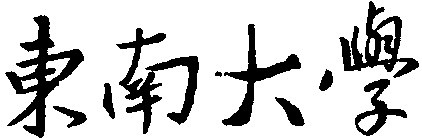
·



**硕士学位论文**

太湖底泥多氯联苯厌氧脱氯过程中

微生物群落变化研究

**专 业 名 称**： **建筑与土木工程**

**研究生姓名** ：

**导 师 姓 名**：

本论文受国家自然科学基金项目资助，在此表示感谢

the shift of microbial community with ANAEROBIC dechlorination of POLYCHLORINATED BIPHENYLS in sediments from Taihu Lake

A Dissertation Submitted to

Southeast University

For the Academic Degree of Master of Engineering

BY

Supervised by

Department of Municipal Engineering

Southeast University

April 2017

**东南大学学位论文独创性声明**

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得东南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 日期：

**东南大学学位论文使用授权声明**

东南大学、中国科学技术信息研究所、国家图书馆有权保留本人所送交学位论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。除在保密期内的保密论文外，允许论文被查阅和借阅，可以公布（包括以电子信息形式刊登）论文的全部内容或中、英文摘要等部分内容。论文的公布（包括以电子信息形式刊登）授权东南大学研究生院办理。

研究生签名： 导师签名： 日期：

太湖底泥多氯联苯厌氧脱氯过程中

微生物群落变化研究

摘要

多氯联苯（Polychlorinated biphenyls，PCBs）是一种典型的有机氯污染物，具有疏水、难降解、远距离传输特性，容易在土壤和底泥中富集。河湖底泥中的pcb可通过水体中的生物富集作用危害人类健康。研究自然环境条件下脱氯微生物的作用过程与机理是实现多氯联苯污染底泥原位修复的关键基础工作之一。

本研究以三种太湖底泥微环境为实验对象，分别是外加PCBs母体的微环境（记为T-1实验组，又称产甲烷条件下太湖底泥反应微环境）、外加PCBs母体以及Na2SO4的微环境（记做T-S实验组，又称硫酸盐还原条件下太湖底泥反应微环境）、外加PCBs母体以及FeOOH的微环境（记做T-Fe实验组，又称三价铁还原条件下太湖底泥反应微环境），对PCBs在各实验微环境下的自然降解情况进行为期66周的监测，共对13个时间点的（数量）样品进行采样（每个实验组采集三个平行样）（获得多少个样品）。对泥浆样品中的PCBs提取纯化后，参照美国环保署方法（EPA Method 8082）进行气相色谱检测，同时提取各样品的总菌DNA，筛选出。。。进行高通量测序（10个样品）及荧光实时定量PCR实验。通过分子生物学方法与PCBs化学分析相结合，筛选PCBs降解指示微生物/基因。主要结论如下：

（1）太湖底泥本土微生物能降解PCBs。

（2）各个实验环境下PCBs降解均存在反应滞后期（T-1实验组为3–6周，其余两组为9周），添加竞争性电子受体（硫酸盐、三价铁）会延长反应滞后期。

（3）总体来看，脱氯速率由快到慢排序为T-1＞T-Fe＞T-S。竞争性电子受体会抑制多氯联苯的脱氯，且硫酸盐的抑制作用强于三价铁。T-1实验组在反应启动后（3–6周）即快速脱氯（3–18周总PCBs脱氯速率为0.3728 ± 0.0146 mg/kg·week-1；18周–36周速率为0.099 ± 0.009mg/kg·week-1；36–66周速率为0.158 ± 0.005 mg/kg·week-1），66周内PCBs总浓度由49.56 ± 0.38降至37.21 ± 1.43 mg/kg。而添加竞争性电子受体的实验组在脱氯开始（第9周）后反应速率较慢。9–36周T-S实验组脱氯速率为0.041 ± 0.007 mg/kg·week-1，T-Fe组脱氯速率为0.098 ± 0.017 mg/kg·week-1。36周后进入快速脱氯期，T-S实验组在36–51周、51–66周的平均脱氯速率分别为0.122、0.180 mg/kg·week-1，T-Fe组36–66周脱氯速率为0.233 ± 0.015 mg/kg·week-1。

（4）实验周期内，体系的类二噁英毒性当量明显降低。太湖底泥微环境在三种实验条件下均表现出优先降解类二噁英多氯联苯PCB 105、PCB 114的特点。太湖底泥具有快速去除类二噁英多氯联苯、减小生态毒性的能力，有利于原位修复。

（5）由第0周（背景值）、第6周、第24周、第66周各实验组共10个样品的高通量测序结果可知：在各个实验组，绿弯菌门中的脱氯菌 *Chloroflexi*占尤其是其中的xxx，但占比并不大，占4.03%。总菌百分比随脱氯进程增加。其中，与多数PCBs脱氯菌密切相关的*Dehalococcoides*不仅随脱氯进程占比增加，而且在PCBs脱氯反应未启动（0周样品、6周T-Fe组及T-S组样品中）或脱氯反应缓慢时（24周T-S组样品中）未检出。已知的PCBs脱氯菌只在太湖底泥微环境体系中占很小的部分，各实验组中*Dehalococcoides*菌最高占细菌总数的4.13%，（qpcr结果写到一起）微环境中更多的是不具备PCBs脱氯功能的细菌（第一条，不能按时间顺序写），如厚壁菌门梭菌目（*Clostridiales*）、*δ*变形菌亚门（δ-*Proteobacteria*）微生物。

（6）对总细菌（*Bacteria*）、绿弯菌门中的脱氯菌（*Chloroflexi*，CHL）、*Dehalococcoides*（DHC）、*o*-17/DF-1的16S rRNA基因以及2种还原脱卤酶基因*ardA*、*rdh*12进行实时荧光定量PCR实验，考察基因数量在各个实验组随时间的变化。其中*o*-17/DF-1基因在各体系中都非常少，CHL、DHC的16S rRNA基因，以及*ardA*、*rdh*12基因均随脱氯反应的进行呈增长趋势，相同时间点的基因数量趋势为T-1组＞T-Fe组＞T-S组，与PCBs降解的多少相对应。到第66周，脱氯相关菌/基因（除*o*-17/DF-1）仍保持在较高水平，表明体系仍具有良好的脱氯潜能。

（7）脱氯相关菌*Chloroflexi*、*Dehalococcoides* 16S rRNA基因能指示产甲烷条件下（T-1实验组）和三价铁还原条件下（T-Fe实验组）底泥微环境脱氯反应的发生。在硫酸盐还原条件下（T-S实验组），脱氯相关菌*Chloroflexi*可以指示脱氯反应的加快，而*Dehalococcoides*无法指示太湖底泥的脱氯情况。与已有研究结果不同，本实验条件下推定脱氯菌*Chloroflexi*相比*Dehalococcoides*可以更好地指示硫酸盐还原和三价铁还原条件下脱氯的启动或脱氯速率的加快，说明脱氯反应的沉积物特异性非常强，指示微生物/基因需要相应调整。

（8）还原脱卤酶基因*ardA*、*rdh*12均能指示产甲烷条件下（T-1实验组）、三价铁还原条件下（T-Fe实验组）太湖底泥微环境脱氯反应的启动，而在硫酸盐还原条件下（T-S实验组）可以指示脱氯反应的加快。T1和T-Fe组的启动和TS组的脱氯反应加快。。。还原脱卤酶基因。。。且这两个基因比C、D 16rs的指示更灵敏。四个基因都能反映产甲烷条件下脱氯反应基因的启动，但不能反应TS组脱氯反应的启动，三个基因能反映TS组的加快，但x基因不能反应其加快，且AB所有指示更加灵敏。

（9）在PCB单体测定实验中，发现了多氯联苯的邻位脱氯现象，但qPCR实验测得的*o*-17/DF-1 16S rRNA基因的浓度却很低，推测太湖底泥中存在其他未知的具有邻位脱氯功能的菌株或酶，有待进一步研究。

（10）

气相色谱和qpcr的实验表明，xx存在临位脱落现象，但本实验的qpcr实验没有发现文献中报到的临位脱氯菌的存在，因此可能这个体系中存在其他的与临位脱氯菌的存在，有待进一步的研究。

最后一句点题：脱氯研究内容还有很多，还有大量的工作需要去做。。。围绕底泥中脱氯菌的系统深入研究对及时？多氯联苯的降解过程、开发相关原位修复技术具有重要作用。

**关键词：**多氯联苯，厌氧脱氯，底泥，高通量测序，qpcr

降解过程毒性当量的变化

脱氯菌的识别

气相色谱实验表明：

实验周期内，降解速率不一样，要写上

3个实验组66周后的速度有。。。

毒性当量：T1组和TF1组

降解过程的毒性当量分析结果为。。。这与降解速率的测定结果是相吻合的。

高通量测序：

高通量测序结果表明底泥中与脱氯相关的菌种有。。。

TCEA

讲趋势、讲几点

**The shift of microbial community with anaerobic dechlorination of polychlorinated biphenyls in sediments from Taihu Lake**

Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are typical organochlorine contaminants with hydrophobic, non-degradable and long-distance transport properties, which are easily enriched in soil and sediment. PCBs in the sediment can be re-suspended into the water body and do harm to human health through bioaccumulation. As a vital source and sink of PCBs, attention should be paid to sediment. The ubiquitous presence of microorganisms with dechlorination function makes natural attenuation under monitoring possible and finally achieves in-situ remediation of PCBs in sediment.

The experiment groups were set as group with PCBs added (recorded as T-1, also as methane production condition of the Taihu Lake sediment microcosms), group with PCBs and Na2SO4 added (recorded as T-S, also as sulfate reduction condition of the Taihu Lake sediment microcosms), and group with PCBs and FeOOH added (recorded as T-Fe, also as ferric iron reduction condition of the Taihu Lake sediment microcosms). Microcosms were set up to explore the dechlorination of PCBs. Over the course of 66-weeks，three parallel samples were collected 13 times. Gas chromatography was performed according to the EPA method after the extraction and purification of PCBs in slurry. DNA of samples was extracted for high-throughput sequencing and qPCR. By combining molecular biology method with chemical analysis, microorganisms/genes were screened to indicate the dechlorination of PCBs. The overarching work and findings of this study are as follows:

(1) Autochthonous microorganisms in sediments of Taihu Lake are capable of dechlorinating PCBs.

(2) Lag time exists in all microcosms during the dechlorination of PCBs (3 to 6 weeks for T-1 group and 9 weeks for the other two groups) and the addition of competitive electron acceptors (sulfate, ferric iron) would extend the lag time.

(3) The dechlorination rate is T-1>T-Fe>T-S from fast to slow. Competing electron acceptor partially inhibited PCB dechlorination and the sulfate inhibition is stronger than that of ferric iron. After the initiation of the reaction (3rd–6th week)，the dechlorination rate of total PCBs was 0.3728 ± 0.0146 mg/kg·week-1 (until 18th week) in the T-1 group; 0.099 ± 0.009 mg/kg·week-1 during 18th to 36th week; 0.158 ± 0.005 mg/kg·week-1 during 36th to 66th week，the total concentration of PCBs decreased from 49.56 ± 0.38 to 37.21 ± 1.43 mg/kg in 66 weeks. In the T-S group, the dechlorination rate of 0.041 ± 0.007, 0.122, 0.180 mg/kg·week-1 were yield in 9th to 36th week, 36th to 51st week and 51st to 66th week. In T-Fe group, the dechlorination rate of 0.098 ± 0.017, 0.233 ± 0.015 mg/kg·week-1 were yield in 9th to 36th week and 36th to 66th week respectively.

(4) During the experimental period, the dioxin-like toxic equivalency of PCBs was significantly decreased. In Taihu Lake sediments, dioxin-like PCB 105 and 114 dechlorinated faste, suggesting a great detoxification potential in Taihu Lake sediments, which is crucial for *in-situ* bioremediation.

(5) The results of high-throughput sequencing of 10 samples (week 0, week 6, week 24 and week 66) revealed that the percentage of *Chloroflexi* over total bacteria increased with the dechlorination process. *Dehalococcoides*, which are closely related to most dechlorination of PCBs, were not detected when the rate of PCBs dechlorination is slow, and would increase with dechlorination process. The known microorganisms, which can dechlorinate PCBs, only accounts for a small proportion of the system (*Dehalococcoides* highest accounted for 4.13% of the total bacteria). Bacteria such as *Clostridiales*, δ-*Proteobacteria*, that do not have the dechlorination function are superior in number.

(6) Real-time PCR assay was operated to examine the change of 16S rRNA gene of *Chloroflexi* (CHL), *Dehalococcoides* (DHC), o-17/DF-1 and two reductive dehalogenase genes (*ardA* and *rdh*12). *Chloroflexi*, *Dehalococcoides*, *ardA* and *rdh*12 were increasing along with dechlorination. At each sampling time point, the total gene copy numbers were generally T-1>T-Fe>T-S. This coincided with the degree of dechlorination in each set of microcosms. At week 66, the dechlorination-associated genes/microorganisms (except *o*-17/DF-1) remained at a high level, indicating a promising potential for further dechlorination.

(7) *Chloroflexi*, *Dehalococcoides* 16S rRNA gene can be used to indicate the dechlorination in T-1 and T-Fe group. *Chloroflexi* can indicate the rapid stage of dechlorination in the T-S group while *Dehalococcoides* cannot. Different from the existing studies, under this experimental condition, *Chloroflexi* can better indicate the initiation or rapid reaction in dechlorination in T-S and T-Fe group than *Dehalococcoides*, indicating that the specificity of dechlorination is very strong, and the microorganisms/genes needs to be adjusted accordingly.

(8) Both the *ardA* and *rdh*12 genes can reflect the initiation of dechlorination reaction in T-1 and T-Fe, and the rapid reaction of T-S group. Compared with *Chloroflexi* and *Dehalococcoides*, these two reductive-dehalogenase genes are more sensitive for indicating dechlorination. Therefore, *ard*A and *rdh*12 are more likely to be used for the estimation of dechlorination potential *in-situ*.

(9) The *ortho* dechlorination phenomenon of PCBs was found in this experiment, but the concentration of *o*-17/DF-1 16S rRNA gene was very low. It is speculated that there are other unknown strains or enzymes with *ortho* dechlorination function in Taihu Lake sediments, which need to be studied further.

(10) In the environment with high sulfate concentration (about 18 mmol/kg slurry) (T-S group), dechlorination indicator microorganisms/genes chosen in this study reflected the dechlorination of PCBs poorly. The specificity of the sediments strongly impacts the dechlorination, indicating that the microorganisms/genes need to be adjusted accordingly. It is presumed that the degradation mechanism of PCBs under sulfate reducing condition is different from the others, and the dechlorination bacteria in T-S group may not belong to *Dehalococcoides*. The dechlorination indicator microorganisms/genes need to be further sought in the sulfate-reducing bacteria and other related microorganisms.

**Keywords: polychlorinated biphenyls, anaerobic dechlorination, sediment, microbial community，gene**

目录

摘要 I

Abstract IV

第一章 绪论 1

1.1 底泥中多氯联苯污染现状 1

1.1.1 多氯联苯基本性质 1

1.1.2 中国底泥中多氯联苯污染现状 1

1.2 微生物群落研究的分子生物学方法 2

1.2.1 实时荧光定量PCR 3

1.2.2 高通量测序 3

1.3 多氯联苯微生物降解研究进展 4

1.3.1 多氯联苯的好氧降解 4

1.3.2 多氯联苯的厌氧脱氯 4

1.4 研究目的及意义 6

1.5 研究内容及技术路线 6

第二章 材料与方法 8

2.1 底泥微环境PCB单体测定 8

2.1.1 实验材料 8

2.1.2 实验设置 10

2.1.3 实验方法 11

2.2 底泥微环境微生物高通量测序 11

2.2.1 实验材料 11

2.2.2 实验方法 12

2.3 底泥微环境微生物实时荧光定量PCR 13

2.3.1 实验材料 13

2.3.2 基本方法 14

第三章 底泥微环境PCB单体测定结果分析 16

3.1 实验方法可靠性验证 16

3.2 多氯联苯母体浓度变化 16

3.3 多氯联苯脱氯程度 20

3.4 多氯联苯脱氯产物及总脱氯速率 21

3.5 多氯联苯解毒效果 24

3.6 本章小结 26

第四章 高通量测序结果分析 28

4.1 测序统计及细菌多样性评估 28

4.2 底泥细菌群落组成 29

4.3 本章小结 37

第五章 实时荧光定量PCR实验结果分析 39

5.1 *Chloroflexi* 16S rRNA基因定量 39

5.2 *o*-17/DF-1 16S rRNA基因定量 42

5.3 *Dehalococcoides* 16S rRNA基因定量 42

5.4 *ardA*基因定量 44

5.5 *rdh*12基因定量 46

5.6 本章小结 48

第六章 结论与展望 50

6.1 结论 50

6.2 展望 52

参考文献 54

## 第一章 绪论

1.1 底泥中多氯联苯污染现状

#### 1.1.1 多氯联苯基本性质

多氯联苯（Polychlorinated Biphenyls，简称PCBs）是联苯由1–10个可能的氯原子取代联苯分子上的氢原子而成，有209种可能的单体分子，其分子式统一表达为C12H10-nCln（n=1-10），结构见图1-1。氯原子取代位置为2、6位称为邻位（*ortho*-）取代，氯原子取代位置3、5位为间位（*meta*-）取代，取代位置4为对位（*para*-）取代。

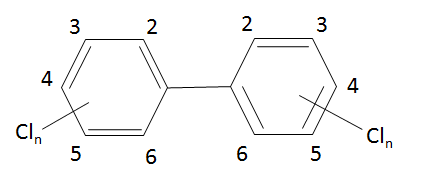


图1-1 多氯联苯分子结构

由于具有良好的热稳定性、化学惰性、阻燃性、绝缘性，多氯联苯广泛用做变压器油、电容器介质、液压流体、热交换液体等[1]。1929年，美国Swam化学公司首先开始商业化生产多氯联苯[2]。在上世纪60年代中期，工业上的多氯联苯产量达到每年10万吨[3]。然而，多氯联苯作为潜在的神经毒素、致癌物质和内分泌干扰物，存在着致畸、致癌、致突变等风险，在微克级别就会对生态环境造成负面影响，并会通过生物富集及食物链放大作用危害人类健康[4]。1968年日本发生的米糠油事件，使多氯联苯的环境污染问题得到了广泛关注[5]。多氯联苯等七种工业混合物于1979年被美国环境保护署（USEPA）列入优先检测物黑名单，并在全美禁用。2001年，斯德哥尔摩公约将其列为首批控制消除的12种持久性有机污染物之一[6]。多氯联苯的累计全球产量约为130万吨，其中三氯联苯、四氯联苯以及五氯联苯的产量超过70％[7]。在中国，累计生产的多氯联苯近万吨，其中90％用作电力电容器的浸渍剂[5]。由于处置不当等原因，PCBs进入环境中，会对生态环境及人体健康造成潜在威胁[8]。

#### 1.1.2 中国底泥中多氯联苯污染现状

PCBs的疏水、难降解、远距离传输特性使土壤和底泥成为其主要归趋。底泥中的PCBs可通过再悬浮作用进入水体，也可以被生物吸收富集，危害人类健康[8, 9]。对于中国水域底泥中的多氯联苯污染物的调查与风险评价，研究者早有关注，其中部分河流湖泊底泥中PCBs浓度见表1-1。

表1-1 全国主要河流湖泊底泥中PCBs含量（干重）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 河流、湖泊 | 采样时间 | PCBs平均浓度  ng/g（干重） | PCBs浓度范围  ng/g（干重） | 文献 |
| 松花江 | 2014 | 1.56 | 1.12–2.19 | [10] |
| 黄海 | 2011 | 0.715 | 0.099–3.13 | [11] |
| 巢湖 | 2009 | 23.24 | 11.07–42.71 | [12] |
| 椒江 | 2008 | 29.08 | 4.93–108.79 | [13] |
| 大运河 | 2008 | 9.26 | 0.5–93 | [14] |
| 滇池 | 2008 | 1.2 | 0.6–2.4 | [15] |
| 海河及河口 | 2007 | 66.8 | n.d.–253 | [16] |
| 太湖 | 2007 | 4.86 | 1.35–13.8 | [17] |
| 长江 | 2005 | 9.2 | 1.2–45.1 | [18] |
| 黄河 | 2004 | 3.10 | n.d.–5.98 | [19] |

我国主要河流湖泊底泥中PCBs平均浓度在几ng/g（干重）到几十ng/g（干重）之间，太湖底泥PCBs浓度处于中等水平。

太湖流域是我国经济最发达的地区之一，同时也面临着巨大的生态环境压力。以多氯联苯为代表的有机氯污染物是影响太湖流域生态环境的重要因素之一。太湖流域工农业发展程度高、乡镇工业发达，工业产品中的多氯联苯成分通过径流、沉降等途径进入水体，进而沉积在底泥中[9, 20]。

太湖是无锡、苏州两市的主要饮用水水源地，而且渔业发达，出产大量水产，周边居民的鱼类摄入量能达到100g/天，故太湖的潜在生态风险应被仔细评估[21]。周春宏等[22]通过调查典型饮用水源地多氯联苯含量，发现部分地表水样品中多氯联苯的含量超过了《地表水水质标准》（GB3838-2002）中20 ng/L的要求，存在一定的健康风险。Wang等[23]在太湖水体中检测到高达631 ng/L的多氯联苯。Xu等[24]研究了太湖梅梁湾水源地底泥10年来的二噁英毒性，发现类二噁英多氯联苯（共面多氯联苯）依旧是导致总二噁英毒性居高不下的重要因素。张跃军等[25] 分析了太湖流域内河河道底泥多氯联苯残留量，推测其多氯联苯总含量可能超过《农用污泥中污染物控制标准》（GB 4284-84）规定的200 ng/g限值，需要采取额外修复手段，以避免多氯联苯通过清淤还田进入食物链，造成更大的健康危害。

