

沈抚石油污水灌区稻田土壤细菌遗传多样性 ——16S rDNA-PCR-DGGE 分析*

李 慧¹ 张 颖¹ 苏振成¹ 徐 慧¹ KRAVCHENKO Irina² 张成刚¹

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 中国科学院陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016)

(2. Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, 117312 Moscow, Russia)

摘 要 以不依赖于培养的 16S rDNA-PCR-DGGE 技术, 评价了石油污染对我国最大的石油污水灌区——沈抚灌区稻田土壤细菌遗传多样性的影响, 并对微生物群落中的优势菌群进行了研究。结果表明, 沈抚灌区土壤总石油烃 (Total petroleum hydrocarbon, TPH) 含量为 277~5 213 mg kg⁻¹ 干土, TPH 在灌区干渠和支渠中的积累和分布趋势大体上是上游地区较严重, 下游地区较轻, 并且与土壤中有机质含量呈显著正相关 ($r = 0.691, p < 0.05$)。在目前的污染程度下, 石油污水能够刺激土壤好氧异养细菌 (Aerobic heterotrophic bacteria, AHB) 的生长, 其数量与 TPH 含量呈显著正相关 ($r = 0.928, p < 0.001$), 而细菌遗传多样性与 TPH 含量呈显著负相关 ($r = -0.715, p = 0.013$)。DGGE 图谱优势条带测序结果表明沈抚灌区土壤细菌群落中的优势菌群为变形细菌 (Proteobacteria) -亚群和 -亚群的菌种, 这些优势菌群的形成可能与石油烃的生物降解有关。

关键词 污水灌溉; 石油污染; 细菌遗传多样性; 16S rDNA; DGGE

中图分类号 X172 **文献标识码** A

沈抚污灌区位于辽宁省沈阳和抚顺两市的郊区, 其上游和中游地区从 20 世纪 40 年代末就已经开始接受主要来自抚顺石油二厂的污水灌溉。从 1960 年开始正式修建沈抚灌渠, 始自抚顺市石油二厂, 全长 70 km, 使污灌范围扩展至沈阳和抚顺 2 市 4 个县区的 11 个乡镇, 到 1985 年, 沈抚两地灌溉面积达 1×10^4 hm², 成为中国最大的石油类污水灌区^[1, 2]。至今, 沈抚灌区的大部分地区仍然采用含油污水进行灌溉。长期污水灌溉对该地区灌溉水质、土壤理化性质、污染物成分及粮食品质等的影响已做过一些调查分析^[2~5], 结果表明, 随着大量超标污水未经处理长年直接排入灌渠中, 导致灌渠内水质日趋恶化, 土壤中芳烃、挥发酚、重金属等严重超标, 在上游地区造成水稻秧苗生长速度缓慢、烂根、粒瘪, 产出的大米口感差, 有浓重的石油味, 此外土壤出现轻度盐渍化。但是, 对土壤细菌多样性和优势菌群的研究, 由于受到传统研究方法的限制, 在 20 世纪 80 年代仅对可培养微生物进行了一些有限的研究^[1]。然而土壤中仅有 0.1%~20% 左右的微生物是可培养的^[6], 因此利用传统的微生物培养方法研究环境中微生物群落的多样性时, 必将失去大部分的物种信息, 从而使研究结论不够全面。

土壤微生物生态系统中微生物种群的数量、结构组成及其多样性是一个随着环境条件不断变化的动态过程, 外源污染物进入土壤后, 首先会影响土壤微生物的生理生化活性, 进而影响土壤微生物群落的多样性。应用分子生物学方法研究土壤微生物多样性, 可以直接从环境样品中获取生命信息物质——DNA, 克服了传统微生物学利用人工培养基培养微生物细胞的研究方法的缺陷, 可得到更为全面的生物信息。自从 1993 年 Muzyer 等^[7]将变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 应用于微生物生态学领域中以来, 作为检测群落多样性、丰度和均度最为敏感群落指纹分析技术, 已广泛应用于污染土壤微生物多样性的研究^[8]。此外, 扩增片段可以从 DGGE 胶中直接回收测序, 也为群落结构组成研究提供了方便。本工作首次以 16S rDNA-PCR-DGGE 技术评价长期石油污水灌溉对沈抚灌区稻田细菌多样性的影响, 并对群落中的优势菌群进行了研究。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

供试土样于 2003 年 7 月采自沈抚污灌渠干渠

* 沈阳大学环境工程重点实验室基金项目、国家重点基础研究发展计划项目 (2004CB418505) 和国家自然科学基金项目 (30670391) 资助
作者简介: 李 慧 (1977~), 女, 辽宁锦州人, 博士, 助理研究员。主要从事环境微生物分子生态学方面的研究, 发表论文 6 篇。E-mail: lihui197780@sohu.com

