

研究报告

Research Report

石油污染土壤强化修复前后细菌多样性变化研究

孔令姣¹ 陈吉祥^{1*} 杨智¹ 李彦林¹ 王永刚² 周永涛³ 张彦³

1 兰州理工大学石油化工学院, 兰州, 730050; 2 兰州理工大学能源与动力工程学院, 兰州, 730050; 3 中石油北京天然气管道有限公司, 北京, 100101

* 通讯作者, betcen@163.com

摘要 采用高通量测序技术, 对石油污染土壤及石油降解菌强化修复土壤的细菌群落多样性进行了分析。发现污染前后各组间在门水平和属水平上变化显著, 污染前细菌多样性丰富, 包括 34 门 675 属, 主要优势菌群依次为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)等。优势菌属依次为芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)等。石油污染 110 d 后土壤细菌类群多样性降低, 分布在 29 门 507 属, 细菌优势门变化不显著等, 优势菌属依次为鞘氨醇单胞菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、GP6、芽单胞菌属、GP4、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)和类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)。添加铜绿假单胞菌 1217、红平红球菌 KB1 和混合菌剂的三个强化修复组细菌分别分布在 31 门 471 属、32 门 474 属和 29 门 473 属, 在细菌组成上差异不显著, 在丰度上差异显著。鞘氨醇单胞菌属、假单胞菌属、芽单胞菌属和类诺卡氏菌属细菌是主要的石油污染物降解菌。

关键词 石油污染土壤, 高通量测序, 细菌群落多样性

Research on the Change of Bacteria Diversity before and after Strengthened Repair of the Petroleum Contaminated Soil

Kong Lingjiao¹ Chen Jixiang^{1*} Yang Zhi¹ Li Yanlin¹ Wang Yonggang² Zhou Yongtao³ Zhang Yan³

1 School of Petrochemical Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, 730050; 2 College of Energy and Power Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, 730050; 3 Petro China Beijing Gas Pipeline Co. Ltd., Beijing, 100101

* Corresponding author, betcen@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.037.003426

Abstract Bacterial community diversity of the petroleum contaminated soils and soils with strengthened repair by petroleum degrading bacteria were analyzed by high-throughput sequencing technology. Results showed that there were significant changes in phylum level and genus level among the different groups before and after pollution. The bacteria diversity of the non-contaminated soil samples was rich, including 34 phyla and 675 genera. The dominant bacteria belonged to Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes and Gemmatimonadetes etc., respectively, at phylum level, and the dominant genera were *Gemmatimonas*, *Sphingomonas* and *Arthrobacter* etc., respectively. Bacterial diversity decreased significantly with the pollution of the oil after 110 days. Bacteria distributed in 29 phyla and 507 genera. The dominant phyla did not change significantly, but the dominant genera were *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, GP6, *Gemmatimonas*, GP4, *Exiguobacterium*, *Stenotrophomonas*

基金项目: 本研究由国家自然科学基金(NO. 31272694)和中国石油天然气股份有限公司天然气与管道分公司科研项目(2014D-4610-0501)共同资助

引用格式: Kong L.J., Chen J.X., Yang Z., Li Y.L., Wang Y.G., Zhou Y.T., and Zhang Y., 2018, Research on the change of bacteria diversity before and after strengthened repair of the petroleum contaminated soil, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 37(8): 3426-3433 (孔令姣, 陈吉祥, 杨智, 李彦林, 王永刚, 周永涛, 张彦, 2018, 石油污染土壤强化修复前后细菌多样性变化研究, *基因组学与应用生物学*, 37(8): 3426-3433)

and *Nocardioides*, respectively. Three strengthened repair groups as *P. aeruginosa* 1217, *R. erythropolis* KB1 and the mixture inoculants distributed in the 31 phyla 471 genera, 32 phyla 474 genera, and 29 phyla 473 genera, respectively. The difference of the constitution was not significant, but that of the bacteria abundance was significant. The dominated oil-degradation bacteria belonged to the *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Gemmatimonas* and *Nocardioides*.

