

石油污染土壤自然老化过程中微生物菌群及 功能基因变化规律*

李兴海, 吕杰, 马媛[†], 吕光辉

(新疆大学 资源与环境科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要: 本文旨在揭示新疆准东油田石油污染土壤自然老化过程中微生物菌群结构及芳香烃双加氧酶基因多态性及其变化规律. 采集同一采油区3个不同污染年限土壤样本及背景土, 进行理化指标检测、16S rDNA V4-V5区扩增子测序及芳香烃双加氧酶基因克隆文库构建与分析. 扩增子测序分析结果显示, 采油区不同背景土壤中原核微生物种类具有极大的相似性, 并且污染1年的土壤中微生物种类与背景土微生物种类相似性较大; 污染3年和5年样本间有一定差异, 组内差异较小. 克隆文库共获得46个芳香烃双加氧酶基因OTUs(Operational Taxonomic Units), 其Genbank注册号为KY985598-KY985643, 分为邻苯二甲酸双加氧酶基因、非培养放线菌芳香加氧酶基因、萘双加氧酶基因、多环芳烃双加氧酶基因和苯甲酸双加氧酶基因5个基因类型, 不同石油污染年限的土壤中双加氧酶基因类型会有显著性差异. 对不同污染年限土壤中微生物与环境因子进行相关性分析, 结果显示: 随石油污染年限的延长, 土壤微生物群落结构及丰度呈规律性变化. 准东油田石油污染土壤当中部分种类微生物和功能基因可作为检测石油污染物老化程度的分子标准.

关键词: 石油污染; 多环芳烃; 微生物群落; 功能基因; 双加氧酶

DOI: 10.13568/j.cnki.651094.651316.2020.03.02.0001

中图分类号: Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-7675(2021)04-0472-09

引文格式: 李兴海, 吕杰, 马媛, 等. 石油污染土壤自然老化过程中微生物菌群及功能基因变化规律[J]. 新疆大学学报(自然科学版)(中英文), 2021, 38(4): 472-480.

英文引文格式: LI X H, LYU J, MA Y, et al. Dynamic properties of microbial communities and aromatic dioxygenase gene during oil-contaminated soils natural aging[J]. Journal of Xinjiang University(Natural Science Edition in Chinese and English), 2021, 38(4): 472-480.

Dynamic Properties of Microbial Communities and Aromatic Dioxygenase Gene during Oil-Contaminated Soils Natural Aging

LI Xinghai, LYU Jie, MA Yuan, LYU Guanghui

(School of Resource and Environment Sciences, Xinjiang University, Urumqi Xinjiang 830046, China)

Abstract: This paper aims to investigate the change rule of bacteria and aromatic dioxygenase gene diversity in oil-contaminated soil with different years from Zhundong oilfield, Xinjiang, China. The oil-contaminated and background soils of three different pollution years were collected in the same oil exploring area, and the soil physical and chemical properties were detected. The V4-V5 hypervariable regions of bacterial 16S rRNA gene were amplified and sequenced and the aromatic dioxygenase gene clone library were constructed with the different soil samples. The 16S rRNA gene sequencing results showed that the bacterial community structure and diversity are similarity in different background soils and the bacterial diversity in the soil polluted for 1 year is similar with that in the background soils. There were some differences in bacterial community between the samples of 3 years and 5 years of pollution, but there was little difference within the group respectively. 46 OTUs of aromatic dioxygenase gene were obtained, and the GenBank accession numbers were KY985598-KY985643. After the homologous analysis, the aromatic dioxygenase gene library were divided into five groups, which were phthalate dioxygenase gene, uncultured actinobacterium aromatic oxygenase gene, naphthalene dioxygenase gene, PAH ring-hydroxylating dioxygenase gene and benzoate dioxygenase gene. There were significant differences in the dioxygenase gene types in soils with different oil pollution years. The correlation between microbial community with environmental factors of soils with different pollution years were analyzed. The results showed that the microbial community structure and abundance

* 收稿日期: 2020-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860149; 31360131); 新疆大学大学生创新训练计划项目(201510755170).

作者简介: 李兴海(1992-), 男, 硕士生, 从事环境微生物分析研究, E-mail: 1506814750@qq.com.

[†] 通讯作者: 马媛(1977-), 女, 博士, 副教授, 主要从事微生物生态学的研究, E-mail: 270943143@qq.com.

changed regularly with the increase of pollution years. The paper implied that some microbial species and functional genes can be served as a molecular standard to estimate the degree of aged oil sludge in contaminated soil of Zhundong oilfield.

Key words: oil pollution; polycyclic aromatic hydrocarbon; microbial diversity; functional gene; dioxygenase

0 引言

石油泄漏后会在环境中留下大量有机污染物^[1],其中芳香烃具有稳定的化学性质会持续对生物体造成毒害^[2-4],这种情况会在环境中持续几十年^[5].石油中许多组分如多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAH)卤代联苯和二恶英类等由于其强烈的致癌作用被列为高关注度污染物^[6].Shahi等^[7]检测了石油污染土壤微生物修复过程中微生物及功能基因的变化,结果显示微生物菌群结构和功能基因多态性可以作为土壤修复过程中的监测方法.Han等^[8]采用克隆文库法研究*pdo1*,*nah*和*C12O*三个多环芳烃降解基因在炼焦厂PAH污染土壤中的多态性及相对丰度,结果显示*pdo1*和*nah*基因丰度与PAH含量成正相关,可以作为PAH污染程度的指标物.以往研究表明,石油污染土壤修复过程中微生物菌群结构及PAH降解基因存在变化规律,那么石油污染土壤自然老化过程中是否也存在变化规律有待研究.

