

不同质量浓度六氯苯胁迫下狭叶香蒲根系 生物膜细菌群落结构研究*

陈海娇, 付如鹏, 何秀梅, 张晋瑞, 钟媛, 余娇娇**

(玉溪师范学院 化学生物与环境学院, 云南 玉溪 653100)

摘要:【目的】研究不同质量浓度六氯苯(hexachlorobenzen, HCB)胁迫下狭叶香蒲(*Typha angustifolia*)根系生物膜菌群结构。【方法】利用扫描电镜观察不同质量浓度(38和760 μg/L)HCB富营养化水体中香蒲根系生物膜的形态结构;采用高通量测序技术对细菌16S rDNA基因进行序列测定。【结果】电镜结果显示:根系生物膜附着微生物主要呈椭圆形或杆状。经不同质量浓度HCB处理后,狭叶香蒲根系附着微生物的数量明显增加,随着水体HCB质量浓度升高其根系生物膜中的细菌数量降低。高通量测序结果表明:根系生物膜的优势菌门是变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝藻菌门(Cyanobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)等。属水平优势菌群主要包括3类:(1)高效净化水质的光合菌群,如红微菌属(*Rhodomicrobium*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、红长命菌属(*Rubrivivax*)、红芽生菌属(*Rhodoblastus*)和红细菌属(*Rhodobacter*)等;(2)以丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、嗜酸菌属(*Acidovorax*)等为主的有机物降解微生物;(3)参与脱氮和氮循环的反硝化菌群,如贪噬菌属(*Variovorax*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、红细菌属(*Rhodobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和红长命菌属(*Rubrivivax*)等。PICRUST功能预测结果表明:根系生物膜中菌群的主要代谢功能是碳水化合物、氨基酸以及能量代谢。【结论】38 μg/L HCB的富营养化水体中狭叶香蒲根系细菌群落的丰富度和多样性均高于760 μg/L HCB的富营养化水体根系细菌群落。此外,属水平优势菌群可能与富营养化水体的水质净化、有机物降解以及脱氮和氮循环有关。研究结果为富营养化水体有机污染物的去除机制提供了理论基础。

关键词:富营养化水体;六氯苯;狭叶香蒲;生物膜;菌群结构

中图分类号: X 524

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X(2021)06-1083-09

Study of Bacterial Community Structure in Biofilm of *Typha angustifolia* Roots under Different Mass Concentrations Hexachlorobenzen Stress

CHEN Haijiao, FU Rupeng, HE Xiumei, ZHANG Jinrui, ZHONG Yuan, YU Jiaojiao

(School of Chemical Biology and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China)

Abstract: [Purpose] To study the bacterial community structure in the biofilm of *Typha angustifolia* under different mass concentrations hexachlorobenzen (HCB) stress. [Method] Biofilm morphology on root of *T. angustifolia* was monitored by using SEM and 16S rDNA gene of the bacteria

收稿日期: 2020-08-05

修回日期: 2021-06-14

网络首发时间: 2021-11-22 16:13:23

*基金项目: 云南省大学生创新创业训练计划项目(2019A11); 云南省地方本科高校联合面上项目(2018FH001-041, 2017FH001-043); 云南省地方本科高校联合重点项目(2017FH001-125)。

作者简介: 陈海娇(1999—), 女, 云南曲靖人, 在读本科生, 主要从事污染控制与生态修复研究。

E-mail: 1256281253@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 余娇娇(1983—), 女, 云南保山人, 博士, 讲师, 主要从事污染控制与生态修复研究。E-mail: jiaojiaoyu@yxnu.edu.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20211122.0936.001.html>



by high-throughput sequencing used root samples under different mass concentrations (38 and 760 $\mu\text{g/L}$) HCB stress. [Result] The results of SEM showed that the microorganisms attached to the root biofilm were elliptic or rod-shaped. After different mass concentrations of HCB treatment, the amount of microorganisms attached to *T.angustifolia* roots increased obviously, with the increase of HCB mass concentration in water, a small quantity of bacteria inhabited the biofilm. The results of high-throughput sequencing revealed that the dominant phyla of bacteria were Proteobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria and Firmicutes. At the genus level, the dominant bacteria mainly included three categories: 1) photosynthetic bacteria of efficient water purification, such as *Rhodomicrobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rubrivivax*, *Rhodoblastus* and *Rhodobacter*; 2) organic pollutant-degrading bacteria population, including *Comamonas*, *Variovorax*, *Acinetobacter* and *Acidovorax*; 3) denitrifying bacteria population, which joined denitrification and nitrogen cycle, such as *Variovorax*, *Comamonas*, *Desulfovibrio*, *Rhodobacter*, *Acinetobacter*, *Mesorhizobium* and *Rubrivivax*. PICRUSt functional prediction showed that bacteria in the biofilm had strongest functions in carbohydrate, amino acid and energy metabolism. [Conclusion] The abundance and diversity of bacterial communities in the biofilm under 38 $\mu\text{g/L}$ HCB were higher than 760 $\mu\text{g/L}$ HCB treatment. In addition, the dominant bacteria at the genus level may be related to eutrophication water purification, organic degradation, denitrification and nitrogen cycle. These results provide a theoretical basis for the removal mechanism of pollutants in eutrophic water.

Keywords: eutrophic water; hexachlorobenzene; *Typha angustifolia*; biofilm; bacterial community structure

水生大型植物是水生生态系统的重要组成部分,可吸收水体和沉积物中的养分和重金属等无机或有机污染物^[1],对湿地生态系统水质的改善起着至关重要的作用^[2]。六氯苯(hexachlorobenzene, HCB)是淡水中的主要有机环境污染物之一,已被中国、日本和美国等多个国家优先划分为持久性有机污染物^[3]。由于 HCB 具有亲脂性,其随空气和废渣等排放进入环境后易聚集在土壤和地下水中,并通过食物链进入生物体内,严重威胁人类健康和生态系统安全^[4]。此外, HCB 具有持久性,光解和化学方法很难对其降解。近年来,生物修复技术被广泛应用于环境有害污染物的分解。研究结果显示:湿地植被中 HCB 含量较低,50% 的 HCB 降解时间约为 28~58 d^[5-6]。水生植物根际微生物在 HCB 污染修复中发挥了关键作用^[7]。水培试验表明: HCB 胁迫下,水体中的优势菌是变形菌门和厚壁菌门,且与 HCB 的根际降解密切相关^[8];研究人工湿地 HCB 根际降解过程中细菌群落的结构与功能发现:厚壁菌门在细菌群落中占主导地位, HCB 的降解菌主要有假单胞菌属、产碱杆菌属、伯克霍尔德杆菌属、梭状芽孢杆菌属和蜡状芽孢杆菌属,它们参与

