

# 海洋沉积物细菌群落结构对芘和 苯甲酸钠胁迫的响应\*

孙向楠<sup>1,2</sup> 胡晓珂<sup>1</sup> 王慧<sup>1</sup>

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室 烟台 264003;

2. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要** 应用分子生态学方法, 研究在不同芳香族化合物胁迫下海洋沉积物中细菌群落结构的演替规律。在实验室建立驯化系统, 在海洋沉积物中分别添加芘和苯甲酸钠, 采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析实验组和对照组细菌群落 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区数量的组成及变化, 研究沉积物中添加芘、苯甲酸钠后, 微生物群落多样性和群落结构的变化。实验结果表明: 芘、苯甲酸钠极大地降低了海洋沉积物中菌群丰度和多样性; 在添加苯甲酸钠的实验组, 变形杆菌门中海杆菌属(*Marinobacter*)、假海源菌属(*Pseudidiomarina*)的细菌显著富集; 在添加芘实验组中拟杆菌门中的 *Balneola* 属、碳酸噬胞菌属(*Aequorivita*)极大富集。初步分析了在海洋沉积物环境中不同多环芳烃胁迫下细菌群落结构的演替特征, 实验结果为海洋环境中针对不同芳香烃的微生物修复提供理论依据。

**关键词** 海洋细菌; 群落结构; 多样性; 苯甲酸钠; 芘

**中图分类号** X55 **doi:** 10.11693/hyhz20141200345

随着工业的发展和海上石油开采运输等活动的增多, 大量多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)类物质进入海洋环境, 这些多环芳烃极可能通过食物链富集作用危害人类健康(崔志松等, 2006)。在海洋环境中, 多环芳烃降解中很重要的一部分是由海洋特有的微生物来完成(Rehmann *et al*, 1998)。高分子量的多环芳烃(含 4 个和 4 个以上芳香环)通常是由一群微生物协同代谢完成(Juhasz *et al*, 2000)。多环芳烃在微生物的一系列氧化酶和脱氢酶作用下, 经过开环反应, 逐渐减少苯环数目, 最终变为邻苯二甲酸、邻苯二酚、龙胆酸等单苯环芳香族化合物, 单苯环化合物再经过开环反应而进入三羧酸循环。在多环芳烃中, 芘是具有四个苯环连接的高分子量芳香烃代表, 是致癌、致畸、致突变有害污染物。已报告能够降解芘的菌属包括, 分支杆菌属(*Mycobacterium*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等(Rehmann *et al*, 1998)。其中

分支杆菌属(*Mycobacterium*)一些菌株能够在添加营养盐的矿物培养基中矿化芘(Heitkamp *et al*, 1988)。

苯甲酸是多种芳香族化合物生物代谢的中间产物, 是一种常见的环境污染物, 常存在于化工、食品和医药工业废水中并广泛应用于塑料、染料和医药工业等方面, 对人类健康有害(Parales *et al*, 2002; 张晓云等, 2012)。在自然界中, 微生物能够通过好氧和厌氧途径降解苯甲酸类化合物。迄今为止, 已经发现很多细菌能够降解苯甲酸钠, 例如, 盐单胞菌属(*Halomonas*)(Oie *et al*, 2007)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)(Collier *et al*, 1997; Kim *et al*, 2003)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)(Geissler *et al*, 1988)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)(Parsek *et al*, 1992)都有能够降解苯甲酸细菌的报道。

芘是多环芳烃上游代谢途径的代表化合物, 因其分子亲脂性、低水溶性、低生物可利用性、高稳定

\* 中国科学院战略性先导科技专项项目, XDA11020403 号; 国家自然科学基金面上项目, 41376138 号。孙向楠, 硕士研究生, E-mail: xiangnanjiayou@163.com

通讯作者: 胡晓珂, 研究员, E-mail: xkhu@yic.ac.cn

收稿日期: 2014-12-10, 收修改稿日期: 2015-04-07

性等,造成的环境污染较难消除。在一系列的脱氢酶、加氧酶的作用下,苾分子逐步加氢、氧化将苯环打开,形成一系列低分子量的苯环类化合物,进而开环进入中心代谢途径。苯甲酸钠是只有一个苯环的化合物,相比于苾更容易被微生物降解进入下游相关代谢途径,随后进入三羧酸循环。通过比较苾和苯甲酸钠对环境中菌群的影响,可以初步分析得出在多环芳烃降解上游代谢途径和下游代谢途径中微生物群落组成的差异。

本研究在实验室条件下,向海洋沉积物样品中添加苾和苯甲酸钠,研究苾和苯甲酸钠胁迫下沉积物样品细菌群落结构的变化特征,初步分析海洋沉积物中微生物群落对不同芳香族类化合物的响应。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

