

# 炼油厂周边 PAHs 污染土壤中微生物群落结构多样性研究

彭静静<sup>1</sup>, 张又弛<sup>1</sup>, 侯艳伟<sup>2</sup>, 黎慧娟<sup>1</sup>, 蔡超<sup>1\*</sup>

1. 中国科学院城市环境研究所/中国科学院城市环境与健康重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 华侨大学化工学院环境科学与工程系, 福建 厦门 361021

**摘要:** 直接从污染土壤中提取微生物基因组 DNA, 对基因组 DNA 进行 16S rDNA 聚合酶链式反应 (PCR) 扩增和末端限制性片段多态性 (T-RFLP) 分析, 进而对炼油厂附近 PAHs 污染区土壤微生物群落结构和多样性进行初步研究。结果表明, PAHs 浓度较高的土壤中 PAHs 主要以高相对分子质量 PAHs 为主, 此外, 其土壤微生物群落多样性明显低于 PAHs 浓度较低的土壤。高浓度 PAHs 刺激了某些土壤微生物生长。不同污染程度的土壤存在一定数量相同的优势菌群, 但相对丰度具有明显差异。其中  $\alpha$ -变形菌是五个区域土壤中的主导微生物。研究结果将为炼油厂周边土壤的修复治理提供科学依据。

**关键词:** 土壤; PCR-T-RFLP; 微生物多样性; 多环芳烃

中图分类号: X176

文献标志码: A

文章编号: 1674-5906 (2011) 05-0962-04

多环芳烃是土壤中一类典型的污染物, 由于其毒性、生物蓄积性和半挥发性并能在环境中持久存在, 对环境及人类健康具有极大的危害, 是美国环保局制定的 129 种优先污染物中的一类。微生物是 PAHs 降解的主要途径。土壤中微生物群落变化受多种因素的影响。土壤类型及 PAHs 污染程度均是影响细菌群落变化的重要因素<sup>[1]</sup>。在非和芘处理的土壤中观察到了物种多样性的减少及特殊微生物群落的富集<sup>[2]</sup>。此外, 多环芳烃降解菌的降解潜力和环境样品多环芳烃污染水平呈正相关<sup>[3]</sup>。PAHs 通常会抑制许多微生物的生长, 但是却能促进土壤中 PAHs-吸收群落的生长<sup>[4]</sup>。因此, 深入开展 PAHs 污染土壤中微生物的群落结构研究是 PAHs 污染土壤生物修复的基础, 具有重要科学意义和现实意义。

炼油厂的生产活动时常常导致 PAHs 污染问题, 因而了解当地土壤的污染物含量及掌握微生物群落的响应变化, 从而对这些污染场地进行有效的生物修复是非常重要的。末端限制性片段多态性分析 (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP) 是在 PCR 和 RFLP 技术基础上发展起来的微生物群落分析方法, 是一种半定量的高效的研究微生物群落结构及动力学的技术。T-RFLPs 的多样性直接反应了微生物群落的多样性<sup>[5-6]</sup>, 而且, 在研究污染土壤微生物多样性方面得到了较好的应用<sup>[7-8]</sup>。本研究针对泉港炼油厂附近土壤进行 T-RFLP 分析研究其微生物多样性, 以期治理当地的土壤污染问题提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 PAHs 污染土壤样品的采集

土壤样品于 2009 年 4 月采集于福建省泉港炼油厂附近区域。此地区土壤属于典型的红壤, 分别为炼油厂周边绿地 (25°10.867 N; 118°55.738 E)、生活区 (25°09.328 N; 118°55.758 E)、农田区 (25°10.469 N; 118°56.632 E) 和码头 (25°11.950 N; 118°57.476 E), 分别以 A、B、C 和 D 来表示。采样土壤为表层土 (0~20 cm), 以所在区域的郊区 (25°08.414 N; 118°48.384 E) 土壤作为轻度污染土壤样品对照, 以 E 来表示。每个样地随即选取 3 个采样点, 混匀分装, -20 °C 保存备用。分别用于 DNA 分析、PAHs 分析和土壤理化性质测定 (表 1)。pH 值、碳、氮、硫和有机质测定方法与之前的研究相同<sup>[1]</sup>。