HCB 的降解或具有降解 HCB 中间产物以及矿化低级氯化联苯的功能^[9-11]。张文静等^[12]从底泥筛选出对 HCB 具有高效降解能力的厌氧菌群,对 1 mg/L HCB 的降解率高达 95.6%,且该混合菌群对 HCB 的耐受能力高达 60 mg/L。这在一定程度上说明生物降解 HCB 可能需要多种微生物参与,细菌多样性和丰富度越高,越有利于 HCB 降解^[9]。

在水生生态系统中,细菌经常出现在如生物膜(又称附生微生物)、湖泊或海雪表面^[13]。与生物膜形成相关的细菌大量富集在可获取养分的中间体,而低或高的营养条件都有利于浮游菌的生长^[14]。生物膜不仅在非生物表面形成,也在水生植物和藻类等生物表面形成^[15]。水生植物是空间异质性的的重要组成部分,而空间异质性对水生生态系统生物膜的建立和发展至关重要^[16]。生物膜的功能通常由其生物多样性和细菌种类决定^[16]。研究结果显示:附生微生物具有多样性和寄主特异性^[17-18],而大型水生植物的生长状态和分泌物可以影响生物膜和沉积物中细菌的组成^[15,19]。高通量测序结果显示:附生生物膜中的细菌群落结构不同于周围水体^[20]。然而,在高通量测序水平上,鲜有关于湿地生态系统中水生植物根际生物

膜菌群结构和功能的报道。

近年来,湿地通过种植大量水生植物对湿地生态系统进行修复,从而改善湿地水质和生物多样性。为研究湿地水生植物根系生物膜的形态结构和细菌群落组成,本研究以常见水生净化植物狭叶香蒲为湿地典型植物,构建人工湿地微系统,采集富营养化水体中经不同质量浓度 HCB 处理后的狭叶香蒲根系和沉积物,利用扫描电镜和 16S rDNA 测序方法分析其生物膜的形成及根系菌群结构。本研究结果有助于进一步认识水生植物在湿地功能中的作用,可为富营养化水体有机污染物的去除机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 HCB 污水制备

将 HCB 标准品 1 g (分析纯,纯度 99.50%) 溶于正己烷 1 000 mL 中配制出 1 000 mg/L 的母液,再用富营养化水体(来自玉溪师范学院地海)稀释得到质量浓度为 38 和 760 $\mu\text{g/L}$ 的水体(即 R38 和 R760),充分混匀后室温放置,使用时检测水体中 HCB 的初始质量浓度分别为 26 和 588 $\mu\text{g/L}$ 。

1.2 水生植物湿地系统构建及样品采集

狭叶香蒲 (*Typha angustifolia*) 为选自玉溪师范学院温室内长期繁育的种苗。选取 5 株高约 20 cm 的狭叶香蒲均一苗种植在 40 cm $\times$ 30 cm $\times$ 50 cm (长 $\times$ 宽 $\times$ 高) 的根箱中,根箱内自上而下依次为水层 15 cm (用富营养化水补充其蒸发量)、直径约 0.3 cm 的砂砾 10 cm 和直径约 3 cm 的碎石 20 cm。R38 和 R760 处理各设置 9 个生物学重复,未添加 HCB 的富营养化水体设为对照组 (CK)。在狭叶香蒲生长茂盛的 7 月采集样品,用灭菌剪刀分别剪取 R38、R760 和 CK 处理的香蒲根系用于扫描电镜观察和高通量测序。

1.3 电镜扫描观察

取新鲜狭叶香蒲根系用灭菌刀片切成长约 0.5 cm 的小块,用乙醇进行梯度脱水(乙醇含量依次为 30%、50%、70%、80%、90% 和 100%),每个梯度脱水 15 min,最后用 100% 乙醇浸泡 15 min 后转移到冷冻干燥仪中干燥约 1 h^[16]。将干燥的样品用镊子粘贴到观察台并真空喷金,用扫描电镜(日立 S-4800)在放大倍数 1 500 $\times$ 、3 000 $\times$ 和 3 500 $\times$ 下对狭叶香蒲根系以及基质的生物膜形态进行观察并拍照。

1.4 Illumina 高通量测序

1.4.1 细菌 16S rDNA-V3V4 区的 PCR 扩增及测序

取新鲜狭叶香蒲根系,其生物膜的总 DNA 提取根据 Power Biofilm DNA 试剂盒 (MoBio Laboratories, USA) 的操作说明书进行,利用细菌 V3V4 区通用引物 338F: ACTCCTACGGGAGG-CAGC 和 806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT 扩增目的片段,PCR 扩增体系 50 μL : 10 $\times$ Buffer 5 μL , 引物各 1 μL , 模板 1 μL , 2.5 mmol/L dNTP 4 μL , 5 U/ μL NEB *Taq* 0.25 μL , 无菌水 37.75 μL 。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 30 个扩增循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min), 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min^[16]。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至上海派森诺生物科技股份有限公司测序,测序平台为 Illumina Miseq。

