



中国环境科学  
China Environmental Science  
ISSN 1000-6923, CN 11-2201/X

## 《中国环境科学》网络首发论文

题目：多环芳烃共代谢对苯并[a]蒽微生物降解过程的影响及机制  
作者：朱清禾，曾军，吴宇澄，杨洁，林先贵  
DOI：10.19674/j.cnki.issn1000-6923.20210803.013  
网络首发日期：2021-08-04  
引用格式：朱清禾，曾军，吴宇澄，杨洁，林先贵. 多环芳烃共代谢对苯并[a]蒽微生物降解过程的影响及机制. 中国环境科学.  
<https://doi.org/10.19674/j.cnki.issn1000-6923.20210803.013>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 多环芳烃共代谢对苯并[a]蒽微生物降解过程的影响及机制

朱清禾<sup>1,2</sup>, 曾军<sup>1</sup>, 吴宇澄<sup>1</sup>, 杨洁<sup>2</sup>, 林先贵<sup>1\*</sup> (1. 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室, 南京土壤研究所, 南京, 210008; 2. 国家环境保护城市土壤污染控制与修复工程技术中心, 上海市环境科学研究院, 上海, 200233)

**摘要:**低分子量多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)可共代谢促进高分子量 PAHs 的降解, 然而该过程中土壤 PAHs 的环境归趋及微生物学机制尚不清楚。本研究利用 <sup>14</sup>C 同位素示踪技术, 研究土壤中菲、蒽、芘三种底物对苯并[a]蒽(Benzo[a]anthracene, BaA) 环境归趋的影响, 高通量测序解析细菌群落响应。三种底物均可以促进 BaA 的降解, 添加蒽作为共代谢底物后, BaA 矿化率比对照提高了 2.5%, 而添加菲、芘时, <sup>14</sup>C 在土壤的结合态比对照升高 4%, 达总添加量的 31%。共代谢底物改变了细菌共生网络的拓扑结构: 添加底物蒽后, 网络中的正连接比例显著升高, 物种间以共生关系为主; 菲、芘作为共代谢底物时, 细菌物种间的负连接比例升高, 暗示微生物种群竞争变激烈。推测蒽与 BaA 化合物结构相似并有相近的代谢途径, 细菌共生性增强并直接促进了苯并[a]蒽的矿化。本研究为揭示共代谢促进苯并[a]蒽降解机制提供理论依据。

**关键词:** 苯并[a]蒽; 环境归趋; 共代谢; 细菌共生网络

中图分类号: X53

文献标识码: A

**Effect of co-metabolism by polycyclic aromatic hydrocarbon on the microbial degradation of benzo[a]anthracene and its mechanism** ZHU Qing-he<sup>1,2</sup>, ZENG Jun<sup>1</sup>, WU Yu-cheng<sup>1</sup>, YANG Jie<sup>2</sup>, LIN Xian-gui<sup>1\*</sup> (1. Key Laboratory of Soil Environmental and Pollution Remediation, Chinese Academy of Sciences, Institute of Soil Science, Nanjing, 210008, China; 2. State Environmental Protection Engineering Center for Urban Soil Contamination Control and Remediation, Shanghai, 200233, China)

**Abstract:**Low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) can enhance the degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon by co-metabolism. However, the fate of pollutants and the microbial mechanism during co-metabolism remains unclear. In this study, the effect of three co-metabolic substrates (phenanthrene, anthracene, pyrene) on the distribution of benzo[a]anthracene (BaA) was studied by using <sup>14</sup>C isotope tracer. High-throughput sequencing and co-occurrence network was used for revealing microbial response. From the results, three co-metabolic substrates all promoted the degradation of BaA. During co-degradation, the mineralization of BaA in anthracene treatment was 2.5% higher than the control. In the treatment of phenanthrene and pyrene, the bound residue of <sup>14</sup>C was 4% higher than the control, up to 31% of the total addition. The topology of bacterial co-occurrence network was changed under co-metabolic treatments. During anthracene co-metabolism, the proportion of positive edges was significantly increased, which indicated the mutualistic network. In contrast, the competition between bacterial species was strengthened in the treatments of phenanthrene and pyrene addition, evidenced by higher negative edges percentage. Anthracene and BaA may share similar metabolic pathway, which accounts for the mutualistic network and higher mineralization rate of BaA. The degradation way of co-metabolic substrates is an important factor on the fate of BaA in soil and the interaction among bacterial species. This study provided basis for elucidating the mechanism of co-metabolism on promoting the degradation of benzo[a]anthracene.

