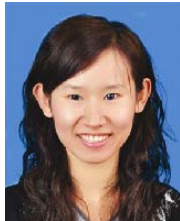


doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.01.003

东营石油污染区微生物多样性 及优势菌假单胞菌对甲苯的降解

张 晓

(济宁医学院生物科学系, 山东 日照 276826)



张晓, 1986年7月生, 理学博士。2013年6月毕业于山东大学微生物重点实验室。已在国内外相关刊物上发表SCI论文3篇, 核心期刊论文1篇。2008年至2009年参与国家自然科学基金项目“植酸酶耐热的分子机理研究”研究; 2008年至2009年参与山东省自然科学基金项目“N,O-二乙酰胞壁质酶耐酸性的分子改造”的研究; 2009年至2012年参与国家青年科学基金项目“恶臭假单胞菌降解单环芳烃时的蛋白质表达研究”的研究。对菌种筛选鉴定、PCR、基因突变、基因敲除、蛋白纯化、工程菌发酵、动物免疫等实验技术精通, 能熟练运用各类PCR技术、激光共聚焦显微镜技术、实时荧光定量技术、蛋白抗体制备、高效液相色谱、蛋白质各类纯化技术、蛋白双向电泳、Western blotting 及各类生化实验等。博士阶段研究方向为资源与环境微生物学, 运用蛋白载体过量表达、基因敲除、荧光实时定量PCR等技术, 确定几种与SOS系统相关基因在恶臭假单胞菌生物膜生成过程中的影响, 并进一步研究其在污水处理中的作用。

摘 要 目的 随着石油及其产品对环境的污染越来越受到重视, 利用土壤微生物修复方法治理石油污染土壤得到了越来越多的关注。土壤中各种微生物可以吸收、降解和转化土壤中的污染物, 使污染物的浓度降低或转化为无害的物质。本实验研究了东营石油污染区微生物的多样性及假单胞菌对甲苯的降解。**方法** 对山东东营胜利油田附近区域的土壤微生物群落通过分子生物学方法进行分析研究, 用大田实验研究了假单胞菌对甲苯的降解。**结果** 确定了不同污染程度土壤中微生物多样性的变化, 证明污染程度不同的区域具有相似的优势菌群。随着污染程度变化, 微生物种类有所差异。优势菌群具有良好的污染物降解能力。**结论** 对污染区微生物多样性及菌群对有机物的降解的研究, 有助于利用生物降解的方法应对有机物的污染。

关键词 微生物多样性; 假单胞菌; 生物降解

中图分类号: X74 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2014)02-010-04

The research of microbial diversity in Dongying petroleum contaminated zone and the degradation of toluene by advantage bacterium pseudomonas

ZHANG Xiao

(College of Life Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract; Objective With more attention paid to the pollution of oil and its products to the environment, the methods using soil microorganism repair to improve petroleum contaminated soil become more and more significant. Microorganisms in the soil could absorb, degrade and transform soil pollutants, or reduce the concentration of the pollutants into harmless substance. This experiment studied the microbial diversity of Dongying oil pollution area and the degradation of toluene by pseudomonas. **Methods** We used molecular biology methods to study the soil microbial communities in the vicinity of the Shandong Dongying Shengli oilfield. The degradation of toluene by pseudomonas was studied by field experiment. **Results** We confirmed the changes of different degree of pollution in the soil microbial diversity, and the different areas have the similar advantage bacterium groups. With the changes of the degree of pollution, microbial species became different. Advantage bacterium groups had good ability to

degrade pollutant. **Conclusion** The study of microbial diversity in pollution area and the degradation of organics can be used to manage the organic matter pollution with biodegradation.

Key words: Microbial diversity; Pseudomonas; Biodegradation

石油是一种由大量的烃类和少量其他有机物组成的复杂混合物^[1]。石油中最常见的污染物质为苯、甲苯、乙苯和 3 种异构体二甲苯(以上芳烃合称 BTEX)^[2-3]。随着石油的开采和对其用量的增加,许多的石油及其加工品进入到环境中,对环境造成了严重的污染,也给人类及其它生物带来了危害。

土壤石油污染的来源主要包括:在石油的开采、运输及使用过程中溢出和泄漏的石油直接进入土壤,对土壤造成严重的污染;含油矿渣的渗入;石油冶炼、石油化工厂的生产过程中的可挥发成分进入大气后通过降尘进入土壤中;含油污水的灌溉;工业垃圾的渗入等。