微生物降解芳香烃的关键步骤在于苯环结构的氧化开环,这也是芳香烃降解的限速步骤,芳香烃双加氧酶具备氧化开环的重要功能^[9-10].芳香烃双加氧酶隶属于Rieske型非血红素铁加氧酶家族^[11],其 α 亚基具有高度保守结构域^[12-13],因此利用芳香烃双加氧酶 α 亚基的保守域设计通用引物,在环境样本多环芳烃降解功能菌群研究中得到普遍的应用^[14].因此研究石油污染土壤自然老化过程中双加氧酶基因种类及丰度的变化规律,对于评估石油污染土壤老化程度,并制定相应的修复方案具有一定应用价值.但目前针对新疆砂质土壤石油污染自然老化过程中微生物菌群结构及双加氧酶基因的研究鲜有报道.

本文研究区域位于古尔班通古特沙漠腹地,就沙源而论,沙漠现代沉积物主要来自周围山系的各类碎屑及盆地内台原高地的基岩风化剥蚀产物,因此沙漠各区域之间的沙物质矿物组成特征因地而异,但同一区域内沙物质组成却较为相似^[15].因此本文采集同一个采油区域内不同原油污染年限的砂质土壤,采用高通量测序的方法研究不同样本中微生物菌群结构变化规律,并采用克隆文库法分析芳香烃双加氧酶基因多态性,研究原油自然老化过程中微生物菌群及功能基因变化规律.

1 材料与方法

1.1 材料

原油污染土壤样本采自新疆古尔班通古特沙漠准东油田(东经 $88^{\circ}40' \sim 89^{\circ}22'$,北纬 $43^{\circ}40' \sim 44^{\circ}20'$).2015年6月与油田工作人员沟通后,分别采集准东油田1个采油区内的三个不同年限原油污染和背景土壤样本,编号为ZD1(污染5年),ZD2(污染1年),ZD3(污染3年),三个样点污染土壤石油污染后再无污染,三个不同污染年限土壤之间距离超过200 m,背景土壤与污染土壤样本之间距离超过50 m.三个石油污染年限土样编号为ZD1A、ZD2A和ZD3A,相对应的背景土壤编号为ZD1B、ZD2B和ZD3B,每份土样各三份,背景土样作为阴性对照.采样时剥离掉1~2 cm表层土,以去除空气中掉落杂质,采样深度20 cm,无菌聚丙烯样品袋密封,车载冰箱运回实验室,-80 °C冻存备用.

1.2 试剂和仪器

土壤基因组DNA抽提试剂盒(MOBIO, USA),*LA Taq* DNA聚合酶和*rTaq* DNA聚合酶(TaKaRa Bio, 大连宝),pUC18-T vector(生工,上海),DNA凝胶回收试剂盒(Axygen, 杭州),*E.coli* DH5a 感受态细胞(全式金公司,北京),DNA Marker(全式金公司,北京)、其它试剂均为国产分析纯.雷磁PHS-3E pH计(上海仪电,上海),DDS-12a电导仪(上海虹益,上海),TC-412型PCR仪(TECHNE, UK),DYCP-31DN型琼脂糖水平电泳仪(六一,北京),凝胶成像仪(UVP, USA),HiSeq2500测序仪(Illumina, USA).

1.3 试验方法

1.3.1 土壤理化性质分析

石油污染土壤含水率(WC)采用烘干法测定^[16];土壤理化性状酸碱度(pH)、电导率(EC)、全氮(TN)、全碳(TC)、可溶性有机碳(DOC)、全磷(TP)和全硫(TS)指标测定采用常规方法进行测定^[17];含油率(OC)采用比色法测定^[18].

1.3.2 土壤基因组DNA提取和16S V4-V5区扩增子测序分析

按照MO BIO[®] PowerSoil[®] DNA Isolation Kit的说明书进行土壤基因组DNA提取. 提取土壤基因组DNA进行电泳检测, 并利用Nanodrop2000进行质量检测, DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀的值均在1.8~1.9之间. 将土壤DNA委托北京诺禾致源公司进行16S V4-V5区扩增子测序分析, 测序引物为515F:GTGCCAGCMGCCGCGGTAA;926R:CCGYCAATYMTTTRAGTTT^[19], 3个生物学重复.

1.3.3 16S V4-V5区扩增子测序数据分析

16S V4-V5区扩增子测序分析, 使用带Barcode的特异引物对样本进行扩增, 扩增产物经电泳检测及纯化, 使用TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit进行文库构建, 文库经过定量合格后, 使用HiSeq2500 PE250进行测序. 根据Barcode序列拆分各样品数据, 使用FLASH软件^[20]对样本进行拼接, 并使用Qiime1.9.1软件^[21]对拼接数据进行质量控制, 质控后Tags序列使用UCHIME软件去除嵌合体序列^[22], 最终获得有效数据. 利用Uparse v7.0.1001软件^[23]对所有样品有效数据按照97%的一致性进行聚类, 聚类成为OTUs (Operational Taxonomic Units), 筛选出现频数最高的序列作为不同OTU的代表序列. 代表序列采用Mothur软件与SILVA数据库^[24]进行物种注释, 在门、纲、目、科、属水平上统计各个样品的细菌群落组成. 用Qiime1.9.1软件进行多样性分析, R软件绘图. 以获得的原油污染土壤样本细菌16S rRNA扩增子测序数据和土壤理化指标, 采用CANOCO软件进行微生物环境因子分析, 研究石油污染土壤自然老化过程中微生物菌群变化规律.

