

目次

2013~2020年天津市PM_{2.5}-O₃污染变化趋势和影响因素分析 肖致美, 李亚菲, 高璟赞, 李鹏, 蔡子颖, 郑乃源, 张裕芬, 戴运峰 (4211)

2015~2020年济南市O₃污染趋势及敏感性变化分析 孙晓艳, 孙军, 郭萌萌, 刘杨, 王宝琳, 范国兰, 许宏宇, 姜腾龙 (4220)

南京市南部地区O₃污染特征、生成敏感性及传输影响分析 郑新梅, 胡崑, 王鸣, 谢放尖, 王艳 (4231)

天津市“十三五”期间O₃污染特征和驱动因子 李源, 肖致美, 毕晓辉, 蔡子颖, 徐虹, 高璟赞, 郑乃源, 杨宁 (4241)

基于随机森林的南京市PM_{2.5}和O₃对减排的响应 尚永杰, 茅宇豪, 廖宏, 胡建林, 邹泽庸 (4250)

基于四维通量法的佛山臭氧污染输送量化 吴莉萍, 莫海华, 杨丽婷, 蔡梓桐, 吴国彤, 白玉洁, 邓思欣, 司徒淑婷, 常鸣, 王雪梅 (4262)

污染地块VOCs源衰减对室内蒸气入侵风险的影响 钟茂生, 汪洋, 姜林, 张丽娜, 马琳, 张瑞环, 赵莹, 李吉鸿 (4271)

2017~2020年长江流域水体污染物通量时空变化特征分析 郭朝臣, 雷坤, 李晓光, 周波, 吕旭波 (4279)

滹沱河流域山区地表水-地下水水化学空间变化特征、影响因素及其来源 孔晓乐, 常玉儒, 刘夏, 赵小宁, 沈彦军 (4292)

重庆东南部岩溶水金属元素空间分布、源解析及健康风险评价 谢浩, 邹胜章, 李军, 申豪勇, 林永生, 周长松, 朱丹尼, 王志恒 (4304)

衡水市桃城区浅层地下水咸化成因 何锦, 张怀胜, 蔡五田, 王雨山 (4314)

吐鲁番南盆地平原区地下水污染风险评价 白凡, 周金龙, 周殿竹, 韩双宝, 孙英 (4325)

金属硫化物矿山水系统中微生物群落组成及多样性 丁聪聪, 朱旭炎, 赵兴青, 陆金, 周宇斌, 张欣怡, 王霄鹏 (4334)

白洋淀上覆水及沉积物中微塑料赋存特征 程昕煜, 杨丽虎, 宋献方 (4344)

基于溶解性有机物分子指纹特征解析城市河道污染来源与机制 朱奕, 叶建锋, 孙晓楠, 胡曙煜, 陈勋, 唐建飞, 陈浩 (4353)

甾体激素在污水处理厂中的赋存特征和行为归趋 刘媛媛, 冯慧, 张云, 叶亮, 钟琴, 邹华 (4364)

博鳌近岸海域表层沉积物中持久性有机污染物的分布、来源与生态风险评价 郝润波, 符国伟, 宋艳伟, 傅开哲, 袁坤 (4374)

太原市耕地土壤PAHs的含量、分布、源解析与风险评价 吴张伟, 段永红, 刘立文, 徐立帅, 陈香玲, 姚旭红 (4387)

雄安新区土壤氟地球化学特征及健康风险评价 郭志娟, 刘飞, 周亚龙, 王乔林, 王成文 (4397)

基于APCS-MLR和PMF模型解析黄河下游文化公园土壤重金属污染特征及来源分析 段海静, 马嘉玉, 彭超月, 刘德新, 王玉龙, 李旭辉, 马建华 (4406)

锰矿区周边农田土壤重金属污染特征、来源解析及风险评价 余高, 陈芬, 张晓东, 孙约兵 (4416)

老工业城市土壤-作物系统重金属的迁移累积及风险协同评价 王莹, 董爱俊, 杨建锋, 马彦斌, 王泽晶, 杨凡燕 (4429)

畜禽粪肥还田四环素类抗生素(TCs)在土壤-蔬菜系统的分布特征及风险评估 丁丹, 黄晓依, 顾静仪, 陈澄宇, 龙新亮, 曾巧云 (4440)

地质高背景区外源污染叠加条件下大白菜对Cd、Pb、Zn累积途径探究 简槐良, 刘鸿雁, 梅雪, 毛诗佳, 刘芳, 张秋野, 敬鹏 (4448)

微塑料与铅复合污染对玉米种子萌发与生长的影响 马贵, 廖彩云, 周悦, 丁家富, 周炎炎, 王展, 马燕 (4458)

施加Fe₃O₄/桑秸秆生物炭对土壤团形态和水稻砷含量的影响 阮麟乔, 梁美娜, 丁艳梅, 曹海燕, 刘崇敏, 成官文, 朱义年, 王敦球 (4468)

生物炭与氮肥配施对镉污染水稻土修复效应及机制 张丽, 李如霞, 何玉玺, 姚彦坡, 林大松 (4479)

不同氮肥配施生物炭对镉污染土壤青菜镉吸收的影响 李平, 聂浩, 郎漫, 朱燕菊, 姜海波, 李楠 (4489)

椰纤维生物炭及其硝酸改性对稻田土壤中Pb钝化的影响 侯正伟, 李建宏, 李财生, 张婧旻, 林清火, 赵庆杰, 吴治澎, 王禹 (4497)

生物炭施用对微塑料污染石灰性土壤理化性质和细菌群落的影响 冉泰山, 龙健, 廖洪凯, 李娟, 杨国梅, 赵雨鑫 (4507)

改性生物炭负载零价铁对土壤中三氯乙烯的去除及微生物响应 陆海楠, 理鹏, 郭琳, 徐佳成, 杨洁, 黄沈发, 柯天英 (4519)

改性酒糟生物炭对紫色土养分及酶活性的影响 由乐林, 谢永红, 王子芳, 杨文娜, 高明 (4530)

化肥减量配施生物炭和秸秆增加了坡耕地土壤中流磷流失风险 赖佳鑫, 邓华, 朱浩宇, 黄容, 龙翼, 王子芳, 高明 (4541)

污泥和鸡粪生物炭制备及其老化过程中的碳损失 张滢, 张长浩, 张秀芳, 段文焱, 陈芳媛 (4554)

化肥和有机肥配施生物炭对根际土壤反硝化势和反硝化细菌群落的影响 谢军, 王子芳, 王莹燕, 熊子怡, 高明 (4565)

黄河下游谷子花生间作农田土壤细菌群落结构与功能预测 刘柱, 南镇武, 林松明, 孟维伟, 于海秋, 谢立勇, 张正, 万书波 (4575)

微咸水灌溉下微生物菌肥对盐渍土壤理化性质和细菌群落的影响 刘月, 杨树青, 张万锋, 姜帅 (4585)

高效石油降解菌修复石油污染土壤与强化机制分析 姚贞先, 王丽萍, 李丹, 李亚平, 何士龙, 赵雅琴 (4599)

土地集约利用程度对华北潮土农田土壤微生物群落丰度和死生物物质积累的影响 李胜君, 盛美君, 李刚, 王蕊, 李洁, 张贵龙, 修伟明 (4611)

中国省域碳达峰路径与政策 苗安康, 袁越, 吴涵, 马欣, 邵辰宇 (4623)

基于碳减排成本的我国省域碳补偿机制 钟诗雨, 张晓敏, 吴佳, 郭娜, 封强, 傅泽强 (4637)

不同施肥措施下长江经济带地区农田土壤有机碳含量的变化分析 刘欣宇, 卢江, 孟璇, 刘铮, 宋鹏, 李季, 田光明 (4647)

中国西北地区多情景土地利用优化与碳储量评估 陈宁, 辛存林, 唐道斌, 张亮, 辛顺杰 (4655)

陕西渭北旱塬区生境质量及碳储量时空演变分析与模拟 古圳威, 刘京, 陈怡, 卢新冉, 王思轶 (4666)

气候变暖对四川盆地水稻土有机碳含量变化的影响 李艾雯, 宋靛颖, 冉敏, 李文丹, 张元媛, 李呈吉, 史文娇, 李启权 (4679)

降水改变下撂荒草地的化学计量失衡改变调节土壤呼吸 王佳懿, 王兴, 王源苗, 房景博, 夏开拉·阿克拜, 祖丽皮耶·居热艾提, 杨改河, 任成杰, 韩新辉 (4689)

水盐环境对黄河口淡水湿地土壤碳、氮、磷生态化学计量特征的影响 秦纪法, 张佳彭, 桑奕, 杨云斐, 杨继松, 王志康, 栗云召, 周迪, 于君宝 (4698)

中国省域土壤重金属空间分布特征及分区管控对策 石航源, 王鹏, 郑家桐, 肖荣波, 邓一荣, 庄长伟 (4706)

壬基酚的环境生物地球化学研究进展及对新污染物管理的建议 洪亚军, 冯承莲, 徐大勇, 吴丰昌 (4717)

微塑料的形成机制及其环境分布特征研究进展 张龙飞, 刘玉环, 阮榕生, 赵蓝天, 王允圃, 张琦, 曹雷鹏, 崔宪, 巫小丹, 郑洪立 (4728)

生物炭添加对土壤温室气体排放影响的长短期效应研究进展 周咏春, 吴柳林, 李丹阳, 郭思伯, 陈志敏, 李正龙, 赵研 (4742)

铁基双金属催化剂活化过硫酸盐去除水中抗生素研究进展 魏健, 张新怡, 郭壮, 宋永会 (4751)

畜禽粪便污染的环境风险与资源化治理技术分析 安婧, 丁子明, 高程程, 胡芳雨, 魏树和 (4764)

《环境科学》征订启事(4230) 《环境科学》征稿简则(4303) 信息(4506, 4678, 4741)

高效石油降解菌修复石油污染土壤与强化机制分析

姚贞先¹, 王丽萍^{1*}, 李丹¹, 李亚平², 何士龙¹, 赵雅琴¹

(1. 中国矿业大学环境与测绘学院, 徐州 221116; 2. 中国石化管道储运有限公司科技研发中心, 徐州 221008)

摘要: 利用定向驯化高效石油降解菌系对石油污染土壤进行为期 120 d 原位修复, 考察生物强化修复效果、土壤理化性质和酶活性的变化, 结合宏基因组测序及生物信息学分析揭示其强化机制。结果表明, 与空白对照组 (Ctrl) 相比, 生物修复组 (Exp-BT) 总石油烃降解率显著提升, 增幅达 81.23%; 高效石油降解菌生物强化修复期间土壤 pH 变化稳定, 体系氧化能力提高, 电导率处于适宜农业活动范围内; 脂肪酶和脱氢酶在修复期间保持较高活性; 另对初始污染土壤样本 (B0)、驯化所得高效石油降解菌系样本 (GZ) 和生物修复后土壤样本 (BT) 的分析显示, 门水平上变形菌门与放线菌门相对丰度增加 17.1%, 属水平上 *Nocardioide*s、*Achromobacter*、*Gordonia* 和 *Rhodococcus* 等丰度明显上升, COG 和 KEGG 物种与功能贡献度分析证明以上菌属对石油烃降解有重要贡献; 修复后土壤中发现高丰度的石油烃相关代谢酶及 5 个降解基因: *alkM*、*tamA*、*rubB*、*ladA* 和 *alkB*, 分析表明外源石油烃降解菌群的引入增强了微生物相关酶的代谢活性与相应功能基因的表达。

关键词: 石油污染; 高效石油降解菌; 强化机制; 代谢途径; 功能基因

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2023)08-4599-12 DOI: 10.13227/j.hjkk.202210004

