,LAI Q L,DONG C M,et al. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge [J]. Environmental microbiology,2008,10(8):2138-2149.

[24] 梁芳.多氯联苯污染土壤生物修复研究[D].杭州:浙江大学,2011.

(上接第 55 页)

[4] 徐祖信,谢海林,叶建锋,等.模拟煤灰渣垂直潜流人工湿地的除磷性能分析[J].环境污染与防治,2007,29(4):241-243.

[5] 刘波,陈玉成,王莉玮,等.4种人工湿地填料对磷的吸附特性分析[J].环境工程学报,2010,4(1):44-48.

[6] 阮晶晶,高德,洪剑明.人工湿地基质研究进展[J].首都师范大学学报(自然科学版),2009,30(6):85-90.

[7] VALIPOUR A,RAMAN V,AHN Y H. Effectiveness of domestic wastewater treatment using a bio-hedge water hyacinth wetland system [J]. Water,2015,7(1):329-347.

[8] 袁东海,景丽洁,高士祥,等.几种人工湿地基质净化磷素污染性能的分析[J].环境科学,2005,26(1):51-55.

[9] DENG C R,HUANG L,LIANG Y K,et al. Response of microbes to biochar strengthen nitrogen removal in subsurface flow constructed wetlands:Microbial community structure and metabolite characteristics[J/OL]. Science of the total environment,2019,694[2021-05-21]. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133687.

[10] JI B,CHEN J,MEI J,et al. Roles of biochar media and oxygen supply strategies in treatment performance,greenhouse gas emissions, and bacterial community features of subsurface-flow constructed wetlands[J/OL]. Bioresource technology,2020,302[2021-05-21]. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122890.

[11] 徐德福,徐建明,李映雪.几种人工湿地基质微生物活性研究[J].农业环境科学学报,2008,27(2):753-757.

[12] SCHALK J,DE VRIES S,KUENEN J G,et al. Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in an anaerobic ammonium oxidation [J]. Biochemistry,2000,39(18):5405-5412.

[13] 张翔波,张晟,贺锋,等.不同填料在高负荷垂直流人工湿地系统中净化能力的研究[J].农业环境科学学报,2007,26(5):1905-1910.

[14] 崔理华,朱夕珍,骆世明,等.煤渣-草炭基质垂直流人工湿地系统对城市污水的净化效果[J].应用生态学报,2003,14(4):597-600.

[15] WANG W,DING Y,WANG Y H,et al. Intensified nitrogen removal in immobilized nitrifier enhanced constructed wetlands with external carbon addition [J]. Bioresource technology,2016,218:1261-1265.

[16] 赵林丽,邵学新,吴明,等.人工湿地不同基质和粒径对污水净化效果的比较[J].环境科学,2018,39(9):4236-4241.

[17] STEINER G R,FREEMAN R J JR. Configuration and substrate design considerations for constructed wetlands wastewater treatment [C]//HAMMER D A. Constructed wetlands for wastewater treatment. Chelsea MI: Lewis Publishers,1989:319-324.

[18] 黄建洪,莫文锐,田森林,等.三种人工湿地填料对氨氮与磷的吸附特性[J].应用化工,2012,41(5):774-777,780.

[19] 陈丽丽,赵同科,张成军,等.不同因素对人工湿地基质脱氮除磷效果的影响[J].环境工程学报,2013,7(4):1261-1266.

[20] SAKADEVAN K,BAVOR H J. Phosphate adsorption characteristics of soils,slags and zeolite to be used as substrates in constructed wetland systems [J]. Water research,1998,32(2):393-399.

[21] 万正芬,张学庆,卢少勇.19种人工湿地填料对磷吸附解吸效果研究[J].水处理技术,2015,41(4):35-39,44.

[22] 张修稳,李锋民,卢伦,等.10种人工湿地填料对磷的吸附特性比较[J].水处理技术,2014,40(3):49-52,56.

[23] 梁晓丽,王晓,赵钰,等.复合垂直流与潜流人工湿地沿程脱氮除磷对比研究[J].环境污染与防治,2009,31(11):26-29,34.

[24] 程龙,李怀,阎百兴,等.无植物水平折流式潜流人工湿地对氮和磷的净化效果[J].湿地科学,2016,14(2):219-225.

[25] 梁语燕,李元慈,董岁明.煤炉渣对污水中磷离子吸附作用研究[J].应用化工,2013,42(10):1870-1871,1874.

[26] 郭本华,宋志文,韩潇源.碎石、沸石和页岩陶粒构建人工湿地的除磷效果[J].工业用水与废水,2005,36(2):46-47,52.

[27] DRIZO A,FROST C A,GRACE J,et al. Physico-chemical screening of phosphate-removing substrates for use in constructed wetland systems [J]. Water research,1999,33(17):3595-3602.