**Keywords:** Benzo[a]anthracene, Environmental fate, cometabolism, bacterial co-occurrence network

基金项目: 国家重点研发计划资助(2019YFC1803700), 国家自然科学基金面上项目(41977132), 上海市科技人才计划项目(19XD1434900)

\* 责任作者, 研究员, E-mail: xglin@issas.ac.cn

多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类主要由人类生产生活产生的稠苯类化合物, 一般具有致癌、致畸和致突变的三致效应, 是土壤及地下水环境中重点管控污染物<sup>[1]</sup>。高分子量多环芳烃(四环及以上), 生物利用性低, 在土壤中更易于持久残留, 成为 PAHs 污染土壤修复的重点与难点。

共代谢是指添加另一种化合物作为碳源促进微生物降解有机物的过程, 是提高 PAHs 生物降解的常用手段之一。已知的 PAHs 共代谢底物包括: 简单的有机酸 (如水杨酸、邻苯二甲酸、香草酸)<sup>[2,3]</sup>、低分子量 PAHs (如萘、芴、菲)<sup>[4]</sup>、石油烃等。李政等人发现<sup>[4]</sup>, 芴、菲可以将芘的降解效率提高 35% 左右, 并且芴和菲还能加速芘中间产物的去除, 减少环境的二次污染。对比不同类型的共代谢底物, 小分子多环芳烃的共代谢效果甚至可能优于有机酸<sup>[5]</sup>, 菲可以将红壤中的苯并[a]芘的转化率提高至 70%, 显著高于对照 (50%), 而邻苯二甲酸对红壤 BaP 降解率影响不明显。有研究者认为共代谢底物的结构是影响 PAHs 效率的重要因素: 底物与污染物结构相似性越高, 共代谢发生的概率越大<sup>[6]</sup>。底物在降解过程刺激相关功能菌的生长, 进而影响相关功能酶活性, 例如萘、菲能够提高多酚氧化酶活性<sup>[7]</sup>、木质素则增强原儿茶酸-4,5-双加氧酶<sup>[3]</sup>等, 这些非特异性酶类增强表达可转化高环 PAHs, 从而促进微生物共代谢降解。

污染物进入土壤除了被微生物降解矿化形成 CO<sub>2</sub> 外, 还会与土壤有机质结合生成结合态残留<sup>[8]</sup>, 这两种去向都可以促进土壤中污染物的解毒, 但背后的机理及对环境的影响存在差异, 其中矿化是污染物最彻底的解毒方式。目前, PAHs 共

代谢降解作用机制多在模拟体系下进行, 而在真实土壤介质中开展的研究相对较少。Sun 等人研究发现, 尽管香草酸是木质素的单体, 两者有类似的结构单元, 对微生物的影响有相似之处, 但两者对苯并[a]蒽 (Benzo[a]anthracene, BaA) 的环境归趋影响存在差异: 木质素主要促进 BaA 土壤结合态的生成, 而香草酸可以提高 BaA 的矿化率<sup>[3]</sup>, 这种差异可能来自于微生物群落及代谢途径。微生物是污染物降解的主要驱动力, 也是影响污染物环境归趋的重要因素<sup>[9]</sup>, 共代谢底物对微生物的影响会改变污染物的降解过程及环境去向。尽管有研究者认为共代谢底物与污染物结构类似时, 更易促进污染物的降解, 但其中的机制仍有待进一步探索。本研究中选择菲、蒽、芘三种多环芳烃作为共代谢底物, 以 BaA 为土壤中代表性的难降解 PAHs 污染物, 分析共代谢底物结构对 BaA 在各处理土壤组分间分配及土壤细菌群落响应, 为发展高分子量 PAHs 污染土壤共代谢修复技术提供支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

采集南京梅山宝钢周边的农田表层土壤 (31.90° N, 118.61° E), 土壤性质如表 1 所示, 挑出植物根系, 风干、磨碎、过 2 mm 筛备用。菲、蒽、芘、苯并[a]蒽购自 Sigma-Aldrich 公司, [7, 12-<sup>14</sup>C] 苯并[a]蒽 (购自于 American Radiolabeled Chemicals, Inc. Missouri, USA), 污染物提取过程中所用到的试剂 (如二氯甲烷、正己烷等) 均购自于国药。FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soils 试剂盒 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) 用于提取土壤中微生物的 DNA。

表 1 供试土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of applied soil

	pH	电导率 ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	有机质 ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	总氮 ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	总钾 ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	$\text{NH}_4^+$ ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	$\Sigma\text{PAHs}$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
土壤	6.0	46.4	24	1.3	16.2	169.0	3.0	1.3

