

石油降解菌的分离鉴定及石油污染土壤的细菌多样性

任随周^{1,2,3}, 郭俊², 邓穗儿², 岑英华², 孙永革⁴, 孙国萍^{2*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 广东省微生物研究所, 广州 510070;
3. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 4. 中国科学院广州地球化学研究所, 广州 510640)

摘要: 从石油污染的土壤中分离筛选到 28 株石油降解菌, 经鉴定分别为短杆菌属、假单胞菌属、邻单胞菌属和微球菌属; 对 4 个石油不同程度污染的土壤样品中嗜油微生物分布状况进行分析, 发现污染严重的土壤样品中嗜油菌的数量相对较多; 用聚合酶链式反应(PCR)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)和切胶测序相结合的方法对 4 个土壤样品中的细菌多样性进行分析, 结果显示在受污染的土壤中, *Mycobacterium* 和 *Bacillus* 在污染程度较低的样品中分布的较为集中, *Flavobacterium* 和 *Azospira* 在污染程度较高的样品中丰度较高。属于 *Beta proteobacterium* 类群的细菌在受污染的土壤中占有优势, 同时还有一些不可培养的菌群存在。气质联用(GC-MS)分析结果表明石油污染程度及污染物中芳香烃类的含量对细菌多样性有着显著影响。在石油污染程度高, 芳香烃类含量高的样品中细菌的多样性相对较低。

关键词: 石油降解菌; 分离鉴定; 菌群多样性; DGGE; 测序

文章编号: 1000-0933(2005)12-3314-09 **中图分类号:** Q 938 **文献标识码:** A

Isolation and Identification of petroleum degrading strains and the diversity of microbes in petroleum-contaminated soils

REN Sui-Zhou^{1,2,3}, GUO Jun², DEN G Sui-Er², CEN Ying-Hua², SUN Yong-Ge⁴, SUN Guo-Ping^{2*} (1. South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China; 3. School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 4. Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510640, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(12): 3314~3322

Abstract Four petroleum-contaminated soil samples at different degree were collected and used for isolation of petroleum-degrading bacterium. 28 petroleum-degrading strains were screened and identified as *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* and *Plesiomonas*, respectively. There are more petroleum-degrading bacteria in heavy petroleum-contaminated soil than that in light contaminated soil, and *Brevibacterium* and *Pseudomonas* are dominant petroleum-degrading bacteria. A culture-independent molecular biological method was applied to analyze the genetic diversity of microbial communities of the four soil samples. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in this study had provided new ideas for study of the microbial community in petroleum-contaminated soil. The genomic DNA of microbial community were extracted from the four soil samples in chemical method, which is based on lysis with a high salt extract ion buffer (1.5 mol/L NaCl) and extend heating (2 to 3 h) of the soil suspension in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS), CTAB and proteinase K. After purification of the genomic DNA with DNA gel recovery kits, the V3 variable fragments of genes coding for 16S rRNA were amplified by using specific primers. The result of agarose gel(1.5%) electrophoresis showed that the PCR products were about 230 bp. The amplified DNA fragments were then separated by paralleled DGGE with the denaturant (urea and formamide) from 30% to 60% to generate DNA fingerprints, nine major bands from DGGE profiles of the four samples were

基金项目: 广东省自然科学基金团队资助项目(200115017); 广东省自然科学基金资助项目(032319)

收稿日期: 2004-08-22; **修订日期:** 2005-09-14

作者简介: 任随周(1974~), 男, 河南灵宝人, 博士生, 主要从事环境微生物研究 Email: ren sz@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence Email: ebiotech@gdas.ac.cn

Foundation item: Provincial Natural Science Foundation Team Item of Guangdong (No. 015017); Provincial Natural Science Foundation of Guangdong (No. 032319)

Received date: 2004-08-22; **Accepted date:** 2005-09-14-

Biography: REN Sui-Zhou, Ph.D. candidate, mainly engaged in environmental microbiology. Email: ren sz@163.com

eluted from gel, then reamplified and sequenced. The results suggested that they belonged to 2 OTUs at 97% homology cutoff, 4 OTUs shared 97%~100% homology with known sequences in the database, while 3 OTUs had 91%~95% homology with known sequences. The isolates from 8 OTUs grouped together with some uncultured eubacteria in the database. A phylogenetic analysis of 9 OTUs classified them into three major groups: the OTU 2 lineage and the other 8 OTUs lineage, the latter was classified further into 6 subgroups. The results indicated the diversity of soil microbes was significantly correlated with the degree of petroleum contamination. Owing to the selective pressure of petroleum pollutants, there was less diversity of microbes in heavy contaminated soil than that in light contaminated soil. Sequences alignment results showed *Mycobacterium* and *Bacillus* bacteria are dominant population in light contaminated soil and *Flavobacterium* and *Azospira* are dominant population in heavy contaminated soil. The results of GC-MS indicated the degree of contamination, especially the content of aromatic hydrocarbons affect the diversity of soil microbes. The petroleum-degrading strains isolated in this study will be good candidates for bioremediation of petroleum-contaminated soils, and the analysis of the microbe diversity in petroleum-contaminated soils will offer a valid scientific basis for better bioremediation of petroleum-contaminated soil.