Keywords Petroleum contaminated soil, High throughput sequencing, Bacteria community diversity

在石油生产、运输、使用过程中,由于石油泄漏造成的环境污染问题日益严重(Assadi et al., 2014),石油污染土壤修复治理困难,已成为不可忽视的环境问题(唐景春等,2015)。土壤中微生物的可培养率仍然只有 0.1%~1% (Pace et al., 1997; Macnaughton et al., 1999; Singh et al., 2008),在很大程度上难以客观评价微生物群落信息,因此非培养技术已经被广泛应用于土壤微生物群落结构多样性的研究中,例如直接提取石油污染土壤中微生物信息能够真实反映石油污染环境微生物的存在状态(Hart et al., 2004)。

自然状态下,土壤微生物群落结构保持着较高的稳定性。土壤被石油烃污染后,会使微生物群落结构发生改变,成为适应污染土壤环境的优势菌群(李玉瑛等, 2006; Cunliffe et al., 2006; Coppotelli et al., 2008)。已有研究表明,石油污染将降低土壤微生物的多样性,使微生物群落结构发生变化(Lindstrom et al., 1999; Cheung et al., 2001)。刘五星等(2007)根据微生物群落结构和物种多样性的变化情况对南京周边石油污染土壤的生态风险进行了评价。

陈丽华等(2012)在模拟自然条件下生物降解陇东黄土中的石油类污染物发现石油降解率随添加量呈下降趋势,说明石油污染浓度过大会抑制微生物的自然降解速率。土壤石油污染与微生物群落结构的关系已成为微生物群落分布方面关注的重点(李玉瑛等, 2006; 卞立红等, 2016)。因此本研究通过高通量测序(杜爽等, 2013)研究了石油污染土壤在自然修复及生物强化修复过程中不同时间段微生物群落多样性变化,探讨石油污染与土壤微生物群落结构的关系,为今后开展石油污染区域修复研究具有理论和实际指导意义。

1 结果与分析

1.1 Shannon 指数

以各处理组样本总 DNA PCR 产物扩增测序结果序列数为横坐标,绘制 Shannon 指数和各样本的相关性曲线(图 1),样品 1 的 Shannon 指数最大,由于室内培养使得土壤生长条件无法完全同于外界环

境,所以空白对照的干净土样群落多样性随着外界环境条件如温度、湿度等的变化而降低,但无论是污染初期、石油污染土壤间隔 40 d 还是加菌强化修复间隔 70 d 后,无污染土样的 Shannon 指数均大于石油污染土样,说明石油污染会降低土壤微生物的多样性。同时可以看出,添加菌剂后,样品 10、11、12 的 Shannon 指数低于样品 8、9,可能是石油污染胁迫下出现的适应石油污染环境的新菌群随着土壤中石油烃类物质含量的降低而逐渐减少,进而使修复后的土样微生物群落多样性降低。

1.2 微生物群落在各分类水平上的比较

通过高通量测序分析(表 1),可以得出 12 个样

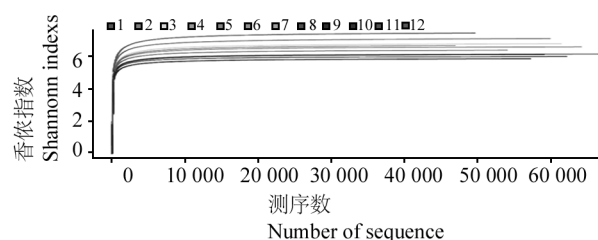


图 1 Shannon 指数稀疏曲线

Figure 1 Shannon-Wiener curve

表 1 细菌群落在各分类水平上的比较

Table 1 Comparison of Bacteria communities at each classification level

编号 No.	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
1	34	70	90	192	657
2	34	69	90	189	501
3	30	68	90	192	559
4	32	67	87	190	541
5	29	66	83	175	504
6	29	64	84	174	498
7	31	70	90	180	556
8	29	63	88	178	507
9	29	63	86	177	501
10	31	62	84	179	471
11	32	63	90	181	474
12	29	60	82	180	473

品中土样细菌的门、属、纲、目、科,在石油污染初期,样品 1 微生物组成有 34 门、657 属、70 纲、90 目、192 科,而样品 2 有 34 门、501 属、69 纲、90 目、182 科,数据表明石油污染会使土壤在属水平有较大变化。

在石油污染间隔 40 d 后,样品 3、4 微生物在属组成分别有 559、541,而样品 5、6 的石油污染土壤分别有 504、498,进一步说明石油烃对土壤微生物危害较大,土壤中的石油含量较高会抑制土壤微生物的生长,石油污染会使土壤微生物群落多样性降低。

加菌强化修复 70 d 后,样品 7 有 556 属,样品 8、9 的石油污染未加菌修复的土壤中分别有 507 属、501 属,而添加菌剂修复的样品 10、11、12 分别有 471 属、474 属、473 属。引起这种变化的主要原因是随着石油降解菌剂的加入,部分石油污染物会被石油降解菌代谢利用,土壤中的石油污染物含量降低,对土壤中细菌的毒害作用减弱,在属水平上细菌的多样性相对维持在一个水平上,差异性不显著。