国内外很多研究表明,石油及其产品进入土壤后,能够降低土壤中微生物的多样性,使微生物群落结构和组成发生改变,降解菌群逐渐成为群落中的优势菌群^[4]。随着石油及其产品对环境的污染越来越受到重视,相关的治理方法得到了广泛应用,主要包括 3 类:物理、化学和生物治理。其中,利用土壤微生物修复方法治理石油污染土壤得到了越来越多的关注^[5]。土壤的微生物修复是利用土壤中的各种微生物对污染物进行吸收、降解和转化,从而使污染物的浓度降低或转化成无害的物质。大部分降解石油的微生物是在好氧的条件下,将有机物逐步降解,但也有一部分微生物可以在厌氧的条件下利用各种石油烃类物质做能量,使石油污染物被降解。BTEX 的有氧降解主要是通过单加氧酶(主要是真核微生物)或双加氧酶(主要原核微生物)将原子氧引入芳香环中,形成中间物邻苯二酚,邻苯二酚再通过邻位或间位途径引起芳香环的断裂,最终形成三羧酸循环的中间产物进入三羧酸循环。在厌氧条件下,将微生物芳香环还原并能使其开环生成脂肪酸。

目前已发现自然界中能够降解石油污染物的微生物包括细菌、真菌和藻类等共 100 多个属,200 多个种^[6]。其中降解石油污染物的细菌有 28 个属,主要包括假单胞菌属、节杆菌属、产碱杆菌属、棒状杆菌属、黄杆菌属、芽孢杆菌属、微球菌属、微杆菌属等。常见的降解石油的真菌主要包括木霉属、青霉属、曲霉属、毛霉属及假丝酵母属、毕赤氏

酵母菌属等共 58 个属^[7-8]。

土壤微生物多样性包括在栖息地中微生物分类群的多样性和在微生物分类群内的遗传多样性,以及包括群落结构的变异性、相互作用的复杂性、营养水平和共位群数量、功能多样性在内的生态多样性^[9-12]。随着分子生物学的发展,各种分子生物学手段,如 RFLP, RAPD, ARDRA, SSCP 和 DGGE 等方法已经被广泛应用于土壤微生物多样性的研究,越来越多的降解微生物新物种得到鉴定和应用^[13-15]。

已有的研究报道表明石油类污染物能够改变土壤微生物的多样性及其群落结构组成,进而导致土壤功能的变化^[16-17]。本论文对石油污染区微生物群落多样性进行了研究,并对其中降解菌假单胞菌对甲苯的降解做了分析,以期应用于石油烃污染土壤微生物修复的实际工作。

1 研究方法

1.1 土壤样品的采集以及土壤中原有微生物种类的研究

土样于 2011 年 10 月采自山东东营胜利油田油井周围 3km, 10km 以及东营市区个 6 个采样点。用不锈钢土钻分别取表层 0~20cm 土壤,将采集的土壤样品用无菌采集袋保管于采集箱中立即带回实验室,将同样的 5 份土样混匀、分装,置于 4℃ 保存。称取定量土样加热蒸馏出总挥发性有机物质,以此代表土样中总污染物含量,所测土样中总石油污染物含量如表 1 所示。表中可以看出,在距离钻井最近的 3km 采样区,污染物含量最高,而市区因为大气污染等各种因素影响,其污染物含量在不同区域变化较大。

表 1 各采样点石油污染物含量

采样点 编号	3km						10km						市区					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
石油量 (mg/kg)	45	40	25	55	125	50	10	3	20	8	10	30	15	25	10	5	35	1

采用土壤基因组 DNA 提取试剂盒(MP Bio-medicals)按指示方法提取土壤中总 DNA 后利用通用上游引物(5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-

CAG-3') 和下游引物 (5'-ACGGCTACCTTGT-TACGACTT-3') 进行 PCR 扩增后进行电泳分析, 用凝胶成像系统 (Bio-Rad) 拍照 (图 1), 对凝胶图像进行分析。