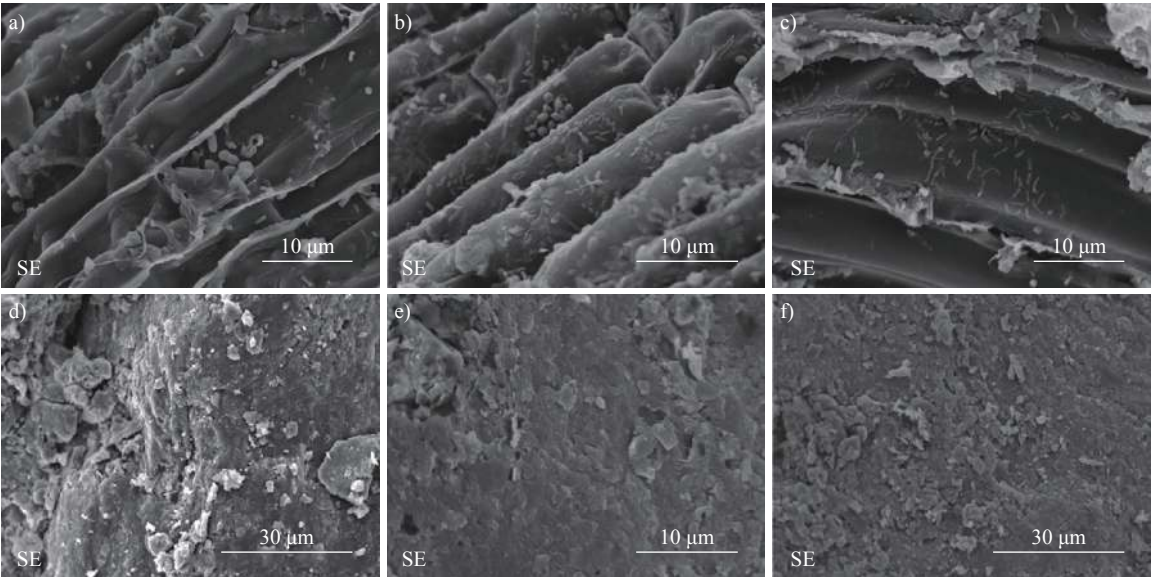
1.4.2 数据处理和分析

测序原始数据利用滑动窗口法筛查质量,舍弃小于 150 bp 的低质量序列,使序列长度集中在 401~450 bp。利用 FLASH v1.2.7 (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) 对通过质量筛查的序列进行配对连接,获取每个样品的有效序列。有效序列按 97% 的序列相似度进行可操作分类单元 (OTU) 划分,对每个样本的序列总数随机抽样,并将抽取到的序列数及其对应的 OTU 数绘制稀疏曲线。利用 QIIME 软件计算样品的 Alpha 多样性指数 (包括 Chao 1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数),其中 Chao1 指数和 Shannon 指数值越高,分别代表群落物种的丰富度和多样性越高。使用 R 软件对丰度前 50 位的属进行聚类分析并绘制热图。利用 PICRUST 工具对 16S rDNA 基因测序数据与代谢功能已知的微生物参考基因组数据库进行比对,预测根系生物膜中菌群的主要代谢功能。

2 结果与分析

2.1 狭叶香蒲根系生物膜中细菌的特征

如图 1 所示:在富营养化水体中,对照根系表面栖息着少量细菌,形态主要呈椭圆形,少量呈杆状;富营养化水体经 38 $\mu\text{g/L}$ HCB 处理后,狭叶香蒲根系细菌数量急剧增加,大量细菌聚集分布,主要呈杆状或椭圆形,少量呈中央凹陷的圆饼状;富营养化水体经 760 $\mu\text{g/L}$ HCB 处理



注: a) CK, 根 (3 000×); b) 38 μg/L, 根 (3 500×); c) 760 μg/L, 根 (3 000×); d) CK, 基质 (1 500×); e) 38 μg/L, 基质 (3 500×); f) 760 μg/L, 基质 (1 500×)。
Note: a) CK, root (3 000×); b) 38 μg/L, root (3 500×); c) 760 μg/L, root (3 000×); d) CK, sediment (1 500×); e) 38 μg/L, sediment (3 500×); f) 760 μg/L, sediment (1 500×).

图 1 狭叶香蒲根系和基质中细菌的扫描电镜图

Fig. 1 Scanning electron micrographs of the epiphytic biofilm on the roots of *Typha angustifolia* and the sediment

后, 狭叶香蒲根系同样附着大量的微生物, 分布散乱, 主要呈杆状, 但数量明显低于 R38。此外, 富营养化水体经不同质量浓度 HCB 处理后, 水体中的基质表面未观察到微生物附着。

2.2 狭叶香蒲根系生物膜多样性分析

通过 Illumina Miseq 高通量测序并优化后, R38 和 R760 共获得 95 792 条序列, 序列长度主要集中在 401~450 bp, 占总序列数的 99.70%。如图 2 所示: 2 个处理的稀释性曲线均趋于平缓, 表明测序数据接近饱和, 测序深度能全面覆盖狭叶香蒲根系绝大多数细菌信息, 测序数据能够较好地反映根系样品中细菌群落组成。

由表 1 可知: 在富营养化水体中, R38 样品的 Chao 1 指数高于对照和 R760, 说明同一水体中, 不同质量浓度 HCB 处理导致生物膜细菌群落丰富度存在差异性变化; 各样品的 Shannon 指数大小为 CK<R760<R38, 表明 HCB 处理后会提高根系附着微生物的多样性, 但随着 HCB 质量浓度增大, 其根系样品中细菌多样性降低。本次测序对照样品获得 1 763 个细菌 OTU, R38 样品获得 2 257 个细菌 OTU, R760 样品获得 2 105 个细菌 OTU, 说明 38 μg/L HCB 富营养化水体中根系细菌种类较多, 随着水体 HCB 质量浓度升高其根系样品中细菌的种类降低。以上结果表明:

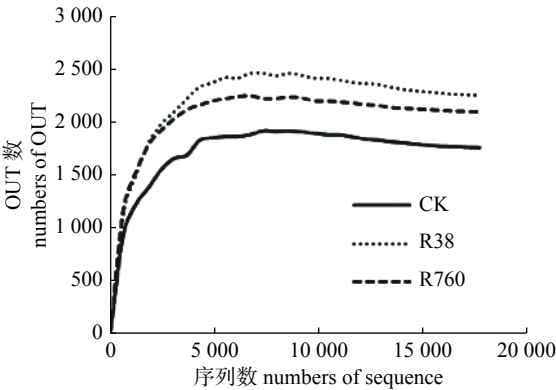


图 2 不同处理根系细菌 OTU 稀释曲线
Fig. 2 Rarefaction curves of root bacteria in different treatments

不同质量浓度 HCB 处理下, 狭叶香蒲根系细菌群落的丰富度和多样性均存在差异, 且 R38 处理下根系细菌群落的丰富度和多样性均高于 R760。

2.3 不同质量浓度 HCB 处理下狭叶香蒲根系细菌群落组成及功能预测

2.3.1 门水平上的细菌群落结构

在门水平上, CK、R38 和 R760 处理分别获得 30、35 和 33 个类群。将相对丰度<0.1% 的类群归类为其他, 可获得 19 个类群。由表 2 可知: 变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、蓝藻菌门

