

农田污染土壤及活性污泥中菲、萘降解复合菌群的驯化及其物种多样性分析

汪从胜, 高璐, 成亮, 李霞, 蒋建雄*

(江苏大学环境科学与安全工程学院生物质能源研究院, 江苏 镇江 212013)

摘要:从焦化厂附近农田污染土壤及污水处理厂的活性污泥中驯化筛选到4个菲、萘复合降解菌群, 其中驯化自活性污泥的复合菌群96 h内对菲、萘的降解效率分别达到85.90%和79.45%, 驯化自污染土壤的复合菌群对菲和萘降解效率分别为52.63%和52.15%。为比较不同复合降解菌群的物种结构及多样性, 进一步采用Illumina Miseq高通量测序技术测定16S rDNA的V3~V4区序列。4个复合菌群共产生420 771条优化序列, 聚为10 696个操作分类单元(OTU), 且各菌群中绝大多数OTU是其独有的。不同菌群的物种丰度大小排序为: 污染土壤来源的菲降解菌群>活性污泥来源的萘降解菌群>污染土壤来源的萘降解菌群>活性污泥来源的菲降解菌群, 物种多样性大小排序为: 污染土壤来源的菲降解菌群>活性污泥来源的萘降解菌群>活性污泥来源的菲降解菌群>土壤来源的萘降解菌群。从属分类水平看, 污染土壤来源的菲降解菌群中优势菌有肠杆菌属(*Enterobacter*) (38.21%)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*) (32.78%)和不动杆菌属(*Acinetobacter*) (20.49%), 萘降解菌群中有肠杆菌属(85.16%)和不动杆菌属(9.67%); 活性污泥来源的菲降解菌群中优势菌为寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*) (90.58%), 萘降解菌群中为不动杆菌属(52.74%)和肠杆菌属(40.11%)。本研究证明驯化自焦化厂附近农田污染土壤以及活性污泥的菲、萘降解菌群的物种丰度及多样性均非常高, 是用于治理多环芳烃污染土壤或水体的重要资源。

关键词:多环芳烃降解菌; 农田污染土壤; 活性污泥; 菲; 萘; Illumina Miseq测序; 多样性

中图分类号: X53; S154.3

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)01-0108-08

Acclimation of Phenanthrene and Naphthalene Degrading Compound Bacteria from the Polluted Farmland Soil and the Activated Sludge and Their Diversities Revealed by 16S rDNA Sequencing

WANG Congsheng, GAO Lu, CHENG Liang, LI Xia, JIANG Jianxiong*

(School of Environment and safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: In this paper, four compound bacteria for degrading phenanthrene or naphthalene were acclimated from the polluted farmland soil nearby a coke-plant as well as the activated sludge from a waste water plant, in which the compound bacteria from the activated sludge gave a degradation efficiency of 85.90% and 79.45% in 96 hours to phenanthrene and naphthalene, respectively and those from the polluted farmland soil with a degradation efficiency of 52.63% and 52.15% to phenanthrene and naphthalene, respectively. In order to compare the community structure and diversity in these compound bacteria, the V3-V4 regions in bacterial 16S rDNA were sequenced using the Illumina Miseq platform, by which a total of 420,771 filtered sequences of 16S rDNA were obtained from 4 compound bacteria and subsequently clustered into 10,696 OTUs (operational taxonomic units), with most of OTUs unique for each community. The order of species richness for different community was the soil phenanthrene-degrading compound bacterium>the sludge naphthalene-degrading compound bacterium>the soil naphthalene-degrading compound bacterium>the sludge phenanthrene-degrading compound bacterium, while that of species diversity was the soil phenanthrene-degrading compound bacterium>the sludge naphthalene-degrading compound bacterium>the sludge phenanthrene-degrading compound bacterium > the soil naphthalene-degrading compound bacterium. On

收稿日期: 2020-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671754); 江苏大学高级人才基金项目(15JDG012); 镇江市重点研发计划项目(SH2022011)

作者简介: 汪从胜(1988-), 男, 助理工程师, 硕士, 从事微生物与植物互作治理土壤有机污染物和重金属研究。

通讯作者: 蒋建雄, 男, 博士, 研究员, E-mail: jxjiang@ujs.edu.cn

the genus-level classification, the dominant bacteria in the soil phenanthrene-degrading compound bacterium included *Enterobacter* (38.21%), *Comamonas* (32.78%) and *Acinetobacter* (20.49%), and those in the soil naphthalene-degrading compound bacterium were comprised of *Enterobacter* (85.16%) and *Acinetobacter* (9.67%). On the other hand, the dominant bacteria in the sludge phenanthrene-degrading compound bacterium came from *Stenotrophomonas* (90.58%), and those for the sludge naphthalene-degrading compound bacterium consisted of *Acinetobacter* (52.74%) and *Enterobacter* (40.11%). This study developed the phenanthrene- or naphthalene-degrading compound bacteria with high species richness and diversity, which can be used to remediate the polluted soil or water by polycyclic aromatic hydrocarbons.

Key words: PAHs degrading bacteria; Farmland polluted soil; Activated sludge; Phenanthrene; Naphthalene; Illumina Miseq; Diversity.