1.3.4 芳香烃双加氧酶基因克隆文库构建及分析

以巢式引物Nid-for: TCCRMTGCCCDTACCACGG; Nid-rev1/Nid-rev2: GAASGAYARRTTSGGGAACA/GCGSKRKCTTCCAGTTCG进行两轮扩增^[25]. 先以Nid-for和Nid-rev1为引物进行第一轮扩增, 25个循环, 保证PCR扩增产物在指数增长期, 扩增结束后凝胶电泳检测扩增产物. PCR产物稀释50倍后作为模板, 以Nid-for和Nid-rev2为引物进行第二轮扩增, 30个循环, 每个样本平行扩增3次. 混合每个样本的3个PCR反应平行样, 进行凝胶回收, 回收产物与pUC18-T载体进行连接, 转大肠杆菌感受态细胞, 进行蓝/白斑筛选. 每个样本随机挑取96个白斑单菌落进行培养, 提取其质粒DNA, 构建准东油田不同年限石油污染土壤中芳香烃双加氧酶基因片段克隆文库. 阳性克隆委托上海生工生物科技有限公司进行测序分析, 芳香烃双加氧酶基因序列信息提交至GenBank数据库. 将获得的芳香烃双加氧酶基因序列在GenBank中进行同源性比对, 下载标准序列, 使用MEGA7软件以邻接法(Neighbor-Joining)进行聚类分析, 并构建系统发育树^[26].

2 结果与分析

2.1 土壤理化因子测定和分析

土壤理化因子测定结果如表1所示. 由表1可知, 石油污染1年土壤与背景土之间, pH、含水率、全碳和全硫具有显著性差异; 石油污染3年土壤与背景土之间, 电导率、全氮、可溶性有机碳、全硫具有显著性差异; 石油污染5年土壤与背景土之间仅电导率具有显著性差异. 说明石油污染可改变土壤物理性质, 但由于石油含氮化合物较少, 氮含量较低, 因此总氮含量无显著性差异; 由于含硫化物较多, 因此总碳含量和总硫含量有显著性差异. 但石油碳氢化合物并不能溶解在土壤溶液中, 因此可溶性碳含量较低. 石油污染土壤后, 有机污染物并不能直接溶解于土壤当中被微生物所利用, 只能经过降解才能被利用. 在所测8项土壤理化指标中, 石油污染1年, 3年土壤与背景土壤有4项理化指标具有显著性差异, 而石油污染5年土壤与背景土壤仅有1项具有显著性差异, 说明随着污染年限增加, 石油有机污染物不断被微生物降解矿化, 自然老化5年后, 污染土壤理化性质逐渐接近背景土壤.

2.2 不同石油污染年限土壤细菌多样性变化

将不同污染年限土壤样本中的OTUs代表性序列在SILVA数据库中进行比对, 将不同样本中微生物在门、纲、目、科、属5个不同的分类水平进行统计, 共从土壤样品中检测出细菌29门、63纲、113目、218科、383属. 石油污染样本共检测获得29门, 背景土壤检测出21门, 石油污染土壤中所包含细菌门的数量大于背景土壤, 其中在门水平样本丰度前10的如图1(a)所示, 其中放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)占样本91.68%~97.64%, 为3个优势门, 其余门丰度较低. 污染1年和5年土壤与背景土, 放线菌门、变形菌门和厚壁菌门均存在显著性差异; 污染3年土壤与背景土仅厚壁菌门存在显著性差异. 结果显示随油泥自然老化土壤中放线菌门逐渐降低, 而变形菌门和厚壁菌门逐渐增多.

表 1 准东油田土壤理化性状

Tab 1 Soil properties of oil-contaminated and background soil in Zhundong oilfield

样品	酸碱度	含水率	电导率	含油率	全氮	全碳	可溶性有机碳	全磷	全硫
	pH	WC(%)	EC(ms/cm)	OC (mg/g)	TN (g/kg)	TC (g/kg)	DOC (g/kg)	TP (g/kg)	TS (g/kg)
ZD1A	8.46±1.12 ^a	0.57±0.07 ^b	0.17±0.06 ^c	16.24±0.32 ^b	0.19±0.02 ^b	19.00±1.64 ^c	0.03±0 ^b	0.14±0.04 ^b	0.46±0.05 ^{bc}
ZD1B	7.13±0.18 ^{ab}	0.47±0.06 ^b	0.61±0.05 ^b	nd	0.22±0.03 ^b	13.50±1.37 ^{cd}	0.02±0.01 ^b	0.27±0.11 ^{ab}	0.25±0.09 ^c
ZD2A	6.05±0.57 ^b	1.20±0.17 ^a	0.60±0.08 ^b	36.40±3.60 ^a	0.24±0.06 ^b	57.10±9.20 ^a	0.04±0.02 ^b	0.16±0.02 ^b	0.79±0.17 ^b
ZD2B	8.82±0.69 ^a	0.44±0.08 ^b	0.48±0.05 ^b	nd	0.21±0.05 ^b	3.20±0.38 ^d	nd	0.24±0.14 ^{ab}	0.25±0.10 ^c
ZD3A	7.55±0.37 ^{ab}	0.89±0.33 ^{ab}	1.83±0.02 ^a	7.50±0.79 ^c	0.52±0.06 ^a	35.70±3.07 ^b	0.20±0.03 ^a	0.47±0.08 ^a	1.55±0.23 ^a
ZD3B	8.20±0.50 ^a	0.45±0.12 ^b	0.54±0.07 ^b	nd	0.22±0.05 ^b	23.80±4.02 ^{bc}	0.03±0.02 ^b	0.29±0.09 ^{ab}	0.24±0.12 ^{cd}

