

红球菌属(*Rhodococcus* sp.) OS62 与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) P35 协同修复石油污染土壤

郭一丹^{1,2}, 姜影影^{1,2}, 马雨曦^{1,2}, 邓振山^{1,2}, 贺晓龙^{1,2}, 柳晓东^{1,2*}

1 延安大学 生命科学学院, 陕西省黄土高原资源植物研究与利用重点实验室, 陕西 延安

2 延安大学 生命科学学院, 微生物资源开发与绿色循环利用陕西省高校工程研究中心, 陕西 延安

郭一丹, 姜影影, 马雨曦, 邓振山, 贺晓龙, 柳晓东. 红球菌属(*Rhodococcus* sp.) OS62 与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) P35 协同修复石油污染土壤[J]. 微生物学报, 2026, 66(6): 2775-2790.

GUO Yidan, JIANG Yingying, MA Yuxi, DENG Zhenshan, HE Xiaolong, LIU Xiaodong. Synergistic remediation of petroleum-contaminated soil by *Rhodococcus* sp. OS62 and *Pseudomonas* sp. P35[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(6): 2775-2790.

摘要: 【目的】探究红球菌属(*Rhodococcus* sp.) OS62 与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) P35 协同高效修复石油污染土壤的调控效应。【方法】运用高通量测序技术测定石油污染土壤修复过程中细菌群落结构及多样性; 采用冗余分析、非度量多维尺度分析、Mantel 检验分析及分子生态网络分析评估修复过程中土壤微生物群落结构变化, 以及石油降解效率与土壤理化因子、土壤酶活和细菌群落组成之间的相关性。【结果】添加复合菌群可显著提高土壤脱氢酶、脂肪酶、多酚氧化酶和过氧化氢酶的活性及石油污染修复效率, 且其修复效果优于单独添加石油降解能力强的菌株 *Rhodococcus* sp. OS62 和石油降解能力较弱的菌株 *Pseudomonas* sp. P35。相关性分析表明土壤石油残留量与土壤总氮、硝态氮含量呈正相关, 与土壤酶活性和亚硝态氮含量呈负相关。单独添加菌株 OS62 和菌株 P35 对土壤 α 多样性和分子生态网络的影响较小; 二者对细菌群落结构差异的贡献较大。在不同处理下, 类诺卡氏菌属(*Nocardioide*s) 均占据主导地位, 且在分子生态网络中为关键节点, 但 Mantel 检验分析表明其与土壤残留石油含量的相关性较弱。【结论】本研究表明, 石油降解能力较弱的菌株 *Pseudomonas* sp. P35 能够协同石油降解能力优良的菌株 *Rhodococcus* sp. OS62 增强土壤酶活性, 提高石油污染土壤修复效率, 为优化微生物菌群在石油污染土壤生物修复中的应用提供了理论依据与实践参考。

关键词: 红球菌属; 协同修复; 分子生态网络分析; 石油污染; 相关性分析

资助项目: 国家自然科学基金(42207037)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42207037).

*Corresponding author. E-mail: lxd@yau.edu.cn

Received: 2025-10-25; Accepted: 2026-01-14; Published online: 2026-01-21

Synergistic remediation of petroleum-contaminated soil by *Rhodococcus* sp. OS62 and *Pseudomonas* sp. P35

GUO Yidan^{1,2}, JIANG Yingying^{1,2}, MA Yuxi^{1,2}, DENG Zhenshan^{1,2}, HE Xiaolong^{1,2}, LIU Xiaodong^{1,2*}

1 Shaanxi Key Laboratory of Research and Utilization of Resource Plants on the Loess Plateau, College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi, China

2 Engineering Research Center of Microbial Resources Development and Green Recycling, University of Shaanxi Province, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi, China

Abstract: [Objective] To explore the regulatory effect of the synergistic and efficient remediation of petroleum-contaminated soil by *Rhodococcus* sp. OS62 and *Pseudomonas* sp. P35. **[Methods]** High-throughput sequencing was employed to determine the bacterial community structure and diversity during the remediation of petroleum-contaminated soil. Redundancy analysis, non-metric multidimensional scale analysis, Mantel test, and molecular ecological network analysis were performed to evaluate the changes of the soil microbial community structure and the correlations of petroleum degradation efficiency with soil physicochemical factors, soil enzyme activities, and bacterial community structure during the remediation process. **[Results]** The addition of the bacterial consortium significantly increased the activities of soil dehydrogenase, lipase, polyphenol oxidase, and catalase and the remediation efficiency, and its remediation effect was better than that of strain OS62 with excellent petroleum degradation ability or strain P35 with weak petroleum degradation ability. Correlation analysis showed that soil petroleum residue was positively correlated with soil total nitrogen and nitrate nitrogen content and negatively correlated with soil enzyme activities and nitrite nitrogen content. The addition of *Rhodococcus* sp. OS62 or *Pseudomonas* sp. P35 had mild influences on soil microbial alpha diversity and molecular ecological network. Both strains had great contributions to the differences of bacterial community structure. Under different treatments, *Nocardioides* occupied a dominant position and were hub nodes in the molecular ecological network, while Mantel test showed that *Nocardioides* had a weak correlation with soil petroleum residue. **[Conclusion]** This study clarified that *Pseudomonas* sp. P35 with weak petroleum degradation ability could cooperate with *Rhodococcus* sp. OS62 with high petroleum degradation ability to enhance soil enzyme activities and improve the remediation efficiency of petroleum-contaminated soil. It provides a theoretical basis and practical reference for optimizing the application of bacteria consortium in bioremediation of petroleum-contaminated soil. **Keywords:** *Rhodococcus*; synergistic remediation; molecular ecological network analysis; petroleum contamination; correlation analysis

石油作为一种重要的能源及化工原料，在社会生产发展中发挥着重要作用。随着社会发展，对石油的需求与日俱增。在石油开采、加工、运输及冶炼等过程中难免会有石油渗漏

到环境中造成严重的环境污染^[1]。泄漏的石油不仅会在土壤中累积并迁移，而且其中部分组分会随着地表径流、渗流、淋溶等作用扩散到深层土壤及地下水中，导致深层土壤及地下水受