表 1 不同土壤的基本理化性质

Table 1 Physical and chemical characteristics of different soils

采样点	w(碳)/ (mg·g <sup>-1</sup> )	w(氮)/ (mg·g <sup>-1</sup> )	w(硫)/ (mg·g <sup>-1</sup> )	pH	w(有机质)/ (mg·g <sup>-1</sup> )
炼油厂周边 绿地 (A)	6.18	0.55	0.18	6.58	54.07
生活区 (B)	13.36	1.11	0.41	5.75	157.73
农田 (C)	7.62	0.66	0.13	6.96	58.36
码头 (D)	7.45	0.52	0.17	6.34	43.17
郊外对照 (E)	6.65	0.68	0.19	5.84	61.94

### 1.2 多环芳烃 (PAHs) 的测定

土壤样品冷冻干燥后, 经研磨过 60 目不锈钢筛, 准确称取 1 g。用索氏提取过的滤纸包裹, 加入 10  $\mu$ L 10 mg·L<sup>-1</sup> (5 种氘代物), 混合均匀后放置 4 °C

基金项目: 国家自然科学基金项目(40801118)

作者简介: 彭静静(1983 年生), 博士研究生, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: jipeng@iue.ac.cn

\*通讯作者: 蔡超。E-mail: ccai@iue.ac.cn

收稿日期: 2011-04-14

或室温避光放置12 h。将包有样品的滤纸放入蛇形索氏提取器中, 添加200 mL二氯甲烷: 丙酮 = 1:1 的混合溶液, 在平底烧瓶中加入10片左右的铜片(1 cm<sup>2</sup>), 放在水浴锅中, 水浴锅温度控制在59 °C, 回流速度控制在5~6次·h<sup>-1</sup>, 连续抽提48 h。

将提取液在旋转蒸发仪上(39 °C)浓缩至约2 mL, 使用15 mL正己烷定量转移到K-D浓缩器中, 再次浓缩至1 mL, 完成溶剂替换。之后采用硅胶/氧化铝复合柱净化, 湿法装柱法洗脱样品。最后向洗脱样品中加入内标(氘代荧蒹), 用柔和的氮气吹蒸定容至1 mL, 作为仪器分析待测样。密封后存放于冰箱(-20 °C)中待测。

有机萃取物GC/MS上机测定条件: 色谱柱为DB-5, 30 m × 0.25 mm × 0.32 m毛细管柱; 初始柱温为50 °C, 保持1 min, 先以10 °C min<sup>-1</sup>的速率升温至200 °C, 后以8 °C min<sup>-1</sup>的速率升温至280 °C, 保持10 min; 载气为氦气, 流速为1 mL min<sup>-1</sup>; 进样口温度为250 °C, 进样方式为分流进样; 质谱条件为离子源, 电子能量为70 eV; 离子源温度为180 °C, 传输线温度为280 °C。