nd 为未检测到。

此外,石油污染样本共检测获得371属,背景土壤检测出282属,其中污染1年土壤检测获得306属,污染3年252属,污染5年307属,与其对应的背景土分别为244、241和219属,石油污染土壤当中检测获得的属数量均大于背景土. 属水平丰度前10分布如图1(b)所示,结果显示随油泥自然老化红球菌属(*Rhodococcus*)、*Pseudarthrobacter*、考克氏菌属(*Kocuria*)、*Alkanindiges*和芽球菌属(*Blastococcus*)5个属的细菌丰度逐渐降低,而*Parvibaculum*和假诺卡菌属(*Pseudonocardia*)逐渐增多. 石油污染1年土壤当中红球菌属占26.4%,为石油污染物降解主要菌群,随着石油的自然老化,石油有机污染物含量变化,导致降解污染物微生物菌群发生了变化。

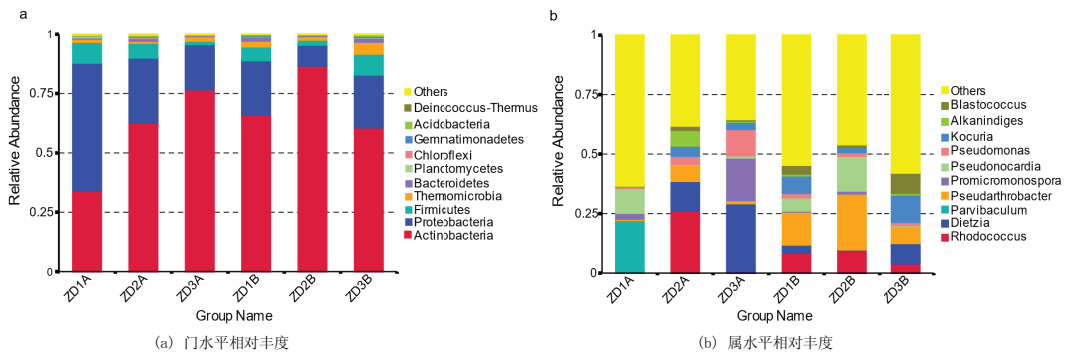


图 1 准东油田不同年限石油污染土壤和背景土壤中细菌门和属水平相对丰度

Fig 1 Relative abundance of soil bacterial community at the phylum and genus levels in oil-contaminated and background soils with three different pollution years of Zhundong oilfield

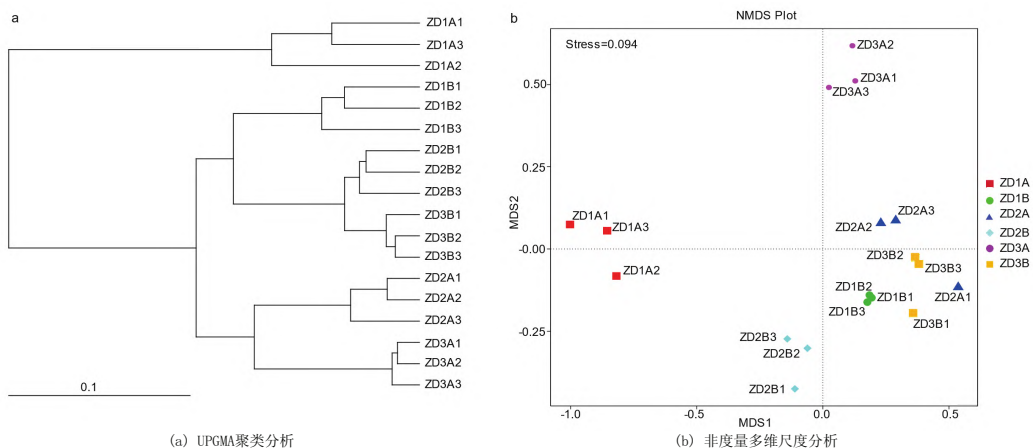


图 2 准东油田不同年限石油污染土壤和背景土壤中微生物种类UPGMA聚类和非度量多维尺度分析

Fig 2 UPGMA cluster and NMDS analysis of bacterial community at OTU levels in oil-contaminated and background soils with three different pollution years of Zhundong oilfield

对石油污染土壤和背景土壤中物种注释结果和OTUs的丰度信息基于Weighted Unifrac距离矩阵进行UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean) (图2(a)) 聚类分析和无度量多维标定法(Non-Metric Multi-Dimensional Scaling, NMDS) (图2(b)) 统计分析, 分析结果如图2所示, 展示不同石油污染土壤和背景土壤中原核微生物种类在组间和组内差异. 准东油田同一采油区不同背景土壤中原核微生物种类具有较大的相似性, 并且石油污染1年土壤中的微生物种类因为污染时间较短, 跟背景土壤中微生物种类具有较大相似性. 随着污染年限的延长, 微生物群落结构发生变化, 但有别于背景土壤, 且污染3年和5年样本间有一定差异, 但组内差异较小.