## 1.2 实验方法

人工污染土壤的配制：称取适量的带标记和未标记的苯并[a]蒽，混合后溶于丙酮，配制成  $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $33\text{ kBq}\cdot\text{mL}^{-1}$  苯并[a]蒽溶液，将上述溶液以 10% 的比例，少量多次分别加入供试土样中并搅拌均匀，得到  $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $3.3\text{ kBq}\cdot\text{g}^{-1}$  的苯并[a]蒽污染土壤。用相似的方法分别配制未标记的菲 ( $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、蒽 ( $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、芘 ( $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 污染土壤，将以上人工污染土壤置于通风橱中挥发丙酮过夜。称取苯并[a]蒽污染土壤 1 g、菲污染土壤 1g 及未污染的土样 3g 土壤于矿化管中并混合均匀，得到苯并[a]蒽（终浓度  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ）、菲（终浓度  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ）混合污染土壤。用相同的方法配制蒽-苯并[a]蒽及芘-苯并[a]蒽混合污染土壤。调节含水量至土壤最大持水量的 60%， $28\text{ }^\circ\text{C}$  暗室恒温培养 2 个月。矿化管用橡胶塞封口，并在橡胶塞下悬挂一小塑料小管，其中装入  $1\text{ mL } 1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 溶液，用于吸收释放的  $\text{CO}_2$ 。培养结束后，用液体闪烁分析仪（LSC，Beckman-Coulter, USA）测定 NaOH 中  $^{14}\text{CO}_2$  的含量，收集培养的土壤，一部分风干后分析污染物在不同组分间的分配，另一部分土壤于  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  分析微生物群落。

## 1.3 多环芳烃可提取态和结合态的测定

污染物土壤可提取态：将风干后的土壤研磨过 20 目筛，取  $2.0\text{ g}$  过筛土壤，置于索氏提取仪中，二氯甲烷提取 24 h。旋转蒸干二氯甲烷后加入  $2\text{ mL}$  环己烷溶解 PAHs，C-18 柱 ( $3\text{ mL} : 0.5\text{g}$ ) 固相萃取法纯化浸提液，洗脱液（正己烷：二氯甲烷=1：1）。得到可提取态的污染物，取  $1\text{ mL}$  洗脱液测定标记量。

胡敏素结合态：将二氯甲烷提取后的土样风干，取  $1.5\text{ g}$  该土样于  $10\text{ mL}$  的离心管中，在氮气保护的状态下加入  $6\text{ mL } 0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 溶液。 $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  速度振荡 24 h 后， $16,000\text{ g}$  离心 30 min (Eppendorf 5804R, 德国)，沉淀为胡敏素，上清液为腐殖酸与富里酸的混合溶液。尽量倒尽剩余提取液，将沉淀（胡敏素）冷冻干燥后（完全去水），取约  $0.5\text{ g}$ （计量）碾磨样品燃烧法测定标记量

腐殖酸与富里酸结合态：取出上述富里酸+腐殖酸提取液（约  $4\text{ mL}$ ），吸取  $0.5\text{ mL}$ （计量）测定标记，得到混合溶液的标记量。另取  $2\text{ mL}$ （计量）上述腐殖酸与富里酸混合溶液，加入  $6\text{ mol/L HCl}$  调节至  $\text{pH}=1.0$ ， $4\text{ }^\circ\text{C}$  沉淀 24 h。 $5,100\text{ g}$  离心 10 min，吸取上清测定即为富里酸结合态的标记物。

NaOH 溶液、富里酸溶液、混合溶液（富里酸、腐殖酸）中的标记物含量，用 LSC 直接测定得到，将混合溶液的标记量减去富里酸溶液的标记量得到腐殖酸中的标记物含量；胡敏素中的标记量用生物氧化燃烧仪（OX-500; Zinsser Analytic, 德国）在  $900\text{ }^\circ\text{C}$  下完全氧化 4 min，用  $15\text{ mL}$  的碱性放射性测定闪烁液（Oxysolve C-400; Zinsser Analytic, 德国）收集氧化后的气体，LSC 测定标记量，得到胡敏素中的标记物含量。

## 1.4 土壤 DNA 的提取及高通量测序

用 FastDNA® SPIN Kit for Soils 试剂盒（MP Biomedicals, Santa Ana, CA），提取土壤中总 DNA，具体操作步骤详见试剂盒说明书，用  $80\text{ }\mu\text{L}$  DES 缓冲液洗脱并用 NanoDrop ND-1000（NanoDrop Technologies, Wilmington, DE）测定 DNA 的浓度，提取



完成后-20 °C保存。

Illumina Miseq 高通量测序分析细菌群落: 细菌 16S rRNA 扩增引物为 519F/907R (CAGCMGCCGCGGTAAATWC/CCGTCAA TTCMTTTRAGTTT), 每个样品的上游引物序列中包含有 5 bp 的特异标签序列 (Barcode) 用于区分不同样品。PCR 扩增条件为: ① 95 °C 5min, ② 95 °C 45 s, ③ 57 °C 45 s, ④ 72 °C 1 min (第二步到第四步 35 个循环), ⑤ 72 °C 7 min。扩增完成后, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目标产物, PCR 产物用 Cycle Pure Kit (Omega, Georgia, USA) 进行纯化并测定浓度, 纯化步骤参见试剂盒说明书。取相同质量各样品的 PCR 产物进行混合, 使混合样品的 DNA 的总浓度达 100 ng。TruSeq™ DNA Sample Prep LT Kit 和 MiSeq Reagent Kit 进行 Illumina 上机测序前的预处理。