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是指一类由两个或两个以上苯环稠合在一起的持久性有机污染物,主要来源于石油、煤等化石燃料的不完全燃烧或者在还原条件下经热分解形成^[1]。PAHs具有低水溶性或憎水性,在非水相中有强烈的分配,易吸附于固体颗粒物表面和有机腐殖质上,大气中的PAHs污染物随大气沉降和降雨最终进入土壤环境中,环境介质中90%以上的PAHs最终累积于土壤中^[2]。我国土壤中PAHs污染严重,尤其是农田土壤已普遍受到PAHs污染,且污染处于中等水平^[3]。我国地域辽阔,水资源南北分布不均,利用经过处理的生活污水灌溉在一定程度上可缓解农业用水不足,这在缺水地区已得到广泛应用,但使用污水灌溉会导致土壤环境中的持久性有机污染增加,尤其是PAHs类物质,当超过土壤环境容量时便造成土壤PAHs污染^[4]。PAHs可通过植物吸收进入食物链,沿食物链富集,进而对人类健康造成威胁^[5]。菲(phenanthrene)是农田土壤PAHs污染物中最常见的一种,也是石油污染后在环境中存在量最大的PAHs之一,具有湾区结构和K区结构,是致癌PAHs的最小结构单元^[6];萘(naphthalene)具有2个苯环结构,是化工焦化的主要产品之一,会污染厂区周边农田土壤,其污染也具有一定代表性^[7-8]。去除土壤中PAHs常用的方法有物理法(萃取、吸收、光催化等)、化学法(氧化法、电化学降解法)、生物法(微生物、植物)^[9]。物理法、化学法因其成本高、费时长等缺点发展较慢,而生物法中微生物修复因其经济、高效且无二次污染物等特点,已成为去除土壤环境中PAHs的理想方法及重要手段^[10-11]。目前研究较为广泛的可降解菲、萘的微生物主要发现于红球菌属(*Rhodococcus*)^[12]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[13-14]、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingobium*)^[15]、微球菌属(*Micrococcus*)^[16]

等,传统的研究方法是从受PAHs污染的介质中筛选分离具有高效降解目标PAHs功能的纯菌,然后接种至污染土壤中^[17]。传统的分离纯化及鉴定过程比较烦琐,降解PAHs的效率也偏低,且有些降解菌只能在特定环境中存活,有的甚至不可人工培养,接种后存活效率也会影响降解效果。驯化可降解PAHs的复合菌群有利于利用多种降解菌之间的相互优势,提高PAHs的降解效率。笔者采用梯度胁迫驯化方法,从焦化厂附近的农田污染土壤以及污水处理厂的活性污泥中筛选出具有菲、萘高效降解功能的复合菌群,对其降解菲、萘的效率进行测定,在此基础上采用基于16S rDNA序列的Illumina Miseq高通量测序技术揭示这些复合菌群中的物种结构及多样性^[18]。本研究对于挖掘与利用可高效降解PAHs的微生物资源具有重要意义,同时也可受PAHs污染农田土壤的治理与修复提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

土壤样品取自镇江市某焦化厂附近农田,去除土壤中的枯枝落叶、石子等杂物后,置于背光处风干,过200目筛网。活性污泥取自镇江市东郊污水处理厂。菲和萘(纯度均为98%)购自Sigma-Aldrich,取2.5 g菲或萘溶解于50 mL丙酮中,过0.22 μm 有机滤膜除菌后,配制成浓度为50 mg/mL母液。其余药品试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品预处理

土壤样品搅拌均匀后用四分法进行均分,称取10 g土壤样品放入无菌的锥形瓶中,加20 mL无菌水于摇床中28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min震荡2 h后,静置沉淀30 min。活性污泥取10 mL泥水混合物加入

锥形瓶中,静置沉淀 30 min。

1.2.2 菲、萘降解菌的筛选与富集

取上述预处理上清液 1 mL 接种于含 50 mg/L 菲或萘的 20 mL 无机盐液体培养基(NaCl 0.5 g/L, K_2HPO_4 1.5 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, pH 7.0)中,于 28 °C、180 r/min 的条件下避光振荡培养,待培养液变浑浊后取 1 mL 培养液转移到 20 mL 含菲或萘的新鲜无机盐液体培养基中继续培养,重复 2 次。取 1 mL 上述菌液加入 100 mg/L 菲或萘的新鲜无机盐液体培养基中,培养 7 d,之后以 50 mg/L 浓度梯度逐步提高无机盐液体培养基中菲或萘的浓度至 500 mg/L。取最后一次培养液于 LB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 进行富集培养 2 d。

1.2.3 复合菌的降解效率测定

将菲或萘溶解于色谱级甲醇溶液中配制成浓度分别为 12.5、25、50、75、100 mg/L 的标准溶液,用直径 0.22 μ m 有机相滤膜过滤后,在 Prominence LC 高效液相色谱仪(Shimadzu, Japan)上采用 HPLC 测定峰面积与浓度的关系并绘制标准曲线。HPLC 检测参数为:C18 反相色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 3.5 μ m);流动相甲醇:水=90:10,流速为 1.0 mL/min;柱温为 40 °C;检测波长为 254 nm;进样量 20 μ L。