1.3 基于 OTU 丰度的样本聚类分析

基于 OUT 丰度对 12 个样品进行的聚类分析(图 2),样品 5、6 及号 8、9 均为不同时间段的石油污染土样,所以比较靠近。样品 3、4 及 7 细菌群落组成相近。

通过对比样品 10、11、12 与样品 1、2,发现加入菌剂修复后,土壤中细菌的生长较好,加修复菌剂样品微生物多样性较高。加入了混合菌剂修复的样品 11 与 1、2 的土样微生物组成最为接近,说明混合菌剂修复石油污染土壤的效果比单一菌剂效果要好。

1.4 细菌群落在门水平的组成

根据所有样品细菌群落在门水平上的组成(图 3),通过对丰度最高的 10 个门比较可知,样品 1 的主要优势菌群为变形菌门(*Proteobacteria*) 38.86%、放线菌

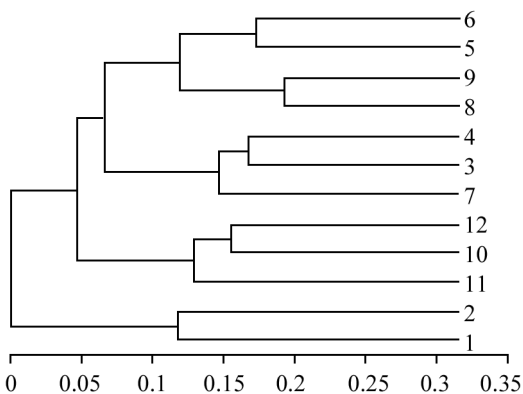


图 2 基于 OTU 的样本聚类树

Figure 2 Sample clustering tree based on OTU

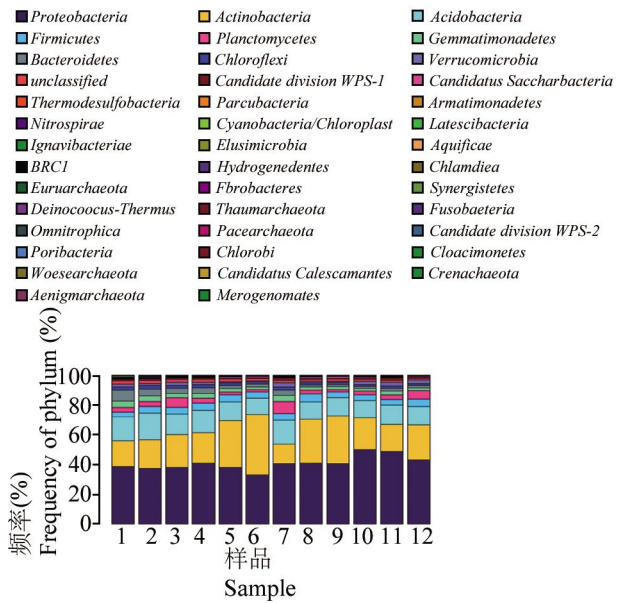


图 3 门水平所有样本细菌群落结构分布

Figure 3 Bacteria community structure distribution of all samples at phylum level

门(*Actinobacteria*) 17.21%、酸杆菌门(*Acidobacteria*) 15.93%、拟杆菌门(*Bacteroidetes*) 7.36%、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*) 4.20%、浮霉菌门(*Planctomycetes*) 3.36%、厚壁菌门(*Firmicutes*) 3.12%、绿弯菌门(*Chloroflexi*) 2.21%、疣微菌门(*Verrucomicrobia*) 1.99%、Candidate division WPS-1 (0.77%)。在石油污染土样初期,样品 2 土壤中的优势菌群种类没有太大变化,只是变形菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门、疣微菌门、Candidate division WPS-1 丰度均降低,而放线菌门、酸杆菌门、厚壁菌门丰度有少量增加。

在人工石油污染土壤 40 d 后的样品 3、4 与样品 1 的优势菌群在门水平上种类相同。石油污染对照土样中的优势菌群发生了变化,样品 5、6 中的变形菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、浮霉菌门及绿弯菌门丰度较低,放线菌门丰度增加到 30%~40%,且优势菌群中出现了 *Candiatius saccharbacteria*, 丰度为 1% 左右。加菌修复 70 d 后,样品 7 的优势菌群为变形菌门 (40.52%)、放线菌门(13.30%)、酸杆菌门(16.05%)、拟杆菌门(3.59%)、芽单胞菌门(4.21%)、浮霉菌门(7.91%)、厚壁菌门(4.60%)、绿弯菌门(2.08%)、疣微菌门(2.68%)、Candidate division WPS-1 (1.43%)。