海底表层沉积物样品于 2013 年 9 月采集于龙口港(37°39'N, 120°18'E),采集后的样品 4°C 冰盒内带回实验室,4°C 保存。

### 1.2 样品处理

实验组 1(P1, P2): 称取 5g 沉积物样品加入编号为 P1, P2 的 250mL 三角瓶,添加 0.1g 苾及 100mL 灭菌海水;

实验组 2(B1, B2): 称取 5g 沉积物样品加入编号为 B1, B2 的 250mL 三角瓶,添加 0.2g 的苯甲酸钠及 100mL 灭菌海水;

生物对照组(Y1, Y2): 在编号为 Y1, Y2 的 250mL 三角瓶中加入 5g 沉积物样品及 100mL 灭菌海水;

化学对照组 1(Pa, Pb): 在编号为 Pa, Pb 的 250mL 三角瓶中加入 0.1g 苾及 100mL 灭菌海水;

化学对照组 2(Ba, Bb): 在编号为 Pa, Pb 的 250mL 三角瓶中加入 0.2g 的苯甲酸钠及 100mL 灭菌海水;

将实验组 1、实验组 2、生物对照组、化学对照组 1、化学对照组 2 放置于 30°C 水平摇床,180r/min,连续培养 15 天。生物对照组用于与实验组 1、实验组 2 比较细菌群落的变化;化学对照组用于与实验组 1、实验组 2 比较实验结束时苾、苯甲酸钠的残留。

### 1.3 基因组 DNA 的提取

实验结束时,分别从 P1, P2, B1, B2, Y1, Y2 样品瓶中取少量沉积物,6000g 离心收集沉积物及菌体。应用 PowerSoil® DNA 提取试剂盒(MoBio Laboratories, Solana Beach, USA)提取环境基因组 DNA。Nanodrop (NanoDrop 2000/2000C, Thermo Scientific, USA)对所

提取的 DNA 样品进行定量分析,所有样品浓度均大于 10 ng/μL, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 均大于 1.8。其中 Y1, Y2 样品为无底物胁迫的样品;P1, P2 为添加苾胁迫的样品;B1, B2 为添加苯甲酸钠胁迫的样品。

### 1.4 Illumina Miseq 测序分析

委托上海翰宇生物科技有限公司,在上海人类基因组研究中心基因组测序部使用 Illumina Miseq 仪器(美国)进行测序。以检测合格 DNA 样本为模板,以设计好含有标签接头的引物 V3-F: TACGGRAGGCA GCAG; V4-R: AGGGTATCTAATCCT 进行 PCR 反应,扩增目的条带。切胶回收纯化后定量,上机测序。

### 1.5 测序结果分类鉴定

经 Miseq 平台测序后下机,允许的最低读取序列(read)平均测序质量为 Q20,即 1%的错误率,去掉 N 序列,保留最短长度为 100bp,去除较长的均聚物,设置最大聚合值为 8。然后根据条码技术的值对处理好的序列进行样本归类,统计样本数目及片段长度分布。使用 PyNAST 和数据库比对,然后再用 UCHIME(Edgar *et al*, 2011)方法检测并去除嵌合序列;非嵌合体序列使用 GreenGene 等核糖体数据库中 aligned 核糖体序列数据比对,去除非目的物种序列污染。采用 mothur(Schloss *et al*, 2009)默认的 OTU 分析方法获得 OTU 代表序列,通过计算序列间未修正的两两距离并使用 cluster 和 97%的相似性对序列进行聚类(Edgar, 2010)。然后在每个 OTU 聚类里面选择最长的序列作为该 OTU 代表序列。以 0.03 为 cutoff 值划分可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。计算 cutoff 为 0.03 时 ACE 和 Chao 值,绘制稀释曲线。

在 cutoff=0.03 情况下分析结果,从门水平(变形菌门从纲水平)对每个实验组两个平行各菌门所占百分比求平均值,将各实验组中微生物各菌门平均组成绘制柱状图,将少于序列总数 1%的菌门归为“少数菌群”。此外,分别从对照组、添加苯甲酸钠的实验组、添加苾的实验组中选出属水平数量上占前十位的优势菌 OUT 的百分含量绘制 heatmap 图,分析群落结构变化(Deng *et al*, 2014)。

