

学校编码: 10384
学号: 22420101151352

密级_____

廈門大學

硕士学位论文

浮床种植海马齿根际微生物的多样性
及对多环芳烃的降解作用研究

Study on Microbial Diversity and Rhizodegradation of PAHs
in the rhizosphere of *Sesuvium portulacastrum*
Planted in Eco-floaing Bed

杨芳

指导教师姓名: 黄凌风 教授
 骆苑蓉 助理教授

专业名称: 海洋生物

论文提交日期: 2013年12月

论文答辩时间: 2013年12月

2013年12月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪 论	1
1 PAHs 概述	1
1.1 PAHs 的性质	1
1.2 PAHs 的来源	1
1.3 PAHs 的代表	2
2 水体污染植物修复.....	3
2.1 植物修复.....	3
2.2 生态浮床.....	3
2.3 浮床植物的选择.....	5
3 PAHs 污染土壤植物-微生物联合修复.....	6
3.1 植物-微生物联合修复的优势	6
3.2 高效植物和微生物的筛选.....	7
3.3 植物-微生物联合修复的机理	9
3.4 植物-微生物联合修复的效果	10
4 根际微生物的分子生态学研究.....	12
4.1 变性梯度凝胶电泳技术.....	12
4.2 高通量测序技术.....	13
5 本论文的研究内容及意义.....	15
第二章 生态浮床植物的根际微生物多样性调查	17
1 材料与方法.....	18
1.1 样品来源.....	18
1.2 主要材料.....	18
1.3 基本方法.....	19
2 结果.....	24
2.1 环境参数测定.....	24
2.2 细菌数量测定.....	26
2.3 宏基因组高通量测序.....	27
3 讨论.....	38

3.1 生态浮床植物的根际效应.....	38
3.2 生态浮床的微生物多样性.....	38
4 小结.....	41
第三章 生态浮床植物根际 PAHs 降解菌的筛选	42
1 材料与方法.....	42
1.1 样品来源.....	42
1.2 主要材料.....	42
1.3 基本方法.....	43
2 结果.....	46
2.1 可培养细菌的分离与鉴定.....	46
2.2 PAHs 降解菌的筛选与鉴定	48
2.3 降解菌对菲的降解能力测定.....	48
3 讨论.....	49
3.1 可培养细菌的分离.....	50
3.2 PAHs 降解菌	51
4 小结.....	53
第四章 人工微宇宙——PAHs 降解菌根系回归模拟实验	54
1 材料与方法	54
1.1 菌株来源.....	54
1.2 主要材料.....	54
1.3 基本方法.....	55
2 结果.....	60
2.1 菲的去除效果.....	60
2.2 微生物的活性变化.....	62
2.3 微生物的群落结构变化.....	64
3 讨论.....	69
3.1 各因素对菲去除的贡献.....	69
3.2 植物与根际微生物的协同作用.....	70
4 小结.....	72
第五章 总结与展望	73
1 结论.....	73
2 本论文创新点	74

3 展望.....	74
参考文献.....	76
附录.....	86
致谢.....	89

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract (in Chinese)	I
Abstract (in English)	III
Chapter 1 Introduction	1
1 Summary of PAHs	1
1.1 Properties of PAHs	1
1.2 Source of PAHs.....	1
1.3 Model Chemical of PAHs.....	2
2 Phytoremediation of Water Pollution	3
2.1 Concept of Phytoremediation	3
2.2 Summary of Eco-floating Bed System	3
2.3 Selection of Plants Usd in Eco-floating Bed.....	5
3 Plant-Microorganism Combined Bioremediation on PAHs Contaminated Soil	6
3.1 Advantages of Plant-Microorganism Combined Bioremediation.....	6
3.2 Selection of Plants and Microorganisms.....	7
3.3 Principles of Plant-Microorganism Combined Bioremediation	9
3.4 Effects of Plant-Microorganism Combined Bioremediation	10
4 Research Methods for Rhizosphere Microorganism	12
4.1 DGGE	12
4.2 High-throughput Sequencing	13
5 Objective and Significance of this Study	15
Chapter 2 Rhizosphere Microbial Diversity Investigation of <i>Sesuvium portulacastrum</i> in Eco-floating Bed System	17
1 Materials and Methods	18
1.1 Sampling	18
1.2 Materials	18
1.3 Methods.....	19
2 Results	24
2.1 Environmental Parameters	24
2.2 Bacterial Abundance.....	26
2.3 High-throughput Sequencing	27