取 4 个复合菌样本各 1 mL 接种到 20 mL 的 LB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h。8 000 r/min 离心 4 min 收集菌体,菌体用基础无机盐培养基洗涤 3 次后重悬浮菌液,并调整细菌菌液浓度至 $OD_{600}=1.0$ ($\times 10^8$ CFU/mL),再按 5% 接种量接入到 20 mL 含 100 mg/L 菲或萘的无机盐培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 4 d,加入等体积色谱级甲醇,水浴超声 30 min,过 0.22 μ m 滤膜后用 HPLC 测定培养物中剩余菲或萘含量,计算降解效率。

1.2.4 细菌总 DNA 的制备

取富集培养的菌液 4 mL,10 000 r/min 室温离心 3 min,弃去上层液体,菌体用于提取细菌总 DNA。DNA 提取采用 E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit (Omega),提取的细菌总 DNA 质量采用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.5 16S rDNA V3-V4 可变区的 PCR 扩增

选取 16S rDNA V3-V4 可变区序列进行高通量测序,首先对该区段序列做两轮 PCR 扩增,先用 Qubit 3.0 DNA 检测试剂盒(Invitrogen)对 DNA 精确定量,确定 PCR 反应加入的 DNA 模板量,第

一轮 PCR 扩增采用 341F 引物(Bar Primer F):5'-CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT G (barcode) CCT ACG GGN GGC WGC AG-3' 和 805R 引物(Primer R):5'-GAC TGG AGT TCC TTG GCA CCC GAG AAT TCC A-3',PCR 反应体系为 30 μ L:1 $\times$ Taq master Mix (Vazyme)、Bar Primer F 和 Primer R 引物各 0.33 μ mol/L、DNA 10~20 ng,PCR 反应条件为:94 °C 3 min;94 °C 30 s,45 °C 20 s,65 °C 30 s,5 个循环;94 °C 20 s,55 °C 20 s,72 °C 30 s,20 个循环;72 °C 5 min。第二轮 PCR 扩增引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物,以第一轮 PCR 产物为模板,反应条件为:94 °C 3 min;94 °C 20 s,55 °C 20 s,72 °C 30 s,5 个循环;72 °C 5 min。

1.2.6 文库构建和测序

用 Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒(Beckman Coulter)对片段长度在 400 bp 以上 PCR 产物进行回收。回收的 DNA 经过精确定量后,每个样品 DNA 量取 10 ng 等量混合,由上海生工利用 Illumina Miseq 高通量测序平台进行测序,最终上机测序的 DNA 浓度为 20 pmol。

1.2.7 数据分析

测序序列用 cutadapt 软件去除引物接头序列,然后用 PEAR 软件将成对的 reads 拼接成一条序列,再按照 barcode 标签序列识别得到各样本序列,最后用 Prinseq 和 Usearch 软件过滤掉其中的低质量序列,包括模糊碱基、单碱基重复区、过长和过短的序列以及 PCR 过程中产生的嵌合体等,得到优化后的序列。利用 Usearch 软件在 97% 相似水平下对所有样本序列进行操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)划分并做生物信息统计分析。根据各样本 OTU 数目,利用 mothur 软件进行 Alpha 多样性分析,包括群落分布丰度指数(Chao1 指数和 ACE 指数)、群落分布多样性指数(Shannon 指数和 Simpson 指数)和 Venn 图绘制。

2 结果与分析

2.1 复合菌群的驯化及其降解效率

本研究分别从农田污染土壤及污水处理过程中的活性污泥中采样,富集驯化培养到 4 个复合菌群,分别标识为:来源于土壤的非降解菌群(T_1)、来源于土壤的萘降解菌群(T_2)、来源于活性污泥的非降解菌群(W_1)和来源于活性污泥的萘降解菌群(W_2)。对各复合菌群的降解效率进行测定,发现在含 100 mg/L 菲或萘的无机盐培养基中,振荡摇瓶培养 96 h 后,活性污泥来源的非复

合降解菌和萘复合降解菌的降解效率分别达到85.90%和79.45%,土壤来源的非复合降解菌、萘复合降解菌的降解效率分别为52.63%和52.15%(图1)。

2.2 序列数量及长度分布

采用基于16S rDNA V3-V4区序列的Illumina Miseq测序分析,从4个菌群样本(T₁、T₂、W₁、W₂)中共获得445 664条原始序列(Raw reads),序列长度在468.42~469.28 bp,质控后获得437 116条Clean reads,序列平均长度在430 bp左右。利用Usearch去除预处理后的序列,获得优化序列(Filtered reads)共计420 771条(表1)。