到污染;此外,石油污染物会破坏土壤的理化性质与肥力特性,其中多环芳烃等有毒物质还会随着食物链逐级富集,最终影响人类健康^[2]。由于石油的开采运输及其各种加工产物(如汽油、柴油、润滑油等)在世界各地广泛运用,石油污染已成为备受关注的全球性环境问题。石油具有组分复杂(主要由烷烃、芳烃、蜡质及沥青质构成)、黏稠疏水等特性,其自然降解速率较慢。石油污染修复方法主要包括物理、化学及生物法。其中物理、化学法具有修复时间短、处理污染物浓度范围广、受环境影响小等优势,但在修复过程中需要专业设备、费用较高且容易产生二次污染;而生物法具有经济简便、绿色环保等优势,因此备受青睐^[3]。生物修复法主要包括微生物修复、植物修复及微生物-植物联合修复。其中,微生物作为自然界中重要的分解者,在石油污染生物修复中发挥着重要作用^[4]。在微生物-植物联合修复过程中,植物根系为微生物提供适宜的微环境,进而促进微生物对石油污染物的降解能力^[5]。同时,植物根系的生长也能促进石油降解微生物在土壤中的迁移扩散,增加微生物与石油污染物的接触机会,提高微生物的石油降解效率^[6]。为了更好地运用微生物进行石油污染修复,科研人员已成功分离筛选出大量具有石油降解能力的微生物菌株,并对其降解机制展开了系统研究^[7-8]。

单一微生物容易受不良环境影响,导致石油污染修复效率受限,而由多种微生物构成的菌群可以通过代谢物交换、功能互补等方式,一方面提高菌群对不良环境的耐受能力,另一方面有效促进修复效率的提升^[9]。相关研究发现,石油降解真菌赛多孢子菌属(*Scedosporium* sp.) ZYY 在摇瓶试验中 7 d 内石油降解率为 23.36%,当其与产生物表面活性剂的不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) Y2 构成复合菌群后,7 d 石油降解率能够提升至 58.61%,降解效率较单一菌株提高了 1.5 倍^[10]。此外,由迪茨氏菌属(*Dietzia* sp.) CN-3 和 *Acinetobacter* sp. HC8-3S 构

成的复合菌群,不仅对烷烃、环烷烃及芳烃的降解能力高于单一菌株,而且其在高盐胁迫条件下(120 g/L NaCl)的石油降解效率也显著高于单一菌株^[11]。

本课题组前期从石油污染土壤中分离得到一株石油降解能力优良的红球菌(*Rhodococcus* sp.) OS62 及一株石油降解能力微弱的假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) P35,摇瓶试验结果表明,二者组合构成的复合菌群对石油的降解能力比单一菌株显著提高^[12]。值得注意的是,在石油污染土壤中碳源与氮源的比例严重失调,导致污染土壤中氮素含量匮乏,成为限制生物修复的一个重要因素^[13]。为了探究复合菌群及营养元素(氮素)在石油污染土壤修复中的调控效应,本研究使用硝态氮作为外源氮源,分别设置单一菌株(OS62、P35)及复合菌群处理组,对石油污染土壤进行为期 25 d 的模拟修复实验,通过对修复过程中土壤理化性质、土壤酶活及土壤微生物群落结构与多样性进行测定,旨在初步阐明 *Rhodococcus* sp. OS62 与 *Pseudomonas* sp. P35 协同修复石油污染土壤的调控效应,为优化石油污染土壤生物修复技术提供理论依据与实践参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及紫花苜蓿草种

Rhodococcus sp. OS62 及 *Pseudomonas* sp. P35 这 2 株菌为课题组前期从石油污染土壤中分离得到。菌株使用体积分数为 20% 的甘油保藏于 -80 °C 冰箱,使用 PYG 培养基于 25 °C 培养箱活化备用。

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)草种由延安大学生命科学学院植物生态学实验室提供。

1.2 培养基

PYG 培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母粉 0.2, 葡萄糖 5.0, 牛肉膏 3.0, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 1.5, pH 7.0; 配制固体培养基时需要加入 15.0 g/L 琼

脂粉, 121 °C 灭菌 15 min 后使用。

1.3 菌群构建

将活化好的菌株 OS62 及 P35 分别接种到 PYG 液体培养基中, 25 °C、180 r/min 培养 5 d 后, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。使用适量无菌水重悬菌体后再次离心收集, 重复 2 次, 以去除菌体表面营养物质, 然后将菌体重悬于无菌水中, 并调节 $OD_{600}=1.0$ 。将制备好的菌株 OS62 和 P35 菌悬液等比例混合, 作为后续修复用菌群悬液。

1.4 土壤样品采集及石油污染土壤制备

土壤样品采集自陕西省延安市宝塔区周边的未污染农田土壤, 土壤自然风干后过 20 目筛, 作为初始土壤(CK)。将适量石油溶于石油醚中配制成石油溶液, 与土壤混匀后摊布于不锈钢盘上, 置于通风橱中静置。石油醚挥发后获得初始石油污染土壤(理论石油浓度为 5 000 mg/kg)。由于 *Rhodococcus* sp. OS62 以硝态氮为唯一氮源时的石油降解效高于以铵态氮为唯一氮源, 因此选用硝酸钾作为外加氮源。初始石油污染土壤添加适量硝酸钾溶液后混匀, 使硝态氮含量为 500 mg/kg, 作为后续修复用石油污染土壤(CS)。初始土壤与修复用石油污染土壤的理化性质(有机质、溶解性有机碳、铵态氮、硝态氮、总氮、电导率、总碳)由陕西佰瑞思生物科技有限公司进行测定; 土壤石油含量测定方法参照文献[14]进行。初始土壤及石油污染土壤的理化性质及石油含量见表 1。