1.2微生物群落研究的分子生物学方法

1953年，Watson和Crick提出DNA双螺旋结构模型，标志着现代分子生物学的诞生。在20世纪50年代至70年代，以中心遗传法则为基础的分子遗传学基本理论体系逐渐建立和完善起来。

研究自然界的微生物群落结构时，由于大量微生物的不可培养性，无法运用传统微生物方法进行实验。而以PCR为基础的分子生物学技术可以很好地解决这一问题。本节将简要介绍几种微生物群落研究的分子生物学实验手段。

#### 1.2.1 实时荧光定量PCR

1996年，实时荧光定量PCR（Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction，qRT-PCR）技术由美国Applied Biosystems公司推出，通过标准曲线对未知模板进行定量。

实时荧光定量PCR有荧光探针和荧光染料2种荧光类型，2种类型中最常使用的分别是TaqMan探针和SYBR Green I染料。SYBR Green I与TaqMan探针法相比，特异性稍差但价格相对低廉。根据不同的定量方式，又可将实时荧光定量PCR分为绝对定量和相对定量2种。绝对定量即用一系列梯度稀释的已知浓度标准品制作标准曲线，与目的基因在同样条件下进行扩增，比对得到目的基因的浓度值。相对定量同时测定目的基因与恒定表达的内源性管家基因，以管家基因的量为标准，比较目的基因表达的差异。

实时荧光定量PCR 操作简便、快速高效、结果准确，得到广泛应用。叶文瑾通过对太湖富营养化水体中蓝细菌qPCR定量，研究蓝细菌群落生态分布特征[26]。Ritalahti等[27]通过对多种*Dehalococcoides*菌株的16S rRNA基因及3种还原脱卤酶基因进行qPCR定量，发现环境样品中的3种还原脱卤酶基因的总和要远远低于对*Dehalococcoides*菌株16S rRNA基因定量的结果，说明许多*Dehalococcoides*菌株含有的还原脱卤酶基因仍然未知。

#### 1.2.2 高通量测序

2005年，454 Life Science公司推出基于焦磷酸测序的高通量测序系统，将第二代测序系统引入生命科学领域市场，随后Illumina、ABI公司分别推出了Solexa Genome Analyzer、SOLiD测序平台。高通量测序（又称“下一代测序”）是相对于传统桑格（Sanger）测序而言，它能一次并行对数十万至数百万条DNA分子序列进行测定，但其读长一般较短。表1-2中是几种主要高通量测序方法的比较。

表1-2 几种高通量测序方法比较

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 方法 | 焦磷酸测序（454） | 合成测序（Illumina） | 连接测序（ABI SOLiD） |
| 读长(bp) | 700 | MiniSeq, NextSeq: 75–300;  MiSeq: 50–600;  HiSeq 2500: 50–500;  HiSeq 3/4000: 50–300;  HiSeq X: 300 | 50+35或50+50 |
| 准确度 | 99.9% | 99.9% | 99.9% |
| 测序成本  （美元/Mb） | 10 | 0.05–0.15 | 0.13 |
| 优势 | 读长较长  运行快速 | 序列产量高 | 测序成本低  应用广泛 |
| 劣势 | 运行昂贵  均聚物误差 | 设备昂贵  需要高浓度DNA | 测序速度较慢  测回文序列有问题 |

高通量测序由于其高数据产量、高精确度以及低廉的测序成本，被广泛应用于基因组测序、基因表达分析、DNA和蛋白质相互作用研究等方面。Sotirios等[28]通过对*Bacteria*16S rRNA基因V3区的高通量测序，研究在长期Ag暴露情况下的土壤微生物群落变化情况。Jiang等[29]利用高通量测序手段比较了去除废水中不同的单硝基酚的无膜生物电化学系统的细菌群落。Kube等[30]通过对脱氯菌*Dehalococcoides* CBDB1菌株的基因组全部1395502个碱基对测序，发现了32个还原脱卤酶同源（reductive-dehalogenase-homologous, *rdh*）基因，这些基因可能赋予细菌强大的脱氯潜能。

1.3 多氯联苯微生物降解研究进展

多氯联苯的生物降解可分为好氧降解和厌氧降解两类。

#### 1.3.1 多氯联苯的好氧降解

低氯代（氯原子取代数≤5）多氯联苯可以进行好氧降解。多氯联苯的好氧降解机制已有较为全面的研究[1]，其好氧降解的主要过程见图1-2。多氯联苯在联苯双加氧酶（*BphA*）作用下，形成二氢醇；随后，在二氢二羟基脱氢酶（*BphB*）的脱氢作用下形成2,3-二羟基-联苯；接着，在2,3-二羟基双加氧酶（*BphC*）的作用下，2,3-二羟基-联苯的1,2位置断裂，生成物主要为2-羟基-6-氧-6-苯-2,4-二烯烃；生成物在水解酶（*BphD*）的作用下发生脱水反应，生成氯代苯甲酸以及2-羟基-2,4-双烯戊酸。氯代苯甲酸可继续被其他微生物降解，2-羟基-2,4-双烯戊酸也可作为碳源被微生物利用，最终转化为CO2。

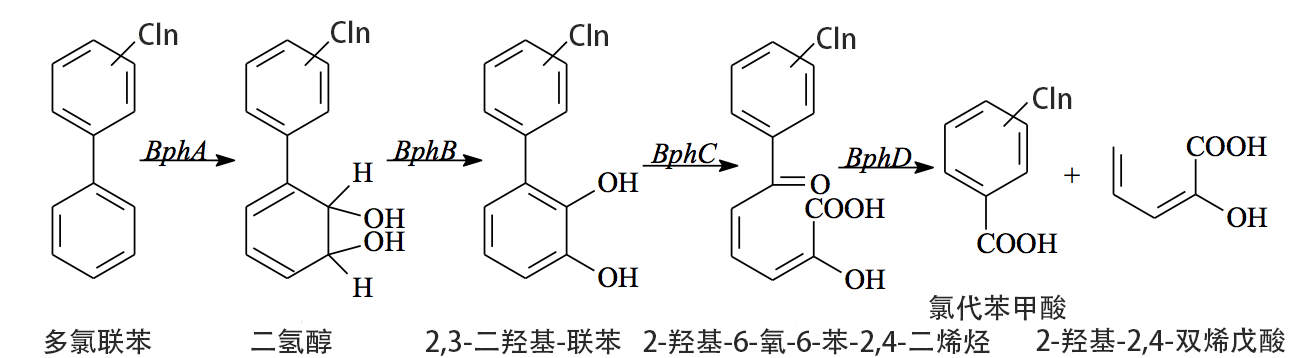


图1-2 多氯联苯微生物好氧降解主要过程

迄今为止，已分离的多氯联苯好氧降解细菌菌株多为革兰氏阴性菌，属变形杆菌门，且大多数菌株对PCBs进行共代谢降解，仅有少数菌株能利用一氯联苯、二氯联苯作为唯一碳源、能源进行降解[31]。

#### 1.3.2 多氯联苯的厌氧脱氯

20世纪80年代，Brown等[32]在对美国哈德逊河以及银湖底泥的研究中发现PCBs厌氧脱氯的证据，Quensen等[33]随即实验证实了哈德逊河底泥微生物的厌氧脱氯作用。研究者对不同的环境底泥进行了厌氧脱氯研究，发现厌氧脱氯微生物在淡水、入海口、海洋底泥中普遍存在，不仅在受PCBs污染的底泥中发现厌氧脱氯现象，在未受污染的环境底泥中同样存在[34, 35]。

处理底泥中的多氯联苯一般采取疏浚方式，对淤泥脱水填埋。这种方法虽然减少了多氯联苯在食物链中的暴露，但未降低环境中多氯联苯的量，长期风险依然存在[36]。Brown等[32]在上世纪80年代发现底泥中某些微生物可以降解多氯联苯，美国环保署随后提出监测自然衰减方案，即通过有计划的监控，利用微生物原位修复底泥中的多氯联苯[4]。随后，底泥中多氯联苯脱氯降解的相关研究在美国、日本、意大利、中国台湾等地区得到广泛开展，而在我国相关研究尚不多见[4]。

监测自然衰减方案有着成本低、环境扰动小、无二次污染的优点[37]。湖泊底泥中仅上层几厘米处于好氧环境，因此底泥中的多氯联苯降解主要依赖厌氧脱氯作用[34]。

PCBs厌氧脱氯的根源在于脱氯微生物，微生物对多氯联苯厌氧脱氯起催化作用并决定脱氯降解的潜能。然而脱氯微生物和环境中多数微生物一样，难以分离培养。近十几年来，非培养微生物基因指纹图谱技术的应用促进了脱卤微生物的鉴别[4, 38, 39]。Wu等[40, 41]发现菌株ortho-17(*o*-17)能脱去PCBs有侧位氯取代的邻位、间位氯原子。*Dehalobium chlorocoercia*菌株DF-1可在有硫还原菌*Desulfovibrio* spp.作为共生菌存在时对双侧氯取代的间位、对位氯原子的PCBs还原脱氯[42]。*Dehalococcoides mccartyi* strain 195能在氯乙烯存在时进行PCBs的厌氧脱氯，其作用和DF-1类似[43]。*Dehalococcoides* sp.菌株CBDB1被证实能够进行43种PCB单体的还原脱氯作用，在实验室条件下重现了单一菌株实现的复杂脱氯过程，可用于Aroclor 1260、Aroclor 1242的脱氯降解[44]。除上述三种纯化分离的脱卤微生物外，*Chloroflexi* Phylotype DEH-10以及*Chloroflexi* Phylotype SF-1能在底泥环境中实现PCBs的脱氯[45]。近年来，*Dehalococcoides*属的PCBs脱氯菌株 *Dehalococcoides* CG1、CG4、CG5以及JNA被纯化分离[46, 47]。随着测序技术的发展，PCBs脱氯菌株已有不少完成了基因组测序，如*Dehalococcoides* *mccartyi* strain 195、CBDB1、BAV1、CG1、CG4、CG5、JNA等，研究者对于PCBs脱氯菌的认识不断加深。

利用q-PCR技术，研究者可以大致估计复杂环境下的脱氯微生物群落情况[27]。Xu等[48]和Kjellerup等[49]使用菌属特异引物（genus-specific primers）进行聚合酶链式反应（PCR），对底泥中脱氯相关微生物16S rRNA基因定量。但是，由于PCBs脱氯菌属16S rRNA基因高度相似（相似度＞98%），而且该基因序列无法与脱氯行为关联，研究者转而关注还原脱卤酶基因（reductive dehalogenase，*rdh*），有助于进一步认识PCBs脱氯菌作用机理[27, 30, 50-52]。*Dehalococcoides*中的还原脱卤酶基因*pceA、mbrA、tceA、bvcA、vcrA*基因对底物往往有很强的选择性，用于催化PCE的四步脱氯为乙烯[46]。但是，严格意义上确定的参与PCBs作用的还原脱卤酶基因却不多[53]。Wang等[46]在CG1、CG4、CG5中发现了还原脱卤酶基因*pcbA1*、*pcbA2*、*pcbA5*，它们与高氯代PCBs的脱氯反应高度相关。随后，Matturro等[53]对Aroclor1254在拉斯佩齐亚港沉积物还原脱氯过程中的*Dehalococcoides*还原脱卤酶基因进行了研究，利用qPCR定量了*Dehalococcoides*细菌以及*pceA*、*tceA*、 *bvcA*、*vcrA*、*pcbA1*、*pcbA4*、*pcbA5*基因，其中*pcbA4*、*pcbA5*基因明显富集，表明它们在高盐度的实验环境下PCBs脱氯过程中起到了重要作用。

1.4 研究目的及意义

多氯联苯是一种典型的有机氯污染物，而底泥作为多氯联苯重要的“源”和“汇”，其中的PCBs应被重点关注。多氯联苯可在自然环境中进行降解，在底泥中主要以厌氧方式进行，通过研究太湖底泥中多氯联苯的厌氧脱氯作用，可为多氯联苯的原位修复提供依据。除多氯联苯外，太湖流域的有机氯农药（OCPs），如滴滴涕（DDTs）、六六六（HCHs）、林丹、五氯酚等都有较高的残留，这些含氯有机污染物环境行为（包括降解途径）和多氯联苯类似[8]，多氯联苯的降解研究同样能为该地区其它有机氯污染物治理提供依据。

竞争性电子受体（SO42-、FeOOH（三价铁））一方面会和多氯联苯形成竞争关系，抑制PCBs脱氯作用[54, 55]。另一方面，也有研究表明PCBs能在硫酸盐存在的情况下进行降解[56]，在三氯乙烯脱氯生成乙烯的过程中，三价铁没有完全抑制脱氯作用[57]，它们对微生物群落及多氯联苯厌氧脱氯的影响还有待进一步研究。

为探究太湖底泥PCBs的降解，模拟太湖底泥反应微环境，以及外加竞争性电子受体（SO42-、FeOOH（三价铁））的情况下太湖底泥微环境多氯联苯厌氧脱氯速率、程度，并利用分子生物学手段探究这三种不同的反应微环境厌氧脱氯过程中微生物群落的变化。通过研究脱氯过程中的总细菌、PCBs脱氯细菌及关键脱卤酶基因的调控变化规律，结合PCB单体测定结果，筛选出合适的脱氯指示微生物/基因，揭示太湖底泥多氯联苯脱氯降解潜能，进而为监测自然衰减法原位修复多氯联苯污染提供微生物方面的依据。

1.5 研究内容及技术路线

（1）进行PCB单体测定实验，考察多氯联苯在三种实验条件下（外加PCBs、外加PCBs及电子受体SO42-、外加PCBs及FeOOH）太湖底泥微环境中PCBs的脱氯速率、脱氯程度及环境解毒效果；

（2）利用高通量测序，研究三种实验条件下太湖底泥微环境在PCBs脱氯过程中的群落变化；

（3）利用实时荧光定量PCR方法，研究三种实验条件下PCBs脱氯过程中总细菌（*Bacteria*）、3种脱氯相关细菌（*Chloroflexi*、*o*-17/DF-1、*Dehalococcoides*）以及3种脱卤酶基因（*ardA*、*rdh*12、*tceA*）的变化情况。

本研究的技术路线见图1-3，其中反应微环境中只外加PCBs的记为T-1实验组，又称产甲烷条件下的太湖底泥反应微环境；外加PCBs及SO42-的记做T-S实验组，又称硫酸盐还原条件下的太湖底泥反应微环境；外加PCBs及FeOOH的记做T-Fe实验组，又称三价铁还原条件下的太湖底泥反应微环境。

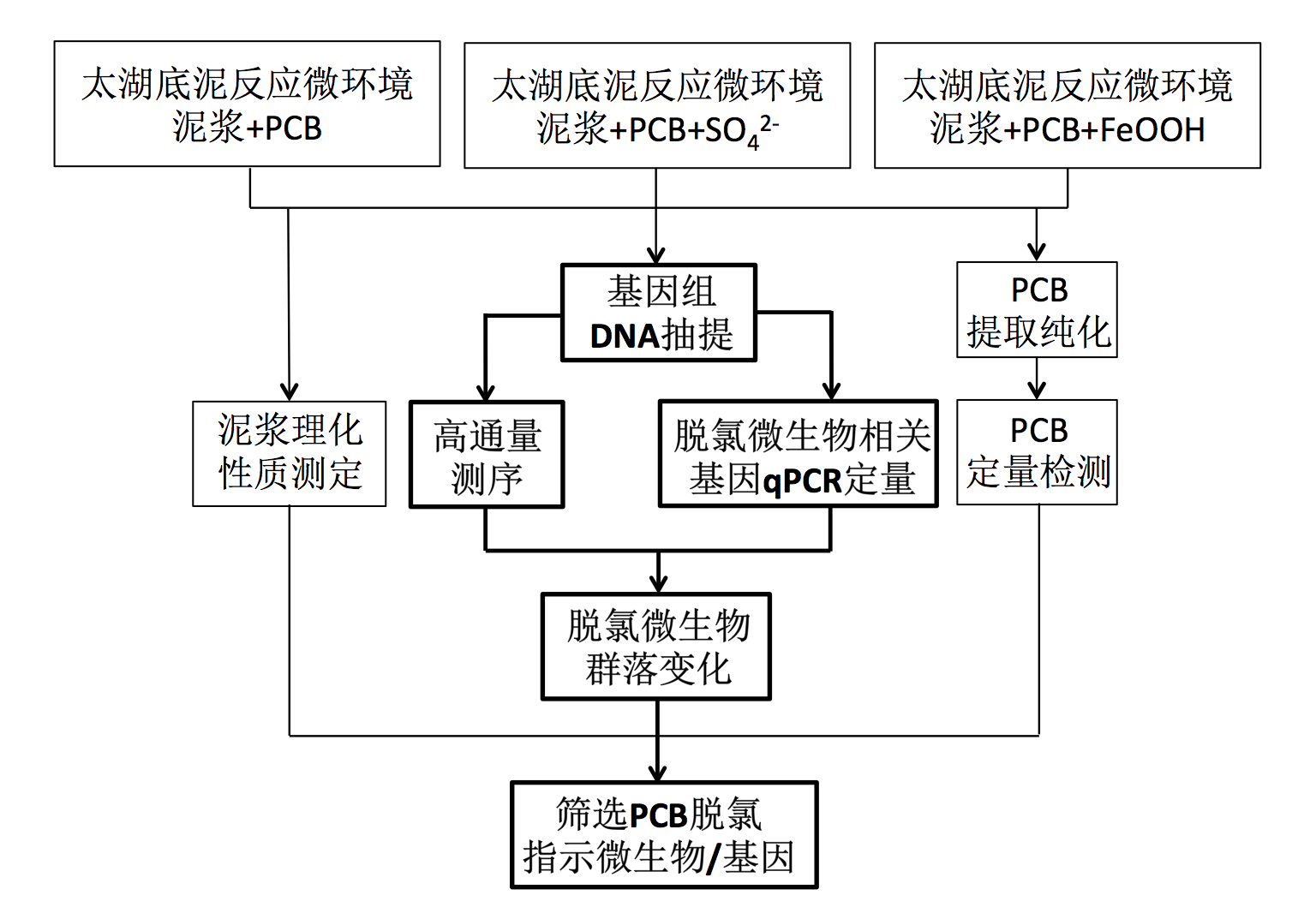


图1-3 技术路线

## 第二章 材料与方法

2.1 底泥微环境PCB单体测定

#### 2.1.1 实验材料

#### 2.1.1.1 供试底泥

使用抓斗式采泥器，采集太湖竺山湾4个采样点的表层底泥（0–5 cm）约5–6 L，在棕色玻璃瓶中水封，置于4℃冰箱中，底泥采集于2014年4月，采样点分布如图2-1所示。

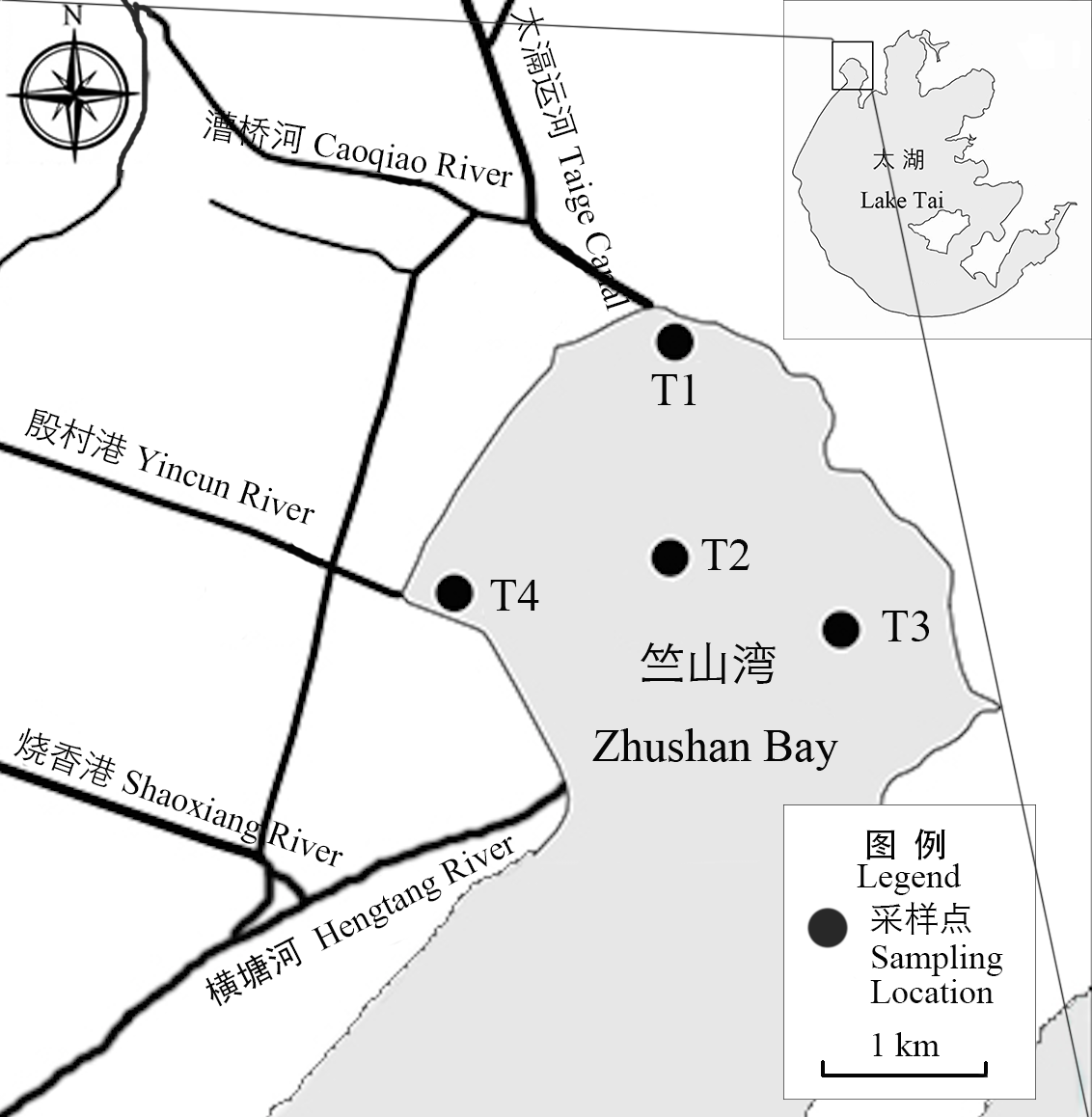


图2-1 太湖底泥采样点

采样点经纬度坐标及相关理化性质见表2-1，底泥样品平均含水率约为50.38%、pH值在6.6–7.1，样品PCBs基底值为13 ng/g–84 ng/g，与历史研究结果相似[17, 21]。