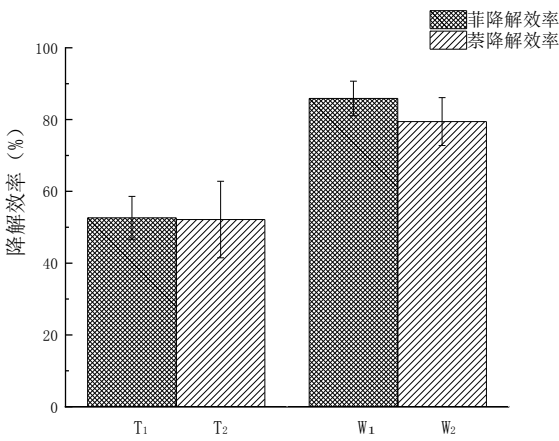


图1 混合菌群对非或萘的降解效率

表1 16S rDNA测序序列数据及OTU数目统计

样品编号	原始 序列数(条)	原始序列 平均长度(bp)	质控 序列数(条)	质控序列 平均长度(bp)	有效 序列数(条)	OTU 数目(个)	覆盖率
T ₁	112 013	469.28	109 975	430.14	100 080	2 370	0.98
T ₂	99 535	469.15	97 942	430.20	96 949	2 749	0.97
W ₁	128 378	468.42	125 731	429.61	124 585	3 654	0.97
W ₂	105 738	468.79	103 468	430.35	99 157	1 923	0.98

2.3 OTU分布

上述Filtered reads在97%相似水平下被聚为10 696个OTU。韦恩图可展示不同菌群中各自独有的OTU数目以及相互间共有的OTU数目,由图2可以看出,从不同来源获得的菲、萘降解菌群具有不同的OTU数目,其中,土壤中菲降解菌群T₁的OTU数是2 370个,土壤中萘降解菌群T₂的OTU是2 749个,污泥中菲降解菌群W₁的OTU数是3 654个,污泥中萘降解菌群W₂的OTU数是1 923个。其中,土壤菌群(T₁+T₂)和污泥菌群(W₁+W₂)共有的OTU数是110个;T₁和T₂共同的OTU数是53个,占各自的OTU比例为2.24%和1.93%,其余

为各自独有;W₁和W₂共同的OTU数是57个,占各自的OTU比例为1.56%和2.96%;T₁和W₁共有的OTU数是32个,占各自的OTU的比例为1.35%和0.88%;T₂和W₂共有的OTU数是60个,占各自的OTU比例为2.18%和3.12%;而4个菌群共有的OTU数仅有12个。由此可见,不同菌群中绝大多数OTU为各自所独有。

2.4 测序质量评估

测序深度指数Coverage是指宏基因组测序中各样品文库的覆盖率,其数值越高,则样本中序列没有被测出的概率越低,该指数实际反映测序结果是否代表样本的真实情况。在本研究中,T₁、T₂、W₁和W₂的覆盖率值分别达到0.98、0.97、0.97和0.98(表1),这说明本次测序结果完全可以代表各样本的真实情况。

Shannon指数稀释性曲线显示,在0~1 000的测序数量范围内,随测序深度的增加,各菌群的物种多样性急剧增加,当测序数量超过1 000时,Shannon多样性指数几乎不再随之变化(图3),同样也表明本研究中各样本的测序量完全可以真实反映菌群中绝大多数微生物物种的信息。

2.5 菌群物种丰富度与多样性

群落生态学中通常采用单样品的多样性分析(Alpha多样性)来反映微生物群落的丰度和多样性,其中,ACE指数和Chao1指数均是通过估计群

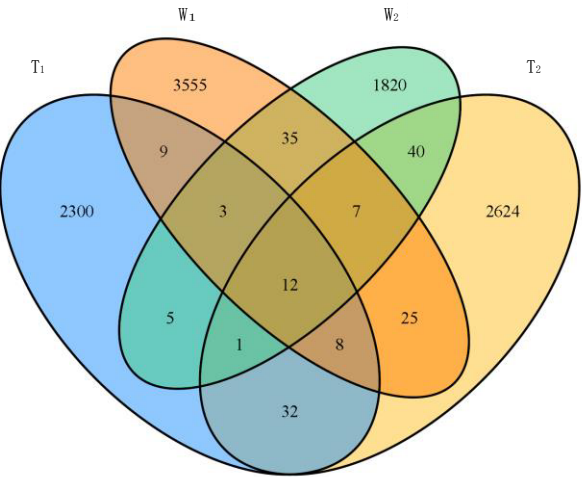


图2 不同菌群间OTU分布韦恩图

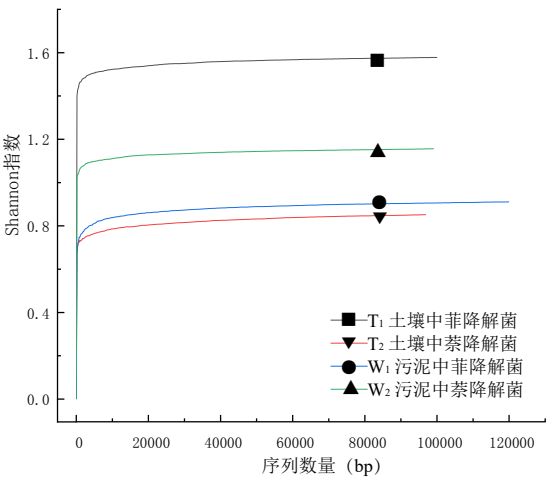
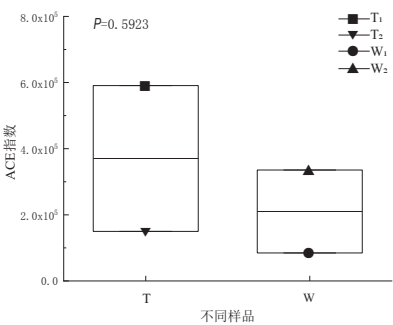