表 1 每个样品的细菌丰富度和多样性指数
Tab. 1 Bacterial abundance and diversity indexes of each sample

处理 treatment	指标 parameter				
	OTU数 OTU number	ACE指数 ACE index	Chao 1指数 Chao 1 index	Shannon指数 Shannon index	Simpson指数 Simpson index
CK	1763	1768.09	1763.09	8.20	0.974961
R38	2257	2271.44	2257.56	9.38	0.991876
R760	2105	2105.00	2105.00	9.27	0.990721

表 2 不同质量浓度 HCB 处理细菌门水平组成
Tab. 2 Bacterial community composition at
phylum level under different mass concen-
tration of HCB

门 phylum	CKR	R38	R760
变形菌门	55.2	52.6	49.0
Proteobacteria			
放线菌门	11.1	13.5	17.5
Actinobacteria			
绿弯菌门	4.8	9.3	8.8
Chloroflexi			
蓝藻菌门	9.9	6.0	6.6
Cyanobacteria			
厚壁菌门	9.8	4.5	4.7
Firmicutes			
拟杆菌门	4.5	4.5	4.7
Bacteroidetes			
酸杆菌门	1.2	2.4	2.0
Acidobacteria			
单糖菌门	0.9	1.9	1.8
Saccharibacteria			
螺旋菌门	0.7	0.7	0.4
Spirochaetae			
异域菌门	0.1	0.2	0.8
Peregrinibacteria			
懒杆菌门	0.1	0.4	0.3
Ignavibacteria			
小基因组菌总门	0.1	0.3	0.3
Microgenomates			
俭菌总门	0.2	0.3	0.2
Parcubacteria			
浮霉菌门	0.1	0.3	0.2
Planctomycetes			
疣微菌门	0.1	0.2	0.3
Verrucomicrobia			
绿菌门	0.1	0.2	0.2
Chlorobi			
芽单胞菌门	0.1	0.3	0.1
Gemmatimonadetes			
装甲菌门	0.1	0.2	0.2
Armatimonadetes			
其他 other	0.1	0.0	0.0

(Cyanobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 为 5 个主要的优势细菌群落。进一步的比较分析显示: R38 处理中变形菌门、蓝藻菌门和厚壁菌门的相对丰度分别比对照降低 2.6%、3.9% 和 5.3%, 其余多数类群的相对丰度均升高; R760 处理中变形菌门、蓝藻菌门、厚壁菌门和螺旋菌门 (Spirochaetae) 的相对丰度分别比对照降低 6.2%、

3.3%、5.1% 和 0.3%, 其余多数类群的相对丰度也均升高; 与 R38 处理相比, R760 处理的变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门 (Acidobacteria)、单糖菌门 (Saccharibacteria)、螺旋菌门、懒杆菌门 (Ignavibacteriae)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、俭菌总门 (Parcubacteria) 和浮霉菌门 (Planctomycetes) 的相对丰度均降低。