### 1.5 高通量测序结果分析

高通量测序得到的原始数据使用 Quantitative Insights into Microbial Ecology 1.9.0 (QIIME 1.9.0) 进行序列比对及聚类。将序列按 barcode 进行分组, 根据序列质量 (质量评分>25, 长度>200 bp) 筛选样品生成聚类单元 (OTU)。相似度高于 97% 的序列归为相同的 OTU, 并从每个 OTU 中挑选代表序列与 SILVA119 数据库进行比对归类,

得到 OTU 的分类信息。为减少细菌共生网络的复杂程度, 仅将相对丰度大于 0.1% 的 OTU 用于网络分析, 选择相关性 $|r|>97%$ 且显著性 $P < 0.05$ 的数值进行共生网络的构建。

### 1.6 数据处理

细菌群落非度量多维尺度分析 (NMDS) 用 R 软件中的 vegan 包进行计算, 使用 Bray-Curtis 距离。用 Gephi 软件绘制细菌共生网络并计算特征参数, 数据统计分析用 SPSS 20.0 进行计算, 并使用 Duncan 检验进行多重比较 ( $P < 0.05$ ), Origin 8.0 与 Sigmaplot 12.5 画图。

## 2 结果与分析

### 2.1 <sup>14</sup>C 可提取态的变化

用 LSC 法测定土壤可提取态、结合态、CO<sub>2</sub> 等不同组分中 <sup>14</sup>C 标记物的含量, 在微宇宙培养及提取过程中 <sup>14</sup>C 的回收率为 86.5% ~ 106.3%。经过 3 个月的培养, 在各处理中, 苯并[a]蒽中的 <sup>14</sup>C 主要以可提取态的形式残留在土壤中 (53.8% ~ 60.5%) (图 1)。对照中苯并[a]蒽的可提残留率最高, 为 60.5%, 加入菲、蒽及芘作为共代谢底物时, 土壤中可提取态苯并[a]蒽较对照降低, 分别降低了 6.7%、4.1% 和 5.7%, 说明菲、蒽和芘均可以提高 BaA 的去除效率。

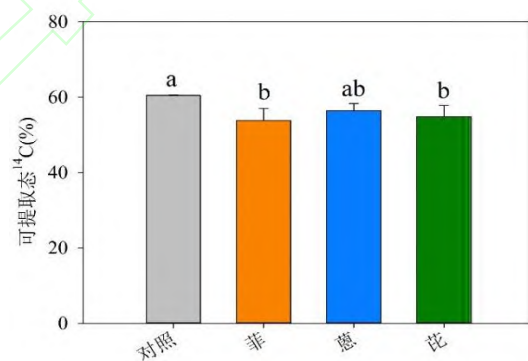


图 1 二氯甲烷可提取态 <sup>14</sup>C 含量

Fig. 1 The proportion of <sup>14</sup>C extracted by dichloromethane

注: 图中小写字母表示各组间的差异显著性; 菲表示 BaA 的共代谢底物为菲, 蒽表示 BaA 的共代谢底物为蒽, 芘表示 BaA 共代谢底物为芘, 下同

## 2.2 苯并[a]蒽矿化率及在土壤有机质组分间的分配

除了可提取态之外, 污染物在土壤中的去向还包括矿化生成  $\text{CO}_2$  及有机质结合态(胡敏酸、富里酸和胡敏素)。结果显示, 减少的苯并[a]蒽大部分结合进入了土壤有机质, 具体分布为: 胡敏酸中的结合量为 3.8% ~ 5.1%, 富里酸中的结合量为 2.3% ~ 2.7%, 胡敏素中的  $^{14}\text{C}$  结合量最高, 达 27.1% ~

31.7%, 而矿化生成  $\text{CO}_2$  的比例只占  $^{14}\text{C}$  总量的 5.4% ~ 7.9%, 远低于土壤有机质中的结合量, 说明在共代谢作用下土壤结合态降低污染物生物有效性仍是 BaA 主要的解毒机制, 共代谢作用对污染物土壤分配过程的影响有限。由于污染物结合量与有机质正相关, 而胡敏素是有机质中含量最高的组分<sup>[10]</sup>, 因此胡敏素成为多环芳烃土壤结合态的主要去向。