Key words: petroleum-degrading strains; community structures; 16S rDNA; DGGE; sequencing

石油及其产品目前在世界范围被广泛使用,由其带来的环境污染问题,尤其水域和土壤污染问题也越来越严重,并日益引起人们的重视。在自然状态下,多个种属的微生物都具有分解和转化石油组分的能力,已报道能够降解石油的菌种有:*Rhodococcus rhodochrous*^[1], *Pseudomonas*, *Aeromonas*^[2], *Rhodococcus erythropolis*^[3], *A cinetobacter*^[4], *Devouroil*^[5]等,能够降解芳香烃的菌种有:*Aeromonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacteria*, *Flavobacterium*, *Mycrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*等^[6,7]。这些微生物广泛分布于土壤和水体中,尤其是受石油污染的环境中。分离筛选对石油具有较强降解能力的菌株,是研究细菌降解石油的机理及对污染水域或土壤进行生物修复的基础。

对污染环境中的微生物群落结构、数量变化动态及其与污染物关系进行分析,对在污染物降解过程中起重要作用的丰度较高的功能微生物进行鉴定与优选,是用微生物方法加速污染物降解的重要环节。研究清楚污染物降解过程中的优势功能微生物及相应的群落结构,就可以人为调节微生物群落构成,使环境中的主要污染物和难降解物更为有效地降解。目前,PCR、DGGE等分子生物学技术在分子生态学上的应用,极大地丰富了人们在微生物生态学上的认识,有效避免在传统培养、分离等过程中造成的微生物多样性丢失,人们可以同时对系统中的可培养与不可培养微生物进行检测,使得分析结果更为准确、全面地反映污染区域中微生物的种群组成情况^[8~11]。将这一技术应用于石油污染土壤微生物生态学研究,是国际上刚刚兴起的前沿领域,在国内还未见报道。

本研究从4个受石油不同程度污染的土壤样品中分离筛选石油降解菌,并分析了不同样品中微生物的分布情况及其与石油污染物组成的关系。同时将免培养的分子生物学技术16S rRNA基因片断的PCR扩增、DGGE分离与切带测序技术相结合,比较不同样品中的土壤微生物种类的异同和数量的差异,以期为石油污染土壤的生物修复技术的应用提供生物学依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

取自广州某炼油厂,从4个不同位置的土壤取样。取样器及盛装样品的铝盒在取样前进行灭菌处理,取样后置于保温冰盒中带回实验室,随即进行分离培养、微生物计数及含油量的测定。4个样品在理化性质方面基本相似,只是受石油污染的程度及类型不同。各土壤样品的污染情况见图2~图4中图3及图4,样品从1到4的污染程度依次增大,且样品1、2中饱和烃含量较高,样品3、4中芳香烃含量较高。

1.2 细菌的分离计数与鉴定

采得的土壤样品分成两部分,一部分用来进行总菌数计数和多样性分析,另一部分用于石油降解菌的筛选。

1.2.1 培养基 (1) 分离计数用培养基,分别为牛肉膏蛋白胨培养基、察氏培养基和高氏一号培养基,分别用于细菌、真菌和放线菌的分离与计数; (2) 嗜油菌筛选用含油培养基,将上述培养基中的碳源换成石油。石油采用0.2μm的超滤膜过滤除菌后,加入到灭菌的液体培养基中。固体培养基中补加1.8%的水洗琼脂。(3) 石油降解菌的分离筛选培养基,其组成成份为(1000ml): K₂HPO₄ 0.5g; NH₄Cl 1.0g; Na₂SO₄ 2.0g; KNO₃ 2.0g; CaCl₂ · 6H₂O 0.01g; MgSO₄ · 7H₂O 1.0g; FeSO₄ 0.0001g; 石油 0.1g,石油同样采用0.2μm超滤膜过滤除菌后加入。

1.2.2 微生物的分离与计数 将采集的石油污染土壤样品经充分分散后作梯度稀释,分别接种在牛肉膏蛋白胨培养基、察氏培养基和高氏一号培养基及各自相应的嗜油菌筛选用含油培养基上,30℃培养2d后计数。从含油计数平板上随机挑取单菌落,经反复纯化确证为纯菌后接种到含油的液体培养基中,恒温静置培养3d。挑取在液体培养基中较浓的菌株进行石油降解实验,测定石油降解率。

1.2.3 石油降解菌的筛选 初筛得到的纯化菌株, 在石油初始浓度为 2g/L 的液体培养基中, 培养 7d 后测定石油烃含量, 以未接菌的作对照。石油烃含量的测定采用紫外分光光度计(美国, BECKMAN, DU-640)法, $\lambda = 225\text{nm}$, 1cm 石英比色皿^[12]。

1.2.4 石油降解菌的鉴定 对分离筛选得到的石油降解菌, 参照伯杰氏细菌分类鉴定手册^[13], 采用细胞及菌落形态与生理生化实验相结合的方法进行鉴定。

1.2.5 石油中饱和烃和芳香烃含量的分析 用石油醚将培养基中残余的石油提取出来, 浓缩一定体积后采用 Finnigan Trace DSQ (Thermo Electron Corporation, U.S.A.) 气质联用仪进行分析, 色谱柱为 DB-5M S (30m × 0.25μm × 0.25mm), 气相色谱操作条件为: 进样口温度数 220 , 程序升温, 扫描范围 19~650amu, 扫描速度 500amu/s, 电子能量 70eV, 离子源温度 250 , 传输线温度 250 , 载气流速 1.0ml/min。

1.3 细菌多样性的分子生物学分析

对 4 个土壤样品进行核酸抽提、PCR-DGGE 和切胶测序分析。

1.3.1 土壤样品总DNA的提取和纯化 首先对采集得到的土壤样品进行预处理: 称取 5g 土壤样品放入 50ml 离心管中(每只离心管加 3 颗玻璃珠), 分别加入 9ml 的磷酸缓冲液(PBS, 1×, pH 7.4), 涡旋器上振荡 10min, 9000 × g 4 min 离心 5min, 然后重复加入 9ml 的 PBS, 共洗涤 3 次, 以去除样品中腐殖质和部分石油。最后加入 8ml 的 PBS 将沉淀悬起后, 分装成 6 支 1.5ml 离心管。取出一管按 Zhou 等所述方法^[14]作 DNA 提取, 其余样品放于 -30℃ 冰箱保藏, 以备后用。提取的 DNA 采用 Promega 基因组 DNA 纯化试剂盒(产品号: 12648410), 按照操作说明进行纯化。