收稿日期: 2006-04-30; 收到修改稿日期: 2006-08-08

及支渠上、中、下游地区的稻田及旱田。选取在灌溉历史及地理位置上有代表性的 13 个样地,每个样地随机选取 5 个采样点,分别取表层 0~20 cm 土壤样品 1 kg,将采集的土壤样品立即带回实验室,将同样地的 5 份土样混匀、分装,置于 4℃ 保存,备用。采样地点如图 1 所示,样点 A 位于干渠上游,污灌 20a 后改清水灌溉 30a 以上;样点 B 位于干渠上游,污灌 20 a 后改旱田耕作 30 a 以上;样点 C、D 和 E 分别位于上游支渠下 3 池、下 6 池和下 9 池,均污灌 50 a 至今;样点 F、G 和 H 分别位于干渠中游上部、中部和下部,均污灌 50 a 至今;样点 I 位于干渠下游上部,污灌 30 a 后改清水灌溉 10 a;样点 J 位于干渠下游中部,污灌 40 a 至今;样点 K 位于干渠下游下部,污灌 30 a 后改旱田耕作 10 a;样点 L 位于干渠下游下部,污灌 30 a 后改清水灌溉 10 a;样点 M 位于渠末,污灌 20 a 后改清水灌溉 20 a。

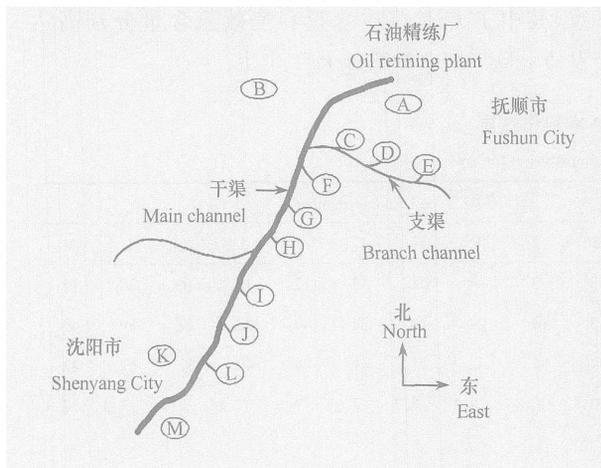


图 1 沈抚灌区土样采集地点示意图

Fig. 1 Distribution of soil sampling sites in the Shenfu Irrigation zone

1.2 土壤中总石油烃 (Total petroleum hydrocarbon, TPH) 的提取及测定

将采集的土样风干过 1 mm 筛,称取 10 g 土样,置于 50 ml 玻璃离心管中,加入 20 ml 正己烷,置于超声水浴中超声提取 20 min,4 000 min^{-1} 离心 5 min,收集上清,再加入 20 ml 二氯甲烷继续超声提取 20 min,4 000 min^{-1} 离心 5 min,上清与上次合并,最后再加入 20 ml 氯仿,超声提取 20 min,4 000 min^{-1} 离心 5 min,将 3 次上清合并,用无水硫酸钠除水,接收滤液于已知重量的恒重烧杯中,室温放置使溶剂挥发至干,重量法测定总石油烃 (TPH) 含量^[9,10]。

1.3 可培养好氧异养细菌数量测定

称取约 10 g 鲜土样置于已灭菌的装有玻璃珠的

三角瓶中,加入 100 ml 0.85% 无菌 NaCl 水溶液,振荡 10 min 使土样分散成为均匀的土壤悬液。对土壤悬液进行梯度稀释,取 10^{-4} ~ 10^{-6} 稀释度涂布牛肉膏蛋白胨琼脂平板,30℃ 倒置培养 4 d,选取含 30~100 个菌落的平板进行计数^[11]。

1.4 细菌遗传多样性及优势菌群分析

1.4.1 土壤基因组 DNA 提取和纯化

采用改进的化学裂解法直接从土壤样品中提取基因组 DNA^[12]。

1.4.2 PCR 扩增细菌 16S rDNA $V_1 \sim V_3$ 高变区

选用细菌通用引物 8f 和 519r 扩增 16S rDNA 基因 $V_1 \sim V_3$ 高变区^[13]。引物 8f (对应 E. coli 16S rRNA 的 8 到 27) 的序列为 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3,引物 519r (对应 E. coli 16S rRNA 的 519 到 533) 的序列为 5-GTATTACCGCGGCTCTG-3。在引物 8f 的 5 末端连一段约 40bp 的富含 GC 的序列 5-CGCCCGC-CGCCCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGG-3,以提高 DGGE 的分离效果。50 μl 的 PCR 反应体系组成如下:1 μl DNA 模板,10 \times PCR 反应缓冲液 5 μl ,2.5 mmol L^{-1} dNTP 混合溶液 4 μl ,20 pmol L^{-1} 引物 8f-GC 1 μl ,20 pmol L^{-1} 引物 519r 1 μl ,Taq 酶 (5U μl^{-1}) 0.25 μl ,加灭菌去离子水至总体积为 50 μl 。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,65℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 3 min,前 20 个循环退火温度每个循环降低 0.5℃,后 15 个循环退火温度维持在 55℃,总计 35 个循环。最后在 72℃ 延伸 8 min。PCR 反应的产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.3 PCR 产物 DGGE 分离及 DGGE 图谱的分析