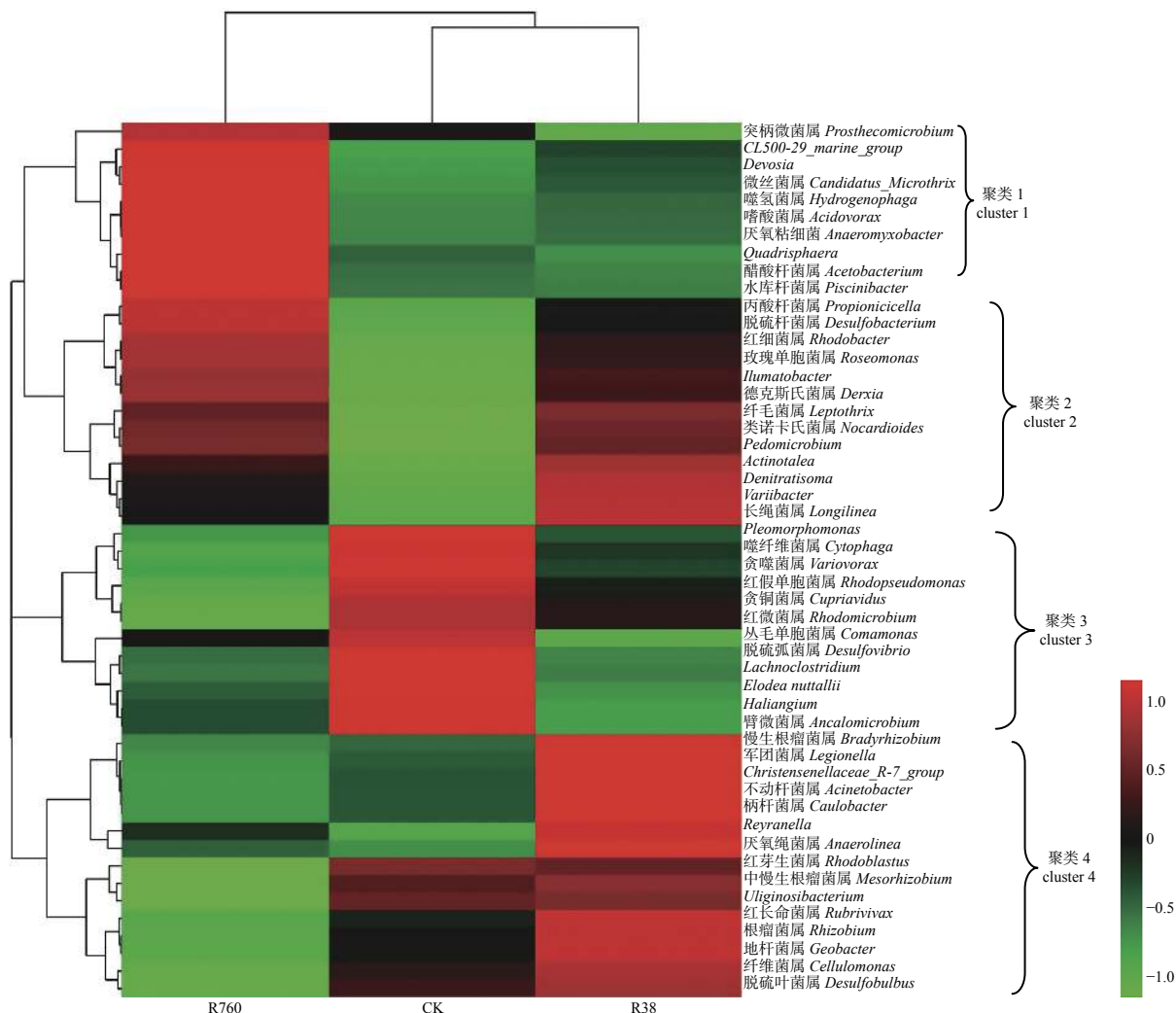
2.3.2 属水平上的细菌群落结构

由图 3 可知: 不同质量浓度 HCB 处理下狭叶香蒲根系生物膜菌群可聚为 4 类, 菌属的丰度均不同程度的受到 HCB 处理的影响。

聚类 1 主要包括突柄微菌属 (*Prosthecomicrobium*)、CL 500-29_marine_group、微丝菌属 (*Candidatus_Microthrix*)、噬氢菌属 (*Hydrogenophaga*)、嗜酸菌属 (*Acidovorax*)、厌氧粘细菌 (*Anaeromyxobacter*)、*Quadrisphaera*、醋酸杆菌属 (*Acetobacterium*) 以及水库杆菌属 (*Piscinibacter*)。HCB 处理后细菌结构的分布发生了明显变化, 这 9 个菌属在对照和 R38 中的丰度均低于 R760。

聚类 2 中的丙酸杆菌属 (*Propionicecella*)、脱硫杆菌属 (*Desulfobacterium*)、红细菌属 (*Rhodobacter*)、玫瑰单胞菌属 (*Roseomonas*)、德克斯氏菌属 (*Derxia*)、*Actinotalea*、*Denitratisoma* 以及 *Variibacter* 的丰度在对照中较低。与 R38 处理相比, R760 处理的丙酸杆菌属、脱硫杆菌属、红细菌属、玫瑰单胞菌属和德克斯氏菌属的丰度均升高; 但放线菌 (*Actinotalea*)、反硝化菌属以及 *Variibacter* 的丰度则低于 R38。

聚类 3 主要包括 *Pleomorphomonas*、噬纤维菌属 (*Cytophaga*)、贪噬菌属 (*Variovorax*)、红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*)、贪铜菌属 (*Cupriavidus*)、红微菌属 (*Rhodomicrobium*)、丛毛单胞菌属 (*Comamonas*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 和臂微菌属 (*Ancalomicrobium*) 等。这 9 个菌属在 R38 和 R760 中的丰度均小于对照。



注：标尺红色代表在对应样本中丰度较高的属，绿色代表丰度较低的属。

Note: The red scale represents the genera with higher abundance in the corresponding sample, and the green scale represents the genera with lower abundance.

图 3 样品属水平群落组成热图

Fig. 3 Heat map of top 50 genera in each sample

聚类 4 主要包括慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、军团菌属 (*Legionella*)、*Christensenellaceae_R-7_group*、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、柄杆菌属 (*Caulobacter*)、厌氧绳菌属 (*Anaerolinea*)、红芽生菌属 (*Rhodoblastus*)、中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)、红长命菌属 (*Rubrivivax*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、地杆菌属 (*Geobacter*)、纤维菌属 (*Cellulomonas*) 和脱硫叶菌属 (*Desulfobulbus*)。这些菌群在 R38 中的丰度均大于对照和 R760。综上所述，R38 和 R760 的细菌结构和丰度存在差异，说明不同质量浓度的 HCB 对根系生物膜菌群结构的影响不同。

2.3.3 狭叶香蒲根系生物膜菌群代谢功能预测

由表 3 可知：根系生物膜菌群的主要功能集

中在碳水化合物、氨基酸以及能量代谢方面，而在多糖的生物合成和代谢以及次生代谢的生物合成等方面的功能较弱。

3 讨论

3.1 狭叶香蒲根系表面为微生物提供特殊的生态位

以大型水生植物为主的水生生态系统中，生物膜是初级生产中不可替代的组成部分^[16]。研究表明：水生植物表面附着的细菌和浮游细菌群落结构存在显著差异^[16,20]。水生植物的表面可以作为细菌群落的“集中器”，为细菌的附着提供营养和微生态位^[16]。在狭叶香蒲根系生物膜中检测到细菌，证明细菌是水生植物附生微生物的主要组成部分^[15,20]。经不同质量浓度 HCB 处理后，根系

表 3 PICRUSt 预测根系生物膜菌群代谢功能

Tab. 3 Metabolic function of bacteria predicted by PICRUSt

PICRUSt 功能预测 PICRUSt function prediction	相对丰度 relative abundance		
	CK	R38	R760
外源性生物降解与代谢 xenobiotics biodegradation and metabolism	0.0387	0.0392	0.0386
核苷酸代谢 nucleotide metabolism	0.0307	0.0305	0.0310
萜类和多酮类化合物的代谢 metabolism of terpenoids and polyketides	0.0232	0.0231	0.0232
其他氨基酸代谢 metabolism of other amino acids	0.0199	0.0197	0.0196
辅助因子和维生素的代谢 metabolism of cofactors and vitamins	0.0429	0.0426	0.0430
脂类代谢 lipid metabolism	0.0377	0.0384	0.0384
多糖的生物合成和代谢 glycan biosynthesis and metabolism	0.0167	0.0173	0.0170
酶家族 enzyme families	0.0212	0.0199	0.0203
能量代谢 energy metabolism	0.0626	0.0619	0.0619
碳水化合物代谢 carbohydrate metabolism	0.0980	0.1002	0.1009
其他次生代谢物的生物合成 biosynthesis of other secondary metabolites	0.0095	0.0096	0.0098
氨基酸代谢 amino acid metabolism	0.1031	0.1041	0.1049

附着微生物的数量明显增加, 尤其是在 R38 处理中最为显著。研究发现: HCB 含量与香蒲根际微生物数量呈负相关, 香蒲根际微生物数量增加有利于湿地系统降解 HCB^[21]。R760 处理的根系生物膜细菌数量减少可能与高质量浓度 HCB 的抑制作用有关^[21]。然而, R38 和 R760 处理的水体基质表面未观察到微生物附着。研究显示: 水生植物根系为微生物生长提供了表面积, 根系分泌物是微生物碳水化合物的来源, 根系氧气的释放为微生物的生存创造了微氧环境^[22-23], 而基质可能未提供微生物附着和生存的必需条件。