1.5 模拟修复试验设计

取 16 个花盆, 每盆装入石油污染土壤 1 kg, 并种植 5 株紫花苜蓿, 加入适量蒸馏水使含水量维持在 15% 左右。取 4 盆石油污染土壤, 每盆均匀加入 $OD_{600}=1.0$ 的 OS62 菌悬液 10 mL, 编号为 RT; 再取 4 盆, 每盆均匀加入 $OD_{600}=1.0$ 的 P35 菌悬液 10 mL, 编号为 PT; 再取 4 盆, 均匀加入复合菌群菌悬液 10 mL, 编号为 MT; 剩余 4 盆不添加菌剂, 作为对照, 编号为 PCS。

表1 初始土壤及修复用石油污染土壤理化性质

Table 1 Physicochemical properties of initial soil and petroleum contaminated soil for remediation

Indices	CK	CS
Organic matter/(g/kg)	2.57±0.18	7.62±0.80
Dissolved organic carbon/(mg/kg)	10.48±1.79	50.00±5.51
NH ₃ ⁺ -N/(mg/kg)	1.93±0.59	2.09±0.22
NO ₃ ⁻ -N/(mg/kg)	4.18±0.15	596.23±56.41
Electric conductivity/(μs/cm)	113.83±4.29	650.00±36.51
Total nitrogen/(g/kg)	0.16±0.01	0.68±0.06
Total carbon/(g/kg)	12.07±0.17	17.90±0.62
Oil content/(mg/kg)	46.86±4.93	5 382.25±146.31

将所有花盆置于室内组培架上进行模拟修复, 根据花盆质量变化进行适量补水, 使土壤含水量维持在 15% 左右。分别在第 10 天(编号为 RT10、PT10、MT10、PCS10)、第 20 天(编号为 RT20、PT20、MT20、PCS20)和第 25 天(编号为 RT25、PT25、MT25、PCS25)取适量土壤, 用于土壤理化性质、土壤酶活及微生物群落结构测定。

每个样品均采集 5 个重复, 按照各指标测定的需求称取一定质量土壤样品进行保藏, 待试验结束后统一进行测定。土壤理化性质由陕西佰瑞思生物科技有限公司进行测定。土壤总碳与总氮使用 FlashSMART 元素分析仪(ThermoFisher Scientific 公司)进行分析; 土壤有机质使用重铬酸钾-浓硫酸外加热法进行测定, 滴定仪器为 Titrette 滴定仪(Brand 公司); 铵态氮、硝态氮和亚硝态氮使用氯化钾浸提法提取后, 使用 Auto Analyzer 3 (SEAL 公司)进行测定。土壤石油含量测定方法参照文献[14]进行。土壤酶活使用试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)按照说明书进行测定, 包括土壤过氧化氢酶、脱氢酶、多酚氧化酶(BC0110)和脂肪酶。

1.6 高通量测序

土壤 DNA 提取、检测、PCR 扩增、文库构建均由北京百迈客生物科技有限公司进行。采用 16S rRNA 基因 V3-V4 区引物 338F (5'-ACT

CCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R (5'-GGAC TACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增建库。使用 Illumina NovaSeq 6000 platform 平台进行高通量测序。测序、序列处理、物种注释等工作均由北京百迈客生物科技有限公司提供技术支持。原始数据保存于 NCBI 网站 SRA 数据库, 登录号为 SRR29243594-SRR29243658。

1.7 数据处理

使用方差分析(analysis of variance, ANOVA)进行试验数据显著性差异分析; 使用冗余分析(redundancy analysis, RDA)评估细菌群落与环境因子间的关系; 使用 Simper 分析(similarity percentage analysis)筛选对各组差异性贡献较大的扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs); 基于 Bray-Curtis 距离进行非度量多维尺度(non-metric multidimensional scaling, NMDS)分析; 基于皮尔森(Pearson)相关系数绘制土壤理化因子及土壤酶活的热图; 应用 Mantel test 分析检验主要物种与土壤理化因子及酶活的相关性及显著性水平。以上分析及绘图均在 R 语言(R 4.4.0)中完成。

采用随机矩阵原理(random matrix theory, RMT)构建不同环境样品细菌共现网络。网络性质参数及相关过程均在 Integrated Network Analysis Pipeline (iNAP) (<https://inap.denglab.org.cn/>)网站上完成^[15]。为确保在同等或极为相近的条件下进行网络分析, 采用 0.76 的阈值计算 4 种不同处理的网络参数, 然后使用 Gephi 0.10 软件进行网络图可视化。

2 结果与分析

2.1 不同处理对土壤理化性质及酶活的影响

不同修复过程中土壤残留石油浓度见图 1。初始石油污染土壤中石油含量(oil)为(5 382.25±146.31) mg/kg。经过 10 d 修复后, 4 种不同处理下土壤石油含量均有所降低, 其中

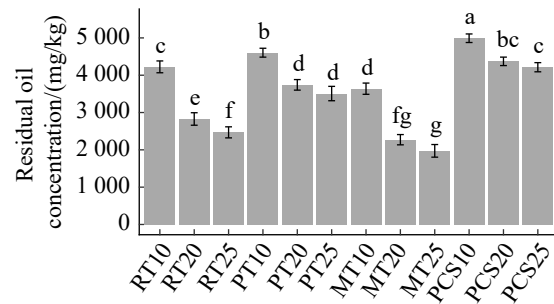


图1 不同处理方式土壤中残留石油浓度

Figure 1 Residual oil concentration in soil under different treatments. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) based on one-way analysis of variance (one-way ANOVA), followed by a LSD test.