将各个采样点所取泥样等量混匀，取其中一半室温下自然风干。去除样品中的动植物残体及其它杂物，研磨后过60目不锈钢筛，保存于棕色试剂瓶中。将剩余泥样保存在4℃冰箱中，水封待用。

表2-1 太湖底泥采样点坐标及理化性质

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 采样点 | 坐标 | | PCBs本底值(ng/g)（干重） | 含水率 (%) | SO42-/（mg/kg）（干重） | Fe元素/（mg/kg） （干重） | pH |
| T1 | 31°27'6.15"N | 120°0'52.70"E | 62 | 41.58 | 690.32 | 24930.46 | 6.8 |
| T2 | 31°27'34.35"N | 120°1'26.24"E | 84 | 58.91 | 1391.71 | 32225.41 | 7.1 |
| T3 | 31°28'6.53"N | 120°2'1.47"E | 13 | 62.71 | 622.54 | 34882.20 | 6.6 |
| T4 | 31°28'40.14"N | 120°2'38.29"E | 14 | 38.86 | 749.02 | 30166.99 | 6.9 |

#### 2.1.1.2 主要仪器与试剂

气相色谱仪：美国安捷伦 7890A配微电子捕获检测器（GC-µECD）

高压灭菌器：美国致微GI54DS

旋转蒸发仪：日本东京理化 N-12008

水流抽气泵：日本东京理化 A-1000s

涡旋仪：美国赛默飞世尔科技 ZX3

试剂：美国天地牌正己烷（n-Hexane 95%，色谱纯）、丙酮（Acetone, 色谱纯）、二氯甲烷（dichloromethane，色谱纯），阿拉丁异丙醇（Isopropanol，色谱纯）

药品：美国赛默飞世尔科技弗罗里土（Florisil，60–100目）、美国西格玛奥德里奇牌无水硫酸钠（Na2SO4，分析纯）、氯化钠（NaCl，分析纯）、亚硫酸钠（Na2SO3，分析纯）、四丁基硫酸氢铵（TBA，分析纯）等

PCB单体标准物质及混标购于美国AccuStandard公司

由于太湖底泥PCBs本底值较低，为方便实验室模拟太湖底泥对PCBs厌氧脱氯的影响，要向底泥中外加PCBs。太湖流域历史使用的多氯联苯多为Aroclor系列[8, 17]，选取此系列中单体含量较高或二噁英毒性较高的单体作为实验外加PCBs，且混合液中包含高、中、低各个含氯量的PCBs，使其PCBs总浓度达到 50.00 mg/kg，其组分配置见表2-2。

表2-2 PCBs溶液成分

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 化合物 | 结构 | 分子量 | 浓度（mg/kg） |
| PCB 5 | 23- | 223 | 5.77 |
| PCB 12 | 34- | 223 | 4.32 |
| PCB 64 | 236-4 | 292 | 6.31 |
| PCB 71 | 26-34 | 292 | 3.69 |
| PCB 105 | 234-34 | 326 | 9.36 |
| PCB 114 | 234-45 | 326 | 0.64 |
| PCB 149 | 236-245 | 361 | 7.78 |
| PCB 153 | 245-245 | 361 | 8.52 |
| PCB 170 | 2345-234 | 395 | 3.71 |

底泥采样点样品SO42-的平均含量为863.4 mg/kg（干重）。为研究SO42-对太湖底泥中多氯联苯厌氧脱氯的影响，外加硫酸钠溶液，使外加终浓度为16 mmol/kg泥浆。

底泥采样点样品Fe元素的平均含量为30551.3 mg/kg（干重）。为研究Fe3+对太湖底泥中多氯联苯厌氧脱氯的影响，外加铁胶（FeOOH）溶液，使得外加终浓度为40 mmol/kg泥浆。

RAMM（Revised anaerobic mineral medium）作为一种厌氧微生物培养液，应用广泛[58]，其配置方法不再赘述。

#### 2.1.2 实验设置

称取一定量自然风干的底泥置于1L大玻璃烧杯中，称取一定量多氯联苯混合物充分溶解于500mL正己烷中，在通风橱中将多氯联苯溶液完全转移到放有底泥的大烧杯里并充分混合，用灭菌玻璃棒定期搅拌，直至正己烷完全挥发，将添加了多氯联苯的干泥转移至600mL棕色带盖玻璃瓶中，密封保存于4℃冰箱中待用。

实验配置了3种反应微环境，分别是外加PCBs的T-1实验组、外加PCBs及Na2NO4的T-S实验组、外加PCBs及FeOOH的T-Fe实验组。T-1实验组微环境的配置如下：在氮气环境下添加相当于干重2.0g干重的湿泥（4.1g湿重）、2.0g已外加多氯联苯的干泥、13.9g新鲜配制的RAMM培养液到30mL灭菌血清瓶中，使总重量为20g，血清瓶用特氟龙涂层灰丁基橡胶塞塞住并用铝盖密封。T-S实验组在同样添加湿泥、干泥后，加入0.5mL Na2SO4（0.64 mo·l/L）溶液，再加入新鲜配制的RAMM培养液直至瓶内混合物总重为20g。T-Fe实验组在同样添加湿泥、干泥后，加入0.696mL FeOOH（1.15 mol/L）溶液，再加入新鲜配制的RAMM培养液直至瓶内混合物总重为20g。将配置好的血清瓶于100rpm震荡混匀12小时。实验反应血清瓶见图2-2。



图2-2 底泥厌氧脱氯反应微环境（反应血清瓶）

为模拟底泥自然环境，将血清瓶置于避光条件下自然反应。反应起始时间为2015年7月25日，为第0周。第0周到第24周，每3周取一次样；第24周到第36周，每6周取一次样；第36周到第66周，每15周取一次样。采样前，将泥浆充分混匀，准确称取2.0g进行多氯联苯分析。取0.5mL泥浆（16000g离心8min，移除上清液），保存于-80℃冰箱，待后续分子生物学分析。取0.2mL泥浆置于0.8mL（0.5 mol/L）稀盐酸中，用菲洛嗪（Ferrozine）试剂测二价铁。每次测试均采集三个平行样。时间0点反应尚未进行，对T-1组取样作为实验基底值。

各组取样时间见下表。

表2-3 取样时间

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间/(周) | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 30 | 36 | 51 | 66 |
| T-1 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| T-S |  | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| T-Fe |  | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |

#### 2.1.3 实验方法

#### 2.1.3.1 PCBs提取与纯化

PCBs的提取方法由Quensen等[33]研究者的方法改进而来，简要描述如下。在2g底泥泥浆样品中加入200μL浓度为5 μg/mL的PCB 209作为内标。加入10mL丙酮萃取一次，10mL丙酮、正己烷混合液（体积比1：1）萃取两次，最后用3mL正己烷萃取。然后在合并后的萃取液中加入8mL的2% NaCl溶液，分离提取正己烷层，氮吹至2mL左右。

再向其中加入1mL四丁基硫酸试剂（0.1M四丁基硫酸氢铵和2M亚硫酸钠）以及2mL异丙醇除硫。涡旋1min后，若沉淀消失，加入0.1g亚硫酸钠。加入4mL无机水，分离正己烷层，氮吹至1mL。将1mL液体过弗罗里土层析柱（10mm内径，3.0g弗罗里硅土上部有约1.8g无水硫酸钠），用30mL正己烷以及30mL的正己烷、二氯甲烷混合液（体积比4：1）分别洗脱，收集洗脱液。将洗脱液旋转蒸发至4mL，正己烷定容至8mL，待气相色谱分析。

#### 2.1.3.2 PCBs气相色谱分析方法

气相色谱分析参照美国环保署的方法《气相色谱法测定多氯联苯》（EPA Method 8082），委托中国科学院南京地理与湖泊研究所公共技术分析测试中心进行。多氯联苯的检测分析使用安捷伦7890A气相色谱仪配63Ni 微电子捕获检测器和安捷伦J&W GC Colimns DB-XLB毛细管色谱柱（30m×0.18mm×0.18µm），进样模式和升温程序参照文献[59]。GC温度程序从50℃开始，保持1分钟，然后每分钟增加12℃升至150℃，每分钟0.4℃升至220℃，每分钟2℃升至260℃。载气为氦气，进样口和检测器的温度分别保持在275℃和300℃。

2.2 底泥微环境微生物高通量测序

#### 2.2.1 实验材料

高通量测序工作由广州美格基因公司完成，将底泥样品提取的总DNA送测，各样品的取样时间见表2-4。

表 2-4 高通量测序样品的取样时间

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间/(周) | 0 | 6 | 24 | 66 |
| T-1 | √ | √ | √ | √ |
| T-S |  | √ | √ | √ |
| T-Fe |  | √ | √ | √ |

#### 2.2.2 实验方法

#### 2.2.2.1 DNA提取

微环境底泥DNA的提取按MOBIO土壤DNA提取试剂盒说明书方法提取，具体操作步骤如下：

1. 在离心管中加入底泥样品

2. 轻轻涡旋混匀

3. 检查C1试剂，若出现沉淀，加热到60°C使其完全溶解

4. 加入60μL C1试剂，上下颠倒数次或稍稍涡旋混匀

5. 把离心管水平置于涡旋仪平板上，最大转速涡旋10min

6. 室温10000g离心30s

7. 转移上清液至2mL离心管中

8. 加入250μL C2试剂，涡旋混匀5s，4°C孵育5min

9. 室温10000g离心1min

10. 避开沉淀物，转移至多600μL上清液到2mL离心管中

11. 加入200μL C3试剂，轻轻涡旋混匀，4 °C孵育5min

12. 室温10000g离心1min

13. 避开沉淀物，转移至多750μL上清液到新的离心管中

14. 使用前摇匀C4试剂，加入1. 2 mL C4试剂，涡旋5s混匀

15. 在带滤芯离心管中加入约675μL上清液，室温10000g离心1min；弃去滤液，继续加入675μL上清液，室温10000g离心1min；重复上述过程，直至过滤完所有上清液

16. 向带滤芯离心管中加入500μL C5试剂，室温10000g离心30s

17. 弃去滤液

18. 室温10000g离心1min

19. 小心转移滤芯到新离心管中，尽量避免C5 试剂污染

20. 向滤膜中加入100μL C6试剂

21. 室温10000g离心30s

22. 弃去滤芯

将DNA在-40 °C冷冻保存。

#### 2.2.2.2 PCR扩增

采用引物357F（5"-CCTACGGGAGGCAGCAG-3"）、806R（5"-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3"）对基因组DNA的16S rRNA基因V3–V4可变区扩增。

PCR反应体系为:10×Ex Taq Buffer 6μL，dNTP 6μL，BSA 0.6μL，上下游引物各1.2μL，DNA 1μL，ddH2O 43.7μL，总体积60μL。

PCR循环条件如下：94°C预变性5min，94°C变性30s，52°C退火30s，72°C延伸45s，共31个循环；72°C延伸10min。用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

根据PCR产物浓度，将各样品进行等浓度混样。采用Illumina Miseq-PE250测序平台进行测序。

#### 2.2.2.3 高通量测序分析方法

用Trimmomatic[60]软件（版本：0.33）对原始数据进行质量过滤，使用Mothur[61]（版本：1.35.1）（http://www.mothur.org）及 Flash[62] （版本：1.2.11）（https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/）获得原始的拼接序列（Raw contigs）。用Mothur对拼接后的序列进行质量控制，得到有效的拼接片段（Clean contigs），并用Qiime[63]（版本：1.9.1）（http://qiime.org/index.html）将拼接后序列分配至相应的样品中。将所有序列按97%的相似度进行OTUs（operational taxonomic units）挑选，去除只有一条代表序列的OTUs，认为它们是测序错误或是PCR过程中产生的嵌合体。从每个OTU所属的序列中选取 OTUs序列中排在第一位的序列来代表相应的OTU，并对每个OTU的代表序列进行物种分类，物种分类时采用Greengenes数据库作为参照。使用MEGA（版本：7.0.20）软件对OTU的代表序列构建系统发育树进行分析。

2.3 底泥微环境微生物实时荧光定量PCR

#### 2.3.1 实验材料

#### 2.3.1.1 样品

将底泥样品提取总DNA，各组样品的取样时间见下表。

表 2-5 实时荧光定量PCR样品取样时间

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间/(周) | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 30 | 36 | 51 | 66 |
| T-1 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| T-S |  |  | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| T-Fe |  |  | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |

#### 2.3.1.2 主要仪器与试剂

Nanodrop 2000 分光光度计：美国赛默飞世尔科技

qPCR扩增仪：美国Applied Biosystems 公司Stepone Plus Real-time PCR

土壤DNA提取试剂盒：美国MOBIO PowerSoil DNA Isolation Kit

荧光定量PCR预混液：日本东洋纺SYBR Green PCR Master Mix Plus

引物购于上海生工生物工程公司

#### 2.3.2 基本方法

#### 2.3.2.1 DNA提取

DNA的提取步骤同2.2.2.1。

#### 2.3.2.2 目标菌群/基因及质粒制备

为定量描述太湖底泥微环境PCBs脱氯过程中微生物群落变化，实验研究了总细菌（*Bacteria*）的16S rRNA基因、3种脱氯相关细菌（*Chloroflexi*、*o*-17/DF-1、*Dehalococcoides*）的16S rRNA基因以及3种脱卤酶基因（*ardA*、*rdh*12、*tceA*）数量随时间的变化情况。表2-6为目标菌群/基因研究使用的引物。

表2-6 目标菌群/基因PCR引物

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 目标菌群/基因 | 引物名称 | 引物序列(5"-3") | 序列  大小 | 参考  文献 |
| *Bacteria* (BAC) | BAC338F  BAC534R | ACTCCTACGGGAGGCAGC  ATTACCGCGGCTGCTGG | 197 bp | [64] |
| *Chloroflexi* (CHL) | CHL348F  Dehal884R | GAGGCAGCAGCAAGGAA  GGCGGGACACTTAAAGCG | 537 bp | [45] |
| *o*-17/DF-1 | BAC1114F  Dehal1265R\* | GCAACGAGCGCAACCC  CCTATTGCTACCTGCTGTACCAC | 152 bp | [65] |
| *Dehalococcoides* (DHC) | DHC1200F  DHC1271R | CTGGAGCTAATCCCCAAAGCT  CAACTTCATGCAGGCGGG | 72 bp | [66] |
| *ardA* | ArdAF  ArdAR | ACTGCGGTTTCMACCCAYMT  ATACCGCAGGTCTKGCAGAAK | 212 bp | [67] |
| *rdh*12 | RDH12F  RDH12R | GCCCGTCATGGCGTTCCATC  GAGCAAGTTTCATTCMATGG | 187 bp | [68] |
| *tceA* | TceA1270F  TceA1336R | ATCCAGATTATGACCCTGGTGAA  GCGGCATATATTAGGGCATCTT | 67 bp | [27] |

质粒送上海生工进行制备，采用pUCm-T载体插入目标基因。其中，*tceA*基因未成功扩增。用Nanodrop 2000分光光度计测质粒浓度，测得各个质粒浓度见表2-7。

表2-7 质粒浓度

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 质粒 | *Bacteria* (BAC) | *Chloroflexi* (CHL) | *o*-17/DF-1 | *Dehalococcoides* (DHC) | *ardA* | *rdh*12 |
| 核酸浓度(ng/μL) | 5.8 | 5.8 | 5.8 | 4.6 | 7.4 | 5.6 |

将质粒10倍梯度稀释，制作标准曲线。

拷贝数计算公式如下：

|  |  |
| --- | --- |
| *Copy number* = | （1） |

B为质粒质量，单位ng

M为载体长度，pUCm-T载体长度为2788，单位bp

A为PCR产物中目的基因的长度，单位bp

D为每对碱基平均分子量，取660

#### 2.3.2.3 qPCR反应体系与循环条件

本实验采用25µL反应体系：2×SYBR Green Realtime PCR Master Mix 12.5µL，Plus Solution 2.5µL，样品DNA 2µL，上下游引物各0.75μL（终浓度为0.3µM），ddH2O 6.5µL，使得总体积为25µL。

除*Chloroflexi*组外，循环条件为：95℃预变性120s；95℃变性15s, 60℃延伸60s，共40个循环；溶解程序设置为60℃–95℃。

*Chloroflexi*组循环条件为：95℃预变性120s；95℃变性15s，55℃退火15s，72℃延伸45s，共40个循环；溶解程序设置为72℃–95℃。

## 第三章 底泥微环境PCB单体测定结果分析

3.1 实验方法可靠性验证

用第0周的采样结果反算各母体PCBs含量，各PCB单体理论及实测浓度如表3-1所示。

表3-1 第0周取样PCB单体浓度实测值与理论值对比

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 化合物 | 理论值（mg/kg） | 实测值（mg/kg） | 理论值（nmol/g） | 实测值（nmol/g） |
| PCB 5 | 5.77 | 5.94 ± 0.07 | 25.86 | 26.60 ± 0.30 |
| PCB 12 | 4.23 | 4.06 ± 0.07 | 18.96 | 18.20 ± 0.32 |
| PCB 64 | 6.31 | 6.32 ± 0.05 | 21.61 | 21.64 ± 0.14 |
| PCB 71 | 3.69 | 3.55 ± 0.05 | 12.64 | 12.16 ± 0.16 |
| PCB 105 | 9.36 | 9.30 ± 0.05 | 28.67 | 28.47 ± 0.14 |
| PCB 114 | 0.64 | 0.60 ± 0.01 | 1.96 | 1.86 ± 0.02 |
| PCB 149 | 7.78 | 7.68 ± 0.15 | 21.56 | 21.28 ± 0.41 |
| PCB 153 | 8.52 | 8.40 ± 0.10 | 23.61 | 23.27 ± 0.28 |
| PCB 170 | 3.71 | 3.71 ± 0.05 | 9.38 | 9.39 ± 0.12 |
| 合计 | 50 | 49.56 ± 0.38 | 164.26 | 162.88 ± 1.14 |

实测PCBs浓度略低于理论值，可能由于添加的PCB单体随溶剂挥发造成了损失。多氯联苯总浓度实测值与理论值的误差小于2%，除PCB 114的检测误差约为7%外，其余各单体的误差均在4%以内，认为多氯联苯的提取分析方法可靠（本研究中多氯联苯浓度用单位质量的泥浆表示）。每次取样测上清液pH在6.8–7.2，证实实验底泥微环境具有良好的缓冲效果。

3.2 多氯联苯母体浓度变化

多氯联苯母体浓度变化情况可直观地反映多氯联苯的脱氯速率。在66周实验周期内，T-1实验组、T-S实验组、T-Fe实验组母体PCBs总浓度变化如图3-1。



图3-1 母体PCBs总浓度变化

在三种实验条件下，母体多氯联苯均发生降解且脱氯反应均都在滞后期。反应滞后期由短到长分别为T-1＜T-Fe≤T-S。

在只外加PCBs的T-1实验组，脱氯反应在3–6周开始进行，第6周首次检测到脱氯产物，此后母体PCBs经历快速降解，3–18周降解速率达1.724 ± 0.113 mg/kg·week-1。第18–30周，母体降解速率减慢，约为0.198 ± 0.051 mg/kg·week-1，出现了一个类平台期。第30周之后，降解速率又增至0.385 ± 0.081 mg/kg·week-1。9种母体多氯联苯总浓度从初始的49.56 ± 0.38 mg/kg降至30周时的22.26 ± 1.11 mg/kg 和66周时的8.21 ± 2.56 mg/kg，分别降低55.1%和83.4%。

硫酸盐还原条件下，脱氯产物在第9周首次检测到，但到18周母体总浓度才有显著降低，直到36周，母体浓度降低速率约为0.082 ± 0.009 mg/kg·week-1。而36周到第51周、51周到66周的母体PCBs降解速率分别为0.440 mg/kg·week-1、0.796 mg/kg·week-1，分别是之前降解速率的5.1倍、9.3倍。第36周和第66周时母体多氯联苯总浓度分别为46.84 ± 0.55 mg/kg 和28.30 ± 1.40 mg/kg。

三价铁还原环境下母体PCBs在第9周开始降解，15周后较为明显，第9周到36周反应速率为0.501 ± 0.054 mg/kg·week-1。第36周到66周，母体PCBs降解速率迅速增为0.834 ± 0.017 mg/kg·week-1，约为之前的1.66倍。第36周和第66周时母体多氯联苯总浓度分别为36.42 ± 2.93 mg/kg 和11.41 ± 3.45 mg/kg，与未添加电子受体的T-1相比（8.21 ± 2.56 mg/kg），并无显著性差异。