### 1.6 降解率的测定

1.6.1 苾降解率的测定 在 15 天实验结束时,采用 GC-MS 分别测定实验组 1(P1, P2)和化学对照组 1(Pa, Pb)中苾的含量。

苾相对降解率=(Pn-P)/Pn×100%, (Pn: 化学对照组 1 中苾的残留量; P: 实验组 1 中苾的残留) (陈志丹

等, 2012)。

**1.6.2 苯甲酸钠降解率** 配制 2.000mg/L、4.000mg/L、6.000mg/L、8.000mg/L、10.000mg/L 的苯甲酸钠系列标准液, 测定其吸光度值并绘制标准曲线。取 2mL 实验组或对照组样品, 加水定容至 20mL, 恒温摇床充分震荡 30min, 6000r/min 离心 20min, 取 10mL 上清定容至 100 mL。将待测液于石英比色皿在 222nm 下测定吸光度。根据吸光度和标准曲线, 计算苯甲酸钠的降解率测定(毛宁等, 2010)。

苯甲酸钠相对降解率=(Bn-B)/Bn×100%, (Bn: 化学对照组 2 中苯甲酸钠的残留量; B: 实验组 2 中苯甲酸钠的残留量)。

表 1 Miseq 测序所获得的 16S rRNA 基因序列信息

Tab.1 16S rRNA gene sequence information obtained by Miseq sequencing

样本名称	数量(reads)	样本下机条数(reads)	最小长度(bp)	最大长度(bp)	平均长度(bp)
B1	25275	35825	392	600	455
B2	22348	31591	301	600	455
P1	21059	32378	211	601	445
P2	24209	35395	260	580	444
Y1	30712	38088	312	601	450
Y2	32238	44395	256	601	449

**2.1.2 Illumina MiSeq 测序的稀释曲线和多样性分析** 对测序序列进行随机抽样, 以抽到的序列数与它们所能代表 OTU 的数目构建稀释曲线(rarefaction curve)。分析基于 cutoff=0.03 水平, 评估对照组 Y1, Y2 和实验组 B1, B2, P1, P2 样本之间的物种多样性(图 1)。其中样品文库的覆盖率, 实验组 B1 为 0.993234, B2 为 0.993512 和 P1 为 0.99264, P2 为 0.992895, 曲线趋于平坦; 当 cutoff=0.03, Y1、Y2、样品文库的覆盖率分别达到了 0.939893 和 0.941156(见表 2)。本次测序结果基本能够代表样本的真实情况。

Chao 指数和 ACE 指数在对照实验组的值远大于添加苯甲酸钠和芘的实验组的值, 说明对照组的菌群丰度(community richness)远大于实验组。对照实验

## 1.7 序列信息

所有的序列都已经上传至 NCBI 的 SRA 数据库原始数据 SRA ID 分别为 Y1: SRR1947065; Y2: SRR1948026; P1: SRR1948031; P2: SRR1948037; B1: SRR1948178; B2: SRR1948179。

## 2 结果

### 2.1 Illumina MiSeq 测序的有效序列数据统计、稀释曲线和多样性分析

**2.1.1 Illumina MiSeq 测序的有效序列数据统计** Miseq 测序结果共得到有效序列 127174 条, 平均每个样品约 25434 条序列, 有效序列信息见表 1。

组的(Y1, Y2)的 Shannon 指数>添加芘的样品的值>添加苯甲酸钠的样品的值, 同时对照实验组的(Y1, Y2)

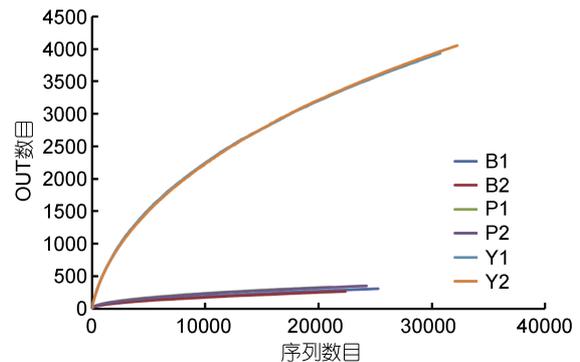


图 1 样品在 cutoff=0.03 情况下得到的稀释曲线  
Fig.1 Rarefaction curve obtained in the case of cutoff=0.03

表 2 OTU 划分和 Alpha 评估结果

Tab.2 OUT division and alpha assessment results

样品名称	Cutoffs 值	OTUs 数目	ACE 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	覆盖率
B1	0.03	309	1030.218	777.871	2.364718	0.188421	0.993234
B2	0.03	269	908.1299	629	2.312708	0.197065	0.993512
P1	0.03	329	856.7783	613.1667	2.90762	0.119896	0.99264
P2	0.03	354	951.0223	688.2273	2.898538	0.115973	0.992895
Y1	0.03	3936	8653.29	6913.159	6.626077	0.006899	0.939893
Y2	0.03	4053	8775.447	6773.66	6.609069	0.007019	0.941156

的 Simpson 指数 < 添加苾的样品的值 < 添加苯甲酸钠的样品的值, 说明对照实验组的菌群的多样性大于实验组, 添加苾的实验组的菌群的多样性大于添加苯甲酸钠的实验组。