而样品 8、9 的石油污染不加菌修复组土壤中放线菌门丰度最高,约为 30%,而酸杆菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门、浮霉菌门、疣微菌门及 Candidate division WPS-1 丰度明显降低,同时优势菌群中也出现了 *Candiatius saccharbacteria*。通过对样品 5、6 与 3、4 微

生物群落进行分析, 结合样品 7、8、9 菌落多样性的分析, 说明石油污染土壤会影响土壤微生物群落变化, 使土壤中放线菌门丰度增加, 同时 *Candidatus saccharibacteria* 成为优势菌门。

通过对加菌修复样品 10、11、12 细菌群落属水平上的分析可知, 优势菌群与样品 7 相同。虽然样品 7 中变形杆菌门丰度较高, 但放线菌门丰度降低, 样品 11 中放线菌门丰度最低为 18.14%, 疣微菌门以及其它菌门丰度与样品 7 最为接近。样品 10 与 12 群落组成多样性相似, 优势菌群中各菌门丰度相差不大。

1.5 细菌群落在属水平的分析

从属水平上的分析结果可知(图 4), 石油污染土壤初期, 通过对丰度最高的 8 个属比较可知, 样品 1 的细菌优势菌属为 GP6 (7.29%)、芽单胞菌属(*Gemmatimonas*) 4.20%、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*) 3.61%、节杆菌属(*Arthrobacter*) 2.32%、GP4 (2.13%)、*Aridibacter* (1.52%)、斯科曼氏球菌属(*Skermanella*) 1.44%、*Povalibacter* (1.28%)。而样品 2 中优势菌属变为 GP6 (9.38%)、假单胞菌属(4.18%)、芽单胞菌属(3.86%)、鞘氨醇单胞菌属(3.63%)、节杆菌属(2.97%)、GP4 (2.03%)、类诺卡氏菌属(*Nocardioidea*) 1.94%、诺卡氏菌属(*Nocardia*) 1.75%。类诺卡氏菌属及诺卡氏菌属均是石油污染胁迫下适应性较好的菌属, 类诺

卡氏菌可被用来降解石油烃类污染物, 且降解效果较好, 而诺卡氏菌可用来降解对苯二甲酸。说明石油污染使土壤微生物群落多样性发生变化, 出现适应石油污染环境的新优势菌属。

人工石油污染土壤 40 d 后, 样品 4 中优势菌属为鞘氨醇单胞菌属(8.49%)、假单胞菌属(6.96%)、GP6 (5.78%)、芽单胞菌属(3.03%)、类诺卡氏菌属(2.98%)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*) 2.33%、GP16 (2.21%)、酸土单胞菌属(*Aciditerrimonas*) 2.06%。与样品 5、6 进行对比发现, 石油污染土壤后土著细菌丰度降低, 而适应石油污染环境较好的类诺卡氏均属和诺卡氏菌属丰度大量增加, 且出现了新的优势菌属, 如溶杆菌属。

添加菌剂强化修复石油污染土壤 70 d 后, 样品 7 中的优势菌属为鞘氨醇单胞菌属(9.02%)、假单胞菌属(3.18%)、GP6 (6.25%)、芽单胞菌属(4.21%)、假单胞菌属(3.18%)、微小杆菌属(2.58%)、*Pirellula* (2.45%)、GP4 (2.34%), 而样品 8、9 中优势菌属中类诺卡氏菌属丰度较高, 且假单胞菌属、*Iamia*、*aquihabitans*、气微菌属(*Aeromicrobium*)丰度明显增加, 而 GP6、芽单胞菌属、*Pirellula*、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)与样品 7 相比, 丰度明显降低。

石油污染胁迫环境的类诺卡氏菌属在样品 10、11、12 的土壤中丰度较低, 同时在污染土样中长势较好的假单胞菌属、*Aquihabitans*、气微菌属在样品 10、11 及 12 土样中丰度也较低, 表明由于适应石油污染土壤环境的细菌菌属随着土壤中石油含量的降低而减少, 使得加菌强化修复石油污染土壤后的土壤微生物在属水平上群落多样性降低, 香农指数也降低。样品 11 土中优势菌属为鞘氨醇单胞菌属(12.64%)、*Iamia* (5.75%)、假单胞菌属(3.83%)、GP6 (3.71%)、GP4 (2.95%)、芽单胞菌属(2.58%)、*Aridibacter* (2.33%)、*Aquihabitans* (1.64%), 与样品 1 优势菌属组成最为接近。

2 讨论

微生物修复技术被认为是有效降解石油烃类污染物的主要方法之一, 向石油污染土壤中投加环境适应能力强, 降解效能高的菌种或菌群是提高石油类污染物降解效率的重要手段。在前期的研究中课题组从甘肃省玉门油田石油污染的土壤中分离出多株具有良好石油降解性能的菌株, 其中铜绿假单胞菌 1217 和红平红球菌 KB1 7 d 的原油降解率分别为 20.73%和 42.99%, 表现出较强的耐盐特性, 具有良好的生物修复利用前景(杨智等, 2015)。