### 1.3 土壤样品中 DNA 提取

本实验所有土壤样品均采用UltraClean Soil DNA Isolation Kit (Mobio)试剂盒提取土壤总DNA, 操作流程按试剂盒说明进行。

### 1.4 末端限制性片段多态性分析

细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增引物为 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) 及 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACT) (由 Invitrogen 合成)<sup>[9]</sup>。5'端引物用 FAM 标记。PCR 反应体系(50 μL)为: 5 μL 10 × 缓冲液 (Takara), 3.6 μL 25 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 4 μL 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP (Takara), 2 μL 150 μmol·L<sup>-1</sup> BSA, 1.6 μL 10 μmol·L<sup>-1</sup> 引物 (Invitrogen), 0.25 μL 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶 (TakaRa), 1 μL DNA 模板。反应程序为 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 56 °C 复性 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 进行 32 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。由于末端限制性片段多态性分析要求 PCR 纯化产物浓度较高, 故 PCR 扩增条带需为单一条带, 因此可以采用离心柱型纯化方法, 直接过柱纯化, 减少 PCR 产物的损失。用于 T-RFLP 的 PCR 产物用天根公司的 DNA 纯化回收试剂盒(离心柱型 DP214)纯化。之后对纯化产物进行酶切, 采用 *Hae*III (Takara), PCR 纯化产物及酶混匀离心后在 37 °C 条件下消化 4 h, 方法参考<sup>[1]</sup>, 之后 80 °C 变性 20 min。酶切产物采用乙醇纯化方法。加 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠及 2 倍体积的 φ=100%乙醇到酶切产物中, 混匀-80 °C 静置至少 0.5 h, 4 °C 14 000 r/min 离心

15 min, 弃上清液, 加 50 μL φ=70%乙醇, 4 °C 14 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 加入 10 μL 高纯水溶解待分析。最后, 采用自动测序仪进行检测。根据 T-RFLP 分析结果, 挑选代表性样品对照样品(CK)进行克隆测序。测序引物为 M13-47, 随机挑选 100 个克隆子进行测序(上海英骏生物技术有限公司), 系统发育树的绘制采用 MEGA4 软件, 算法为邻位相连法(Neighbor-Joining Analysis)。测序后对质粒进行酶切, 进行 T-RFLP 校正片段<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 土壤多环芳烃的测定

根据分析结果(表2)可以看出, 各位点 PAHs 总含量范围为 93.66~643.67 ng·g<sup>-1</sup>。炼油厂周边绿地的表层土壤中总 PAHs 的含量明显高于其他位点, 而位于炼油厂较远区域的对照 PAHs 的总体含量较低。分析原因为: ① 此位点离工业区较远, 因此引入的工业污染较少; ② 此位点处于农业活动密集区域, 农业活动屏蔽了部分污染, 农作物对于 PAHs 的迁移也起到了重要作用。因此, 其 PAHs 的含量较低。

表2 不同地方农业土壤 PAHs 含量分布特征

Table 2 Total PAHs concentration in different place ng·g<sup>-1</sup>

PAHs	环数	炼油厂周边绿地(A)	生活区(B)	农田(C)	码头(D)	郊外(E)
萘	2	15.24	9.31	18.02	13.71	7.97
苊烯	3	1.33	1.89	5.04	1.20	0.74
苊	3	1.33	1.34	5.51	0.86	0.61
芴	3	5.36	5.66	12.74	3.48	2.80
菲	3	23.79	18.86	22.54	19.06	8.56
蒽	3	3.28	1.31	2.38	1.32	0.73
荧蒹	4	16.19	19.07	23.74	15.41	8.76
芘	4	54.67	46.56	65.00	45.95	13.01
苝	4	52.08	7.11	10.98	10.85	3.80
苯并(a)蒽	4	64.36	13.77	19.57	16.66	7.18
苯并(b)荧蒹	5	83.57	17.37	23.43	21.60	10.34
苯并(k)荧蒹	5	75.47	15.69	21.16	19.51	9.34
苯并(a)芘	5	109.21	18.18	22.30	22.54	8.56
茚并(1,2,3-cd)芘	6	3.50	15.62	1.26	9.72	2.81
二苯并(a,n)蒽	5	35.87	0.17	0.16	2.85	0.44
苯并(ghi)北(二萘嵌苯)	6	98.40	14.67	15.70	19.61	8.02
总量		643.67	206.60	269.53	224.30	93.66