各实验组母体总浓度变化是添加的各PCB母体脱氯变化的加总，各PCB母体在实验周期内的浓度变化见图3-2。

截至66周，各个母体在各个实验组降解由多到少排序为T-1＞T-Fe＞T-S。竞争性电子受体的添加均抑制了母体多氯联苯的脱氯，且三价铁的抑制作用要弱于硫酸根，这和同样重金属含量较高的美国格拉斯河底泥微环境中所观察到的抑制规律类似[59]。

对比各个母体在不同实验条件下的降解规律发现，二氯联苯PCB 5、PCB 12的脱氯速率快、降解充分。在第66周，T-1、T-S、T-Fe实验组PCB 5的剩余量约为0.8%、16%、5%。对于T-1实验组而言，PCB 5在实验进行的第18周就已经降解了约97%，而T-S、T-Fe实验组主要是在实验中后期（36周–66周）完成体系中PCB 5的脱氯。PCB 12的降解与PCB 5非常相似，到第66周，在T-1、T-S、T-Fe体系中的分别剩余约2.9%、10.5%、3.5%。















图3-2 各母体PCB浓度变化

PCB 64、PCB 71都是四氯联苯，其中PCB 71在各个实验体系中都难以降解。截至66周，PCB 64和PCB 71在硫酸盐还原体系中降解率分别不足3%和1%，考虑到检测误差，这两种多氯联苯单体的脱氯反应微乎其微。PCB 64在T-1组66周内浓度由6.32 ± 0.04 mg/kg 降至0.57 ± 0.52 mg/kg，在T-Fe组降至1.70 ± 1.16 mg/kg。与T-1组在第6周之后开始明显脱氯不同，在三价铁还原条件下PCB 64的脱氯反应主要在第36周到第66周完成。同样，PCB 71在T-1组降解速率相对较快，66周降解了约20%，而在三价铁还原环境下只降解了不足7%，且大部分发生在51–66周。

PCB 105、PCB 114是两种共平面多氯联苯，具有类二噁英毒性，应重点关注。这两种多氯联苯在太湖底泥微环境中降解开始时间早，优先进行脱氯。硫酸盐还原条件下的PCB 105、PCB 114脱氯速率在36–66周较快，而此时三价铁还原条件下PCB 105、PCB 114已经快完全降解。T-1实验组早在第21周就降解了约94%的PCB 105、92%的PCB 114，到第66周分别降解了99.0%、98.7%；T-Fe组在实验进行的第51周PCB 105降解了约97.9 %，PCB 114降解了约97.0%，到第66周分别降解了98.8%、98.2%；T-S组在66周时PCB 105、PCB 114分别剩余20.0% ± 7.8%，22.2% ± 8.6%。

PCB 149、PCB 153、PCB 170均为高氯取代多氯联苯。三种PCB单体在太湖底泥微环境中反应由易到难均是PCB 170、PCB 153、PCB 149，特别是在硫酸盐还原条件下，PCB 149几乎没有反应。值得注意的是，在PCB 149和PCB 153脱氯中，T-Fe实验组在反应后期（分别是51–66周、36–66周）脱氯速率超过T-1实验组，表现出了很强的潜力。T-S实验组在36周之后降解PCB 153、PCB 170速率也明显加快。

由图3-2还可以看出，第66周时，在产甲烷条件下的T-1组中除了PCB 5、PCB 12、PCB 105、PCB 114外，其他单体尚未到达平台期，仍可能继续进行脱氯反应。而对于硫酸盐还原条件下的T-S组和三价铁还原条件下的T-Fe组而言，更多的单体还处于反应阶段。这意味着对本底中硫酸盐或铁含量较高的底泥修复时，需要充分考虑竞争电子受体的影响，延长反应时间，以达到更好的修复效果。

与美国格拉斯河和哈德逊河相比，太湖底泥的脱氯较慢，主要是由于PCB 64、PCB 71和PCB 149降解缓慢导致[59]。分析其结构发现这三种多氯联苯单体均为在一个苯环上同时出现两个邻位取代氯的结构（26-），推测太湖本土微生物中很可能缺乏针对该结构多氯联苯的脱氯菌株/脱氯酶，后续需要通过分子生物学技术进行深入的微生物群落和基因研究来验证。可以考虑通过外加来自格拉斯河等底泥的脱氯菌富集培养液来加强对这3种多氯联苯单体的降解。

3.3 多氯联苯脱氯程度

研究中常用每联苯平均氯原子数目（Chlorines per biphenyl，CPB），即氯原子总摩尔浓度与多氯联苯总摩尔浓度的比值，衡量多氯联苯脱氯效果[48, 69, 70]。Rhee等[71]基于实验结果提出CPB曲线模型，曲线分为滞后期、快速下降期以及平台期三个阶段。图3-3为实验周期内三个实验组CPB的变化情况。由图可知，脱氯程度从大到小排序为T-1>T-Fe>T-S。

截至66周，T-1实验组每联苯平均氯原子数目由4.36 ± 0.02降至3.29 ± 0.11。第3–18周，CPB降解速率为0.0372 ± 0.0018氯原子数/联苯·week-1；第18周到30周，变化速率减慢，为0.0047 ± 0.0002氯原子数/联苯·week-1；30周之后CPB降低速率又增长为0.0145 ± 0.0031氯原子数/联苯·week-1。

从脱氯反应开始的第9周到第36周，T-S实验组CPB几乎没有下降。36–51周，CPB由4.381 ± 0.015降至4.273 ± 0.054；到第66周，每联苯平均氯原子数降低为3.936 ± 0.038。

T-Fe实验组在0–21周CPB几乎没有下降；21周–51周，CPB由4.403 ± 0.014降为3.881 ± 0.081，变化速率为0.016 ± 0.002氯原子数/联苯·week-1；51–66周，CPB降至3.376 ± 0.115，平均降低速率为0.034氯原子数/联苯·week-1。



图3-3 CPB变化

到第66周，各实验组CPB仍有良好的下降趋势，均未到达平台期，预计脱氯降解反应可以继续进行。值得注意的是，在T-S、T-Fe实验组中，由于PCB 5、PCB 12在反应体系中优先降解，生成PCB 1、PCB 2、PCB 3，进一步脱氯成为联苯，而体系中的高氯代PCBs降解不多，表现为CPB开始下降的时间点晚于PCBs降解的时点，以及反应早期CPB不降反升。用CPB衡量多氯联苯的脱氯效果时，未考虑体系中完全脱氯为联苯的情况，会低估脱氯程度。

3.4 多氯联苯脱氯产物及总脱氯速率

母体PCBs脱氯产生子代PCBs，反应体系中PCB单体种类增多。脱氯产物的检出与定量是评估反应体系生态风险的重要步骤。

在T-1组中，第6周首次发现了脱氯产物，有PCB 1、PCB 2、PCB 25、PCB 27、PCB 31、PCB 32、PCB 33、PCB 52、PCB 55、PCB 56、PCB 63、PCB 66、PCB 74、PCB 90、PCB95、PCB 99、PCB 101、PCB 102、PCB 130、PCB 137、PCB 138。脱氯产物种类多，且出现了添加的母体的二代子产物PCB 25（PCB 105的二代脱氯产物）、PCB 52 （PCB 149的二代脱氯产物）、PCB 90（PCB 170的二代脱氯产物）。

T-S 实验组在第9周时，检测到脱氯产物PCB 25、PCB 32、PCB 63、PCB 66；T-Fe 实验组中在第9周时检测到脱氯产物PCB 66、PCB 138。

由于在脱氯产物初次检出时，T-1实验组母体PCBs浓度降低较其他两组多，认为T-1组反应起始时间为第3–6周，T-S组、T-Fe组的反应起始时间为第9周。

脱氯反应未开始时（第0周）和反应进行66周时T-1、T-S、T-Fe实验组PCBs浓度分布见图3-4。

除添加的PCBs母体的含量明显降低外，三个实验组中低氯取代的子代PCBs累积明显。在T-1和T-Fe实验组，PCB 1、PCB 2、PCB 25、PCB 32、PCB 47、PCB 49、PCB 51、PCB 52在第66周均有较高浓度，产物组成非常相似。这些生成物苯环上剩余的氯原子均无侧位氯取代，证实了当某一氯原子邻位存在氯原子时将易被微生物作用，发生取代。且三价铁的添加虽然延长了脱氯反应的滞后期，减慢了脱氯反应的速率，但并没有改变脱氯路径的偏好。值得注意的是，在T-1组里出现了大量PCB 25（24-3-CB）的邻位脱氯产物PCB 13（3-4-CB），说明在太湖底泥微环境中存在稀有的邻位脱氯路径，为多氯联苯的全降解（降解为联苯）提供了理论依据。



图3-4 T-1、T-S、T-Fe实验组66周PCBs浓度分布图

与其它两组不同，T-S实验组66周产物中有较多的PCB 130及PCB 66，PCB 130、PCB 66分别是PCB 170、PCB 105的双侧氯取代的间位氯原子脱氯产生。由于PCB 130、PCB 66均存在上述易取代的氯原子，因而它们的二代脱氯子代产物分别为PCB 90和PCB 25；PCB 101（245-25-CB）和PCB 52（25-25-CB）则为PCB 153（245-245-CB）的一代和二代单侧氯取代对位脱氯产物（SF *Para*）。硫酸盐还原条件下的对位脱氯偏好依旧凸显。

综上所述，在产甲烷条件下和三价铁还原条件下多氯联苯以间位和对位脱氯为主，且脱氯路径偏好基本一致，硫酸盐还原条件下脱氯路径减少，以对位脱氯为主。

图3-5为各实验组PCBs总浓度随时间变化情况。



图3-5 T-1、T-S、T-Fe实验组PCBs总浓度变化

T-1实验组在3–6周反应开始，总PCBs浓度降低，截至66周总浓度由49.56 ± 0.38降至37.21 ± 1.43 mg/kg。相比PCBs母体总浓度的下降趋势，总浓度随时间的变化要均匀的多。由于总浓度变化包含外加母体PCBs以及其各个子代PCBs的脱氯，考虑了体系中存在的其他相对优先降解的单体PCBs，使得体系脱氯速率均匀化。

第3周到18周，T-1实验组总PCBs降低速率为0.3728 ± 0.0146 mg/kg·week-1；18至36周，速率减缓到0.099 ± 0.009 mg/kg·week-1；第36周到66周，总PCBs降低速率为0.158 ± 0.005 mg/kg·week-1。

T-S实验组中9–36周，体系平均脱氯速率为0.041 ± 0.007 mg/kg·week-1。在36周到66周的快速反应期，PCBs总浓度由46.79 ± 0.33 mg/kg降至39.80 ± 0.45 mg/kg，36–51周、51–66周的脱氯速率分别为0.122、0.180 mg/kg·week-1。

从PCBs总浓度变化可以看到，T-Fe实验组在反应初始时降解速率较慢（9–36周平均降解速率为0.098 ± 0.017 mg/kg·week-1），36周后脱氯速率加快，达0.233 ± 0.015 mg/kg·week-1。第36周和第66周时多氯联苯总浓度分别为46.79 ± 0.33 mg/kg和39. 80 ± 0.45 mg/kg。

底泥微环境中二价铁浓度的测定结果见图3-6。可以看出，添加了FeOOH的底泥环境（T-Fe组）中Fe(II)累积含量明显高于T-1组和T-S组。第0–36周，T-Fe实验组Fe(II)浓度保持增长，到36周时外加的40 mmol/kg FeOOH已绝大部分转化为二价铁，相应地，36周之后T-Fe组PCBs降解速率显著增加。



图3-6 Fe(II)浓度变化

3.5 多氯联苯解毒效果

多氯联苯通过厌氧脱氯能降低生态风险。Van den Berg等[72]在1998年提出以二噁英毒性为基准，衡量其他二噁英和类二噁英多氯联苯的相对毒性，用毒性当量因子（Toxic equivalence factors，TEFs）表示。世界卫生组织在2005年对标准进行了修订[73]。PCBs的总毒性当量（toxic equivalency, TEQ）的计算公式如下：

|  |  |
| --- | --- |
|  | （2） |

其中，TEQs为总二噁英毒性当量; Ci 为类二噁英化合物i的浓度; TEFi为类二噁英化合物i的毒性当量因子（Toxic equivalency factor，TEF）。

表3-2 类二噁英多氯联苯的TEF

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 化合物 | 结构 | 分子量 | TEF (WHO2005) |
| PCB 77 | 34-34 | 292 | 0.0001 |
| PCB 81 | 345-4 | 292 | 0.0003 |
| PCB 105 | 234-34 | 326 | 0.00003 |
| PCB 114 | 2345-4 | 326 | 0.00003 |
| PCB 118 | 245-34 | 326 | 0.00003 |
| PCB 123 | 345-24 | 326 | 0.00003 |
| PCB 126 | 345-34 | 326 | 0.1 |
| PCB 156 | 2345-34 | 361 | 0.00003 |
| PCB 157 | 234-345 | 361 | 0.00003 |
| PCB 167 | 245-345 | 361 | 0.00003 |
| PCB 169 | 345-345 | 361 | 0.03 |
| PCB 189 | 2345-345 | 395 | 0.00003 |

各实验组多氯联苯毒性当量变化见图3-7。



图3-7 多氯联苯毒性当量变化

由于实验中母体PCBs脱氯并未产生新的类二噁英PCBs，PCB 105及PCB 114的降解情况决定了体系中类二噁英毒性当量的变化。类二噁英多氯联苯PCB 105、PCB 114在各个太湖底泥微环境实验组中都是优先降解的PCB单体。

在T-1实验组中，从反应起始（第3–6周）类二噁英毒性迅速下降，到第18周，毒性当量降为0.027 ± 0.011，是初始的9.18% ± 3.62%，已解除体系中大部分类二噁英毒性。第66周，体系的类二噁英毒性为0.003 ± 0.000。

T-S组中，PCBs从第9周开始降解，到第36周时，毒性当量为0.271 ± 0.005，类二噁英毒性只降低了8.73% ± 1.78%。到51周，毒性当量为0.187 ± 0.031，比初始时（0.297 ± 0.002）降低了约37.13%；第66周，毒性当量降至0.006 ± 0.023。

在T-Fe实验组，从反应起始到36周时体系类二噁英毒性降低速率较快（0.0098 ± 0.0011 ng/g·week-1），第36周毒性当量为0.050 ± 0.025。到第51周时，类二噁英毒性当量为0.006 ± 0.000，第66周为0.004 ± 0.001，与同时期的T-1实验组的毒性当量无显著性差异。

在66周的试验周期内T-1、T-S、T-Fe三个实验组母体浓度分别平均降低了83.4%、42.9%、77.0%；总PCBs浓度分别平均降低了24.9%、12.4%、19.7%；类二噁英毒性分别平均降低了98.9%、79.8%、98.8%。无论是相对于母体PCBs总体的平均脱氯速率，还是包括母体PCBs脱氯后产生的子代产物在内的体系总PCBs脱氯速率，在太湖底泥微环境三种实验条件下类二噁英毒性当量的降解速率都要快得多，表现出优先降解类二噁英PCB 105、PCB 114的特点。

表3-3中对比了美国哈德逊河、格拉斯河和中国太湖底泥微环境在反应进行15周时类二噁英多氯联苯PCB 105和PCB 114的浓度及相应的二噁英毒性当量（TEQs）[59, 74]。可以看出，太湖底泥降解类二噁英PCB 105和PCB 114的能力要强于多氯联苯污染严重的美国哈德逊河和格拉斯河底泥。在反应进行15周后，太湖底泥中的TEQs降低了约80%。这一发现有利于对太湖底泥中多氯联苯脱氯解毒作用的综合评价。在贫碳且本底重金属含量高的太湖底泥中[75]，具有更快去除类二噁英多氯联苯，减小生态毒性的能力。

表3-3 哈德逊河、格拉斯河和太湖TEQs比较

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 沉积物 | PCB 105  (mg/kg) | PCB 114  (mg/kg) | TEQs  (pg/g 2,3,7,8-TCDD) |
| 哈德逊河 | 4.47 ± 0.55 | 0.35 ± 0.08 | 144.6 ± 18.1 (51.8%)\* |
| 格拉斯河 | 5.59 ± 0.17 | 0.40 ± 0.01 | 179.6 ± 5.2 (40.1%) |
| 太湖 | 1.72 ± 0.44 | 0.11 ± 0.02 | 55.1 ± 13.8 (81.6%) |

\*：括号内百分数代表相对于所添加母体多氯联苯的毒性当量所降低的百分比

3.6 本章小结

（1）用太湖底泥微环境第0周的采样结果反算各母体PCBs含量，实测结果略低于理论值，可能是由于溶剂挥发所致，除PCB 114的检测误差约为7%外，其余各单体的误差均在4%以内，PCBs提取、纯化、测试方法可靠。

（2）PCBs母体浓度变化可直观地反映多氯联苯的脱氯速率，各实验组PCBs母体降解均存在滞后期。T-1实验组PCBs母体在3周之后开始快速降解，3–18周降解速率达1.724 ± 0.113 mg/kg·week-1；在第18–30周，母体降解速率减慢，约为0.198 ± 0.051 mg/kg·week-1，出现类平台期；30周后，体系对PCB 64、PCB 149、PCB 153的降解速率加快，脱氯速率回升至0.385 ± 0.081 mg/kg·week-1。T-S、T-Fe实验组PCBs母体降解第9周开始，9–36周母体降解速率分别为约为0.082 ± 0.009、0.501 ± 0.054 mg/kg·week-1，36周后母体脱氯速率加快，进入快速降解期，降解速率分别是前一阶段的5倍以上及1.66倍。在66周试验周期内均未达到降解平台期，仍具有脱氯潜能。

（3）各PCB母体均在实验组中降解速率由快到慢排序依次为T-1组＞T-Fe组＞T-S组。竞争性电子受体的添加会抑制母体多氯联苯的脱氯，且硫酸根的抑制作用比三价铁强。脱氯微生物对脱氯底物具有选择性，其中，PCB 5、PCB12、PCB105、PCB114在各实验组中反应速率快、降解充分，是体系中优先脱氯的PCB单体。PCB153、PCB170的脱氯表现相似，反应滞后期较上述4种PCB单体长，第 66周时，在T-1组和T-Fe组中接近完全脱氯。PCB 64、PCB 149在T-S实验条件下几乎不反应；在T-Fe中到36周脱氯反应才开始明显进行；在T-1实验组降解的24周–30周都经历了类平台期。PCB 71降解速率非常慢，到66周时，在T-1组中降解了约20%；在三价铁还原环境下只降解了不足7%，且大部分发生在第51周–66周；在T-S中未发生反应。PCB 64、PCB 71和PCB 149均为在一个苯环上同时出现两个邻位取代氯的结构（26-），推测太湖本土微生物中很可能缺乏针对该结构多氯联苯的脱氯菌株/脱氯酶导致其脱氯速率慢。

（4）CPB可表征PCBs的脱氯程度，脱氯程度从大到小排序为T-1>T-Fe>T-S。到第66周，各实验组CPB仍有良好的下降趋势，均未到达平台期，降解反应可以继续进行。

（5）T-1、T-S、T-Fe实验组分别在第6周、9周、9周首次检出脱氯产物。由于T-1组在3–6周母体浓度下降多，认定反应起始时间为3–6周，而T-S、T-Fe组6–9周母体浓度降低少，认定反应起始时间为第9周。

（6）第66周时，脱氯反应程度较大的T-1、T-Fe实验组产物多为苯环上剩余的氯原子无侧位氯取代的PCBs，组成非常相似。在产甲烷条件下和三价铁还原条件下以间位和对位脱氯为主，脱氯路径偏好基本一致，在硫酸盐还原条件下脱氯路径减少，以对位脱氯为主。T-1实验组中出现了大量PCB 25（24-3-CB）的邻位脱氯产物PCB 13（3-4-CB），说明在太湖底泥微环境中存在稀有的邻位脱氯路径，为多氯联苯的全降解（降解为联苯）提供了理论依据。

（7）体系PCBs总浓度变化与PCBs母体变化类似，但由于总浓度变化包含外加母体PCBs以及其各个子代PCBs的脱氯，考虑了体系中存在的其他相对优先降解的单体PCBs，体系各个阶段脱氯速率相对均匀。

（8）由于实验中母体PCBs脱氯并未产生新的类二噁英PCBs，体系中类二噁英毒性当量由PCB 105及PCB 114的降解情况决定。在产甲烷条件下，体系的类二噁英毒性从反应初始（第3–6周）就迅速下降，到第18周，类二噁英毒性当量从原有的0.297 ± 0.002降至0.027 ± 0.011，已解除绝大部分毒性；到第66周，降至0.003 ± 0.000。硫酸盐还原条件下，体系类二噁英毒性当量在第9–36周只降低了8.73% ± 1.78%，在36–66周下降明显，第66周毒性当量为0.006 ± 0.023。在三价铁还原条件下，从第9周（反应开始）到36周，毒性当量降低速率为0.0098 ± 0.0011 ng/g·week-1，毒性当量从0.297 ± 0.002降至0.050 ± 0.025，第51周、66周分别为0.006 ± 0.000、0.004 ± 0.001。截至第66周，T-1、T-S、T-Fe实验组类二噁英毒性分别平均降低了98.9%、79.8%、98.8%。太湖底泥微环境在三种实验条件下均表现出优先降解类二噁英PCB 105、PCB 114的特点，相比美国哈德逊河、格拉斯河，太湖底泥具有更快去除类二噁英多氯联苯、减小生态毒性的能力。