复合菌群处理样品(MT10)残留石油浓度最低, 为(3 638.95±150.65) mg/kg; 而未添加微生物的土壤样品(PCS10)残留石油浓度最高, 为(4 991.36±114.77) mg/kg。经过 25 d 修复后, 添加复合菌群处理的 MT25 样品残留石油浓度最低, 为(1 973.17±169.29) mg/kg, 显著低于添加红球菌(*Rhodococcus* sp.) OS62 处理的 RT25 [(2 468.79±148.22) mg/kg]、添加假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) P35 处理的 PT25 [(3 508.78±192.59) mg/kg] 及不添加菌处理的 PCS25 [(4 214.33±122.71) mg/kg] ($P < 0.05$)。上述结果表明, 由 OS62 及 P35 构建的复合菌群具有最好的石油污染土壤修复效果, 而仅添加氮素组(PCS)的修复效果最差。由于 P35 的石油降解能力较弱, 因此使用 P35 进行石油污染土壤修复的效果也弱于 OS62。

不同修复过程中土壤理化性质及酶活测定结果见表 2。土壤微生物碳氮代谢具有一定的耦合性, 因此在石油生物降解过程中, 伴随着大量氮源的消耗^[13,16]。MT25 的总氮(total nitrogen, TN)和硝态氮(NO_3^- -N)消耗最多, 从初始石油污染土壤的(680±60) mg/kg 和(596.23±56.41) mg/kg (表 1)降低到(158.66±15.17) mg/kg 和(115.78±15.71) mg/kg (表 2)。土壤微生物主要通过反硝化过程对硝态

表2 不同处理土壤理化性质及酶活

Table 2 Physicochemical properties and enzyme activities of soil under different treatments

Groups	TN/(mg/kg)	NO ₃ -N/(mg/kg)	NO ₂ -N/(mg/kg)	CAT/(U/g)	PPO/(U/g)	LPS/(U/g)	DHA/(U/g)
RT10	454.11±21.70de	371.01±13.46cd	16.48±2.77g	0.84±0.22g	16.86±2.14de	31.38±4.36fg	31.42±6.86f
RT20	296.66±17.06g	230.11±22.08e	46.11±3.60cd	2.71±0.38e	20.13±2.60cd	40.78±3.57c	40.47±2.71cd
RT25	264.97±25.21h	173.39±18.90f	49.80±4.25bc	3.24±0.27c	23.21±2.69bc	45.99±2.58b	45.94±3.36ab
PT10	556.19±29.26b	473.26±17.91b	12.98±2.39gh	0.94±0.15g	15.49±2.66e	27.53±1.90g	29.94±2.11f
PT20	475.69±19.61d	375.22±24.18c	37.62±4.83e	2.87±0.39cde	19.78±1.67cd	32.95±3.67ef	32.42±3.03ef
PT25	435.55±20.23e	352.82±24.99cd	43.36±5.62de	3.14±0.26cd	21.43±3.27bc	39.26±2.32cd	36.72±4.27de
MT10	387.33±26.98f	341.47±25.56d	39.87±5.20e	1.35±0.10f	17.57±1.92de	36.59±4.69cde	34.25±4.51ef
MT20	229.72±14.50i	152.61±32.95f	54.11±2.15ab	4.30±0.35b	24.35±1.76b	49.29±3.51b	44.86±4.90bc
MT25	158.66±15.17j	115.78±15.71g	58.14±6.62a	4.91±0.23a	29.27±3.79a	55.32±2.98a	50.69±2.01a
PCS10	592.89±18.84a	526.91±25.09a	10.44±5.81g	0.84±0.24g	14.89±1.99e	20.70±2.29h	29.86±2.27f
PCS20	529.13±12.98c	469.21±37.98b	24.58±3.20f	2.53±0.28e	16.73±4.08de	29.82±2.00fg	33.94±3.15ef
PCS25	474.79±17.32d	457.52±30.09b	25.53±3.87f	2.86±0.33de	22.32±2.20bc	36.18±2.65de	36.78±2.44de

The lowercase letters in the table represent the indices of different treatments at different timepoint was significant different at $P<0.05$ level based on one-way analysis of variance (one-way ANOVA), followed by a LSD test.

氮进行代谢,在此过程中会产生一定量的亚硝态氮^[17]。因此土壤中亚硝态氮的变化趋势与总氮及硝态氮正好相反,在第25天,MT25组的亚硝态氮(NO₂⁻-N)含量最高,为(58.14±6.62) mg/kg,显著高于其他3组($P<0.05$)。上述结果表明,石油降解能力较弱的P35能够协同石油降解菌OS62提高石油污染修复能力,二者构建的菌群能够有效去除土壤中的石油污染。

微生物修复的本质是通过一系列酶促反应将污染物代谢为无毒物质^[18]。本研究选择了4种与石油生物降解相关的酶,并对修复过程中的酶活变化进行了测定。土壤过氧化氢酶(catalase, CAT)在第10天时的酶活均较低,第10到第20天急剧升高,第20到第25天上升缓慢,其中MT25样品CAT酶活最高,为(4.91±0.23) U/g。RT20、PT20、PCS20这3个样品的CAT酶活无显著差异,RT25、PT25、PCS25这3个样品同样无显著差异。上述结果表明,加入菌群对CAT酶活的增加要优于单一菌株的添加。RT25和MT25样品的土壤脱氢酶(dehydrogenase, DHA)活性最高,为(45.94±3.36) U/g和(50.69±2.01) U/g。在

相同的处理时间下,PT与PCS处理的DHA酶活无显著差异,但是均显著低于RT及MT处理。对DHA酶活测定结果表明,加入复合菌群(MT)对DHA酶活的提高与单独加入OS62(RT)基本一致,但是要高于单独加入P35(PT)及仅添加硝态氮处理(PCS)。MT25样品的土壤脂肪酶(lipase, LPS)活性最高,为(55.32±2.98) U/g,显著高于其他样品($P<0.05$)。对于第20天及第25天的样品,MT组的LPS酶活显著高于RT组,而RT组显著高于PT组及PCS组。MT25样品的土壤多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性最高,为(29.27±3.79) U/g,显著高于其他样品($P<0.05$)。对于第20天及第25天的样品,MT组的PPO酶活显著高于其他3种处理,并且其他3种处理的PPO酶活无显著差异。4种酶活在修复过程中均有明显的升高趋势,在第25天,4种处理的酶活均显著高于第10天。MT25样品的4种酶活最高,且显著高于其他样品($P<0.05$),表明菌群的添加显著提高土壤酶活。