2.3 芳香烃双加氧酶基因系统发育分析

芳香烃双加氧酶基因克隆文库测序结果与NCBI核酸数据库进行BLAST同源性比对, 去除嵌合子片段后, 最终基因片段46条, 基因登陆号: KY985598-KY985643. BLAST同源性比对选取相似性较高的序列作为标准序列, 利用MEGA 7软件采用邻接法聚类分析构建系统发育树(图3).

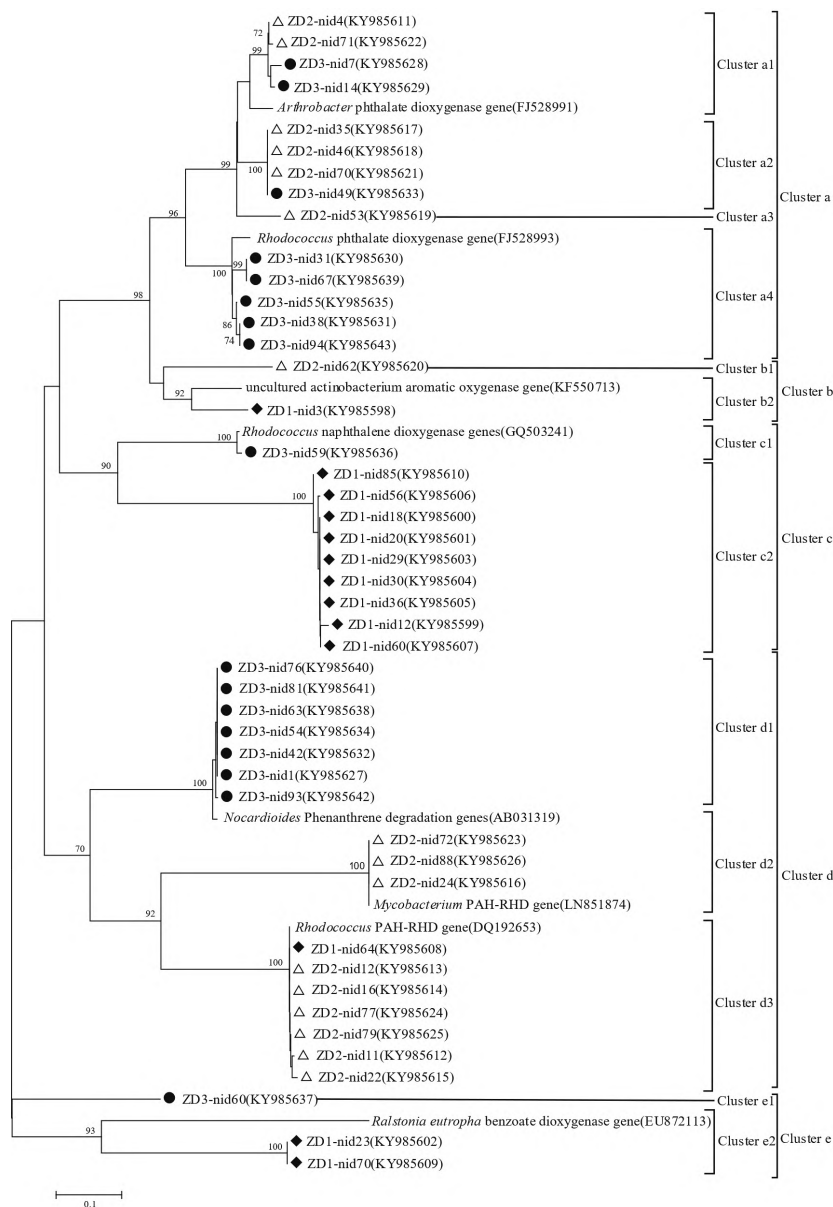


图 3 准东油田不同年限石油污染土壤中芳香烃双加氧酶基因系统发育分析

Fig 3 Phylogenetic analysis of aromatic dioxygenase gene fragments in oil-contaminated and background soils with three different pollution years

聚类结果显示,准东油田石油污染土壤中获得芳香烃双加氧酶基因,聚类成5个类群,在图中标注为Cluster a、Cluster b、Cluster c、Cluster d和Cluster e,分别对应5个芳香烃双加氧酶基因类别,为邻苯二甲酸双加氧酶基因、芳香加氧酶基因、萘双加氧酶基因、多环芳烃双加氧酶基因和苯甲酸双加氧酶基因.此外Cluster a分为4个小类群,彼此间序列相似度小于90%;Cluster b分为2个小类群,彼此间序列相似度为80%;Cluster c分为2个小类群,彼此间序列相似度为71%;Cluster d分为3个小类群,彼此间序列相似度小于70%;Cluster e分为2个小类群,彼此间序列相似度为57%.从聚类结果可以看出每一类基因当中不同的小类群会按照污染年限聚类在一起,表明不同类型基因在不同污染年限土壤当中碱基序列存在差异.