Remediation of Petroleum-contaminated Soil by Highly Efficient Oil-degrading Bacteria and Analysis of Its Enhancement Mechanism

YAO Zhen-xian¹, WANG Li-ping^{1*}, LI Dan¹, LI Ya-ping², HE Shi-long¹, ZHAO Ya-qin¹

(1. School of Environment Science and Spatial Informatics, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, China; 2. Research and Development Center for Science & Technology, SINOPEC Pipeline Storage & Transportation Co., Ltd., Xuzhou 221008, China)

Abstract: A 120-day in situ remediation of oil-contaminated soil was carried out by using highly efficient oil-degrading bacteria. The effects of bio-enhanced remediation and changes in soil physicochemical properties and enzyme activities were investigated. Combined with metagenomic sequencing and bioinformatics analysis, the strengthening mechanism was revealed. The results showed that compared with the blank control group (Ctrl), the degradation rate of total petroleum hydrocarbons in the bioremediation group (Exp-BT) was significantly increased, reaching 81.23%. During enhanced bioremediation by highly efficient oil-degrading bacteria, the pH of the soil was stable, the oxidation capacity of the system was improved, and the electrical conductivity was in the range suitable for agricultural activities. Lipase and dehydrogenase maintained high activity during repair. In addition, the analysis of the initial contaminated soil (B0), the highly efficient oil-degrading bacteria obtained from domestication (GZ), and the soil samples after bioremediation (BT) in the obtained samples showed that, at the phylum level, the total proportion of Proteobacteria and Actinobacteria increased by 17.1%. At the genus level, the abundance of *Nocardioide*s, *Achromobacter*, *Gordonia*, and *Rhodococcus* increased significantly. The species and function contribution analysis of COG and KEGG proved that the above bacterial genera had important contributions to the degradation of petroleum hydrocarbons. A high abundance of petroleum hydrocarbon-related metabolic enzymes and five petroleum hydrocarbon-related degradation genes was found in the soil after remediation; *alkM*, *tamA*, *rubB*, *ladA*, and *alkB*. The analysis showed that the introduction of the exogenous petroleum hydrocarbon-degrading bacteria group enhanced the metabolic activity of microorganism-related enzymes and the expression of corresponding functional genes.

Key words: oil pollution; highly efficient petroleum-degrading bacteria; strengthening mechanism; metabolic pathways; functional genes

原油开采、储运、加工和利用过程中使环境石油污染日趋严重。石油污染物不仅改变土壤 pH 值等理化性质和影响生物养分有效性, 还改变微生物群的数量和活动^[1]。利用微生物代谢将碳氢化合物转化为 CO₂ 和 H₂O 的生物修复技术, 在石油污染土壤修复应用中得到了广泛研究。微生物在好氧和缺氧条件下有特定生物降解途径: 好氧微生物可使用单或双加氧酶将 1 或 2 个氧原子整合到碳氢化合物分子中^[2]; 缺氧情况下, 厌氧微生物及兼性厌氧微生物以硝酸盐和二氧化碳作为最终电子受体, 以有机物作为电子供体降解有机物生成化学能^[3]。生物修复可大幅降低石油污染对土壤环境造成的影响, 改善土壤功能。其中生物强化是污染场地的有效修复方法^[4]。

生物强化可以解决降解体系中土著菌生长受抑制、降解潜力较低和单一外源混合菌降解效果不够稳定等问题, 而优势混合专性菌系的选择和获得等是保证修复生物强化效果的关键因素^[5, 6]。由于微生物的代谢机制和适应恶劣环境的能力, 它们可以降解许多有机污染物, 然而在某些情况下, 本土微生物群落可能没有降解目标污染物的适当代谢潜力^[7]。Szulc 等^[5]研究提出, 在实地工作之前进行初步的实验室测试以选择接种的微生物, 能增加实地

收稿日期: 2022-10-01; 修订日期: 2022-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51974314, 52270171); 中国矿业大学未来科学家计划项目 (2022WLJRCZL263); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (SJCX22_1159)

作者简介: 姚贞先 (1998 ~), 男, 硕士, 主要研究方向为土壤修复, E-mail: yzxcumt@foxmail.com

* 通信作者, E-mail: wlpcumt@126.com

研究成功的机会. Ameen 等^[8] 研究从沙特阿拉伯红海海岸红树林分离的真菌对柴油的降解效果, 发现这些分离株具有快速的柴油生物去除作用. Alisi 等^[9] 基于使用与选定的本地菌株量身定制的微生物配方, 42 d 内总碳氢化合物减少约 75%.

本研究从 20 年以上石化污染场地获得菌源, 将经定向驯化后获得的高效石油降解菌系投加到污染场地进行原位修复. 在整个修复过程中, 对土壤的总石油烃 (TPH) 含量、理化性质、营养元素含量和酶活性等进行监测, 了解修复过程中土壤参数的变化; 同时利用 Pearson 相关性等分析方法, 解析土壤参数修复过程中变化原因; 通过群落结构变化与物种与功能贡献度分析, 探求引入石油烃降解菌系实现高效降解效率的原因并确认关键菌属; 通过烷烃代谢酶及相关功能基因分析, 揭示烷烃的生物降解路径与石油降解菌系的强化作用机制.

1 材料与方法

1.1 生物强化实验

本研究原位修复场地位于徐州市某厂区内, 修复实验面积为 10 m × 5.5 m, 原始 ω (TPH) 为 (16 622.87 ± 23.06) mg · kg⁻¹, 土壤为粉(沙)壤土, ω (砂粒, 2.0 ~ 0.05 mm) 为 296 g · kg⁻¹, ω (粉粒, 0.05 ~ 0.002 mm) 为 582 g · kg⁻¹, ω (黏粒, < 0.002 mm) 为 122 g · kg⁻¹. 本实验共两组, 石油降解菌系强化实验组 (Exp-BT) 及空白对照组 (Ctrl). 使用采样器根据五点取样法采集土壤, 每个采样点设置 D1 (0 ~ 15 cm)、D2 (15 ~ 30 cm) 和 D3 (30 ~ 45 cm) 这 3 个采样深度, 将取得的样品均匀混合带回实验室检测. 取样监测频次为每 30 d 1 次.

生物强化实验组第 0 d 取样后接菌. 菌源来自广州 20 a 以上石化污染土壤, 10℃ 条件下, 经石油烃驯化 2 个月得到耐低温高效石油降解菌. 接种石油烃降解菌群至 10 L 灭菌后的 LB 培养基, 培养至 D_{600} 为 1 ~ 1.5, 完成一级扩繁. 将一级扩繁菌液接种到 40 L 灭菌后的 LB 培养基, 至 D_{600} 为 1 ~ 1.5 完成二级扩繁. 将 50 L 二级扩繁菌液均匀接种到污染土壤, 翻耕搅拌.

1.2 石油浓度及组分测定

使用经石油标准样品校准后的专用红外测油仪 (北京华夏 OIL480), 应用红外分光光度法 (HJ 1051-2019) 对样品总石油烃浓度进行检测. TPH 去除率 (%) 的计算公式为:

$$\text{TPH 去除率} = [(C_0 - C_t) / C_0] \times 100\%$$

式中, C_0 表示初始土壤 TPH 含量 (mg · kg⁻¹), C_t 表示时间 t 时土壤中的残留 TPH 含量 (mg · kg⁻¹), t

表示修复时间 (d).

将采集土壤样品冷冻干燥 4 ~ 6 h, 过 30 目筛, 取土壤 1.00 g, 加入 10 mL 正己烷: 丙酮 = 1:1 混合萃取溶液, 涡旋振荡 1 min, 超声 30 min, 然后以 2 500 r · min⁻¹ 转速离心 5 min, 过 0.45 μm 滤膜后放到进样瓶中, 使用 GC-MS 分析石油组分.

1.3 理化性质测定

采用 SANXIN (上海三信仪表厂) SX751 型便携式 pH/ORP/电导率/溶解氧测试仪 (ISO9001:2015) 测定理化性质 (pH、EC 和 ORP); 采用普锐森社 PR-ECTH-SC-35DC 型土壤参数速测仪测量土壤温度.

1.4 酶活性测定

脂肪酶的测定使用 Margesin 等^[10] 的方法, 土壤脂肪酶活性 (以 pNP/土壤干重计) 为 μg · (g · 10 min)⁻¹; 土壤脱氢酶活性的测定采用 TTC 比色法, 其活性以 1 g 土壤样品 24 h 产生的 TP (1,3,5-三苯甲腈) 来衡量, 单位为 μg · (g · h)⁻¹.

1.5 宏基因组测序及生物信息学分析

对所取得样品中初始污染土壤 (B0)、驯化所得高效石油降解菌系样本 (GZ) 和生物修复后土壤样本 (BT) 进行宏基因组测序及生物信息学分析. 测序流程为: 环境样品进行 DNA 抽提 → 片段化约 300 bp → 构建 PE 文库 → 桥式 PCR-Illumina 测序. 使用软件 fastp 剪切序列 3' 端和 5' 端的 adapter 序列进行质量剪切, 并去除剪切后长度小于 50 bp、平均质量值低于 20 和含 N 碱基的 reads, 得到高质量的质控数据 (clean data). 使用软件 MEGAHIT v1.1.2 对质控后得到的短片段序列进行组装. 使用 MetaGene 对拼接结果中的 contigs 进行 ORF 预测. 选择核酸长度大于等于 100bp 的基因, 并将其翻译为氨基酸序列, 获得各样本的基因预测结果统计表. 通过 CD-HIT 软件对样本预测出来的基因序列进行聚类, 构建非冗余基因集, 得到非冗余基因集基因的碱基序列. 针对 SOAPaligner 比对后的信息, 统计基因在各个样本中的丰度信息, 并对得到的基因进行物种与功能上的分类, 包括 NR、COG 和 KEGG 等. 在上述分析的基础上, 进行了物种与功能组成分析、物种功能注释、物种与功能贡献度分析和功能基因分析等.

1.6 数据分析

采用 Origin 2020 和 R 语言软件进行数据整理及绘图.