2.2 高通量测序结果

2.2.1 原始数据处理

为探究 4 种处理在石油污染土壤修复过程中对土壤细菌群落的影响, 分别采集处理第 10、20、25 天的土壤样品进行高通量测序。原始序列(raw reads)经过质控、过滤、拼接及去除引物序列后, 获得有效序列(clean sequences)。有效序列通过 usearch-unoise3 处理后获得 ASV, 然后使用 SILVA (v123)数据库进行注释^[19-20]。去除注释结果中被鉴定为叶绿体和线粒体、单拷贝、嵌合体以及其他在域(kingdom)水平上无法注释的 ASVs。按照最低样品的序列数量进行抽平, 抽平后每个样品的序列数量为 34 356。

2.2.2 土壤细菌群落结构组成及 α 多样性分析

各样品的细菌域(domain)门水平(phylum)群落组成见图 2A。芽孢杆菌界(Bacillati)放线菌门(Actinomycetota)在所有样品中都占有绝对优势, 相对丰度为 $(57.6\pm 5.3)\%$ (RT10) - $(75.6\pm 8.1)\%$ (PCS20); 其次是假单胞菌界(Pseudomonadati)中的假单胞菌门(Pseudomonadota), 相对丰度为 $(11.3\pm 4.0)\%$ (PCS20) - $(19.1\pm 1.8)\%$ (PT10); 再次是假单胞菌界中的酸杆菌门(Acidobacteriota)。所有处理第 20 天和第 25 天样品中放线菌门的相对丰度相差不大, 但是均高于第 10 天样品; 假单胞菌门和酸杆菌门相对丰度的变化情况与放线菌门相反。各样品属水平(genus)的细菌群落组成见图 2B。从图 2B 中可以看出类诺卡氏菌属(Nocardioides)占绝对优势, 相对丰度为 $(36.4\pm 4.5)\%$ (RT10) - $(52.9\pm 9.2)\%$ (PCS20)。所有样品中均检测到了红球菌属(Rhodococcus), 相对丰度为 $(1.90\pm 0.03)\%$ (PT10) - $(4.40\pm 0.08)\%$ (RT20)。在所有处理中, 第 20 天和第 25 天样品中类诺卡氏菌属和红球菌属相对丰度均高于第 10 天样品。这一变化趋势与放线菌门的变化趋势一致。在 RT 和 PCS 组中, 假单胞菌属(Pseudomonas)的相对丰度很低, 仅为 $(0.07\pm$

$0.06)\%$ (PCS25) - $(0.23\pm 0.12)\%$ (RT10); 而在 PT 和 MT 组中, 假单胞菌的丰度能够达到 $(1.8\pm 0.4)\%$ (PT10) - $(4.2\pm 1.3)\%$ (MT10)。韦恩图能够直观反映不同处理间细菌群落组成差异性及其重叠性(图 2C)。从图 2 中可以看出 4 种处理共有 ASVs 为 1 097 个, 占 ASVs 总量 71.9%; RT 组特有的 ASVs 仅为 8 个, MT 组为 2 个, PCS 组为 17 个, PT 组为 11 个; 该结果表明不同处理的 ASVs 组成虽有差异, 但是在物种组成上差异不大, 共有的 ASVs 占绝大多数(71.9%), 4 种处理特有 ASVs 仅有 38 个(2.5%)。

对 4 种处理不同时间样品的细菌 α 多样性分析结果见图 3。4 种处理在 3 个取样时间点的 Observed_species 指数均有下降趋势, 其中只有 PT25 显著低于 PT10, 其他组在不同时间点的差异并不显著。RT 组的 Shannon 指数先下降后上升, 但是差异不显著; PT 组的 Shannon 指数具有下降趋势, 但是差异并不显著; MT 和 PCS 处理在不同时间点样品的 Shannon 指数无显著差异。RT 与 PT 处理的 Gini-Simpson 指数具有先降后升的趋势, 但是组内差异不显著; MT 组则具有上升趋势, 组内差异不显著; PCS 组无明显变化趋势, 组内差异不显著。总体来说, 虽然各处理不同采样时间的样品 α 多样性指数有一定的差异, 但是绝大部分情况下其差异均不显著。

2.2.3 土壤细菌群落结构相似性分析

按照取样时间的不同, 基于 Bray-Curtis 距离对 4 种处理的土壤细菌群落进行 NMDS 分析, 并通过置换多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)对分组间差异显著性进行分析; 同时使用 Simper 分析筛选对每组差异性贡献较大的前 10 个属, 结果见图 4。在第 10 天, 4 种处理细菌群落结构具有显著差异(stress=0.086, $R^2=0.422$, $P=0.001$); 在第 20 天, 由于 PT 与其他 3 种处理都有一定重叠性, 导致 PERMANOVA 分析结果显示组间差异不显著($R^2=0.250$, $P=0.097$); 第