第四章 高通量测序结果分析

4.1 测序统计及细菌多样性评估

分别对实验未开始时（第0周）、实验初始时（第6周）、实验中期（第24周）以及实验末期（第66周）样品的16S rRNA基因V3–V4可变区进行测序，探究不同PCBs降解阶段的微生物群落组成及变化情况。使用Illumina Miseq-PE250平台对10个样品底泥细菌进行测序分析，共得到149984条序列，平均每个样品含有14998条序列（8000–25273条）。为分析底泥微生物群落结构，将相似度达到97%的序列归为1个OTU，样品及OTUs统计见下表。

表4-1 序列数及OTUs统计

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品名称 | 序列数 | OTUs |
| T-1 （0w） | 9150 | 1283 |
| T-1 （6w） | 8000 | 1126 |
| T-1（24w） | 9905 | 1208 |
| T-1（66w） | 22174 | 1921 |
| T-S （6w） | 8517 | 1235 |
| T-S（24w） | 21411 | 1600 |
| T-S（66w） | 25273 | 1941 |
| T-Fe （6w） | 8190 | 1053 |
| T-Fe（24w） | 13618 | 1162 |
| T-Fe（66w） | 23746 | 1674 |
| 总计 | 149984 | 14203 |

样品丰富度稀疏曲线见图4-1，用以比较测序数量不同的样品之间的物种丰富度。各样品的丰富度稀疏曲线均未达到饱和，样品的多样性较高，继续取样可能会产生更多OTU。样品丰富度稀疏曲线只反映群落中物种OTU数目，而不考虑群落中每个物种的丰度。

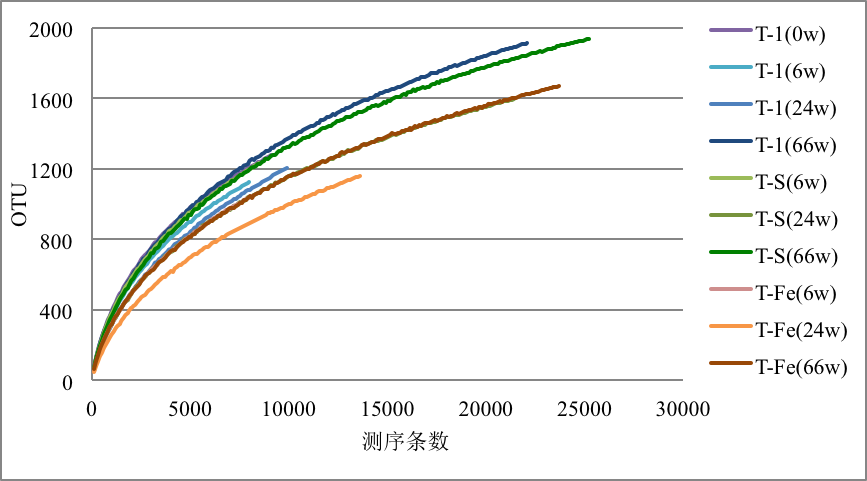


图4-1 样品丰富度稀疏曲线

香农威纳（Shannon-Wiener）指数利用各样品在不同测序深度时的微生物多样性指数构建曲线，其计算公式如下：

|  |  |
| --- | --- |
|  | （3） |

Sobs为实际测得OTU数值

ni为第i个OTU所含序列数

N为序列总数

样品香农指数曲线见图4-2。

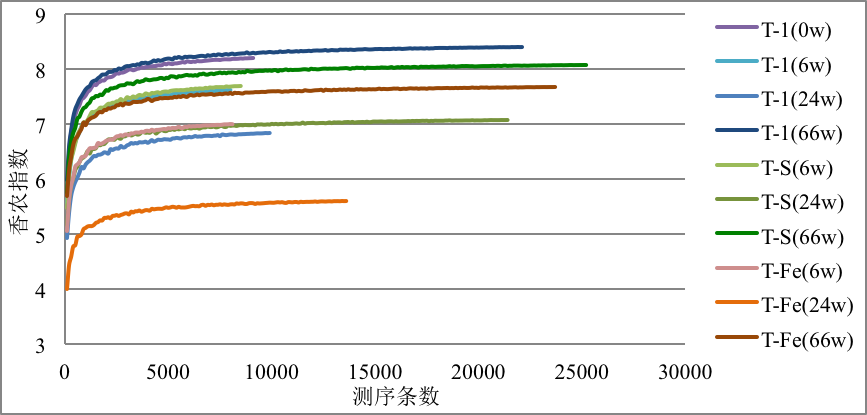


图4-2 样品香农指数

香农指数考虑了物种的丰富度和均匀度，用以衡量群落多样性。曲线随着测序条数的增加趋于平缓，表明测序数目可以反映样品中大部分微生物的物种信息。

4.2底泥细菌群落组成

为进一步了解不同太湖底泥微环境中的微生物群落结构，对各个实验组不同时间的样品在不同分类水平进行分析。

各组样品在门（phylum）水平上的分布情况见图4-3，图中展示了相对丰富大于1%的物种，相对数量小于1%及未分类的归为其它。

在时间0点，样品中变形菌门（*Proteobacteria*）所占比例最大，达到46.46%，其中又以*β*-*proteobacteria*为主（46.55%）。拟杆菌门（*Bacteroidetes*）所占百分比次之，达16.57%。绿弯菌门（*Chloroflexi*）、厚壁菌门（*Firmicutes*）丰度分别为9.64%、9.62%。此外样品中还有硝化螺旋菌门（*Nitrospirae* ,占6.33%）、疣微菌门（*Verrucomicrobia*,占2.40%）、绿菌门（*Chlorobi*，占2.35%）、酸杆菌门（*Acidobacteria*，占1.38%）、放线菌门（*Actinobacteria*，占0.73%）、螺旋体门（*Spirochaetes*，占0.24%）等。

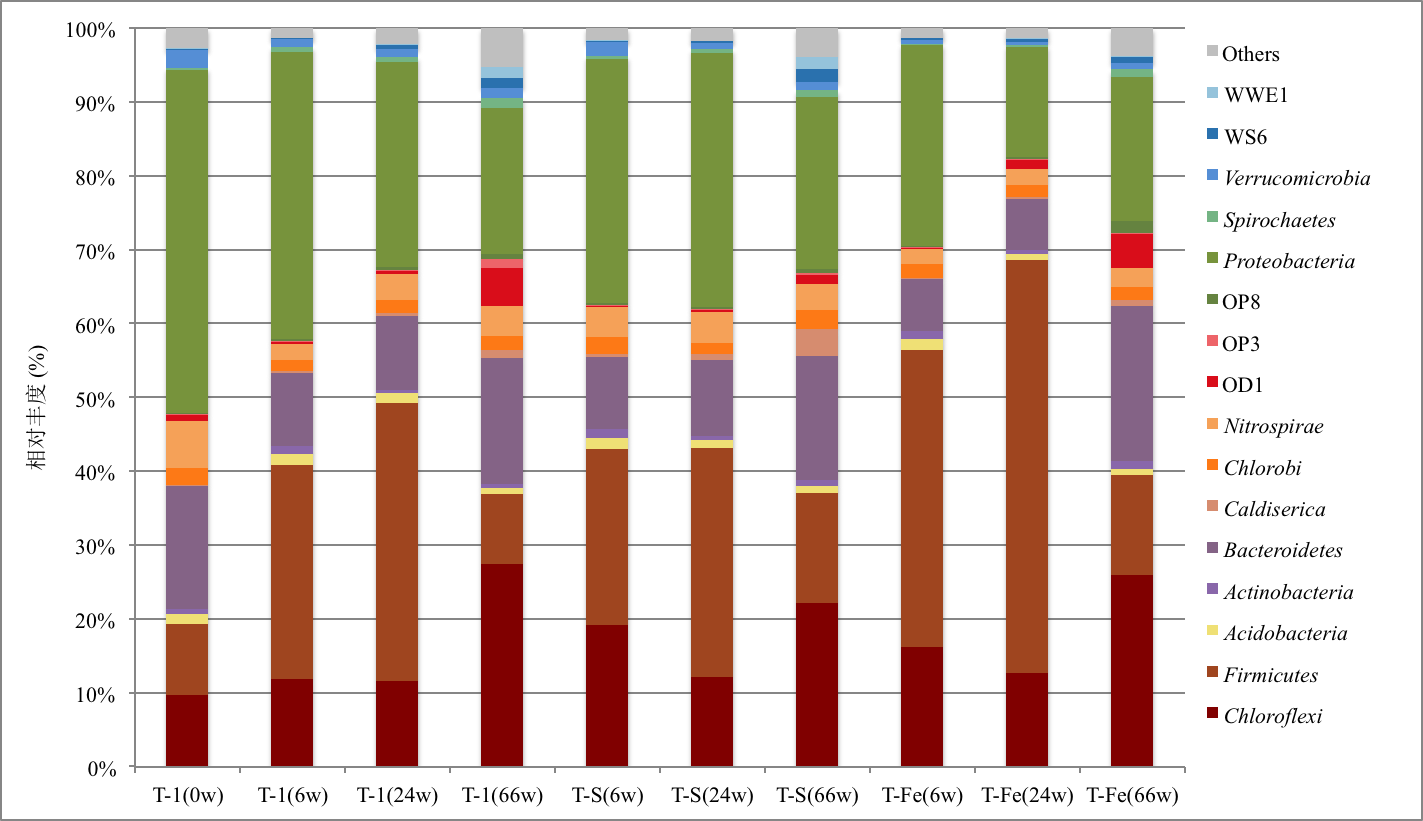


图4-3 优势细菌门类的相对丰度

表4-2 T-1、T-S、T-Fe 实验组细菌门类相对丰度排布（前十位） (单位：%)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| T-1 |  | T-1 | | |  | T-S | | |  | T-Fe | | |
| (0w) |  | (6w) | (24w) | (66w) |  | (6w) | (24w) | (66w) |  | (6w) | (24w) | (66w) |
| *Proteobacteria*  46.46 |  | *Proteobacteria*  38.90 | *Firmicutes*  37.71 | *Chloroflexi*  27.41 |  | *Proteobacteria*  33.04 | *Proteobacteria*  34.40 | *Proteobacteria*  23.28 |  | *Firmicutes*  40.16 | *Firmicutes*  55.93 | *Chloroflexi*  25.87 |
| *Bacteroidetes*  16.57 |  | *Firmicutes*  28.91 | *Proteobacteria*  27.72 | *Proteobacteria*  19.77 |  | *Firmicutes*  23.87 | *Firmicutes*  31.05 | *Chloroflexi*  22.15 |  | *Proteobacteria*  27.18 | *Proteobacteria*  14.96 | *Bacteroidetes*  20.88 |
| *Chloroflexi*  9.64 |  | *Chloroflexi*  11.86 | *Chloroflexi*  11.57 | *Bacteroidetes*  17.16 |  | *Chloroflexi*  19.11 | *Chloroflexi*  12.12 | *Bacteroidetes*  16.85 |  | *Chloroflexi*  16.20 | *Chloroflexi*  12.70 | *Proteobacteria*  19.54 |
| *Firmicutes*  9.62 |  | *Bacteroidetes*  9.79 | *Bacteroidetes*  10.08 | *Firmicutes*  9.48 |  | *Bacteroidetes*  9.77 | *Bacteroidetes*  10.30 | *Firmicutes*  14.94 |  | *Bacteroidetes*  7.00 | *Bacteroidetes*  6.87 | *Firmicutes*  13.56 |
| *Nitrospirae*  6.33 |  | *Nitrospirae*  2.26 | *Nitrospirae*  3.51 | Others  5.28 |  | *Nitrospirae*  4.04 | *Nitrospirae*  4.18 | Others  3.93 |  | *Nitrospirae*  2.01 | *Nitrospirae*  2.22 | OD1  4.69 |
| Others  2.69 |  | *Acidobacteria*  1.55 | Others  2.13 | OD1  5.26 |  | *Chlorobi*  2.42 | Others  1.71 | *Caldiserica*  3.70 |  | *Chlorobi*  1.87 | *Chlorobi*  1.62 | Others  3.74 |
| *Verrucomicrobia*  2.40 |  | *Chlorobi*  1.49 | *Chlorobi*  1.78 | *Nitrospirae*  3.94 |  | *Verrucomicrobia*  1.94 | *Chlorobi*  1.54 | *Nitrospirae*  3.54 |  | *Acidobacteria*  1.50 | Others  1.40 | *Nitrospirae*  2.55 |
| *Chlorobi*  2.35 |  | Others  1.36 | *Acidobacteria*  1.26 | *Chlorobi*  1.95 |  | Others  1.67 | *Acidobacteria*  0.99 | *Chlorobi*  2.56 |  | Others  1.33 | OD1  1.17 | *Chlorobi*  1.71 |
| *Acidobacteria*  1.38 |  | *Actinobacteria*  1.14 | *Verrucomicrobia*  1.10 | WWE1  1.49 |  | *Acidobacteria*  1.48 | *Verrucomicrobia*  0.82 | WS6  1.88 |  | *Actinobacteria*  1.14 | *Acidobacteria*  0.83 | OP8  1.63 |
| OD1  0.80 |  | *Verrucomicrobia*  0.98 | *Spirochaetes*  0.67 | *Verrucomicrobia*  1.35 |  | *Actinobacteria*  1.24 | *Caldiserica*  0.74 | WWE1  1.58 |  | *Verrucomicrobia*  0.55 | *Actinobacteria*  0.48 | *Actinobacteria*  1.09 |

表4-2中给出了各实验组不同样品前十位的优势门类百分比。

绿弯菌门（*Chloroflexi*）内包括丝状绿色非硫菌，*Dehalococcoides*、进化枝不同的脱氯细菌和大量未鉴别的环境微生物，是研究PCBs脱氯过程中重点关注的门类[76]。表4-3为各实验组中*Dehalococcoides、Dehalococcoidales 、Chloroflexi*占总OTUs的百分比及*Dehalococcoidales* /*Chloroflexi*与DHC/CHL的百分比。

表4-3 各实验组*Dehalococcoides、Dehalococcoidales、Chloroflexi*百分比 (单位：%)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品组别  周数 | T-1  0w | T-1  6w | T-1  24w | T-1  66w | T-S  6w | T-S  24w | T-S  66w | T-Fe  6w | T-Fe  24w | T-Fe  66w |
| *Dehalococcoides* (%) | - | 0.01 | 0.78 | 4.13 | - | - | 0.04 | - | 0.18 | 1.33 |
| *Dehalococcoidales*(%) | 0.33 | 0.48 | 3.04 | 10.37 | 0.27 | 0.47 | 5.79 | 0.49 | 1.34 | 11.4 |
| *Chloroflexi* (%) | 9.64 | 11.86 | 11.57 | 27.41 | 19.11 | 12.12 | 22.15 | 16.20 | 12.70 | 25.87 |
| DHC/CHL (%) | - | 0.11 | 6.72 | 15.07 | - | - | 0.20 | - | 1.45 | 5.14 |
| *Dehalococcoidales/*  *Chloroflexi* (%) | 3.42 | 4.05 | 26.27 | 37.83 | 1.41 | 3.88 | 26.14 | 3.02 | 10.55 | 44.07 |

T-1实验组中，*Chloroflexi* 随脱氯反应进行呈增长趋势，到第66周，相对丰度已达27.41%，成为相对数量最多的门类。具体看*Chloroflexi*门内OTU的相对丰度，初始微环境体系中最多的是厌氧绳菌纲（*Anaerolineae*），占94.33%，随后就是*Dehalococcoidetes*，占4.2%。不仅*Chloroflexi*在体系中随脱氯进程在环境中占比增加，与已知与PCBs脱氯相关的*Dehalococcoidales*/*Chloroflexi*的百分比也同样增加，由初始的3.42% 依次增长到4.05%、26.27%、37.83%。

T-S组、T-Fe组的*Chloroflexi*菌门在第6周百分比数量都较高，分别达到19.11%、16.20%，高于同期T-1组的11.86%。在第24周，T-S、T-Fe百分比分别下降至12.12%、12.70%，66周又增至22.15%、25.87%。但就*Dehalococcoidales*目而言，硫酸盐还原条件及三价铁还原环境下占样品总OTUs的比例大体上升。T-S实验组中从时间0点的0.33%依次变为0.27%、0.47%、5.79%；T-Fe实验组依次变为0.49%、1.34%、11.4%。

*Dehalococcoides*属0周时未在体系中检出，在T-1实验组中第6周、24周、66周依次占OTUs总数的0.01%、0.78%、4.13%；在T-S实验组中只有第66周有检出占OTUs总数0.04%；T-Fe实验组中第6周时，*Dehalococcoides*未检出，第24周、66周分别占0.18%、1.33%。*Dehalococcoides*会随着时间富集，在PCB未开始降解的第六周T-S、T-Fe实验组以及PCBs脱氯速率较慢的24周时T-S组未检出，且在脱氯程度较高的T-1实验组富集程度高于T-Fe、T-S实验组，侧面验证了*Dehalococcoides*在太湖底泥微环境厌氧脱氯反应中起到重要作用。

表4-4列出了分类在*Dehalococcoides*下的OTUs条数及编号。虽然每个样品中OTUs数目不同，但可得出同一个样品中的不同OTUs的优势程度。其中OTU 10是各实验体系中最主要的*Dehalococcoides* OTU，且在T-S实验组只出现这一种分类为*Dehalococcoides*的OTU。OTU 11728只在66周的T-Fe实验组出现3条；OTU 9803只在T-1实验组的第24周、66周分别检测到1条、2条；OTU 10707、OTU 4458、OTU 8613只在66周的T-1、T-Fe实验组中检出。

表4-4 各实验组*Dehalococcoides* OTUs测序条数

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| OTU 编号 | T-1  0w | T-1  6w | T-1  24w | T-1  66w | T-S  6w | T-S  24w | T-S  66w | T-Fe  6w | T-Fe  24w | T-Fe  66w |
| OTU 10 | 0 | 1 | 76 | 904 | 0 | 0 | 11 | 0 | 25 | 308 |
| OTU 10707 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| OTU 11728 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| OTU 4458 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| OTU 8613 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| OTU 9803 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

使用MEGA 7.0.20软件对归类为*Dehalococcoides*的OTU 10以及PCBs脱氯相关微生物进行聚类分析，如图4-4。

由于所测序列较短（OTU 10为406 bp），且*Dehalococcoides* 16S rRNA基因序列高度相似，难以与已知的*Dehalococcoides* PCBs脱氯菌准确区分。选取了与OTU 10经过NCBI（National Center of Biotechnology Information，美国国家生物技术信息中心）核苷酸序列比对最为相似的几条序列以及*Dehalobium chlorocoercia* DF-1，使用*Desulfitobacterium chlororespirans* (T) Co23作为外群，用最大似然法构建系统发育树。

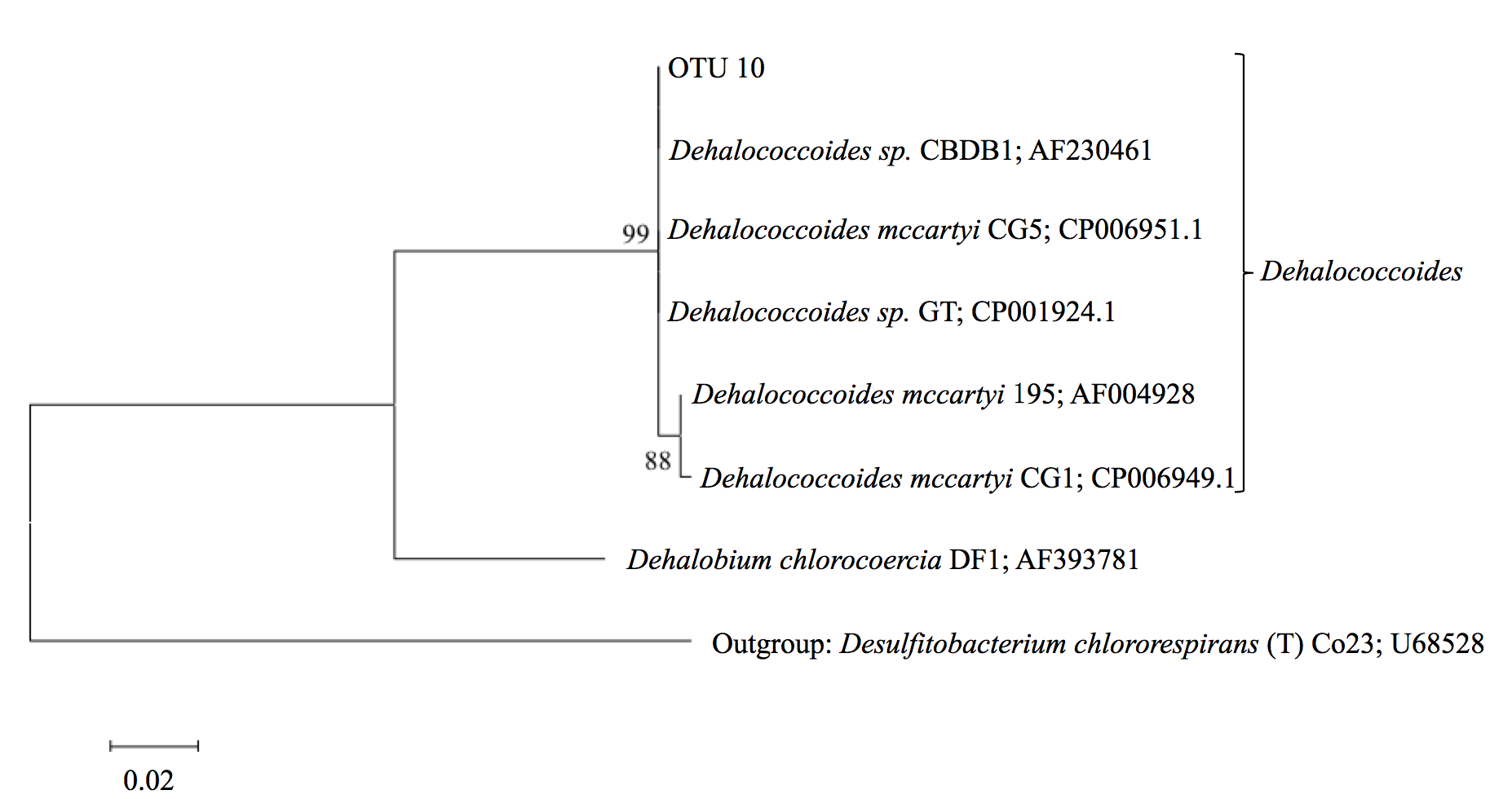


图4-4 OTU 10 系统发育树

OTU 10与*Dehalococcoides mccartyi* WBC-2序列（Genebank序列号：CP017572.1）、Dehalococcoides mccartyi strain 11a5（Genebank序列号：CP011127.1）、*Dehalococcoides sp.* GT（Genebank序列号：CP001924.1）等均达到100%的序列相似度。