3 Discussion	38
3.1 Rhizosphere Effect of Eco-floating Bed System	38
3.2 Microbial Diversity of Eco-floating Bed System	38
4 Conclusion	41
Chapter 3 Screening of Typical PAHs-degradative Bacteria from Rhizosphere of Eco-floating Bed System	42
1 Materials and Methods	42
1.1 Sampling	42
1.2 Materials	42
1.3 Methods.....	43
2 Results	46
2.1 Isolation of Culturable Bacteria	46
2.2 Screening of PAHs-degradative Bacteria	48
2.3 Degrading Ability of PAHs-degradative Bacteria	48
3 Discussion	50
3.1 Isolated Bacteria in this Study	50
3.2 Enrichment and Isolation of PAHs-degradative Bacteria	51
4 Conclusion	53
Chapter 4 Re-inoculation of Typical PAHs-degradative Bacteria to their Host in Microcosms	54
1 Materials and Methods	54
1.1 Strains	54
1.2 Materials	54
1.3 Methods.....	55
2 Results	60
2.1 Removal of Phenanthrene	60
2.2 Variation of ETSA	62
2.3 Variation of Microbial Community Structures	64
3 Discussion	69
3.1 Impact on Removal Rate of Phenanthrene.....	69
3.2 Co-remediation Mechanisms between Plants and Micorbes	79
4 Conclusion	72
Chapter 5 Conclusions and Prospects	73
1 Conclusions	73
2 Creations of the Research	74

3 Perspective	74
Reference.....	76
Appendix.....	86
Acknowledgements.....	89

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

植物修复本质上是由特定植物与其根际微生物共同作用完成的一种重要生物修复技术。尽管已有许多研究表明陆生植物的根际微生物对土壤中污染物的降解和消除具有重要作用，但对水环境，尤其是海水环境的修复植物与其根际微生物之间的共生关系和对污染物的协同修复却极少有研究报道。本论文以菲为多环芳烃（PAHs）的代表，在已开展的基于植物修复原理的海水生态浮床技术研究基础上，进一步研究海马齿（*Sesuvium portulacastrum*）根际微生物在 PAHs 污染的植物修复中的作用机制。应用 454 高通量测序技术比较海马齿生态浮床根区和非根区微生物多样性；根据多样性信息指导分离纯化可培养的根系共生菌，从中筛选出 PAHs 降解菌，进行降解能力测定；最后，通过人工微宇宙模拟实验，将 PAHs 降解菌进行根际回归模拟，考察降解菌与植物的共生关系和对 PAHs 的协同修复机制。主要研究结果归纳如下：

（1）筲箕湖的微生物多样性调查，经高通量测序共鉴定微生物 26 个门 44 个纲，其中变形菌门占绝对优势（占 57.1%），其次依次是蓝细菌门（占 32.9%）和拟杆菌门（占 5.3%）。 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲、 ϵ -变形菌纲和 δ -变形菌纲是常见的优势类群。在属的水平上，各样本的群落结构都比较复杂，且包含多种已报道的功能微生物类群。物种多样性指数由高到低依次是浮床植物根系>浮床根际区>浮床非根际区>非浮床区，表明生态浮床根际效应显著。

用 Weighted Unifrac 算法计算样本距离、样本聚类、样本 PCA，进行 Beta 多样性分析，均得到了一致的结果。各样本区分按照地域分布，外共生菌群与根际、非根际以及非浮床区菌群结构差异均较大，同一站位的根际、非根际菌群结构较相近。表明环境因素，特别是浮床植物根系对微生物群落结构的影响较大。

（2）采用两种方法富集和驯化 PAHs 降解菌，最大化地分离纯化可培养细菌，16S rDNA 鉴定结果显示这些细菌分属于 4 门 55 属 140 种，其中含有多种已报道的具 PAHs 降解能力的细菌类群。

采用改良的平板升华法成功地从海马齿根际筛选到三株菲降解菌，16S rDNA 鉴定结果显示这三株菌分别为 *Celeribacter neptunius* strain H 14 (R1)，

Erythrobacter vulgaris strain 022 2-10 (R2) 和 *Novosphingobium resinovorum* strain NCIMB 8767 (R3)。

用 SPE-HPLC (Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography) 测定各单菌株的对菲的降解能力, 结果显示, 扣除非生物因素的损失 (5.29%), 降解菌 R1, R2 和 R3 7d 后对初始浓度为 100 mg/L 的菲分别降解了 72.17%, 82.25% 和 82.94%, 表明降解菌具有较强的 PAHs 降解能力。