从表中可以看出, PAHs 各类化合物中, 结构复杂的化合物含量较高, 结构简单的化合物含量较少。尤其以炼油厂周边绿地土壤中表现最为明显, 苯并(a)芘的浓度最高, 其次为苯并(ghi)北(二萘嵌苯)、苯并(b)荧蒹等。相对于四个苯环以下的 PAHs 含量, 4 个苯环以上的 PAHs 化合物含量占了绝对优势。主要原因可能是炼油厂不完全燃烧导致了高环 PAHs 的累积。此外, 一方面, 低相对分子质量多环芳烃在好氧条件下较易挥发降解, 从而有较少的 PAHs 的累积, 另一方面, 高相对分子质量

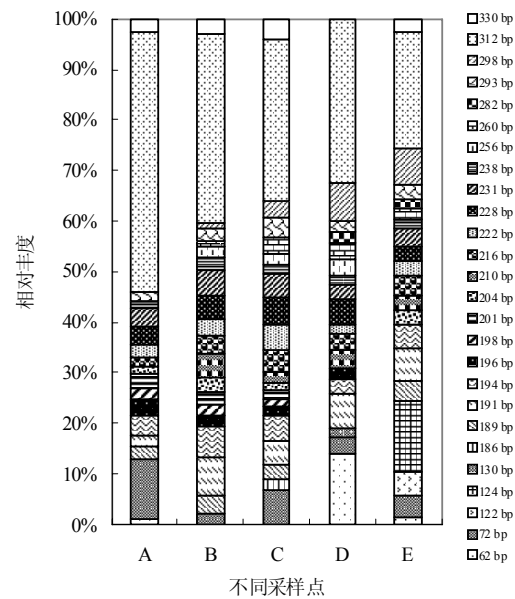
PAHs 由于难挥发性和难降解性等 在土壤中得到累积, 此外, PAHs 的分析也说明此地区 PAHs 的主要来源是化石燃料的燃烧。与炼油厂周边绿地不同, 其它土壤中, PAHs 中, 四环的芘含量均是最高, 说明了芘的普遍存在性及难降解性。

2.2 系统发育分析

本研究挑选郊外对照样品构建克隆文库。随机挑选克隆子进行测序分析表明全部序列均属于细菌, 主要包括酸杆菌门 *Acidobacteria*、放线菌门 *Actinobacteria*、 $\alpha$ -变形菌  $\alpha$ -*Proteobacteria*、 $\beta$ -变形菌  $\beta$ -*Proteobacteria*、 $\gamma$ -变形菌  $\gamma$ -*Proteobacteria* 和浮霉菌状菌 *Planctomycetia*。对代表性的序列进行 *in silico* 酶切, 进行 T-RFLP 分析, 之后确定每个酶切片段所代表的细菌, 大多数酶切片段得到鉴定, 结果如图 1。

2.3 不同区域土壤样品细菌多样性的 T-RFLP 分析

每一个 T-RF 所代表的至少是一种细菌, 因此 T-RF 的多样性, 也代表了细菌种类的多样性。不同位点细菌多样性有显著区别 (图 2)。从 T-RFLP 分析图谱中, 可以看出从 5 个区域土壤样品中共得出 30 个末端限制性片段 (Terminal Restriction Fragment, T-RF)。全部样品中, 主要的微生物为 312 bp, 代表  $\alpha$ -变形菌 (图 1), 其丰度在各个样品中均达到 20%, 尤其是 A 样品, 312 bp 的丰度超过了 50%。污染严



(A、B、C、D和E代表不同的采样位点, 见表2)  
图2 不同采样点细菌群落末端限制性片段 (T-RF) 的相对百分含量  
Fig.2 Relative abundance of bacterial communities generated from DNA fractions