将不同石油污染土壤样本所获基因类型,基因类型OTU数,编码蛋白质序列数以及所占比例进行统计(表2).结果所示ZD2A(1 a)样本占比最大的为多环芳烃双加氧酶基因(56.25%),ZD3A(3 a)样本占比最大的为邻苯二甲酸双加氧酶基因(47.06%),ZD1A(5 a)样本占比最大的为萘双加氧酶基因(69.24%).PAH-RHD基因随着时间推移,比例逐年减少;萘双加氧酶基因在3 a时出现,随污染时间增加比例增大.ZD2A(1 a)和ZD3A(3 a)样本中,PAH-RHD基因和邻苯二甲酸双加氧酶基因占据绝对优势,二者共占据85%以上的OTUs.当时间达5 a之久苯甲酸双加氧酶基因和萘双加氧酶基因大量出现,共占据80%以上的OTUs.说明随着污染年限的延长,多环芳烃降解的功能基因在不同污染年限土壤样本中的相对丰度会发生相应的变化,显示了微生物群体功能随石油自然老化成分改变的变化趋势.

表 2 准东油田不同年限石油污染土壤中所含芳香烃双加氧酶基因类型

Tab 2 The aromatic dioxygenase gene types of oil-contaminated and background soils with three different

样点	污染年限	基因类型	OUT数	氨基酸序列的数量	百分比
ZD2A	1 a	多环芳烃双加氧酶基因 (PAH-RHD gene)	9	8	56.25%
		邻苯二甲酸双加氧酶基因 (Phthalate dioxygenase gene)	6	6	37.50%
		芳香加氧酶基因 (Aromatic oxygenase gene)	1	1	6.25%
ZD3A	3 a	邻苯二甲酸双加氧酶基因 (Phthalate dioxygenase gene)	8	8	47.06%
		多环芳烃双加氧酶基因 (PAH-RHD gene)	7	6	41.18%
		萘双加氧酶基因 (Naphthalene dioxygenase gene)	1	1	5.88%
		苯甲酸双加氧酶基因 (Benzoate dioxygenase gene)	1	1	5.88%
ZD1A	5 a	萘双加氧酶基因 (Naphthalene dioxygenase gene)	9	9	69.24%
		苯甲酸双加氧酶基因 (Benzoate dioxygenase gene)	2	2	15.38%
		芳香加氧酶基因 (Aromatic oxygenase gene)	1	1	7.69%
		多环芳烃双加氧酶基因 (PAH-RHD gene)	1	1	7.69%

2.4 微生物环境因子分析

将石油污染土壤和背景土中微生物群落前10门和前10属与土壤理化因子进行冗余分析,从图4可知,土壤WC、TC和OC是污染三年土壤ZD3A微生物群落组成的主要影响因子,TS、EC、TN、TP和DOC是ZD2B微生物群落组成的主要影响因子.从图4(b)可得考克氏菌属、芽球菌属、*Alkanindiges*、红球菌属和*Pseudarthrobacter*为污染1年土样ZD2A微生物菌群优势属,迪茨氏菌属(*Dietzia*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)为污染3年土样ZD3A微生物菌群优势属,*Parvibaculum*和假诺卡菌属为污染5年土样ZD1A微生物菌群优势属.分析结果表明随着石油污染的自然老化,石油污染土壤中微生物菌群结构会随底物谱变化而发生规律性的变化.

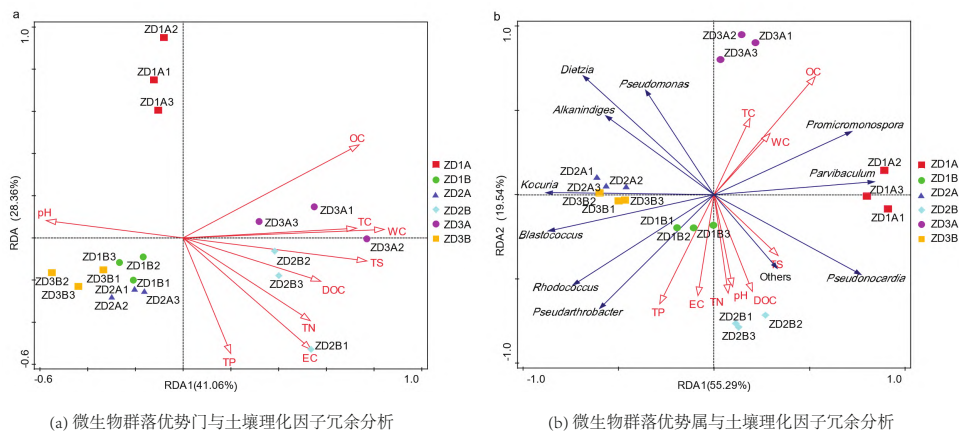


图 4 准东油田不同年限石油污染土壤和背景土壤中微生物群落优势门及属与土壤理化因子冗余分析

Fig 4 Redundancy analysis to show correlation between soil properties and dominant bacterial phyla and genera of oil-contaminated and background soils with three different pollution years of Zhundong oilfield

3 结论

原油渗漏至土壤会改变土壤物理结构及化学性质,并在自然老化过程中改变土壤微生物菌群结构,通过分析污染土壤自然老化过程中微生物菌群结构及功能基因得出如下结论.