2 结果与讨论

2.1 土壤修复过程中 TPH 含量及其衍生物分析

120 d 修复过程中 TPH 含量变化与去除率如图 1 所示, Exp-BT 组 ω (TPH) 从初始 16 622.87

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 经 30 d 修复降为 $6\ 005\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 去除率达 63.88%; 后续降解速率趋缓, 90 d 后稳定, 总去除率达 81.23%, 显著高于仅依靠土著菌修复的对照组 (20.49%)。张金秋等^[11] 发现, 在石油质量分数为 0.6% 时, 经 56 d 修复, 对照组降解率为 12.5%, 微生物组仅达 45%; 且其通过石油污染程度对石油污染土壤修复效果的影响实验结果表明, 石油初始质量分数为 1.2% 和 1.5% 时, 其 56 d 降解率都不足 45%, 过量的石油会产生一定毒性, 抑制微生物生长发育。花莉等^[12] 利用前期已筛选的高效石油降解菌, 修复延安某油田石油烃初始含量为 $14\ 720\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的污染土壤。未灭菌污染土壤 42 d 对照组降解率为 12.03% 的情况下, 投加游离菌组降解率仅为 21.05%, 且在 21 d 后基本保持稳定。可以看出在基本相同的边界条件下, 本研究对石油污染土壤石油烃的降解速率和效果等均较优。

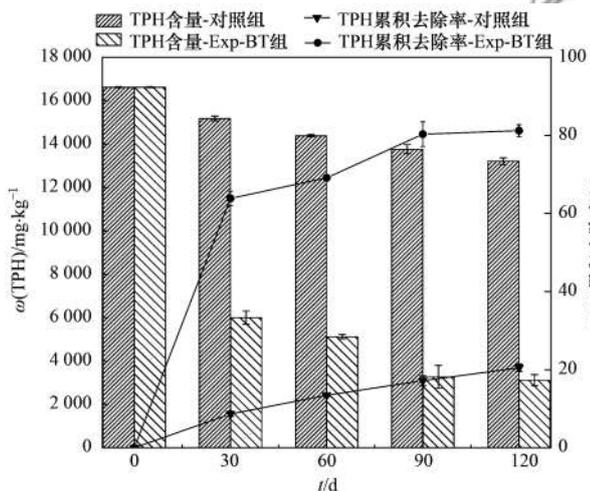


图1 修复过程中 TPH 含量变化与累计去除率

Fig. 1 TPH content change and cumulative removal rate during remediation

表 1 显示了 120 d 修复期前后土壤样品中石油烃及其衍生物的 GC-MS 分析结果。在进行修复前, 从石油污染土壤中鉴定出 20 种污染物, 其中多为相对分子质量低、中的直链烷烃, 另还有相对丰度排序为芳烃 > 环烷烃 > 烯烃的污染物和其他有机物。Exp-BT 组 120 d 修复后相对分子质量低的脂肪族 ($\text{C}_8 \sim \text{C}_{16}$) 烃占比从 17.74% 提升至 76.18%, 相对分子质量中的脂肪族烃 ($\text{C}_{17} \sim \text{C}_{28}$) 占比为 82.26% 降至 23.82%。根据 GC-MS 分析, 短链烷烃优先于长链烷烃降解, 其后由于微生物的作用, 大部分长链烷烃被降解为短链烷烃、烯烃和其他产物, 导致相对分子质量低的烷烃占比增多, 这与 Liu 等^[13] 研究的结论一致。此外经修复后, Exp-BT 组样品中残留石油烃的含量与种类均显著降低, 但对照组降解

表 1 修复前后土壤样品中碳氢化合物及其衍生物的 GC-MS 分析

Table 1 Hydrocarbon compounds and their derivatives analyzed by GC-MS in soil samples before and after remediation

化合物类别	修复前	修复后	
		对照组	Exp-BT 组
烷烃	10	6	3
芳烃	5	4	2
烯烃	1	4	3
环烃	2	3	2
其他有机物	2	2	1

则并不彻底, 尤其是在烷烃降解方面。

2.2 修复参数及相关性分析

2.2.1 理化性质

pH 值大小影响土壤中常量、微量元素的迁移和有效性。Exp-BT 组土壤 pH 值变化如图 2(a), 与初始土壤 ($\text{pH} = 8.36$) 相比, 接种石油降解菌后约下降了 0.18, 这可能是由于微生物降解石油过程中产生羧酸类物质造成的。其后基本呈上升趋势, 这与 Chakravarty 等^[14] 关于土壤 pH 由高酸性向低转变的研究结果一致。在微生物修复期间 pH 一直保持在 8.17 ~ 8.60 之间, 为烃类矿化提供了更好条件^[15, 16]。

氧化还原电位 (ORP) 能反映微生物的代谢活性与所处环境氧化还原状态。Exp-BT 组土壤 ORP 变化如图 2(b), 总体呈先降后升。接菌后 ORP 约为 70.67 mV, 较初始土壤 (ORP = 86 mV) 略有降低, 这可能是由于高浓度污染物质对微生物的抑制作用, 但土壤中易被降解的石油烃为微生物提供了充足碳源。随其浓度及环境温度降低, 微生物降解速度变缓, ORP 逐渐趋于稳定。整体上修复后 ORP 值高于原始土壤, 证明接入石油降解菌后土壤环境内的氧化能力增强。

Chakravarty 等^[14] 指出导电性是土壤健康的一个重要参数, 因其与土壤结构和水分入渗有关。Exp-BT 组土壤电导率 (EC) 变化如图 2(c) 所示, 接种石油降解菌后由于 LB 营养液的引入其值升高; 随修复时间延长逐渐降低, 可能因土壤中营养盐被微生物吸收和代谢, 且进入秋冬季节环境气温低, 影响微生物活性。整个修复过程中 EC 值处于 0.18 ~ 0.41 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 之间, 均处于 0.11 ~ 0.57 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 的农业活动适宜范围内^[14]。

2.2.2 酶活性

在土壤生物修复过程中, 酶在烃类生物降解过程中发挥重要作用, 酶的活性反映了微生物的代谢活性。一般而言, 酶活性越强, 生物降解性能越好。

脱氢酶是重要的氧化还原酶, 参与分解有机污染物。如图 3(a) 所示, 脱氢酶活性 (以 TPF 计) 在第

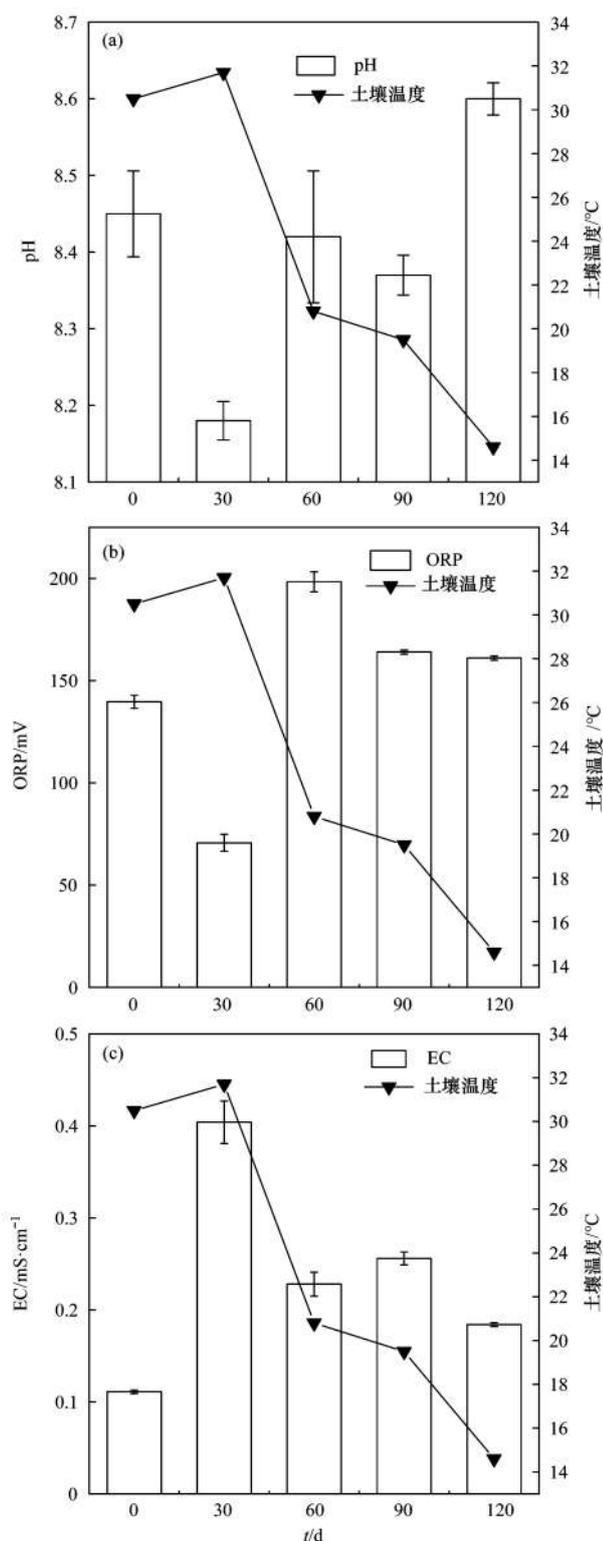


图2 Exp-BT组土壤修复过程中pH、ORP、EC和温度的变化

Fig. 2 Changes in pH, ORP, EC, and temperature during Exp-BT soil remediation

30 d 达到峰值 $0.98 \mu\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$, 而后缓慢下降。在整个处理过程中, 脱氢酶趋势与 Liu 等^[13] 和 Zhen 等^[17] 报道的结果基本一致。本实验初期, 石油污染土壤中存在易生物降解的碳氢化合物, 脱氢酶活性最高。随着生物利用度高的污染物被降解, 脱氢酶活性降低。Liu 等^[13] 在处理石油污染土壤过程中, 脱氢

酶活性在 27 d 内下降了约 60%。本实验在 120 d 周期内, 脱氢酶活性仅降低了 32.7%, 整个过程中均保持了高活性。此外, 90 d 后气温显著降低, 同时也证明接种石油降解菌提高了菌群抗低温的能力。

脂肪酶能够将土壤中羧酸脂类有机化合物水解, 生成可溶性物质。脂肪酶活性变化趋势与脱氢酶类似, 图 3(b) 显示脂肪酶在 30 ~ 60 d 均保持较高活性, 而后逐渐下降, 这与王华金等^[18] 研究的结果一致。修复过程中, 脂肪酶活性 (以 pNP/soil 计) 最高可达 $387.92 \mu\text{g} \cdot (\text{g} \cdot 10 \text{ min})^{-1}$ 。有研究表明, 与脱氢酶不同, 在生物修复后期可利用组分减少和难降解物质积累对土壤脂肪酶活性的影响不明显^[19]。本研究中生物修复后期脂肪酶活性出现明显下降, 可能是修复过程中产生了毒性较强的中间代谢产物。

2.2.3 相关性分析

对修复过程中各时间点样品的土壤理化性质 (pH、EC、ORP)、环境温度 (TEMP) 和土壤酶活性 (脂肪酶 LIP、脱氢酶 DEH) 进行相关性分析, 如图 4 所示。温度、脱氢酶和脂肪酶活性三者之间均呈显著正相关 ($P < 0.05$), 较高的温度可以提高微生物的代谢活性; TPH 浓度与脱氢酶和脂肪酶显著正相关 ($P < 0.05$), 微生物的高活性促进了石油污染物的快速降解, 这与 Devi 等^[20] 和张博凡等^[21] 研究的结论一致; 而 pH 与脱氢酶呈显著负相关 ($P < 0.05$), 降解烃类细菌在 pH 接近中性的条件下发育最好, 土壤样品偏碱性随修复过程逐渐上升, 加之修复后期微生物的脱氢酶活性受环境温度降低的影响, 导致了这一结果。

2.3 群落结构与物种功能分析

2.3.1 微生物群落结构变化

Illumina 测序共获得 B0: 94 944 994、GZ: 108 693 364 和 BT: 88 625 538 条序列 (Raw reads), 每条 read 序列长度均为 150 bp; 经质控后选择 B0: 92 706 180、GZ: 106 026 290 和 BT: 86 647 814 条序列进行进一步分析。使用 LCA 方法对基因集进行了 NR 物种注释, Taxon 个数统计结果如下: 域 4、界 10、门 106、纲 182、目 315、科 565、属 1 441 和种 3 490。

从门和属两个水平的 Venn 图中可以看出 (图 5), BT 和 B0 样本来说整体较为相似, 但 BT 样本微生物种类多样性更高, 本研究推测这种情况的出现是由于 GZ 混合菌的引入。GZ 样品中超过 80% 的物种均出现在另外两个样本中, 但 BT 样本呈现出更高的相似程度。这一分析证明通过外源添加经驯化的石油降解菌群, 可以对降解体系的微生物群落结构与物种多样性的变化产生正向影响。