图3 不同菌群的Shannon指数稀疏曲线

落中所含 OTU 的数目来衡量群落中的物种丰富度,数值越大说明 OTU 数目越多,群落中的物种丰富度也就越大。

4 个样品中的 ACE 指数和 Chao1 指数详见表 2,本研究中 ACE 指数和 Chao1 指数的变化趋势是



一致的(图 4),均以土壤中非降解菌群 T_1 为最高,其 ACE 指数和 Chao1 指数分别为 590 794 和 151 430,高于其他 3 个菌群的值,其次是污泥中萘降解菌群 W_2 (ACE 335 515, Chao1 63 601),第三为土壤中萘降解菌群 T_2 (ACE 149 773, Chao1 46 399),最低的为污泥中土壤非降解菌群 W_1 (ACE 84 663, Chao1 39 279)。

表2 样品多样性指数统计表

样品编号	ACE 指数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
T_1	590 794	151 430	1.58	0.30
T_2	149 773	46 399	0.85	0.73
W_1	84 663	39 279	0.91	0.76
W_2	335 515	63 601	1.16	0.43

微生物群落中物种多样性(Alpha 多样性)用 Shannon 指数和 Simpson 指数来表征,Shannon 指数越大或 Simpson 指数越小,表明群落中的多样性越丰富。4 个样品中的 Shannon 指数和 Simpson 指数详见表 2,土壤非降解菌群的 Shannon 指数 1.58,

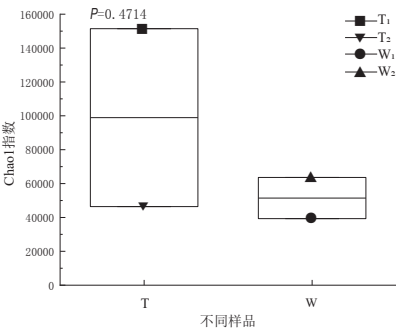


图4 不同菌群的ACE指数(左)和Chao1指数(右)

Simpson 指数 0.30,该菌群的多样性在 4 个复合菌群中最高(图 5)。此外,不同来源的非降解菌群多样性为土壤(Shannon 1.58, Simpson 0.30)高于活性污泥(Shannon 0.91, Simpson 0.76),相反,不同来源的萘降解菌群多样性为活性污泥(Shannon 1.16, Simpson 0.43)高于土壤(Shannon 0.85, Simpson 0.73)。土壤来源的降解菌群多样性为非降解

菌群(Shannon 1.58, Simpson 0.30)高于萘降解菌群(Shannon 0.85, Simpson 0.73),活性污泥来源的降解菌群多样性则为萘降解菌群(Shannon 1.16, Simpson 0.43)高于非降解菌群(Shannon 0.91, Simpson 0.76)。分组间的 Shannon 多样性指数也显示,土壤中非、萘降解菌群的离散程度>活性污泥中非、萘降解菌的离散程度,且土壤中非和萘

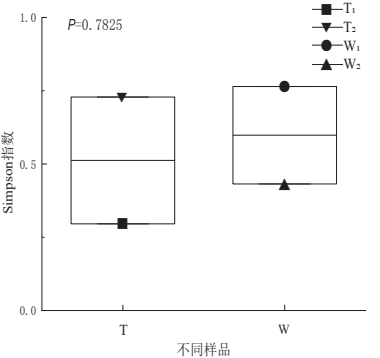
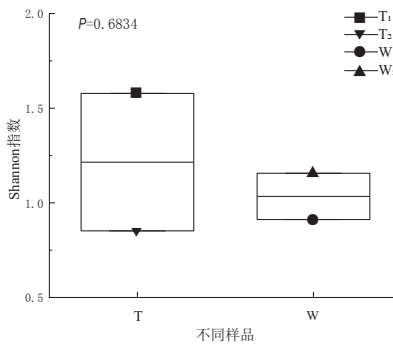


图5 不同菌群的Shannon指数(左)和Simpson指数(右)

降解菌群的多样性高于活性污泥中非和萘降解菌群的多样性。

2.6 菌群结构

由图6可知,从门分类水平上看,不同来源的非降解菌群主要分布在变形菌门(Proteobacteria)(99.94% vs 99.06%);从纲分类水平看,它们主要分布在 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)(66.41% vs 93.72%);从目分类水平看,土壤来源的非降解菌群主要分布在肠杆菌目(Enterobacteriales)(45.7%),活性污泥来源的非降解菌群主要分布在黄色单胞菌目(Xanthomonadales)(90.73%);从科分类水平看,土壤来源的非降解菌群主要分布在肠杆菌科(Enterobacteriaceae)(45.7%),活性污泥来源的非降解菌群主要分布在黄色单胞菌科(Xanthomonadaceae)(3.97%);从属分类水平看,土壤来源的非降解菌群主要分布在肠杆菌属(*Enterobacter*)(38.21%),其次是丛毛单胞菌属(*Comamonas*)(32.78%)与不动杆菌属(*Acinetobacter*)(20.49%),活性污泥来源的非降解菌群基本上为寡养食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)(90.58%)。