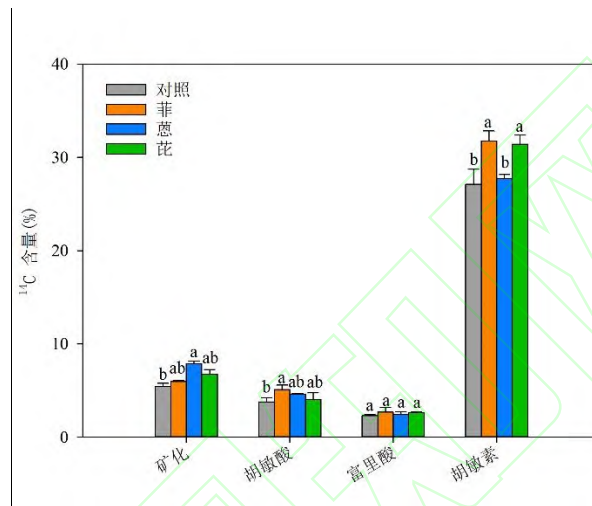


图 2 BaA 的矿化率及在土壤有机质中的分配

Fig. 2 Mineralization of BaA and the distribution of BaA in soil organic matters

注: 图中小写字母表示各组间的差异显著性

加入菲、葱和苳底物后均可以促进苯并[a]蒽矿化生成  $\text{CO}_2$  (图 2), 其中葱作为共代谢底物时, BaA 矿化率最高 ( $7.9\% \pm 0.3\%$ ), 比对照 ( $5.4\% \pm 0.3\%$ ) 提高了 2.5%, 葱能够提高微生物对 BaA 及其中间产物的分解及代谢能力; 菲、苳作为共代谢底物时, BaA 的矿化率无显著差异, 分别为  $5.9\% \pm 0.1\%$  及  $6.7\% \pm 0.5\%$ , 高于对照但不及添加葱作底物后 BaA 的矿化率。

在土壤有机质分配中, 共代谢能够促进苯并[a]蒽转化进入胡敏酸, 菲、葱、苳作为共代谢底物时,  $^{14}\text{C}$  在胡敏酸中的结合量分别为  $5.1\% \pm 0.5\%$ 、 $4.6\% \pm 0.05\%$ 、 $4.0\% \pm 0.7\%$ , 比对照 ( $3.8\% \pm 0.5\%$ ) 有所升高; 共代谢底物对 BaA 富里酸结合态的影响不大, 各处理之间无显著差异; 而三种共代谢

底物对污染物在胡敏素结合态的影响存在显著差异: 与对照 (27.1%) 相比, 葱对  $^{14}\text{C}$  在胡敏素结合态影响不大 (27.7%); 菲与苳则促进  $^{14}\text{C}$  在胡敏素中的结合, 污染物的结合量均升高至 31%, 比对照提高了约 4%。菲与苳对  $^{14}\text{C}$  结合量相当。由此可见, 葱对 BaA 的共代谢作用主要是促进其矿化, 菲、苳共代谢作用则主要增强 BaA 在土壤胡敏素组分中的结合, 不同 PAHs 共代谢对苯并[a]蒽环境分配存在差异。

## 2.3 土壤细菌群落的变化

高通量测序结果用 Silva 119 数据库比对后发现, 细菌群落主要由酸杆菌门 (Acidobacteria, 22%)、放线菌门 (Actinobacteria, 9%),  $\alpha$ -变形菌门 (Alphaproteobacteria, 15%)、 $\beta$ -变形菌门

(Betaproteobacteria, 12%) 组成。各处理之间群落组成与分异不明显 (图 3a, 3b), 多样性也无统计学差异 (图 3c), 说明少量的共

代谢多环芳烃对土壤中的微生物群落结构的影响较小。

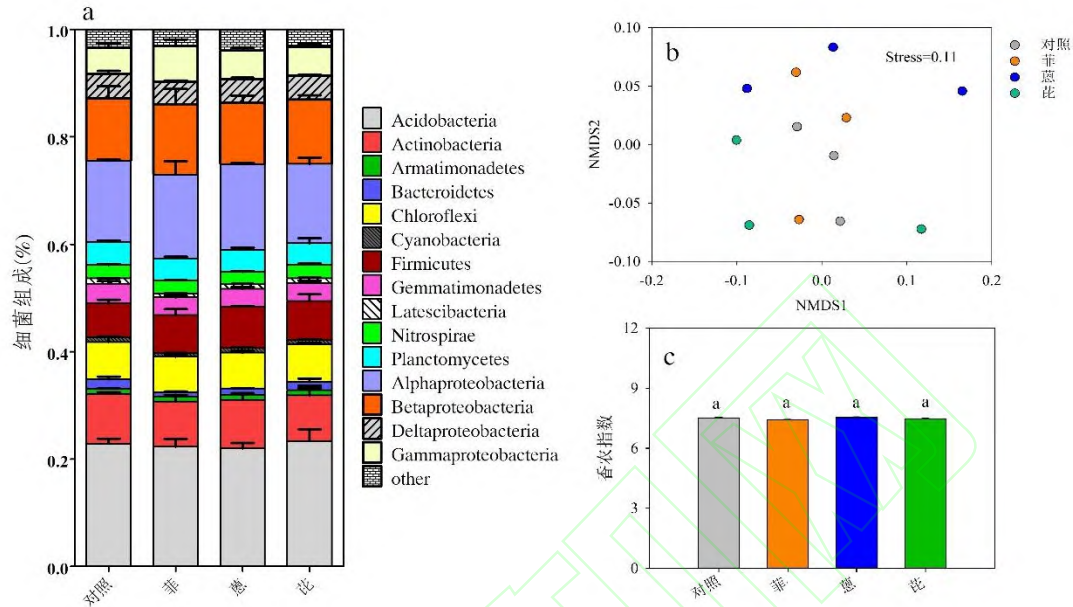


图 3 土壤中细菌群落组成及多样性。

Fig. 3 The composition and diversity of bacterial community in soils.