(3) 人工微宇宙实验中各组菲的去除率按由低到高排列, 依次是 CK (18.9%), S+Phe (34.3%), S+Phe+T (41.7%), S+B+Phe (82.2%), NS+Phe (87.8%), S+B+Phe+T (97.3%)。各生物因素对菲去除的贡献率按大小排列, 依次是植物根系和原菌群联合作用 (78.5%), 表面除菌根系和降解菌联合作用 (77.0%), 降解菌 (58.3%) 和表面除菌根系 (18.8%)。说明根系和原有根际微生物群落以及表面除菌根系和降解菌的协同作用, 在菲的去除过程中具有最重要的地位。

对实验过程中细菌的 ETSA 进行测定, 结果显示, 根系表面除菌后加降解菌的实验组 (S+B, S+B+Phe 和 S+B+Phe+T) ETSA (Electron Transport System Activity) 的变化趋势相似, 均是由 0 d 时的高值, 降低至 4 d 时的低值, 之后在低值附近波动。根系表面除菌后不加降解菌的对照组 (S, S+Phe 和 S+Phe+T) ETSA 的变化趋势一致, 均在低值附近波动。S+Phe 和 NS+Phe 的 ETSA 在 8 d 时略微升高, 之后逐渐降低。表明微生物在降解 PAHs 时的种群数量很高, 随着 PAHs 含量的下降, 降解菌的数量也随之减少。

采用 PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 技术分析实验过程中细菌群落结构的变化, 结果显示, 添加菲与否、添加降解菌与否和根系表面除菌与否对菌群结构的影响较大, 而水流因素对菌群结构的影响较小。根系表面除菌后的菌群结构较不除菌组的简单, 说明根系表面除菌处理有效抑制了部分抗性较弱的根际微生物。添加降解菌的实验组中, R3 菌所对应的条带在整个实验过程中始终存在且条带相对较亮, 显示其在菲根际降解过程中的优势地位, 表明降解菌的根际回归实验效果良好。

关键词: 根际微生物; 多环芳烃; 海马齿; 植物修复; 海水环境

Abstract

Phytoremediation is a strategy that use specific plants and their associated microbes for environmental cleanup. Although in soil habitat, many studies have indicated the ecological correlations and co-remediation mechanisms between the terrestrial plants and their rhizospheric microorganisms, so far in aquatic habitat, especially in seawater environment, few issues had been touched yet. Based on our previous work on the floating phytoremediation in seawater wetland system, we studied the role and the mechanisms of rhizosphere microbes in phytoremediation of seawater polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by halophytes. Both microbial and functional diversities in the rhizosphere of the typical remediating plant, *Sesuvium portulacastrum* were explored via metagenomic analysis. Under the direction of the results of molecular ecology, the typical PAHs-degradative bacteria from rhizosphere were isolated and their characteristics on degradation were analyzed. Moreover, the typical PAHs-degradative bacteria were re-inoculated to their host in microcosms, under which the symbiotic relation and co-remediation mechanisms were uncovered. The results of this study provide meaningful insights into the symbiosis of microbe-plant as well as the practical significance of PAHs bioremediation in seawater environments. The results were as follows:

(1) High-throughput sequencing was conducted to study the bacterial community structure. The results showed that, there were 44 classes from 26 phyla in Yundang Lagoon. Proteobacteria was the dominant phylum which included 4 main classes, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Epsilonproteobacteria and Deltaproteobacteria. Furthermore, Cyanobacteria and Bacteroides were also the common phyla. Bacterial community structures of different samples were complicated at genus level, which contained many reported functional bacteria. According to the diversity index from high to low, the order was root, rhizosphere, non-rhizosphere and non-floating bed. These results showed that the rhizosphere effect was significant in eco-floating bed system.

In order to study the Beta diversity of bacterial community structure, sample distances, clustering and PCA were calculated using Weighted Unifrac, and the results showed that the bacterial diversity and community structure might be affected by the existence of root. The samples of both rhizosphere and non-rhizosphere from

the same site were clustered together, while the samples from root and non-floating bed were different from other samples.