## 2.2 苾或苯甲酸钠降解率的测定

经过 15 天的摇床培养, 相较于化学对照组 1(Pa, Pb) 实验组 1(P1, P2) 中的苾的降解率为 40.67%; 化学对照组 2(Ba, Bb) 相比实验组 2 (B1, B2) 中苯甲酸钠的降解率为 89.92%。说明在实验过程中, 苾和苯甲酸钠在沉积物菌群作用下发生了不同程度的降解。

## 2.3 苯甲酸钠胁迫下微生物群落结构的变化与响应

通过 Illumina MiSeq 测序技术, 分析在不同污染物的选择压力下沉积物样品中细菌群落演替规律以及预测有降解功能的微生物群落。在添加苾和苯甲酸钠连续培养 15 天后菌群多样性极大降低。相比于对照组微生物菌群, 添加苯甲酸钠的实验组和添加苾的实验组, 在门的水平上呈现不同的变化特征。

在对照组样品中, 占主导地位的是变形菌门。变形菌门中的  $\gamma$  变形菌纲、 $\delta$  变形菌纲、 $\alpha$  变形菌纲分别占序列总数的 31.007%, 25.168%, 9.857% (百分含量为两个平行试验组的平均值, 下同)。此外拟杆菌门占 10.024%。添加苯甲酸钠或苾连续培养 15 天后的微生物群落与对照组的微生物群落组成有显著的差别。

在添加苾实验组中, 菌群主要包括拟杆菌门 (48.102%),  $\alpha$  变形菌纲 (22.214%),  $\gamma$  变形菌纲 (14.019%), 放线菌门 (8.735%), 热脱硫杆菌门 (4.785%)。其中拟杆菌门,  $\alpha$  变形菌纲相对于对照组有所增加。拟杆菌门序列数从对照样品的 10.024% 增加到 48.102%;  $\alpha$  变形菌纲所占比例由对照组的 9.857% 增加至 22.214%。放线菌门由原位的 1.014% 增加至 8.735%, 热脱硫杆菌门所占比例由 0.003% 增加至 4.785%。而变形菌门的  $\gamma$  变形菌纲,  $\delta$  变形菌纲,  $\xi$  变形菌纲相比于原位微生物菌群所占百分比均显著降低, 分别从 31.007%, 25.168%, 8.581% 降低至 14.019%, 0.623%, 和 0.011%。

Illumina MiSeq 测序结果表明, 在添加苯甲酸钠实验组的微生物群落中, 变形菌门占了菌群的绝大多数 (91.122%)。其中  $\gamma$  变形菌纲占了整个微生物菌群的 86.362%, 而对照组菌群中  $\gamma$  变形菌纲只占了整个群落的 31.007%,  $\alpha$  变形菌纲相对于原位菌群的 9.857% 有所降低, 占 4.025%。 $\delta$  变形菌纲则相比于对

照组的 25.168% 降低至为 0.533%,  $\beta$  变形菌纲为 0.139%,  $\epsilon$  变形菌纲占 0.044%。除变形菌门以外, 芽单孢菌门相比于对照组的菌群 1.320% 增加至 3.906%, 厚壁菌门的菌群相对于对照组菌群 0.493% 增加至 3.104%。拟杆菌门相比于对照组, 菌群含量从 10.024% 降低至 1.480%, 变形菌门中的  $\delta$  变形菌纲则由对照组的 25.168% 降低至 0.533%。

通过比较可以得出, 相比对照组, 在添加苾的实验组, 拟杆菌门和变形菌门的  $\gamma$  变形菌纲其富集最为显著, 在添加苯甲酸钠的实验组中变形菌门微生物群落极大地富集, 其中  $\gamma$  变形菌纲尤为显著, 从对照组的 31.007% 增加至占菌群的 86.362%。

从属的水平上对菌群组成进行分析, 发现在对照组中数量居前十位的属大多在 1.000%—10.000% 之间, 各菌群分布均匀, 说明没有芳香族化合物胁迫时没有占主导地位的菌群。

添加苯甲酸钠的实验组, 主要菌属包括假海源菌属 (*Pseudidiomarina*) (39.421%)、海杆菌属 (*Marinobacter*) (37.924%)、噬甲基菌属 (*Methylophaga*) (6.254%)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) (2.921%)。而在对照组, 假海源菌属 (*Pseudidiomarina*) 只占菌群的 0.001%, 在添加苾的实验组, 假海源菌属 (*Pseudidiomarina*) 占 0.011%; 对照组噬甲基菌属 (*Methylophaga*) 只占菌群的 0.095%, 在添加苾的实验组噬甲基菌属 (*Methylophaga*) 数目占菌群总量的 0.349%, 对照组芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 占菌群百分数远小于 0.001%, 添加苾的实验组芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 数目占菌群总量的 0.077%。比较得出, 相比于原位菌群的数目, 添加苯甲酸钠的实验组假海源菌属 (*Pseudidiomarina*)、海杆菌属 (*Marinobacter*)、噬甲基菌属 (*Methylophaga*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 所占百分比数目明显增加。