制备 1 mm 厚 8% (w/v) 聚丙烯酰胺凝胶,变性剂浓度梯度为 35% ~ 70% (100% 变性剂组成为 7 mol L^{-1} 尿素和 40% (v/v) 去离子甲酰胺)。加样后,置于 1 \times TAE 缓冲液中 80 V 电泳 16 h。电泳完毕,取下凝胶,置于含 SYBR Green I (1:10 000 稀释) 的 1 \times TAE 缓冲液中染色 20 min^[7]。用凝胶成像系统 (Gel Doc 20 00™ Chemi Doc™ Gel Documentation Systems, Bio-Rad) 捕获凝胶数字图像,并用图形分析软件 (Quantity One 4.2.3, Bio-Rad) 对凝胶图象进行分析。各泳道图谱的相似性可以通过计算 Dice 系数来比较,聚类树状图用非加权配对算术平均法 (UP-GMA) 生成。泳道光密度曲线上的峰面积代表条带密度,条带密度的数值代入 S-W 指数计算公式,计算每个土壤样品细菌的多样性。

$$\text{S-W 指数计算公式}^{[14]} \text{ 为 } H' = \sum_{i=1}^s P_i \times \ln P_i, P_i$$

2.2 总石油烃 (TPH) 在沈抚灌区土壤中的积累与分布规律

沈抚灌区各采样点总石油烃含量测定结果如图 2

所示,对比各样点 TPH 含量与表 1 中有机质含量的数据,结果表明稻田土壤中(不包括 B 点和 K 点) TPH 含量与有机质含量呈显著正相关 ($r=0.691$, $p=0.018$)。

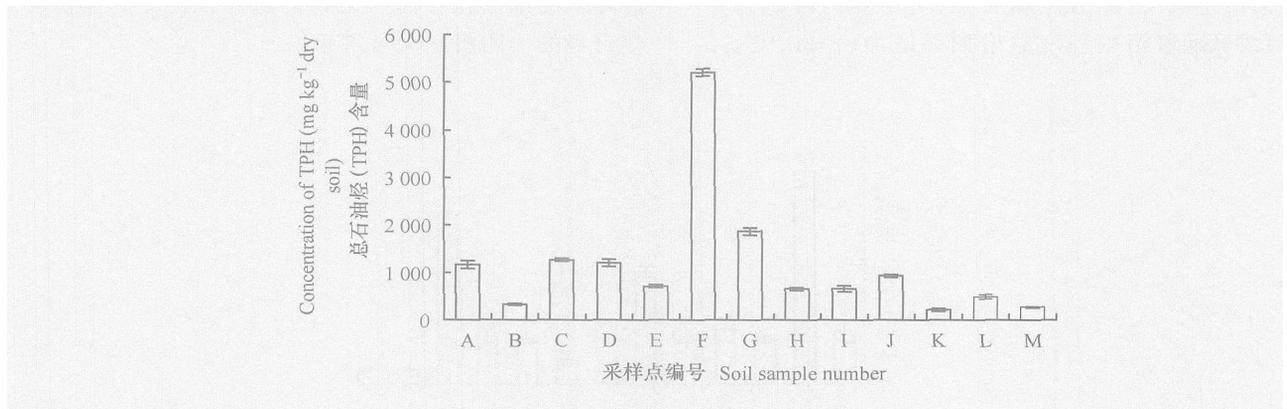


图 2 沈抚灌区各样点总石油烃 (TPH) 含量

Fig. 2 TPH concentrations of the soil samples from the Sherfu Irrigation zone. Error bars ($n=3$) indicated standard deviations

由图 2 还可以看出 TPH 在污灌地区干渠和支渠中的分布趋势大体上都是上游地区较严重,下游地区较轻。污染最严重的 F 点位于干渠中游上部,TPH 含量高达 5213 mg kg^{-1} 干土,严重超过了环境容量 500 mg kg^{-1} 干土^[10]。而至渠末的 M 点,TPH 含量仅为 277 mg kg^{-1} 干土,与附近地区从未接受污灌的相同性质稻田土壤 TPH 含量的本底值 184 mg kg^{-1} 干土相比,差别已不太明显。支渠上的 C、D 和 E 点的 TPH 含量分别为 1266 、 1208 和 715 mg kg^{-1} 干土,也是由上游至下游依次递减。石油烃污染物的这种积累和分布规律可能是污染物的自身沉积以及土壤、土壤-植物系统对污染物的吸附吸收和土壤微生物降解的综合作用结果,此外,农事活动也可能有较大的影响作用。值得讨论的是,TPH 在灌区中积累最高的点(F 点)位于中游上部地区,而不是上游地区,这可能与土壤的质地有关。上游地区为砂土,对石油烃的吸附作用小,而中游地区为粘土,对石油烃污染物吸附作用强,因此导致 TPH 在表层土壤中大量累积。TPH 在污灌地区的积累与分布规律与宋玉芳等^[5]报道的多环芳烃(PAHs)的积累与分布规律相似,这表明沈抚灌区土壤中总油的成分大部分为 PAHs,总油中的一些轻组分和直链烃可能在长期污灌的过程中由于物理作用挥发或被土壤微生物降解。

上游的 A 点、C 点以及下游的 J 点、L 点分别是地理位置相近的 2 块稻田(图 1),所不同的是 A 点与 C 点相比,A 点在 23 a 前已改用井水灌溉,而 L 点与 J