1.3.2 PCR 扩增 将纯化所得总DNA 进行适当稀释后作为模板, 使用 16S rDNA 中 V3 区特异性引物^[15]扩增目的片段。扩增前预先测定和调整各模板的DNA 浓度, 使不同样品尽可能以等量DNA 作为模板进行 PCR 扩增。每 100μl 反应体系中正反向引物浓度为 0.1μmol/L, 每种 dNTP 的浓度为 0.2mmol/L, Taq 酶含量为 5U, 并设置阴性对照。为提高扩增产物的特异性, 使用热启动降落 PCR, 反应条件为 94 5min, 冷却至 80 时加入 Taq 酶, 65 退火 30s, 以后每个循环温度降低 1 , 直至退火温度为 55 , 72 1min 延伸。并且在 55 进行 15 个循环, 72 最终延伸 7min, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖检验。

1.3.3 DGGE 分析 采用 Dcode™ 突变检测系统(Bio-Rad)对 16S rDNA V3 区扩增产物进行 DGGE 分析。电泳所用聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10%, 规格为 16mm × 16mm × 1.0mm (L × W × H), 变性梯度为 30% ~ 60% (尿素为 7mol/L, 甲酰胺为 40% 时的变性浓度为 100%)。使用电泳缓冲溶液为 1×TBE, 上样 25μl 浓缩后的扩增产物。电泳条件为 60 恒温下, 100V 电泳 9h, 然后用 EB 染色 30min, UV Itec 紫外凝胶成像系统(Cambridge, U.K)分析结果。按文献^[26]所述方法从凝胶上切下目标条带, 从中分离DNA, 经纯化后再做 PCR 扩增, 并用 DGGE 检查再扩增结果与切胶前迁移位置是否一致, 一致的样品由上海博亚生物技术有限公司测序。

1.3.4 DGGE 条带的序列测定、同源性比较及系统发育分析 将所得序列提交到 GenBank 数据库, 登录号为 AY695075~AY695083, 用 Blast 软件在 GenBank 数据库中进行相似性比较, 获取同源性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列。用 ClustalX (version 1.81) 进行序列对比, 用邻接法(Neighbour Joining, NJ) 构建系统进化树(PHYLIP, version 3.5)。利用 UV Itec 凝胶成像系统中的 BAND Analysis 软件对 4 个样品 DGGE 图谱的条带进行分析, 并根据 DGGE 条带的数目和条带的亮度计算出 4 个样品的 Shannon 多样性指数。

2 结果与分析

2.1 不同样品中可培养微生物的分布

采用梯度稀释的方法, 分别用普通培养基和含油培养基对 4 个样品中的细菌、真菌和放线菌进行分离计数(表 1)。结果表明, 在四个污染程度不同的土壤样品中, 样品 1 的细菌数量最多, 样品 3 次之, 样品 4 最少。嗜油菌的相对数量则以样品 3 最多, 样品 4 最少。4 个样品中的真菌和放线菌的数量则相对较少。4 个土壤样品的石油污染程度分析结果显示, 样品 1 的石油污染程度最低, 而样品 4 最为严重(见图 3, 图 4)。这说明高浓度石油烃对细菌有毒害作用, 适量石油烃的存在则会促进嗜油细菌的生长。考虑到嗜油细菌数量优势及石油污染修复时操作方便, 选择丰度较高的细菌为研究对象。

表 1 不同土壤样品的细菌数量分布(CFU/g)

Table 1 Distribution of microbes in different soils (CFU/g)

微生物类型 Microbes type	样品 1 Sample 1		样品 2 Sample 2		样品 3 Sample 3		样品 4 Sample 4	
	总菌数 ^a	嗜油菌 ^b						
细菌 Bacteria	7.2×10^7	1.2×10^4	5.4×10^6	6.8×10^4	4.4×10^7	8.5×10^5	2.1×10^6	4.1×10^4
真菌 Fungi	3.2×10^4	2.0×10^1	8.1×10^3	3.9×10^1	3.8×10^3	5.7×10^2	6.1×10^2	8.9×10^1
放线菌 Actinomycetes	4.6×10^3	1.5×10^1	1.3×10^2	5.1×10^1	1.9×10^4	5.4×10^1	9.2×10^2	5.1×10^1

嗜油菌的判断: 以培养 48h 后在石油为唯一碳源的培养基上长出的可见菌落为嗜油菌 The judgement criterion of oilophilic bacteria: the clones appearing on the medium using petroleum as sole carbon sources within 48h; a: Total microbes; b: Oilophilic microbes

2.2 石油降解菌的筛选

在含油的分离平板上, 随机挑取 180 个单菌落, 经分离纯化后测定石油降解率。其中石油降解率高于 20% 的菌株有 28 株, 其石油降解率如表 2 所示。

表 2 分离菌种对石油的降解率

Table 2 The degradation rates of petroleum by isolated microbes

菌株	降解率 (%)	土壤编号									
Y-62	21.6	1	Y-112	38.2	2	Y-111	26.1	3	Y-160	26.5	3
Y-101	38.5	1	Y-116	32.7	2	Y-113	35.4	3	Y-41	41.3	4
Y-117	30.8	1	Y-141	40.5	2	Y-143	38.7	3	Y-60	28.3	4
Y-120	25.0	1	Y-159	31.2	2	Y-114	33.1	3	Y-104	36.4	4
Y-21	26.4	2	Y-59	31.2	3	Y-151	35.3	3	Y-109	24.7	4
Y-55	20.7	2	Y-66	40.1	3	Y-156	37.8	3	Y-118	48.7	4
Y-63	25.7	2	Y-68	27.3	3	Y-157	35.5	3	Y-155	20.4	4

The name of strains; Degradation rates(%); The number of soil sample

从表 2 可以看出, 降解率较高的菌株在污染程度较重的土壤样品中的数量相对较多。如降解率在 40% 以上的有 4 株, 其中由样品 1、2 分离得到的有 1 株, 由样品 3、4 分离得到的有 3 株; 降解率在 30% ~ 40% 的菌株有 13 株, 其中由样品 1、2 分离得到的有 5 株, 由样品 3、4 分离得到的有 8 株。不同降解率的降解菌在不同样品中的这种规律分布, 可能与石油污染物对细菌群落的选择性富集作用有关, 污染物的浓度越高, 则这种富集作用就越强。