3.1 石油污染年限与微生物多样性

对不同石油污染年限土壤样本16S V4-V5区扩增子测序分析,菌群结构结果显示随石油自然老化,原核微生物种类会发生规律性的变化.在属水平上,污染1年土壤中的红球菌属和 *Alkanindiges*,污染3年土壤中的迪茨氏菌属和假单胞菌属,污染5年土壤中的 *Parvibaculum* 与其它石油污染和背景土壤样本中该属微生物丰度均存在显著性差异,可以作为石油自然老化年限的指标性微生物.杨智等人^[27]分离玉门油田污染荒漠土壤石油降解菌时,红球菌为优势属.蔡萍萍等人^[28]开展采油井场土壤微生物群落结构分布研究时揭示 *Alkanindiges* 为石油污染的指示菌株.该两项研究证明落地石油自然老化过程土壤微生物会发生规律性变化,但未说明指示菌株与石油自然老化年限之间的相关性.对石油污染土壤和背景土壤中微生物物种信息进行无量多维标定分析,结果显示背景土微生物种类具有极大相似性,并且污染1年的土壤中微生物种类与背景土也较为相似,污染3年和5年的土壤微生物种类都和背景土具有显著的差异,揭示石油污染土壤中微生物群落会随着时间推移而发生变化.因此可以推断随着污染年限的延长,有机污染物组分发生改变,微生物为了适应底物谱的变化群落结构也随之发生改变,也证明石油降解菌并非有很广的底物谱.此外原油渗漏后所含烃类能给微生物提供充足碳源,砂质土壤中原核微生物多样性往往大于背景土壤^[29].

3.2 石油污染年限与功能基因种类

选择 *nid* 基因通用引物^[30],该引物可以扩增除 *nid* 基因外其它类型的双加氧酶基因片段,具有较高的简并性.采用该引物组扩增出不同污染年限砂质土壤中萘双加氧酶基因、邻苯二甲酸双加氧酶基因、芳香烃加氧酶基因、PAH-RHD基因和苯甲酸双加氧酶基因5类不同的基因,本研究所获多个双加氧酶基因与国内外其它研究所获双加氧酶基因具有较高的相似性,并且多来源于红球菌属 (*Rhodococcus*) 微生物,比对结果如基因 FJ528993^[31], AB031319^[32] 和 DQ192653^[25].并且每个样点所获双加氧酶 OTUs 能很好地进行聚类,表明随着污染年限的延长,功能基因类型也随之发生变化.石油污染1年的土壤中多环芳烃双加氧酶基因和邻苯二甲酸双加氧酶基因在克隆文库中丰度较高,而污染5年的土壤中苯甲酸双加氧酶基因丰度较高.依照实验结果进行推测,说明石油污染土壤后,由于所含多环芳烃对微生物胁迫作用,环境微生物迅速反应将其降解,以缓解环境胁迫.多环芳烃双加氧酶为多环芳烃开环降解关键步骤酶分子,邻苯二甲酸双加氧酶则为芴、菲、蒽和芘多环芳烃降解代谢途径关键节点,两个酶丰度较高,说明大量多环芳烃分子被开环降解,产生小分子的代谢产物进入相应的代谢途径.随污染时间延长多环芳烃双加氧酶基因相对丰度减小,苯甲酸双加氧酶基因丰度升高,说明石油经过土壤微生物降解成分发生了相应的改变,多环芳烃被降解产生的小分子物质通过苯甲酸代谢途径继续进行降解,最

终进入三羧酸循环生成能量、 H_2O 和 CO_2 或参与微生物其它物质的合成. 实验结果与Bacosa^[33]等人研究墨西哥湾石油污染海底沉积物中石油降解规律有相类似的研究结论,多环芳烃类物质在石油污染30天内迅速被代谢.

本文开展的新疆准东油田石油污染砂质土壤自然老化过程中微生物群落结构及功能基因变化研究,实验结果显示微生物群落结构及功能基因会随着石油老化发生变化. 推测为石油自然老化大分子有机污染物降解为小分子物质,成分发生变化,不同微生物群落会响应外界环境因子变化,从而更好的利用不同碳源物质进行增殖. 因此在石油自然老化过程中微生物菌群结构和功能基因均会发生规律性变化. 结果显示微生物群落和石油污染物降解功能基因可以作为石油自然修复程度指标.

参考文献:

- [1] 任磊, 黄廷林. 土壤的石油污染[J]. 农业环境保护, 2000, 19(6): 360-363.
REN L, HUANG T L. Contamination of petroleum[J]. Agro-environmental Protection, 2000, 19(6): 360-363. (in Chinese)
- [2] RAVELET C, GROSSET C, MONTUELLE B, et al. Liquid chromatography study of pyrene degradation by two micromycetes in a freshwater sediment[J]. Chemosphere, 2001, 44(7): 1541-1546.
- [3] 朱林海, 丁金枝, 王健健, 等. 石油污染对土壤-植物系统的生态效应[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(2): 320-330.
ZHU L H, DING J Z, WANG J J, et al. Ecological effects of oil pollution on soil-plant system[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(2): 320-330. (in Chinese)
- [4] 刘薇薇, 塔娜, 赵星华, 等. 我国环境中多环芳烃的健康风险评估进展[J]. 环境与健康杂志, 2014, 31(12): 1104-1108.
LIU W W, TA N, ZHAO X H, et al. Research progress on health risk assessments of PAHs in China[J]. Journal of Environment and Health, 2014, 31(12): 1104-1108. (in Chinese)
- [5] LI H, BOUFADEL M C. Long-term persistence of oil from the Exxon Valdez spill in two-layer beaches[J]. Nature Geoscience, 2010, 3(2): 96-99.
- [6] FIELD J A, SIERRA-ALVAREZ R. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls[J]. Environmental Pollution, 2008, 155(1): 1-12.
- [7] SHAHI A, AYDIN S, INCE B, et al. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 125: 153-160.
- [8] HAN X M, LIU Y R, ZHENG Y M, et al. Response of bacterial pdo1, nah, and C12O genes to aged soil PAH pollution in a coke factory area[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21: 9754-9763.
- [9] 于寒颖, 杨慧. 石油降解酶及其基因的结构、功能和表达调控[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(6): 1066-1074.
YU H Y, YANG H. Structure, Function and expression regulation of hydrocarbon-degrading enzymes and their encoding genes[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(6): 1066-1074. (in Chinese)
- [10] 许炳雯, 李诗阳, 张强, 等. 细菌芳烃外二醇双加氧酶研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(5): 873-879.
XU B W, LI S Y, ZHANG Q, et al. Advance in research on bacterial aromatic extradiol dioxygenase[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(5): 873-879. (in Chinese)
- [11] GIBSON D T, PARALES R E. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2000, 11(3): 236-243.
- [12] ABU-OMAR M M, LOAIZA A, HONTZEAS N. Reaction mechanisms of mononuclear non-heme iron oxygenases[J]. Chemical Reviews, 2005, 105(6): 2227-2252.
- [13] 章俭, 夏春谷. 芳香烃双加氧酶的结构与功能研究[J]. 化学进展, 2004, 16(1): 116-122.
ZHANG J, XIA C G. Studies of structure and function of aromatic hydrocarbon dioxygenases[J]. Progress in Chemistry, 2004, 16(1): 116-122. (in Chinese)
- [14] LIANG Y T, ZHANG X, WANG J, et al. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 241-242: 371-378.
- [15] 朱秉启, 于静洁, 秦晓光, 等. 新疆地区沙漠形成与演化的古环境证据[J]. 地理学报, 2013, 68(5): 661-679.
ZHU B Q, YU J J, QIN X G, et al. Formation an evolution of sandy deserts in Xinjiang: the paleo-environmental evidences[J]. Acta Geographica Sinica, 2013, 68(5): 661-679. (in Chinese)
- [16] 陈伟胜, 童玲, 唐国斌. 石油污染土壤含水率的测定[J]. 华北水利水电学院学报, 2012, 33(4): 93-96.
CHEN W S, TONG L, TANG G B. Determination of water content of the oil-contaminated soil[J]. Journal of North China University of Water Resources and Electric Power, 2012, 33(4): 93-96. (in Chinese)

- [17] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
LU R K. Analytical methods for soil and agricultural chemistry[M]. Beijing: China Agricultural Science Press, 2000. (in Chinese)
- [18] 孙玉萍, 刘素辉, 徐晓燕, 等. 新疆不同石油产区油污土壤含油量的测定[J]. 疾病预防控制中心通报, 2011, 26(2): 8-10.
SUN Y P, LIU S H, XU X Y, et al. Determination of mineral oil content in soil in different oildom of Xinjiang[J]. Bulletin of Disease Control and Prevention, 2011, 26(2): 8-10. (in Chinese)
- [19] QUINCE C, LANZEN A, DAVENPOR R J, et al. Removing noise from pyrosequenced amplicons[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 38.
- [20] MAGOČ T, SALZBERG S L. Flash: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [21] 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.
- [22] HAAS N J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. Genome Research, 2011, 21: 494-504.
- [23] EDGAR R C. Uparse: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10: 996-998.
- [24] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [25] ZHOU H W, GUO C L, WONG Y S, et al. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 262: 148-157.
- [26] SUDHIR K, GLEN S, KOICHIRO T. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [27] 杨智, 陈吉祥, 周永涛, 等. 玉门油田污染荒漠土壤石油降解菌多样性[J]. 环境科学研究, 2017, 30(5): 799-808.
YANG Z, CHEN J X, ZHOU Y T, et al. Diversity of oil-degrading bacteria isolated from oil-contaminated desert soil of Yumen oilfield[J]. Research of Environmental Sciences, 2017, 30(5): 799-808. (in Chinese)
- [28] 蔡萍萍, 宁卓, 何泽, 等. 采油井场土壤微生物群落结构分布[J]. 环境科学, 2018, 38(7): 3329-3338.
CAI P P, NING Z, HE Z, et al. Microbial community distributions in soils of an oil exploitation site[J]. Environmental Science, 2018, 38(7): 3329-3338. (in Chinese)
- [29] 谭银萍, 马媛, 吕杰. 石油污染对土壤细菌结构特征的影响[J]. 生物技术, 2016, 26(2): 193-198.
TAN Y P, MA Y, LYU J. Effect of oil pollution on soil bacteria structure characteristics[J]. Biotechnology, 2016, 26(2): 193-198. (in Chinese)
- [30] IWAI S, JOHNSON T A, CHAI B, et al. Comparison of the specificities and efficacies of primers for aromatic dioxygenase gene analysis of environmental samples[J]. Applied Environmental Microbiology, 2011, 77(11): 3551-3557.
- [31] JIN D C, LIANG R X, DAI Q Y, et al. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by Rhodococcus sp. JDC-11 and molecular detection of 3,4-phthalate dioxygenase gene[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(10): 1440-1445.
- [32] SAITO A, IWABUCHI T, HARAYAMA S. A novel phenanthrene dioxygenase from Nocardioides sp. strain KP7: expression in Escherichia coli[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(8): 2134-2141.
- [33] BACOSA H P, ERDNER D L, ROSENHEIM B E, et al. Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to light Louisiana sweet crude oil[J]. The ISME Journal, 2018, 12: 2532-2543.

责任编辑: 赵新科