重的土壤较对照土壤的微生物多样性较差 (图 2), 这可能是由于长期的自然选择过程, 在 PAHs 浓度较高的土壤中占据了绝对优势, 导致其它类型菌群的消失或丰度的降低。另外, 从图 2 可以看出, 5 个区域土壤均存在相同的优势菌群 312 bp 所代表的细菌, 表明这一类菌群在对照及未污染的土壤中均能较好的生存繁衍。此外, 312 bp 所代表的细菌丰度随着 PAHs 含量的提高而升高, 表明其对高质量分数的 PAHs 污染具有更好的适应性。62 bp 及 72 bp 分别在码头区 (D) 及炼油厂周边绿地区 (A) 中相对丰度含量较高, 两者均属于放线菌门。

原位土壤 T-RFLP 分析表明不同位点细菌群落多样性明显不同。高质量分数 PAHs 降低了群落多样性, 这与 Nakatsu<sup>[11]</sup>等的研究结果一致, 也进一步验证了 PAHs 污染后微生物群落多样性将减少的观点。但是, Sverdrup<sup>[12]</sup>等通过室内培养实验表明 1 ~ 3 000 mg·kg<sup>-1</sup> 芘处理几乎对细菌群落没有影响, 与本实验结果明显不同, 这可能是由于实验条件的不同。尽管高质量分数 PAHs 会降低群落多样性, 但同时也会提高某些微生物的相对丰度并促使其在群落中占据主导地位。本研究也表明主要的细菌群落及其代表片段的相对丰度有明显的 PAHs 依赖趋势, 如 312 bp 的丰度随 PAHs 污染质量分数的升高而升高, 并在 PAHs 较高质量分数污染的土壤样品中占据主导地位, 这与本实验室模拟实验具有较好的吻合性, 主要的细菌群落及其代表片段的相对

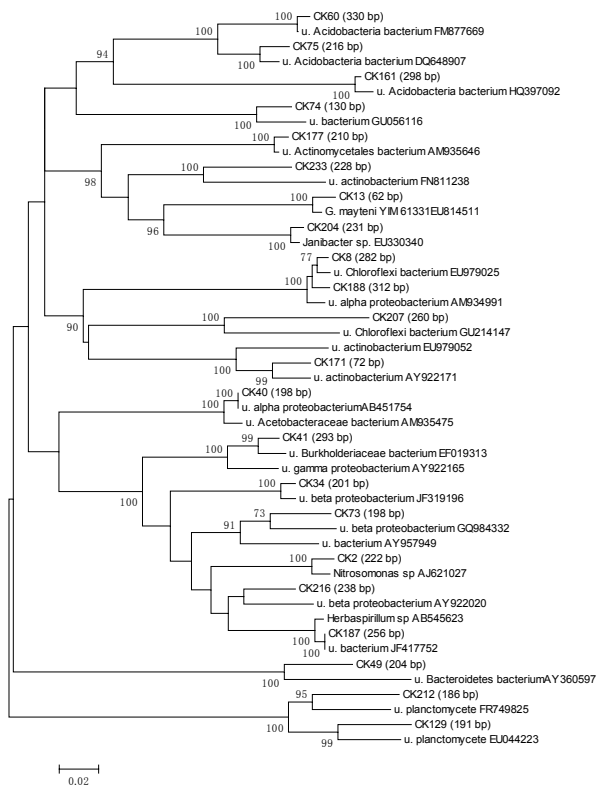


图 1 基于 16S rRNA 序列的系统发育树  
Fig.1 Phylogenetic relationship of representative bacterial 16S rRNA gene clone sequences

丰度有明显的芘依赖趋势,  $\alpha$ -变形菌、 $\beta$ -变形菌和厚壁菌门 Firmutes 随着芘质量分数的升高而升高(未发表)。

### 3 结论

1) 不同 PAHs 污染土壤中 PAHs 的分布明显不同。PAHs 质量分数较高的污染区, 高相对分子质量 PAHs 占绝对优势, 低相对分子质量 PAHs 在低浓度 PAHs 污染土壤中分布较为均匀, 此外, 所有样品中芘的质量分数均较高。