同样,从门分类水平看,不同来源的萘降解菌

群主要分布在变形菌门(Proteobacteria)(99.85% vs 99.95%);从纲分类水平看,降解菌群主要分布在 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)(99.41% vs 99.76%);从目分类水平看,土壤来源的萘降解菌群主要分布在肠杆菌目(Enterobacteriales)(87.69%),活性污泥来源的萘降解菌群主要分布在假单胞菌目(Pseudomonadales)(53.08%);从科分类水平看,土壤来源的萘降解菌群主要分布在肠杆菌科(Enterobacteriaceae)(87.69%),活性污泥来源的萘降解菌群主要分布在莫拉菌科(Moraxellaceae)(53.07%),其次为肠杆菌科(41.04%);从属分类水平看,土壤来源的萘降解菌群主要分布在肠杆菌属(*Enterobacter*)(85.16%),其次为不动杆菌属(*Acinetobacter*)(9.67%),活性污泥来源的萘降解菌群主要分布在不动杆菌属(*Acinetobacter*)(52.74%),其次为肠杆菌属(*Enterobacter*)(40.11%)。

土壤菌群(T_1+T_2)中的肠杆菌属(*Enterobacter*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)的丰度显著高于活性污泥菌群(W_1+W_2)中的,相反,活性污泥中寡养食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、无色杆菌属

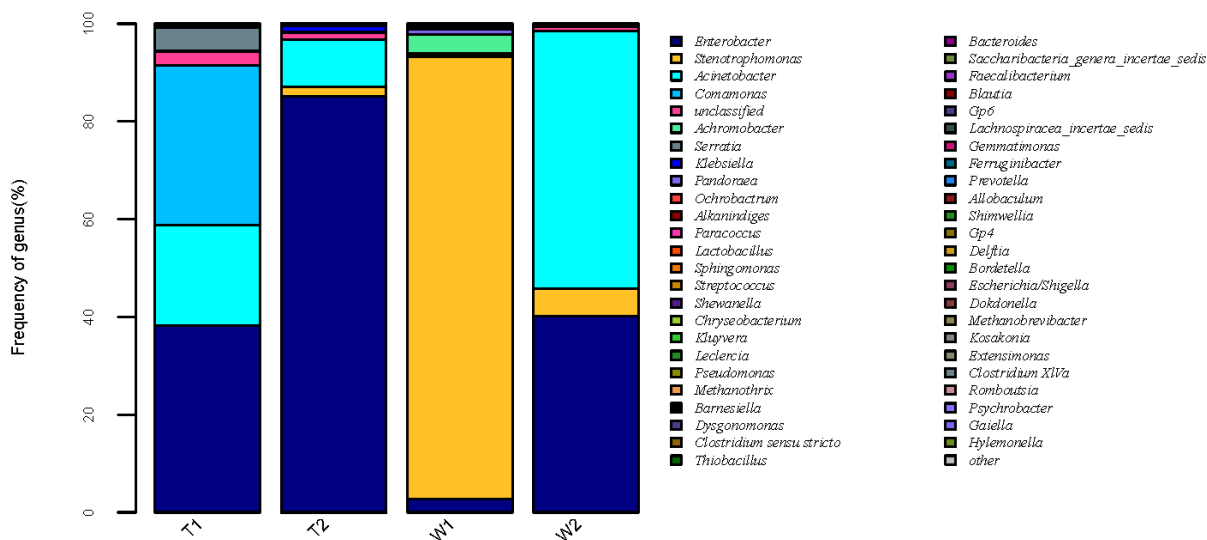


图6 属水平的物种分布频率

(*Achromobacter*)、潘多拉菌属(*Pandoraea*)和苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)要显著高于土壤。此外,丛毛单胞菌属(*Comamonas*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)仅在土壤非降解菌群中发现,潘多拉菌属(*Pandoraea*)只存在于活性污泥的萘降解菌群中,且寡养食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和无色杆菌属(*Achromobacter*)也主要存在于该菌群中。

3 讨论

农田土壤由于大气沉降和污水灌溉会导致

PAHs等持久性有机污染物含量增加,通过对不同典型灌区土壤分析发现,表层土是PAHs的主要累积部位,污灌区表土中PAHs含量高达726 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其次是再生水灌区和清灌区分别为200、34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[19]。农田土壤中积累的PAHs具有慢性毒性和致癌、致畸、致突变的“三致”作用,对人类的健康和生态环境造成巨大危害^[20]。微生物对土壤中PAHs的降解起着很大作用,一些好氧或厌氧微生物能通过不同的代谢机制将PAHs降解、矿化,为生物修复PAHs污染土壤提供可能^[21],因此,挖掘高效