本研究以人工构建的石油污染黄土为生物修复

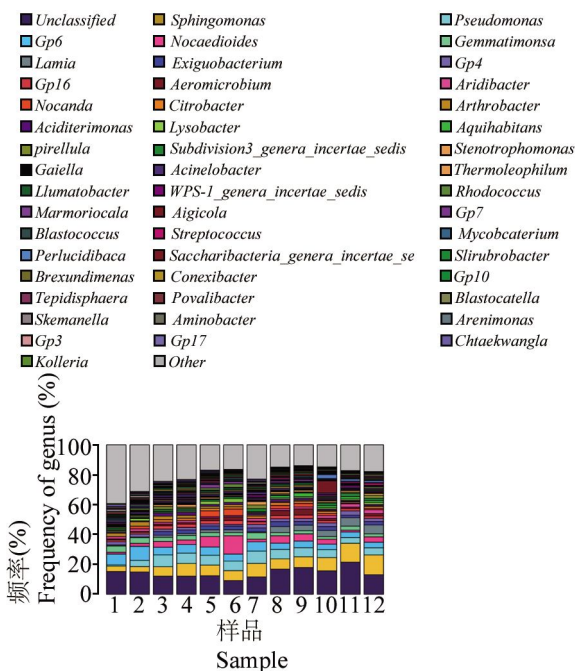


图 4 属水平所有样本细菌群落结构分布
Figure 4 Bacteria community structure distribution of all samples at genus level

对象,分别研究了原油污染黄土过程中污染物的自然降解转化作用和铜绿假单胞菌 1217、红平红球菌 KB1 单菌株和复合菌剂对污染物的强化降解过程中细菌菌群结构和多样性的变化。目前已报道的具有降解石油烃类物质的细菌有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus genus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和红球菌属(*Rhodococcus*)等(Thompson et al., 2005; Purnima et al., 2011; Li et al., 2013)。

近年来,国内外石油烃污染土壤生物处理的研究很多,通过土壤微生物多样性的研究揭示微生物群落功能多样性、结构多样性及分子遗传多样性。其中土壤耕作处理是现场处理土壤污染常用的方法,主要采用定期翻耕、灌溉和添加微生物菌剂等措施保持氧气、水分以及酸碱度,从而完成土壤中石油污染物的降解。Yan 等(2015)在实验室内模拟了假单胞菌对原油污染土壤的修复效果,表明假单胞菌能高效去除原油污染土壤中的饱和烃和芳香烃。张超等(2014)从石油污染土壤中分离了根瘤菌、节杆菌、嗜盐菌和芽孢杆菌 4 株细菌,分别考察了 4 种菌单独和混合后对人工模拟石油污染土壤的生物修复作用,发现混合菌剂对土壤中的石油烃的降解率最高,随着降解率的提高土著微生物的数量亦显著增加。

本试验研究了不同时间节点下不同菌剂处理组间土壤细菌多样性的变化情况,由 Shannon 指数曲线可知,空白组土壤中的细菌多样性较高,随着石油污染物的添加,土壤中细菌多样性降低,污染前的土壤样品中细菌分布在 34 门、70 纲、90 目、192 科、675 属,主要优势菌群依次为变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门、浮霉菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、疣微菌门。优势菌属依次为 GP6、芽单胞菌、鞘氨醇单胞菌属、节杆菌属、GP4、*Aridibacter*、斯科曼氏球菌属和 *Povalibacter*; 而加入石油污染物后土壤中细菌分布在 34 门、69 纲、90 目、182 科、501 属;主要优势菌为变形菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门、疣微菌门、Candidate division WPS-1,丰度降低,而放线菌门、酸杆菌门、厚壁菌门丰度有少量增加。主要优势属为优势菌属变为 GP6、假单胞菌属、芽单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、节杆菌属、GP4、类诺卡氏菌属、诺卡氏菌属等。

加入铜绿假单胞菌 1217、红平红球菌 KB1 和混合菌剂修复过程中后,细菌分别分布在 31 门,471 个属;32 门,474 个属;29 门,473 个属。土壤中的细菌多样性水平降低,尤其是属水平上显著降低,一