在添加苾的实验组, *Balneola* 属 (28.892%)、碳酸噬胞菌属 (*Aequorivita*) (13.254%)、黄单孢杆菌科下的 unclassified (7.344%)、叶杆菌科下的 unclassified (6.604%) 及分支杆菌属 (*Mycobacterium*) (6.541%) 占优势地位。而在对照组和添加苯甲酸钠的实验组中 *Balneola* 属基本检测不到; 对照组中的碳酸噬胞菌属 (*Aequorivita*) 和添加苯甲酸钠的实验组中的碳酸噬胞菌属 (*Aequorivita*) OTU 数目基本检测不到。在属的水平, 在添加苾实验组中, *Balneola* 属、碳酸噬胞菌属 (*Aequorivita*) 以及在添加苯甲酸钠实验组中海杆菌属 (*Marinobacter*)、假海源菌属 (*Pseudidiomarina*) 极大地富集, 成为优势菌群。

### 3 讨论

Illumina Miseq 技术可为解析微生物群落结构、阐明海洋沉积物中微生物群落的整体概貌及其在不同污染物胁迫下的演替特征提供技术支持。本文在实验室建立驯化系统, 采用 Illumina Miseq 技术研究芳香族化合物芘和苯甲酸钠对海洋沉积物中细菌群落结构的影响, 初步阐释不同苯环数的芳香族化合物对海洋环境微生物群落的影响。监测海洋沉积物中微生物群落在芘或苯甲酸钠胁迫下的演替特征, 有助于揭示芳香烃类污染环境中的优势种群, 发现在海洋沉积物中与芘、苯甲酸钠降解相关的微生物。

通常, 原位生态环境的破坏会伴随物种丰度和多样性的降低(Peng *et al.*, 2013)。Alpha 评估指数和稀释曲线显示, 在添加芘和苯甲酸钠的实验组中, 海洋沉积物中细菌群落的丰度和多样性都极大降低。添加苯甲酸钠的实验组 OTUs 数目分别为 309 和 269, 添加芘和苯甲酸钠的实验组 OTUs 数目为 329 和 354, 添加芘和苯甲酸钠的实验组稀释曲线已经达到饱和。在对照组中(Y1, Y2), OTUs 数目分别为 3963 和 4053, 并且随着测序数目的增加尚有增加的趋势。进一步分析 Chao 指数、AC 指数、Shannon 指数和 Simpon 指数

可知, 添加苯甲酸钠和芘的实验组中菌群的丰度和多样性都远远低于对照组。原因可能是添加芳香族化合物导致一些原位微生物失去生存条件, 此外添加芳香族化合物可能导致敏感种群的生长受到抑制, 同时使某些能够利用或耐受芳香族化合物的菌群得到额外的碳源而富集。

在未添加苯甲酸钠和芘的对照组中, 海洋沉积物样品中多样性分布结果如图 2 所示, 样品中微生物多样性较高, 主要有变形菌门、拟杆菌门、酸杆菌门、放线菌门等, 其中变形菌门为主要的优势菌群, 占总序列数的 74.801%。在添加芘的实验组中主要包括拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、热脱硫杆菌门, 其中拟杆菌门占到序列总数的 48.102%, 变形菌门降低至 47.852%。添加苯甲酸钠的实验组中主要包括变形菌门, 占到了序列总数的 91.122%, 其中  $\gamma$  变形菌纲占到了总序列数的 86.362%。研究结果表明, 添加芘和苯甲酸钠的海洋沉积物中微生物群落在门水平呈现不同的变化趋势。变形菌门的  $\gamma$  变形菌纲在对照组、添加苯甲酸钠、和添加芘的菌群中都占主导地位。在芘和苯甲酸钠的影响下, 一部分细菌失去优势, 同时一些细菌能够耐受或者是能够利用芘和苯甲酸钠从而实现污染物的降解和自身数量的富集。