2.3 石油降解菌的分离鉴定

分别采用形态学观察和生理生化实验对 28 株石油降解菌进行鉴定, 结果如表 3 所示。

表 3 28 株石油降解菌的鉴定结果

Table 3 The identification characters of the bacteria for degrading petroleum

微生物类型 Genus	分离得到的菌株 Isolated microbes
短杆菌属 <i>Brevibacterium</i>	Y-109, Y-111, Y-112, Y-117, Y-118, Y-141, Y-143, Y-144, Y-151, Y-156, Y-157, Y-159, Y-160
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	Y-21, Y-41, Y-55, Y-59, Y-60, Y-62, Y-63, Y-68, Y-120, Y-113, Y-116, Y-155
微球菌属 <i>Micrococcus</i>	Y-66, Y-104
邻单胞菌属 <i>Plesianonas</i>	Y-101

28 株石油降解菌分别属于短杆菌属、假单胞菌属、微球菌属和邻单胞菌属。其中属于短杆菌属和假单胞菌属的菌株占绝对优势, 属于微球菌属、邻单胞菌属的菌株则相对较少。文献报道能够降解石油的微生物种类繁多, 包括细菌的 28 个属、丝状真菌的 30 个属和酵母菌的 12 个属, 其中细菌主要为假单胞菌属、芽孢菌属和短杆菌属。本研究中同样发现短杆菌属和假单胞菌属是 4 个石油污染土壤样品中的优势种群。尽管在石油污染的土壤样品中能够降解污染物的细菌种类繁多, 但丰度相对较高的只是少数种群。结合表 2 菌种的分离来源可以看出, 具有石油降解能力的丰度较高的菌群在污染程度不同的土壤样品中存在差异。如虽然从样品 1 中仅分离得到 3 株降解率高于 20% 降解菌, 但这 3 株菌又分属于不同的 3 个属, 其余样品中的降解菌以短杆菌属和假单胞菌属为主。

2.4 细菌多样性分析

为了进一步分析不同样品中包括不可培养细菌在内的整个细菌种群的分布情况, 以提取的不同土壤样品总 DNA 为模板, 采用 16S rRNA 基因 V3 区的通用引物进行扩增, 获得长为 233bp 的 16S rRNA 基因 V3 区扩增产物。以扩增产物进行 DGGE 分析(图 1), 结果显示 4 个不同土壤样品中的 16S rDNA V3 区扩增产物在 DGGE 上呈现的条带在数目与亮度上均存在差异。根据 DGGE 条带的数目和条带的亮度计算出 4 个样品的 Shannon 指数分别为 11.999, 14.537, 12.29 和 7.247, 4 个样品中种群多样性最高的是样品 2, 与前 3 个样品相比, 样品 4 的种群多样性明显较低。样品 2 与样品 3 中的主条带基本相同, 但与

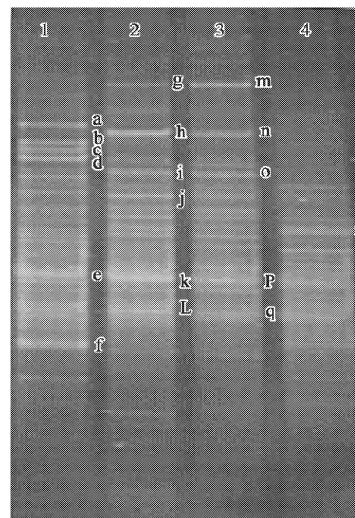


图 1 4 个土壤样品的 DGGE 图谱

Fig. 1 DGGE profiles generated from four petroleum-contaminated soil samples Lane 1, Sample 1; Lane 3, Sample 3; Lane 4, Sample 4; Lane 1, Sample 1; Lane 3, Sample 3; Lane 4, Sample 4

样品 1 及样品 4 明显不同。条带 a、b、c、d 为样品 1 所独有, 条带 r、s 为样品 4 所独有。条带 g、m、h、n 仅在样品 2、3 中出现。表明不同样品中的主要细菌种群存在明显差异。另一方面, 不同土壤样品中较亮的条带也有所不同, 如条带 f 在样品 2、3 中为一条主带, 而在样品 1 中仅为一条弱带, 样品 4 中未检测到此条带, 显示不同样品中主要细菌种群在丰度上也存在着差异。细菌 V3 区条带数目的多少可反映出样品中优势细菌菌群的多少, 而同一位置条带亮度的不同, 则可反映出不同样品中优势细菌数量的差异。因此通过 DGGE 分析, 可以反映出不同样品中细菌菌群种类与数量的差异。从整体上看, 样品 1、2、3 中优势细菌菌群远比样品 4 多, 2、3 样品中优势细菌菌群又与样品 1 有所差别。

分别对 4 个样品 DGGE 图谱中的 14 条较亮的条带进行切割 DNA 洗脱、回收和纯化后重新扩增, 将扩增产物纯化后进行 16S rDNA (V3 区) 测序, 共得到 9 个条带的序列。根据 DGGE 的原理, 每一个条带大致与群落中的一个优势菌群或可操作分类单位 (Operational taxonomic unit, OTU) 相对应, 这 9 个序列片段即为 9 个不同的分类操作单元。将其序列提交到 GenBank, 登录号见表 4。将所得的序列与 GenBank 数据库中已登录序列进行同源性分析和检索, 与 9 个不同的分类操作单元 (OTU) 同源。

表 4 土壤样品中 9 种细菌 OTU 在 GenBank 中的最近序列种类

Table 4 The most closely matched species of 9 partial 16S rDNA sequences in GenBank

