

油田区土壤微生物种群构成及系统分类初步研究

贾建丽¹, 李广贺²

(1. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083; 2. 清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要:通过直接从土壤中提取总 DNA, 并对其 16S rDNA 片段作 PCR-DGGE 分析, 对油田区土壤微生物种群及其分布进行初步研究。结果表明, 本研究改进的方法 DNA 提取率提高到现有方法的 1.4~2.2 倍, 纯度提高到 1.8~2.0; 不同区域环境下石油污染土壤的微生物种群构成存在差异, CQ 油田和 DQ 油田种群构成相似性较高, SL 油田和 YM 油田则差异显著, 其影响因素包括含油率、含水量等土壤基本特性; 各油田土壤微生物与参考序列的相似性达 89%~100%; 油田区土壤香农-威纳指数分布在 0.5~1.2 之间, 且随着微生物数量和活性的升高略有增加。通过上述研究可为评价区域环境下石油污染土壤的微生物群落结构, 调控和优化污染土壤的微生态环境以及识别优势群落提供客观、可靠的技术依据。

关键词:微生物种群; 土壤; 油田区; 不经培养; PCR-DGGE

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)04-1185-08

Microbial Community Constitute and Phylogenetic Analysis on Oil Polluted Soils in Oilfields of China

JIA Jian-li¹, LI Guang-he²

(1. School of Chemical & Environmental Engineering, China University of Mining & Technology (Beijing), Beijing 100083, China;

2. Department of Environmental Science and Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The microbial communities in oil polluted soils from oilfields of China were analyzed using a modern molecular biological approach. The crude total DNA from soils were directly extracted, 16S rDNA fraction were amplified by PCR, the bands were separated using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and some of the typical bands were sequenced and compared with the records of NCBI to classify the germs. Comparison of the DNA extraction indicated that the yields were 1.4-2.2 times as much as the existing technique, and the DNA purity reached 1.8-2.0. With higher similarity and correlation in CQ and DQ oilfields but lower in that of SL and YM oilfields, the influence factors to microbial communities consisted in the elementary properties of soil samples such as oil contents, water ratio, etc. Extraction and sequencing analysis of selected 16S rDNA bands demonstrated a range of similarity of 89%-100% to reference bacteria. The Shannon-Weiner index of the oil contaminated soils was 0.5-1.2, and which was increased slightly along with the enhancement of microbial amounts and FDA activities. According to this research, it has possibility in developing a reliable tool for researching oil contaminated soil bacteria diversity, and in applying a credible foundation for adjusting the microbial ecosystem and determining the dominant community in contaminated soils in oilfields.

Key words: microbial communities; soil; oilfields; uncultured; PCR-DGGE

在污染土壤的生物修复过程中, 微生物群落结构和功能是决定污染物生物降解效率和降解机制的关键因素。因此, 石油污染土壤微生物群落分析是研究其生物修复效应的基础。目前, 污染土壤中的微生物群落分析主要包括基于传统培养的古典微生物学手段和不经培养的现代分子生物学手段。已有研究成果认为, 土壤中可被人工分离的微生物仅占微生物总量的 0.1%~1%^[1], 表明基于培养的微生物群落分析一定程度上会导致微生物缺失, 造成对微生物相互关系和群落结构的信息丢失^[2], 从而影响土壤微生物种群结构分析。因此不经过培养而直接从土壤中提取总 DNA^[3~5]并进行后续分子生物学分析来研究土壤微生物种群结构, 由于其微生物学信息的完整性、更直接和可靠地反映土壤微生物的群落结构及其多样性而受到环境微生物研究人员的关

注^[6~11]。

土壤与活性污泥等其它样本相比, 因其微生物数量相对较少, 有机质、腐殖酸等干扰物质含量高等特点, 存在提取 DNA 产率和纯度较低, 不利于后续分子生物学操作等缺点^[12,13]。土壤受到石油污染后, 其微生物数量会低 2~3 个数量级, 有机质和腐殖质含量升高, 且石油的强疏水性和生物毒性等, 对 DNA 提取的影响则更为突出。目前, 国内外关于土壤微生物 DNA 的提取多应用于农田等无污染土壤^[14~16], 将 DNA 技术应用于污染土壤微生物种群分析成为近年的研究热点, 多为重金属和简单组分

收稿日期: 2008-05-13; 修订日期: 2008-07-07

基金项目: 科技部平台项目(2004DEA70890)

作者简介: 贾建丽(1977~), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为污染场地修复、分子生态学, E-mail: jiajianli77@126.com

* 通讯联系人, E-mail: ligh@tsinghua.edu.cn

有机物污染土壤的研究^[17-19].石油污染土壤微生物 DNA 的提取报道很少,许多技术细节更有待完善.因此本研究针对影响土壤 DNA 直接提取的关键步骤进行研究与改进,以解决石油污染土壤微生物种群分析中存在的普遍问题,同时利用后续的 PCR-DGGE 分子生物学方法对我国油田区量大面广的石油污染土壤微生物种群构成及其特性进行分析,以期石油污染土壤的生物修复提供方法学支撑.

