

梯度驯化法定向培育高效石油烃降解菌群及功能菌资源挖掘

独学渊^{1,2*}, 李书鹏^{1,2*}, 邱景琮^{1,2}, 郭丽莉^{1,2}, 常慧^{1,2}, 李嘉晨^{1,2}, 张冉^{1,2}, 李丽杰^{1,2}

1 污染场地安全修复技术国家工程实验室, 北京

2 北京建工环境修复股份有限公司, 北京

独学渊, 李书鹏, 邱景琮, 郭丽莉, 常慧, 李嘉晨, 张冉, 李丽杰. 梯度驯化法定向培育高效石油烃降解菌群及功能菌资源挖掘[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3794-3812.

DU Xueyuan, LI Shupeng, QIU Jingcong, GUO Lili, CHANG Hui, LI Jiachen, ZHANG Ran, LI Lijie. Directed cultivation of efficient petroleum hydrocarbon-degrading microbial consortia via gradient domestication and exploitation of functional bacterial resources[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(8): 3794-3812.

摘要:【目的】探究不同浓度石油烃条件下微生物群落结构特征, 定向培育高效石油烃降解微生物菌群, 并挖掘具有石油烃降解功能的菌株资源。【方法】以 0#柴油作为唯一碳源, 通过逐级提高其浓度对石油污染土壤样品进行逐级驯化, 共进行 5 代驯化。基于 16S rRNA 基因扩增子测序技术揭示微生物群落结构变化, 利用稀释涂布和平板划线法分离纯化具有石油烃降解潜力的菌株。通过改进 2,6-二氯靛酚培养体系验证实验筛选高效降解菌株。【结果】随着驯化过程中 0#柴油浓度的升高, 在 7 000 mg/L 条件下拟杆菌门(*Bacteroidota*)、芽孢杆菌门(*Bacillota*)等具有石油烃降解功能的细菌门相对丰度显著升高。共分离得到 58 株细菌, 分属于 4 门 22 科 25 属。其中, 假单胞菌门(*Pseudomonadota*) 31 株, 占比 53.45%; 放线菌门(*Actinomycetota*) 13 株, 占比 22.41%; 芽孢杆菌门(*Bacillota*) 11 株, 占比 18.97%; 拟杆菌门(*Bacteroidota*) 3 株, 占比 5.17%。同时, 筛选获得 18 株具有潜在石油烃降解功能的菌株。【结论】通过逐级驯化培养, 成功富集获得 7 个在 7 000 mg/L 0#柴油浓度下石油烃降解率超过 70% 的驯化菌群。扩增子测序表明, 不同浓度的 0#柴油明显改变了微生物群落结构, 并筛选得到 18 株能以 0#柴油作为唯一碳源进行生长的细菌, 为微生物修复石油污染土壤提供了潜在的菌种资源。

关键词: 石油烃降解; 梯度驯化; 微生物群落; 细菌分离

资助项目: 北京建工集团科技计划(SA10000000272023051)

This work was supported by the Beijing Construction Engineering Group Science and Technology Project (SA10000000272023051).

*Corresponding authors. E-mail: DU Xueyuan: duxueyuan@bceer.com; LI Shupeng: lishupeng@bceer.com

Received: 2025-04-27; Accepted: 2025-06-20; Published online: 2025-07-02

Directed cultivation of efficient petroleum hydrocarbon-degrading microbial consortia *via* gradient domestication and exploitation of functional bacterial resources

DU Xueyuan^{1,2*}, LI Shupeng^{1,2*}, QIU Jingcong^{1,2}, GUO Lili^{1,2}, CHANG Hui^{1,2}, LI Jiachen^{1,2}, ZHANG Ran^{1,2}, LI Lijie^{1,2}

1 National Engineering Laboratory for Site Remediation Technologies, Beijing, China

2 BCEG Environmental Remediation Co., Ltd., Beijing, China

Abstract: [Objective] To investigate the structural characteristics of microbial consortia in different concentrations of petroleum hydrocarbons, cultivate efficient petroleum hydrocarbon-degrading microbial consortia, and mine the strain resources capable of degrading petroleum hydrocarbons. [Methods] We used 0# diesel as the sole carbon source to domesticate oil-contaminated soil samples through five successive generations by gradually increasing the 0# diesel concentration. The structural changes of microbial consortia were uncovered by 16S rRNA gene amplicon sequencing. The strains with petroleum hydrocarbon-degrading potential were isolated and purified *via* dilution plating and streaking. Finally, the improved 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) cultivation system was employed to identify efficient degrading strains. [Results] During domestication, when the concentration of 0# diesel was raised to 7 000 mg/L, the relative abundance of petroleum hydrocarbon-degrading bacteria including *Bacteroidota* and *Bacillota* significantly increased. A total of 58 bacterial strains belonging to 25 genera, 22 families of 4 phyla were isolated, including 31 (53.45%) strains of *Pseudomonadota*, 13 (22.41%) strains of *Actinomycetota*, 11 (18.97%) strains of *Bacillota*, and 3 (5.17%) strains of *Bacteroidota*. From the isolated strains, 18 petroleum hydrocarbon-degrading strains were screened out. [Conclusion] Through gradient domestication, seven natural microbial consortia were successfully enriched, achieving over 70% degradation of petroleum hydrocarbons at 7 000 mg/L of 0# diesel. Amplicon sequencing revealed that varying 0# diesel concentrations altered the microbial consortium structure. Additionally, 18 strains capable of using 0# diesel as the sole carbon source were identified, providing potential microbial resources for the bioremediation of oil-contaminated soil.

Keywords: petroleum hydrocarbon degradation; gradient domestication; microbial consortium; bacterial isolation

石油作为众多行业的重要能源与原材料^[1], 具有不可替代的地位。然而, 石油泄漏造成的污染因具有高度的顽固性、三致效应(致癌、致畸、致突变)^[2], 已被列为优先控制的污染物^[3]。据统计, 欧洲约有 280 万个站点受污染影响^[4], 其中烷烃污染占比 22%–24%, 与苯系物、多环

芳烃一起占 45%^[5]。在我国, 经统计的石化场地中有 42 个开展了土壤污染调查, 28 个进行了地下水污染调查, 均检出不同程度的石油烃污染^[6]。

针对土壤与地下水石油烃污染, 常规修复手段涵盖物理、化学及生物修复。物理和化学修复虽具快速起效的优势, 却因成本高昂及可

能诱发的二次污染问题而备受关注^[7],例如化学氧化剂高锰酸钾与过氧化氢便存在生物安全隐患^[8]。相较之下,生物修复凭借低成本、易于操作、生态风险低以及广泛的适用性等突出优势被视作极具潜力的修复技术^[9]。生物修复主要借助微生物的代谢作用,将污染物转化为低毒或无毒物质,是一种环保的修复策略^[10]。众多实验和实际应用已证实微生物修复可有效降解土壤中的石油烃等污染物。鉴于石油烃污染的广泛性和严重性,开展微生物群落结构与石油烃浓度的相关性研究、石油烃高效降解菌株的分离以及生物修复技术研究具有重要意义。

多年来,国内外学者在微生物降解石油烃领域已取得诸多重要成果,研究集中在功能菌株筛选、降解性能评估、基因与代谢途径解析及微生物与环境互作等方面。已鉴定超过 70 个属、200 种降解石油烃的微生物^[11],包括细菌、真菌与藻类,其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)等细菌应用广泛,产表面活性剂微生物也因能提高降解效率而备受关注^[11-14]。在石油烃污染场地修复方面,实际应用成果显著。1989 年,Exxon 石油公司 Valdez 油轮在阿拉斯加海滩溢油,首次大规模应用微生物修复技术,通过添加营养物质刺激本土微生物降解石油烃,取得了一定效果^[15]。国内在胜利油田、辽河油田和吉林油田的微生物修复工程累计处理超过 1.2 万 t 污染土壤,取得了巨大的经济和生态效益^[16]。姚贞先等^[17]通过定向驯化高效石油降解菌系,使石油污染土壤总石油烃降解率较空白对照提升了 81.23%。

现有石油烃降解微生物研究成果虽多,但仍存在不足。一方面,不同浓度石油烃对微生物群落结构的影响机制尚不明确,导致石油烃污染场地微生物修复策略的精准性不足。另一方面,当前多数石油烃降解菌株依赖传统分离培养法获得,而针对高浓度石油烃降解菌株的筛选研究相对稀缺。因此本研究运用梯度驯化法逐步提升石油烃浓度,助力微生物菌群适应

高浓度污染环境,强化其对石油烃污染物的降解效能。同时,探究不同浓度石油烃作用下微生物群落结构的演变规律,加深对微生物群落结构与石油烃浓度关联性的认知,以期为石油烃污染场地微生物修复策略的优化奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 石油烃污染样品的采集

采样点位于天津市北辰区天重道路与高峰路交叉口南侧遗留厂房东侧的石油烃污染地块。经前期场地调查,该区域存在地下埋藏柴油储油罐泄漏,土壤和地下水存在不同程度的石油烃污染(89.1–2 470.0 mg/kg)。在泄漏点周围设置 6 个采样点(表 1,采样点用天津 90 坐标系定位),使用 30 钻机进行土壤钻探,采集不同深度的土壤岩心样品(地表至地下 12 m 范围内,地表 0 m 及地下 -2 m、-5 m、-8 m、-10 m、-12 m 处岩心土壤各取样 1 kg,每个采样点 6 份),共 36 份。样品经冰袋冷藏运输返回实验室,并在实验前于 4 °C 冰箱中保存。

1.2 培养基

以梯度提升方式向无机盐培养基(mineral salt medium, MSM)^[18]添加不同浓度的 0#柴油(第一代:200 mg/L,第 2 代:800 mg/L,第 3 代:2 000 mg/L,第 4 代:5 000 mg/L,第 5 代:7 000 mg/L)作为唯一碳源(0#柴油购自中国石油加油站,主要成分包括饱和烷烃约占 89.6%、芳香烃约占 8.0% 及少量的醇、酸、烯等氧化物^[19]),对采集样品进行 5 代梯度驯化。使用分离筛选培养基(在第 4 代驯化培养基加 18 g 琼脂制备分离平板(90 mm),无菌 0#柴油以覆盖每个平板 0.125 g 的方式添加),分离第 5 代驯化培养液中的可培养细菌,筛选出具有石油烃降解潜力的菌株。LB 培养基^[20]用于分离菌株的纯化和常规培养。