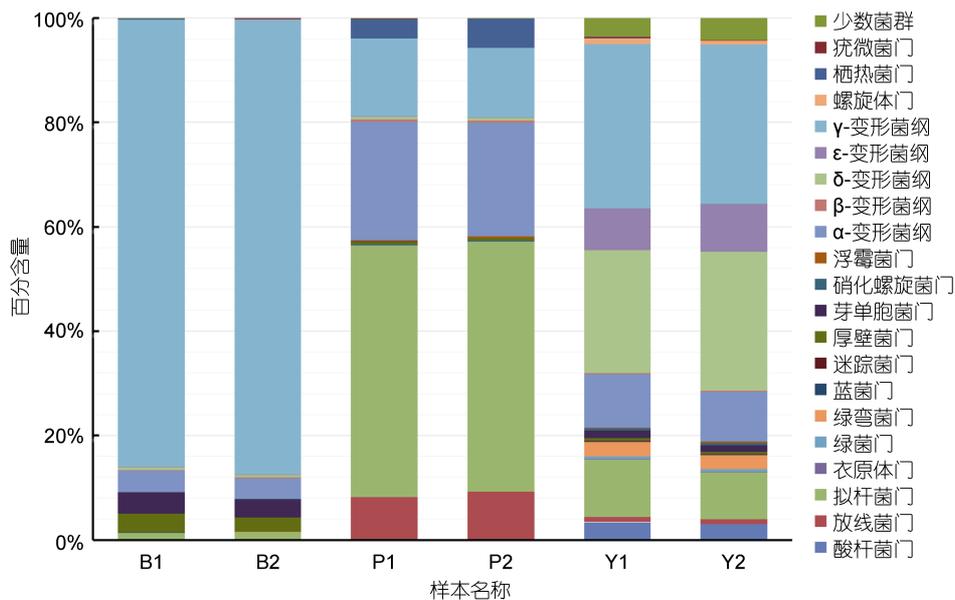


图 2 样品在 cutoff=0.03 情况下菌群在门的水平上(变形菌门在纲的水平)的分类情况  
Fig.2 Bacterial classification in phylum level in cutoff=0.03 (Proteobacteria in class level)

在属水平, 对照组中数量占细菌群落前十位的属百分含量介于 1.000%—10.000%之间, 大多数属于未被明确分类的细菌, 说明在对照样品中没有占主导地

位的菌属, 另一方面也能够说明人们对海洋环境中的细菌群落的认识还不够充分。添加苯甲酸钠的实验组中占前四位的菌属为假海源菌属(*Pseudidiomarina*)、