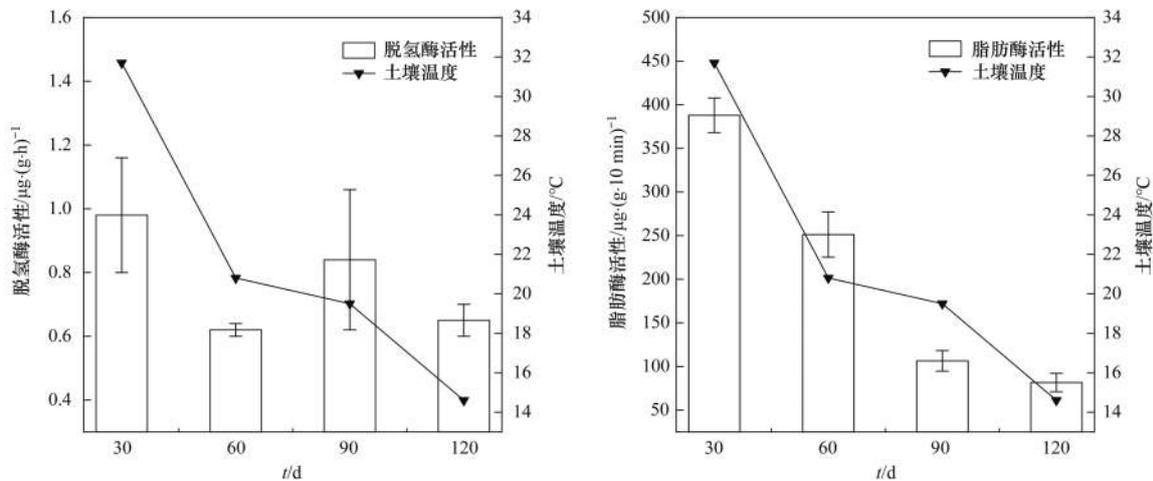


图3 Exp-BT 组土壤修复过程中土壤脱氢酶、脂肪酶活性和温度的变化

Fig. 3 Changes in soil dehydrogenase, lipase activity, and temperature during Exp-BT soil remediation

图6 给出修复过程中土壤样中微生物多样性与丰度的变化。门水平上已识别变形菌门和放线菌门最丰富,在所有样本中均处于优势地位,尤其是 GZ 样本,两个菌门占总样本丰度达 99.91%,其中 Proteobacteria 门相对丰度更是高达 98.53%,这与余天飞等^[22]在细菌富集培养研究中的结论一致。有研究表明,Proteobacteria 是包括土壤和海水等各类环境中最丰富的门,并且还是各类石油烃污染场地中占主导的菌门^[23,24]。此外,Jiao 等^[25]也提到变形菌门和放线菌门能够通过自身代谢活动降解石油烃类污染物,在许多石油污染土壤中均占优势地位。在属水平上 GZ 样本中优势菌主要为 *Pseudomonas*、*Achromobacter* 和 *Rhodococcus*。在其他生物强化研究中,丁明山等^[26]从油田退役井场老化油泥中分离出 3 种石油烃降解菌,分别为短杆菌 TK-3、DM-2 和红球菌 TM-1; Rahman 等^[27]从 130 种石油降解细菌培养物中筛选出 5 种高效菌株 *Micrococcus* sp. GS2-22、*Corynebacterium* sp. GS5-66、*Flavobacterium* sp. DS5-73、*Bacillus* sp. DS6-86 和 *Pseudomonas* sp. DS10-129; Varjani 等^[28]研究发现利用碳氢化合物的细菌群 (HUBC) 由 *Ochrobactrum* sp.、*Stenotrophomonas maltophilia* 和 *P. aeruginosa* 组成。由此可知对于生物强化,各研究所获得的优势降解菌在门水平层面较为相似,而在属水平或具体菌株则差异较大。结合本研究对石油污染土壤 TPH 降解率高达 81.23%,可以看出本研究中长期污染场地菌源选择合适(来自广州石油污染场地),采用定向驯化方式驯化所得石油降解菌的降解效果优异。

与 B0 样本相比,虽然石油碳氢化合物抑制了修复初期大多数微生物的生长,但在引入外源石油降解菌群并经过 120d 修复后,变形菌门与放线菌门的优势地位进一步扩大,总相对丰度增加 17.1%。

其中放线菌门相对丰度由 33.96% 升至 51.61%,变形菌门相对丰度虽略有降低,但根据 NR 物种注释其丰度提升了 15.01%。虽然根据图 5 与 NR 物种注释结果 BT 样本微生物种类更为丰富且总丰度更高,但从图 6 中可以看出其群落结构发生了较大变化,与石油烃降解相关的功能菌门物种更为集中。而相对丰度 $\geq 1\%$ 的除变形菌门和放线菌门的其他菌门,大多数不论在丰度还是相对丰度上均呈现不同程度减少。此外,虽然土壤中酸杆菌门丰度较原始土壤有所下降,但仍占不小比例,Chen 等^[29]研究结果表明酸杆菌门也具有降解石油烃的能力。后续可通过改变驯化条件等方式,进一步研究如何通过调整石油烃降解混合菌门相对丰度,以获得更优的石油烃降解效率。

属水平微生物多样性与丰度的变化如图 6(b) 所示。可以看出在 3 个样本中相对丰度 $\geq 1.5\%$ 的菌属,按照在 BT 样本中的丰度排序,放线菌门中主要为 *Achromobacter* (7.91%) 和 *Pseudomonas* (4.07%) 等;变形菌门中主要为 *Nocardioides* (17.63%)、*Gordonia* (7.75%) 和 *Rhodococcus* (5.53%) 等。*Nocardioides*^[30]、*Pseudomonas*^[31]、*Achromobacter*^[32]、*Gordonia*^[33]、*Rhodococcus*^[34] 和 *Acinetobacter*^[35] 这 6 种菌属均为已报道过的石油降解菌。

与 B0 相比,BT 样本中 *Nocardioides* 仍为优势菌,相对丰度由 11.79% 上升到 17.63%,在样本所有菌属中的优势地位进一步扩大;剩余菌属相对丰度情况发生较大改变,其中 8 种相对丰度上升尤为明显:*Achromobacter* (0.14% \rightarrow 7.91%)、*Gordonia* (0.11% \rightarrow 7.75%)、*Agromyces* (3.81% \rightarrow 5.98%) 和 *Rhodococcus* (0.83% \rightarrow 5.53%),还有 *Alcanivorax*、*Solimonas*、*Ramlibacter* 和 *Shinella* 等。其余如 unclassified_c __Betaproteobacteria、unclassified_p __

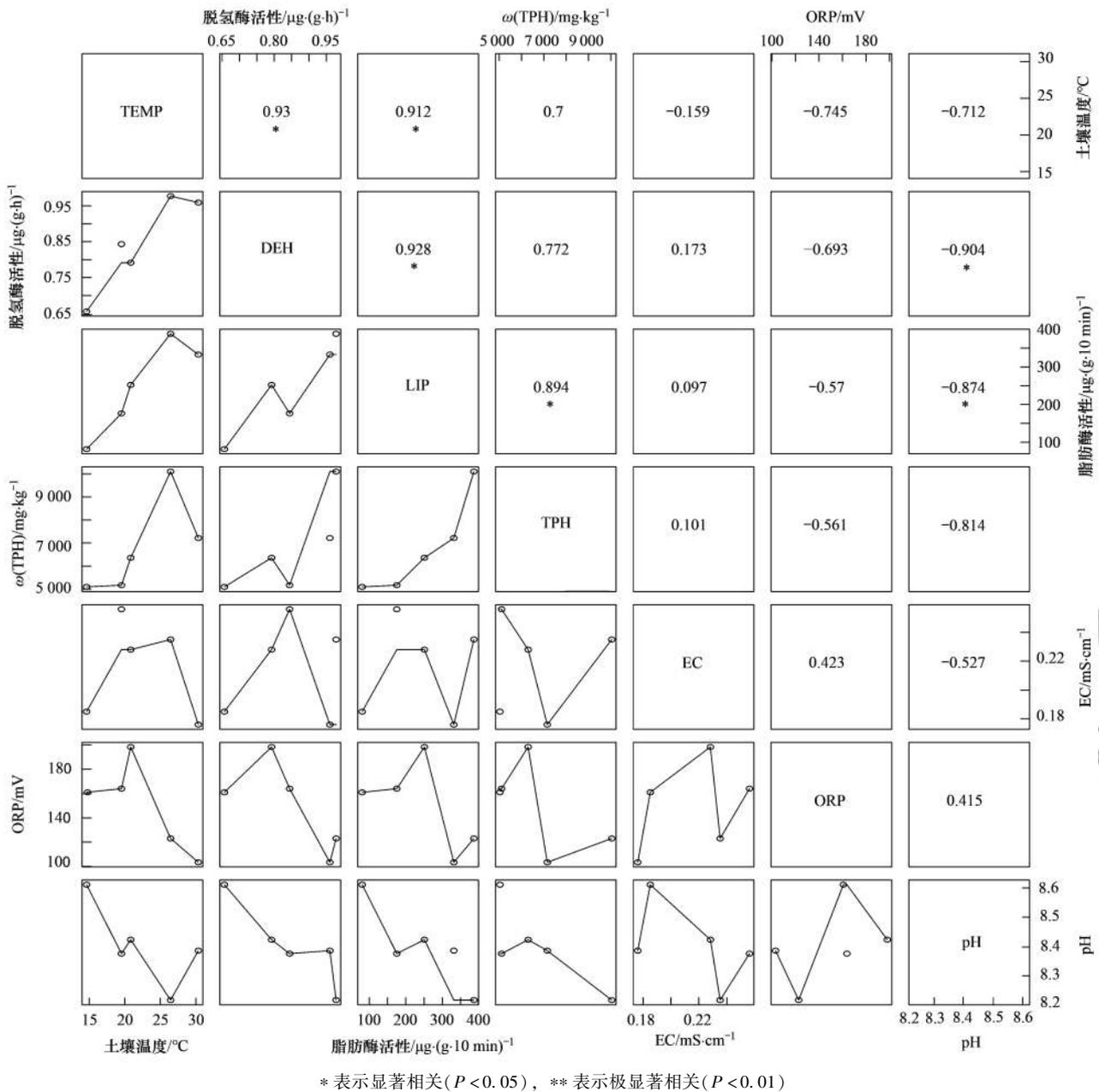


图 4 Exp-BT 组土壤修复参数的 Pearson 相关矩阵

Fig. 4 Pearson correlation matrix of Exp-BT soil remediation parameters

Candidatus_Rokubacteria、*Nocardia* 和 *Acinetobacter* 等菌属的相对丰度则呈现出不同程度的减少。

GZ 样本中其他优势菌属 *Achromobacter* 和 *Rhodococcus* 等在 BT 样本中表现出积极正向作用,提升相关石油降解菌属的相对丰度,改善了降解体系的微生物群落结构组成;值得注意的是, *Pseudomonas* 在 GZ 样本中占有绝对优势,但 BT 样本中其相对丰度却略有降低.结合图 1 分析,30d 时 TPH 降解速率最快,120d 时降解率基本维持不变.分析认为由于取样时间过长,石油降解菌发挥完降解作用后占比恢复稳定,从而最后表现为土著菌更占优势.此外微生物在污染体系中的生存情况受多方面影响,除微生物本身对污染物质的利用能力外,

还与污染物种类、浓度和环境条件等密切相关.随修复时间延长,降解体系中的碳源不断被消耗,且环境温度逐渐下降,后期 B0 原始污染土壤样品中的优势土著菌 *Nocardioideis* 相较于外源引入的功能菌属 *Pseudomonas* 可能在此降解体系中更具竞争力,从而导致这一结果的出现.