1.3 主要试剂和仪器

无机盐培养基,山东拓普生物工程有限公司

司; LB 培养基, ThermoFisher Scientific 公司。

微量分光光度计, ThermoFisher Scientific 公司; PCR 仪、凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 台式高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 生物安全柜, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司。

1.4 菌群驯化

从每个采样点不同深度的土壤样品中各取 10 g, 充分混匀。取混匀后的土壤 10 g, 加入含 90 mL 无菌生理盐水和玻璃珠的 250 mL 摇瓶中, 于 30 ℃、180 r/min 的恒温摇床孵育 2 h, 制备成土著菌源悬浮液。向装有 90 mL 第 1 代驯化培养基的 250 mL 摇瓶中加入 10 mL 土著菌源悬浮液。在 30 ℃、180 r/min 培养 7 d 后, 依据梯度压力驯化法, 将 10 mL 培养液转移至 90 mL 第 2 代驯化培养基中。重复此过程, 直至

第 5 代驯化培养 7 d 后终止定向驯化, 如图 1 所示。在第 3、4、5 代驯化阶段结束后, 从各浓度梯度的培养液中取样, 用于驯化菌群保藏、后续微生物群落结构分析, 以及测定驯化菌群对 0#柴油中总石油烃的降解能力。每个混合土样设置 3 个重复。

1.5 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增子测序

在不同样品的第 3、4、5 代驯化阶段, 共收集了 54 个驯化菌群样本。通过 4 ℃、4 000 r/min 离心 2 min 后收集菌体, 并利用基因组提取试剂盒提取总 DNA, 使用微量分光光度计检测 DNA 浓度。细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区域使用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCGAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')

表1 污染区域采样点及信息
Table 1 Location of sampling points

Sample points (m)	Date	Geographical coordinates
S1 (0, -2, -5, -8, -10, -12)	2023-08-11	X=309 709.341, Y=96 000.111
S2 (0, -2, -5, -8, -10, -12)	2023-08-11	X=309 725.705, Y=96 990.718
S3 (0, -2, -5, -8, -10, -12)	2023-08-11	X=309 738.788, Y=95 983.205
S4 (0, -2, -5, -8, -10, -12)	2023-08-11	X=309 746.227, Y=95 996.159
S5 (0, -2, -5, -8, -10, -12)	2023-08-11	X=309 733.360, Y=96 003.879
S6 (0, -2, -5, -8, -10, -12)	2023-08-11	X=309 716.797, Y=96 013.128

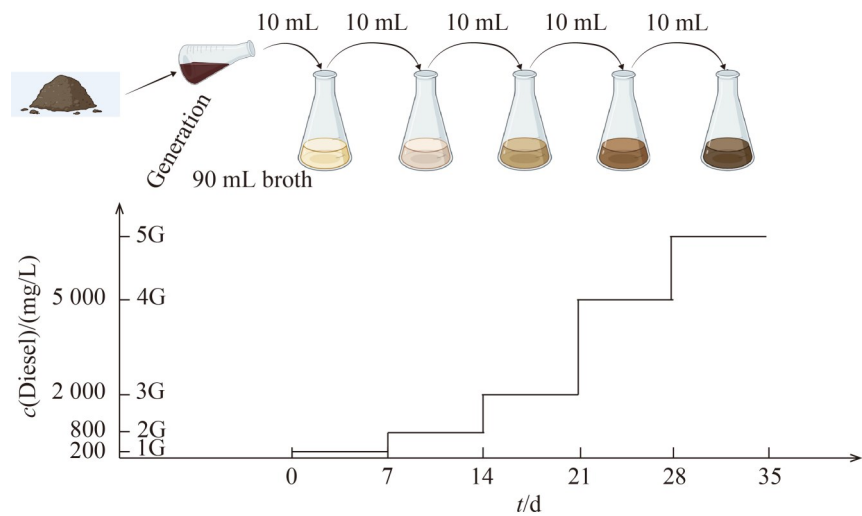


图1 0#柴油逐级提升浓度驯化微生物菌群示意图
Figure 1 Schematic diagram of domesticated microbial consortia with increasing concentrations of 0# diesel.

进行扩增^[21]；真菌 ITS 序列的 ITS1 区域使用引物 1737F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 2043R (5'-GCTGCGTTCTTCATCG-3') 进行扩增^[22]。PCR 反应由北京百迈客生物科技有限公司完成。对获取的高质量 DNA 片段构建文库，利用 Illumina NovaSeq 6000 测序。对得到的原始序列数据经过滤、去噪、拼接等处理后进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类分析 (相似性 97%)，注释物种，得到 OTU 数量及分类信息。结合多样性指数、物种组成等分析方法，研究不同时间点驯化菌群的微生物群落结构差异和功能。上述生物信息学分析在百迈客云平台 (<https://www.biocloud.net>) 完成。

1.6 菌株分离纯化

在生物安全柜内利用分离筛选培养基对第 5 代驯化样本中的高效石油烃降解菌株进行分离。取 1 mL 富集培养物进行连续梯度稀释至 10^{-7} ，并分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释梯度的菌液 100 μ L 涂布到分离筛选培养基平板上，在 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中正置培养，直至形成可见菌落。

选取在平板上生长速度较快、菌落较大且形态各异的单菌落，在 LB 平板上进行多次划线分离纯化，并重复该操作 3 次以获得纯培养。

1.7 驯化菌群对 0#柴油中总石油烃降解率的测定

以正己烷为萃取剂，采用液液萃取的方法萃取柴油培养基中的柴油，萃取后的柴油含量通过气相色谱仪进行测定。色谱条件：Agilent HP-5 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) 色谱柱；温度程序为 50 $^{\circ}$ C 恒温 6 min，以 80 $^{\circ}$ C/min 升温至 300 $^{\circ}$ C，恒温 13 min；氮气载气流速为 4 mL/min；进样量为 1 μ L，进样温度为 320 $^{\circ}$ C，分流比为 2:1；检测器为 FID 检测器，检测器温度 330 $^{\circ}$ C，氢气流量：40 mL/min，空气流量 350 mL/min，尾吹气流量 30 mL/min。

总石油烃 (total petroleum hydrocarbons, TPH) 降解率计算如公式 (1) 所示。

$$\text{TPH降解率} = (C_0 - C_t) / C_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中： C_0 为未接种菌的驯化培养基中 TPH 的质量浓度，mg/L； C_t 为接种菌后驯化培养基中 TPH 的质量浓度，mg/L。

1.8 分离菌株生物信息学分析

1.8.1 分离菌株系统发育分析

分离菌株基因组 DNA 模板提取方法见 1.5 节，采用通用引物 27f 和 1492r^[23] 扩增细菌的 16S rRNA 基因并测序，PCR 反应由北京擎科生物科技股份有限公司完成。在测序结果成功拼接后，将拼接序列上传至 NCBI 网站，利用其在线 BLAST 功能进行相似性比对。利用 MEGA 11^[24] 软件，通过最大似然法构建细菌系统发育树^[25]，采用 Kimura 双参数法^[26] 计算进化距离，用 MEGA 11 软件中 Phylogeny 内的 bootstrap 值评估分支稳定性，重复 1 000 次，其余参数为默认设置。

1.8.2 分离菌株最近菌或模式菌功能基因分析

运用 BLAST 方法将分离菌株的近缘模式菌 (如没有则选取非模式菌) 基因组注释文件与从 NCBI 等数据库获取的已知石油烃降解相关酶蛋白序列进行比对^[27]。利用 makeblastdb 工具建立本地 BLAST 数据库，运行 blastp，参数设置为： $E\text{-value} \leq 0.0001$ ， $\text{identity} \geq 40\%$ ， $\text{coverage} \geq 50\%$ 。

1.9 分离菌株石油烃降解功能验证

分离菌株在 LB 液体培养基中于 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养，直至 $OD_{600} > 1.0$ 。取 1 mL 菌液，4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 2 min 后收集菌体，用 0.9% 无菌生理盐水洗涤，重复 3 次以去除残留培养基，并调整至 OD_{600} 值为 1.0，制备成细胞悬浮液。采用 2,6-二氯酚 (2,6-dichlorophenol indophenol, 2,6-DCPIP) 作为指示剂，按照修改自 Kubota 等^[28] 的方法验证分离菌株的石油烃降解能力。2,6-DCPIP 实验体系置于 5 mL EP 管中，在 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下培养，连续 5 d 观察并记录颜色的每日变化。实验体系各组分具体

为: MSM 培养基 1 500 μL , 2,6-DCPIP (37.5 mg/L) 100 μL , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (150 mg/L) 100 μL , 细胞悬浮液($OD_{600}=1.0$) 100 μL 、0#柴油 10 μL 。

1.10 数据分析

使用 GraphPad Prism 软件进行单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 并采用邓肯法(Duncan)进行多重比较, 显著性水平分别设定为 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 和 $P<0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 驯化菌群对 0#柴油中总石油烃的降解效果

六个采样点的混合样品, 每个样品取 3 个重复进行菌群定向驯化。考虑到实验时间和成本的限制, 同时避免柴油梯度设置过大导致微

生物难以适应环境压力, 本研究选择进行 5 代梯度驯化。其中第 3、4、5 代驯化微生物菌群对不同浓度 0#柴油中总石油烃(total petroleum hydrocarbons, TPH)的降解效果如图 2 所示。第 3 代驯化菌群对 2 000 mg/L 的 0#柴油中 TPH 的降解效果较好, 每个样品的 3 个驯化菌群 7 d TPH 降解率均值均超过 70% (图 2A); 第 4 代驯化菌群中, 仅 S3 号样品的 3 个驯化菌群对 5 000 mg/L 的 0#柴油中 TPH 的 7 d 降解率均值超过 60% (图 2B); 第 5 代驯化菌群中, S2、S3 号样品各自的 3 个驯化菌群对 7 000 mg/L 的 0#柴油中 TPH 的 7 d 降解率均值超过 70%, S5、S6 号样品的 3 个驯化菌群降解率均值超过 60% (图 2C)。这表明逐级提高 0#柴油浓度驯化石油烃污染土著菌群, 富集石油烃降解功能菌株的方式是合理的, 可以为后续功能菌株分离筛选提供材料。