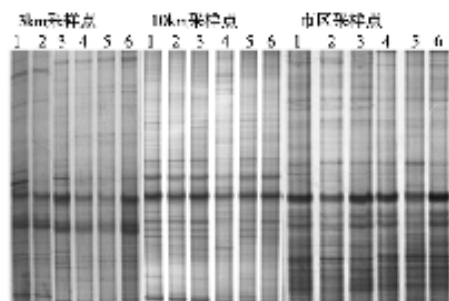


图 1 不同采样点土样总 DNA 的 DGGE 分析

电泳图像 (图 1) 分析表明, 土壤样品基因组中共有 53 个不同的带型, 每个土样均含有 15~35 种不同条带, 且相同采样区各土样均存在同样的高丰度的条带, 表明各土样具有相似的优势菌群, 种类数目变化不明显, 这些优势菌群在不同程度的石油污染土壤中均能够较好地生存繁殖。同时在不同样品采集区域的微生物群落呈现出较大的差异, 体现在某些条带的增加, 缺失以及条带深浅的变化上。在靠近采油井的地区, 样品条带较少, 微生物种类较其他地方有所下降, 在市区, 微生物种群增多, 变化较为明显。越靠近污染源, 所存在的微生物越适应于石油污染环境, 趋向于某些稳定种类占了主导优势而其他微生物的生长受不同程度抑制, 微生物种类有所减少。而在市区, 环境复杂, 各种污染物成分多样, 导致微生物种群数目明显增多。

1.2 不同污染程度土壤微生物群落相似性分析

依据图 1 中微生物种群分布, 利用 Jaccard 群落相似性系数计算工具, 通过 SPSS 10.0 可以得到 3 个不同土壤生境之间微生物群落的相似性系数。如表 2, 表 3, 表 4 所示, 在同类采集区域的不同采样点, 各微生物群落的相似性系数较高, 表明在相似的石油污染区域, 微生物群落相似性较大, 微生物种类和数量的差异性较小。

表 2 距井口 3km 采样点微生物相似性比较 (p/%)

采样点	1	2	3	4	5	6
1	100					
2	95.3	100				
3	92.1	89.9	100			
4	96.3	91.5	90.3	100		
5	88.3	87.7	72.9	93.4	100	
6	97.9	95.4	91.7	94.2	96.1	100

表 3 距井口 10km 采样点微生物相似性比较 (P/%)

采样点	1	2	3	4	5	6
1	100					
2	95.3	100				
3	97.1	92.5	100			
4	91.3	87.5	89.7	100		
5	92.5	96.1	90.7	87.9	100	
6	89.5	95.1	94.3	92.8	91.7	100

表 4 市区采样点微生物相似性比较 (P/%)

采样点	1	2	3	4	5	6
1	100					
2	97.7	100				
3	96.1	98.2	100			
4	95.4	91.8	90.4	100		
5	92.7	89.6	88.7	93.3	100	
6	96.9	94.4	92.2	96.9	91.2	100

对不同采集区域的微生物群落进行比较 (表 5) 发现, 不同采样区域的土壤中微生物含量以及种类差异较大, 表明污染物含量对微生物菌群生长的影响比较显著, 在较为严重的污染区, 微生物种类趋向减少, 优势菌生长状况良好, 较轻污染区具有更为优良的竞争优势。对优势菌种 16S 条带进行序列分析, 经 NCBI 数据库比对, 发现这些微生物包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 节杆菌属 (*Arthrobacter*), 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*), 以及一些不可培养微生物等。假单胞菌属的几种微生物在环境中广泛存在, 可催化多种污染物的降解, 包括一些不易被其他微生物降解的有机物质。对单环芳烃和多环芳烃的降解, 假单胞菌都发挥着重要作用。

表 5 距井口 3km、10km 及市区采样点微生物相似性比较 (P/%)

采样点	3km			10km			市区		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
3km-1	100								
3km-2	95.3	100							
3km-3	92.1	89.9	100						
10km-1	80.5	79.8	82.3	100					
10km-2	78.3	82.1	75.7	95.3	100				
10km-3	79.3	75.2	73.4	97.1	92.5	100			
市区 1	65.2	64.7	62.2	68.7	67.1	69.4	100		
市区 2	60.5	63.2	61.4	69.5	68.8	66.2	97.7	100	
市区 3	62.5	61.8	60.9	67.3	65.8	67.7	96.1	98.2	100