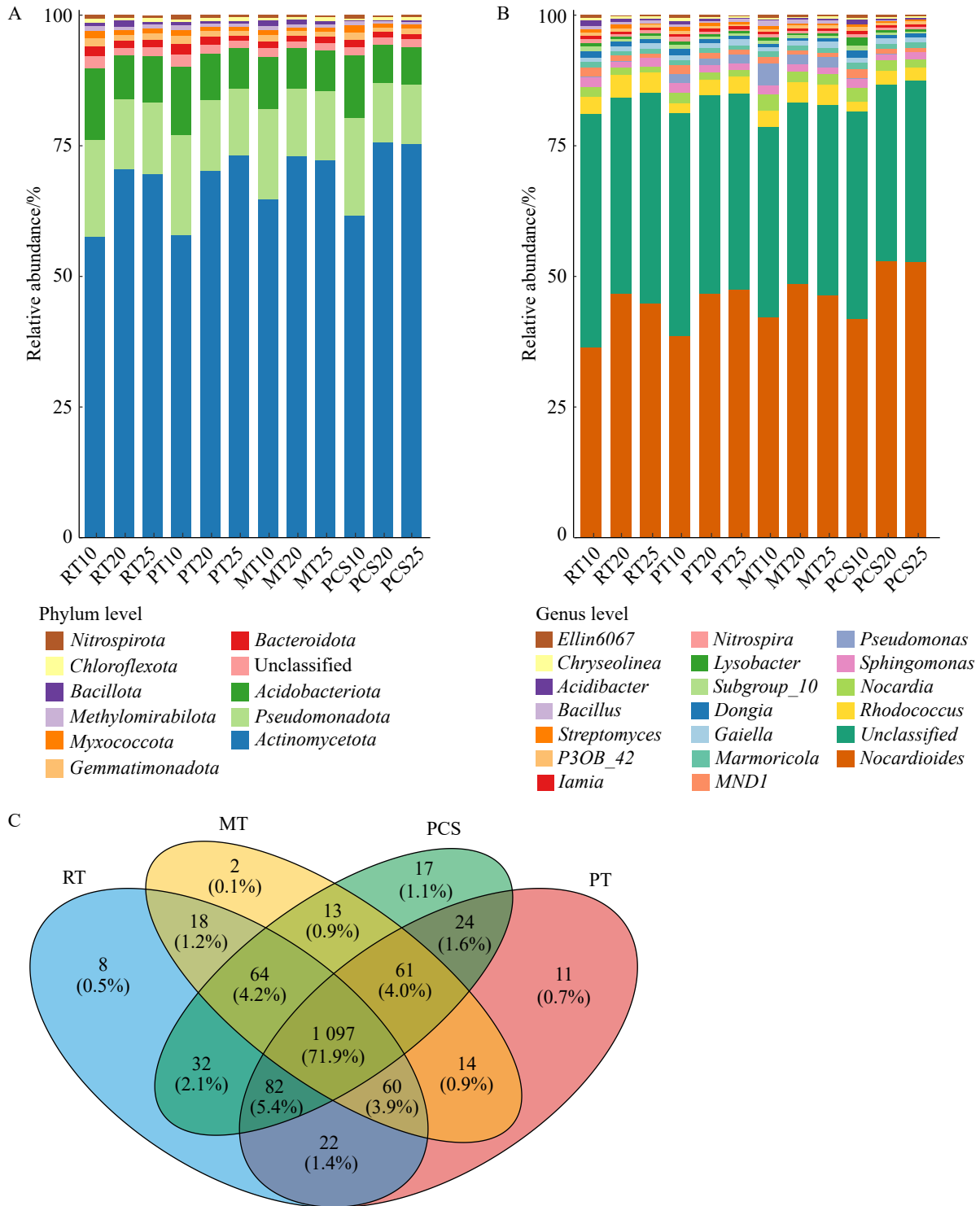


图2 石油污染土壤修复过程中细菌分布及韦恩图

Figure 2 Distribution and Venn diagram of bacteria in the remediation process of petroleum contaminated soil. A: Bacterial community composition at phylum level; B: Bacterial community composition at genus level; C: Venn diagram.

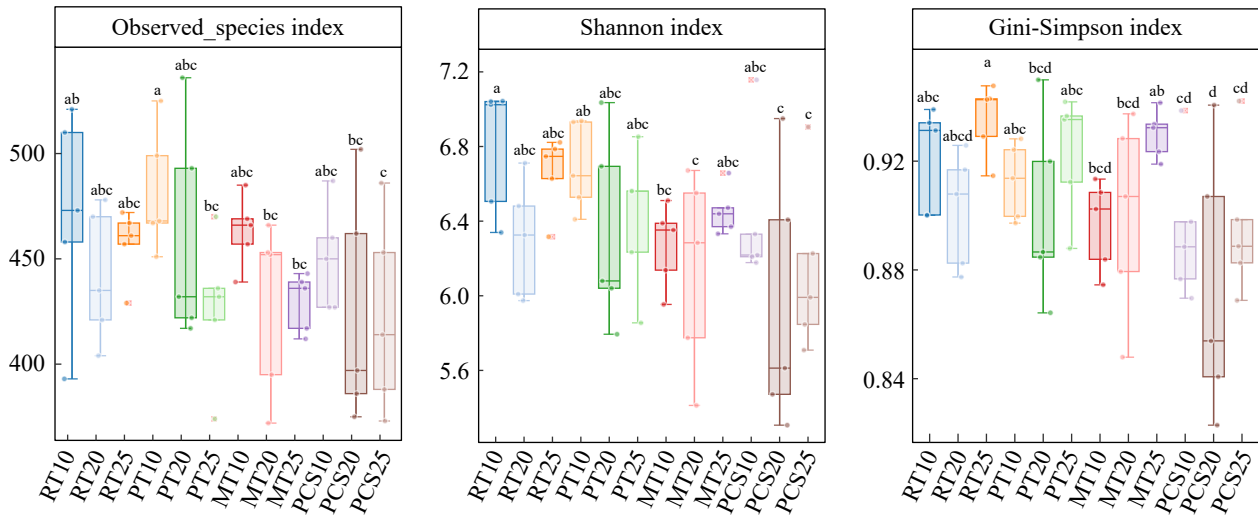


图3 土壤细菌群落α多样性指数

Figure 3 Alpha diversity index of soil microbial community. The lowercase letters in the graph represent the indices of different treatments at different timepoint was significant different at $P < 0.05$ level based on one-way analysis of variance (one-way ANOVA), followed by a LSD test.