点相比,L 点在 10 a 前改用井水灌溉,A 点和 L 点的 TPH 含量均分别低于 C 点和 J 点,这表明改清水灌溉有效地减少了土壤 TPH 的积累。但是从图 2 中的数据看到,改清灌地区的 A 点 TPH 含量仅略低于 C 点 ($p=0.164$),而清灌的 L 点 TPH 含量却显著 ($p=0.005$) 低于 J 点。实际上,A 点的灌溉用水来源于上游地区一个 15m 深的水井,而上游地区又是砂质土,污染物可能通过渗透、淋溶等作用污染了地下水,从而导致 A 点的灌溉用水也受到石油烃的污染。

样点 A 与 B 及样点 K 与 L 也是地理位置相近的两块农田(图 1),样点 A 改清水灌溉的同时,样点 B 改为旱田耕作;样点 L 改清水灌溉的同时,样点 K 也由污灌改为旱田耕作的旱地。由图 2 中数据可以看到,B 和 K 的 TPH 含量分别显著低于 A ($p=0.002$) 和 L ($p=0.013$),这是因为好氧微生物是石油烃类物质的主要降解者,石油烃在自然界中降解的主要途径是氧化分解,旱田耕作提供了一个良好的好氧环境,加速了石油烃在微生物体内的代谢过程。有研究表明,石油烃类物质的好氧降解速度是厌氧降解的 10 倍。因此,改旱田耕作与改清水灌溉的地区相比,更有利于土壤中石油污染物的降解。

2.3 沈抚灌区各采样点好氧异养细菌(AHB)数量

沈抚灌区各采样点好氧异养细菌数量如图 3 所示。对于已改旱田耕作的 B 和 K,其可培养的好氧异养细菌数量达 $(57 \sim 71) \times 10^7 \text{ CFU g}^{-1}$ 干土,是稻田土壤中好氧异养细菌数量的 4~5 倍。稻田中可

培养好氧异养细菌数量相对较少,可能是由于稻田土壤是一个相对厌氧或微厌氧的环境,因此不利于好氧菌的大量生长。统计表明,在目前的污染程度下,稻田土壤中(除 B 点和 K 点)可培养的好氧异养细菌数量随着污染程度的增加而增加 ($r = 0.928, p$

< 0.001)。其原因可能是污水带来的丰富的 C、N、P 等元素作为营养物质刺激了细菌的大量生长,同时能够利用石油烃作为 C 源和能源物质并参与石油烃降解的细菌在石油污染物的选择压力下,通过调整自身的代谢机制大量增殖。

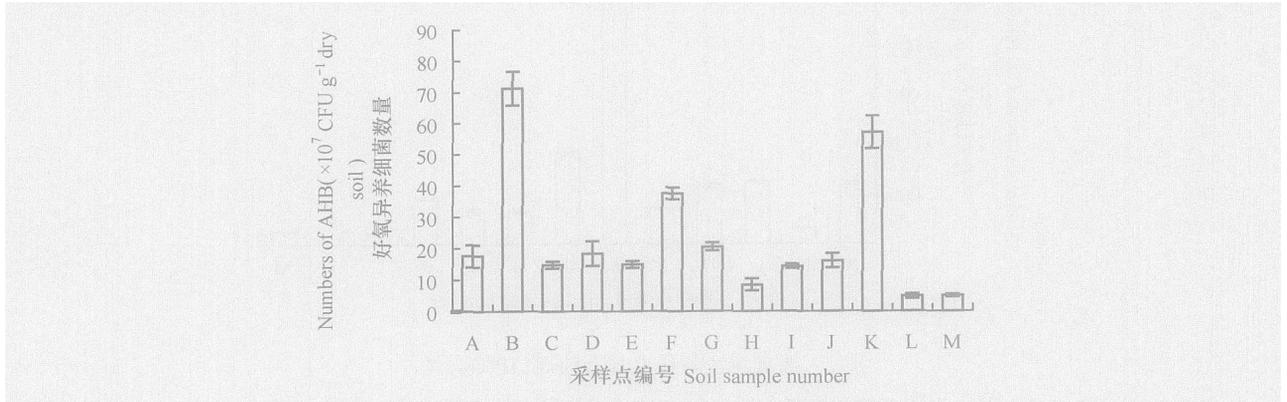


图3 沈抚灌区土样好氧异养细菌数量 ($n = 4$)

Fig. 3 Total counts of aerobic heterotrophic bacteria in the soil samples from the Sherfu Irrigation zone. Error bars ($n = 4$) indicated standard deviations

2.4 沈抚灌区土壤样品细菌遗传多样性

本研究采用 16S rDNA-PCR-DGGE 方法,首次从分子水平评价了长期含油污水灌溉对沈抚灌区稻田土壤细菌多样性的影响。PCR 扩增 16S rDNA 片段的 DGGE 分离图谱如图 4 所示。

软件分析表明,沈抚灌区土壤样品基因组 DNA

中共有 46 个不同的带型,每个土样含有 24 ~ 33 种不同的带型,根据 DGGE 图谱上条带峰面积计算得到的各土样 S-W 指数如表 2 所示,统计表明,细菌基因多样性与各样点 TPH 含量呈显著负相关 ($r = - 0.715, p = 0.013$),污染最严重的 F 点细菌多样性最低。