a: 细菌群落组成; b: 非度量多尺度分析; c: 香农指数

注: 图 c 中小写字母 a 表示各组间无显著差异

## 2.4 细菌群落共生网络

通过分析细菌共生网络, 进一步研究细菌物种之间的相互联系。结果显示尽管菲、萘等共代谢底物对土壤细菌组成及群落影响较小, 却能改变土壤细菌共生网络结构 (表 2)。相较于对照组, 萘作为共代谢底物时, 物种间的正相关连接比例显著升高 (72%), 并占主导地位, 而网络中的节点数 (112)、连接数 (325)、网络密度 (0.052) 及负相关连接比例 (27%) 则明显下降, 提示在萘共代谢作用下, 土壤中微生物之间的共生关系增强<sup>[15]</sup>, 共生网络变得简单; 相反地, 添加菲与蒽参与代谢时, 网络中的节点数 (136 ~ 139)、连接数 (737 ~ 731)、网络密度 (0.077 ~ 0.08) 等参数均比对照有所增加, 共生网络更加复杂, 而负连接比例有所升高, 说明微生物的竞争关系可能变得激烈。

## 2.5 关键物种分析

在细菌共生网络中, 通常以度 (Degree) 及中心性 (Betweenness centrality) 来指示关键物种<sup>[20]</sup>, 在对照中, 网络中主要的关键节点包括放线菌门 (Actinobacteria), 变形菌门 (Proteobacteria), 添加共代谢底物后, 网络中的关键节点以变形菌门细菌为主 (图 4)。具体到物种而言, *Variibacter* sp. (变形菌门) 在共代谢作用中与其它物种的联系最密切, 提示其在网络中发挥了重要的作用。Burkholderiales, Xanthobacteraceae 等分类下的部分细菌在萘/菲等共代谢作用下成为关键物种 (表 3), 常见的多环芳烃降解菌株许多属于这些菌属中, 推测这些细菌可能与 PAHs 降解相关。当然, 目前的结论都是基于统计学的推理, 对于实际参与 PAHs 降解的微生物, 还需要结合其它手段进行深入研究, 如稳定性同位素示踪 DNA-SIP、PLFA-SIP 等方法。

表 2 细菌共生网络特征参数

Table 2 The characteristic parameter of bacterial co-occurrence network

	对照	菲	葱	芫
节点	128	139	112	136
连接	581	737	325	731
正相关连接	370(64%)	444(60%)	237(73%)	448(61%)
负相关连接	211(36%)	293(40%)	88(27%)	283(39%)
平均度	9.08	10.60	5.80	10.75
网络密度	0.071	0.077	0.052	0.08
模块性	0.51	0.56	0.66	0.58
平均聚类系数	0.37	0.43	0.49	0.46
平均路径长度	3.25	3.01	4.92	3.54

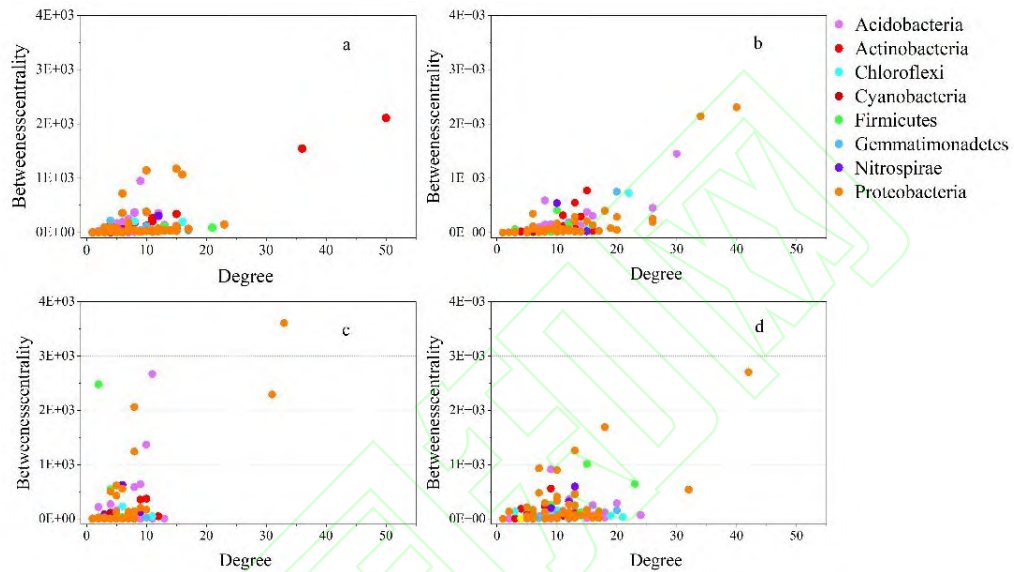


图 4 细菌关键物种分析.