1.3 假单胞菌对单环芳烃的降解

将分离的假单胞菌培养后分别接种入 1kg 不同甲苯含量的土样中,置于大田中,在 7~9 月份测定甲苯降解状况发现,接种恶臭假单胞菌后,在 1 周内甲苯含量下降较快,然后逐渐趋于缓慢降低状态,采集土样稀释平板涂布发现,如表 6 所示,接种后可培养微生物中主要为假单胞菌,菌落数在 3d 后开始急剧下降,最终趋于稳定。由于最初的高浓度底物甲苯的挥发以及其被大量微生物迅速代谢,随着物理条件的变化导致部分假单胞菌死亡,剩余菌种对甲苯的代谢趋于平稳,假单胞菌成为该土样中优势菌。

表 6 每克土样中可培养微生物菌落数

时间	3d	7d	2 周	1 个月	2 个月
菌落数 cfu/mg 土	108	105	104	104	104

2 结论

选取东营不同地区不同污染程度的土壤,测定土壤中微生物的多样性,发现相似的取样区域范围内,微生物种群基本保持稳定,种类和数目较为相似。而在污染较为严重的区域,微生物种群较生态环境复杂的市区土壤中的微生物群落更为简单,具有明显的优势菌群,主要是假单胞菌,节杆菌,鞘氨醇单胞菌以及一些不可培养的未知微生物。

对甲苯污染土壤接种假单胞菌后研究 7 对微生物菌群的影响,发现接种初期由于假单胞菌能迅速降解甲苯,所以土壤中微生物主要是假单胞菌;2 周后逐渐发现其他微生物,最终各微生物形成稳定群落,假单胞菌作为降解菌占据优势地位。

强化生物修复可短期内增强降解作用,但增加的微生物在本研究中并不能长期大量在野外存活。

参考文献:

[1] Basumatary B, Saikia R, Bordoloi S. Phytoremediation of

crude oil contaminated soil using nut grass, *Cyperus rotundus*[J]. J Environ Biol, 2012, 33(5):891-896.

[2] Singh A, Singh B, Ward O. Potential applications of bioprocess technology in petroleum industry[J]. Biodegradation, 2012, 23(6):865-880.

[3] 邓旺秋,潘超美,李泰辉,等. 油页岩废渣场植林修复过程中的土壤微生物生态[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(5): 522-552.

[4] 刘期松,齐恩山,张春桂等. 石油污水灌区的微生物生态及其降解石油的研究[J]. 环境科学, 1981, 2(3):161-177.

[5] 丁克强,骆永明. 生物修复石油污染土壤[J]. 土壤, 2001, 33(4):179-198.

[6] 张久根,蔡士悦. 土壤矿物油及其污染[J]. 农业环境保护, 1993, 12(4):166-171.

[7] 顾传辉,陈桂珠. 石油污染土壤生物修复[J]. 重庆环境科学, 2001, 23(2): 42-44.

[8] 李丽,张利平,张元亮. 石油烃类化合物降解菌的研究概况[J]. 微生物学通报, 2001, 28(5):89-98.

[9] Benitez E, Melgar R, Nogales R. Estimating soil resiliencet Oatotoxicorganic waste by measuring enzyme activities[J]. Soil Biol Biochem, 2004, 36(10):1615-1662.

[10] Garcia-Gil JC, Plaza C, Soler-Rovira P, et al. Long-term effects of municipal soli waste compost application on soli enzyme activities and microbial biomass[J]. Soil Biol Biochem, 2000, 32(13):1907-1910.

[11] 任磊,黄廷林. 石油污染土壤的生物修复技术[J]. 安全与环境学报, 2001, 1(2):50-55.

[12] 李习武,刘志培. 石油烃类的微生物降解[J]. 微生物学报, 2002, 42(6):764-776.

[13] 席劲琰,胡洪营,钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学报, 2003, 1(13):78-85.

[14] 周礼恺,郑巧英,宋妹. 石油烃和酚类物质在土中的生物降解与土壤酶活性[J]. 应用生态学报, 1990, 1(2):149-155.

[15] 钟文辉,蔡祖聪. 土壤微生物多样性研究方法[J]. 应用生态学报, 2004, 15(5):899-904.

[16] 宋玉芳,常士俊,李利. 污灌土壤中多环芳烃(PAHs)的积累与动态变化研究[J]. 应用生态学报, 1997, 8(1):93-98.

[17] 柴丽红,王涛,李沁元,等. 应用 DGGE 法对青海相邻两盐湖中细菌多样性的快速检测. 生物学杂志, 2003, 20(1):14-19.

(收稿日期 2014-02-28)