分类操作单元 OTUs	登录号 Accession number	GenBank 数据库中最为接近的细菌细菌种类 Closely identified relatives in GenBank database	相似性(%) Similarity
OTU 1 1-a	AY695075	A F547964 Mycobacterium septicum strain CIP 106642	100
		A F547963 Mycobacterium senegalense strain CIP 104941	100
		A F547958 Mycobacterium porcinum strain DSM 44242	100
		A F547956 Mycobacterium peregrinum strain CIP 105382	100
		A F547921 Mycobacterium farcinogenes strain DSM 43637	100
OTU 2 1-d	AY695076	A Y608605 Bacillus litoralis strain D-1, 5aT	100
		AJ276809 Bacillus strain LM G-19415	100
		AJ781029 Bacillus herbersteinii strain D-1, 5aT	100
		AJ316317 Bacillus strain LM G 20243	100
		AB062678 Bacillus stvain M K03	100
OTU 3 1-f	AY65077	AF128872 Pseudomonas sp. b53	95
		AF482685 Pseudomonas sp. NmX	95
		A Y039425 Soil bacterium NS9	95
		AJ296560 Uncultured bacterium GV-Sh1-163	95
		AJ534849 Pseudomonas sp. DW 101	95
OTU 4 2-h	AY695078	U 58019 Thiobacillus aquaesulnis	99
		AJ307983 Propionibacterium limicola strain GoChil T	99
		A Y297807 Beta proteobacterium pACH91	99
		A Y297805 Beta proteobacterium pACH89	99
		AB066262 Thauera sp. DN T-1	99
OTU 5 2-k	AY695079	AJ295642 Uncultured bacterium. KF-Gitt2-47	97
		AF445251 Swine manure pit bacterium PPC1	95
		AF445250 Swine manure pit bacterium PPC87	95
		A Y554420 Bacteroides sp. 22C	98
		AB064832 Uncultured P revotella sp.	91
OTU 6 3-m	AY695080	AJ295643 Uncultured Thiobacillus sp. KF-Gitt2-40	91
		AJ224618 Beta proteobacterium 5Z-C1	90
		AJ224617 Beta proteobacterium TBW 3	90
		M 79426 Thiobacillus thioparus	90
		AJ243144 Thiobacillus denitrificans strain NCMB 9548	89
OTU 7 3-o	AY695081	AJ318192 Uncultured beta proteobacterium clone Bluii29	94
		A Y238499 Acaligenes sp. 92	93
		X92415 Acaligenes sp.	93
		AJ133493 Acaligenes sp. CCUG 36768	93
		A Y162074 Beta proteobacterium GMD 36F11	93
OTU 8 4-r	AY695082	A Y337599 Bacteroidetes bacterium EC2	97
		A Y162137 Flavobacterium sp. MTN 11	97
		A Y599661 Flavobacterium sp. TB4-10-II Flavobacterium sp. pf32	97
		A Y336561 Pedobacter sp. Ellin108	95
		A F408950 A Y297807 Beta proteobacterium pACH91	94
OTU 9 4-s	AY695083	A Y297805 Beta proteobacterium pACH89	100
		X85435 A zoarcus sp. 6a3	100
		A Y126453 Dechlorosana sp. PCC	97
		AJ009466 Uncultured bacterium SJA -52	96
			96

性最接近的有 8 个已知类群, 其中 d 与 *Bacillus* 属具有很高的同源性(近 100%)。f 与 *Pseudomonas* 属的同源性为 95%, h 与 *Beta proteobacterium* 的 *Thiobacillus* 属、*Propionibacterium* 属及 *Thauera* 属具有 99% 同源性,k 与 *Uncultured bacterium KF-Gitt2-47* 具有 97% 同源性,m 与 GenBank 数据库中已有的序列同源性较低, 与 *Beta proteobacterium* 中的 *uncultured Thiobacillus* sp. 有 91% 同源性, o 与 *Uncultured beta proteobacterium* 具有 94% 同源性, 与 *Alcaligenes* 属具有 93% 的同源性, r 与 *Flavobacterium* 属的同源性较高, 具有 97% 同源性, s 与 *Beta proteobacterium* 具有较高的同源性, 且与其中的 *Azospira* 属具有 97% 同源性。其余 5 条带的 PCR 产物未获得测序结果, 原因可能是含有两个以上不同的序列, 需构建克隆文库后重新进行测序分析。

从 GenBank 已知细菌相关信息得知, 与 d, f, k, o 4 个操作单元相似的细菌菌株均从土壤中分离得到。与 h, k, m, o, r, s 5 个操作单元相似的细菌种类是从与污染物降解有关的污染环境中分离得到, 尤其 h, r, s 是从与芳香烃类降解有关的污染环境中分离得到, 例如与 a 带有 100% 的同源性的 *Mycobacterium* 属有文献报道与多环芳烃降解有关^[23, 24], 与 h 带有 99% 的同源性的 *Propionibacterium limicola* 所代表的菌株 strain GolChi1T 是多环芳烃降解菌, 与 s 有 97% 的同源性的 *Azospira* 6a3 能够降解甲苯。GenBank 数据库中与 k, m, o 及 f, s 同源性较高的菌株均为不可培养细菌, 表明 4 个样品中可能含有相当数量的不可培养细菌存在。

对 9 个分类操作单元(OUT)的序列进行多序列比较分析、分类及进化树的构建, 结果见图 2。9 个分类操作单元可分为三大类群, 1-d 和 2-k, 4-r 分别为单独的类型, 称之为 Group I 和 Group II, 与其它细菌的亲缘关系比较远, 其余 1-a, 2-h, 4-s, 3-m, 1-f, 3-o 分类操作单元可归为另一大类。在此 6 个 OUT 组成的大类群中, OUT 1-a 与其它类群进化关系比较远, 为 Group III。其余 5 个分类单元中, 根据其亲缘关系的远近又可分为 4 个不同类型, OUT 1-f 为 Group VI, OUT 3-o 为 Group V, OUT 3-m 为 Group VI, OUT 2-h 和 OUT 4-s 为 Group VII。