1 材料与方法

1.1 材料

表 1 油田区地理概况与基本信息		
Table 1 Basic properties of the sampling sites and oilfields		
油田	样品	油田区地理概况
CQ	CQ1 ~ CQ5	盆地、黄土地貌、大陆性季风气候,平均温度 7 ~ 10℃
DQ	DQ1 ~ DQ5	波状起伏的低平原,中温带大陆性季风气候,年均温度 6.2℃
JH	JH1 ~ JH5	平原地貌,亚热带季风性湿润气候,年均温度 16.1℃
SL	SL1 ~ SL5	地势总体平缓,南高北低,西高东低,暖温带半湿润大陆性季风气候年均温度 12.5℃
YM	YM1 ~ YM5	戈壁,大陆性中温带干旱气候,年均温度 6.9℃

GGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3', P2 为 5'-CTACC-AGGGTATCTAATCC-3'),由华美生物工程公司北京分公司合成.

1.2 实验方法

1.2.1 油田区土壤基本性质分析

油田区土壤基本性质包括含油量、含水率、pH 值、有机质含量、土壤微生物数量与活性等.其中含油量采用超声波+索氏抽提法测定^[23],土壤微生物数量采用 MPN 三管法测定^[23]、活性采用 FDA 法测定^[23],其他基本性质参照土壤农业化学分析方法测定^[23,24].

1.2.2 石油污染土壤微生物总 DNA 直接提取

于 Bio101 管中放入 0.5 g 贮于 -20℃ 的石油污染土样,加入 20 μL 10 mg/mL 蛋白酶 K、100 μL 20% 的 SDS 和 1 mL DNA 抽提缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.0),100 mmol/L EDTA 二钠盐溶液(pH = 8.0),100 mmol/L 磷酸缓冲液(37.6 mL 1 mol/L K₂HPO₄,2.4 mL 1 mol/L KH₂PO₄,pH = 8.0),1.5 mol/L NaCl,1% CTAB],65℃ 水浴 2 h,期间每隔 20 ~ 30 min 翻转混匀 1 次.将 Bio101 管置于 FP220A 型 Fastprep 系统(美国 Qbiogene 公司)内,于 5.5 速裂解 20 s.取出 Bio101 管,置于冰上冷却.4℃、15 000 r/min 离心 10 min.取上清,加入等体积酚仿抽提液(Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1,体积比),混匀,4℃、15 000 r/min 下离心 10 min.取上清(防止带

1.1.1 土壤样品

供试土壤取自中国东北、西北、华北及南方共 5 个油田 10 ~ 25 cm 土壤,以密封袋封好置于冷冻保温箱中,运回实验室后于 4℃ 保存分析土壤微生物数量、活性,-20℃ 保存分析微生物群落结构;其他基本理化性质常温测定.土壤样品及采样点基本信息如表 1 所示.

1.1.2 其他材料及试剂

DNA 纯化采用 Qiagen 公司试剂盒;PCR 引物^[20-22]为 16S rRNA 保守区通用引物(P1 为 5'-CGC-CCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGCGGGGCACGGG-

入中间层杂质),滴加 0.6 体积异丙醇,室温沉淀 DNA 2 h,室温、12 000 r/min 下离心 30 min.弃上清,待挥发尽残余异丙醇后,加入 100 μL 灭菌超纯水溶解 DNA.

1.2.3 粗提 DNA 纯化

采用 DNA 纯化试剂盒(美国 Qiagen 公司)对上述方法获得的 DNA 粗提物按操作说明进行纯化与回收.

1.2.4 DNA 产率与纯度测定

提取 DNA 的产率及纯度以 Biospe-Mini 核酸蛋白仪(日本岛津公司)按操作说明书进行测定.

1.2.5 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

PCR 反应体系为:10×PCR 反应缓冲液 5 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,PCR 上下游引物各 25 pmol,DNA 模板 4 μL,Taq 酶 2 U,加灭菌双蒸水补足到 50 μL. PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min,30 个循环为:94℃ 变性 1 min、55℃ 退火 1 min、72℃ 延伸 2 min,最后 72℃ 延伸 8 min.每次 PCR 扩增均设置不加 DNA 模板的阴性对照实验.

按上述配方在灭菌的 PCR 管中加入各 PCR 试剂,混匀,放入 MJ PTC-200 梯度 PCR 仪(美国 MJ 公司)样品管内,按设定程序进行 PCR 扩增.PCR 反应产物以 1.5% 琼脂糖电泳进行检测,EB 染色 30 min,漂洗 10 min,以 UVP 系统(美国 UVP 公司,GSD 8000)进行结果观察和照相.

1.2.6 PCR 产物的 DGGE 分析及测序

PCR 片段以 BIORAD Dcode 系统(加拿大 Biorad 公司)对 PCR 产物进行 DGGE 分离.试验凝胶为变性剂梯度为 30%~60% 的 6% DGGE 凝胶,上样量为 30 μL PCR 反应液加 8 μL 溴酚蓝和二甲苯菁上样缓冲液,60℃、100 V 电压下电泳 10 h.取出凝胶后,以 1×SYBR Gold(美国 Invitrogen 公司)20 mL 染色 30 min, UVP 观察照相.