PAHs降解菌资源并将其用于农田污染土壤的治理具有重要意义。此外添加到土壤中的微生物还可以增加土壤肥力^[22]。目前,利用微生物降解PAHs已成为污染土壤修复的重要研究方向,不少研究者分离纯化到一些对PAHs具有高效降解作用的纯菌,但单一纯菌通常仅能降解PAHs中的一种或几种^[23],不能满足农田土壤中种类繁多的PAHs污染物的降解需求。在自然环境中,微生物均以群落形式存在,群落的组成和结构往往影响微生物对污染物的降解^[24],研究表明复合菌往往比单一纯菌有更高的降解PAHs的效率^[25],且复合菌具有群落多样性,对环境有较强的适应能力。本研究从农田污染土壤及活性污泥中驯化得到4个对菲或萘具有高效降解能力的复合菌群,说明污染土壤及活性污泥是驯化PAHs降解菌的重要资源,其中,来自活性污泥中的降解复合菌群对菲、萘的降解效率均显著高于来自农田土壤中的复合菌群。从多样性角度而言,土壤中的菲降解菌多样性高于污泥中菲降解菌群,相反,活性污泥中萘降解菌群多样性高于土壤来源的萘降解菌群,这表明可有针对性地从焦化厂污染土壤中挖掘菲降解菌资源,从活性污泥中发掘萘降解菌资源。

通过物种结构分析可进一步看到土壤和活性污泥中菲、萘降解菌的差异。就菲降解菌而言,从门分类水平上看,两种来源的菲降解菌都主要集中在变形菌门(Proteobacteria),约占99%。从属分类水平看,土壤来源的菲降解菌群主要分布在肠杆菌属(*Enterobacter*)(38.21%),其次是从毛单胞菌属(*Comamonas*)(32.78%)与不动杆菌属(*Acinetobacter*)(20.49%),活性污泥中的菲降解菌群基本上为寡养食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)(90.58%),土壤中菲降解的优势菌属为肠杆菌属、丛毛单胞菌属,污泥菲降解优势菌属为寡养食单胞菌属,两者有明显的不同。两种来源的萘降解菌也主要集中在变形菌门(Proteobacteria),占99%左右。从属分类水平看,土壤来源的萘降解菌群主要分布在肠杆菌属(*Enterobacter*)(85.16%),其次为不动杆菌属(*Acinetobacter*)(9.67%),而活性污泥中的萘降解菌群主要分布在不动杆菌属(*Acinetobacter*)(52.74%),其次为肠杆菌属(*Enterobacter*)(40.11%)。可以看出活性污泥中萘降解菌不动杆菌属(*Acinetobacter*)的比例较土壤中的高47.07%,而肠杆菌属(*Enterobacter*)的比例较土壤中高45.05%。其他研究也证实上述属的微生物种类具有菲或萘的降解能力,1株

*Acinetobacter johnsonii*能够降解菲^[26];从炼油厂附近污染土壤中分离到两株菲降解菌,经过鉴定其中一株为寡养食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)^[27];由胜男等首次发现*Comamonas* sp.能够降解菲^[28];肠杆菌属(*Enterobacter*)能够降解菲、萘等低分子的多环芳烃污染物^[29]。

此外,本研究中4个菌群的绝大部分OTU是各自独有的,表明这些属的物种对降解PAHs具有重要作用,且不同来源的样品中存在具有可降解不同种类PAHs的特异微生物,这些不同种类微生物在PAHs降解过程中可能有相互作用。

4 结 论

本研究可比较农田污染土壤与活性污泥中驯化到的菲、萘降解菌的多样性差异,可针对性发掘菲、萘降解菌资源。研究表明农田土壤和活性污泥中PAHs降解菌的丰富度及多样性都非常高,可用于驯化优良的PAHs降解菌。通过对土壤和活性污泥中PAHs降解混合菌的群体构成和丰度的比较,发现土壤中对发掘菲降解菌资源、污泥中对发掘萘降解菌资源更有意义,发掘的降解菌能够为农田土壤或水体中PAHs污染治理提供保障。

参考文献:

- [1] 张耀丹,田胜艳,刘宪斌,等.渤海西北部海域表层水体中PAHs的分布、来源及风险评价[J].海洋与湖沼,2013,44(1):255-261.
- [2] Sun J H, Wang G L, Chai Y. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Henan reach of the Yellow River, Middle China[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72(5): 1614-1624.
- [3] 尚庆彬,段永红,程 荣.中国农业土壤多环芳烃污染现状及来源研究[J].山东农业科学,2019,51(3):62-67.
- [4] 刘 庚,牛俊杰,王 玲,等.土壤多环芳烃污染及风险评价[J].环境化学,2017,36(7):1622-1629.
- [5] Haritash A K, Kaushik C P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 169(1): 1-15.
- [6] 刘鑫鑫,田梓靖,胡 鑫,等.一株菲降解菌的分类鉴定及其降解特性[J].南开大学学报(自然科学版),2017,50(3):49-53.
- [7] 何佳璘,段永红,孙 健.晋中某焦化企业周边农田表土中PAHs污染特征及风险分析[J].山西农业科学,2020,48(3):416-419.
- [8] 陈 雨,佟雪娇,于 海,等.河北省化工企业多环芳烃污染土壤化学氧化小试研究[J].环境与发展,2019,31(11):87-89.
- [9] 王 飞.土壤多环芳烃污染修复技术的研究进展[J].环境