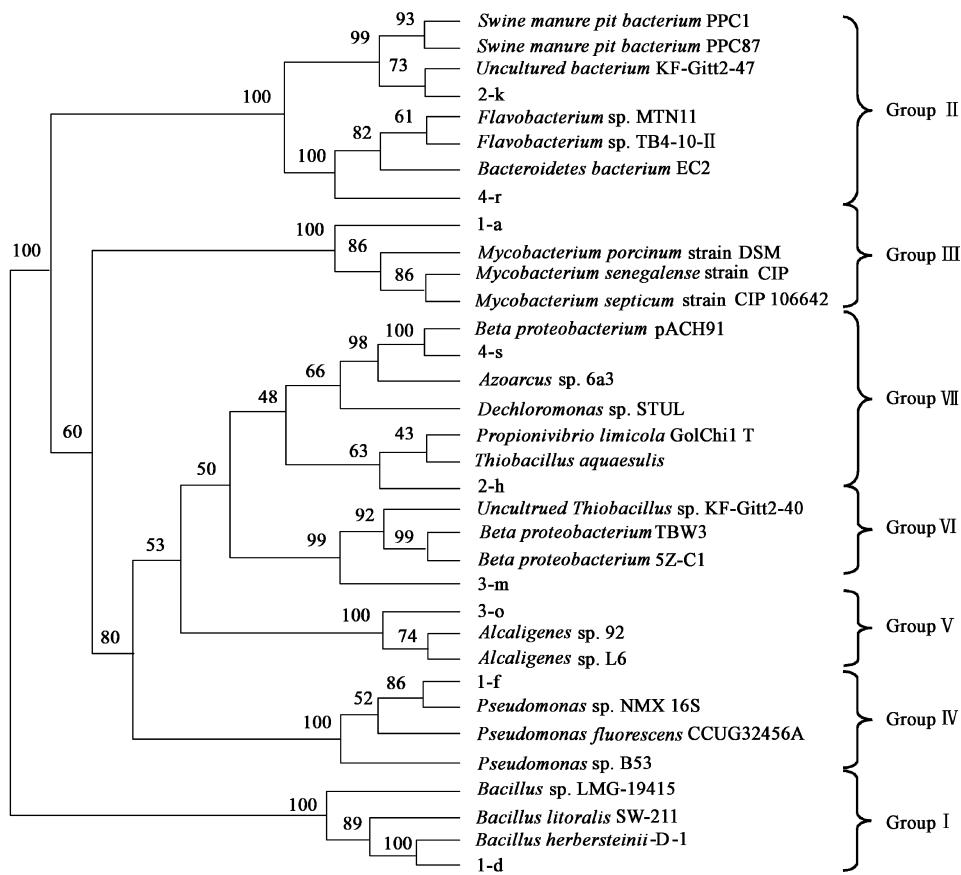


图 2 4 个样品中细菌种群的分类进化图

Fig. 2 Unrooted neighbor-joining tree of bacteria identified from the sequences of four petroleum-contaminated soil samples DGGE bands

2.5 不同土壤样品中污染物组成的分析

为了确定不同土壤样品中细菌种群多样性是否与样品中污染的石油组成成分有关, 对 4 个土壤样品中的饱和烃和芳香烃

进行 GC·MS 分析。图 3 是 4 个土壤样品的 M/z 82 的 GC·MS 图谱, 图 4 是 4 个土壤样品的 M/z 178 的 GC·MS 图谱, 即三环的菲的碎片特征离子, 主要是为了查看芳香烃菲分布特征。结合图 3、图 4 可知, 样品 1、2 中的饱和烃种类较多, 含量较高, 样品 3、4 中的芳香烃类种类较多, 含量较高。适量的饱和烃类可以促进土壤中的细菌生长, 而芳香烃类含量过高则对细菌具有毒害作用。结合前面不同污染土壤中细菌种群的结构特点, 样品 1、2 中微生物种群多样性高可能与其饱和烃类含量较高而芳香烃类含量较低有关; 样品 4 中微生物种群多样性明显较低, 可能与其芳香烃类含量较高且毒害作用较强有关。

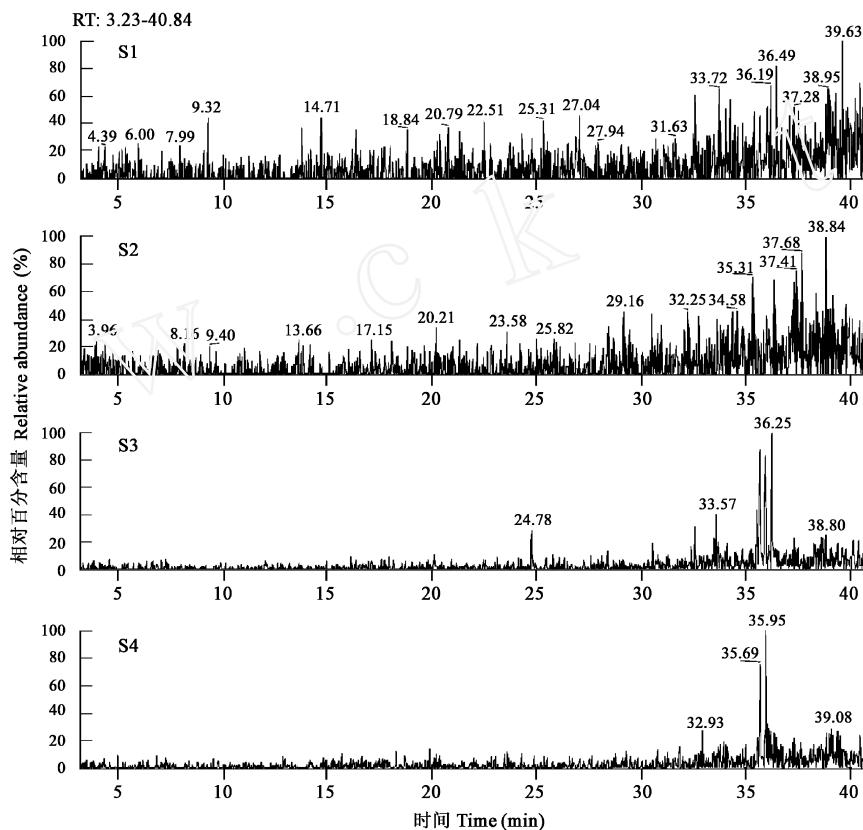


图 3 4 个样品中的饱和烃 GC·MS 图谱

Fig. 3 M/z 82 GC·MS of aliphatic hydrocarbon fractions in 4 petroleum-contaminated soil samples S1, Sample 1; S2, Sample 2; S3, Sample 3; S4, Sample 4