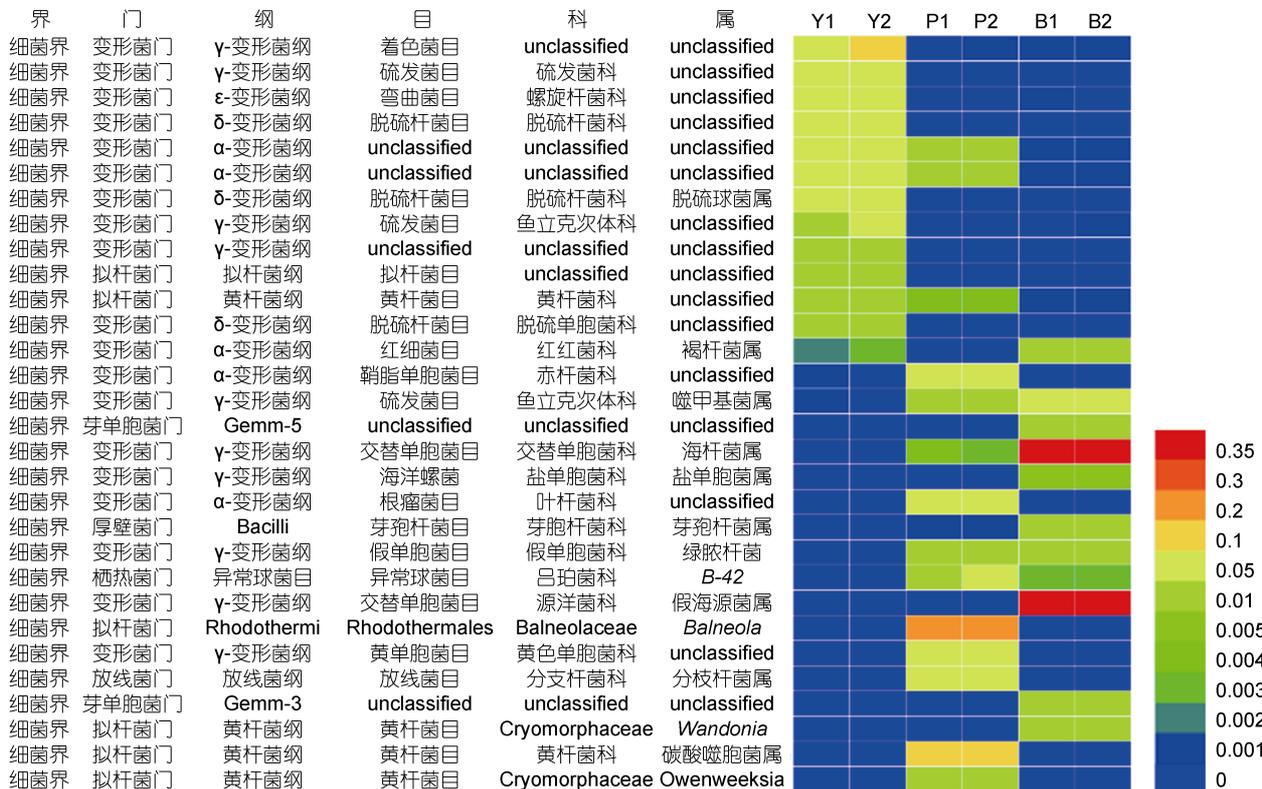


图3 Heatmap 图显示有无胁迫样品细菌群落结构的组成与变化

Fig.3 Heatmap showing the relative abundance of different bacterial genera  
柱状图中的不同颜色表征不同种群的测序丰度

海杆菌属(*Marinobacter*)、噬甲基菌属(*Methylophaga*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*), 分别占 39.421%、37.924%、6.254%、2.921%, 而在添加茈的实验组中假海源菌属(*Pseudidiomarina*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、噬甲基菌属(*Methylophaga*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)所占的比例相比于对照组也相应地有所增加, 分别占 0.011%、0.349%、1.418%、0.077%。在添加茈实验组, 占前两位的菌属分别为 *Balneola* 属和碳酸噬胞菌属(*Aequorivita*)细菌, 分别占菌群含量的 28.88%、13.25%; 而在对照组和添加苯甲酸钠的实验组中并未检测到以上两者。我们推测 *Balneola* 属和碳酸噬胞菌属(*Aequorivita*)这两个菌属在耐受或者降解茈的过程中起重要作用, 在添加茈后, 菌群得到富集成为主导菌群。假海源菌属(*Pseudidiomarina*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、噬甲基菌属(*Methylophaga*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)细菌在添加苯甲酸钠后菌群富集成为优势菌群; 在添加茈的实验组, 可能由于环境中茈的降解, 在代谢过程中产生的单苯环类化合物导致这四种菌属相比于对照组菌群数量稍微有富集。

假海源菌属(*Pseudidiomarina*)、海杆菌属

(*Marinobacter*)细菌在添加苯甲酸钠实验组中极大地富集成为优势菌群。研究表明海杆菌属(*Marinobacter*)、假海源菌属(*Pseudidiomarina*)能够广泛利用多种碳源作为底物, 许多成员已经被证明具有多环芳烃的降解能力。据报道, *Marinobacter* sp. NCE312 能够降解萘、2-甲基-萘、1-甲基萘(Handley *et al.*, 2009)。Moghadam 等(2014)分离到海杆菌属(*Marinobacter*)和假海源菌属(*Pseudidiomarina*)菌株能够以茈和菲为唯一碳源和能量来源 Kostka 等分离的海杆菌属(*Marinobacter*)和假海源菌属(*Pseudidiomarina*)细菌在降解石油的过程中发挥了一定作用(Kostka *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013)。Li 等(2012)发现海杆菌属(*Marinobacter*)能够在广泛的盐度范围内降解单苯环类化合物, 成为主导菌群。*Balneola* 属、碳酸噬胞菌属(*Aequorivita*)细菌在茈胁迫下成为添加茈的实验组主要的菌群, 有研究表明 *Balneola* 属细菌可以在较广泛的盐浓度范围内有效降解 BTEX(张倩, 2012), *Balneola* 属细菌在添加茈的环境中富集还是首次报道。推测在海洋原位环境中 *Balneola* 属、碳酸噬胞菌属(*Aequorivita*)等细菌协同完成茈的降解和自身数量

的富集。

#### 4 结论

芘和苯甲酸钠的胁迫对海洋沉积物中微生物群落结构演替产生巨大影响。相对于对照组, 添加芘的实验组中 *Balneola* 属、碳酸噬胞菌属(*Aequorivita*)极大地富集成为优势菌群; 添加苯甲酸钠的实验组中海杆菌属(*Marinobacter*)和假海源菌属(*Pseudidiomarina*)极大地富集成为优势菌群。这些菌已经被证明能够参与芳香族化合物的降解。本实验表明, 海洋中不同的芳香族化合物胁迫下细菌群落结构发生明显演替。本实验结果能够为芳香族化合物乃至石油等有机污染物的修复提供理论指导。