以灭菌的黄色取液器枪头在 UVP 紫外灯下将待测序条带切下,放入已灭菌的 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL 灭菌超纯水,于 4℃放置过夜,取上清液按前述 PCR 体系与条件进行扩增.将 PCR 扩增产物送上海生工生物工程公司纯化测序.测序结果输入 Genbank 进行比对分析.比对结果以 ARB 软件进行处理并绘制各 DNA 序列的 16S rRNA 系统进化树(Tree view 1.6.6, 2001).

以 Phoretix1D 软件(英国 Nonlinear 公司)对不同油田区土壤样品的微生物群落相关性关系进行分析,并绘制相关性树图.

1.2.7 种群多样性指数分析

已有的研究表明^[25~28],可以利用生态学的生物多样性指数香农-威纳指数(H)对 DGGE 条带所表示的微生物种群多样性进行表征,判别污染土壤中的微生物多样性, H 数值越大,未确定性也越大,因而种群多样性也就越高.其计算公式如下:

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \lg P_i \tag{1}$$

式中, H 为微生物种群多样性指数; P_i 为第 i 条带峰高在全部条带峰高之和中所占比例.

以 Labworks 软件(美国 UVP 公司)对不同样品 DGGE 图谱进行条带扫描及识别,得出不同条带的数目及其相应的吸收峰值.将其条带数目及各自的吸收峰高等参数导入 Excel,按上述公式进行归纳计算,得出不同样品的 H 值.

2 结果与分析

2.1 石油污染土壤基本性质

由 5 大油田区土壤基本性质(表 2)可知,不同区域环境下各油田区土壤基本性质差异较大.总体说来,CQ 油田土壤含油量普遍较低而 SL 油田土壤含油量总体较高,其他油田土壤含油量则范围分布较广;CQ 油田和 DQ 油田土壤含水率除各别样品外普遍高于 10%,而其他油田则土壤含水率总体低于 5%,表现出和土壤含油率相反的特点,主要原因可

能是石油的强疏水性使高含油量土壤的储水能力下降所致;油田区土壤 pH 值除个别样品外大体分布于 7.1~8.0 之间,属碱性土壤;CQ 油田和 YM 油田有机质含量总体水平比其他油田要低;从微生物数量来看,SL 油田总体水平较低,其他油田样品则随土壤其他基本性质有所区别,FDA 活性则表现出和微生物数量变化趋势较为一致的特点.油田区土壤基本性质揭示了不同区域环境下的土壤特性和微生物学基础,可为土壤微生物群落分析提供重要的依据和参考.

2.2 不经培养的石油污染土壤微生物总 DNA 提取

土壤微生物总 DNA 是进行微生物种群分析的基础,高效、完全地提取纯度较高的 DNA,可为后续的 PCR 及 DGGE 等分子生物学分析提供高质量的模板,是整个微生物种群分析客观和科学性的基础保障.DNA 产率太低可能导致微生物种群缺失,而杂质过多则可能会对 PCR 产生抑制.在土壤微生物总 DNA 提取流程中,土壤裂解和核酸沉淀是影响石油污染土壤微生物总 DNA 产率和纯度的重要步骤,针对上述关键步骤,本研究在 Zhou 等^[29]方法的基础上,参考目前国际先进的土壤 DNA 提取方法,以 Fastprep 系统对土样进行研磨结合 SDS 提取和高温水浴对石油污染土壤进行裂解;在核酸沉淀步骤,参考现有 DNA 提取方法中核酸沉淀 4℃沉淀可得到较高 DNA 产率但杂质较多、而常温沉淀 DNA 产率低杂质少的特点,本研究采用常温异丙醇沉淀粗提的 DNA.根据以上论述,本研究改进 DNA 的提取方法温度设置为:核酸沉淀之前于 4℃进行,而核酸沉淀及后续步骤则在常温下开展,可取得高 DNA 产率和纯度,同时有效避免石油污染土壤有机质和腐殖质的影响.同时,对同一样品按照 Zhou 等^[29]报道的方法提取、测定总 DNA 产率和纯度.2 种方法所得结果如表 3 所示.

由表 3 可知,对于不同油田区的石油污染土壤,按改进方法提取的土壤微生物总 DNA 产率是 Zhou 等^[29]方法的 1.4~2.2 倍,DNA 纯度也有了较大提高.在本研究中采用改进后的方法提取油田区和生物修复模拟系统土壤的总 DNA,结果如图 1 所示.

本研究所提取的微生物总 DNA 大小约为 23 kb,说明以此方法可得到大分子的 DNA,避免激烈的物理或化学措施,如超声波等对 DNA 的剪切,以及可能由此造成的对 PCR 等后续操作的影响,有利于真实客观地对分子生物学特性进行表达.