3 讨论

为使对细菌种群多样性的分析结果尽可能全面, 该研究将培养与免培养的方法相结合起来进行分析。通过培养的方法, 发现污染程度严重的土壤样品中嗜油菌的数量较多, 分离筛选得到了降解率较高的石油降解菌, 为石油污染土壤的生物修复提供了菌种资源。借助于 PCR-DGGE、切胶测序等免培养技术, 对样品中丰度较高的优势细菌种群进行了分析, 结果显示在受石油污染的土壤中, 属于 *Beta proteobacterium* 的菌群占优势, 其中一些可能与石油污染中芳香烃类的降解直接相关。

石油污染物进入土壤后, 由于特殊碳源的富集选择作用, 会明显改变土壤中细菌的优势种群构成, 这已为许多研究所证实。与未污染的土壤相比, 受污染土壤中细菌属的多样性明显较低, 而其中细菌的数量和活性却较高^[16, 17]。这是因为石油污染带来的芳香烃类具有毒害作用, 使得那些能够适应和利用新底物的细菌类群得到选择性地富集, 那些能够利用具有生物毒性的芳香烃类污染物的细菌种类在细菌群落中容易成为优势种群, 从而最终改变受污染土壤中细菌群落组成, 使得受重污染的土壤中细菌种群多样性比未受污染的低。

DGGE 是一种 DNA 指纹图谱技术之一, 自 1993 年 Muyzer 等^[15]首次将 DGGE 用于细菌生态学领域研究以来, 该技术迅速引起细菌生态学家的关注, 现已发展成为环境细菌群落结构分析研究的主要手段之一。在将 DGGE 技术用于环境样品的研究中, 通常用 DGGE 指纹图谱中条带数目的多少来反映细菌种群的多样性, 用染色后不同条带的染色强度反映不同细菌种群的丰度。然而, 新近的研究表明, DGGE 虽能将仅有一个碱基序列差异的 DNA 片段区别开来, 但对有多个碱基序列差异的 DNA 片段的分离仍有局限性^[18]。利用 DGGE 图谱对不同样品中细菌多样性进行评估时, 仅仅存在于群落中的丰度较高的菌群

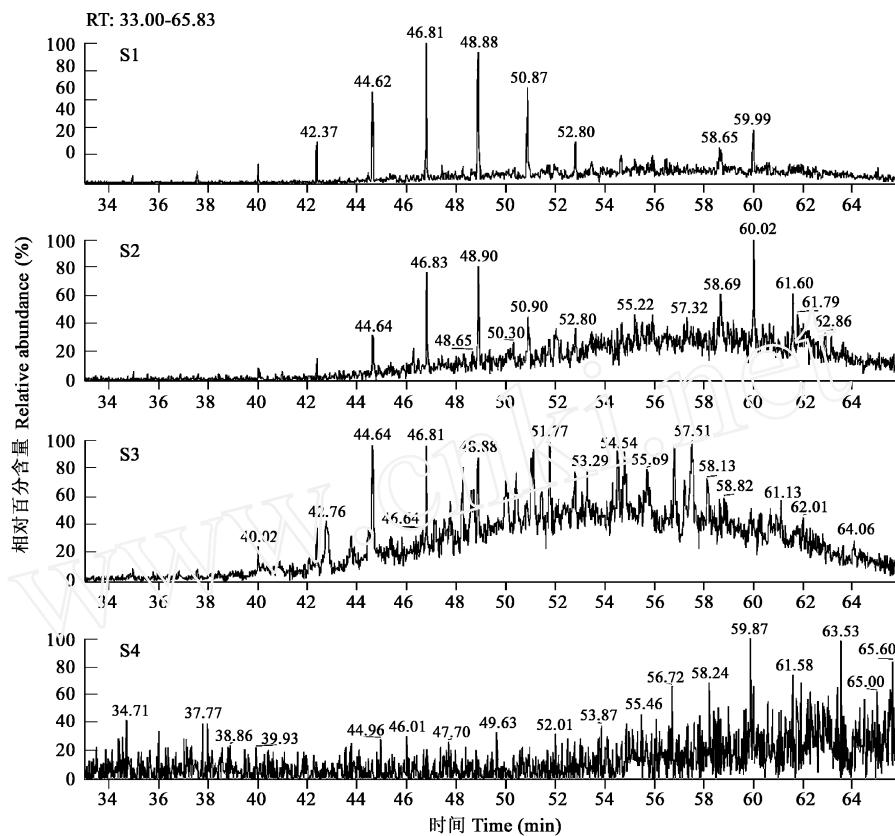


图4 4个样品中的芳香烃GC-MS图谱

Fig. 4 M/z178 GC-MS of aromatic hydrocarbon fractions in 4 petroleum-contaminated soil samples S1, Sample 1; S2, Sample 2; S3, Sample 3; S4, Sample 4

的DNA片段能够被展示出来,且序列不同的DNA片段有可能具有相近迁移率从而在胶的同一位置重叠。已有研究表明,对环境样品进行DGGE条带分析时,一条DGGE条带有可能并非只代表一种细菌^[19],且DGGE条带的强弱不仅和细菌种群的16S rDNA的拷贝数、DNA模板量,而且与不同类型的细菌种群有着相同的迁移行为有关,这有可能使我们低估了环境细菌的种群多样性^[20~22]。因此DGGE仅能以定性和半定量方式将群落结构展示出来。本研究中共切胶分离14条DGGE条带,仅有9个DGGE条带能够被测序分析,其余5个条带因具有多态性而未获测序结果,需要分别构建克隆文库逐个分析。因此,要对环境样品中的细菌种群多样性进行更为准确的描述,有必要将DGGE和其它分子生物学方法相结合起来进行研究。