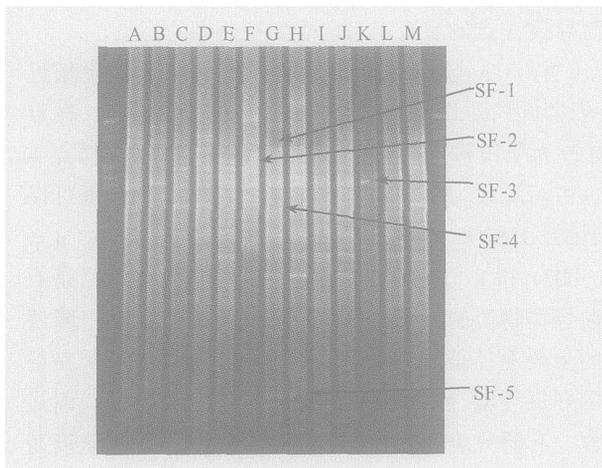


图4 引物 8F-CC 和 519r 扩增 16S rDNA 片段的 DGGE 指纹图谱 (K,B, ...L 为样片编号)

Fig. 4 DGGE fingerprints of 16S rDNA fragments amplified by 8F-CC and 519r (K,B, ...L is the number of soil sample)

表2 沈抚灌区各土壤样品细菌遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of the bacteria in the soil samples from the Sherfu Irrigation zone.

土壤编号 Soil code	遗传多样性 Genetic diversity	
	带型总数(S) Total band type	多样性指数(H) Shannon index
A	28.7 ±0.6	2.796 ±0.044
B	27.0 ±3.0	2.690 ±0.116
C	28.0 ±1.7	2.791 ±0.074
D	31.7 ±2.1	2.927 ±0.071
E	31.0 ±1.0	2.872 ±0.012
F	24.3 ±2.5	2.683 ±0.202
G	32.0 ±1.0	2.902 ±0.086
H	33.0 ±1.7	2.939 ±0.146
I	31.0 ±1.6	2.833 ±0.084
J	29.3 ±1.5	2.790 ±0.056
K	29.0 ±1.7	2.737 ±0.124
L	32.7 ±2.1	2.936 ±0.052
M	33.7 ±4.0	2.962 ±0.099

注:表中数据为 3 次重复的平均值 ±标准偏差 The data in the table are average of 3 replications ± SD

对比作者用传统培养方法研究该地区可培养 AHB 的菌落形态多样性^[17], PCR-DGGE 方法得到的 S-W 指数均高于由培养方法计算得到的多样性指数,并且两者与 TPH 的相关性也不一致,这是由传统研究方法的局限性造成的。土壤微生物群落中可培养细菌部分仅占很小的一部分,而大部分的微生物是不可培养的。能够在平皿上形成菌落的微生物只是土壤微生物群落中的部分可培养微生物,并且是数量上占一定优势的微生物^[7]。可培养微生物能否代表整个微生物群落或者群落中具有活性的一部分微生物都不得而知,因此,利用培养方法得到的多样性比 PCR-DGGE 图谱得到的可培养和不可培养总的微生物多样性要偏低。同传统培养方法相比, DGGE 指纹图谱技术还能够检测土壤微生物群落中不可培养的部分,是检测群落多样性、丰度和均度最为敏感群落指纹分析技术,此外,扩增片段可以从 DGGE 胶中直接回收测序,也为群落结构组成研究提供了方便。但这种方法也并不是完美无暇无可挑剔的,用引物 8 f 和 519 r 仅检测到 46 个不同的带型,这显然没有包括所有的细菌类群。并且,研究报道有些种类细菌 16 S rDNA 在 DGGE 上不只显示一条带^[18],而不同种细菌的 16 S rDNA 序列在 DGGE 上也可能因为具有相同的解链行为而不能被分开^[19]。此外,在基因组 DNA 的提取过程中可能丢失一部分 DNA 信息,在 PCR 扩增过程中由于 PCR 的放大也可能丢失一部分信息,因此,实验中所提取和扩增的 DNA 是否能够定量的反映整个微生物群落的种群丰度

也是一个值得讨论的问题^[20]。DGGE 图谱上的条带是代表最丰富的种群,最容易提取 DNA 的种群,最具活性的种群还是这些种群的集合都是一个悬而未知的问题。

通过计算 Dice 系数并用非加权配对算术平均法(UPGMA)生成的 DGGE 图谱聚类树状分析如图 5 所示。从图中可以明显看出,2 个旱田土样(B 点和 K 点)的 DGGE 指纹图谱最为相似,聚为一大类。稻田土样被分为二大部分,位于中游地区污染较为严重的 3 个样点 F、G、H 和位于下游地区的 I、J 2 点 DGGE 指纹最为相似,聚为一类,其中污染最为严重的 F 点与其他各样点又略有差异,被分在另一个小的分支上。其余的稻田土壤样品聚为另一大分支,其中位于上游支渠的 3 个样点 C、D 和 E 为一个小分支,其中污染程度较为相近的 C 点和 D 点 DGGE 指纹图谱更为相似;位于下游地区的 L、M 和位于上游地区改清水灌溉的 A 点为一个分支,其原因可能为 3 个样点的灌溉历史均为污水改清水灌溉,其中位于下游渠末污染最轻的 L 点和 M 点 DGGE 指纹图谱相似性更高。以上的聚类分析表明,沈抚灌区各土壤样品细菌 16S rDNA 片段的 DGGE 指纹图谱的相似性是由该土壤样品的采样地点和污染程度决定的,采样地点相近及污染程度接近的土壤样品, DGGE 指纹图谱最为相似。