方面是由于石油污染物的胁迫作用,另一方面是新菌群细菌的加入逐渐成为优势菌群,对部分细菌产生拮抗影响,造成多样性水平发生显著变化。综合分析各土样细菌分布,其中假单胞菌属、类诺卡氏菌属及诺卡氏菌属均是石油污染胁迫下适应性较好的菌属,类诺卡氏菌属可被用来降解石油烃类污染物,且降解效果较好,而诺卡氏菌属可用来降解对苯二甲酸。本研究从不同生态层次上认识土壤细菌多样性,较全面、系统地综合评述污染土壤的细菌群落多样性,有助于揭示细菌菌群功能、结构及分子遗传多样性,为今后的土壤石油污染物的治理提供思路。

3 材料与方法

3.1 材料

本研究使用菌株 1217 和 KB1 均分离于甘肃玉门油田的石油污染土壤样品,经 16S rDNA 分析和生理生化鉴定为铜绿假单胞菌和红平红球菌。两株菌具有较高石油降解效果和较好环境适应性。

3.2 仪器与试剂

FAN/JA-N 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司),IS-RDH2 恒温振荡器(美国精骐有限公司),KQ3200E TC-96/G/H 基因扩增仪(杭州博日科技有限公司),HE-90 水平电泳槽、EPS-300 数显稳压稳流电泳仪、Tanon-3500 凝胶图像处理系统(上海方瑞仪器有限公司),XK-96A 涡流振荡器(江苏新康医疗器械有限公司)。

原油样品(中国石油兰州石化公司)、Agarose (Ta-KaRa Biotechnology)、磁珠法土壤基因 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程上海股份有限公司)。

3.3 人工石油污染土壤样品制备

供试土壤为农田黄土,采自甘肃省兰州市七里河区土门墩新村(103°44'14"E/36°3'35"N)。土壤经 0.25 mm 的孔径筛网去除沙砾等大颗粒杂物,向每 1 kg 土壤里面添加 4 000 mg 的原油制备人工石油污染土壤样品,搅拌均匀,作为修复对象。

取相同大小花盆,每个花盆中加入含 0.4%原油的土壤 1.2 kg。进行为期 110 d 的石油降解修复试验,其中 40 d 为未加菌修复期,70 d 为加菌强化修复期,同时设定空白对照组。将实验组花盆放置在室温(20±5℃)下,每隔 10 d 均匀翻耕土壤以保持氧供应,并喷洒无菌水保证各组土壤中湿度约为 16%。40 d 后待土壤中石油含量变化相对稳定时,开始分别添

加菌剂进行强化修复。

3.4 菌剂修复和实验分组

分别将铜绿假单胞菌 1217 和红平红球菌 KB1 单菌落接种于 LB 液体培养基中,于 30 °C 下 180 r/min 培养 24 h,采用稀释涂布平板法计算细菌总数。在无菌条件下 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,使用生理盐水洗涤菌体 2 次,离心弃上清液收集菌体,加入无菌水中,稀释成一定菌浓度备用。分别按照 5.00×10^7 cfu/g 干土的接种量向含油土壤中加入铜绿假单胞菌 1217 和红平红球菌 KB1 菌体、1217 菌体与 KB1 混合菌体(等细菌数混合)进行修复。

实验分为 3 组, I 组包括污染前土壤样品对照(编号 1, 对照样品)和污染 3 d 的土壤样品(编号 2); II 组包括 40 d 时未污染土样(编码 3 和 4, 对照样品),污染土样(编号 5 和 6); III 组为 40 d 后加菌强化 70 d 修复组,包括未污染土样(编码 7, 对照样品),污染土样(编号 8 和 9),菌剂强化修复土样(铜绿假单胞

菌 1217 菌剂修复组, 编号 10; KB1 与 1217 混合菌剂修复组, 编号 11; 红平红球菌 KB1 菌剂修复组, 编号 12)(表 2)。

3.5 土壤总 DNA 的提取

使用磁珠法土壤基因组 DNA 抽提试剂盒提取土壤总 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 质量。

3.6 高通量测序分析

以土壤总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物进行高通量测序。PCR 扩增分两轮进行。第一轮 PCR 所用的引物为细菌 16S rDNA 中 V3-V4 通用引物 341F 和 805R,其中 341F 引物接有 Barcode 标签,反应条件为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,45 °C 20 s,65 °C 30 s,5 个循环;94 °C 20 s,55 °C 20 s,72 °C 30 s,20 个循环;72 °C 5 min,10 °C 保存。PCR 结束后,进行 1.0% 琼脂糖电泳检测。