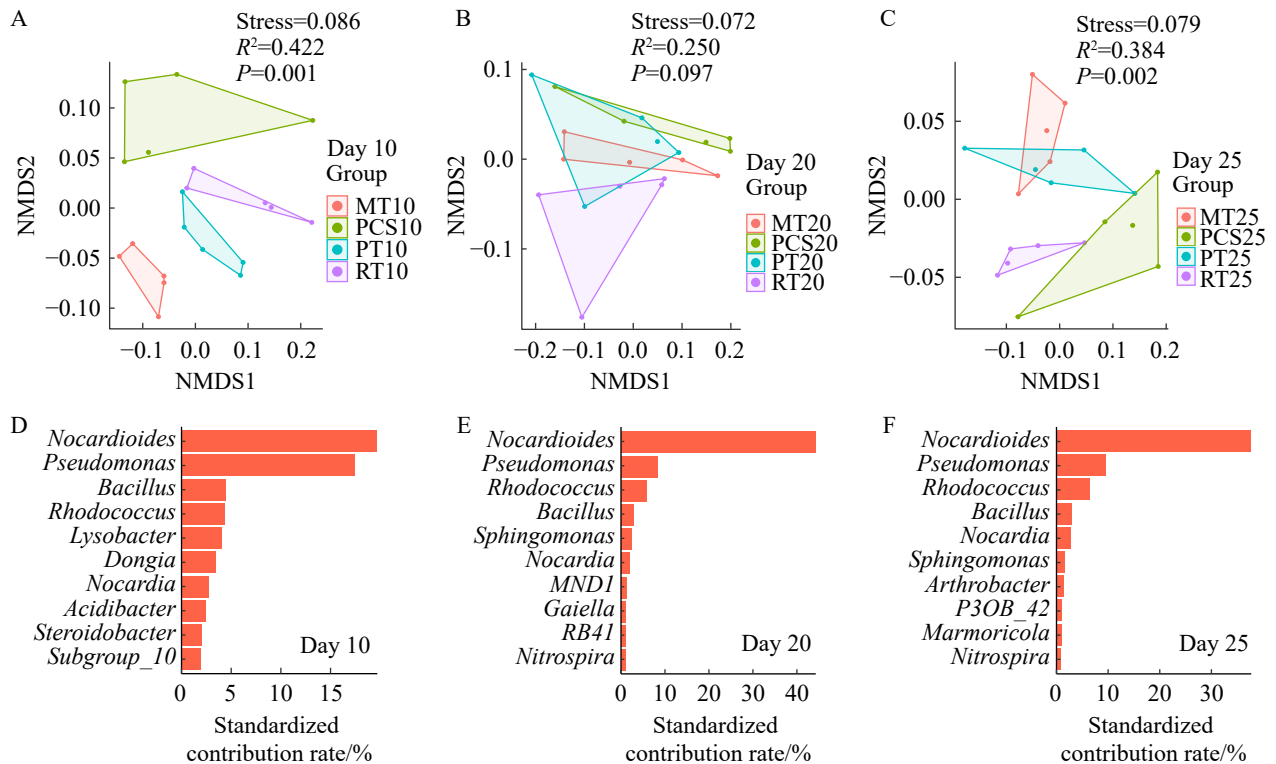


图4 基于Bray-Curtis距离的非计量多维尺度(NMDS)分析(A-C)及Simper分析(D-F)

Figure 4 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis (A-C) and Simper analysis (D-F) based on Bray-Curtis distance.

25 天, MT 与 PT 有小部分重叠, 但与 RT 及 PCS 能有效区分 ($\text{stress}=0.079$, $R^2=0.384$, $P=0.002$)。第 10 天对组间差异贡献前 10 的属分别为: 类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、溶杆菌属(*Lysobacter*)、东秀珠氏菌属(*Dongia*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、嗜酸杆菌属(*Acidibacter*)、类固醇杆菌属(*Steroidobacter*)、*Subgroup_10*; 其中类诺卡氏菌属的标准贡献率最高为 19.7, 其次是假单胞菌属为 17.4, 其他属标准贡献率都低于 5.0。第 20 天对组间差异贡献率前 4 的属与第 10 天的一致, 其中诺卡氏菌属标准贡献率最高为 44.3, 其次为假单胞菌属的 8.3, 红球菌属的 5.8, 芽孢杆菌属的 2.8。第 25 天对组间差异贡献前 4 的菌属与第 10 及第 20 天一致, 仍为类诺卡氏菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、红球菌属, 其标准化贡献率分别为 37.7、9.5、3.0、6.4。综上所述, 不同处理对石油污染修复过程中土壤细菌群落结构有重要影响, 其中诺卡氏菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、红球菌属对各处理差异具有较大贡献。

2.2.4 土壤细菌群落多样性与理化因子相关性分析

基于 RDA 分析探究土壤理化性质对石油污染土壤修复过程中细菌群落的影响, 结果见图 5A。第一坐标轴 (RDA1) 和第二坐标轴 (RDA2) 对土壤理化因子影响的解释度分别为 30.7% 和 12.2%。从图 5A 中可以看出, 土壤残留石油浓度(oil)与总氮含量(TN)、硝态氮含量(NO_3^- -N)呈正相关, 与 4 种酶活(CAT、LPS、PPO、DHA)及亚硝态氮含量(NO_2^- -N)呈负相关。土壤中的部分微生物能够通过反硝化功能将硝态氮转变为氮气, 在此过程中会有部分亚硝态氮产生^[21], 因此 TN、 NO_3^- -N 与 NO_2^- -N 呈负相关关系。同时, 土壤酶活主要来自土壤微生物, 而土壤微生物的生长繁殖离不开氮素的利用, 因此土壤氮素消耗越快, 土壤微生物活动越强,

土壤酶活越高, 这也解释了土壤酶活与 TN、 NO_3^- -N 呈负相关关系。微生物对石油的降解与微生物的新陈代谢息息相关, 因此微生物活性越强, 土壤石油降解越多^[7], 本研究中 oil 与 TN、 NO_3^- -N 呈正相关, 而与土壤酶活及 NO_2^- -N 呈负相关。PCS 组与 PT 组有一定交集, 而 PT 组与 RT 和 MT 组有一定交集, PCS 组与 RT 和 MT 组无交集, 表明 PCS 组微生物群落结构与 RT 和 MT 组差异较大。PCS 组与 oil、TN、 NO_3^- -N 有较强的正相关关系, 而 MT 组与土壤酶活和 NO_2^- -N 有较强的正相关关系。上述结果表明, MT 组样品中的土壤微生物活性较强, 对石油的降解效率较高。