#### 参 考 文 献

- 毛 宁, 薛泉宏, 唐 明, 2010. 2株放线菌对土壤中苯甲酸和对羟基苯甲酸的降解作用. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 38(5): 143—148
- 张晓云, 盖忠辉, 台 萃等, 2012. 微生物降解苯甲酸的研究进展. 微生物学通报, 39(12): 1808—1816
- 张 倩, 2012. 高盐条件 BTEX 降解菌群多样性、降解基因型及相容性溶质分析. 上海: 华东理工大学硕士论文
- 陈志丹, 晁群芳, 杨滨银等, 2012. 一株芘降解菌 B2 的降解条件优化及降解基因. 环境工程学报, 6(10): 3795—3800
- 崔志松, 邵宗泽, 2006. 一株海洋新鞘氨醇杆菌 *phe-8* (*Novosphingobium* sp.) 的 PAHs 降解基因和降解特性. 厦门大学学报(自然科学版), 45(S): 257—261
- Collier L S, Nichols N, Neidle E L, 1997. *benK* encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter* sp. strain ADP1. Journal of Bacteriology, 179(18): 5943—5946
- Deng W K, Wang Y B, Liu Z X *et al*, 2014. HemI: a toolkit for illustrating heatmaps. PLoS One 9(11): e111988
- Edgar R C, 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics, 26(19): 2460—2461
- Edgar R C, Haas B J, Clemente J C *et al*, 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics, 27(16): 2194—2200
- Gao W, Cui Z S, Li Q *et al*, 2013. *Marinobacter nanhaiticus* sp. nov., polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the sediment of the South China Sea. Antonie van Leeuwenhoek, 103(3): 485—491
- Geissler J F, Harwood C S, Gibson J, 1988. Purification and properties of benzoate-coenzyme A ligase, a *Rhodospseudomonas palustris* enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. Journal of Bacteriology, 170(4): 1709—1714
- Handley K M, Héry M, Lloyd J R, 2009. *Marinobacter santoriniensis* sp. nov., an arsenate-respiring and arsenite-oxidizing bacterium isolated from hydrothermal sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59(4): 886—892
- Heitkamp M A, Franklin W, Cerniglia C E, 1988. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. Applied and Environmental Microbiology, 54(10): 2549—2555
- Juhasz A L, Naidu R, 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation, 45(1—2): 57—88
- Kim S II, Song S Y, Kim K W *et al*, 2003. Proteomic analysis of the benzoate degradation pathway in *Acinetobacter* sp. KS-1. Research in Microbiology, 154(10): 697—703
- Kostka J E, Prakash O, Overholt W A *et al*, 2011. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. Applied and Environmental Microbiology, 77(22): 7962—7974
- Li H, Zhang Q, Wang X L *et al*, 2012. Biodegradation of benzene homologues in contaminated sediment of the East China Sea. Bioresource Technology, 124: 129—136
- Moghadam M S, Ebrahimpour G, Abtahi B *et al*, 2014. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. Journal of Environmental Health Science and Engineering, 12(1): 114
- Oie C S I, Albaugh C E, Peyton B M, 2007. Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism. Water Research, 41(6): 1235—1242
- Parales R E, Bruce N C, Schmid A *et al*, 2002. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B3). Applied and Environmental Microbiology, 68(10): 4699—4709
- Parsek M R, Shinabarger D L, Rothmel R K *et al*, 1992. Roles of CatR and *cis*, *cis*-muconate in activation of the *catBC* operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida*. Journal of Bacteriology, 174(23): 7798—7806
- Peng J J, Li H, Su J Q *et al*, 2013. Response of bacterial communities to short-term pyrene exposure in red soil. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 7(4): 559—567
- Rehmann K, Noll H P, Steinberg C E W *et al*, 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. Chemosphere, 36(14): 2977—2992
- Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T *et al*, 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 75(23): 7537—7541

## RESPONSE OF BACTERIAL COMMUNITIES TO PYRENE AND BENZOATE SODIUM IN MARINE SEDIMENTS

SUN Xiang-Nan<sup>1,2</sup>, HU Xiao-Ke<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** We set up microcosm experiments to study dynamic changes in the bacterial communities, and in which we supplemented with different model PAH compounds pyrene and sodium benzoate. High-throughput sequencing technology Illumina Miseq targeting the 16S rRNA gene V2-V3 variable region was used to analyze changes in composition of the bacterial communities after treated with pyrene or sodium benzoate. Results show that either pyrene or sodium benzoate could dramatically affect the bacterial community structure in marine sediments, and largely reduced the diversity and abundance. *Marinobacter* and *Pseudidiomarina* were boosted in sodium-benzoate-enriched group, while *Balneola* and *Aequorivita* were greatly enriched in pyrene-adding group. The results may help understanding some functional bacteria capable of degrading pyrene and sodium benzoate, and providing a theoretical basis for bioremediation of PAH compounds in marine environment.

**Key words** bacterial community; diversity; sodium benzoate; pyrene; dynamic changes