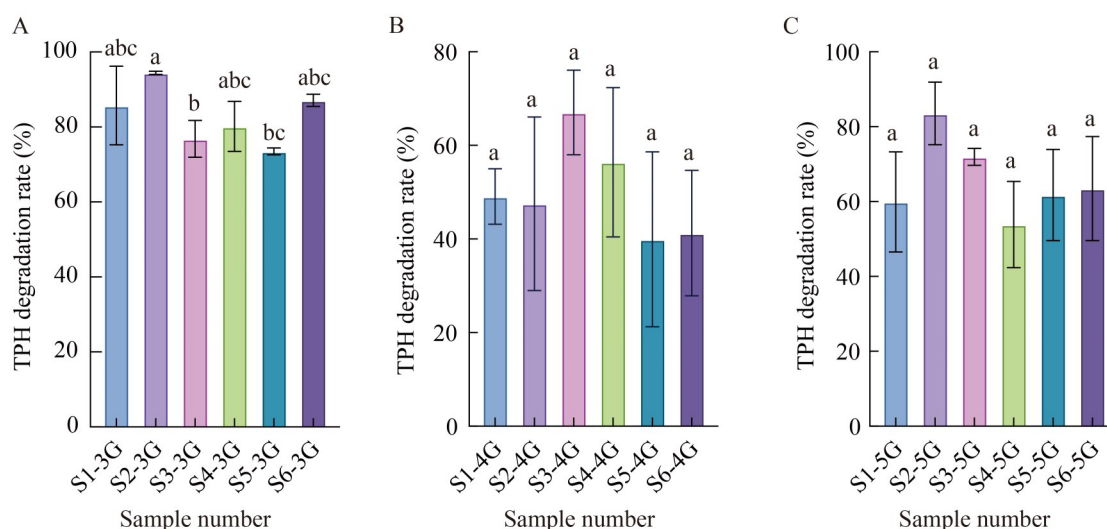


图2 驯化菌群对不同浓度0#柴油中TPH的降解效果。A: 第3代驯化菌群对2 000 mg/L 0#柴油中TPH的降解率; B: 第4代驯化菌群对5 000 mg/L 0#柴油中TPH的降解率; C: 第5代驯化菌群对7 000 mg/L 0#柴油中TPH的降解率。不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

Figure 2 The degradation effect of domesticated microbial consortia on TPH in 0# diesel of different concentrations. A: Degradation rate of TPH in 2 000 mg/L 0# diesel by the third generation domesticated microbial consortia; B: Degradation rate of TPH in 5 000 mg/L 0# diesel by the fourth generation domesticated microbial consortia; C: Degradation rate of TPH in 7 000 mg/L 0# diesel by the fifth generation domesticated microbial consortia. Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at the 0.05 level.

2.2 0#柴油影响下微生物 α 多样性的演替

采用 Shannon 指数和 Chao1 指数来反映微生物 α 多样性对不同浓度 0#柴油影响的响应。单因素方差分析(one-way ANOVA)结果表明,微生物群落 α 多样性在不同培养阶段呈现出显著差异(图 3)。随着富集传代过程的推进,微生物群落 α 多样性明显升高。高浓度组(5G 组)的细菌群落 Shannon 指数显著高于 0#柴油低、中浓度组(3G、4G 组),而低、中浓度组之间 α 多样性差异并不显著,低、中、高组在 Chao1 指数上差异并不显著(图 3A、3B)。对于真菌群落,高浓度组(5G 组)的真菌群落 Shannon 指数和 Chao1 指数显著高于 0#柴油低、中浓度组(3G、4G 组),而低、中浓度组之间 α 多样性差异并不显著(图 3C、3D)。

2.3 不同浓度 0#柴油对驯化菌群群落结构的影响

2.3.1 不同浓度 0#柴油对门水平驯化菌群群落结构的影响

为了进一步了解微生物群落结构与石油烃降解效果的关系,对各个驯化菌群中的微生物

群落组成进行了分析(图 4)。随着驯化培养基中石油烃浓度的升高,降解石油烃的功能微生物被富集。在 2 000 mg/L 0#柴油条件下,细菌群落组成方面,各驯化菌群的组成结构在门水平上差异较大,无明显规律(图 4A),但以假单胞菌门(*Pseudomonadota*)细菌为主,平均相对丰度为 83.1% (图 4B);真菌群落组成方面,各驯化菌群的群落组成结构在门水平上差异不大(图 4C),平均相对丰度>10.0% 的有 3 个门,壶菌门(*Chytridiomycota*)、子囊菌门(*Ascomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)平均相对丰度分别为 53.2%、31.7% 和 10.0%,总计占比达 94.9% (图 4D)。菌群驯化过程中,随着唯一碳源 0#柴油的浓度升高,各驯化菌群群落结构在门水平上趋于相似(图 4A、4C)。在 7 000 mg/L 0#柴油条件下,细菌平均相对丰度>10.0% 的有 3 个门,分别为假单胞菌门(*Pseudomonadota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、芽孢杆菌门(*Bacillota*),平均相对丰度分别为 23.8%、20.6% 和 22.3%,总计占比 66.7% (图 4A、4B);真菌平均相对丰度>10.0% 的有 5 个门,分别为子囊菌门(*Ascomycota*)、壶菌门

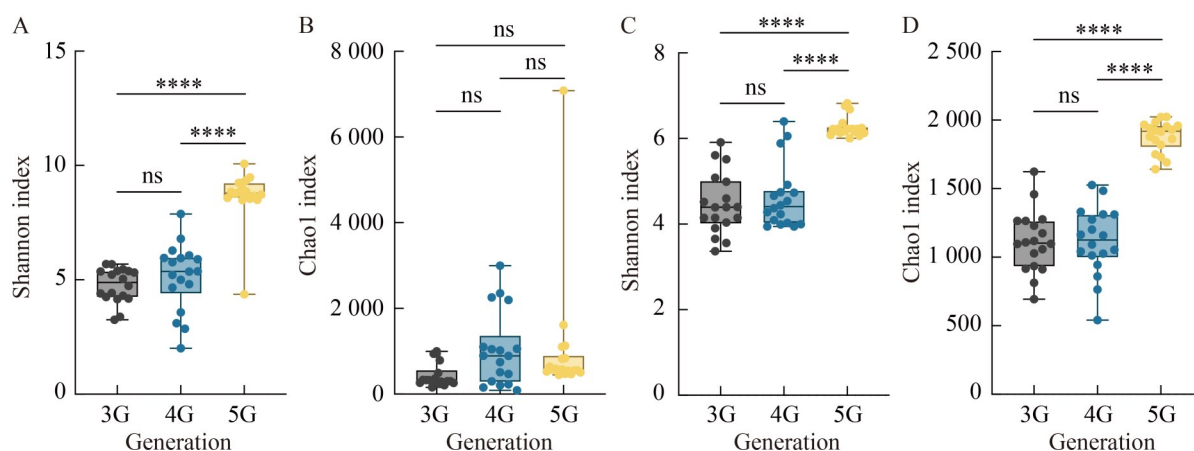


图3 各代驯化菌群真菌和细菌 α 多样性分析。A: 细菌的Shannon指数; B: 细菌的Chao1指数; C: 真菌的Shannon指数; D: 真菌的Chao1指数。****: $P < 0.0001$; ns: 无显著性差异。3G: 2 000 mg/L 0#柴油; 4G: 5 000 mg/L 0#柴油; 5G: 7 000 mg/L 0#柴油。

Figure 3 Analysis of fungal and bacterial α diversity in each generation of domesticated consortia. A: Shannon index of bacteria; B: Chao1 index of bacteria; C: Shannon index of fungi; D: Chao1 index of fungi. ****: $P < 0.0001$; ns: Not significant. 3G: 2 000 mg/L 0# diesel; 4G: 5 000 mg/L 0# diesel; 5G: 7 000 mg/L 0# diesel.

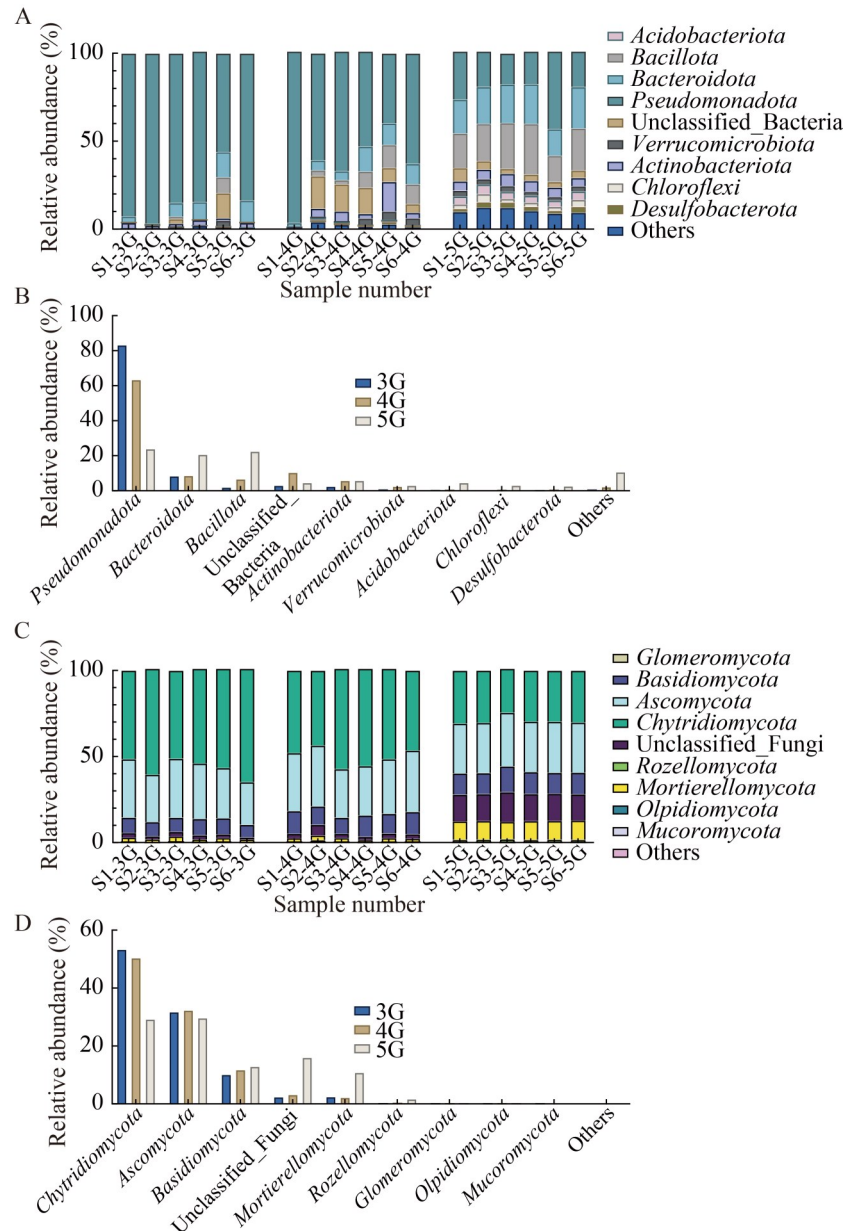


图4 驯化微生物菌群门水平组成。A: 3、4、5代驯化菌群中细菌群落门水平组成结构; B: 各代驯化群落中细菌门水平平均相对丰度变化; C: 3、4、5代驯化菌群中真菌群落门水平组成结构; D: 各代驯化群落中真菌门水平平均相对丰度变化。A、C图中微生物群落相对丰度为3个重复的平均值。3G: 2 000 mg/L 0#柴油; 4G: 5 000 mg/L 0#柴油; 5G: 7 000 mg/L 0#柴油。