2.3.2 微生物功能的 COG 和 KEGG 分析与物种贡献度

图 7 为两样本 COG 和 KEGG 物种与功能差异分析. COG 的高度丰富的功能类别按以下顺序排列:氨基酸转运和代谢、功能预测、能量产生和转换、信号转导机制、脂质转运和代谢、细胞壁-膜-包膜生物发生、辅酶转运和代谢、翻译、核糖体结构

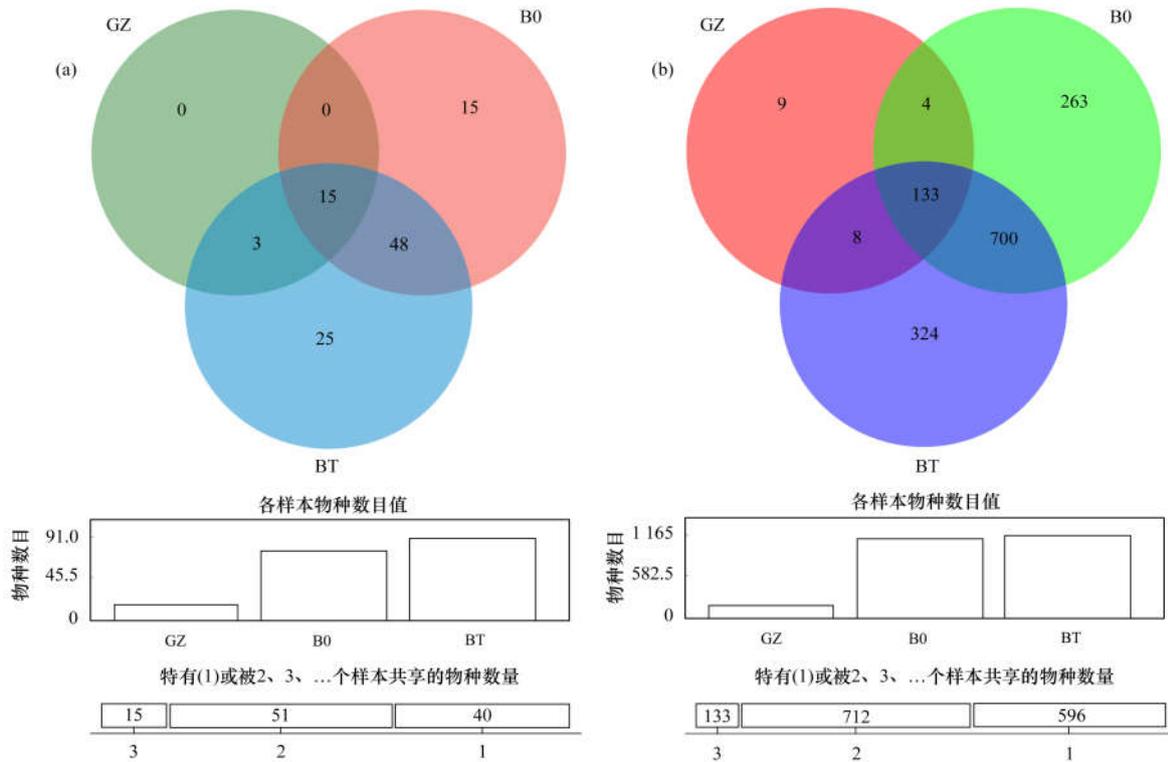


图 5 不同样本间门水平和属水平的物种组成相似性及重叠情况 Venn 图

Fig. 5 Venn chart of similarity and overlap of species composition at phylum and genus levels among different samples

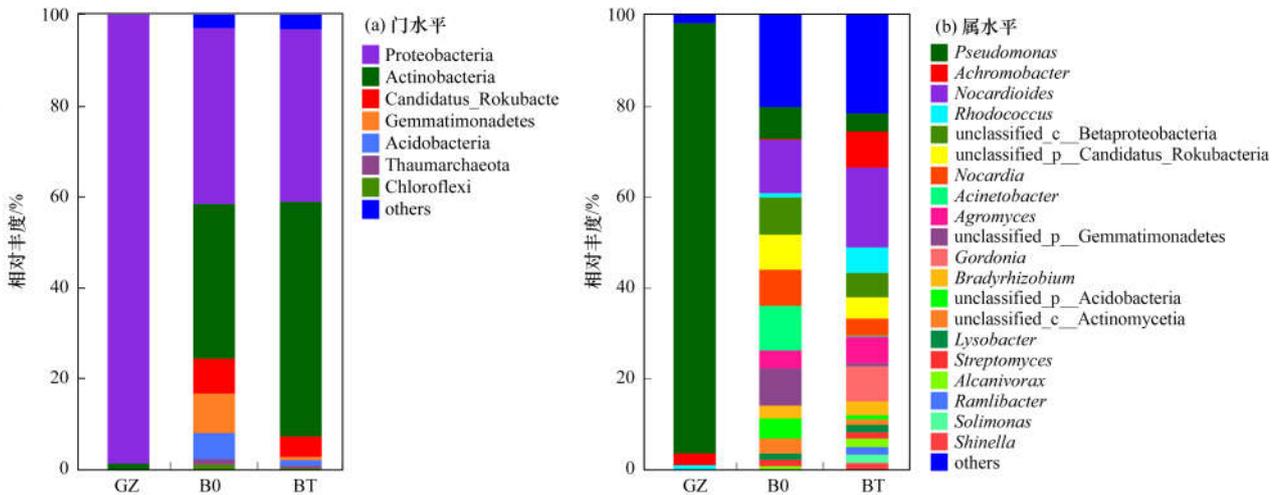


图 6 不同样本门水平和属水平的物种群落柱状图

Fig. 6 Histograms of species communities at phylum and genus levels of different samples

和生物发生、无机离子转运和代谢、转录、复制、重组和修复、防御机制和核苷酸转运和代谢等. 而根据图 7(b) 的 KEGG 注释, 可以看出两个样本中最丰富的途径均为次级代谢物的生物合成、不同环境下的微生物代谢, 此外低丰度的 KEGG 途径包括碳代谢、氨基酸生物合成、辅因子生物合成、ABC 转运体、双组分系统、群体感应、嘌呤代谢、丙酮酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、氧化磷酸化、糖酵解/糖异生、原核生物中的碳固定途径和氨酰-tRNA 生物合成等.

在应激环境中, 微生物需要足够的能量供应来维持基本的细胞代谢. 石油污染土壤中, 微生物以石油烃为碳源, 通过碳代谢促进细胞生长. 细胞外膜可以保护细胞免受环境有毒分子的伤害, 对细胞在应激条件下的生存非常重要^[36]. 通过氨基酸、脂质、磷和无机离子的转运与代谢, 可以改变细胞外膜的通透性, 减轻外界污染物对细胞的影响. 细胞通过转录和翻译中进行相对变化, 改变不同核糖体蛋白的表达水平以产生差异基因, 适应不同环境的要求^[37]. 基于 KEGG 通路分析, ABC 转运蛋白也得到

了富集.石油烃类污染物不溶于水,难被微生物吸收,需要一些特定的受体转运体来帮助其吸收和利

用,ABC 转运蛋白是细菌获取碳源的最重要途径^[38].

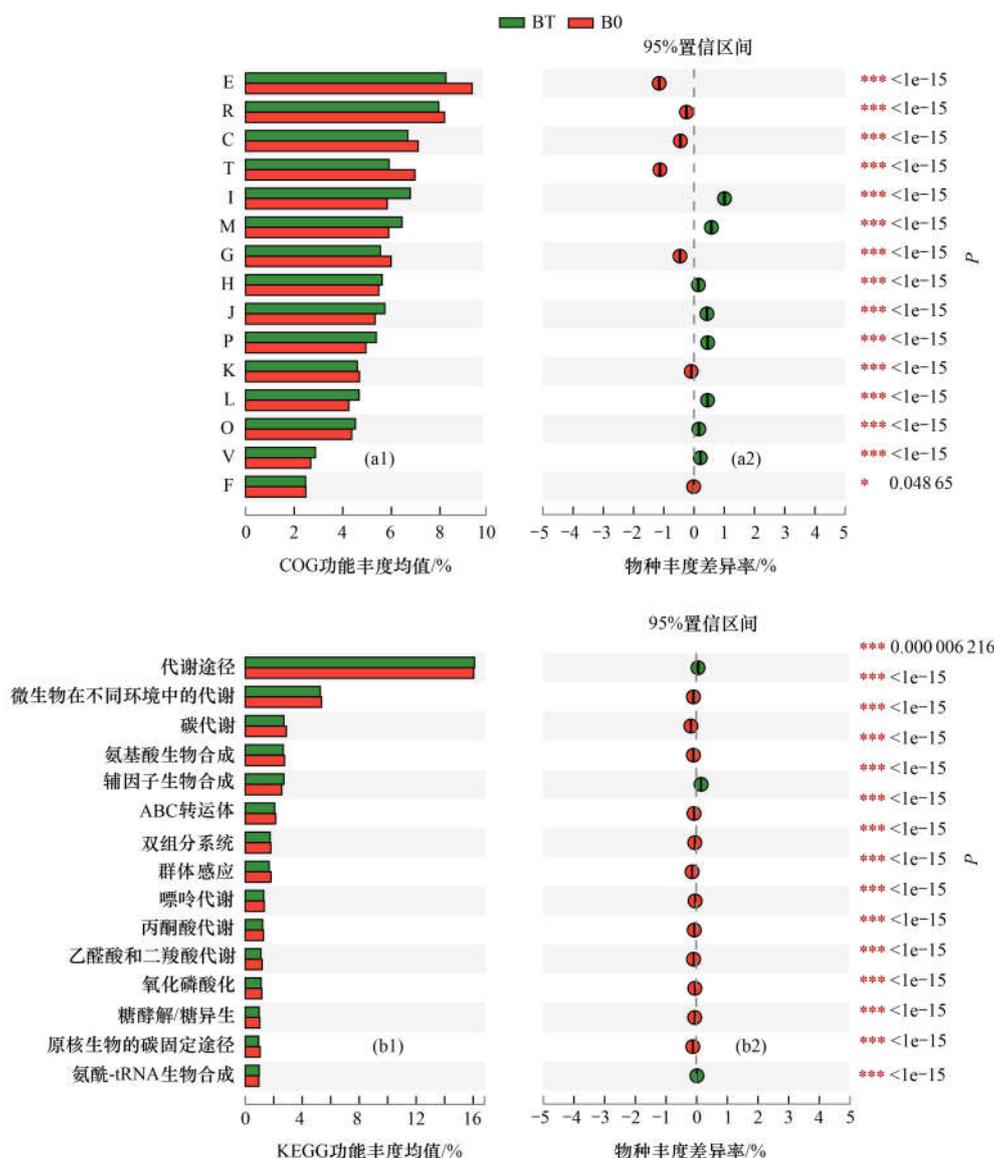


图 7(a1)纵坐标为 COG 功能注释分析数据库中不同功能缩写; * 表示 $0.01 < P \leq 0.05$, ** 表示 $0.001 < P \leq 0.01$, *** 表示 $P \leq 0.001$

图 7 修复前后样本网 COG 和 KEGG 功能差异性检验

Fig. 7 Functional difference test of COG and KEGG between samples before and after remediation

根据图 8(a) COG 物种与功能贡献度分析, BT 中对氨基酸运输与代谢转化、主要功能预测、能源生产与转换、信号转导机制和脂肪转运代谢等功能贡献度较大的主要有 *Nocardioides*、g __ unclassified _ c __ Betaproteobacteria、g __ unclassified _ p __ Candidatus _ Rokubacteria、*Agromyces*、*Achromobacte*、*Gordonia* 和 *Rhodococcus*. KEGG 分析展现了类似的结果,图 8(b)表明代谢途径、次级代谢物的生物合成、不同环境下的微生物代谢、碳代谢和氨基酸生物合成与 *Nocardioides*、g __ unclassified _ c __ Betaproteobacteria、g __ unclassified _ p __ Candidatus _ Rokubacteria、*Agromyces*、*Achromobacte*、*Gordonia* 和 *Rhodococcus* 有关. 与 B0 相比 BT 组中 *Nocardioides*、

Achromobacter、*Gordonia* 和 *Rhodococcus* 对主要功能的贡献度明显增加. 结合 KEGG 和 COG 结果分析推断本实验中的 *Nocardioides*、*Achromobacter*、*Gordonia* 和 *Rhodococcus* 对石油烃的降解有着重要贡献.