2.3 从总 DNA 中扩增 16S rDNA 片段

表 2 油田区土壤样品基本性质
Table 2 Properties of soil samples in oilfields

油田	样品	含油量/%	含水率/%	pH	有机质含量/%	微生物数量/个·g ⁻¹	FDA 活性/Abs·(g·h) ⁻¹
CQ	CQ1	0.05	17.35	7.52	1.29	4.5 × 10 ⁶	0.283 5
	CQ2	0.07	13.12	7.73	2.32	7.5 × 10 ⁶	0.125 3
	CQ3	0.24	5.15	8.67	0.15	9.5 × 10 ⁴	0.056 8
	CQ4	0.40	6.52	7.49	2.25	2.5 × 10 ⁷	0.094 1
	CQ5	0.32	27.44	7.55	1.15	4.5 × 10 ⁷	0.120 5
DQ	DQ1	0.50	6.39	7.56	1.05	2.5 × 10 ⁵	0.291 0
	DQ2	6.02	14.58	7.17	9.48	2.5 × 10 ⁶	0.764 5
	DQ3	0.15	12.24	7.58	2.56	2.5 × 10 ⁸	0.622 8
	DQ4	5.05	11.72	7.29	9.67	4.0 × 10 ⁷	0.582 4
	DQ5	0.05	18.89	8.45	2.8	1.1 × 10 ⁷	0.443 6
JH	JH1	0.36	18.23	7.46	1.07	9.5 × 10 ⁷	0.458 8
	JH2	15.11	1.20	8.00	14.11	2.5 × 10 ⁶	0.124 6
	JH3	12.36	1.24	7.19	10.87	2.5 × 10 ⁶	0.037 4
	JH4	17.41	0.92	7.59	9.75	2.5 × 10 ⁶	0.079 5
	JH5	5.53	3.06	7.92	3.08	4.5 × 10 ⁷	0.094 0
SL	SL1	11.85	3.86	8.25	2.43	2.5 × 10 ⁶	0.107 2
	SL2	16.22	2.53	7.75	1.15	4.5 × 10 ⁶	0.060 6
	SL3	21.13	3.84	7.85	2.39	3.0 × 10 ⁶	0.074 2
	SL4	23.82	2.23	7.51	0.64	4.5 × 10 ⁵	0.043 9
	SL5	10.26	3.24	7.32	12.98	2.5 × 10 ⁶	0.123 3
YM	YM1	2.66	6.71	7.84	4.35	9.5 × 10 ⁷	0.976 8
	YM2	10.93	1.96	7.86	13.78	2.5 × 10 ⁵	0.086 2
	YM3	9.73	1.08	7.90	10.69	2.5 × 10 ⁷	0.423 5
	YM4	1.59	1.50	7.93	3.24	1.5 × 10 ⁶	0.095 0
	YM5	4.63	4.30	7.85	7.48	4.5 × 10 ⁶	0.237 0

表 3 不同提取方法所得 DNA 产率和纯度比较¹⁾
Table 3 DNA yield and purity according to different extraction methods

项目	DQ2'	DQ2	DQ3'	DQ3	DQ4'	DQ4	DQ5'	DQ5
DNA 产率(以土壤计)/μg·g ⁻¹	10.19	14.64	7.26	10.74	3.45	7.87	7.02	12.63
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1.69	1.95	1.68	1.81	1.77	2.00	1.62	2.00

1)DQ2' ~ DQ5'为按文献方法提取

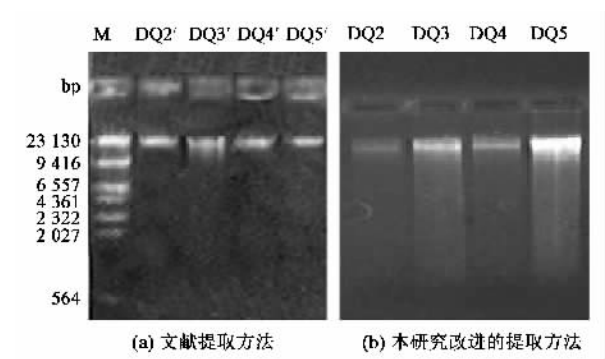


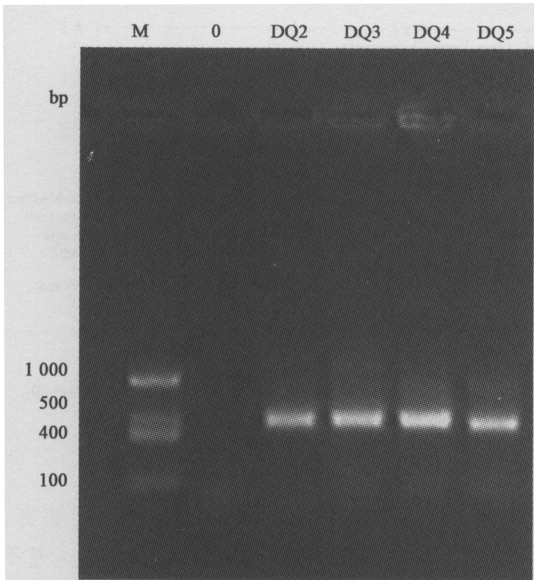
图 1 不同石油污染土壤微生物总 DNA
Fig. 1 Total DNA of the oil polluted soils

从土壤样品中获得的总 DNA 经过 PCR 后,PCR 产物在 470 bp 左右出现特异性条带(图 2),而阴性对照样在相同位置则无条带出现,因此 PCR 结果可为后续 DGGE 分离提供可靠依据.