构建的系统发育树表明OTU 10与*Dehalococcoides* CBDB1、CG5、GT高度相似，本次测序深度不足以区分这些菌株。*Dehalococcoides* *mccartyi* strain 195、CG1属于*Dehalococcoides*的另一分支，而OTU 10与绿弯菌门PCBs脱氯菌DF1在进化上亲缘关系较远，同已有研究成果相似[41, 46]。迄今发现的PCBs脱氯菌株已有不少完成了基因组测序，如*Dehalococcoides* *mccartyi* strain 195、CBDB1、BAV1、CG1、CG4、CG5、JNA等。只对16S rRNA基因的V3–V4区测序乃至16S rRNA基因的测序均无法满足菌株鉴别的精度要求，对太湖底泥PCBs脱氯菌的深度测序将有助于揭示其与已知脱氯菌的进化亲缘关系，从基因角度探究太湖底泥PCBs脱氯菌的脱氯行为。

此外，OTU 10707与*Dehalococcoides* *mccartyi* strain CG3（Genebank序列号：CP013074.1）、未分离培养的*Dehalococcoides* sp. clone Dehal-TCE-clone14（Genebank序列号：KR056823.1）、*Dehalococcoides* sp. UCH007 DNA（Genebank序列号：AP014722.1）相似度最高，达98%。OTU 11728与未分离培养的CLC16菌株（Genebank序列号：KX882406.1）、未分离培养的*Dehalogenimonas sp.* clone PHAbac169（Genebank序列号：KX882406.1）、未分离培养的clone LaC15H83（Genebank序列号：EF667789.1）有94%相似度。OTU 4458与未分离培养的*Dehalococcoides* sp. clone DE7（Genebank序列号：AY622903.1）比对得到的数据评价值最高，OTU 8613与未分离培养的clone SEDMP26\_10（Genebank序列号：HF913733.1）比对得到的数据评价值最高；OTU 9803与未分离培养的FL191（Genebank序列号：HM481368.1）比对得到的数据评价值最高，且与铁还原细菌富集培养基HN-HFO18（Genebank序列号：FJ269090.1）非常相似，该序列在Wang等[77]研究湖南水稻土三价铁异化还原菌系统发育多样性时发现。与这些OTUs相似的大多是未分离培养的菌株序列，仍有待进一步研究。

表4-5展示了变形菌亚门、*δ*变形菌亚门、*ε*变形菌亚门OTUs占总体百分比及两个亚门占变形菌门的百分比。

表4-5 各实验组*δ-Proteobacteria、ε*-*Proteobacteria*及*Proteobacteria*所占百分比 (单位：%)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品组别  周数 | T-1  0w | T-1  6w | T-1  24w | T-1  66w | T-S  6w | T-S  24w | T-S  66w | T-Fe  6w | T-Fe  24w | T-Fe  66w |
| *δ-Proteobacteria* (%) | 14.601 | 20.200 | 14.871 | 12.948 | 10.004 | 21.311 | 17.903 | 14.225 | 8.188 | 14.239 |
| *ε-Proteobacteria* (%) | 1.792 | 0.025 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.004 | 0.024 | 0 | 0 |
| *Proteobacteria* (%) | 46.46 | 38.90 | 27.72 | 19.77 | 33.04 | 34.40 | 23.28 | 27.18 | 14.96 | 19.54 |
| *δ-Proteobacteria/ Proteobacteria* (%) | 31.43 | 51.93 | 53.65 | 65.49 | 30.28 | 61.95 | 73.43 | 52.34 | 54.73 | 73.15 |
| *ε-Proteobacteria/ Proteobacteria* (%) | 3.86 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.09 | 0.00 | 0.00 |

在产甲烷条件下的T-1实验组，随着反应的进行，体系中*Proteobacteria* 门菌优势不再，相对数量一直降低，到第66周占总体的19.77%，成为体系中继*Chloroflexi*（27.41%）之后的第二大细菌门类。*δ*变形菌亚门（*δ-Proteobacteria*）、*ε*变形菌亚门（*ε*-*Proteobacteria*）中部分的细菌可以降解有机氯污染物[68, 78]，虽然变形菌门在体系中丰度降低，*δ*变形菌亚门在变形菌门内所占百分比保持上升趋势，由0周的31.43%依次变为51.93%、53.65%，在第66周达到65.49%。*ε*变形菌亚门则由原来占比3.86%降到未测出。

在硫酸盐还原条件下，体系中*Proteobacteria*门相对数量随着反应的进行呈降低趋势，到第66周占总体的23.28%，但一直是体系中占比最多的门类。*δ*变形菌亚门在变形菌门内所占百分比保持上升趋势，由6周的30.28%依次增长为24周的61.95%，在第66周达到73.43%。*ε*变形菌亚门同样降至未测出。

在三价铁还原条件下，体系中*Proteobacteria*门相对数量同样大致呈降低趋势，到第66周占总体的19.54%，占比小于*Chloroflexi*（25.87%）、*Bacteroidetes*（20.88%）。*δ*变形菌亚门在变形菌门内所占百分比同样保持上升，由6周的52.34%依次增长为24周的54.73%，在第66周达到73.15%。*ε*变形菌亚门同样未测出。

*δ*变形菌亚门中地杆菌属（*Geobacter*）菌是淡水沉积物和地下水中的常见微生物, 且与脱氯、硫还原以及铁还原密切相关。其中，*G. lovleyi*是已知的四氯乙烯降解菌[79]。Merlino等[80]研究地下水中1,2-二氯乙烷降解的微生物群落变化，发现添加乳酸生物刺激后*Geobacter*从原来在体系中占主导地位变为未检出。在本实验中，初始时*Geobacter* 占总体的5.03%，在T-1实验组及T-Fe实验组均随时间增加比例降低。在T-S实验组中第6周、24周、66周所占百分数依次为0.86%、1.72%、0.40%，虽然与Merlino等人实验变化趋势相同，但本实验是模拟自然条件降解的群落变化，并非比较添加乳酸生物刺激前后的群落变化，因此难以得出*Geobacter*一定随PCBs脱氯反应进行占比降低的结论。

硫酸盐还原细菌在*δ*变形菌亚门中最多，包括脱硫菌目（*Desulfobacterales*）、脱硫弧菌目（*Desulfovibrionales*）、互营杆菌目（*Syntrophobacterales*）菌株。厚壁菌门中脱硫柄菌属（*Desulfotomaculum*）、 *Desulfosporomusa*和*Desulfosporosinus*以及硝化螺旋菌门（*Nitrospira*）中的热脱硫弧菌属（*Thermodesulfovibrio*）均可还原硫酸盐。在样品中我们发现了脱硫相关菌*Desulfobacterales、Desulfovibrionales、Syntrophobacterales*、*Desulfosporosinus*以及*Thermodesulfovibrio*。其中*Thermodesulfovibrio*是样品OTUs中*Nitrospira*的主要组成（在各样品中均占90%以上）。然而，在外加了硫酸盐的T-1实验组，这些硫酸盐还原菌并未出现明显富集，反而在相同的时间点富集程度低于T-1组。

在厌氧环境中，三价铁还原菌与通过发酵或厌氧呼吸作用生长的细菌（如硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌）共存[81]。三价铁还原菌位于*δ*变形菌亚门中脱硫单胞菌属（*Desulfuromonas*），脱硫细菌属（*Desulfuromusa*），地杆菌属（*Geobacter*）和幽门杆菌属（*Pelobacter*）[82]。*Desulfuromonas* *chloroethenica* 、*Desulfuromonas* *michiganensis*、*Geobacter* *lovleyi*等三价铁还原菌可作用于三氯乙烯（TCE）、四氯乙烯（PCE），使其脱氯[79, 83, 84]。Wei等[57]发现外加三价铁后，不会完全抑制TCE的降解，*Dehalococcoides*和*Geobacteraceae*将在TCE降解、三价铁还原环境下同步富集。然而，截至目前，尚未发现能够降解PCBs的铁还原菌，仅从高通量测序所得的三价铁还原相关细菌的在样本中的相对数量难以得出确切规律，脱氯过程及铁还原过程中微生物的相互作用较为复杂，有待进一步研究。

杨凯[85]通过对PCBs脱氯富集培养体的群落研究发现厚壁菌门（*Firmicutes*）是占比最多的菌门，其中可能存在与PCBs在脱氯富集培养体中转化与消解密切相关的微生物。厚壁菌门（*Firmicutes*）在第0周占总OTUs的9.62%，与Matturro等[86]对历史上有PCBs污染的意大利塔兰托海湾沉积物高通量测序结果中厚壁菌门以热脱硫菌科（*Thermodesulfobiaceae*）为主不同，太湖底泥微环境中的厚壁菌门中梭菌目（*Clostridiales*）居多。*Thermodesulfobiaceae*中包含几种硫酸盐还原菌[87]，因而会在硫酸盐浓度高的海洋沉积物中富集。类似地，在外加硫酸盐的T-S实验组中也有热脱硫菌目（*Thermoanaerobacterales*）富集，第24周占OTUs总数的0.14%、第66周占0.03%。

Merlino等[80]对乳酸生物刺激降解地下水中1,2-二氯乙烷的微生物群落进行研究，发现多种还原脱卤酶与富含梭菌目（*Clostridiales*）微生物的群落环境密切相关。本实验各样品中梭菌目一直在厚壁菌门中占比最多，占总OTUs的比例在6.78%–54.33%之间。

Hug等[88]分析了三种脱氯富集培养物的代谢和系统发育学差异，指出非脱氯微生物在群落中的重要作用，其中厚壁菌门、古生菌（*Euryarchaeota*）、*δ*变形菌亚门在编码类咕啉合成、甲硫氨酸合成、氧清除和电子供体代谢起关键作用，间接提供*Dehalococcoides*生长所需的代谢物质。在本实验体系中并未检测古生菌，仅针对环境体系中的细菌进行测序。传统认为，古生菌会与*Dehalococcoides*竞争电子供体，而且它也不是提供*Dehalococcoides*生长所需代谢物的唯一来源。因此，在电子供体较少的情况下，不倾向于考虑其对脱氯菌生长的有益作用。

4.3 本章小结

（1）对产甲烷条件下太湖底泥微环境（T-1实验组）、硫酸盐还原条件下太湖底泥微环境（T-S实验组）以及三价铁还原条件下的太湖底泥微环境（T-Fe实验组）在第0周（只取T-1组作为背景值）、第6周、第24周以及第66周共10个样品进行高通量测序，共得到149984条序列，样品序列数为8000–25273条。将相似度达到97%的序列归为1个OTU，各样品及OTUs为1053–1941条，香农指数表明测序数目可以反映样品中大部分微生物的物种信息。

（2）所测样品中主要有变形菌门（*Proteobacteria*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）、绿弯菌门（*Chloroflexi*）、厚壁菌门（*Firmicutes*）、硝化螺旋菌门（*Nitrospirae*）、绿菌门（*Chlorobi*）、酸杆菌门（*Acidobacteria*）、放线菌门（*Actinobacteria*）、螺旋体门（*Spirochaetes*）等菌株。

（3）*Chloroflexi*中包含了所有已知的PCBs脱氯菌，在各个实验组随着脱氯进程占体系的百分比数量增加，但相对数量并未呈现绝对增长。*Chloroflexi*不仅仅相对其他菌门的数量发生变化，其门内菌群结构同样出现变化，PCBs脱氯菌所在的*Dehalococcoidales*目占*Chloroflexi*百分比保持增长。

（4）大多数已知PCBs脱氯菌所在的*Dehalococcoides* 在0周时未检出，T-1实验组中第6周、24周、66周依次占OTUs总数的0.01%、0.78%、4.13%；T-S实验组中第66周占OTUs总数0.04%；T-Fe实验组第24周、66周分别占0.18%、1.33%。*Dehalococcoides*会随着时间占比增加，在PCBs脱氯反应未启动（0周样品、6周的T-S、T-Fe实验组样品）或脱氯反应缓慢（24周的T-S样品）未检出，侧面验证了*Dehalococcoides*与太湖底泥微环境PCBs脱氯反应的关联性。样品中分类为*Dehalococcoides*的主要为OTU 10，从系统发育树看与*Dehalococcoides* CBDB1、CG5、GT高度相似，但由于测序深度所限，OTU 10无法形成单独的进化枝以进一步鉴别。

（5）在时间0点样品中变形菌门（*Proteobacteria*）所占比例最高，达46.46%，随反应进行呈下降趋势。但其中与有机氯污染物降解相关的两种亚菌门表现不同，其中*δ*变形菌亚门在变形菌门内所占百分比升高，而*ε*变形菌亚门从初始占变形菌门的3.86%均降至未检出。

（6）硫还原相关细菌和铁还原细菌并未在相应添加了硫酸盐和三价铁的实验组富集，也未随时间推移表现出某种明显规律。太湖底泥实验环境中微生物的相互作用较为复杂，有待进一步研究。

（7）已知的PCBs脱氯菌只在体系中占很小的部分（各实验组中*Dehalococcoides*菌最高占总OTUs 的4.13%），微环境中更多的是不具备PCBs脱氯功能的微生物。与已有研究结论一致[80, 88]，本实验微环境中厚壁菌门梭菌目（*Clostridiales*）、*δ*变形菌亚门菌非常丰富，它们间接提供*Dehalococcoides*生长所需的代谢物质，是PCBs脱氯微生物群落的重要组成部分。

## 第五章 实时荧光定量PCR实验结果分析

利用qPCR分别对产甲烷条件下太湖底泥微环境（T-1实验组）、硫酸盐还原条件下实验微环境（T-S实验组）、三价铁还原条件下实验微环境（T-Fe实验组）的总细菌（*Bacteria*）、绿弯菌门中的脱氯菌（*Chloroflexi*，CHL）、*Dehalococcoides*（DHC）、*o*-17/DF-1的16S rRNA基因以及2种还原脱卤酶基因*ardA*、*rdh*12进行实时荧光定量，考察各环境下微生物群落变化情况。

图 5-1为各实验组中*Bacteria* 16S rRNA基因拷贝数随时间的变化。各实验组总菌数量均在108 copies/mL(拷贝数每毫升泥浆)到1010 copies/mL数量级，t检验无显著性差异（*p*>0.05），外加硫酸盐或三价铁不会对其产生明显影响。总菌数量可为研究脱氯相关细菌16S rRNA基因在微环境中的相对数量变化提供依据。







图5-1 T-1、T-S、T-Fe组*Bacteria* 16S rRNA基因随时间的变化

5.1 *Chloroflexi* 16S rRNA基因定量

迄今发现的PCBs脱氯菌均属于绿弯菌门（*Chloroflexi*），系统进化树分析表明绿弯菌门中的脱氯菌分为两组，*Dehalococcoides*属各菌株属于一组，*o*-17/DF1属于另一组[76]。虽然绿弯菌门中推定的脱氯细菌并不都能参与PCBs的脱氯，但其16S rRNA基因序列与已知的PCBs脱氯菌高度相似[89]，因此把*Chloroflexi*推定的脱氯菌作为实验目标菌群。

图5-2为各实验组*Chloroflexi* 16S rRNA基因拷贝数随时间的变化。太湖底泥中存在*Chloroflexi*菌，第0周即有2.45×106 ± 3.7×105 copies/mL基因。







图5-2 T-1、T-S、T-Fe组*Chloroflexi* 16S rRNA基因随时间的变化

在产甲烷条件下微环境T-1实验组，*Chloroflexi* 16S rRNA基因在0到24周呈上升趋势，在第24周达到7.79×107 ± 1.23×106 copies/mL。由单体测定结果知，脱氯反应在3–6周开始启动并进入快速降解期，在此也观察到第6周时*Chloroflexi* 16S rRNA基因较0周和3周有显著增加。在24周后，*Chloroflexi* 16S rRNA基因在4.94×107 ± 5.65×106 copies/mL 到9.74×107 ± 6.92×106 copies/mL之间波动，维持在较高的数量级水平，一定程度上说明体系有较好的脱氯潜能。

硫酸盐还原条件下实验组的*Chloroflexi* 16S rRNA基因拷贝数增长则缓慢得多。在0到36周，拷贝数在106数量级波动，在脱氯反应启动的第9周到第36周，*Chloroflexi*没有表现出增长趋势。在脱氯反应快速进行的36周–66周，*Chloroflexi* 16S rRNA基因拷贝数出现明显增长，由36周的4.86×106 ± 7.67×105 copies/mL增至 2.36×107 ± 6.21×105 copies/mL。由于T-S组从反应开始到反应快速进行前（第9–36周）PCBs降解程度低，我们认为*Chloroflexi* 16S rRNA基因拷贝数变化可以指示硫酸盐还原条件下快速反应期的到达。

三价铁还原条件下实验组的*Chloroflexi* 16S rRNA基因拷贝数增长要快于T-S组。除了在第21周出现的拷贝数值低的情况(与前文PCB单体测定结果对应，21周T-Fe组多氯联苯降解较前后时间点较弱，属于异常点)，反应微环境的增长趋势良好。T-Fe实验组在36 周之前*Chloroflexi* 16S rRNA基因拷贝数增速比T-1组慢，到了第51周T-Fe实验组基因拷贝数与T-1组相当，第66周*Chloroflexi* 16S rRNA基因拷贝数达1.06×108 ± 1.20×106 copies/mL，略高于T-1实验组。在三价铁还原环境下，多氯联苯在第9周开始启动，9周到36周基因拷贝数由5.33×106 ± 5.27×104 copies/mL增长至4.47×107 ± 1.41×106 copies/mL，增长了约1个数量级。36周之后，T-Fe组PCBs降解速率增快，基因拷贝数同样保持增长，第66周达1.06×108 ± 1.20×106 copies/mL。*Chloroflexi* 16S rRNA基因拷贝数能指示三价铁还原条件下太湖底泥微环境PCBs的降解。

图3.3为*Chloroflexi* 16S rRNA基因拷贝数与*Bacteria* 16S rRNA基因拷贝数的百分比值随时间的变化。第0周到第24周，T-1 实验组*Chloroflexi/bacteria*从0.1%增长至3.37% ，24周后*Chloroflexi*拷贝百分数出现波动，在1.70%与8.67%之间，维持在相对较高水平，这和多氯联苯单体分析结果中T-1组持续脱氯降解的结果相吻合；也说明脱氯过程中，推定脱氯菌*Chloroflexi*在微生物群落中的相对丰度得到提高。

硫酸盐还原条件下，*Chloroflexi* 16S rRNA基因拷贝百分数由原来的0.1% 提高到36周的0.26%。但到了第51周、第66周，基因拷贝百分数有明显的增长，分别达到了1.31%和2.30%，由单体测定结果知多氯联苯同期降解显著（见图3-1、图3-2）。因此推测*Chloroflexi* 16S rRNA基因的相对丰度可以指示脱氯速率。

三价铁还原条件下实验组*Chloroflexi/bacteria*在实验最初9周内由原来的0.1%增长至0.19 %，随后出现波动上涨，到第30周时，达1.59%。在第51周，*Chloroflexi*/*Bacteria*百分比值回落至1.00% ，与同期硫酸盐还原条件下实验组相当。然而，第66周T-Fe组百分比高达11.81％，远高于T-1和T-S组。相应地，51周到第66周T-Fe组的PCBs降解速率快，超过同期其它两组，进一步说明*Chloroflexi*的相对丰度可以指示脱氯速率。Hori等[90]分离了自然环境中还原结晶氧化铁的微生物，提出环境中富集的厚壁菌门和绿弯菌门微生物可能起到催化结晶的氧化铁（III）的异化还原作用。因此T-Fe组中绿弯菌门部分微生物的富集可能是催化三价铁还原作用导致，从而表现为*Chloroflexi*在三价铁多的环境中丰度较高，这也和T-Fe在脱氯尚未开始的第6周时的基因拷贝数远高于脱氯已启动的T-1组相吻合（见图5-2）。



图5-3 T-1、T-S、T-Fe组*Chloroflexi* 16S rRNA占*Bacteria* 16S rRNA基因的百分比值  
随时间的变化

5.2 *o*-17/DF-1 16S rRNA基因定量

*o*-17/DF-1是两种已知的多氯联苯脱氯菌。Cutter等[39]在美国巴尔的摩港沉积物中发现了*o*-17，它是首个鉴别出的多氯联苯脱氯菌，可以脱去多氯联苯邻位氯原子。随后*Dehalobium chlorocoercia* strain DF-1也从巴尔的摩港沉积物培养基中鉴别出来，其16S rRNA基因序列与*o*-17的序列最为相似（相似度为89％），可以脱去双侧氯取代的氯原子[41, 91]。