Figure 4 Phylum-level composition of domesticated microbial consortia. A: The composition structure of bacterial communities at the phylum level in the 3rd, 4th, and 5th generation domesticated microbial consortia; B: Changes in average relative abundance of bacterial community phylum in each generation of domesticated microbial consortia; C: The composition structure of fungal communities at the phylum level in the 3rd, 4th, and 5th generation domesticated microbial consortia; D: Changes in average relative abundance of fungal community phylum in each generation of domesticated microbial consortia. The relative abundance of microbial communities in figures A and C is the average of three replicates. 3G: 2 000 mg/L 0# diesel; 4G: 5 000 mg/L 0# diesel; 5G: 7 000 mg/L 0# diesel.

(*Chytridiomycota*)、unclassified_Fungi、担子菌门(*Basidiomycota*)、被孢霉门(*Mortierellomycota*)，平均相对丰度分别为 29.6%、29.2%、15.9%、12.8% 和 10.7%，总计占比 98.2% (图 4D)。

与低浓度相比，高浓度驯化菌群中细菌的假单胞菌门(*Pseudomonadota*) (图 5A)和真菌的壶菌门(*Chytridiomycota*) (图 5B)平均相对丰度显著下降；而细菌的拟杆菌门(*Bacteroidota*) (图 5C)、芽孢杆菌门(*Bacillota*) (图 5D)，真菌的担子菌门(*Basidiomycota*) (图 5E)、unclassified_Fungi (图 5F)、被孢霉门(*Mortierellomycota*) (图 5G)平均相对丰度显著上升，子囊菌门(*Ascomycota*)变化不显著(图 5H)。这表明细菌的假单胞菌门(*Pseudomonadota*)和真菌的壶菌门(*Chytridiomycota*)对高浓度 0#柴油较为敏感，子

囊菌门(*Ascomycota*)对 0#柴油浓度变化不敏感，而拟杆菌门(*Bacteroidota*)、芽孢杆菌门(*Bacillota*)细菌，以及担子菌门(*Basidiomycota*)、unclassified_Fungi、被孢霉门(*Mortierellomycota*)真菌可能对高浓度 0#柴油具有较高的耐受性和更强的代谢能力。0#柴油浓度通过改变环境导致了细菌和真菌群落的重构，使 3、4、5 代驯化菌群的细菌和真菌群落显著区分。

2.3.2 不同浓度 0#柴油对驯化菌群属水平群落组成的影响

菌群驯化过程中，随着唯一碳源 0#柴油的浓度升高，细菌与真菌的某些属均表现出显著变化(图 6)。具体而言，细菌假单胞菌门中的不动杆菌属(*Acinetobacter*) (图 6A)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (图 6B)、食碱菌属(*Alcanivorax*)

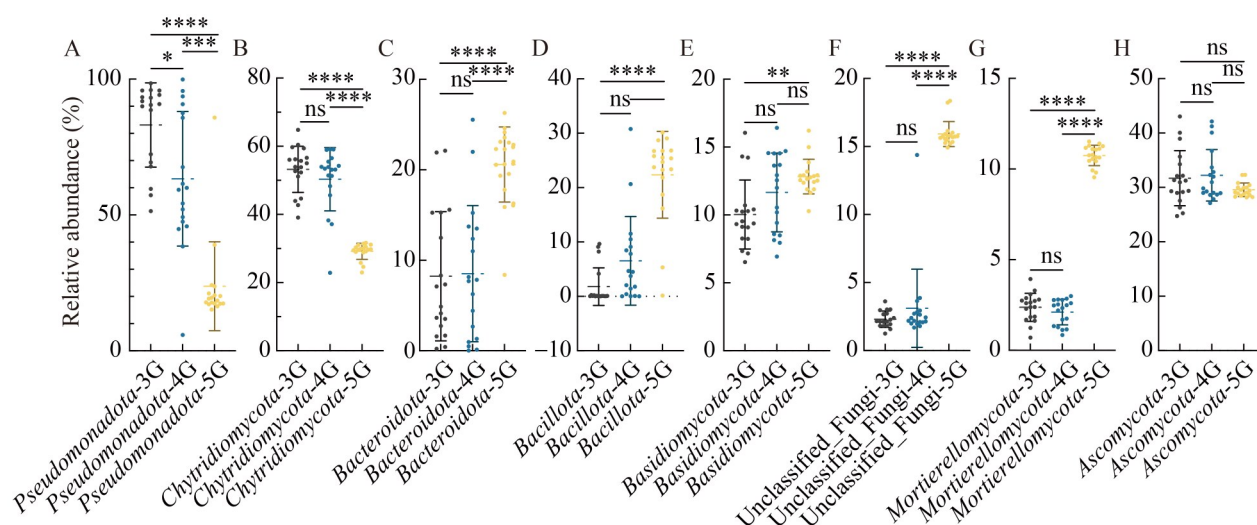


图5 不同浓度0#柴油压力下各代驯化菌群中细菌、真菌门水平平均相对丰度变化。A-H: 假单胞菌门、壶菌门、拟杆菌门、芽孢杆菌门、担子菌门、unclassified_Fungi、被孢霉门、子囊菌门在各代驯化微生物菌群中相对丰度差异性分析。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: 无显著性差异。3G: 2 000 mg/L 0#柴油; 4G: 5 000 mg/L 0#柴油; 5G: 7 000 mg/L 0#柴油。

Figure 5 Changes in average relative abundance of bacteria and fungi in each generation of domesticated microbial consortia under different concentrations of 0# diesel pressure. A-H: Analysis of relative abundance differences of *Pseudomonadota*, *Chytridiomycota*, *Bacteroidota*, *Bacillota*, *Basidiomycota*, unclassified_Fungi, *Mortierellomycota*, and *Ascomycota* in each generation of domesticated microbial consortia. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: Not significant. 3G: 2 000 mg/L 0# diesel; 4G: 5 000 mg/L 0# diesel; 5G: 7 000 mg/L 0# diesel.

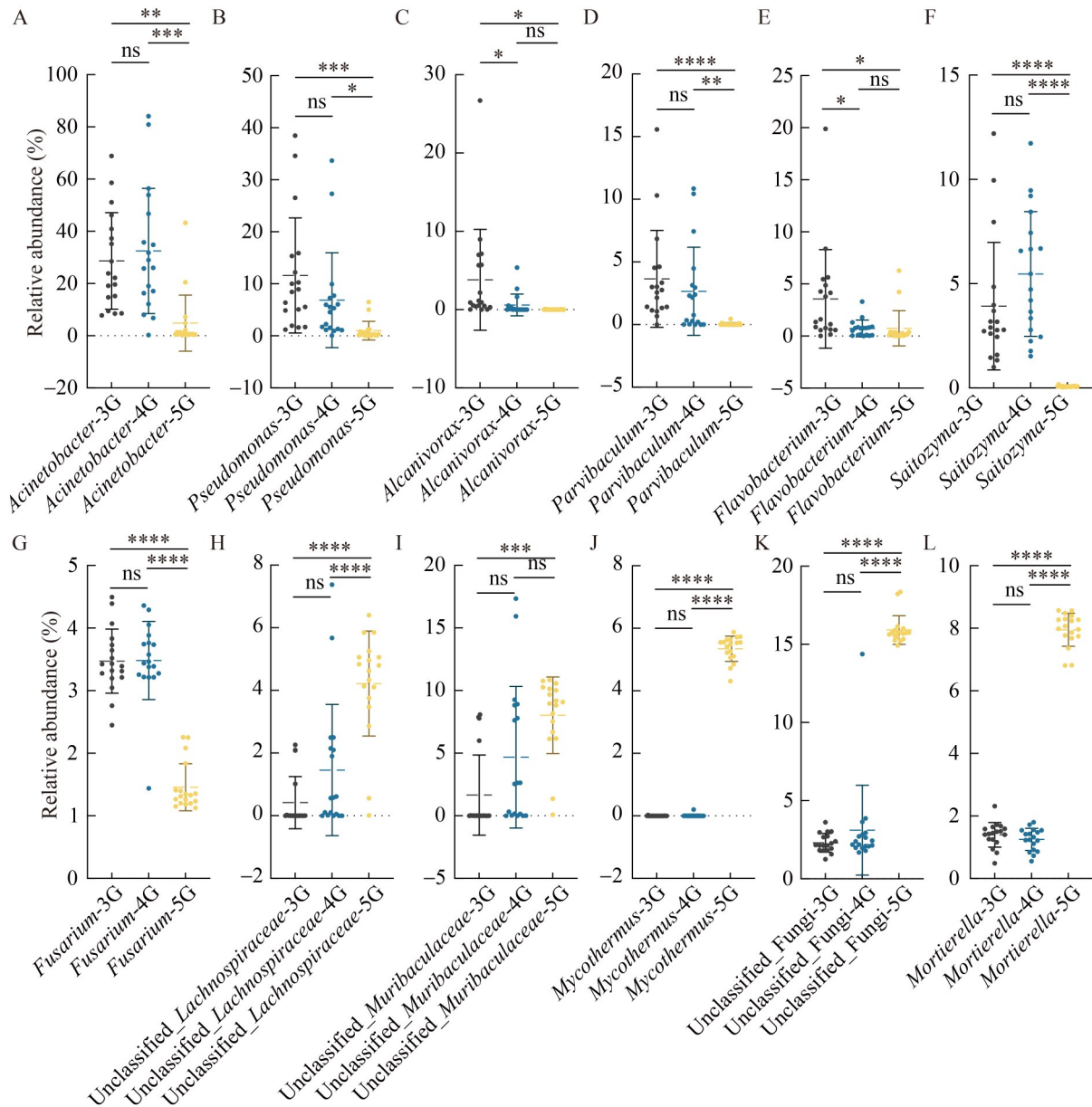


图6 各代驯化微生物菌群中部分细菌和真菌属

Figure 6 Changes in the average abundance of some bacteria and fungi at the genus level in each generation of domesticated microbial consortia. A – L: Analysis of the relative abundance differences of *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Parvibaculum*, *Flavobacterium*, unclassified *Lachnospiraceae*, unclassified *Muribaculaceae*, *Saitozyma*, *Fusarium*, *Mycothermus*, unclassified *Fungi* and *Mortierella* in each generation of domesticated microbial consortia. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: Not significant. 3G: 2 000 mg/L 0# diesel; 4G: 5 000 mg/L 0# diesel; 5G: 7 000 mg/L 0# diesel.