Fig. 4 Keystone species analysis.

a: 对照; b: BaA 共代谢底物为菲; c: BaA 共代谢底物为葱; d: BaA 共代谢底物为芫

表 3 关键微生物信息

Table 3 Keystone species in microbial network

	物种编号	门	纲	目	丰度
对照	DM040593.1.1372	Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	0.47%
	AB672250.1.1470	Actinobacteria	Thermoleophilia	Gaiellales	0.28%
	FJ802355.1.1257	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	1.28%
	EU193117.1.1497	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	0.27%
菲	FJ802355.1.1257	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	1.40%
	GQ262821.1.1412	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	0.92%
	FM872961.1.1506	Acidobacteria	Subgroup 6	-	0.12%
葱	LN563821.1.1379	Actinobacteria	Thermoleophilia	Gaiellales	0.08%
	FJ802355.1.1257	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	1.24%
	GQ262821.1.1412	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	0.95%
芫	EF018161.1.1366	Proteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiales	0.16%
	FJ802311.1.1212	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	0.26%
	GQ262821.1.1412	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	1.07%
	EU134742.1.1342	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	0.34%
	EU881128.1.1451	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	0.15%
	AM934816.1.1335	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	0.08%



### 3 讨论

#### 3.1 多环芳烃共代谢底物结构影响 BaA 环境归趋

共代谢主要是通过底物刺激微生物中相关酶或辅助因子,提高对污染物的转化能力。尽管一般利用低分子量 PAHs 可以作为共代谢底物促进高分子量多环芳烃降解<sup>[7]</sup>,而底物分子量对共代谢作用的影响可能较小。芘作为一种高分子量的 PAHs,同样可以增强苯并[a]蒽的去除。除此之外,木质素作为一种生物大分子聚合物,也是 PAHs 降解的共代谢底物之一<sup>[3]</sup>,底物结构或是影响共代谢作用的主要因素。

不同共代谢底物对 BaA 环境归趋的影响存在差异:蒽主要促进了 BaA 的矿化,而菲、芘则提高污染物在土壤有机质中的结合。多环芳烃在土壤中的代谢途径及相关的功能酶类多样<sup>[11]</sup>,然而苯并[a]蒽与蒽可能存在相似的代谢途径:苯并[a]蒽的代谢产物包括 1,2-二羟基蒽、1-羟基-2-羧基蒽等<sup>[12]</sup>,而蒽降解也可能产生 1,2-二羟基蒽等中间产物<sup>[13]</sup>,因此蒽降解过程中产生酶类,无论是特异性的还是非特异性的,或都可以直接代谢 BaA 中间产物,从而增强了 BaA 的矿化;菲、芘的代谢过程则与苯并[a]蒽差异较大<sup>[14]</sup>,降解菲、芘过程中产生的功能酶或细菌对苯并[a]蒽及其相关中间产物的特异性可能不足,因此 BaA 转化极性产物后难以继续分解,而生成结合态残留在土壤中。推测当底物与污染物结构相似性高时可能更易促进污染物的矿化;而结构相似性低时则主要促进污染物的土壤结合。

#### 3.2 多环芳烃共代谢改变土壤细菌的共生网络

添加少量的多环芳烃共代谢底物对土壤中微生物群落的影响较小,各处理中细菌群落组成、结构以及多样性均无显著差异。可能一方面由于实验中的共代谢底物菲、蒽、芘在土壤中的含量( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )远低于苯并[a]蒽( $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),另一方面菲、蒽、

芘降解速度比苯并[a]蒽快,经 90 天的培养后,底物已完全降解,只有 BaA 仍残留在土地壤中,因此微生物群落主要受苯并[a]蒽影响,各处理之间细菌群落组成及多样性的差异较小。

尽管底物对土壤中细菌群落组成的影响较小,但共代谢底物显著改变了细菌的共生网络。在共生网络中,模块性(modularity)是网络拓扑结构的另一个重要的指标,一组紧密联系的功能基因或微生物形成一个模块,modularity 与功能相关<sup>[16]</sup>。当 modularity > 0.4 时,网络呈模块结构(modular structure);而 modularity < 0.4 时,则属于随机性网络。添加蒽为底物时 modularity 为 0.66 显著高于对照(0.51),而菲与芘作为底物时,两者 modularity 类似,分别为 0.56 与 0.58,比对照中也所升高。代谢过程及产物是影响网络 modularity 的重要因子<sup>[17,18]</sup>,蒽与苯并[a]蒽可能有相同的代谢产物及相似的代谢途径,因此微生物物种间的协作、共生关系增加,网络结构中的 modularity 显著升高;而菲、芘虽能促进双加氧酶等功能基因的富集<sup>[9,19]</sup>,但菲、芘与 BaA 代谢途径的不同或使得网络的复杂程度升高,菌群之间对底物的竞争变强,而对 BaA 及其中间产物降解能力不足,或导致菲、芘促进了  $^{14}\text{C}$ -BaA 在土壤结合态的生成。添加共代谢底物后,细菌共生网络的变化与污染物环境归趋具有一致性,从结果推测底物结构的差异改变了微生物的协作关系并最终影响污染物在土壤中的分配,底物与污染物结构相似性越高,可能促进污染物的矿化。