DGGE主要条带分析结果表明,*Mycobacterium*和*Bacillus*在石油污染程度较轻的样品1中有较高的丰度,而*Flavobacterium*和*Azospira*菌群在污染程度较重的样品中有丰度较高。通过对与DGGE条带所代表操作单元同源性较接近的已报道细菌来源进行追索,结果表明它们大都与芳香烃类化合物的降解有关,进一步证实石油污染物对那些能够耐受和利用芳香烃类污染物的细菌类群起到了选择性地富集作用。

4 结论

4.1 石油污染程度不同的土壤样品中,细菌、真菌、放线菌在数量均存在差异。这种差异与石油污染的程度、污染物的种类及组成成分有关。

4.2 从污染土壤中分离得到的28株石油降解菌,分别属于短杆菌属、假单胞菌属、邻单胞菌属、微球菌属等4个菌属,具有较高石油降解率的细菌以短杆菌属和假单胞菌属为主。

4.3 结合培养与免培养的PCR-DGGE技术进行分析,能够对石油污染土壤的细菌多样性进行较深入的分析。

References

- [1] Sorkhoh N A, Ghannoun M A, Ibrahim A S, et al. Crude oil and hydrocarbon degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait. *Environ Pollut*, 1990, **65**(1): 1~7.
- [2] Vecchiboli G I, Del Panno M T, Pimenta M T. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in © 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

- soil *Environ Pollut*, 1990, **67**(3): 249~ 258
- [3] M ilekhina E I, Borzenkov IA, Zvyagintseva IS, et al Characterization of a hydrocarbon-oxidizing *Rhodococcus erythropolis* strain isolated from an oil field *Microbiology New York*, 1998, **67**(3): 271~ 274
- [4] Surzhko L F, Finkel'shtein Z I, Baskunov B P, et al Utilization of oil in soil and water by microbial cells *Microbiology New York*, 1995, **64**(3): 330~ 334
- [5] Sidorov D G, Borzenkov IA, Ibatullin R R, et al A field experiment on decontamination of oil polluted soil employing hydrocarbon-oxidizing microorganisms *Prikl B iokhim M ikrobiol* (Russ), 1997, **33**(5): 497~ 502
- [6] Susan C W, Kevin C J. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons(PAHs):A review. *Environ Pollut*, 1993, **81**(3): 229~ 250
- [7] Guzev V S, Khalimov E M, Volde M I, et al Regulatory effect of glucose on hydrocarbons oxidizing microorganisms in soil *Microbiology New York*, 1997, **66**(2): 124~ 128
- [8] Sarah J M, John R S, Albert D V, et al Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(5): 2222~ 2229
- [9] Chen P Y, Brian K K. Mycobacterium Diversity and Pyrene Mineralization in Petroleum-Contaminated Soils *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(5): 2222~ 2229
- [10] Raeid M M, Nimer M D, Jurgen K, et al Microbial Diversity of a heavily Polluted Microbial Mat and Its Community Changes following Degradation of petroleum Compounds *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(4): 1674~ 1683
- [11] Julietten N R, Robert T A, Jocelyn L F, et al Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(7): 3056~ 3063
- [12] Xie Zhongge. *The analysis technology of oil pollution in the environment*, Beijing, China Environmental Science Press, 1987. 82~ 83
- [13] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (Ninth Edition), Williams & Wilkins Baltimore, Maryland, USA, 1994. 705~ 707.
- [14] Zhou J, Bruns M A, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(7): 316~ 322
- [15] Muyzer G, de Wall 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 rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(3): 695~ 700
- [16] Trzesicka lynnartz-D. Degradation of polycyclic aromatic-hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component purecultures, obtained from PAH-contaminated soil *Canadian Journal of Microbiology*, 1995, **41**(6): 470~ 476
- [17] Guanghe L, Xu Z, Wei H. Characteristics of Degrading Microorganism Distribution in Polluted Soil with Petroleum Hydrocarbons *Environmental Science*, 2000, **4**: 61~ 64
- [18] Jackson C R, Roden E E, Churchill P F. Denaturing gradient gel electrophoresis can fail to separate 16S rDNA fragment with multiple base differences *Mol Biol Today*, 2000, **1**(2): 49~ 51.
- [19] Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, et al A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis *Biochemical Letters*, 2001, **23**: 1205~ 1208
- [20] Gao P P, Chao Q F, et al Population dynamics and community structure of bacteria in an industrial phenol-degrading process analyzed with Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), *Acta Ecologica Sinica*, 2003, **23**(10): 1963~ 1969.
- [21] Schabereiter C, Saiz-Jimenez C, Pinar G, et al Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings *Environ Microbiol*, 2002, **4**(7): 392~ 400
- [22] Murray A E, Hollibaugh J T, Orrego C. Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(7): 2676~ 2680
- [23] Gauthier E, Deziel E, Villeneuve R, et al Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. *J Appl Microbiol*, 2003, **94**(2): 301~ 11.
- [24] Bogan B W, Lahner L M, Sullivan W R, et al Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. *J Appl Microbiol*, 2003, **94**(2): 230~ 238
- [25] Dandie C E, Thomas S M, Bentham R H, et al Physiological characterization of *Mycobacterium* sp. strain 1B isolated from a bacterial culture able to degrade high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **9**(10): 246~ 255
- [26] Chen H, Tang X S, Lin J, et al Community Constitute and phylogenetic Analysis on Soil Cultured Microorganism. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, **42**(4): 479~ 483

参考文献:

- [12] 谢重阁. 环境中石油污染物分析技术. 北京: 环境科学出版社, 1987. 82~ 83
- [17] 李广贺, 张旭, 黄巍. 石油污染包气带中降解细菌的分布特性. *环境科学*, 2000, **4**: 61~ 64
- [20] 高平平, 晁群芳, 张学礼, 等. TGGE 分析焦化废水处理系统活性污泥细菌种群动态变化及多样性. *生态学报*, 2003, **23**(10): 1963~ 1969.
- [26] 陈灏, 唐小树, 林洁, 等. 不经培养的农田土壤细菌种群构成及系统分类的初步研究. *微生物学报*, 2002, **42**(4): 479~ 483.