(图 6C)、小棒菌属(*Parvibaculum*) (图 6D)以及拟杆菌门中的黄杆菌属(*Flavobacterium*) (图 6E)的

平均相对丰度显著下降。真菌担子菌门中的原隐球菌属(*Saitozyma*) (图 6F)和子囊菌门中的镰

孢菌属(*Fusarium*) (图 6G)的平均相对丰度也显著下降。与此同时,芽孢杆菌门中的 *unclassified_Lachnospiraceae* (图 6H)和假单胞菌门中的 *unclassified_Muribaculaceae* (图 6I),子囊菌门中的 *Mycothermus* (图 6J)、*unclassified_Fungi* (图 6K)以及毛霉菌门中的孢霉属(*Mortierella*) (图 6L)的平均相对丰度显著上升。这表明 *unclassified_Lachnospiraceae*、*unclassified_Muribaculaceae* 细菌,以及 *Mycothermus*、*unclassified_Fungi*、孢霉属真菌可能对高浓度 TPH 具有较高的耐受性和更强的代谢能力。

2.4 菌株分离与鉴定结果

由于真菌的分离筛选易引发实验室污染,而细菌的分离和验证过程更为成熟和便捷,因此本研究仅针对细菌进行分离。通过稀释涂布和平板划线培养,在分离筛选培养基平板中从第 5 代驯化菌群的 6 个样品的 3 个重复共 18 个驯化菌群中,共分离获得 58 株细菌。从形态上观察,培养基中的菌落主要为圆形,颜色主要有绿色、白色、黄色和红色等。

对纯化成功的菌株进行 16S rRNA 基因的双向测序,并对获得的 16S rRNA 基因序列进行比对分析。58 株细菌的 16S rRNA 基因 GenBank 序列号为 PV571834–PV571891 (JGXF-1–JGXF-58),分属于 4 门 7 纲 13 目 22 科 25 属 50 个种。菌株主要分布在 4 个门,其中 31 株分属于假单胞菌门,占总数的 53.45%;放线菌门 13 株,占总数的 22.41%;芽孢杆菌门 11 株,占总数的 18.97%;拟杆菌门 3 株,占总数的 5.17% (表 2)。

为了探究这些菌株间的进化关系,采用 MEGA 11 软件,运用最大似然 (maximum likelihood, ML)法构建了系统发育树(图 7),揭示了它们的进化关系。

2.5 分离菌株生物信息学分析

分析微生物的功能基因对于了解分离菌株是否具有石油烃降解功能以及理解石油降解菌

株的代谢机制至关重要。研究石油烃污染物生物降解的一些重要基因包括 *ladA*、*alkB*、*almA*、*nagAaAbAcAd* 和 *tmoABCDE* 等^[29]。为了进一步了解分离菌株的功能基因情况,以分离菌株亲缘关系最近的模式菌或菌株基因组信息为参考,利用本地 BLAST 分析功能基因的赋存情况,从而进一步评估菌株的石油烃降解潜力。分析结果如图 8 所示,*ladA*、*alkB*、*almA* 基因在鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、农杆菌属(*Agrobacterium*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、豕村氏菌属(*Tsukamurella*)等属中广泛存在,这也与袁林杰等^[30]的综述中提到的降解石油烃微生物一致。

2.6 菌株功能验证

基于 2,6-二氯酚 (2,6-dichlorophenol indophenol, 2,6-DCPIP)氧化还原指示剂来验证 0#柴油的生物降解性已被广泛使用。大多数石油相关碳氢化合物很容易通过需氧微生物降解。Hanson 等^[31]首次将一种基于电子受体的筛选技术应用到该领域,通过在培养基中添加 2,6-DCPIP,利用其颜色变化从蓝色(氧化态)到无色(还原态),有效评估微生物对底物的利用效率。

2,6-DCPIP 实验表明,58 株菌中有 18 株菌具有良好的石油烃降解功能(图 9,表 3),其中有 9 株菌降解速率较快,分属于 *Pseudomonas*、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、*Acinetobacter*、*Gordonia*、*Tsukamurella*、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*Arthrobacter* 7 个属(图 9,表 3)。这 18 株菌可作为潜在的生物修复菌剂,然而其对 0#柴油中具体组分的利用及其在不同环境条件下对石油烃的降解能力还需在后续研究中进一步探讨。

表2 分离菌株最近菌或模式菌信息

Table 2 Information on the most similar type strain or strain of isolated bacteria

Strains	The most similar type strains or strains	GenBank accession number
JGXF-1	<i>Agrobacterium pusense</i> LMG 25623 ^T	GCA_900102105.1
JGXF-2	<i>Brevundimonas pondensis</i> LVF1 ^T	GCA_017487345.1
JGXF-3	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> JCM 13310 ^T	GCA_001431595.1
JGXF-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962 ^T	GCA_000615485.1
JGXF-5	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC 4720 ^T	GCA_011684035.1
JGXF-6	<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC 11568 ^T	GCA_000204035.1
JGXF-7	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 ^T	GCA_000026225.1
JGXF-8	<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i> DSM 44234 ^T	GCA_900104775.1
JGXF-9	<i>Tsukamurella conjunctivitis</i> HKU72 ^T	GCA_007858475.1
JGXF-10	<i>tenotrophomonas acidaminiphila</i> JCM 13310 ^T	GCA_001431595.1
JGXF-11	<i>Rhizobium rhizogenes</i> K599	GCA_016864595.1
JGXF-12	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 ^T	GCA_000026225.1
JGXF-13	<i>Brevibacillus nitrificans</i> DA2 ^T	GCA_003710965.1
JGXF-14	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13884 ^T	GCA_000163455.1
JGXF-15	<i>Agrobacterium divergens</i> R-31762 ^T	-
JGXF-16	<i>Bacillus licheniformis</i> SCDB 14	GCA_002074115.1
JGXF-17	<i>Gordonia amicalis</i> DSM 44461	GCA_012395955.1
JGXF-18	<i>Agrobacterium pusense</i> LMG 25623 ^T	GCF_900102105.1
JGXF-19	<i>Achromobacter veterisilvae</i> LMG 30378 ^T	GCA_900496975.1
JGXF-20	<i>Aeromicrobium tamense</i> SSW1-57 ^T	-
JGXF-21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962 ^T	GCA_000615485.1
JGXF-22	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i> FMP01 ^T	GCA_001682515.1
JGXF-23	<i>Flavobacterium alkalisolis</i> XS-5 ^T	GCA_008000935.1
JGXF-24	<i>Sphingobacterium puteale</i> M05W1-28 ^T	GCA_003627955.1
JGXF-25	<i>Microbacterium paraoxydans</i> NBRC 103076 ^T	GCA_001552495.1
JGXF-26	<i>Brevundimonas pondensis</i> LVF1 ^T	GCF_017487345.1
JGXF-27	<i>Brevundimonas intermedia</i> VKM B-1499 ^T	GCA_027922165.1
JGXF-28	<i>Enterobacter hormaechei</i> DSM 16687 ^T	GCA_001729705.1
JGXF-29	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> LMG 21614 ^T	GCA_900188285.1
JGXF-30	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCTC 12983 ^T	GCA_900444805.1
JGXF-31	<i>Sphingomonas echinoides</i> ATCC 14820 ^T	GCA_033842725.1
JGXF-32	<i>Bacillus polymyxa</i> ATCC 842	GCA_022811565.1
JGXF-33	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	GCA_006094495.1
JGXF-34	<i>Serratia marcescens</i> ELP1.10	GCA_030291735.1
JGXF-35	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	GCA_009035845.1
JGXF-36	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2	GCA_003568825.1
JGXF-37	<i>Achromobacter denitrificans</i> LMG 1231	GCA_902859715.1
JGXF-38	<i>Rhodococcus erythropolis</i> R138	GCA_000696675.2
JGXF-39	<i>Staphylococcus pasteurii</i> FDAARGOS_1069	GCA_016599795.1
JGXF-40	<i>Gordonia alkanivorans</i> NBRC 16433	GCA_000225505.1
JGXF-41	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i> JGXF-41	GCA_001682515.1
JGXF-42	<i>Brevibacillus nitrificans</i> DA2 ^T	GCA_003710965.1
JGXF-43	<i>Brevibacillus nitrificans</i> DA2 ^T	GCA_003710965.1
JGXF-44	<i>Bacillus licheniformis</i> SCDB 14	GCA_002074115.1
JGXF-45	<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i> DSM 44234 ^T	GCA_900104775.1
JGXF-46	<i>Gordonia amicalis</i> strain DSM 44461	GCA_012395955.1
JGXF-47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962 ^T	GCA_000615485.1
JGXF-48	<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i> DSM 44234 ^T	GCA_900104775.1
JGXF-49	<i>Alcanivorax dieselolei</i> CGMCC 1.3690	GCA_014644575.1
JGXF-50	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	GCA_034478925.1
JGXF-51	<i>Staphylococcus pasteurii</i> DSM 10656	GCA_003970495.1
JGXF-52	<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	GCA_958448115.1
JGXF-53	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	GCA_009035845.1
JGXF-54	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117	GCA_002849715.1
JGXF-55	<i>Bacillus polymyxa</i> ATCC 842	GCA_022811565.1
JGXF-56	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962 ^T	GCA_000615485.1
JGXF-57	<i>Rhodococcus qingshengii</i> CS98	GCA_015099595.1
JGXF-58	<i>Gordonia alkanivorans</i> NBRC 16433	GCA_000225505.1