341F 引物:CCCTACACGACGCTCTTCCGATC

表 2 分组信息

Table 2 Group information

展示组 Group No.	样本编号 Sample No.	分析阐述 Analysis and description
I	1	人工石油污染土壤 3 d 前土壤样品(空白对照) Sample taken before contaminating (blank control)
	2	人工石油污染土壤 3 d 后污染土壤样品 The oil-contaminated soil for 3 days
II	3	干净土壤空白对照 Sample with non-contaminant
	4	干净土壤 Sample with non-contaminant for 40 days
	5	人工石油污染土壤 40 d 后土壤 Contaminated soil for 40 days
	6	人工石油污染土壤 40 d 后土壤 Contaminated soil for 40 days
III	7	干净土壤 Sample with non-contaminant for 70 days
	8	石油污染土壤未加菌自然降解修复土壤 Contaminated soil for 70 days
	9	石油污染土壤未加菌自然降解修复土壤 Contaminated soil for 70 days
	10	加菌修复土壤 The oil-contaminated soil repaired with the different bacteria for 70 days
	11	加菌修复土壤 The oil-contaminated soil repaired with the different bacteria for 70 days
	12	加菌修复土壤 The oil-contaminated soil repaired with the different bacteria for 70 days

TG (Barcode) CCTACGGGNGGCWGCAG

805R 引物: GACTGGAGTTCCTTGGCACCCG
AGAATTCCA ACTACHVGGGTATCTAATCC

第一轮 PCR 结束后, 用 0.8 倍体积 AMPure XP Beads 进行纯化后, 以此为模板, 用 P5+index i5 和 P7+index i7 引物进行第二轮 PCR 扩增, 得到的 PCR 产物即带有 P5/P7 接头序列和双端 index。反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 20 s, 55°C 20 s, 72°C 30 s, 5 个循环; 72°C 5 min, 10°C 保存。PCR 结束后, 进行 1.0% 琼脂糖电泳检测。

对 PCR 产物进行纯化后, 由上海生工有限公司 Miseq 平台进行高通量测序, 进行分析微生物群落信息分析(Shannon 指数, 样本聚类图, 微生物群落组成)。

作者贡献

孔令姣主要负责实验操作, 数据分析及论文撰写; 杨智, 李彦林参与部分实验操作; 王永刚, 周永涛和张彦参与部分数据的分析; 通讯作者陈吉祥主要负责实验设计以及论文修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(NO. 31272694)和中国石油天然气股份有限公司天然气与管道分公司科研项目(2014D-4610-0501)共同资助。

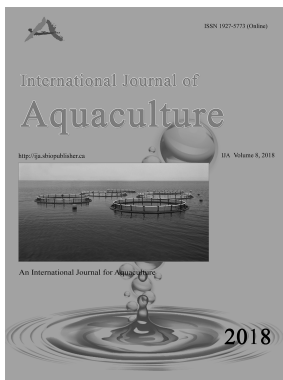
参考文献

- Assadi M.M., Ardeshiri M., Sheykhzadeh H., and Jahangiri M., 2014, The bioremediation of crude oil contaminated soil, *Petrol. Sci. Technol.*, 32(32): 1497-1504
- Bian L.H., Xu J.X., Zhang H., Zhang H., Ren G.L., Zhang L.X., Liu W., and Huang Y.H., 2016, Screening and analysing of growth characteristics to oil degrading strains producing surfactant, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 35(5): 1156-1160 (卞立红, 徐晶雪, 张慧, 张虹, 任国领, 张丽霞, 刘伟, 黄永红, 2016, 石油降解表面活性剂产生菌的筛选与生长特性分析, *基因组学与应用生物学*, 35(5): 1156-1160)
- Chen L.H., 2012, The law of depredation and optimizing bio-remediation of petroleum contaminated soil in the loess plateau, Lanzhou University, pp.20-30 (陈丽华. 2012, 黄土塬石油污染土壤的降解规律及生物修复优化研究, 兰州大学, pp.20-30)
- Cheung P.Y., and Kinkle B.K., 2001, Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils,