2.4 烷烃的降解路径与相关代谢酶基因分析

另基于 KEGG 中代谢通路丰度排名,发现 BT 样本中与烷烃降解代谢相关的 ko00071 “FATTY ACID DEGRADATION”路径富集. 根据 KEGG 网站 (<http://www.KEGG.jp/KEGG/>), ko00071 中建议了烷烃的 ω/α 羟化脂肪酸降解途径,其中相关代谢酶基因: alkane 1-monooxygenase [EC: 1. 14. 15. 3]、alcohol dehydrogenase [EC: 1. 1. 1. 1]、aldehyde dehydrogenase (NAD⁺) [EC: 1. 2. 1. 3]在 BT 样本中

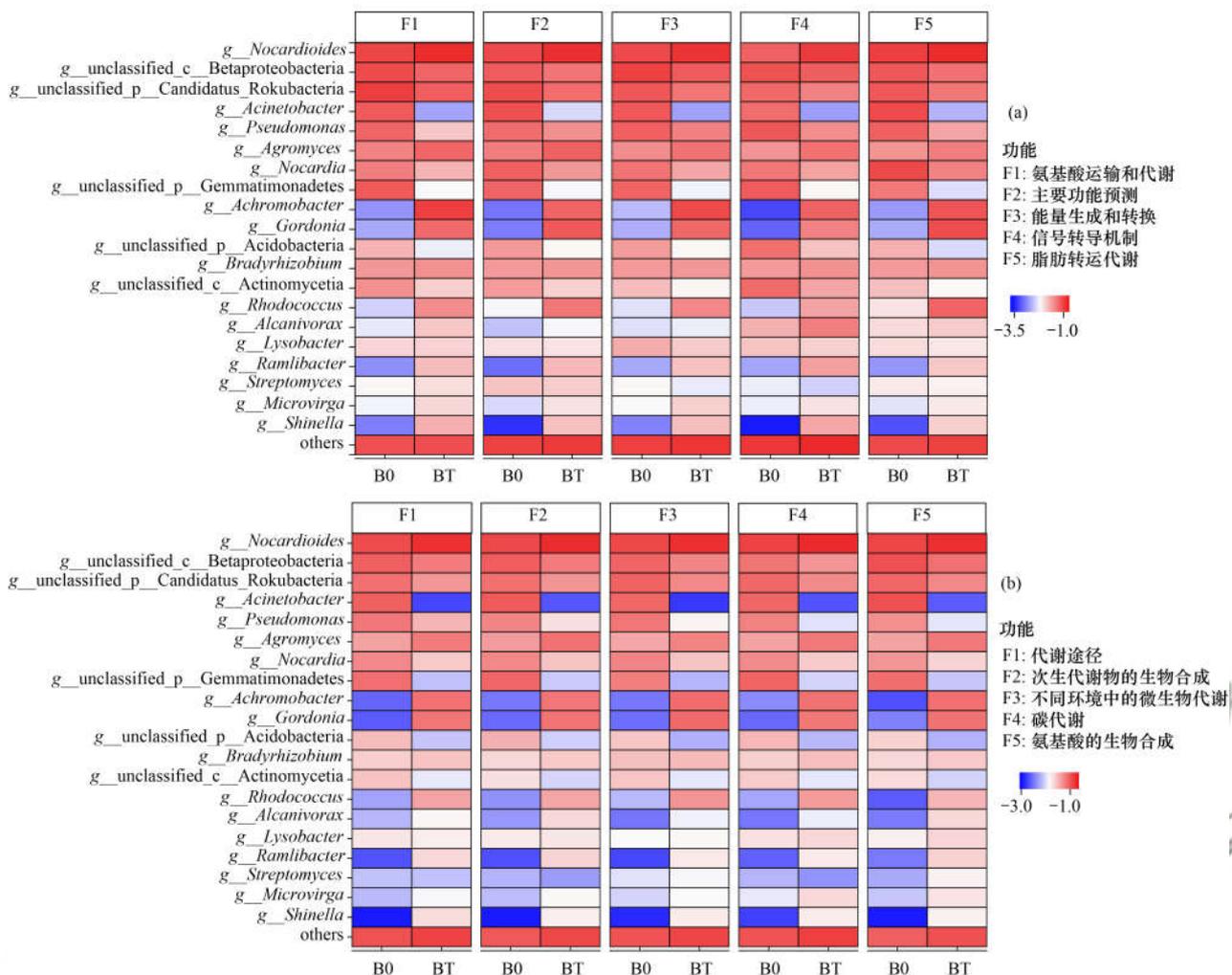


图 8 修复前后样本 COG 和 KEGG 物种与功能贡献度热图

Fig. 8 Heat map of COG and KEGG species and function contribution of samples before and after remediation

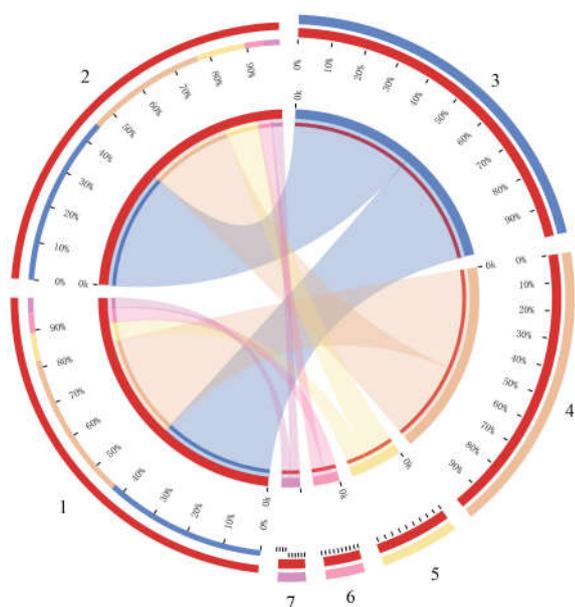
丰度水平均很高,此外还有 long-chain acyl-CoA synthetase[EC:6.2.1.3]及 TCA 相关酶基因等.且 BT 样本中上述相关酶基因丰度水平均高于 B0 样本,增加了 18.16%~41.12%不等,并与 GZ 样品中相对丰度水平基本保持一致.这些结果证明石油降解菌系的引入提高了相关酶基因的表达水平,且微生物对烷烃的降解主要是通过末端氧化途径进行.但是由于目前 KEGG 数据库中烷烃代谢通路信息不全,通过此方法不能全面且具体获得微生物对烷烃的代谢途径,因此本研究结合相关文献对样本中与石油烃降解相关的功能基因进行了研究.

为获得石油污染土壤微生物群落中的石油烃降解相关基因,对样品 B0、GZ 和 BT 这 3 个样本的基因进行了 KEGG 功能注释,在其中发现 5 个石油烃降解相关基因,KEGG NAME 和对应的 KEGG Orthology 分别为: *alkB1_2/alkM* (K00496)、*tamA* (k07278)、*rubB/alkT* (k05297)、*ladA* (K20938) 和 *alkB* (K03919).通过对 B0、BT 样品的功能基因丰度表进行比较分析,可看出由于 GZ 外源微生物的

引入,BT 样本相较于 B0 样本中与石油烃降解相关基因总丰度增加 32.20%.具体来说,除 *rubB/alkT* 基因丰度减少 19.67%外,*alkM*、*tamA*、*ladA* 和 *alkB* 各功能基因丰度均有增加,比例分别为 22.64%、60.27%、64.03%和 23.42%.

在此基因注释表的基础上,进一步通过 Circos 样本与基因关系图清晰描述其丰度对应关系.从图 9 可看出, *alkM* 基因在两个样品中均占主导地位,其余基因丰度关系为: *tamA* > *rubB* > *ladA* > *alkB*.降解体系中基因相对丰度比例有所改变,部分基因相对丰度比例增加: *tamA* (32.92% → 39.91%)、*ladA* (5.56% → 6.90%);其余均略有降低: *alkM* (44.88% → 41.63%)、*rubB* (12.20% → 7.41%) 和 *alkB* (4.44% → 4.15%).

据报道,所选基因(*alkM*、*tamA*、*rubB*、*ladA* 和 *alkB*) 在石油烃的转化和代谢中起着重要作用^[39,40]. *AlkM* 是烷烃羟化酶编码基因, Ratajczak 等^[41]通过基因的失活实验表明 *ORF1*、*alkR* 和 *alkM* 是烷烃利用的潜在必须基因; *AlkM* 对于烷烃上的



1. BT, 2. B0, 3. K00496, 4. K07278, 5. K05297, 6. K20938, 7. K03919; 左边半圆(较小圈)表示样本的功能丰度组成情况,右边半圆(较大圈)表示在该聚类水平下功能在不同样本中的分布比例情况;圆圈从外到内,第一、二彩色圈:左半部分圆圈表示不同样本对应的功能组成,不同颜色表示不同功能,长度表示某一功能在该样本中的丰度比例(第二圈内显示的百分比);右半部分圆圈表示不同样本在优势功能中的分布比例,不同颜色表示不同样本,长度表示该样本在某一物种中的分布比例(第二圈内显示的百分比);第三圈:圈内的彩色条带,一端连接样本(左边半圆),条带端点宽度表示功能在该样本中的丰度,另一端连接功能(右边半圆),条带端点宽度表示该样本在相应功能中的分布比例,圈外数值表示相应功能的丰度数值

图9 修复前后 Circos 样本与基因关系

Fig. 9 Circos sample and gene relationship diagram

生长是必不可少的,但对于相应的烷醇上的生长却不是,这表明它是末端烷烃羟化酶。*TamA* 是碳链选择性腺苷酸化酶, Marchetti 等^[42] 研究表明 *TamA* 能够利用 $C_6 \sim C_{13}$ 的脂肪酸 (C_{14} 形式几乎检测不到), 而且对 C_{12} 的酰化形式的转化是最高的; *TamA* 可以将链长范围从 $C_6 \sim C_{13}$ 的脂肪酸转移到一个孤立的 ACP 结构域, 因此 *TamA* 通过连接脂肪酸和吡咯生物合成途径, 弥合初级和次级代谢之间的差距。烷烃单加氧酶 (*AlkB*) 是一种非血红素二铁酶, 催化烷烃的羟基化。它通常存在于以烷烃为唯一碳源和能量来源的烷烃营养生物中^[39]。它与 *AlkG* 和 *AlkT* 基因形成的酶复合物共同组成红素氧还蛋白依赖酶。*AlkB* 的活化是通过其二铁活性位点的双电子还原实现的, 这有助于分子氧的结合、活化和裂解, 以插入惰性 C—H 键^[43]。电子通常由 NADH 通过红素氧还蛋白还原酶 (*AlkT*) 到红素氧还蛋白 (*AlkG*) 到 *AlkB*, 如图 9 所示。在分枝杆菌、戈登菌、红球菌、伯克霍尔德菌、红杆菌、弗兰克氏菌、军团菌、不动杆菌和海洋杆菌的基因组序列中发现了 *alkB* 基因的存