2.4 DGGE 分离扩增所得 16S rDNA 片段

将所得 16S rDNA 片段通过 DGGE 进行分析,可以看到分离为若干条带.并且每种土壤样品的 PCR 产物所出现的条带都不同.

不同油田土壤样品中,DGGE 的条带数量和分布具有一定的差异性,由 DGGE 图谱表现出的微生物种群数量也有较大差别(图 3).不同油田土壤中,



M 为 DNA Marker,0 为阴性对照样
图 2 不同污染土样 DNA 的 PCR 产物
Fig.2 16S rDNA amplified by PCR

微生物种群既有类似 J1 的保守种群存在于多个油田中,也有类似 C4 和 S2 只存在于某些土壤样品中的特殊种群.CQ 油田,污染土壤微生物 DGGE 图谱与农田样相比,一些种群消失,而 C4 等保守条带依旧存在.同时,由于石油的诱导还产生了 C1 等新的种群,表现出石油污染物对微生物种群结构有一定的胁迫性.YM 油田 YM1 比其他样品微生物条带多,表现出较高的种群多样性.

以 Phoretix 1D 软件对不同油田土壤样品 DGGE 所表现的微生物种群结构进行分析,结果如图 4 所示.

由图 4 可知,各油田区土壤样品微生物种群结构差异较大,相关系数分布在 0.22 ~ 0.74 之间.CQ 油田、DQ 油田样品在相关性树图上分布比较集中,而 SL 油田和 YM 油田不同石油污染土壤微生物种群结构差异显著,在 DGGE 图谱上分布分散.

2.5 各分离 16S rDNA 片段测序

选择图谱中各油田土样普遍存在或特有的典型

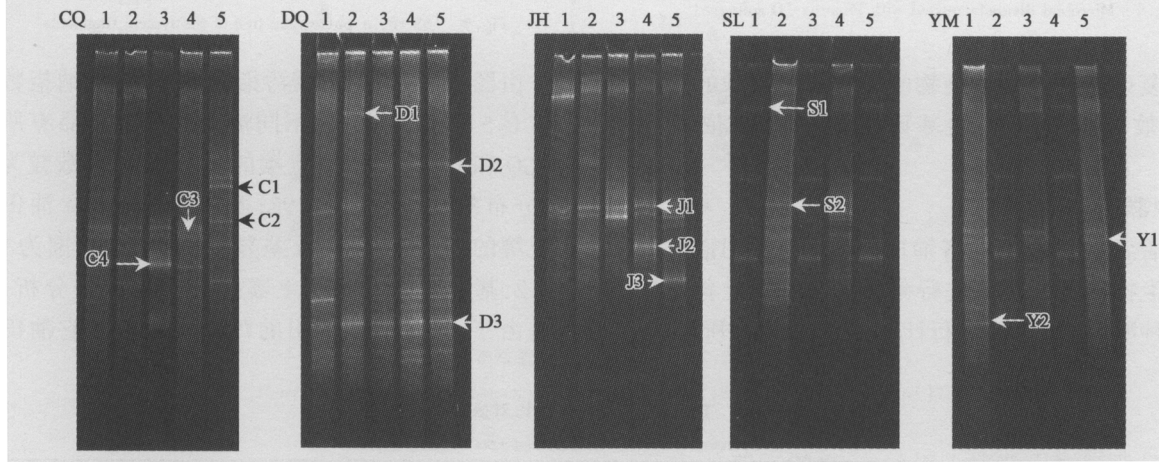


图 3 油田区土壤样品 DGGE 图谱
Fig.3 DGGE profile of soil samples in oilfields

种群等部分 DGGE 条带进行割取,PCR 扩增后测序,将测序序列输入 NCBI 数据库进行比对,比对信息及测序微生物性质如表 4 所示^[30].各油田土壤检出微生物种类很多,与参考序列的相似性达 89% ~ 100%.部分细菌是已有报道的石油降解微生物,如不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*) 等^[31,32].同时也有土壤中普遍存在的微生物如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等.对 DQ 油田污染土壤中的土著微生物进行富集培养^[33],富集菌液(L1、L2)中检测出了可以降解石油的假单胞菌

(*Pseudomonas*).各序列的系统进化树如图 5 所示.
根据上述油田区污染土壤微生物 DGGE 片段序列的系统发育分析,不同样品在细菌 16S rRNA 进化树上的距离即可表示其亲缘关系^[34,35].在石油污染土壤中,当石油污染物因含量和组成不同而导致对微生物基因的刺激或抑制时,就可能使其向着能利用目标污染物的功能基因方向发展.从图 5 各油田土壤样品中微生物的进化距离可推测相应样品基因转移的概率和微生物种群相似性关系.同时,可根据其亲缘关系的远近,推测未培养微生物如 C3 和 Y1 的分离条件和适宜活性提高的非生物因子范围,为