- 与发展,2019,31(2):55-58.
- [10] 周子康,崔洁,许平,等.细菌降解低分子量多环芳烃的研究进展[J].生物工程学报,2019,35(11):2069-2080.
- [11] 陈凯丽,叶茜琼,吴蔓莉,等.微生物修复油污土壤过程中氮素的变化及菌群生态效应[J].环境科学,2017,38(2):728-734.
- [12] Song X H, Xu Y, Li G M, et al. Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons[J]. Marine Pollution Bulletin, 2011, 62: 2122-2128.
- [13] Nwinyi O C, Ajayi O O, Amund O O. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of *Pseudomonas*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(3): 551-562.
- [14] Singh P, Tiwary B N. Optimization of conditions for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by *Pseudomonas stutzeri* P2 isolated from Chirimiri coal mines[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2017, 10: 20-29.
- [15] Dong C M, Bai X H, Lai Q L. Draft genome sequence of *Sphingobium* sp. strain C100, a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from the deep-sea sediment of the arctic ocean[J]. Genome Announcements, 2014, 2(1): 55-59.
- [16] Hritash A K, Kaushik C P. Degradation of low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by microorganisms isolated from contaminated soil[J]. International Journal of Environmental Sciences, 2016, 6(5): 808-819.
- [17] 许超,曲勤凤,顾文佳,等.新型可降解高效氯氟酯微生物菌株的筛选、鉴定及条件优化[J].东北农业科学,2016,41(2):70-73.
- [18] 宋宇,王鹏,韦月平.不同共作模式的稻田土壤细菌群落结构分析[J].东北农业科学,2019,44(4):46-49.
- [19] 陈素暖,何江涛,金爱芳,等.多环芳烃在不同灌区土壤剖面的分布特征研究[J].环境科学与技术,2010,33(10):10-14.
- [20] 周燕.西安市居民区土壤多环芳烃来源及健康风险评估[J].环境科学导刊,2019,38(6):71-77.
- [21] 李燕.污染场地生物修复技术应用研究[J].环境保护与循环经济,2019,39(5):22-25.
- [22] 李乐,孙海,刘政波,等.微生物肥料的作用、机理及发展方向[J].东北农业科学,2016,41(4):63-69.
- [23] 邵猛猛.多环芳烃降解菌的筛选、降解性能及环境安全影响研究[D].西安:西安建筑科技大学,2018.
- [24] 赵旭阳,郭美霞,周艳梅.外源微生物对PAHs污染土壤细菌群落结构的影响[J].化学研究,2019,30(5):498-503.
- [25] 花莉,彭香玉,范洋,等.石油降解单菌株及混合菌降解产物分析[J].陕西科技大学学报(自然科学版),2014,32(5):27-31.
- [26] 马丹,王永刚,陈吉祥,等.1株高效菲降解不动杆菌的筛选、鉴定及性能研究[J].微生物学杂志,2018,38(6):15-23.
- [27] Xia Y, Min H, Rao G, et al. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4[J]. Biodegradation, 2005, 16(5): 393-402.
- [28] 由胜男,沈文丽,裴晓芳,等.*Comamonas* sp.IDO2合成靛蓝的特性研究[J].环境科学学报,2017,37(6):2069-2075.
- [29] 陈小兵.植物内生细菌的分离筛选及其与植物联合修复土壤多环芳烃的研究[D].南京:南京农业大学,2007.
- (责任编辑:王昱)

(上接第101页)2018,10(9):2-18.

- [14] 吴伟斌,李佳雨,张震邦,等.基于高光谱图像的茶树LAI与氮含量反演[J].农业工程学报,2018,34(3):195-201.
- [15] 王凌.苹果树花期叶/冠N、P营养状况的卫星遥感反演研究[D].泰安:山东农业大学,2012.
- [16] 徐良将,黄昌春,李云梅,等.基于高光谱遥感反射率的总氮总磷的反演[J].遥感技术与应用,2013,28(4):681-688.
- [17] 冯海宽,杨福芹,李振海,等.最优权重组合模型和高光谱估算苹果叶片全磷含量[J].农业工程学报,2016,32(7):173-180.
- [18] 付元元,杨贵军,冯海宽,等.基于高光谱维数约简与植被指数估算冬小麦叶面积指数的比较[J].农业工程学报,2012,28(23):107-113.
- [19] 贾良良,李斐,陈新平,等.应用IKONOS卫星影像监测冬小麦氮营养状况[J].中国土壤与肥料,2013(6):68-71.
- [20] 王来刚,田永超,李文龙,等.基于地-空遥感耦合的冬小麦叶片氮积累量估算[J].应用生态学报,2012,23(1):73-80.
- [21] 胡昊,白由路,杨俐苹,等.基于SPAD-502与GreenSeeker的冬小麦氮营养诊断研究[J].中国生态农业学报,2010,18(4):748-752.
- [22] 肖春华,李少昆,王克如,等.基于多视角反射光谱的冬小麦冠层叶片氮素营养监测研究[J].作物学报,2007(7):1141-1145.
- (责任编辑:王丝语)