3.2 不同质量浓度 HCB 对狭叶香蒲根系生物膜菌群多样性和结构的影响

根际是影响根系活动的特殊区域, 除能为微生物的生存提供营养物质和有氧环境外, 还能促进高分子有机物(如农药)的降解^[24]。狭叶香蒲常用于降解无机和有机污染物(如 HCB)^[25]。本研究表明: 狭叶香蒲根系生物膜细菌群落的 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数均表现为 R38>R760>CK, 说明低质量浓度 HCB 处理的根系细菌群落结构、丰富度和多样性均高于高质量浓度 HCB 处理。16S rDNA 测序结果显示: 生物膜中的优势细菌有变形菌门、放线菌门、绿弯菌门、蓝藻菌门和厚壁菌门, 它们在其

他大型水生植物中同样有分布^[16,20]。多数变形菌门对有机基质具有较强的代谢能力, 使其在富营养化水体中占主导地位^[26]。富营养化水体中, 水生净化植物粉绿狐尾藻和喜旱莲子草根际微生物的数量均表现为细菌>放线菌>真菌^[27]。本研究测序结果中放线菌门为第二大种群, 可能与 HCB 富营养化水体的改善以及 HCB 的降解有关^[21,27]。HE 等^[18]利用 T-RFLP 对各微生物群落进行比较, 发现变形菌门在慈姑和黑藻上最丰富, 而蓝藻在慈姑和黑藻上是第二大种群。蓝藻对氮、磷等营养元素具有极强的竞争力, 气候条件和营养元素均是有害蓝藻扩增的有利因素^[28]。然而, 经不同质量浓度 HCB 处理后, 水体中蓝藻菌门丰度均降低。HCB 胁迫下, 厚壁菌门在细菌群落中占主导地位, 参与人工湿地 HCB 的降解^[9]。在 R38 和 R760 中厚壁菌门丰度相似, 但明显低于对照。

HCB 胁迫下, 菌属的丰度均受到不同程度的影响。R760 中, 放线菌门的 *CL 500-29_marine_group* 丰度高于对照和 R38, 能够有效利用多种形式的碳化合物, 属于养殖环境中的有益微生物^[29]。推测高丰度的 *CL 500-29_marine_group* 可能通过促进碳循环改善 R760 的水体环境。狭叶香蒲根系生物膜中还检测到红微菌属、红假单胞菌属、红长命菌属、红芽生菌属和红细菌属等多种光合细菌属, 均属于光合细菌下的紫色非硫细菌。光合细菌能有效改善富营养化水体的水质, 且对水体中总磷、总氮、铵态氮、硝态氮和 COD 的去除效果明显^[30]。紫色非硫细菌能高效去除有机物, 参与卤代化合物和芳香化合物的降解^[31], 如光合细菌降解 57.26% 的 2-氯苯酚只需 7 d^[32]。以上研究表明: 生物膜中大量光合细菌的附着可能与富营养化水体的改善以及 HCB 的降解有关。丛毛单胞菌属可降解酚类物质, 对苯酚的最高耐受力可达 2 000 mg/L, 完全降解初始质量浓度为 1 000 mg/L 的苯酚只需 48 h^[33]。此外, 丛毛单胞菌属还可分解多环芳烃和杂环类物质^[34]。这类细菌在根系生物膜上的丰度大小依次为 CK>R760>R38。贪噬菌属是另一类能降解多种有机化合物的微生物, 如原油相关的硫代物^[35]、烟碱类杀虫剂^[36]以及腈类除草剂等^[37], 它在生物膜上的丰度为 CK>R38>R760。在 R38 中, 不动杆菌属是植物根际优势菌群, 这类细菌同样能参与苯酚等有机物的降解^[38]。嗜酸菌属是 R760 根系生物膜上的优势菌属, 能降解喹啉等有机物^[39]。狭叶香蒲

根际优势菌属以丛毛单胞菌属、贪噬菌属、不动杆菌属、嗜酸菌属以及多种光合细菌属为主,说明它们可能是水体中 HCB 降解的“主力菌”^[9,21]。此外,根系生物膜中的微生物栖息于特定的生态位,植物根系、水体、沉积物成分甚至水生动物都可能影响根际微生物的群落结构和多样性^[16],并影响根际对水体中污染物的去除效果。

3.3 狭叶香蒲根系生物膜菌群与氮循环

反硝化细菌将硝酸盐还原为分子氮或气体氮。反硝化细菌被认为是自然反硝化过程的主要执行者^[40],近年来在污水脱氮处理中备受关注。本研究共检测到 7 属此类细菌。R38 生物膜中,红长命菌属、中慢生根瘤菌属和不动杆菌属的丰度最高,而红细菌属则是 R760 生物膜中的优势菌。红长命菌属是兼性异养细菌,能在厌氧和低氧条件下将亚硝酸盐还原成氮气^[41]。中慢生根瘤菌属则是一类好氧反硝化菌,在好氧条件下将铵态氮直接转化成气态产物^[42]。不动杆菌属是近年来发现的异养硝化—好氧反硝化菌群,能将 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 氧化为 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (或 $\text{NO}_3^-\text{-N}$),再将 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (或 $\text{NO}_3^-\text{-N}$) 还原生成含氮气体释放^[43],实现硝化和反硝化作用在同一时间和空间内完成^[44]。红细菌属是一类高效净化水质且能参与反硝化作用的光合细菌^[45]。反硝化作用是去除湖泊、河流氮污染和调节氮循环的关键过程^[46]。以上 4 类菌群分别属于 R38 和 R760 根系生物膜中的优势菌,它们可能参与富营养化水体的脱氮和氮循环。植物在白天可以通过光合作用释放氧气,而根系生物膜中大多数微生物通过呼吸消耗氧气,白天和晚上能分别形成好氧和低氧的微环境^[16]。好氧环境下,生物膜上的硝化细菌进行硝化作用;低氧环境下,厌氧或兼性厌氧的反硝化细菌进行反硝化作用^[46],从而实现水体氮循环。此外,7 月适宜的环境和水体条件可能也会刺激这类细菌的生长。上述结果表明:狭叶香蒲根系生物膜体系在富营养化水体脱氮和氮循环过程中至关重要。