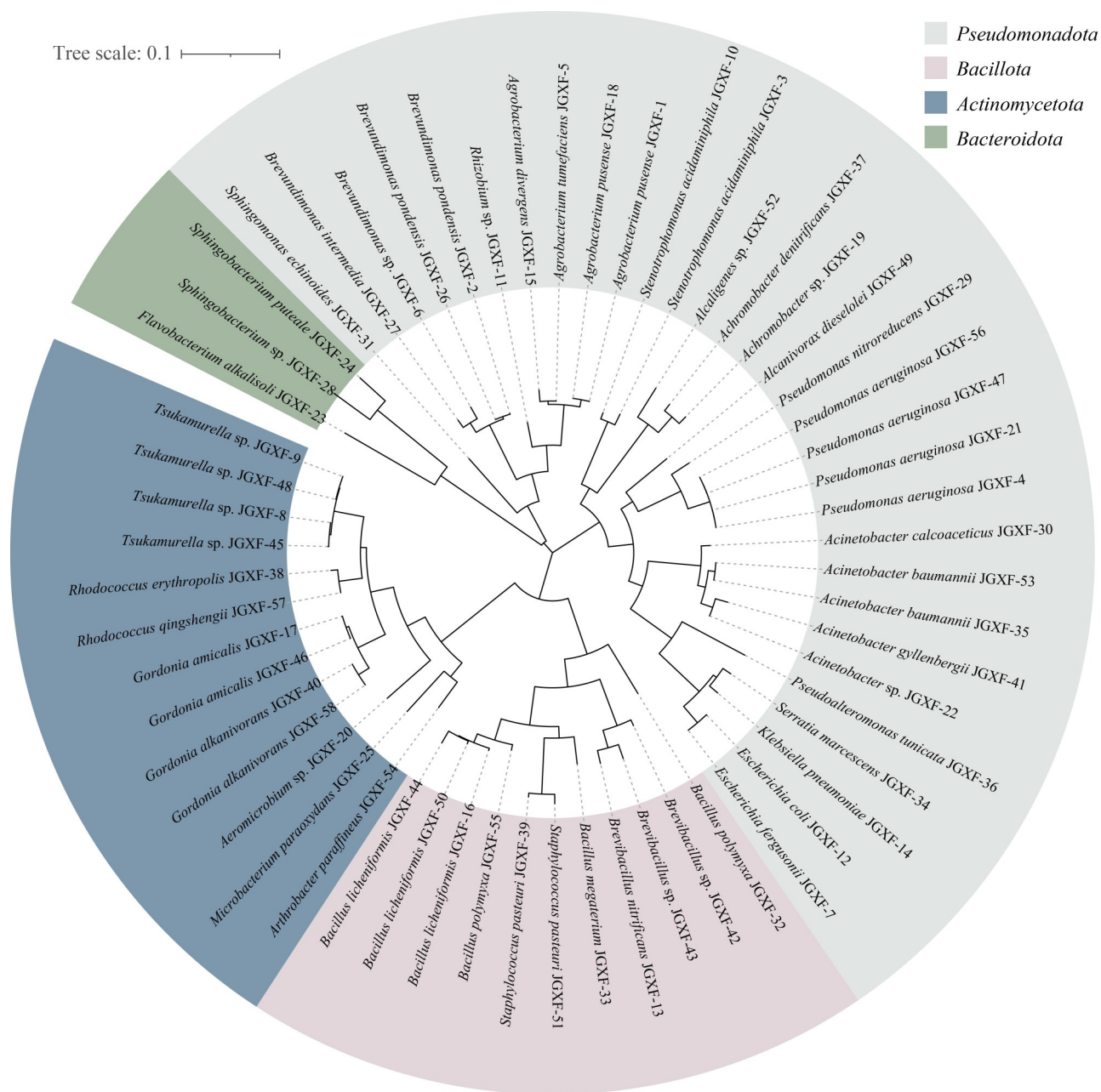


图7 第5代驯化菌群分离细菌基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree of bacteria isolated from the fifth generation of domesticated microbial consortia based on 16S rRNA gene sequences. The color range indicates the classification of the phylum level.

3 讨论

逐级驯化使微生物菌群对石油烃污染的适应和降解能力呈现出复杂且有序的变化。随着驯化代数的增加及石油烃浓度的逐步提升，微

生物群落结构发生显著改变，反映了微生物面对环境压力的适应性进化。在石油烃浓度升高的初期，微生物对石油烃的利用率先下降后上升，体现了菌群的适应过程(图 10)。在高浓度石油烃条件下，微生物可能通过水平基因转移获

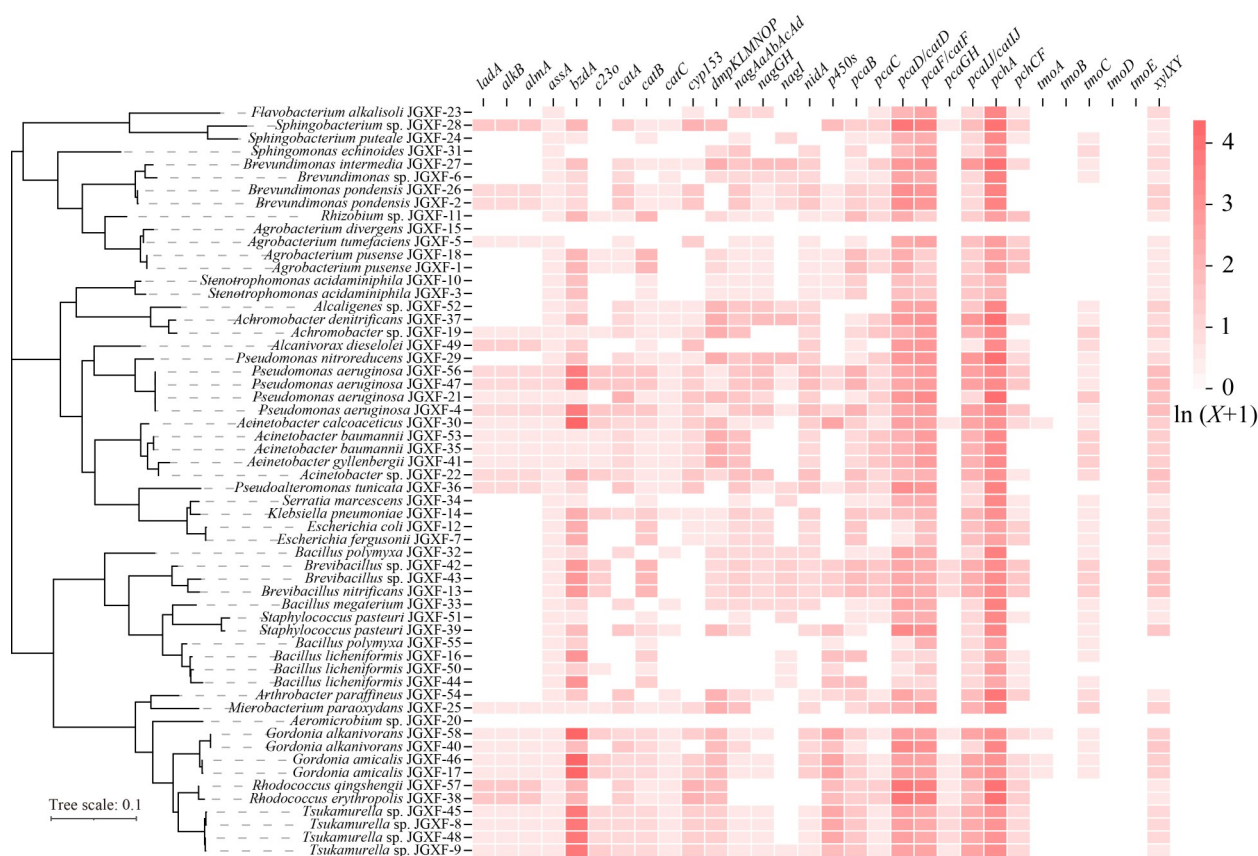


图8 分离菌株功能基因分析。红色方框表示存在对应基因， X 代表基因在基因组上的拷贝数，颜色渐变对应于 $\ln(X+1)$ 值。

Figure 8 Functional gene analysis of isolated strains. The red box indicates the existence of the corresponding gene, X represents the copy number of the gene on the genome, and the color gradient corresponds to the $\ln(X+1)$ value.

得高效降解基因，从而在高浓度石油烃环境中获得竞争优势^[32-33]。同时，微生物菌群内部存在协同作用，例如分泌表面活性剂以降低石油烃的表面张力，或产生生长因子和维生素以促进其他微生物的生长代谢，从而提高菌群的整体降解能力^[34-35]。逐级驯化还可能涉及微生物细胞膜结构和功能的改变，增强其对石油烃的耐受性和摄取能力，例如转运蛋白的适应性变化使得石油烃更容易被运输到细胞内进行降解^[36-37]。逐级驯化法为微生物菌群提供了一个逐步适应高浓度石油烃环境的过程，使其在生理、生化和生态层面进行调整和优化，从而实现对石油烃污染的高效降解。

通常情况下，随着 TPH 浓度的升高土壤细菌的操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)数量和 α 多样性会降低^[38-39]。研究表明石油烃浓度大于 565 mg/kg 会对微生物多样性产生抑制作用，属于高浓度污染^[40]。也有研究发现，石油烃浓度大于 20 000 mg/kg 会显著降低土壤微生物多样性，而在 4 000–20 000 mg/kg 之间时微生物多样性无显著变化，但浓度大于 20 000 mg/kg 时微生物多样性会显著降低^[41]。本研究发现在 2 000 mg/L 和 5 000 mg/L 0#柴油条件下，微生物群落的 α 多样性变化不显著，而在 7 000 mg/L 条件下显著高于前两组(图 3)。与以往研究结果存在差异，其原因可能包括：(1) 在高 TPH 浓度