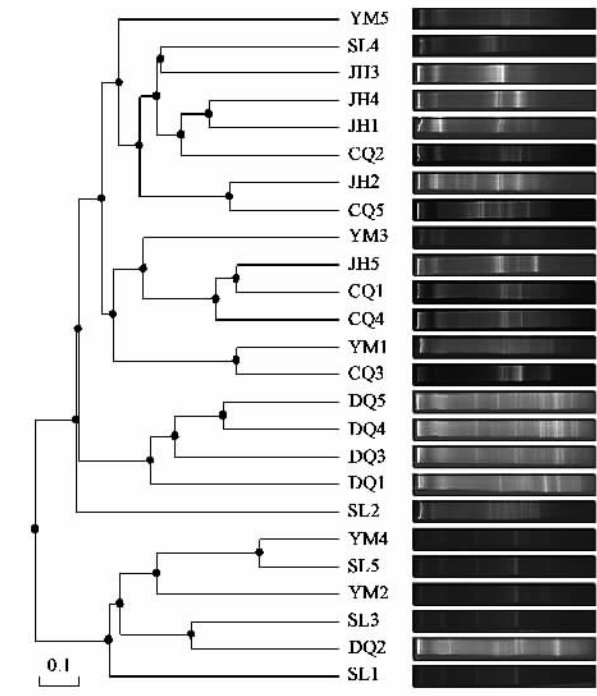


图 4 油田区土壤微生物种群多样性树图

Fig.4 Microbial diversity treated with Phoretix 1D software

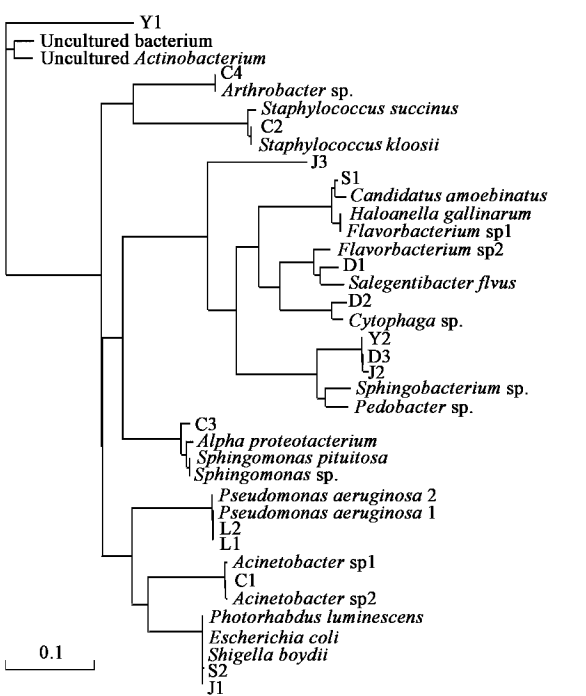


图 5 测序序列 16S rRNA 系统进化树

Fig.5 16S rRNA phylogenic tree of the typical fragments

难降解复杂组分石油污染物的生物降解菌种的筛选和降解效率的提高提供基因层面的技术依据和支持。

2.6 种群多样性性分析

以香农-威纳指数对各油田土样 DGGE 图谱所表现的微生物种群多样性进行分析,依式(1)对各样品微生物种群多样性(H)进行计算,结果如图 6 所示。

由图 6 可知,油田区污染土壤香农-威纳指数分布在 0.5 ~ 1.2 之间,随不同油田和具体样品有所差异。CQ 和 DQ 油田污染土壤的香农-威纳指数较为稳定,分布范围为 0.7 ~ 0.98;而 JH、SL 和 YM 油田污染土壤的香农-威纳指数差异较大,分布范围为 0.5 ~ 1.2。基于油田区污染土壤的非生物因子分析,可能是由于 CQ 和 DQ 油田的污染土壤与其它油田相

表 4 16S rRNA 片段序列比对信息

Table 4 Comparison of several typical fragments of soil samples

油田	样品	主要分类特征	相似序列	相似性/%
CQ	C1	β 变形菌纲	不动杆菌属	99
	C2	低 G + C 革兰氏阳性细菌	葡萄球菌属	100
	C3	α 变形菌纲	未培养微生物	98
	C4	高 G + C 革兰氏阳性细菌	节杆菌属	100
DQ	D1	拟杆菌-噬纤维菌群	黄杆菌属	96
	D2	拟杆菌-噬纤维菌群	噬纤维菌属	97
	D3	—	土地杆菌属	96
JH	J1	γ 变形菌纲	鲍氏志贺氏菌、大肠杆菌	100
	J2	—	土地杆菌属	95
	J3	拟杆菌-噬纤维菌群	屈挠杆菌	100
SL	S1	—	片状杆菌属	98
	S2	γ 变形菌纲	鲍氏志贺氏菌、大肠杆菌	100
YM	Y1	高 G + C 革兰氏阳性细菌	未培养微生物	89
	Y2	—	土地杆菌属	96