2.5 沈抚灌区土壤样品细菌群落中优势菌群的研究

对 DGGE 分离凝胶上的部分优势条带进行了切胶测序。所分析的条带如图 4 所示,各条带序列经 NCBI 数据库的 BLAST 分析,结果见表 3。

表 3 细菌 16S rDNA 片段 V₁ ~ V₃ 高变区 DGGE 回收条带序列分析

Table 3 Sequence analysis of bands excised from DGGE gels derived from V₁ ~ V₃ hypervariable regions in bacterial 16S rDNA fragments

条带编号 Band No.	序列同源微生物 Bacterium with related bacterial sequence	相似性 Similarity	接收编号 Accession No.
SF-1	<i>Halothiobacillus</i> sp. WJ 18	100 %	A Y096035
SF-2	Uncultured gamma proteobacterium clone NOW2. 14WL	97 %	A Y043684
SF-3	Uncultured bacterium clone p-3415-SwA2	99 %	AF371861
SF-4	Uncultured betaproteobacteria clone TH486	95 %	AJ888541
SF-5	Uncultured Actinobacteria ARFS-24	99 %	AJ277695

经 NCBI 数据库的 BLAST 分析和 RDP 数据库的验证,与条带 SF-1 同源性最高的是 *Halothiobacillus* sp. WJ 18(相似性 100%),该菌为变形细菌-亚纲(gammaproteobacterium)盐硫杆菌(*Halothiobacillus*)属的一个种,是从酸性矿水中分离出来的一株菌,未

见其有关石油烃降解的报道^[21]。同源性排在第二位的是一种不可培养的细菌 Uncultured bacterium clone copi6(99%),该克隆是从人工废水富集的微生物群落中发现的。与其同源性次之的 *Thiobacillus* sp. UAM-I(98%)是变形细菌-亚纲(betaproteobac-

terium) 硫杆菌 (*Thiobacillus*) 属的一个种,与硫氧化有关。与渠末污染较轻的 M 土样相比,条带 SF-1 在污染程度较高土样的细菌群落中均占有一定的优势地位,特别是在中游地区的 G 样点, SF-1 明显变亮。这表明 SF-1 菌在石油烃污染土样的细菌群落中为一种优势菌,也很可能是一种未报道过的石油烃降解菌,并且与污水环境中石油烃类物质的脱硫有关。

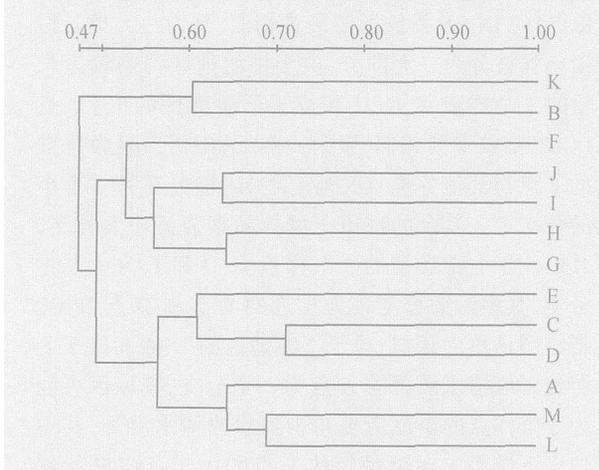


图5 8F-GC 和 519r 扩增片段 DGGE 指纹图谱聚类分析树状图 (K,B, ...L 为样片编号)

Fig. 5 A hierarchical cluster analysis of the DGGE fingerprints generated from primer 8F-GC and 519r (K,B, ...L is the number of soil sample)

与条带 SF-2 同源性最高的 2 个菌株均为变形细菌 - 亚纲的一种不可培养的细菌,因此 SF-2 菌应归为变形细菌 - 亚纲。同源性最高的 *Uncultured gammaproteobacterium* clone NOW2.14WL (97%) 为一株从森林土壤中分离出来的细菌^[22]。同源性次之的 *Uncultured gammaproteobacterium* clone Blhiii13 (96%) 是一种能够处理工厂废气的菌株^[23]。该条带为所有稻田土壤 (B 点和 K 点除外) 的共有条带,但在污染最为严重的 F 样点的 DGGE 图谱中, SF-2 条带更为明亮一些,这表明该菌株至少是一株石油烃耐受菌,有可能与石油烃的生物降解有关。

NCBI 数据库中与 SF-3 条带序列同源性最高的菌株为一种不可培养细菌 *Uncultured bacterium* clone p-3415-SwA2 (99%), 该克隆是研究猪肠道微生物群落时发现的^[24]。与其同源性次之的是一株不可培养的假单胞菌 *Uncultured Pseudomonas* sp. clone YIQ-50 (99%), 是从中国腾冲温泉中分离出来的。同源性再次之的 *Uncultured proteobacterium* MT1 (99%) 也是一种不可培养的细菌,该菌株与污染物的降解有