在^[44]; *LadA* 基因控制长链烷烃单加氧酶的形成, 利用末端氧化途径将长链烷烃 (至少 C_{36}) 转化为相应的伯醇; *LadA* 通过的黄素蛋白单加氧酶机制催化长链烷烃的转化, 其能力取决于长链烷烃底物的结合模式^[45]。与 B0 相比, BT 样本这些基因的丰度更大, 表明在样品 BT 中可能有更大的降解能力。

3 结论

(1) 石油污染土壤添加高效降解菌系进行为期 120 d 生物修复, TPH 降解率达到 81.23%, 强化了污染体系中土著菌群的 TPH 降解能力。修复过程中 pH、EC 值均处于较佳范围内, 土壤环境内的氧化能力增强, 微生物的代谢活性维持较高水平, 保证了生物修复体系好氧降解能力。生物强化对石油污染土壤石油烃的降解速率、效果等均较优。

(2) 揭示外源石油降解菌系实现高效降解效率的原因并确认关键菌属。高效石油降解菌系对石油污染场地土著微生物有强化作用, 可改善降解体系的微生物群落结构组成; 关键石油烃降解菌属 *Nocardioides*、*Achromobacter*、*Gordonia* 和 *Rhodococcus* 等的相对丰度得到提升。

(3) 生物信息学分析表明, 外源高效石油烃菌系主要是通过末端氧化途径降解石油烃; 其强化机制是通过增强微生物相关酶的代谢活性与相应功能基因 *alkM*、*tamA*、*rubB*、*ladA* 和 *alkB* 等的表达。

参考文献:

- [1] Maliszewska-Kordybach B, Klimkowicz-Pawlas A, Smreczak B, et al. Ecotoxic effect of phenanthrene on nitrifying bacteria in soils of different properties [J]. Journal of Environmental Quality, 2007, 36(6): 1635-1645.
- [2] Abbasian F, Lockington R, Mallavarapu M, et al. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(3): 670-699.
- [3] 华涛, 李胜男, 邱志辉, 等. 微生物降解石油污染物机制研究进展 [J]. 生物技术通报, 2018, 34(10): 26-34.
Hua T, Li S N, Di Z H, et al. Review on mechanism and application of microbe degrading petroleum pollutants [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(10): 26-34.
- [4] Shintani M, Sugiyama K, Sakurai T, et al. Biodegradation of A-fuel oil in soil samples with bacterial mixtures of *Rhodococcus* and *Gordonia* strains under low temperature conditions [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 127(2): 197-200.
- [5] Szulc A, Ambrozewicz D, Sydow M, et al. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies [J]. Journal of Environmental Management, 2014, 132: 121-128.
- [6] 吴蔓莉, 祁燕云, 祝长成, 等. 堆肥对土壤中石油烃的去除及微生物群落的影响 [J]. 中国环境科学, 2018, 38(8): 3042-3048.
Wu M L, Qi Y Y, Zhu C C, et al. Influence of compost

- amendment on hydrocarbon degradation and microbial communities in petroleum contaminated soil [J]. *China Environmental Science*, 2018, **38**(8): 3042-3048.
- [7] Ma J, Yan G X, Ma W F, *et al.* Isolation and characterization of oil-degrading microorganisms for bench-scale evaluations of autochthonous bioaugmentation for soil remediation[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2015, **226**(8), doi: 10.1007/s11270-015-2491-6.
- [8] Ameen F, Moslem M, Hadi S, *et al.* Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016, **23**(2): 211-218.
- [9] Alisi C, Musella R, Tasso F, *et al.* Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, **407**(8): 3024-3032.
- [10] Margesin R, Feller G, Hämmerle M, *et al.* A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil [J]. *Biotechnology Letters*, 2002, **24**(1): 27-33.
- [11] 张金秋, 王帅杰, 王露, 等. 紫花苜蓿-铜绿假单胞菌联合修复石油污染土壤[J]. *石油学报(石油加工)*, 2022, **38**(6): 1399-1405.
- Zhang J Q, Wang S J, Wang L, *et al.* Remediation of petroleum contaminated soil by alfalfa and *Pseudomonas Aeruginosa* [J]. *Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section)*, 2022, **38**(6): 1399-1405.
- [12] 花莉, 成涛之, 梁智勇. 固定化混合菌对陕北黄土地区石油污染土壤的修复效果[J]. *生态环境学报*, 2022, **31**(8): 1610-1615.
- Hua L, Cheng T Z, Liang Z Y. Remediation effect of petroleum-contaminated soil by immobilized mixed bacteria in northern Shaanxi Province of China [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2022, **31**(8): 1610-1615.
- [13] Liu Q M, Li Q B, Wang N, *et al.* Bioremediation of petroleum-contaminated soil using aged refuse from landfills [J]. *Waste Management*, 2018, **77**: 576-585.
- [14] Chakravarty P, Deka H. Enzymatic defense of *Cyperus brevifolius* in hydrocarbons stress environment and changes in soil properties [J]. *Scientific Reports*, 2021, **11**(1), doi: 10.1038/s41598-020-80854-5.
- [15] Atlas R M, Bartha R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation[A]. In: Marshall K C (Ed.). *Advances in Microbial Ecology*[M]. Boston: Springer, 1992; 287-338.
- [16] Manuel C, Jorge R, Maximiliano C. Biodegradation experiment conducted at a tropical site in Eastern Venezuela [J]. *Wastes Management. & Resources*, 1993, **11**: 97-106.
- [17] Zhen L S, Hu T, Lv R, *et al.* Succession of microbial communities and synergetic effects during bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil enhanced by chemical oxidation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, **410**, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124869.
- [18] 王华金, 朱能武, 杨崇, 等. 石油污染土壤生物修复对土壤酶活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2013, **32**(6): 1178-1184.
- Wang H J, Zhu N W, Yang C, *et al.* Effect of soil enzyme activities during bioremediation of crude oil-contaminated soil [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, **32**(6): 1178-1184.
- [19] Margesin R, Schinner F. Biological decontamination of oil spills in cold environments [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1999, **74**(5): 381-389.
- [20] Devi S P, Jani K, Sharma A, *et al.* Bacterial communities and their bioremediation capabilities in oil-contaminated agricultural soils[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2022, **194**(1), doi: 10.1007/s10661-021-09669-9.
- [21] 张博凡, 熊鑫, 韩卓, 等. 菌糠强化微生物降解石油污染土壤修复研究[J]. *中国环境科学*, 2019, **39**(3): 1139-1146.
- Zhang B F, Xiong X, Han Z, *et al.* Bioremediation of petroleum contaminated soil by microorganisms enhanced with spent mushroom substrate [J]. *China Environmental Science*, 2019, **39**(3): 1139-1146.
- [22] 余天飞, 柳晓东, 艾加敏, 等. 石油污染土壤富集前后细菌群落组成和共现网络分析[J]. *中国环境科学*, 2022, **42**(8): 3858-3866.
- Yu T F, Liu X D, Ai J M, *et al.* Bacterial community composition and co-occurrence network before and after enrichment of oil-contaminated soil [J]. *China Environmental Science*, 2022, **42**(8): 3858-3866.
- [23] Zhang W, Wang H, Zhang R, *et al.* Bacterial communities in PAH contaminated soils at an electronic-waste processing center in China [J]. *Ecotoxicology*, 2010, **19**(1): 96-104.
- [24] Mukherjee S, Juottonen H, Siivonen P, *et al.* Spatial patterns of microbial diversity and activity in an aged creosote-contaminated site [J]. *The ISME Journal*, 2014, **8**(10): 2131-2142.
- [25] Jiao S, Liu Z S, Lin Y B, *et al.* Bacterial communities in oil contaminated soils: biogeography and co-occurrence patterns [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, **98**: 64-73.
- [26] 丁明山, 刘京焯, 孙楠, 等. 退役井场老化油污土壤的生物强化修复技术[J]. *环境工程*, 2022, **40**(5): 159-165.
- Ding M S, Liu J X, Sun N, *et al.* Bioaugmentation remediation of ageing oil-contaminated soil in decommissioned well field [J]. *Environmental Engineering*, 2022, **40**(5): 159-165.
- [27] Rahman K S M, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, *et al.* Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium [J]. *Bioresource Technology*, 2002, **85**(3): 257-261.
- [28] Varjani S J, Rana D P, Jain A K, *et al.* Synergistic *ex-situ* biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, **103**: 116-124.
- [29] Chen K J, He R, Wang L A, *et al.* The dominant microbial metabolic pathway of the petroleum hydrocarbons in the soil of shale gas field: Carbon fixation instead of CO₂ emissions [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, **807**, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151074.
- [30] Hamamura N, Arp D J. Isolation and characterization of alkane-utilizing *Nocardioide* sp. strain CF8 [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **186**(1): 21-26.
- [31] Das K, Mukherjee A K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India [J]. *Bioresource Technology*, 2007, **98**(7): 1339-1345.
- [32] Deng M C, Li J, Liang F R, *et al.* Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, **83**(1): 79-86.
- [33] Kim H S, Dong K, Kim J, *et al.* Characteristics of crude oil-degrading bacteria *Gordonia ierans* isolated from marine coastal in Taean sediment [J]. *Microbiologypopen*, 2019, **8**(6), doi:

- 10.1002/mbo3.754.
- [34] Gibu N, Kasai D, Ikawa T, *et al.* Characterization and transcriptional regulation of *n*-alkane hydroxylase gene cluster of *Rhodococcus jostii* RHA1 [J]. *Microorganisms*, 2019, **7**(11), doi: 10.3390/microorganisms7110479.
- [35] Throne-Holst M, Wentzel A, Ellingsen T E, *et al.* Identification of novel genes involved in long-chain *n*-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(10): 3327-3332.
- [36] DeLucia A M, Six D A, Caughlan R E, *et al.* Lipopolysaccharide (LPS) inner-core phosphates are required for complete LPS synthesis and transport to the outer membrane in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. *Mbio*, 2011, **2**(4), doi: 10.1128/mBio.00142-11.
- [37] Xu J, Zhang L, Hou J L, *et al.* iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the global response to 17 β -estradiol in estrogen-degradation strain *Pseudomonas putida* SJTE-1 [J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**, doi: 10.1038/srep41682.
- [38] Yun S H, Park G W, Kim J Y, *et al.* Proteomic characterization of the *Pseudomonas putida* KT2440 global response to a monocyclic aromatic compound by iTRAQ analysis and 1DE-MudPIT [J]. *Journal of Proteomics*, 2011, **74**(5): 620-628.
- [39] Li J, Xu Y, Song Q W, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon and *n*-alkane pollution characteristics and structural and functional perturbations to the microbial community: a case-study of historically petroleum-contaminated soil [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, **28**(9): 10589-10602.
- [40] Shahi A, Ince B, Aydin S, *et al.* Assessment of the horizontal transfer of functional genes as a suitable approach for evaluation of the bioremediation potential of petroleum-contaminated sites: a mini-review [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, **101**(11): 4341-4348.
- [41] Ratajczak A, Geissdorfer W, Hillen W. Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADPI is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(4): 1175-1179.
- [42] Marchetti P M, Kelly V, Simpson J P, *et al.* The carbon chain-selective adenylation enzyme TamA: the missing link between fatty acid and pyrrole natural product biosynthesis [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2018, **16**(15): 2735-2740.
- [43] Williams S C, Luongo D, Orman M, *et al.* An alkane monooxygenase (AlkB) family in which all electron transfer partners are covalently bound to the oxygen-activating hydroxylase [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2022, **228**, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2021.111707.
- [44] Cabral L, Giovanella P, Pellizzer E P, *et al.* Microbial communities in petroleum-contaminated sites: structure and metabolisms [J]. *Chemosphere*, 2022, **286**(2), doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131752.
- [45] Li L, Liu X Q, Yang W, *et al.* Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, **376**(2): 453-465.