### 4 结论

共代谢底物菲、蒽、芘均可促进苯并[a]蒽的去除,其中蒽主要促进 BaA 的矿化,菲、芘则增强 BaA 在土壤有机质中的结合。添加蒽作为共代谢底物时,细菌共生网络的模块性显著增强、细菌物种间以共生关系为主;而菲、芘作为共代谢底物时,共生网络的模块性比对照升高但不及蒽的作用,细菌

物种间竞争变得激烈。推测共代谢底物与 PAHs 结构相似时可促进污染物的矿化，而底物与 PAHs 结构不同时降解途径存在差异，共代谢则促进 BaA 的土壤结合，本研究为研究共代谢影响多环芳烃降解机制提供了依据。

## 参考文献

- [1] 土壤环境质量 农用地土壤污染风险管控标准 (GB15618-2018) 2018.
- [2] Gong, ZQ., Li, PJ., Wang, X., Tai, PD., et al. Effects of aromatics on the degradation of benzo(a)pyrene in slurry reactors[J]. Huanjing Kexue, 2002, 23:69-73.
- [3] Sun, Y., Liu, LM., 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]. Soil Biology and Biochemistry, 2020, 149:107908.
- [4] 李政, 顾贵洲, 赵朝成等. 高相对分子量多环芳烃的生物共代谢降解[J]. 石油学报, 2015, 31(3).
- [5] 刘世亮, 骆永明, 吴龙华等. 真菌对污染旱地红壤中苯并[a]芘共代谢研究[J]. 环境科学, 2010, 31:1944-1950.
- [6] Nzila, A. Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria[J]. Environmental Pollution, 2013, 178:474-482.
- [7] 刘世亮, 骆永明, 吴龙华等. 污染土壤苯并[a]芘的微生物共代谢修复研究[J]. 土壤学报, 2010, 47:364-369.
- [8] Kaestner, M., Nowak, K.M., Miltner, A., et al. Classification and modelling of non-extractable residue (NER) formation of xenobiotics in soil – A synthesis[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2014, 44, 2107-2171.
- [9] Zhu, QH., Wu, YC., Zeng, J., et al. Influence of bacterial community composition and soil factors on the fate of phenanthrene and benzo[a]pyrene in three contrasting farmland soils[J]. Environmental Pollution, 2019, 247:229-237.
- [10] Hayes, MHB., Mylotte, R., Swift, RS. Humins: Its composition and importance in soil organic matter[J]. Advances in Agronomy, 2017, 143, 47-138.
- [11] Kim SJ, Kweon O, Jones R C, Freeman JP, Edmondson RD, Cerniglia CE (2007) Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology[J]. Journal of Bacteriology, 189: 464-472.
- [12] Tian, ZY., Vila, J., Yu, M., et al. Tracing the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil using stable isotope-assisted metabolomics[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2018,5:103-109.
- [13] Kweon, O., Kim, SJ., Kim, DW., Kim JM., et al. Pleiotropic and epistatic behavior of a ring-hydroxylating oxygenase system in the polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic network from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1[J]. Journal of Bacteria, 2014, 196:3503-3515.
- [14] Li, XZ., Pan, YS., Hu, S., et al. Diveristy of phenanthrene and benz[a]anthracene and benz[a]anthracene metabolic pathways in white rot fungus *Pycnoporus sanguineus* 14[J]. International biodeterioration & Biodegradation, 2018, 134:25-30.
- [15] 李东, 肖娴, 孙波, 梁玉婷. 水热增加下黑土细菌群落共生网络特征[J]. 微生物学报, 2021.
- [16] Zhou, JZ., Deng, Y., Luo, F., et al. Functional Molecular Ecological Networks[J]. mBio, 2010, 1:e00169-10.
- [17] Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., et al. Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities[J]. Proceeding of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2015, 12:6449-6454.
- [18] Ravasz, E., Somera, AL., Mongru, DA., et al. Hierarchical organization of modularity in metabolic network[J]. Science, 2002, 297:1551-1555.
- [19] Ren, GD., Teng, Y., Ren, WJ., et al. Pyrene dissipation potential varies with soil type and associated bacterial community changes[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2016, 103:71-85.
- [20] Tipton, L., Mueller, CL., Kurtz, ZD., et al. Fungi stabilize connectivity in the lung and skin microbial ecosystems[J]. Microbiome, 2018, 6:12.

**致谢:** 本研究中涉及的  $^{14}\text{C}$  同位素示踪相关试验在南京大学季荣教授实验室完成, 在此感谢季老师及课题组成员的大力支持。

**作者简介:** 朱清禾 (1986-), 女, 江苏人, 博士, 主要从事有机污染物降解相关研究。