关。条带 SF-3 为所有土壤样品共有的较亮的条带,在 2 个旱田土壤样品中的优势地位尤其明显。综上所述,该菌大致可以归为变形细菌纲 (*Proteobacterium*), 鉴于其在 2 个旱田土壤中的优势地位更为明显,而旱田土壤的石油烃降解速率相对较快,所以推测其可能与石油烃的降解有关。

与条带 SF-4 同源性最高的菌株为变形细菌 - 亚纲的一株不可培养的细菌 *Uncultured betaproteobacteria* clone TH486 (95%), 该克隆是在研究太湖微生物多样性时发现的。与其同源性次之的 *betaproteobacterium* 5Z-C1 (95%) 和 *betaproteobacterium* TBW3 (95%) 均为在稻田中分离出来的硫代硫酸盐 (酯) 氧化菌^[25]。未见其与石油烃降解有关的报道。从图 4 也可以看出, SF-4 为所有稻田土壤样品特有的条带, 2 个旱田土壤样品中没有该条带。综合以上结果, SF-4 菌可以被归为变形细菌 - 亚纲。

NCBI 数据库中与条带 SF-5 同源性最高的菌株为不可培养细菌 *Uncultured bacterium* ARFS-24 (99%), 该克隆在研究意大利稻田土壤放线细菌纲 (*Actinobacteria*) 的细菌多样性过程中发现的^[26]。与其同源性次之的也是一种不可培养的细菌 *Uncultured actinobacterium* clone TH490 (98%), 该克隆也是在研究太湖底泥微生物多样性时发现的。因此, SF-5 菌应为底泥环境中的一种优势菌,其归属只能鉴定到放线细菌纲,目前没有该纲菌种降解石油烃类物质的报道。从图 4 中可以看出, SF-5 条带在中下游地区的几个稻田土壤样品 (G、H、I、J、L、M) 中优势地位更为明显。

综合以上测序结果,沈抚灌区土壤样品微生物群落中的优势菌群为变形细菌 - 亚纲和 - 亚纲的菌种,此外还有放线细菌纲的细菌。这些优势菌群的形成很可能是石油烃污染胁迫的结果并且与石油烃的生物降解有关。

3 小 结

(1) 石油污染物在灌区干渠和支渠中的积累和分布趋势大体上是上游地区较严重,下游地区较轻,并且与土壤有机质含量呈显著正相关 ($r = 0.691$, $p < 0.05$)。干渠上游污染最严重的样点 TPH 含量高达 $5\ 213\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ 干土,而渠末 TPH 含量仅为 $277\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ 干土。

(2) 在目前的污染程度下,含石油污水能够刺激土壤中好氧异养细菌 (AHB) 类群的生长。污灌地

区土样中好氧异养细菌(AHB)的CFU随着污染程度的增加而增加,相关系数为0.928($p < 0.001$),而细菌遗传多样性与TPH含量呈显著负相关($r = -0.715, p = 0.013$)。

(3)在石油烃污染的胁迫下,沈抚灌区土壤样品细菌群落中的优势菌群为变形细菌(Proteobacteria)- α 群和 β -群的菌种,这些优势菌群的形成可能与石油烃的生物降解有关。