本实验中虽然发现了多氯联苯的邻位脱氯现象，但在各个实验条件下荧光定量PCR实验中*o*-17/DF-1 16S rRNA基因浓度均很低，这和美国格拉斯河底泥中邻位脱氯出现伴随着*o*-17/DF-1 16S rRNA基因的上升不同[74]。我们认为太湖底泥中存在其他未知的具有邻位脱氯功能的菌株或酶，有待进一步研究。

5.3 *Dehalococcoides* 16S rRNA基因定量

*Dehalococcoides*根据其16S rRNA基因V2和V6可变区的差异，得到*Cornell*、*Victoria*和*Pinellas*三个亚组[92]。截至目前，研究者发现的PCBs脱氯菌主要是*Dehalococcoides*属菌（*Pinellas*亚组）及上述进化系统发育相关却又不同的绿弯菌门菌株。*Dehalococcoides*属纯化分离的PCBs脱氯菌株包括 *Dehalococcoides* *mccartyi* strain 195、CBDB1、CG1、CG4、CG5以及JNA[46, 93-95]。

图5-4是各实验组中*Dehalococcoides* 16S rRNA基因拷贝数随时间的变化。太湖底泥中存在*Dehalococcoides*菌，在反应0点有8.24×106 ± 9.78×105 copies/mL。

随着反应的进行，T-1实验组*Dehalococcoides* 16S rRNA基因拷贝数从脱氯启动的第6周即有明显增加，达到8.24×106 ± 9.78×105 copies/mL，至24周一直上升，此后保持在较高水平。在反应的66周内，T-1实验组*Dehalococcoides*增加了一个数量级。一般认为，多氯联苯脱氯反应出现滞后或停止是由于环境中脱氯菌浓度太低。而*Dehalococcoides*保持在高浓度说明太湖底泥在66周后仍具有良好的脱氯潜能。







图5-4 T-1、T-S、T-Fe组*Dehalococcoides* 16S rRNA基因随时间的变化

在三价铁还原条件下，*Dehalococcoides*基因在脱氯反应启动（第9周）不仅没有上升反而出现了下降。直到24周后，也就是多氯联苯单体分析（见图3-1）发现脱氯速率较快时，基因数才有所增加。到第66周时，*Dehalococcoides*基因较反应0点增加了2倍。第6周时的高*Dehalococcoides*基因水平和同期高*Chloroflexi*水平一样，很可能是相关菌可以用三价铁作为替代电子受体进行生长代谢所致[90]。

在硫酸盐还原条件下，底泥微环境实验组中不仅在脱氯反应未启动的第6周升高，而且*Dehalococcoides*拷贝数即使在脱氯反应迅速进行的36–66周也没有表现出持续增长，故*Dehalococcoides*无法指示太湖底泥在硫酸盐还原条件下的脱氯情况。

图5-5为*Dehalococcoides* 16S rRNA基因拷贝数与Bacteria 16S rRNA基因拷贝数的百分比值随时间的变化。与上述*Chloroflexi*/*Bacteria*百分比值相似，三种实验条件下*Dehalococcoides*相对丰度均出现增长，T-1组*Dehalococcoides*16S rRNA基因相对丰度最大，其次是T-Fe组，T-S组相对最低。因而，也可以考虑采用*Dehalococcoides/Bacteria*来追踪指示脱氯进程。



图5-5 T-1、T-S、T-Fe组*Dehalococcoides*16S rRNA占*Bacteria*16S rRNA基因的百分比值随时间的变化

在T-1组66周的实验期中，*Dehalococcoides*最高占细菌总量的3.76%，不能成为体系中的优势菌。Brothersen[67]外加PCB 132 (0.158mM)构建的无沉积物LH（Lake Hartwell，哈特韦尔湖）培养基，在培养184天后，*Dehalococcoides*占总菌的2.2%，与本实验同期结果相似（第24周即168天，占1.98%）。Xu等[74]在脱氯反应活性高的格拉斯河底泥中观察到的*Dehalococcoides* 16S rRNA基因相对丰度甚至低于1.0%。由此可见*Dehalococcoides*只要达到了一定浓度可以在非优势条件下进行多氯联苯降解。

Kjellerup[89]对比研究了美国格拉斯河、布法罗河以及安那考斯迪亚河不同微生物群落对PCBs脱氯的影响，发现在格拉斯河沉积物中*Dehalococcoides*菌丰富、脱氯反应明显，而安那考斯迪亚河和布法罗河沉积物的微生物群落中推定的脱氯细菌总数与格拉斯河相似，但脱氯微生物种类更加多样，它们的脱氯反应较弱。相比*Chloroflexi*中推定的脱氯微生物，*Dehalococcoides*可能更好地表征微环境中PCBs的脱氯反应，因此进一步研究*Dehalococcoides*在脱氯反应过程中的变化。该研究结果与Xu等[48, 74]在美国格拉斯河和哈德逊河的研究结果一致。而本研究结果显示，推定脱氯菌*Chloroflexi*可以更好地指示硫酸盐还原和三价铁还原条件下脱氯的启动和脱氯速率的变化。这说明脱氯反应的沉积物特异性非常强，指示微生物/基因需要相应调整。

5.4 *ardA*基因定量

由于*Dehalococcoides*属16S rRNA基因高度相似（相似度＞98%），而且该基因序列无法与脱氯行为关联，研究者转而关注还原脱卤酶基因（reductive dehalogenase，*rdh*）[27, 50]。不同菌株含有的还原脱卤酶基因不尽相同，研究还原脱卤酶基因有助于认识微生物的脱氯行为[30, 52, 96]。

Ritalahti等[27]运用qPCR定量了*Dehalococcoides*中3种功能已知的还原脱卤酶基因，分别是调控三氯乙烯脱氯产生氯乙烯的*tceA*、氯乙烯生成乙烯的*bvcA*以及三氯乙烯直接脱氯产生乙烯的*vcrA*基因。

Brothersen[67]在研究美国哈特韦尔湖多氯联苯脱氯微生物群落时，选取了还原脱卤酶基因*ardA* (*ancestral reductive dehalogenasegene*)、*tceA*、*bvcA*、*vcrA*作为qPCR实验研究对象。实验结果表明哈特韦尔湖底泥微环境中存在*ardA*基因，其总量大约是*Dehalococcoides*定量结果的一半，推测是由于微环境中存在两类*Dehalococcoides*菌株（一种有*ardA*基因，另一种没有），而*tceA*、*bvcA*、*vcrA*基因均不存在。

本实验选取了*ardA*基因以及*tceA*基因作为研究对象，然而*tceA*基因在质粒制备阶段就未成功扩增，说明太湖底泥微环境的多氯联苯脱氯过程中还原脱卤酶基因*tceA*并未起作用。

图5-6是各实验组中还原脱卤酶基因*ardA*基因拷贝数随时间的变化。





图5-6 T-1、T-S、T-Fe组*ardA*基因随时间的变化

对于T-1实验组，*ardA*基因数量在经历了3周的反应滞后期后迅速增长，在首次检测到脱氯产物的第6周时增至1.39×105 ± 8.01×104 copies/mL，第9周达到3.07×106 ± 3.94×105 copies/mL，相比第0周增长了两个数量级。之后*ardA*基因保持整体增长趋势，第24周到66周稳定在107copies/mL数量级，仍具有较高脱氯潜能。

在硫酸盐还原条件下，还原脱卤酶基因*ardA*的增长并不明显，甚至较0点还出现下降现象。到第30周基因数量才达到5.27×104 ± 8.29×103 copies/mL。然而，第36–66周基因数量由3.20×104 ± 2.86×103 copies/mL增至2.26×105 ± 2.10×104 copies/mL，同期多氯联苯降解也从缓慢阶段进入了较快速阶段。*ardA*基因能指示多氯联苯脱氯反应加快，但与产甲烷条件下不同的是无法指示脱氯的启动。

在三价铁还原条件下，还原脱卤酶基因*ardA*与产甲烷条件下同样表现出了良好的增长趋势，从第9周脱氯反应启动之后即有显著上升（第21周被认为是异常点，该时间点测得的多氯联苯脱氯程度较前后的18周和24周都显著低），与多氯联苯单体测定结果吻合。在第66周时，*ardA*基因数量甚至高于T-1组，达到3.90×107 ± 2.16×106 copies/mL。*ardA*基因数量持续增长，说明在三价铁还原条件下多氯联苯有较高的脱氯潜能。*ardA*基因作为指示基因在三价铁还原条件下是可行的。

与Brothersen[67]所得结论不同，在太湖底泥微环境中，*ardA*/*Dehalococcoides*不存在1：2的稳定关系。在0–15周，比值由0.00增长为0.58，随后在0.19到0.48之间波动。在添加了多种PCB母体的实验环境下，参与PCBs降解的*Dehalococcoides* 微生物以及相关的还原脱卤酶基因更为复杂。

5.5 *rdh*12基因定量

Park等[68]对*Dehalococcoides* *ethenogenes* strain 195和strain CBDB1共有的12种还原脱卤酶（*rdh*01-*rdh*12）进行了研究。研究者在美国安那考斯迪亚河不同底泥微环境条件下，对培养135天后的各微环境中4种还原脱卤酶基因（*rdh*01、*rdh*04、*rdh*06、*rdh*12）进行qPCR定量。其中，*rdh*12基因在各个脱氯实验组都有较为明显的增长，因而将其作为在本实验还原脱氯酶研究对象之一。

图5-7是各实验组中还原脱卤酶基因*rdh*12基因拷贝数随时间的变化情况。

对于T-1实验组，与*ardA*基因的变化规律几乎一致，*rdh*12基因在脱氯产物首次被检出的第6周即升高到1.23×105 ± 1.93×104 copies/mL，第9周为1.84×106 ± 8.62×104 copies/mL。到第66周，*rdh*12基因数量达到2.1×107 ± 1.49×106 copies/mL，比第0周增长了3个数量级。*rdh*12基因数量的增长与PCB单体测定所得的PCBs降解滞后期相对应，它在66周仍保持在高数量水平，表明脱氯反应在66周仍可继续进行。

与上述还原脱卤酶基因*ardA*类似，硫酸盐还原条件下*rdh*12的增长并不明显，除第18周*rdh*12基因数量较高外，前24周几乎没有增长，到第30周基因数量为7.34×104 ± 2.65×103 copies/mL。第36周到第66周PCBs快速降解期*ardA*基因数量有一定升高，由5.05×104 ± 2.02×103 copies/mL增至3.14×105 ± 3.86×104 copies/mL。在硫酸盐还原条件下，*rdh*12 基因仅能指示多氯联苯的加快。

在三价铁还原条件下，还原脱卤酶基因*rdh*12的增长幅度介于T-1和T-S之间。虽然第9周首次检测到微量脱氯子产物，但*rdh*12并没有明显增长。第9周到第12周，*rdh*12基因由1.73×104 ± 5.22×103 copies/mL增至5.31×104 ± 5.31×103 copies/mL，增长了2倍。随后，*rdh*12基因除了在第21周出现低值，一直保持增长，在第66周达到9.00×106 ± 2.25×105 copies/mL，显示出持续的脱氯潜能。因而，*ard*A基因作为指示基因在三价铁还原条件下是可行的。





图5-7 T-1、T-S、T-Fe组*rdh*12基因随时间的变化

Park等[68]在安那考斯迪亚河微环境中外加PCB 116 (2uM)，经135天培养后，*rdh*12约为对照组的10倍，CPB变化不足5%。而在本实验中，*rdh*12 基因的响应更加明显，18周（126天）T-1实验组的*rdh*12基因比初始增长了两个数量级，CPB降低了约11%。然而PCB 116在多氯联苯商业产品中未曾出现，在环境中不多见，而本实验中外加的PCBs混合物存在于商业产品中且曾在太湖底泥中有检出，从而推测底泥对历史上有污染的多氯联苯单体可能更容易降解，还原脱卤酶基因相应也更明显，但也可能是太湖与安那考斯迪亚河本土微生物的差异导致实验结果的不同。相似的是，*rdh*12基因均表现出了对PCB脱氯反应的良好响应。

*rdh*12基因与*ardA*基因在指示太湖微环境PCBs降解方面的表现相似，它能在太湖底泥各个实验微环境中能很好地指示PCBs脱氯反应发生，揭示环境脱氯潜能。

5.6 本章小结

（1）与美国格拉斯河底泥中邻位脱氯出现伴随着*o*-17/DF-1 16S rRNA基因的上升不同，本实验中发现了多氯联苯的邻位脱氯现象，但在各个实验条件下*o*-17/DF-1 16S rRNA基因浓度却很低。推测太湖底泥中存在其他未知的具有邻位脱氯功能的菌株或酶，有待深入研究。

（2）本实验共选取了*ardA*基因、*tceA*基因和*rhd*12基因作为研究对象，然而*tceA*基因在质粒制备阶段就未成功扩增，说明太湖底泥微环境的多氯联苯脱氯过程中还原脱卤酶基因*tceA*并未起作用。

（3）脱氯相关菌*Chloroflexi*、*Dehalococcoides*的16S rRNA基因以及 *ardA*、*rdh*12基因均随脱氯进行呈增长趋势，各实验组相同时间点基因的数量大体上为T-1组＞T-Fe组＞T-S组，与PCBs降解程度相对应。

（4）脱氯相关菌*Dehalococcoides*在多氯联苯降解反应进行过程中无法成为微环境中的优势菌，在66周实验周期中、三种不同反应条件下的最高含量为总菌的3.76％。而实验体系PCBs降解效果显著，说明*Dehalococcoides*只要达到了一定浓度可以在非优势条件下进行多氯联苯降解。

（5）结合各组脱氯反应的滞后期和快速反应期，脱氯相关菌*Chloroflexi*、*Dehalococcoides* 16S rRNA基因能指示产甲烷条件下太湖底泥微环境（T-1实验组）和三价铁还原条件下太湖底泥微环境（T-Fe实验组）脱氯反应的发生。在硫酸盐还原条件下（T-S实验组）脱氯相关菌*Chloroflexi*可以指示脱氯反应的加快，而*Dehalococcoides*无法指示太湖底泥的脱氯情况。意味着在硫酸盐还原条件下起脱氯作用的菌可能并非属于*Dehalococcoides*属。*Dehalococcoides*在PCBs快速降解期占*Bacteria*百分比增大，能一定程度上指示脱氯反应的加快，可以考虑采用*Dehalococcoides/Bacteria*来追踪指示脱氯进程。与已有研究结果[48, 74]不同，在本实验中，推定脱氯菌*Chloroflexi*相比*Dehalococcoides*可以更好地指示硫酸盐还原和三价铁还原条件下脱氯的启动和脱氯速率的变化。这说明脱氯反应的沉积物特异性非常强，指示微生物/基因需要相应调整。

（6）结合各组脱氯反应的滞后期和快速反应期，还原脱卤酶基因*ardA*、*rdh*12 均能指示产甲烷条件下太湖底泥微环境（T-1实验组）、三价铁还原条件下太湖底泥微环境（T-Fe实验组）脱氯反应的启动。在硫酸盐还原条件下（T-S实验组）只能反映脱氯反应的加快，无法指示反应的启动。相对于PCBs脱氯指示微生物，还原脱卤酶基因对PCBs脱氯反应起始的响应更加明显，*ardA*、*rdh*12在产甲烷条件下（T-1实验组）PCBs降解的第3–6周均表现出数量级的增长，远高于同期两种指示微生物*Chloroflexi*、*Dehalococcoides*的变化。在三价铁还原条件下太湖底泥微环境（T-Fe实验组）的变化情况与产甲烷条件下（T-1实验组）类似。而在硫酸盐还原条件下（T-S实验组）指示微生物/基因的响应都较差。推测在硫酸盐浓度较高（约18mmol/kg泥浆）的环境下太湖底泥微生物降解PCBs的方式不同，在该环境下的脱氯指示基因/微生物还有待探索。

（7）到第66周，脱氯相关菌/基因仍保持在较高水平，说明脱氯反应仍可继续进行，实验微环境具有脱氯潜能。

## 第六章 结论与展望

6.1 结论

本研究对构建的太湖底泥微环境T-1实验组（外加PCBs母体）、T-S实验组（外加PCBs母体及Na2SO4）、T-Fe实验组（外加PCBs母体及FeOOH）模拟自然条件下多氯联苯的降解，进行了为期66周的实验监测。探究太湖底泥微环境中PCBs的降解规律以及外加的两种竞争性电子受体（三价铁、硫酸根）对PCBs降解的影响，通过化学分析与分子生物学方法相结合，筛选出了太湖底泥PCBs降解的指示微生物/还原脱卤酶基因。所得主要结论如下：

（1）太湖底泥本土微生物能降解PCBs，验证了脱氯微生物在环境中普遍存在。

（2）各个实验环境下多氯联苯降解都存在一定的滞后期：T-1实验组在第6周首次测得PCBs脱氯产物；T-S组、T-Fe实验组均在第9周首次测得脱氯产物（由于T-1组第6周PCBs降解较多，认为脱氯从第3周开始，而T-S、T-Fe组则认定从第9周开始反应）。然而脱氯反应的开始并不意味着PCBs降解可以快速进行，尤其是T-S实验组9–36周的总PCBs脱氯速率只有0.041 ± 0.007 mg/kg·week-1；同期T-Fe实验组的脱氯速率为0.098 ± 0.017 mg/kg·week-1；T-1实验组在前36周的脱氯速率可大致分为两个阶段，3–18周速率为0.3728 ± 0.0146 mg/kg·week-1，18–36周速率为0.099 ± 0.009mg/kg·week-1。36周之后，三个实验组的脱氯速率趋于一致：T-1实验组总PCBs降低速率为0.158 ± 0.005 mg/kg·week-1；T-Fe实验组为0.233 ± 0.015 mg/kg·week-1；T-S实验组在36–51周、51–66周的平均脱氯速率分别为0.122、0.180 mg/kg·week-1。

（3）添加的各PCBs母体降解速率由快到慢排序为T-1实验组＞T-Fe实验组＞T-S实验组。竞争性电子受体的添加会抑制母体多氯联苯的脱氯，且硫酸根的抑制作用比三价铁强。脱氯微生物对脱氯底物具有选择性，其中PCB 5、PCB 12、PCB 105、PCB 114在各实验组中降解速率快且降解充分，是体系中优先降解的PCB单体。其中，PCB 5、PCB 12、PCB 105、PCB 114在各实验组中反应速率快、降解充分，是体系中优先脱氯的PCB单体。PCB 153、PCB 170的脱氯表现相似，反应滞后期较上述4种PCB单体长，第 66周时，在T-1组和T-Fe组中接近完全脱氯。PCB 64、PCB 149在T-S实验条件下几乎不反应；在T-Fe中到36周脱氯反应才开始明显进行；在T-1实验组降解的24–30周都经历了类平台期。PCB 77降解速率非常慢，到66周时，在T-1组中降解了约20%；在三价铁还原环境下只降解了不足7%，且大部分发生在第51–66周；在T-S中未发生反应。PCB 64、PCB 71和PCB 149均为在一个苯环上同时出现两个邻位取代氯的结构（26-），推测太湖本土微生物中很可能缺乏针对该结构多氯联苯的脱氯菌株/脱氯酶导致其脱氯速率慢。

（4）到第66周，各实验组CPB仍有良好的下降趋势，均未到达平台期，降解反应可以继续进行。此时，脱氯反应程度较大的T-1、T-Fe实验组产物多为苯环上剩余的氯原子无侧位氯取代的PCBs，三价铁的添加并没有改变脱氯路径的偏好，主要是间位脱氯与对位脱氯，而在T-S组中以对位脱氯为主。在T-1实验组产物中找到邻位脱氯的明显证据。

（5）由于实验中母体PCBs脱氯并未产生新的类二噁英PCBs，体系中类二噁英毒性当量由外加的PCB 105及PCB 114的降解情况决定。太湖底泥微环境在三种实验条件下均表现出优先降解类二噁英PCB 105、PCB 114的特点，相比美国哈德逊河、格拉斯河，太湖底泥具有更快去除类二噁英多氯联苯、减小生态毒性的能力。

（6）对第0周（T-1实验组）、6周、24周、66周的各实验组的高通量测序结果表明样品中多数菌株位于变形菌门（*Proteobacteria*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）、绿弯菌门（*Chloroflexi*）、厚壁菌门（*Firmicutes*）、硝化螺旋菌门（*Nitrospirae*）、绿菌门（*Chlorobi*）、酸杆菌门（*Acidobacteria*）、放线菌门（*Actinobacteria*）、螺旋体门（*Spirochaetes*）等。

（7）由高通量测序结果知，包含了所有已知PCBs脱氯菌的*Chloroflexi*，在各个实验组随着脱氯进程百分比含量呈增长趋势，多数PCBs脱氯菌所在的*Dehalococcoidales*目相对*Chloroflexi*富集。其中，与多数PCBs脱氯菌密切相关的*Dehalococcoides*不仅呈现百分比增长，而且在PCBs脱氯反应未启动（0周样品、6周的T-S、T-Fe实验组样品）或脱氯反应缓慢（24周的T-S样品）未检出，侧面验证了*Dehalococcoides*在太湖底泥微环境PCBs脱氯反应中的重要作用。

（8）根据高通量测序结果，已知的PCBs脱氯菌只在体系中占很小的部分（各实验组中*Dehalococcoides*菌最高占细菌总数的4.13%），微环境中更多的是不具备PCBs脱氯功能的微生物。与已有研究结论一致，本实验微环境中富含厚壁菌门梭菌目（*Clostridiales*）、*δ*变形菌亚门微生物，它们间接提供*Dehalococcoides*生长所需的代谢物质，是PCBs脱氯微生物群落的重要组成部分。