- Appl. Environ. Micro.*, 67(5): 2222-2229
- Coppotelli B.M., Ibarrolaza A., Del Panno M.T., and Morelli I.S., Panno oculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006 FA on soil bacterial community and biodegradation in phenanthrene-contaminated soil, *Microbial Ecol.*, 55(2): 173-183
- Cunliffe M., and Kertesz M.A., 2006, Effect of *Sphingobium yanoikuyae* B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in aged and freshly PAH-contaminated soils, *Environ. pollut.* (Barking, Essex : 1987), 144(1): 228-237
- Du S., Zhang W.F., and Shi H.T., 2013, 16S rRNA-base analysis of bacteroidetes and firmicutes diversity in the microbial flora of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) intestinal tract, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 32(6): 700-706 (杜爽, 张文飞, 史海涛, 2013, 基于 16S rRNA 序列分析红耳龟肠道拟杆菌和厚壁杆菌菌群多样性, *基因组学与应用生物学*, 32(6): 700-706)
- Hart M., 2004, Methods of studying soil microbial diversity, *J. Microbiol. Meth.*, 58(2): 169-188
- Li C., Zhou Z.X., Jia X.Q., Chen Y., Liu J., and Wen J.P., 2013, Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain *Rhodococcus* sp. JZX-01, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(7): 1715-1725
- Li Y.Y., Zheng X.L., and Li B., 2006, Interaction between oil contamination and microbial community structure, *Sheng-taihuanjing Xuebao (Ecology and Environment)*, 15 (2): 47-47 (李玉瑛, 郑西来, 李冰, 2006, 石油污染与微生物群落结构的相互影响, *生态环境学报*, 15(2): 47-47)
- Lindstrom J.E., Barry R.P., and Braddock J.F., 1999, Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill, *Soil Biol. Biochem.*, 31(12): 1677-1689
- Liu W.X., Luo Y.M., Teng Y., Li Z.G., and Wu L.H., 2007, Eco-risk assessment and bioremediation of petroleum contaminated soil ii. changes in physico-chemical properties and microbial ecology of petroleum contaminated soil, *Turang Xuebao (Acta Pedologica Sinica)*, 44(5): 848-853 (刘五星, 骆永明, 卡滕应, 李振高, 吴龙华, 2007, 石油污染土壤的生态风险评价和生物修复 II, 石油污染土壤的理化性质和微生物生态变化研究, *土壤学报*, 44(5): 848-853)
- Macnaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., GREGORY A.D., Chang Y.J., and DAVID C.W., 1999, Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill, *Applied & Environmental Microbiology*, 65(8): 3566-3574
- Pace N.R., 1997, A molecular view of microbial diversity and the biosphere, *Science*, 276(5313): 734-740
- Purnima K.G., Goyal D., and Khanna S., 2011, Pyrene biodegradation by *Bacillus* spp. isolated from coal tar-contaminated soil, *Bioremediat. J.*, 15 (1): 12-25

- Singh B., Gautam S.K., Verma V., Manoj K., and Bhupinder S., 2008, Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects, *Anaerobe*, 14(3): 138-144
- Tang J.C., Lu H.H., Liu Q.L., and Zhu W.Y., 2015, Recent review on the microbial molecular ecology during contamination and remediation of petroleum hydrocarbons, *Weishengwuxue Tongbao (Microbiol. China)*, 42(5): 944-955 (唐景春, 吕宏虹, 刘庆龙, 朱文英, 2015, 石油烃污染及修复过程中的微生物分子生态学研究进展, *微生物学通报*, 42(5): 944-955)
- Thompson I.P., Gast C.J.V.D., Ciric L., and Singer A.C., 2005, Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection, *Environ. Microbiol.*, 7(7): 909-915
- Yan G., Cai B., Chen C., Yue Y., Wang Q., Deng H., Liu S., and Guo S., 2015, Bioremediation of crude oil contaminated soil, *Petrol. Sci. Technol.*, 33(6): 712-723
- Yang Z., Chen J.X., and Qin B., 2015, Characterization and catabolic genes detection of three oil-degrading *Rhodococcus* spp., *Yingyong Yu Huanjing Shengwuxuebao (Chinese Journal of Applied and Environmental Biology)*, 21(5): 805-812 (杨智, 陈吉祥, 秦波, 2015, 3株石油降解红球菌 (*Rhodococcus* spp.)特性及相关基因分析. *应用与环境生物学报*, 21(5): 805-812)
- Zhang C., CHEN W.B., WU D.J., WEI T.D., 2014, Remediation of oil-contaminated soil with mixed bacteria, *Huagong Huanbao (Environmental Protection of Chemical Industry)*, 34(1): 19-23 (张超, 陈文兵, 武道吉, 魏天迪, 2014, 混合菌修复石油污染土壤, *化工环保*, 34(1): 19-23)

International Journal of Aquaculture (IJA)



International Journal of Aquaculture (ISSN 1927-5773) is an open access, peer reviewed journal published online by BioPublisher. The journal publishes all the latest and outstanding research articles, letters and reviews in all working and studying within the many varied areas of aquaculture, containing the latest developments and techniques for practice in aquaculture; information about the entire area of applied aquaculture, including breeding and genetics, physiology, aquaculture-environment, hatchery design and management, utilization of primary and secondary resources in aquaculture, production and harvest, the biology and culture of aquaculturally important and emerging species, aquaculture product quality and traceability, as well as socio-economics of aquaculture and impacts.

Email: edit@ija.biopublisher.ca

Web: <http://ija.biopublisher.ca>