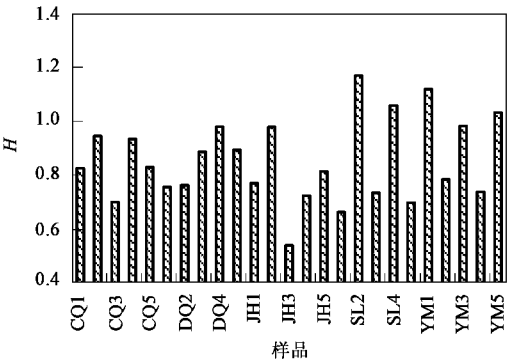


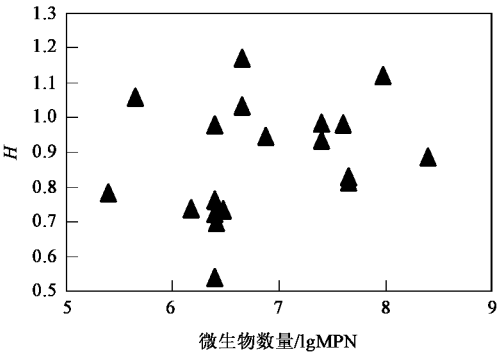
图 6 油田区土壤香农-威纳指数

Fig.6 Shannon-Weiner index of soils in oilfields

比,表现为含油量较低而含水率较高,适宜微生物生长所致.

2.7 种群多样性与微生物数量和活性的关系

油田区土壤微生物数量和 FDA 活性与香农-威纳指数的关系如图 7 所示. 从中可知,油田区土壤



的种群多样性和总微生物数量、微生物活性之间的关系表现为:随着总微生物数量和活性的升高,香农-威纳指数略有增加.分析其原因在于微生物种群多样性作为种群结构的一个方面,其值的高低由微生物种类和各种类的丰度共同决定,而微生物种类的差异则并不能直接与数量和活性联系起来,要根据微生物种属和其他特性具体分析.即微生物种群多样性与微生物数量和活性不表现出直接的数学关系.在石油污染土壤中,由于石油污染物对微生物有抑制作用,一定程度上会使微生物种群趋于单一化和功能化,微生物种群多样性会降低,但此时由于功能微生物所占的比例升高,微生物活性和降解性反而可能增加.由此,在研究与评价污染土壤微生物特性过程中,不仅要关注微生物数量与活性决定的微生物学因子的变化,而且要考虑微生物种群构成及其多样性,才能够全面认识和了解污染土壤的微生物学特性.

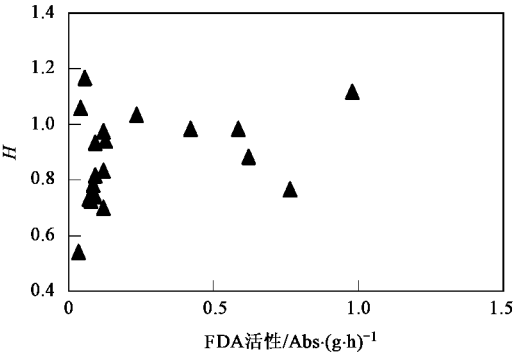


图 7 总微生物数量和 FDA 活性与香农-威纳指数的关系

Fig.7 Relationship between the Shannon-Weiner index and the total microbial amount and FDA activity

3 结论

(1)基于石油污染土壤微生物数量低、杂质含量高影响 DNA 提取的关键问题,本研究通过改进土壤裂解和核酸沉淀方法,完善了不经培养的 DNA 直接提取技术,DNA 产率提高到已有方法的 1.4~2.2 倍,纯度提高到 1.8~2.0.为评价污染土壤微生物群落结构、揭示与评价石油污染土壤微生物种群结构与演化奠定方法基础.

(2)各油田区土壤样品微生物种群结构差异较大,相关系数分布在 0.22~0.74 之间,其中 CQ 油田、DQ 油田种群构成相似性较高,而 SL 油田和 YM 油则差异显著,与不同油田土壤含油量、含水率等基本性质有关;油田区土壤种群多样性指数分布在 0.5~1.2 之间,且随着总微生物数量和 FDA 活性的

升高 H 略有增加.各油田土壤微生物序列与参考序列的相似性达 89%~100%,主要聚类在细菌 16S rRNA 系统进化树的高 G+C 革兰氏阳性细菌(节杆菌属)、低 G+C 革兰氏阳性细菌(葡萄球菌)到 γ 变形菌纲(鲍氏志贺氏菌和大肠杆菌).

(3)利用本研究改进与构建的 PCR-DGGE 技术评价区域环境下石油污染土壤微生物群落结构,可为分析微生物与污染土壤非生物因子的关系提供客观、可靠的技术,也可为生物修复微生态环境的调控和优势群落的识别提供依据.