（9）*tceA*、*o*-17/DF-1这两种在其它PCBs降解体系中常见的基因/微生物未在太湖底泥微环境中浓度很低，说明不同的环境中PCBs降解菌有所不同，针对太湖底泥微环境的研究能为本土微生物原位修复PCBs乃至其它有机氯污染物提供依据。

（10）脱氯相关菌*Chloroflexi*、*Dehalococcoides* 16S rRNA基因能指示产甲烷条件下太湖底泥微环境（T-1实验组）和三价铁还原条件下太湖底泥微环境（T-Fe实验组）脱氯反应的发生。在硫酸盐还原条件下（T-S实验组）脱氯相关菌*Chloroflexi*可以指示脱氯反应的加快，而*Dehalococcoides*无法指示太湖底泥的脱氯情况。在本实验条件下，推定脱氯菌*Chloroflexi*相比*Dehalococcoides*可以更好地指示硫酸盐还原和三价铁还原条件下脱氯的启动和脱氯速率的变化。

（11）还原脱卤酶基因*ardA*、*rdh*12均能指示产甲烷条件下太湖底泥微环境（T-1实验组）、三价铁还原条件下太湖底泥微环境（T-Fe实验组）脱氯反应的启动，在硫酸盐还原条件下（T-S实验组）反映脱氯反应的加快。在三价铁还原条件下太湖底泥微环境（T-Fe实验组）的变化情况与产甲烷条件下（T-1实验组），相对于PCBs脱氯指示微生物*Chloroflexi*、*Dehalococcoides*，还原脱卤酶基因*ardA*和*rdh*12更为灵敏，可考虑用于多氯联苯脱氯启动和潜能的预测。而在硫酸盐还原条件下（T-S实验组）指示微生物/基因的响应都较差。

6.2 展望

（1）虽然太湖底泥微环境中原有的的有机氯污染物相比外加的PCBs可忽略不计，认为体系中原有的脱氯微生物在未外加PCBs的情况下变化不大，但增加未外加PCBs的底泥微环境对照组的微生物群落变化将使得实验体系更加完善。

（2）截至66周，各个实验组的PCBs均未降解完全且具有脱氯潜力，可继续延长周期进行实验。尤其是在外加了竞争性电子受体的三价铁、硫酸盐的底泥微环境中，脱氯反应从开始到快速进行经历了较长时间，PCBs脱氯程度仍有待于长期研究。

（3）与美国格拉斯底泥已有的研究结果不同[59]，PCB 64、PCB 71和PCB 149在各实验组降解速率都很慢，这三种多氯联苯单体均为一个苯环上有两个邻位取代氯的结构（26-），推测太湖本土微生物中很可能缺乏针对该结构多氯联苯的脱氯菌株/脱氯酶作为电子受体的细菌。可以考虑外加来自格拉斯河等底泥的脱氯菌富集培养液，加强对这3种多氯联苯单体的降解。

（4）本实验中发现了多氯联苯的邻位脱氯现象，但在各个实验条件下*o*-17/DF-1 16S rRNA基因的浓度却很低。推测太湖底泥中存在其他未知的具有邻位脱氯功能的菌株或酶，有待进一步研究。

（5）在硫酸盐浓度较高（约18mmol/kg泥浆）的环境下（T-S实验组），本实验选取的几种脱氯指示微生物/基因对PCBs降解的指示效果都相对较差，说明脱氯反应的沉积物特异性非常强，指示微生物/基因需要相应调整。推测在该条件下PCBs的降解机理不同，在硫酸盐还原条件下起脱氯作用的菌可能不属于*Dehalococcoides*属，可在硫酸盐还原菌中及其他相关微生物中进一步寻找脱氯指示微生物以及脱氯指示基因。

（6）在接下来的研究中，对于新发现的还原脱卤酶基因*pcbA1*、*pcbA2*、*pcbA5*应当给予关注。

（7）本实验中样品的高通量测序只针对细菌的16 S rRNA的V3–V4可变区，较为粗略。为进一步明确太湖底泥实验体系中的PCBs脱氯菌，可针对*Chloroflexi*菌群测序分析，并探索太湖底泥PCBs脱氯菌株的分离纯化。

（8）本土PCBs脱氯微生物富集后可进行太湖底泥PCBs、有机氯污染物生物强化实验，向监测下的自然衰减推进。

参考文献

[1] Borja J, Taleon D M, Auresenia J, et al. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(6): 1999-2013.

[2] Hutzinger O, Safe S, Zitko V. Chemistry of PCB's [M]. 1974.

[3] 陈蕾. 天然有机质介导的多氯联苯环境转化与降解机制 [D]. 浙江大学, 2012.

[4] 许妍, 傅大放. 多氯联苯微生物厌氧脱氯研究进展 [J]. 环境化学, 2014, 06: 908-14.

[5] 聂湘平. 多氯联苯的环境毒理研究动态 [J]. 生态科学, 2003, 02: 171-176.

[6] 邢颖, 吕永龙, 刘文彬, 等. 中国部分水域沉积物中多氯联苯污染物的空间分布、污染评价及影响因素分析 [J]. 环境科学, 2006, 02: 228-234.

[7] Breivik K, Sweetman A, Pacyna J M, et al. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners — a mass balance approach: 1. Global production and consumption [J]. Science of The Total Environment, 2002, 290: 181-198.

[8] 聂明华, 杨毅, 刘敏, 等. 太湖流域水源地悬浮颗粒物中的PAH、OCP和PCB [J]. 中国环境科学, 2011, 08: 1347-1354.

[9] 袁旭音, 王禹, 孙成, 等. 太湖底泥中多氯联苯的特征与环境效应 [J]. 长江流域资源与环境, 2004, 03: 272-276.

[10] Cui S, Fu Q, Li Y-F, et al. Levels, congener profile and inventory of polychlorinated biphenyls in sediment from the Songhua River in the vicinity of cement plant, China: a case study [J]. Environ Sci Pollut Res, 2016, 23(16): 15952-15962.

[11] Duan X, Li Y, Li X, et al. Polychlorinated biphenyls in sediments of the Yellow Sea: Distribution, source identification and flux estimation [J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 76(1–2): 283-290.

[12] Wang X, Xi B, Huo S, et al. Polychlorinated biphenyls residues in surface sediments of the eutrophic Chaohu Lake (China): characteristics, risk, and correlation with trophic status [J]. Environmental Earth Sciences, 2014, 71(2): 849-861.

[13] Zhou S-s, Shao L-y, Yang H-y, et al. Residues and sources recognition of polychlorinated biphenyls in surface sediments of Jiaojiang Estuary, East China Sea [J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64(3): 539-45.

[14] Hong Y, Yu S, Yu G, et al. Impacts of urbanization on surface sediment quality: evidence from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) contaminations in the Grand Canal of China [J]. Environment Science Pollution Research, 2012, 19(5): 1352-1363.

[15] Wan X, Pan X, Wang B, et al. Distributions, historical trends, and source investigation of polychlorinated biphenyls in Dianchi Lake, China [J]. Chemosphere, 2011, 85(3): 361-367.

[16] Zhao L, Hou H, Zhou Y, et al. Distribution and ecological risk of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in surficial sediments from Haihe River and Haihe Estuary Area, China [J]. Chemosphere, 2010, 78(10): 1285-1293.

[17] 陈燕燕, 尹颖, 王晓蓉, 等. 太湖表层沉积物中PAHs和PCBs的分布及风险评价 [J]. 中国环境科学, 2009, 02: 118-124.

[18] Yang Z, Shen Z, Gao F, et al. Occurrence and possible sources of polychlorinated biphenyls in surface sediments from the Wuhan reach of the Yangtze River, China [J]. Chemosphere, 2009, 74(11): 1522-1530.

[19] He M-c, Sun Y, Li X-r, et al. Distribution patterns of nitrobenzenes and polychlorinated biphenyls in water, suspended particulate matter and sediment from mid- and down-stream of the Yellow River (China) [J]. Chemosphere, 2006, 65(3): 365-374.

[20] 计勇, 陆光华, 吴昊, 等. 太湖北部湾多氯联苯分布特征及生态风险评价 [J]. 生态环境学报, 2009, 03: 839-843.

[21] Zhang Q, Jiang G. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans and polychlorinated biphenyls in sediments and aquatic organisms from the Taihu Lake, China [J]. Chemosphere, 2005, 61(3): 314-322.

[22] 周春宏, 柏仇勇, 胡冠九, 等. 江苏省典型饮用水源地多氯联苯污染特性调查 [J]. 化工时刊, 2005, 03: 22-25.

[23] Wang H, Wang C, Wu W, et al. Persistent organic pollutants in water and surface sediments of Taihu Lake, China and risk assessment [J]. Chemosphere, 2003, 50(4): 557-562.

[24] Xu Y, Wei S, Qin Q, et al. AhR-mediated activities and compounds in sediments of Meiliang Bay, Taihu Lake, China determined by in vitro bioassay and instrumental analysis [J]. RSC Advances, 2015, 5(69): 55746-55755.

[25] 张跃军, 许添国, 刘程. 江苏省典型内河沉积物中多氯联苯残留情况 [J]. 环境污染与防治, 2008, 06: 98-100.

[26] 叶文瑾. 太湖富营养化水体和底泥中微生物群落的分子生态学研究 [D]. 上海交通大学, 2009.

[27] Ritalahti K M, Amos B K, Sung Y, et al. Quantitative PCR targeting 16s rrna and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2765-2774.

[28] Vasileiadis S, Puglisi E, Trevisan M, et al. Changes in soil bacterial communities and diversity in response to long-term silver exposure [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2015, 91(10).

[29] Jiang X, Shen J, Lou S, et al. Comprehensive comparison of bacterial communities in a membrane-free bioelectrochemical system for removing different mononitrophenols from wastewater [J]. Bioresource Technology, 2016, 216:645-652.

[30] Kube M, Beck A, Zinder S H, et al. Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1 [J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(10): 1269-1273.

[31] 崔静岚. 多氯联苯降解菌的筛选、降解特性研究及其应用 [D]. 浙江大学, 2013.

[32] Brown J F, Bedard D L, Brennan M J, et al. Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments [J]. Science, 1987, 236(4802): 709-712.

[33] Quensen J F, Tiedje J M, Boyd S A. Reductive dechlorination of polychlorinated-biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments [J]. Science, 1988, 242(4879): 752-754.

[34] Wiegel J, Wu Q. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 32(1): 1-15.

[35] Rhee G Y, Bush B, Sokol R C, et al. Anaerobic dechlorination of Aroclor 1242 as affected by some environmental conditions [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1993, 12(6): 1033-1039.

[36] Sowers K R, May H D. In situ treatment of PCBs by anaerobic microbial dechlorination in aquatic sediment: are we there yet? [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2013, 24(3): 482-488.

[37] 陈然然, 祝欣, 林玉锁, et al. 氯代有机物污染场地的监控自然衰减修复初探 [J]. 化工学报, 2015, 07: 2361-2369.

[38] Holoman T R P, Elberson M A, Cutter L A, et al. Characterization of a defined 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl-ortho-dechlorinating microbial community by comparative sequence analysis of genes coding for 16S rRNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(9): 3359-3367.

[39] Cutter L A, Watts J E M, Sowers K R, et al. Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2,3,5,6-chlorobiphenyl [J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(11): 699-709.

[40] Wu Q, Sowers K R, May H D. Establishment of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating microbial consortium, specific for doubly flanked chlorines, in a defined, sediment-free medium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 49-53.

[41] Wu Q, Watts J E M, Sowers K R, et al. Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(2): 807-812.

[42] May H D, Miller G S, Kjellerup B V, et al. Dehalorespiration with polychlorinated biphenyls by an anaerobic ultramicrobacterium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(7): 2089-2094.

[43] Fennell D E, Nijenhuis I, Wilson S F, et al. *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants [J]. Environmental Science and Technology, 2004, 38(7): 2075-2081.

[44] Adrian L, Dudková V, Demnerová K, et al. “*Dehalococcoides*” sp. strain CBDB1 extensively dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1260 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(13): 4516-4524.

[45] Fagervold S K, Watts J E M, May H D, et al. Sequential reductive dechlorination of meta-chlorinated polychlorinated biphenyl congeners in sediment microcosms by two different *Chloroflexi* phylotypes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8085-8090.

[46] Wang S Q, Chng K R, Wilm A, et al. Genomic characterization of three unique *Dehalococcoides* that respire on persistent polychlorinated biphenyls [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(33): 12103-12108.

[47] Wang S, Chng K R, Chen C, et al. Genomic characterization of *Dehalococcoides mccartyi* strain JNA that reductively dechlorinates tetrachloroethene and polychlorinated biphenyls [J]. Environmental Science and Technology, 2015, 49(24): 14319-14325.

[48] Xu Y, Yu Y, Gregory K, et al. Comprehensive assessment of bacterial communities and analysis of PCB congeners in PCB-contaminated sediment with depth [J]. Journal of Environmental Engineering, 2012, 138(12): 1167-1178.

[49] Kjellerup B V, Sun X, Ghosh U, et al. Site-specific microbial communities in three PCB-impacted sediments are associated with different in situ dechlorinating activities [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(5): 1296-1309.

[50] Duhamel M, Mo K, Edwards E A. Characterization of a highly enriched *dehalococcoides*-containing culture that grows on vinyl chloride and trichloroethene [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5538-5545.

[51] Hölscher T, Krajmalnik-Brown R, Ritalahti K M, et al. Multiple nonidentical reductive-dehalogenase-homologous genes are common in *Dehalococcoides* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5290-5297.

[52] Mcmurdie P J, Behrens S F, Müller J A, et al. Localized plasticity in the streamlined genomes of vinyl chloride respiring *Dehalococcoides* [J]. Plos Genetics, 2009, 5(11).

[53] Matturro B, Di Lenola M, Ubaldi C, et al. First evidence on the occurrence and dynamics of *Dehalococcoides mccartyi* PCB-dechlorinase genes in marine sediment during Aroclor1254 reductive dechlorination [J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 112(1–2): 189-194.

[54] Cho Y C, Oh K H. Effects of sulfate concentration on the anaerobic dechlorination of polychlorinated biphenyls in estuarine sediments [J]. Journal of Microbiology, 2005, 43(2): 166-171.

[55] Morris P J, Mohn W W, Rd J F Q, et al. Establishment of polychlorinated biphenyl-degrading enrichment culture with predominantly meta dechlorination [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(9): 3088-3094.

[56] Rysavy J P, Yan T, Novak P J. Enrichment of anaerobic polychlorinated biphenyl dechlorinators from sediment with iron as a hydrogen source [J]. Water Research, 2005, 39(4): 569-578.

[57] Wei N, Finneran K T. Influence of ferric iron on complete dechlorination of trichloroethylene (TCE) to ethene: Fe(III) reduction does not always inhibit complete dechlorination [J]. Environmental Science and Technology, 2011, 45(17): 7422-7430.

[58] Yan T, Lapara T M, Novak P J. The effect of varying levels of sodium bicarbonate on polychlorinated biphenyl dechlorination in Hudson River sediment cultures [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(7): 1288-1298.

[59] Xu Y. Microbial-catalyzed Reductive Dechlorination of Polychlorinated biphenyl (pcbs) in Hudson and Grasse River sediment – Shifts of microorganisms, PCB tracker pairs and geochemical properties [D]. Carnegie Mellon University,2011.

[60] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.

[61] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.

[62] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.

[63] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.

[64] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-RNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.

[65] Watts J E M, Fagervold S K, May H D, et al. A PCR-based specific assay reveals a population of bacteria within the *Chloroflexi* associated with the reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls [J]. Microbiology, 2005, 151(6): 2039-2046.

[66] He J, Ritalahti K M, Aiello M R, et al. Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* Species [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 996-1003.

[67] Brothersen T. Identification and characterization of polychlorinated biphenyl dechlorinating microorganisms from Lake Hartwell, SC [D]. Clemson University, 2011.

[68] Park J-W, Krumins V, Kjellerup B, et al. The effect of co-substrate activation on indigenous and bioaugmented PCB dechlorinating bacterial communities in sediment microcosms [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2011, 89(6): 2005-2017.

[69] Pakdeesusuk U, Lee C M, Coates J T, et al. Assessment of natural attenuation via in situ reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls in sediments of the Twelve Mile Creek arm of Lake Hartwell, SC [J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39(4): 945-952.

[70] Hughes A S, Vanbriesen J M, Small M J. Impacts of PCB analytical interpretation uncertainties on dechlorination assessment and remedial decisions [J]. Chemosphere, 2015, 133:61-67.

[71] Rhee G Y, Cho Y C, Ostrofsky E B. Microbial degradation of PCBs in contaminated sediments [J]. Remediation Journal, 1999, 10(1): 69-82.

[72] Van Den Berg M, Birnbaum L, Bosveld A T C, et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife [J]. Environmental Health Perspectives, 1998, 106(12): 775-792.

[73] Van Den Berg M, Birnbaum L S, Denison M, et al. The 2005 world health organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds [J]. Toxicological Sciences, 2006, 93(2): 223-241.

[74] Yan X, Gregory K B, Vanbriesen J M. Microbial-catalyzed reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls in the hudson and grasse river sediment microcosms: determination of dechlorination preferences and identification of rare ortho removal pathways [J]. Environmental Science and Technology, 2016, 50:12767−1277

[75] 周亚子, 陈曦, 刘莎, 等. 太湖竺山湾及其主要入湾河流表层沉积物重金属污染及潜在生态风险评估 [J]. 环境化学, 2016, 35(8): 1557-1566.

[76] Bedard D L. A Case Study for Microbial Biodegradation: Anaerobic bacterial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls—From sediment to defined medium [J]. Microbiology, 2008, 62(62): 253-270.

[77] Wang X-J, Yang J, Chen X-P, et al. Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in paddy soil of Hunan, South China [J]. Journal of Soils and Sediments, 2009, 9(6): 568-577.

[78] Balows A, Trüper H G, Dworkin M, et al. The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2nd Edition [M]. 1992.

[79] Sung Y, Fletcher K E, Ritalahti K M, et al. Geobacter lovleyi sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(4): 2775-2782.

[80] Merlino G, Balloi A, Marzorati M, et al. Diverse reductive dehalogenases are associated with Clostridiales-enriched microcosms dechlorinating 1,2-Dichloroethane [J]. Biomed Research International, 2015, 2015(7): 242856.

[81] Straub K L, Kappler A, Schink B. Enrichment and isolation of ferric‐iron‐ and humic‐acid‐reducing bacteria [M]. Methods in Enzymology. Academic Press. 2005: 58-77.

[82] Lonergan D J, Jenter H L, Coates J D, et al. Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(8): 2402-2408.

[83] Krumholz L R. *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1997, 47(4): 1262-1263.

[84] Sung Y, Ritalahti K M, Sanford R A, et al. Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov [M]. Ashgate, 2005.

[85] 杨凯. 水稻土有机质矿化过程中多氯联苯的厌氧生物脱氯研究 [D]; 浙江大学 硕士, 2015.

[86] Matturro B, Ubaldi C, Rossetti S. Microbiome dynamics of a Polychlorobiphenyl (PCB) historically contaminated marine sediment under conditions promoting reductive dechlorination [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(1502).

[87] Mori K, Kim H, Kakegawa T, et al. A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: Thermodesulfobiaceae fam. nov., Thermodesulfobium narugense, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring [J]. Extremophiles Life Under Extreme Conditions, 2003, 7(4): 283-290.

[88] Hug L A, Beiko R G, Rowe A R, et al. Comparative metagenomics of three *Dehalococcoides*-containing enrichment cultures: the role of the non-dechlorinating community [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 327.

[89] Kjellerup B V, Sun X, Ghosh U, et al. Site-specific microbial communities in three PCB-impacted sediments are associated with different in situ dechlorinating activities [J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(5): 1296–1309.

[90] Hori T, Aoyagi T, Itoh H, et al. Isolation of microorganisms involved in reduction of crystalline iron(III) oxides in natural environments [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(386): 1-16.

[91] Wu Q Z, Sowers K R, May H D. Establishment of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating microbial consortium, specific for doubly flanked chlorines, in a defined, sediment-free medium [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(1): 49-53.

[92] Hendrickson E R, Payne J A, Young R M, et al. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from Chloroethene-contaminated sites throughout north America and Europe [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(2): 485-495.

[93] Laroe S L, Fricker A D, Bedard D L. *Dehalococcoides mccartyi* strain JNA in pure culture extensively dechlorinates Aroclor 1260 according to Polychlorinated Biphenyl (PCB) dechlorination Process N [J]. Environmental Science and Technology, 2014, 48(16): 9187-9196.

[94] Sung Y, Ritalahti K M, Apkarian R P, et al. Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene-to-ethene-respiring *Dehalococcoides* isolate [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1980-1987.

[95] Matturro B, Ubaldi C, Grenni P, et al. Polychlorinated biphenyl (PCB) anaerobic degradation in marine sediments: microcosm study and role of autochthonous microbial communities [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(13): 12613-12623.

[96] Hölscher T, Krajmalnikbrown R, Ritalahti K M, et al. Multiple nonidentical reductive-dehalogenase-homologous genes are common in *Dehalococcoides* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5290-5297.

攻读硕士期间发表论文

1、典型多氯联苯在太湖底泥微环境中的脱氯降解研究 [J]. 东南大学学报（自然科学版），终审中（第二作者）.

2、（第二作者）

3、太湖竺山湾及其主要入湾河流表层沉积物重金属污染及潜在生态风险评估 [J]. 环境化学, 2016, 35(8): 1557-1566（第三作者）.