2) T-RFLP 可以明显鉴定微生物群落多样性的不同, PAHs 质量分数较高的污染区土壤细菌多样性明显低于低质量分数 PAHs 污染土壤, 且 PAHs 对土壤中部分微生物具有刺激作用。 $\alpha$ -变形菌是土壤中主要的细菌群落。

### 参考文献:

- [1] PENG J J, CAI C, QIAO M, et al. Dynamic changes in functional gene copy numbers and microbial communities during degradation of pyrene in soils[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(9):2872-2879.
- [2] CHEUNG P Y, KINKLE B K. Changes in Mycobacterium spp. population structure and pyrene mineralization in polycyclic aromatic hydrocarbon-amended soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry* 2005, 37(10):1929-1937.
- [3] CEBRON A, NORINI M P, BEGUIRISTAIN T, et al. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD  $\alpha$ -pha) genes from *Gram positive* and *Gram negative* bacteria in soil and sediment samples[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 73(2):148-159.
- [4] GAO Y Z, LING W T, WONG M H. Plant-accelerated dissipation of phenanthrene and pyrene from water in the presence of a non-ionic-surfactant[J]. *Chemosphere*, 2006, 63(9):1560-1567.
- [5] BLACKWOOD C B, HUDLESTON D, ZAK D R, et al. Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: Insights from simulated microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16):5276-5283.
- [6] PENG J J, LV Z, RUI J, et al. Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(9):2894-2901.
- [7] YRJALA K, SIPILA T P, KESKINEN A K, et al. High aromatic ring-cleavage diversity in birch rhizosphere: PAH treatment-specific changes of IE3 group extradiol dioxygenases and 16S rRNA bacterial communities in soil[J]. *Isme Journal*, 2008, 2(9):968-981.
- [8] DURAN R, BEN SAID O, GONI-URRIZA M, et al. Bacterial community structure of sediments of the Bizerte lagoon (Tunisia), a southern mediterranean coastal Anthropized lagoon[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59(3):445-456.
- [9] WEISBURG W G, BARNES S M, PELLETIER D A, et al. 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology* 1991, 173(2):697-703.
- [10] RUI J P, PENG J J, LU Y H. Succession of bacterial populations during plant residue decomposition in rice field soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(14):4879-4886.
- [11] NAKATSU C H. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2007, 71(2):562-571.
- [12] SVERDRUPL E, EKELUND F, KROGH P H, et al. Soil microbial toxicity of eight polycyclic aromatic compounds: Effects on nitrification, the genetic diversity of bacteria, and the total number of protozoans[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, 21(8):1644-1650.

## Application of T-RFLP to study microbial diversity in PAHs polluted soil around oil refinery

PENG Jingjing<sup>1</sup>, ZHANG Youchi<sup>1</sup>, HOU Yanwei<sup>2</sup>, Li HUIJUAN<sup>1</sup>, CAI Chao<sup>1</sup>

1. Key Lab of Urban Environment and Health/Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China;

2. Department of Environmental Science and Technology, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen, 361021, China;

**Abstract:** After DNA extraction from oil refinery adjacent soil directly, composition of bacterial communities was evaluated using polymerase chain reaction (PCR)-terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis. Bacterial 16S rRNA T-RFLP fingerprinting revealed a high structural bacterial diversity in soil. High molecular weight PAHs is the dominate group in the high PAHs polluted soil. High concentration of PAHs in the polluted soil showed a strong effect on the bacterial populations. Our results revealed that higher bacterial diversity was found in the soil with low levels of PAHs. This indicates that PAHs affect the bacterial community by favoring certain groups of bacterial community. There were several bacteria detected in the different soils, while the relative abundance of T-RFs differed significantly with different soils.  $\alpha$ -Proteobacteria is the dominant group in different soils. This study will provide scientific evidence for bioremediation of soil around oil refinery.

**Key words:** soil; PCR-T-RFLP; microbial diversity; PAHs