(2) In all, 4 phyla, 55 genera and 140 species of culturable bacteria were obtained from the enrichment and domestication culture. Using modified sublimation method, three PAHs-degradative bacteria, identified as *Celeribacter neptunius* strain R1, *Erythrobacter vulgaris* strain R2 and *Novosphingobium resinovorum* strain R3, were isolated from the rhizosphere of *S. portulacastrum*. They can utilize phenanthrene as the sole carbon. After 7 days incubation, 72.17%, 82.25% and 82.94% of phenanthrene (initial concentration 100 ppm.) were degraded, respectively. The results indicated that PAHs-degradative bacteria have high phenanthrene degradation capability.

(3) After 14 days incubation, the phenanthrene removal rate of different groups presented the order of CK (18.9%), S+Phe (34.3%), S+Phe+T (41.7%), S+B+Phe (82.2%), NS+Phe (87.8%) and S+B+Phe+T (97.3%). By subtraction method, results showed that the contribution of phenanthrene removal caused by different factors presented the order of combined effect of root and original bacteria (78.5%), combined effect of sterilized root and strain R3 (77.0%), R3 (58.3%) and sterilized root (18.8%). Hence, it was suggested that the interrelationship between the root of *S. portulacastrum* and rhizosphere PAHs-degradative bacteria might play the most important role in the removal of phenanthrene.

PCR-DGGE was adopted to investigate the bacterial composition and community dynamic changes during the experiment. The results showed that, the addition of phenanthrene, PAHs-degradative bacteria and sterilized method might influence the bacterial community structure most. The structures were more complex in treatment of non-sterilized root, compared to treatment of sterilized root, *i.e.* the sterilized method inhibited the growth of bacteria effectively. Moreover, the band that represented the re-inoculated PAHs-degradative bacteria was persistently existed and it showed that strain R3 might be the dominant bacteria during the rhizodegradation of phenanthrene. Hence, the re-inoculation in microcosms was successful.

Key Words: rhizosphere microorganisms; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); *Sesuvium portulacastrum*; phytoremediation; seawater environment.

第一章 绪论

1 PAHs 概述

1.1 PAHs 的性质

在众多持久性有机污染物中，多环芳烃（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs）是一类广泛分布并稳定存在于自然环境中的含两个或两个以上苯环的难降解有机污染物^[1]，具有“三致”（致癌、致畸、致突变）和其它潜在毒性^[2, 3]。1979年，美国环境保护署公布了129种优先监测污染物，其中PAHs有16种；1990年，我国提出了水中优先控制的68种污染物，PAHs有7种^[4]。

PAHs具有疏水性、蒸汽压小及辛醇-水分配系数高的特点，随着苯环数量的增加，脂溶性增强，水溶性减小，在环境中存在时间越长，遗传毒性越高，致癌性随苯环数量增加而增强^[5]。

由于PAHs在水中的溶解度很小，大部分PAHs与矿物质和有机质结合，形成悬浮颗粒物，一方面以吸收方式进入生物相，另一方面以沉积方式进入沉积物，吸附在沉积物颗粒上的PAHs由于再悬浮作用，可再次进入水相，成为流动的污染物。

由于PAHs脂溶性强而很容易被动物的肠胃吸收，并能经食物链级联放大而富集，迅速地被分散到不同的组织（趋定位脂肪）发挥毒性作用，危害人体健康，对生态及食物链造成长期影响。

1.2 PAHs 的来源

PAHs除自然成因外，主要来自化石燃料使用过程中的泄漏以及化石燃料和有机物不完全燃烧产物的排放等。焦化厂炼焦和火力发电产生的烟气及废水，炼油及采油过程中产生的废气、废水及废渣，木材燃烧的烟气及灰烬，汽车尾气和家庭做饭的油烟等，都含有大量的PAHs。人们在对垃圾进行深填埋处理的过程中，产生的有机废水和垃圾渗滤液都含有PAHs。另外，垃圾焚烧也会产生大量PAHs。据估计，在世界范围内每年有约43000 t PAHs释放到大气中，同时有230000 t进入海洋环境^[6]。

利用特征化合物指数可对PAHs的来源进行判别，包括荧蒽/芘、菲/葱、LMW

(2-3 环 PAHs) /HMW (4 环以上 PAHs)。当菲/葱 <10 、荧葱/芘 >1 、LMW/HMW 较低时, 指示 PAHs 主要来源于化石燃料不完全燃烧; 而菲/葱 >15 、荧葱/芘 <1 、LMW/HMW 较高时, 指示 PAHs 主要来源于石油污染^[7-9]。