参考文献:

[1] Torsvik V, Sorheim R, Goksoyr J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities: a review [J]. J Ind Microbiol Biotech, 1996, 17: 170-178.
[2] Frank S, Christoph C T. A new approach to utilize PCR single strand

- conformation polymorphism for 16S rRNA gene based microbial community analysis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 4870-4876.
- [3] Roose-Amsaleg C L, Garnier-Sillam E, Harry M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples [J]. *Appl Soil Ecol*, 2001, **18**: 47-60.
- [4] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化[J]. *微生物学报*, 2003, **43**(2): 276-282.
- [5] Niemi R M, Heiskanen I, Wallenius K, *et al.* Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia [J]. *Microbiol Method*, 2001, **45**: 155-165.
- [6] 余素林, 吴晓磊, 钱易. 环境微生物群落分析的 T-RFLP 技术及其优化措施[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, **12**(6): 861-868.
- [7] Juck D, Charles T, Whyte L G, *et al.* Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, **33**: 241-249.
- [8] 马悦欣, Holmström C, Webb J, 等. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)在微生物生态学中的应用[J]. *生态学报*, 2003, **23**(8): 1561-1568.
- [9] Malik S, Beer M, Megharaj M, *et al.* The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water [J]. *Environ Int*, 2008, **34**: 265-276.
- [10] 姜昕, 马鸣超, 李俊, 等. 用 DGGE 技术分析污水人工快速渗滤系统中微生物种群分布[J]. *微生物学通报*, 2007, **34**(6): 1179-1183.
- [11] Asakawa S, Kimura M. Comparison of bacterial community structures at main habitats in paddy field ecosystem based on DGGE analysis [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, **40**: 1322-1329.
- [12] 徐晓宇, 闵航, 刘和, 等. 土壤微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. *农业生物技术学报*, 2005, **13**(3): 377-381.
- [13] Dong D X, Yan A, Liu H M, *et al.* Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate [J]. *J Microbiol Method*, 2006, **66**(2): 217-222.
- [14] Liang Z B, Drijber R A, Lee D J, *et al.* A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, **40**: 956-966.
- [15] 陈灏, 唐小树, 林洁, 等. 不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究[J]. *微生物学报*, 2002, **42**(4): 478-483.
- [16] 吴永胜, 李浩, 马万里, 等. 分子生物学技术在草原土壤微生物研究中的应用[J]. *内蒙古师范大学学报*, 2008, **37**(2): 241-248.
- [17] Wang Y P, Shi J Y, Wang H, *et al.* The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter [J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2007, **67**(1): 75-81.
- [18] 黄耀蓉, 李登煜, 张小平, 等. 五氯酚钠污染土壤的微生物活性及优势菌群研究[J]. *西南农业学报*, 1999, **12**: 39-43.
- [19] 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[J]. *土壤学报*, 2004, **41**(3): 343-374.
- [20] Rölleke S, Muyzer G, Wawer C, *et al.* Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 2059-2065.
- [21] Lee S, Malone C, Kemp P F. Use of multiple 16S rRNA-targeted fluorescent probes to increase signal strength and measure cellular RNA from natural planktonic bacteria [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1993, **101**: 93-201.
- [22] Whyte L G, Goalen B, Hawari J, *et al.* Bioremediation treatability assessment of hydrocarbon-contaminated soils from Eureka, Nunavut [J]. *Cold Regions Technol*, 2001, **32**: 121-132.
- [23] 贾建丽, 李广贺, 钟毅. 石油污染土壤微生态环境非生物因子与微生物活性关系 [J]. *环境科学*, 2004, **25**(3): 110-114.
- [24] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000. 13-165.
- [25] McCaig A E, Glover L A, Prosser J I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(10): 4554-4559.
- [26] Stamper D M, Walch M, Jacobs R N. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(2): 852-860.
- [27] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, *et al.* Succession of bacterial community structure along the Changjiang river determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(10): 5142-5150.
- [28] 孙儒泳, 李庆芬, 牛翠娟, 等. 基础生态学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 143-144.
- [29] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(2): 316-322.
- [30] 贾建丽. 石油污染土壤微生物学特性与生物修复效应研究 [D]. 北京: 清华大学, 2005. 145-150.
- [31] 李广贺, 张旭, 黄巍. 石油污染包气带中降解微生物的分布特性 [J]. *环境科学*, 2000, **21**(4): 61-64.
- [32] Li G H, Hung W, Lerner D N, *et al.* Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil [J]. *Wat Res*, 2000, **34**(15): 3845-3853.
- [33] 李广贺, 梁玉婷, 张旭, 等. 循环式填充型菌剂与生物载体复合制备器 [P]. 中国专利: ZL200510011257.8, 2007-10-12.
- [34] Nei M, Kumar S, 著. 吕宝忠, 钟扬, 高莉萍, 等. 译. 分子进化与系统发育 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001. 1-73.
- [35] Roling W F M, Milner M G, Jones D M, *et al.* Bacterial Community Dynamics and Hydrocarbon Degradation during a Field-Scale Evaluation of bioremediation on a contaminated with buried oil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(5): 2603-2613.