4 结论

经 $38\text{ }\mu\text{g/L}$ HCB 处理后,富营养化水体中狭叶香蒲根系生物膜细菌的数量、群落丰富度和多样性均高于 $760\text{ }\mu\text{g/L}$ HCB 的富营养化水体根系。此外,属水平优势菌群可能与富营养化水体的水质净化、有机物降解以及脱氮和氮循环有关。

[参考文献]

- [1] DHOTE S, DIXIT S. Water quality improvement through macrophytes: a review[J]. Environmental Monitoring & Assessment, 2009, 152(1/4): 149. DOI: [10.1007/s10661-008-0303-9](https://doi.org/10.1007/s10661-008-0303-9).
- [2] THORÉN A K. Urea transformation of wetland microbial communities[J]. Microbial Ecology, 2007, 53(2): 221. DOI: [10.1007/s00248-006-9098-9](https://doi.org/10.1007/s00248-006-9098-9).
- [3] US EPA. 2000 toxics release inventory (TRI) public data report[R]. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC: 2002.
- [4] YUN S H, KANNAN K. Distribution of mono-through hexa-chlorobenzenes in floodplain soils and sediments of the Tittabawassee and Saginaw Rivers, Michigan[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2011, 18(6): 897. DOI: [10.1007/s11356-010-0437-5](https://doi.org/10.1007/s11356-010-0437-5).
- [5] ZHOU Y Q, TRESTIP S, LI X Z, et al. Dechlorination of hexachlorobenzene in treatment microcosm wetlands[J]. Ecological Engineering, 2012, 42: 249. DOI: [10.1016/j.ecoleng.2012.02.017](https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.02.017).
- [6] ZHOU Y Q, TIGANE T, LI X Z, et al. Hexachlorobenzene dechlorination in constructed wetland mesocosms[J]. Water Research, 2013, 47(1): 102. DOI: [10.1016/j.watres.2012.09.030](https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.030).
- [7] HOU J Y, LIU W X, WANG B B, et al. PGPR enhanced phytoremediation of petroleum contaminated soil and rhizosphere microbial community response[J]. Chemosphere, 2015, 138: 592. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2015.07.025](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.025).
- [8] WANG B, ZHANG C P, LI S Y, et al. An approach to biodegradation of chlorobenzenes: combination of *Typha angustifolia* and bacterial effects on hexachlorobenzene degradation in water[J]. Water Science and Technology, 2016, 74(6): 1409. DOI: [10.2166/wst.2016.313](https://doi.org/10.2166/wst.2016.313).
- [9] ZHANG C P, WANG B, DAI X Y, et al. Structure and function of the bacterial communities during rhizoremediation of hexachlorobenzene in constructed wetlands[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(12): 11483. DOI: [10.1007/s11356-017-8463-1](https://doi.org/10.1007/s11356-017-8463-1).
- [10] TAKAGI K, IWASAKI A, KAMEI I, et al. Aerobic mineralization of hexachlorobenzene by newly isolated pentachloronitrobenzene-degrading *Nocardioidea* sp. strain PD653[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(13): 4452. DOI: [10.1128/AEM.02329-08](https://doi.org/10.1128/AEM.02329-08).
- [11] UHLIK O, STREJCEK M, VONDRACEK J, et al. Bacterial acquisition of hexachlorobenzene-derived carbon in contaminated soil[J]. Chemosphere, 2014, 113: 141. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2014.04.110](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.110).
- [12] 张文静, 陈朱蕾, 江娟, 等. 六氯苯处理技术现状及其生物降解研究[J]. 科技创业月刊, 2006(12): 187. DOI: [10.3969/j.issn.1672-2272.2006.12.095](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-2272.2006.12.095).
- [13] COSTERTON J W, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL D E, et al. Microbial biofilms[J]. Annual Review of Microbiology, 1995, 49(1): 711. DOI: [10.5772/intechopen.90790](https://doi.org/10.5772/intechopen.90790).
- [14] STANLEY N R, LAZAZZERA B A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(4): 917. DOI: [10.1111/j.1365-2958.2004.04036.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04036.x).
- [15] HEMPEL M, BLUME M, BLINDOW I, et al. Epiphytic bacterial community composition on two common submerged macrophytes in brackish water and freshwater[J].