CONTENTS

Analysis of Change Trend and Influencing Factors of PM _{2.5} -O ₃ Pollution in Tianjin from 2013 to 2020	XIAO Zhi-mei, LI Ya-fei, GAO Jing-yun, <i>et al.</i> (4211)
Changes in Ozone Pollution Trend Characteristics and Sensitivity in Jinan from 2015 to 2020	SUN Xiao-yan, SUN Jun, GUO Meng-meng, <i>et al.</i> (4220)
Analysis of O ₃ Pollution Characteristics, Formation Sensitivity, and Transport Impact in Southern Nanjing	ZHENG Xin-mei, HU Kun, WANG Ming, <i>et al.</i> (4231)
Characteristics and Driving Factors of O ₃ Pollution During 13 th Five-Year Period in Tianjin	LI Yuan, XIAO Zhi-mei, BI Xiao-hui, <i>et al.</i> (4241)
Response of PM _{2.5} and O ₃ to Emission Reductions in Nanjing Based on Random Forest Algorithm	SHANG Yong-jie, MAO Yu-hao, LIAO Hong, <i>et al.</i> (4250)
Quantification of Ozone Pollution Transport Based on Four-dimensional Flux Method in Foshan, China	WU Li-ping, MO Hai-hua, YANG Li-ting, <i>et al.</i> (4262)
Effects of Source Depletion on Vapor Intrusion Risk Assessment	ZHONG Mao-sheng, WANG Yang, JIANG Lin, <i>et al.</i> (4271)
Spatiotemporal Variation Characteristics of Main Pollutant Fluxes in the Yangtze River Basin from 2017 to 2020	GUO Chao-chen, LEI Kun, LI Xiao-guang, <i>et al.</i> (4279)
Spatial Variation Characteristics, Influencing Factors, and Sources of Hydrogeochemical of Surface Water and Groundwater in Mountainous Area of Hutuo River	KONG Xiao-le, CHANG Yu-ru, LIU Xia, <i>et al.</i> (4292)
Spatial Distribution, Source Analysis, and Health Risk Assessment of Metal Elements in Karst Water in Southeastern Chongqing	XIE Hao, ZOU Sheng-zhang, LI Jun, <i>et al.</i> (4304)
Mechanism of Salinization of Shallow Groundwater in Taocheng District, Hengshui City	HE Jin, ZHANG Huai-sheng, CAI Wu-tian, <i>et al.</i> (4314)
Assessment of Groundwater Contamination Risk in the Plain Area of Southern Turpan Basin	BAI Fan, ZHOU Jin-long, ZHOU Yin-zhu, <i>et al.</i> (4325)
Microbial Community Composition and Diversity in Metal Sulfide Mine Water Systems	DING Cong-cong, ZHU Xu-yan, ZHAO Xing-qing, <i>et al.</i> (4334)
Occurrence Characteristics of Microplastics in Baiyangdian Lake Water and Sediments	CHENG Xin-yu, YANG Li-hu, SONG Xian-fang (4344)
Analyzing the Pollution Sources and Mechanisms of Urban Rivers Based on Identifying the Molecular Signature of Dissolved Organic Matter	ZHU Yi, YE Jian-feng, SUN Xiao-nan, <i>et al.</i> (4353)
Occurrence and Fate of Steroid Hormones in Sewage Treatment Plants	LIU Yuan-yuan, FENG Hui, ZHANG Hui, <i>et al.</i> (4364)
Distribution, Source, and Ecological Risk Assessment of Persistent Organic Pollutants in Surface Sediments of Boao Coastal Waters	HAO Run-bo, FU Guo-wei, SONG Yan-wei, <i>et al.</i> (4374)
Content, Distribution, Source Analysis, and Risk Assessment of PAHs in Arable Soils of Taiyuan	WU Zhang-wei, DUAN Yong-hong, LIU Li-wen, <i>et al.</i> (4387)
Potential Ecological Risk Assessment and Source Analysis of Heavy Metals in Soil-crop System in Xiong'an New District	GUO Zhi-juan, LIU Fei, ZHOU Ya-long, <i>et al.</i> (4397)
Pollution Characteristics and Source Analysis of Heavy Metals in Soils in Yellow River Cultural Park Based on APCS-MLR and PMF Receptor Model	DUAN Hai-jing, MA Jia-yu, PENG Chao-yue, <i>et al.</i> (4406)
Pollution Characteristics, Source Analysis, and Risk Assessment of Heavy Metals in the Surrounding Farmlands of Manganese Mining Area	YU Gao, CHEN Fen, ZHANG Xiao-dong, <i>et al.</i> (4416)
Translocation, Accumulation, and Comprehensive Risk Assessment of Heavy Metals in Soil-Crop Systems in an Old Industrial City, Shizuishan, Ningxia, Northwest China	WANG Ying, DONG Ai-jun, YANG Jian-feng, <i>et al.</i> (4429)
Distribution Characteristics and Risk Assessment of Tetracycline Antibiotics (TCs) in Soil-Vegetable System with Soil Fertilized with Animal Manure	DING Dan, HUANG Xiao-yi, GU Jing-yi, <i>et al.</i> (4440)
Accumulation Pathway of Cd, Pb, and Zn in Chinese Cabbage under the Condition of Exogenous Pollution Superposition in High Geological Background Area	JIAN Huai-liang, LIU Hong-yan, MEI Xue, <i>et al.</i> (4448)
Effects of Combined Pollution of Microplastics and Lead on Maize Seed Germination and Growth	MA Gui, LIAO Cai-yun, ZHOU Yue, <i>et al.</i> (4458)
Application of Fe ₃ O ₄ /Mulberry Stem Biochar Effects on Soil Arsenic Species and Rice Arsenic Content	RUAN Lin-qiao, LIANG Mei-na, DING Yan-mei, <i>et al.</i> (4468)
Remediation Effect and Mechanism of Biochar in Combination with Nitrogen Fertilizer on Cd-contaminated Paddy Soil	ZHANG Li, LI Ru-xia, HE Yu-lei, <i>et al.</i> (4479)
Effects of Combined Application of Different Nitrogen Fertilizers and Biochar on Cadmium Uptake by Pakchoi (<i>Brassica chinensis</i> L.) in Cadmium Contaminated Soil	LI Ping, NIE Hao, LANG Man, <i>et al.</i> (4489)
Effect of Coconut Fiber Biochar and Its Nitrate Modification on Pb Passivation in Paddy Soils	HOU Zheng-wei, LI Jian-hong, LI Cai-sheng, <i>et al.</i> (4497)
Effects of Biochar Application on Physicochemical Properties and Bacterial Communities of Microplastic-contaminated Calcareous Soil	RAN Tai-shan, LONG Jian, LIAO Hong-kai, <i>et al.</i> (4507)
Effects of Modified Biochar-Supported Zero-Valent Iron on the Removal of Trichloroethylene and Responses of Microbial Community in Soil	LU Hai-nan, LI Peng, GUO Lin, <i>et al.</i> (4519)
Effects of Modified Distiller's Lees Biochar on Nutrients and Enzyme Activities in Purple Soil	YOU Le-lin, XIE Yong-hong, WANG Zi-fang, <i>et al.</i> (4530)
Biochar or Straw Substituting Chemical Fertilizer Increase the Risk of Phosphorus Loss in Subsurface Runoff in Sloping Farmland	LAI Jia-xin, DENG Hua, ZHU Hao-yu, <i>et al.</i> (4541)
Carbon Loss During Preparation and Aging of Sludge Livestock Manure Biochars	ZHANG Ying, ZHANG Chang-hao, ZHANG Xiu-fang, <i>et al.</i> (4554)
Effect of Chemical Fertilizer and Manure Combined with Biochar on Denitrification Potential and Denitrifying Bacterial Community in Rhizosphere Soil	XIE Jun, WANG Zi-fang, WANG Ying-yan, <i>et al.</i> (4565)
Soil Bacterial Community Structure and Function Prediction of Millet/Peanut Intercropping Farmland in the Lower Yellow River	LIU Zhu, NAN Zhen-wu, LIN Song-ming, <i>et al.</i> (4575)
Effects of Microbial Fertilizer on Physicochemical Properties and Bacterial Communities of Saline Soil Under Brackish Water Irrigation	LIU Yue, YANG Shu-qing, ZHANG Wan-feng, <i>et al.</i> (4585)
Remediation of Petroleum-contaminated Soil by Highly Efficient Oil-degrading Bacteria and Analysis of Its Enhancement Mechanism	YAO Zhen-xian, WANG Li-ping, LI Dan, <i>et al.</i> (4599)
Impacts of Land Use Intensification Level on Fluvo-aquic Cropland Soil Microbial Community Abundance and Necromass Accumulation in North China	LI Sheng-jun, SHENG Mei-jun, LI Gang, <i>et al.</i> (4611)
Pathway and Policy for China's Provincial Carbon Emission Peak	MIAO An-kang, YUAN Yue, WU Han, <i>et al.</i> (4623)
Carbon Offsetting Mechanism of China Province Based on Carbon Reduction Cost	ZHONG Shi-yu, ZHANG Xiao-min, WU Jia, <i>et al.</i> (4637)
Analysis on Change in Soil Organic Carbon Content of Farmland in Yangtze River Economic Belt Under Different Fertilizing Measures	LIU Xin-yu, LU Jiang, MENG Xuan, <i>et al.</i> (4647)
Multi-scenario Land Use Optimization and Carbon Storage Assessment in Northwest China	CHEN Ning, XIN Cun-lin, TANG Dao-bin, <i>et al.</i> (4655)
Analysis and Simulation of the Spatiotemporal Evolution of Habitat Quality and Carbon Storage in the Weibei Dry Plateau Region of Shaanxi	GU Zhen-wei, LIU Jing, CHEN Yi, <i>et al.</i> (4666)
Impact of Climate Warming on Paddy Soil Organic Carbon Change in the Sichuan Basin of China	LI Ai-wen, SONG Liang-ying, RAN Min, <i>et al.</i> (4679)
Stoichiometric Imbalance of Abandoned Grassland Under Precipitation Changes Regulate Soil Respiration	WANG Jia-yi, WANG Xing, WANG Yuan-zhuo, <i>et al.</i> (4689)
Effects of Water-salt Environment on Freshwater Wetland Soil C, N, and P Ecological Stoichiometric Characteristics in the Yellow River Estuary Wetland	QIN Ji-fa, ZHANG Jia-peng, SANG Luan, <i>et al.</i> (4698)
Spatial Distribution of Soil Heavy Metals and Regional Control Strategies in China at Province Level	SHI Hang-yuan, WANG Peng, ZHENG Jia-tong, <i>et al.</i> (4706)
Comprehensive Review on Environmental Biogeochemistry of Nonylphenol and Suggestions for the Management of Emerging Contaminants	HONG Ya-jun, FENG Cheng-lian, XU Da-yong, <i>et al.</i> (4717)
Research Progress on Distribution Characteristics and Formation Mechanisms of Microplastics in the Environment	ZHANG Long-fei, LIU Yu-huan, RUAN Rong-sheng, <i>et al.</i> (4728)
Review on the Long-term and Short-term Effects of Biochar Addition on Soil Greenhouse Gas Emissions	ZHOU Yong-chun, WU Liu-lin, LI Dan-yang, <i>et al.</i> (4742)
Iron-based Bimetallic Catalysts for Persulfate Activation to Remove Antibiotics in Water: A Review	WEI Jian, ZHANG Xin-yi, GUO Zhuang, <i>et al.</i> (4751)
Analysis of the Environmental Risk of Livestock Manure Pollution and Resource Treatment Technology	AN Jing, DING Zi-ming, GAO Cheng-cheng, <i>et al.</i> (4764)