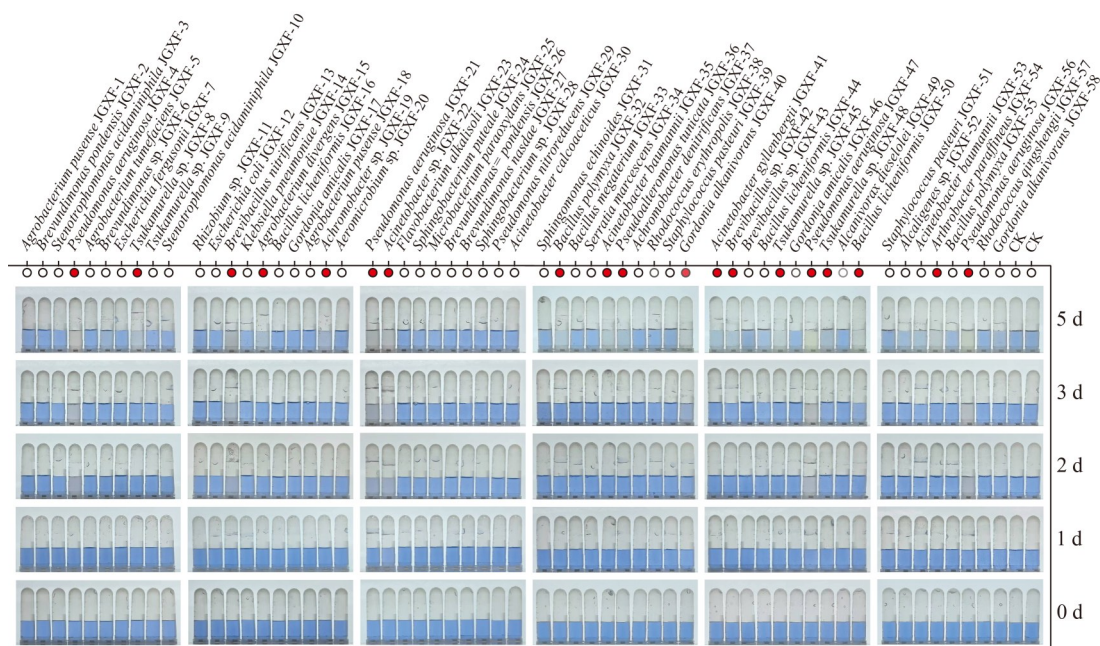


图9 分离菌株0#柴油降解功能定性分析
Figure 9 Qualitative analysis of the degradation function of 0# diesel by isolated strains. Red solid circle: The strains have the ability to degrade 0# diesel.

表3 潜在功能菌株降解石油烃潜力(以2,6-DCPIP褪色程度表征)

Table 3 The potential of potential functional strains to degrade petroleum hydrocarbons (characterized by the degree of 2,6-DCPIP fading)

Number	Strains	2,6-DCPIP fading degree
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JGXF-4	+++
2	<i>Tsukamurella</i> sp. JGXF-8	++
3	<i>Brevibacillus nitrificans</i> JGXF-13	+++
4	<i>Agrobacterium divergens</i> JGXF-15	+
5	<i>Achromobacter</i> sp. JGXF-19	+
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JGXF-21	+++
7	<i>Acinetobacter</i> sp. JGXF-22	+++
8	<i>Bacillus polymyxa</i> JGXF-32	+
9	<i>Acinetobacter baumannii</i> JGXF-35	++
10	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> JGXF-36	+
11	<i>Gordonia alkanivorans</i> JGXF-40	+++
12	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i> JGXF-41	+
13	<i>Brevibacillus</i> sp. JGXF-42	+
14	<i>Tsukamurella</i> sp. JGXF-45	+++
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JGXF-47	+++
16	<i>Tsukamurella</i> sp. JGXF-48	+
17	<i>Bacillus licheniformis</i> JGXF-50	+++
18	<i>Arthrobacter paraffineus</i> JGXF-54	+++

+++和橘色: 2,6-DCPIP完全褪色; ++和蓝色: 2,6-DCPIP褪色程度中等; +和绿色: 2,6-DCPIP褪色程度较低。
+++ and orange: 2,6-DCPIP is completely faded; ++ and blue: 2,6-DCPIP is moderately faded; + and green: 2,6-DCPIP is slightly faded.

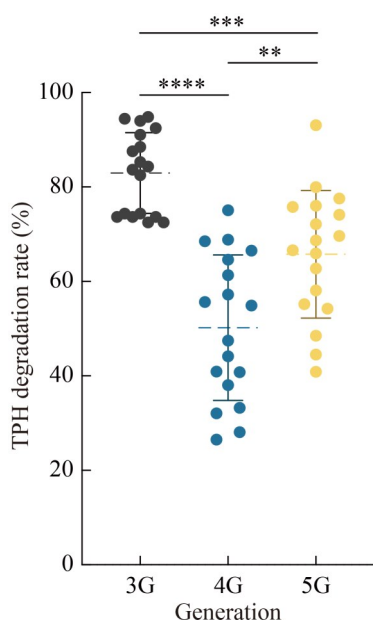


图10 不同浓度0#柴油条件下, 驯化菌群降解率差异性分析。**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ 。3G: 2 000 mg/L 0#柴油; 4G: 5 000 mg/L 0#柴油; 5G: 7 000 mg/L 0#柴油。
Figure 10 Analysis of the degradation rate differences of domesticated microbial consortia under different concentrations of 0# diesel. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$. 3G: 2 000 mg/L 0# diesel; 4G: 5 000 mg/L 0# diesel; 5G: 7 000 mg/L 0# diesel.

下, 微生物的协同作用更为显著^[42]。部分微生物能够将石油烃大分子分解为小分子, 为其他微生物提供营养, 从而促进多种微生物的生长, 使得一定范围内高浓度 TPH 条件下这种协同作用增强, 原先低相对丰度难以检测的微生物相对丰度升高, 导致微生物多样性升高。(2) 高 TPH 浓度可能改变了微生物群落的组装机制, 例如增强了生态位分化和物种共存的机会, 促进了微生物群落的水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT), 使得原本不具备烃类降解能力的微生物获得了代谢潜能, 其相对丰度提升导致微生物多样性升高^[43]。不同代际驯化菌群在不同浓度 0#柴油下的降解效果与群落结构密切相

关。拟杆菌门和芽孢杆菌门中的许多细菌是已知具有石油烃降解能力的优势菌^[44-45]。面对高浓度(5 000 mg/L 和 7 000 mg/L)的 0#柴油, 多数驯化群落(19/36)对石油烃仍保持较高的降解率(>60%), 表明在驯化过程中群落结构进一步调整和优化以适应高浓度石油烃环境的压力。优势降解群落的富集和群落结构的优化是高效降解石油烃的关键, 本研究验证了逐级驯化法的科学性和有效性, 为功能菌株的筛选和实际污染修复应用提供了理论和实践依据。

本研究通过逐步提高石油烃浓度模拟微生物的自然适应过程, 较好地平衡了群落多样性和降解效率。通过逐级驯化提高菌株的适应性, 同时保留了丰富的微生物多样性, 有利于群落面对不同环境和污染类型时展现出更强的适应性和协同降解能力。在功能菌株筛选方面, 采用改进后的 2,6-DCPIP 验证方法, 操作简便、快速高效。相比气相色谱法检测石油烃降解率筛选菌株, 该方法能够快速筛选出高效降解菌株且节约成本, 为大规模筛选提供了实用的技术手段。

然而本研究仍有一些需要进一步深入探讨的问题。(1) 研究报道了极端环境下高效降解石油烃的微生物菌株^[46-48], 而本研究主要集中在常温条件, 对微生物在不同环境条件下降解特性及适应机制的研究不足。后续研究将拓展至不同环境条件下, 系统研究微生物的降解特性及其适应机制。例如, 通过模拟高温、低温、高盐等极端环境, 分析微生物的生长曲线、降解效率和代谢产物的变化, 揭示其在不同环境下的适应策略。(2) 部分研究从基因层面分析了石油烃降解相关基因在群落中的分布和表达^[49], 而本研究虽涉及部分功能基因分析, 但在基因表达和调控机制方面的研究有限。后续研究需加强这一领域, 以深入理解群落降解石油烃的内在机制。(3) 本研究筛选出的 18 株具有石油烃降解功能的菌株, 尤其是降解速率较快的 9 株, 为开发生物修复菌剂提供了潜在候选菌株, 但

在实验室优化和扩大培养方面的研究不足。后续研究将加强对这些功能菌株的实验室优化和扩大培养研究。通过优化培养条件(如碳氮比、pH 值、温度等),提高菌株的降解效率和稳定性,并进一步用于石油烃污染土壤和水体的修复。

4 结论

本研究采用逐级驯化法,通过逐步提高 0#柴油浓度定向驯化了高效石油烃降解微生物菌群,并筛选出具有石油烃降解功能的菌株。逐级驯化过程显著提高了微生物菌群对石油烃的降解能力,7/18 的第 5 代驯化菌群在 7 000 mg/L 的 0#柴油中 7 d 内 TPH 降解率超过 70%,表明该方法能有效富集石油烃降解功能菌株。

微生物群落分析显示,在驯化过程中随着 0#柴油浓度的升高,微生物群落结构发生显著变化。在高浓度石油烃的影响下,拟杆菌门和芽孢杆菌门等降解功能菌门的相对丰度增加,表明这些微生物对高浓度 TPH 具有更高的耐受性和代谢能力。同时,真菌群落中壶菌门和担子菌门的相对丰度显著上升,进一步证实了微生物群落演替与石油烃降解功能增强密切相关。

本研究通过稀释涂布和平板划线法从第 5 代驯化菌群中分离出 58 株细菌。基于 16S rRNA 基因序列分析发现,这些菌株分属 4 门 7 纲 13 目 22 科 25 属。结合 2,6-DCPIP 验证实验,筛选出 18 株功能菌株,主要分属于假单胞菌属、不动杆菌属、戈登氏菌属和豕村氏菌属等,显示出较高的石油烃降解潜力,其中 9 株菌降解速率较快,可作为潜在的生物修复菌剂。

本研究揭示了逐级驯化中微生物群落的演替规律及其对石油烃降解能力的影响。逐级驯化法模拟了微生物对污染物的自然适应过程,加速了群落的进化,提高了其对高浓度石油烃的降解效率,为石油烃污染场地的生物修复提供了理论依据和技术支持。