- BMC Microbiology, 2008, 8(1): 58. DOI: [10.1186/1471-2180-8-58](https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-58).
- [16] PANG S, ZHANG S, LYU X Y, et al. Characterization of bacterial community in biofilm and sediments of wetlands dominated by aquatic macrophytes[J]. Ecological Engineering, 2016, 97: 242. DOI: [10.1016/j.ecoleng.2016.10.011](https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.10.011).
- [17] CRUMP B C, KOCH E W. Attached bacterial populations shared by four species of aquatic angiosperms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(19): 5948. DOI: [10.1016/S0165-6147\(00\)01608-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01608-4).
- [18] HE D, REN L J, WU Q L. Epiphytic bacterial communities on two common submerged macrophytes in Taihu Lake: diversity and host-specificity[J]. Chinese Journal of Oceanology & Limnology, 2012, 30(2): 237. DOI: [10.1007/s00343-012-1084-0](https://doi.org/10.1007/s00343-012-1084-0).
- [19] INGEMANN J S, KÜHL M, PRIEMÉ A. Different bacterial communities associated with the roots and bulk sediment of the seagrass *zostera marina*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 62(1): 108. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2007.00373.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00373.x).
- [20] HE D, REN L J, WU Q L. Contrasting diversity of epibiotic bacteria and surrounding bacterioplankton of a common submerged macrophyte, *Potamogeton crispus*, in freshwater lakes[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 90(3): 551. DOI: [10.1111/1574-6941.12414](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12414).
- [21] 张翠萍, 李淑英, 王蓓, 等. 六氯苯胁迫下2种湿地植物根际土壤微生物数量与酶活性变化[J]. 生态与农村环境学报, 2018, 34(2): 177. DOI: [10.11934/j.issn.1673-4831.2018.02.011](https://doi.org/10.11934/j.issn.1673-4831.2018.02.011).
- [22] GERSBERG R M, ELKINS B V, LYON S R, et al. Role of aquatic plants in wastewater treatment by artificial wetlands[J]. Water Research, 1986, 20(3): 363. DOI: [10.1016/0043-1354\(86\)90085-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90085-0).
- [23] BRIX H. Do macrophytes play a role in constructed wetlands?[J]. Water Science and Technology, 1997, 35(5): 11. DOI: [10.1016/s0273-1223\(97\)00047-4](https://doi.org/10.1016/s0273-1223(97)00047-4).
- [24] SINGH S, GUPTA R, SHARMA S. Effects of chemical and biological pesticides on plant growth parameters and rhizospheric bacterial community structure in *Vigna radiata*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 291: 102. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2015.02.053](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.053).
- [25] ROGERS M R, STRINGFELLOW W T. Partitioning of chlorpyrifos to soil and plants in vegetated agricultural drainage ditches[J]. Chemosphere, 2009, 75(1): 109. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2008.11.036](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.036).
- [26] 薛银刚, 刘菲, 孙萌, 等. 太湖竺山湾春季浮游细菌群落结构及影响因素[J]. 环境科学, 2018, 39(3): 1151. DOI: [10.13227/j.hjkk.201707164](https://doi.org/10.13227/j.hjkk.201707164).
- [27] 陆开宏, 胡智勇, 梁晶晶, 等. 富营养水体中2种水生植物的根际微生物群落特征[J]. 中国环境科学, 2010(11): 70.
- [28] O'NEIL J M, DAVIS T W, BURFORD M A, et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change[J]. Harmful Algae, 2012, 14: 313. DOI: [10.1016/j.hal.2011.10.027](https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027).
- [29] 李建柱, 侯杰, 张鹏飞, 等. 空心菜浮床对鱼塘水质和微生物多样性的影响[J]. 中国环境科学, 2016, 36(10): 3071. DOI: [10.3969/j.issn.1000-6923.2016.10.033](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-6923.2016.10.033).
- [30] 常会庆, 王世华, 寇太记. 固定化光合细菌对水体富营养化的去除效果[J]. 水资源保护, 2010, 26(3): 64. DOI: [10.3969/j.issn.1004-6933.2010.03.017](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-6933.2010.03.017).
- [31] 吕红, 周集体, 王竞. 光合细菌降解有机污染物的研究进展[J]. 工业水处理, 2003, 23(10): 9. DOI: [10.3969/j.issn.1005-829X.2003.10.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-829X.2003.10.003).
- [32] 胡筱敏, 董怡华, 李亮, 等. 光合细菌PSB-1D对2-氯苯酚的降解特性研究[J]. 环境科学, 2010, 31(7): 1672. DOI: [10.13227/j.hjkk.2010.07.038](https://doi.org/10.13227/j.hjkk.2010.07.038).
- [33] 陈春, 李文英, 吴静文, 等. 焦化废水中苯酚降解菌筛选及其降解性能[J]. 环境科学, 2012, 33(5): 1652. DOI: [10.13227/j.hjkk.2012.05.009](https://doi.org/10.13227/j.hjkk.2012.05.009).
- [34] MA Q, QU Y Y, SHEN W L, et al. Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing[J]. Bioresource Technology, 2015, 179: 436. DOI: [10.1016/j.biortech.2014.12.041](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.041).
- [35] BERS K, LEROY B, BREUGELMANS P. A novel hydrolase identified by genomic-groteomic gnalysis of phenylurea herbicide mineralization by *Variovorax* sp. strain SRS16[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(24): 8754. DOI: [10.1128/AEM.06162-11](https://doi.org/10.1128/AEM.06162-11).
- [36] 张会娟. 贪噬菌 *Variovorax boronicumulans* J1降解烟碱类杀虫剂噻虫啉机制的研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2012.
- [37] NIELSEN M K, HOLTZE M S, SVENSMARK B, et al. Demonstrating formation of potentially persistent transformation products from the herbicides bromoxynil and ioxynil using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)[J]. Pest Management Science, 2010, 63(2): 141. DOI: [10.1002/ps.1311](https://doi.org/10.1002/ps.1311).
- [38] 蒙小俊, 李海波, 曹宏斌, 等. 焦化废水活性污泥细菌菌群结构分析[J]. 环境科学, 2016, 37(10): 3923. DOI: [10.13227/j.hjkk.2016.10.034](https://doi.org/10.13227/j.hjkk.2016.10.034).
- [39] 李静, 李文英. 喹啉降解菌筛选及其对焦化废水强化处[J]. 环境科学, 2015, 36(4): 1385. DOI: [10.13227/j.hjkk.2015.04.034](https://doi.org/10.13227/j.hjkk.2015.04.034).
- [40] LU H, CHANDRAN K, STENSEL D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment[J]. Water Research, 2014, 64(1): 237. DOI: [10.1016/j.watres.2014.06.042](https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.042).
- [41] NAGASHIMA S, KAMIMURA A, SHIMIZU T, et al. Complete genome sequence of phototrophic betaproteobacterium *rubrivivax gelatinosus* IL144[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(13): 3541. DOI: [10.1128/JB.00511-12](https://doi.org/10.1128/JB.00511-12).
- [42] 王薇, 蔡祖聪, 钟文辉, 等. 好氧反硝化菌的研究进展[J]. 应用生态学报, 2007, 18(11): 2618. DOI: [10.13287/j.0.2007-11-038](https://doi.org/10.13287/j.0.2007-11-038).
- [43] 张明霞, 李安章, 陈猛, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌脱氮相关酶系及其编码基因的研究进展[J]. 生物技术进展, 2020, 10(1): 40. DOI: [10.19586/j.2095-2341.2019.0092](https://doi.org/10.19586/j.2095-2341.2019.0092).
- [44] 杨静丹, 祝铭韩, 刘琳, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 HY3-2 的分离及脱氮特性[J]. 中国环境科学, 2020, 40(1): 294. DOI: [10.19674/j.cnki.issn1000-6923.2020.0035](https://doi.org/10.19674/j.cnki.issn1000-6923.2020.0035).
- [45] 郑耀通, 胡开辉, 高树芳, 等. 高效净化水产养殖水域紫色非硫光合细菌的分离和筛选[J]. 福建农业大学学报, 1998, 27(3): 342. DOI: [10.1088/0256-307X/15/12/024](https://doi.org/10.1088/0256-307X/15/12/024).
- [46] 陈秋阳, 赵彬洁, 袁洁, 等. 人工遮光和营养添加对河流反硝化活性和反硝化细菌群落结构的影响[J]. 生态学报, 2018, 38(15): 5566. DOI: [10.5846/stxb201704050582](https://doi.org/10.5846/stxb201704050582).

责任编辑: 何承刚