我国水体沉积物中以潜在致癌性的高环 PAHs 占主导^[10], 表明 PAHs 主要来源为化石燃料不完全燃烧。1999 年, 我国 16 种 PAHs 总排放量约为 9799 t, 主要排放源为燃煤和炼焦, 两者分别占总排放量的 66.6% (质量分数, 下同) 和 30.6%, 合计占 97.2%^[11]。2003 年, 我国 16 种 PAHs 总排放量增至 25300 t^[12], 年平均增长率约为 26.8%, 增速非常显著, 表明我国 PAHs 污染的控制面临非常严峻的形势。

1.3 PAHs 的代表

菲 (Phenanthrene) 是燃油和汽车尾气排放 PAHs 的标志物, 在环境中检出浓度一般较高, 且作为优先控制的多环芳烃类物质, 菲的研究对于多环芳烃类物质的环境治理具有重要的意义。

菲属于较简单的低分子量 PAHs, 由 3 个苯环成一定角度联结而成, 外观与性状为无色、有荧光、单斜形片晶体, 其分子量为 178.23, 在水中的溶解度为 1.18 mg/L (25 °C), 辛醇-水分配系数对数值为 4.46, 能溶于大部分有机溶剂, 如甲苯、四氯化碳、乙醚、氯仿、乙酸等。菲的分子因兼具 K 区和湾区结构 (图 1.1), 是致癌 PAHs 的最小结构单元, 其衍生物大都具有微弱或中等强度的致癌性, 也常用作研究 PAHs 生物降解的模式化合物^[13]。

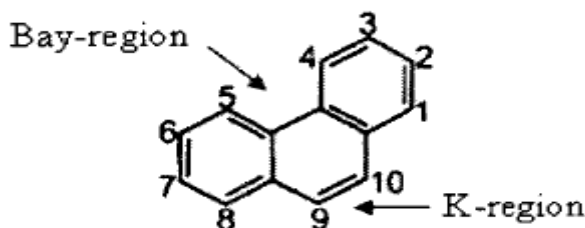


图 1.1 菲的化学结构

Fig. 1.1 Chemistry structure of phenanthrene

菲的性质稳定, 易在环境中沉积, 对人呼吸道和皮肤有毒害作用, 虽然目前

尚无证据显示菲对人体有致癌和诱变性，但它可诱发鱼类和其它生物的突变、畸变和癌变，并能通过食物链累积。

以菲为模式化合物多是研究 PAHs 的毒性，降解路径、机制，以及影响 PAHs 衍生物利用率、生物降解潜力和降解效率的各种因素。菲的研究不仅有利于污染环境中的菲的去除，还可为其它 PAHs 污染的防治提供相关的参考资料。

2 水体污染植物修复

2.1 植物修复

对污染水体治理有物理、化学和生物等 3 种修复方法，生物修复法同物理、化学方法相比，具有成本低、能耗低、简单方便、不会对环境产生二次污染等优点，越来越受到人们的重视，如水生植物修复系统、浮床植物系统、微生态技术等都属于生物修复范畴^[14]。其中，植物修复（Phytoremediation）被广泛应用于受到营养盐、持久性有机污染物（Persistent Organic Pollutants, POPs）、重金属和放射性元素等各类污染物污染的城市生活污水^[15]、工业废水^[16, 17]、农业生产养殖废水^[18, 19]、富营养化水体^[20]等的处理，展示了很好的净化效果。

植物修复是指利用植物及其根际微生物的代谢活动来吸收、积累或降解转化环境中的污染物（氮、磷、重金属及有机污染物等）以达到净化、修复环境的目的^[21]。在植物修复过程中，除植物自身的吸收和转化作用外，植物-微生物的耦合作用是水体修复的重要机制。在植物根际范围内，植物的根际分泌物能够为根际微生物提供生长所需的碳源和其它营养物质，从而影响根际微生物的群落结构及其对有机物的分解。而根际微生物在植物的营养循环、根部环境的维持、有害污染物的降解以及植物的生长代谢方面发挥着重要的作用^[22, 23]。在植物对污染物的吸附和积累以及污染物的降解和转化中，根际微生物起着关键作用^[24]。

2.2 生态浮床

生态浮床又称人工浮床、人工浮岛、生态浮岛等，近年来已成为水环境植物修复的重要技术方法之一。生态浮床技术是应用无土栽培技术，通过浮床设施将水生植物或改良驯化的陆生植物移栽到水面或移植到可承受其重量的人工载体材料上，植物的枝叶生长在空气中，根则生长在水里，通过植物伸入水中的强大根系吸收、吸附、截留水体中的氮、磷等营养物质，并通过收获植物体的形式将

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