作者贡献声明

独学渊:方法论,数据收集与监管,数据分析,获取基金,撰写文章;李书鹏:项目监管,实验设计,获取基金;邱景琮:样品采集,文章审阅;郭丽莉:项目监管;常慧:文章编辑、审阅;李嘉晨:参与论文讨论;张冉:项目管理;李丽杰:文章审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] VARJANI SJ, UPASANI VN. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 222: 195-201.
- [2] KOSHLAF E, BALL AS. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments[J]. *AIMS Microbiology*, 2017, 3(1): 25-49.
- [3] MECKENSTOCK RU, BOLL M, MOUTTAKI H, KOELSCHBACH JS, CUNHA TAROUCO P, WEYRAUCH P, DONG XY, HIMMELBERG AM. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(1/2/3): 92-118.
- [4] PAYA PA, RODRIGUEZ EN. Status of local soil contamination in Europe: revision of the indicator “progress in the management contaminated sites in Europe”[EB/OL]. [2021-12-31]. <https://www.eea.europa.eu/en/analysis/indicators/progress-in-the-management-of-activeAccordion>.
- [5] HENTATI O, LACHHAB R, AYADI M, KSIBI M. Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2013, 185(4): 2989-2998.
- [6] 彭树青, 李婧, 韩璐, 张文影, 陈梦舫, 陈雪艳, 谷涵远, 周源, 候少林. 我国石油炼化行业特征污染物及其健康风险分析[J]. *环境工程学报*, 2024, 18(11): 3071-3080. PENG SQ, LI J, HAN L, ZHANG WY, CHEN MF, CHEN XY, GU HY, ZHOU Y, HOU SL. Analysis of characteristic pollutants and health risks in the petroleum refining industry in China[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2024, 18(11): 3071-3080 (in Chinese).
- [7] GAUR N, FLORA G, YADAV M, TIWARI A. A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals[J]. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2014, 16(2): 180-193.
- [8] KRUPIŃSKA I. Impact of the oxidant type on the

- efficiency of the oxidation and removal of iron compounds from groundwater containing humic substances[J]. *Molecules*, 2020, 25(15): 3380.
- [9] KUPPAN N, PADMAN M, MAHADEVA M, SRINIVASAN S, DEVARAJAN R. A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: eco friendly solutions for waste and pollution management[J]. *Waste Management Bulletin*, 2024, 2(3): 154-171.
- [10] ABTAHI H, PARHAMFAR M, SAEEDI R, VILLASEÑOR J, SARTAJ M, KUMAR V, COULON F, PARHAMFAR M, DIDEHDAR M, SEIFI H, KOOLIVAND A. Effect of competition between petroleum-degrading bacteria and indigenous compost microorganisms on the efficiency of petroleum sludge bioremediation: field application of mineral-based culture in the composting process[J]. *Journal of Environmental Management*, 2020, 258: 110013.
- [11] ABBASIAN F, LOCKINGTON R, MALLAVARAPU M, NAIDU R. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(3): 670-699.
- [12] HEAD IM, JONES DM, RÖLING WFM. Marine microorganisms make a meal of oil[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(3): 173-182.
- [13] HU FH, WANG PL, LI YH, LING JH, RUAN YQ, YU JJ, ZHANG LH. Bioremediation of environmental organic pollutants by *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms, methods and challenges[J]. *Environmental Research*, 2023, 239: 117211.
- [14] SILVA IA, ALMEIDA FCG, SOUZA TC, BEZERRA KGO, DURVAL IJB, CONVERTI A, SARUBBO LA. Oil spills: impacts and perspectives of treatment technologies with focus on the use of green surfactants[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2022, 194(3): 143.
- [15] BRAGG JR, PRINCE RC, HARNER EJ, ATLAS RM. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill[J]. *Nature*, 1994, 368(6470): 413-418.
- [16] 钟磊, 卿晋武, 陈红云, 栗高源, 陈冠益, 孙于茹, 李金磊, 宋英今, 颜蓓蓓. 微生物修复石油烃土壤污染技术研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3636-3652.
- ZHONG L, QING JW, CHEN HY, LI GY, CHEN GY, SUN YR, LI JL, SONG YJ, YAN BB. Advances in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(10): 3636-3652 (in Chinese).
- [17] 姚贞先, 王丽萍, 李丹, 李亚平, 何士龙, 赵雅琴. 高效石油降解菌修复石油污染土壤与强化机制分析[J]. *环境科学*, 2023, 44(8): 4599-4610.
- YAO ZX, WANG LP, LI D, LI YP, HE SL, ZHAO YQ. Remediation of petroleum-contaminated soil by highly efficient oil-degrading bacteria and analysis of its enhancement mechanism[J]. *Environmental Science*, 2023, 44(8): 4599-4610 (in Chinese).
- [18] REASONER DJ, GELDREICH EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(1): 1-7.
- [19] 姬乔娜, 高小红, 付敏. 气相色谱-质谱测定0#柴油成分及含量的研究[J]. *广州化工*, 2015, 43(24): 135-136, 178.
- JI QN, GAO XH, FU M. Determination of 0# diesel oil by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2015, 43(24): 135-136, 178 (in Chinese).
- [20] DU XY, LIU N, YAN BF, LI YS, LIU MH, HUANG Y. Proximity-based defensive mutualism between *Streptomyces* and *Mesorhizobium* by sharing and sequestering iron[J]. *The ISME Journal*, 2024, 18(1): wrad041.
- [21] KLINDWORTH A, PRUESSE E, SCHWEER T, PEPLIES J, QUAST C, HORN M, GLÖCKNER FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1): e1.
- [22] HUANG RL, CROWTHER TW, SUI YY, SUN B, LIANG YT. High stability and metabolic capacity of bacterial community promote the rapid reduction of easily decomposing carbon in soil[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 1376.
- [23] FRANK JA, REICH CI, SHARMA S, WEISBAUM JS, WILSON BA, OLSEN GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2461-2470.
- [24] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [25] HUELSENBECK JP, CRANDALL KA. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood[J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1997, 28: 437-466.
- [26] NEI M, KUMAR S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*[M]. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- [27] ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG JH, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [28] KUBOTA K, KOMA D, MATSUMIYA Y, CHUNG SY, KUBO M. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay[J]. *Biodegradation*, 2008, 19(5): 749-757.
- [29] XU CY, QARIA MA, XU Q, ZHU DC. The role of microorganisms in petroleum degradation: current development and prospects[J]. *Science of The Total Environment*, 2023, 865: 161112.
- [30] 袁林杰, 彭凡, 申泰铭, 解庆林. 石油降解菌的研究进展[J]. *生命科学*, 2019, 31(10): 1088-1097.
- YUAN LJ, PENG P, SHEN TM, XIE QL. Review on petroleum hydrocarbon-degrading microbes[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2019, 31(10): 1088-1097 (in Chinese).
- [31] HANSON KG, DESAI JD, DESAI AJ. A rapid and simple screening technique for potential crude oil

- degrading microorganisms[J]. *Biotechnology Techniques*, 1993, 7(10): 745-748.
- [32] HABE H, OMORI T. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, 67(2): 225-243.
- [33] PHALE PS, SHAH BA, MALHOTRA H. Variability in assembly of degradation operons for naphthalene and its derivative, carbaryl, suggests mobilization through horizontal gene transfer[J]. *Genes*, 2019, 10(8): 569.
- [34] MILLER RM, BARTHA R. Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(2): 269-274.
- [35] PANDOLFO E, BARRA CARACCILO A, ROLANDO L. Recent advances in bacterial degradation of hydrocarbons[J]. *Water*, 2023, 15(2): 375.
- [36] ZHOU YM, WANG Y, YAO SD, ZHAO XY, KONG Q, CUI LH, ZHANG HX. Driving mechanisms for the adaptation and degradation of petroleum hydrocarbons by native microbiota from seas prone to oil spills[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 476: 135060.
- [37] HUA F, WANG HQ. Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2014, 28(2): 165-175.
- [38] KIM JW, HONG YK, KIM HS, OH EJ, PARK YH, KIM SC. Metagenomic analysis for evaluating change in bacterial diversity in TPH-contaminated soil after soil remediation[J]. *Toxics*, 2021, 9(12): 319.
- [39] FENG XK, LIU Z, JIA XQ, LU WY. Distribution of bacterial communities in petroleum-contaminated soils from the dagang oilfield, China[J]. *Transactions of Tianjin University*, 2020, 26(1): 22-32.
- [40] SUTTON NB, MAPHOSA F, MORILLO JA, ABU ALSOUD W, LANGENHOFF AAM, GROTEHUIS T, RIJNAARTS HHM, SMIDT H. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(2): 619-630.
- [41] GAO H, WU ML, LIU H, XU YR, LIU ZL. Effect of petroleum hydrocarbon pollution levels on the soil microecosystem and ecological function[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 293: 118511.
- [42] CHEN HY, YIN C, SU F, HE JC, WU SL, JIANG MH, GAO HF, LI C. Effective treatment and biodegradation mechanism analysis of petroleum hydrocarbon wastewater by immobilized *Ochrobactrum* sp. WY-4 on iron-modified biochar[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2024, 235(12): 769.
- [43] XUE WZ, HONG JK, WANG T. The evolutionary landscape of prokaryotic chromosome/plasmid balance[J]. *Communications Biology*, 2024, 7: 1434.
- [44] KWON K, KWON YM, KIM SJ. Aerobic hydrocarbon-degrading bacteroidetes[M]//*Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*. Cham: Springer International Publishing, 2019: 73-91.
- [45] KAIDA N, HABIB S, YASID NA, SHUKOR MY. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by *Bacillus* spp.: a review[J]. *Bioremediation Science and Technology Research*, 2018, 6(2): 14-21.
- [46] RAJKUMARI J, BHUYAN B, DAS N, PANDEY P. Environmental applications of microbial extremophiles in the degradation of petroleum hydrocarbons in extreme environments[J]. *Environmental Sustainability*, 2019, 2(3): 311-328.
- [47] AHMAD ROSLEE AF, ZAKARIA NN, CONVEY P, ZULKHARNAIN A, LEE GLY, GOMEZ-FUENTES C, AHMAD SA. Statistical optimisation of growth conditions and diesel degradation by the Antarctic bacterium, *Rhodococcus* sp. strain AQ5-07[J]. *Extremophiles*, 2020, 24(2): 277-291.
- [48] TENG TT, LIANG JD, ZHANG M, WU ZJ, HUO X. Biodegradation of crude oil under low temperature by mixed culture isolated from alpine meadow soil[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2021, 232(3): 102.
- [49] REN L, ZHANG J, GENG B, ZHAO J, JIA WJ, CHENG LR. Ecological shifts and functional adaptations of soil microbial communities under petroleum hydrocarbon contamination[J]. *Water*, 2025, 17(8): 1216.