参考文献

- [1] 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.环境科学,1981,2:161~166. Liu Q S, Qi E S, Zhang C G, *et al.* Study on the microbial ecology in petroleum wastewater irrigation area and the degradation of petroleum (In Chinese). Environmental Science, 1981, 2: 161~166
- [2] 吴维中,刘钧洁,常士俊,等.沈抚灌区水田土壤矿物油环境容量与自净规律的研究.农业环境保护,1985,4:1~6. Wu W Z, Liu J G, Chang S J, *et al.* Study of the mineral oil environmental capacity and self-purification law of paddy field soil in Shenfu irrigation region (In Chinese). Agro-environmental Protection, 1985, 4: 1~6
- [3] 耿春女,李培军,陈素华,等.菌根生物修复技术在沈抚污水灌区的应用前景.环境污染治理技术与设备,2002,3:51~55. Geng C N, Li P J, Chen S H, *et al.* Application of mycorrhizal bioremediation technique to Shenfu sewage irrigated area (In Chinese). Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2002, 3: 51~55
- [4] 吴维中,刘钧洁,谢重阁,等.沈抚污水灌区矿物油污染综合治理研究.见:中国环境科学学会,中国农学会编,全国污水灌溉和环境学术讨论会论文集.北京,1982.106~115. Wu W Z, Liu J G, Xie C G, *et al.* A research on the comprehensive management of mineral oil pollution in Shenfu irrigation region. In: Chinese Society for Environmental Sciences & Chinese Society for Agriculture. eds. Proceedings of the Workshop on Wastewater Irrigation and Environment in China (In Chinese). Beijing, 1982. 106~115
- [5] 宋玉芳,常士俊,李利,等.污灌土壤中多环芳烃(PAHs)的积累与动态变化研究.应用生态学报,1997,8:93~98. Song Y F, Chang S J, Li L, *et al.* Accumulation and dynamic change of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wastewater irrigated area (In Chinese). Chin. J. Appl. Ecol., 1997, 8: 93~98
- [6] Torsvik Y L, Gbsoyr J, Daae F. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56: 782~787
- [7] 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: 695~700
- [8] 滕应,骆永明,赵祥伟,等.重金属复合污染农田土壤DNA的快速提取及其PCR-DGGE分析.土壤学报,2004,41(3):343~347. Teng Y, Luo Y M, Zhao X W, *et al.* Rapid extraction and purification of DNA in farmland soils contaminated with mixed heavy metals for PCR-DGGE analysis (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(3): 343~347
- [9] Mishra S, Jyot J, Kuhad R C, *et al.* Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67: 1675~1681
- [10] 谢重阁.环境中石油污染物的分析技术.北京:中国环境科学出版社,1987.82~83. Xie C G. Analytic Techniques of Petroleum Pollutants in the Environment (In Chinese). Beijing: China Environmental Science Press, 1987. 82~83
- [11] 中国科学院南京土壤研究所编.土壤微生物研究法.北京:科学出版社,1985.44~45. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. ed. Methods of Soil Micro-organisms Analysis (In Chinese). Beijing: Science Press, 1985. 44~45
- [12] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 316~322
- [13] Coates J D, Ellis D J, Elizabeth L. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64: 1504~1509
- [14] Shannon C E, Weaver W. The Mathematical Theory of Communication. Urbana, IL: University of Illinois Press, 1949
- [15] Altschul S F, Gish W, Miller W, *et al.* Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol., 1990, 215: 403~410
- [16] 鲁如坤主编.土壤农业化学分析法.北京:中国农业科技出版社,1999.107~240. Lu R K. ed. Analytical Methods of Soil and Agricultural Chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999. 107~240
- [17] Li H, Zhang Y, Zhang C G, *et al.* Effect of petroleum-containing wastewater irrigation on bacterial diversities and enzymatic activities in paddy soil irrigation area. Journal of Environmental Quality, 2005, 34: 1073~1080
- [18] Nübel U, Engelen B, Felske A, *et al.* Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. J. Bacteriol., 1996, 178: 5636~5643
- [19] Vallaeyts T, Topp E, Muyzer G, *et al.* Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. FEMS Microbiol. Ecol., 1997, 24: 279~285
- [20] Farrelly V, Rainey F A, Stackebrandt E. Effect on genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16s rRNAs genes from a mixture of bacterial species. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61: 2798~2801
- [21] Hallberg K B, Johnson D B. Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. Hydrometallurgy, 2003, 71: 139~148
- [22] Axelrod P E, Chow M L, Radomski C C, *et al.* Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. Can. J. Microbiol., 2002, 48: 655~674
- [23] Friedrich U, Prior K, Altendorf K, *et al.* High bacterial diversity of a waste gas-degrading community in an industrial biofilter as shown by a 16S rDNA clone library. Environ. Microbiol., 2002, 4: 721~734

- [24] Leser T D, Amenuvor J Z, Jensen T K, *et al.* Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68: 673 ~ 690
- [25] Stubner S, Wind T, Conrad R. Sulfur oxidation in rice field soil: activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1998, 21: 569 ~ 578
- [26] Ludemann H, Conrad R. Molecular retrieval of large 16S rRNA gene fragments from an Italian rice paddy soil affiliated with the class Actinobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2000, 23: 582 ~ 584

ANALYSIS OF BACTERIAL GENETIC DIVERSITY IN PADDY SOIL IN SHENFU IRRIGATION ZONE IRRIGATED WITH WASTEWATER FROM PETROLEUM INDUSTRY —BY DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS AND SEQUENCING OF PCR-AMPLIFIED 16S RIBOSOMAL DNA FRAGMENTS

Li Hui¹ Zhang Ying¹ Su Zhencheng¹ Xu Hui¹ KRAVCHENKO Irina² Zhang Chenggang¹

(1. Key Laboratory of Terrestrial Ecological Processes, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

(2. Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, 117312 Moscow, Russia)

Abstract Effects of petroleum contamination on counts, diversity and dominant populations of bacteria in paddy soils were investigated in the Shenfu Irrigation Zone, the largest zone irrigated with oil-containing wastewater for more than 50 years in Northeast China. Bacterial genetic diversity was determined with 16S rDNA PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Results show that total petroleum hydrocarbon (TPH) concentration in the paddy soil varied from 277 to 5 213 mg kg⁻¹ dry soil. Soil TPH concentration declined along with the distance of the irrigation channel from the water source, showing a gradient from upstream to downstream and was positively correlated with organic matter ($r = 0.691$, $p = 0.057$). At the current pollution level, the paddy soil TPH concentration was positively correlated with the CFU of aerobic heterotrophic bacteria (AHB) ($r = 0.928$, $p < 0.001$). While genetic diversity of the bacteria based on DGGE profiles was negatively correlated with TPH concentration ($r = -0.715$, $p = 0.013$). Sequence analysis of prominent bands in DGGE profiles show that *and* subgroups of Group Proteobacteria were dominant in paddy soil of the Shenfu Irrigation Zone, All or some of the populations may play a significant role in metabolizing the petroleum compounds.

Key words Wastewater irrigation; Petroleum contamination; Bacterial genetic diversity; 16S rDNA; DGGE