为了探究主要微生物类群与土壤理化因子之间的关系, 本研究选择红球菌属、假单胞菌属和类诺卡氏菌属 3 个菌属对其与土壤理化因子的关系进行 Mantel 分析, 结果见图 5B。从热图中可以看出, oil 与 TN、 NO_3^- -N 呈显著正相关关系, 与土壤酶活和 NO_2^- -N 呈显著负相关关系, 这一结果与 RDA 分析结果一致。Chao1 指数及 Shannon 指数与土壤理化因子相关性较弱; 而细菌群落结构(BCS, PCoA 分析第一主坐标轴)与土壤酶活及 NO_2^- -N 显著正相关, 与 TN、 NO_3^- 、oil 显著负相关。红球菌属与所测土壤理化因子及细菌群落结构都有显著相关性, 与 oil (Mantel's $r=0.48$, Mantel's $P=0.001$)、TN (Mantel's $r=0.52$, Mantel's $P=0.001$)、 NO_3^- -N (Mantel's $r=0.51$, Mantel's $P=0.001$)、LPS (Mantel's $r=0.41$, Mantel's $P=0.001$)相关性较强。假单胞菌与所有理化因子及细菌群落结构均无显著相关性。类诺卡氏菌属与 CAT 及细菌群落结构有显著相关性, 但是相关性较弱, 与细菌 α 多样性(Chao1、Shannon 指数)呈显著强相关。上述结果表明, 红球菌属在石油污染土壤修复过程中具有重要作用。

2.3 分子生态网络分析

基于各组样品 ASV 数据构建不同处理下土壤细菌群落分子生态网络, 结果见图 6A。网络

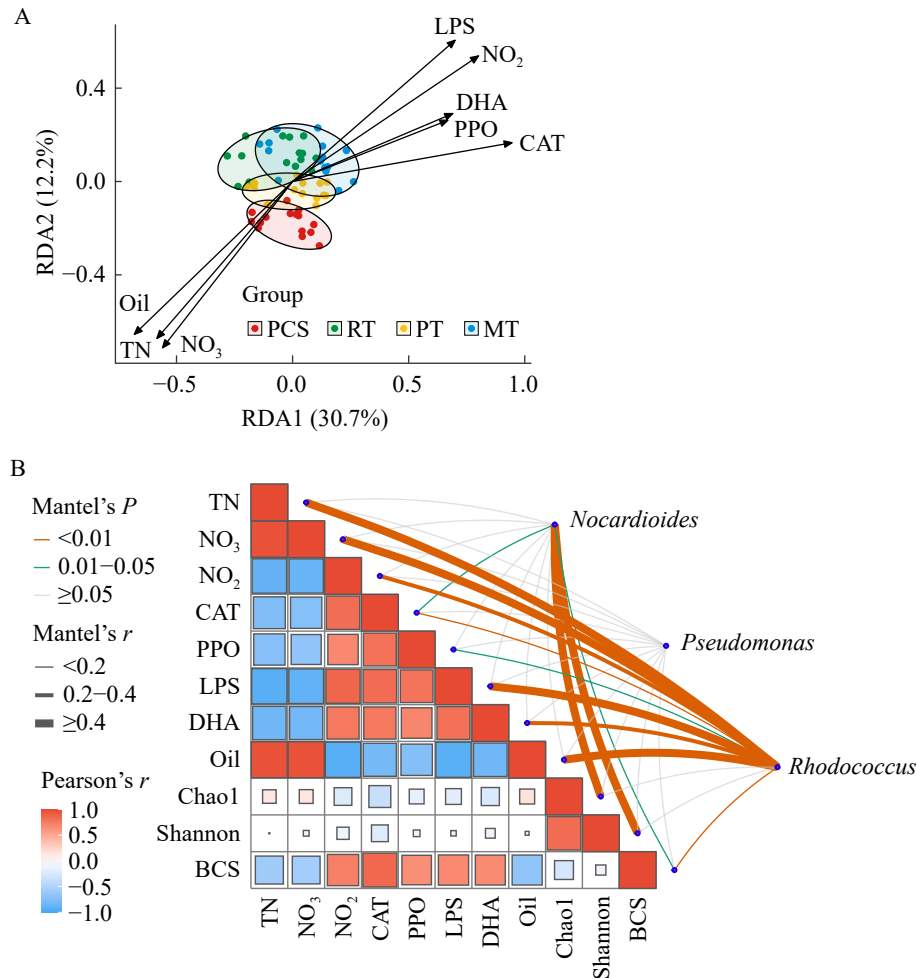


图5 不同处理石油污染土壤细菌多样性与土壤理化因子和酶活的相关性分析

Figure 5 Correlation analysis between bacterial diversity and soil physiochemical factors and enzyme activities in petroleum contaminated soil under different treatments. A: RDA analysis; B: Mantel test. TN: Total nitrogen; NO_3 : Nitrate nitrogen; NO_2 : Nitrite nitrogen; LPS: Lipase activity; DHA: Dehydrogenase activity; PPO: Polyphenol oxidase activity; CAT: Catalase activity; Oil: Residual oil concentration; Chao1 and Shannon: Alpha diversity indices; BCS: Bacterial community structure obtained from the PC1 of principal coordinates analysis (PCoA) based on based on Bray-Curtis distance.

中的节点代表物种，边代表各物种两两间的关系，其中红色代表正相关，蓝色代表负相关。从图 6A 中可以看出 4 种处理的节点数并无较大差异(最大为 RT 组 242，最小为 PCS 组 195)，但是边数差异较大(最大为 PT 组 701，最小为 PCS 组 358)。较大的节点数及边数表明，该处理下 RT 及 PT 组土壤细菌网络更加复杂。正相关代表物种间为合作或共生等关系，负相关代

表物种间为拮抗、竞争等关系。在 4 种处理中，正相关边的比例基本一致，介于 33.00%–38.27% 之间，负相关边的比例介于 61.73%–67.00%，表明不同处理对土壤中微生物间相互关系无较大影响。

为了筛选网络中的关键物种，根据不同节点模块内连通性(Z_i)和模块间连通性(P_i)值的大小，将其分为模块枢纽物种(module hubs,

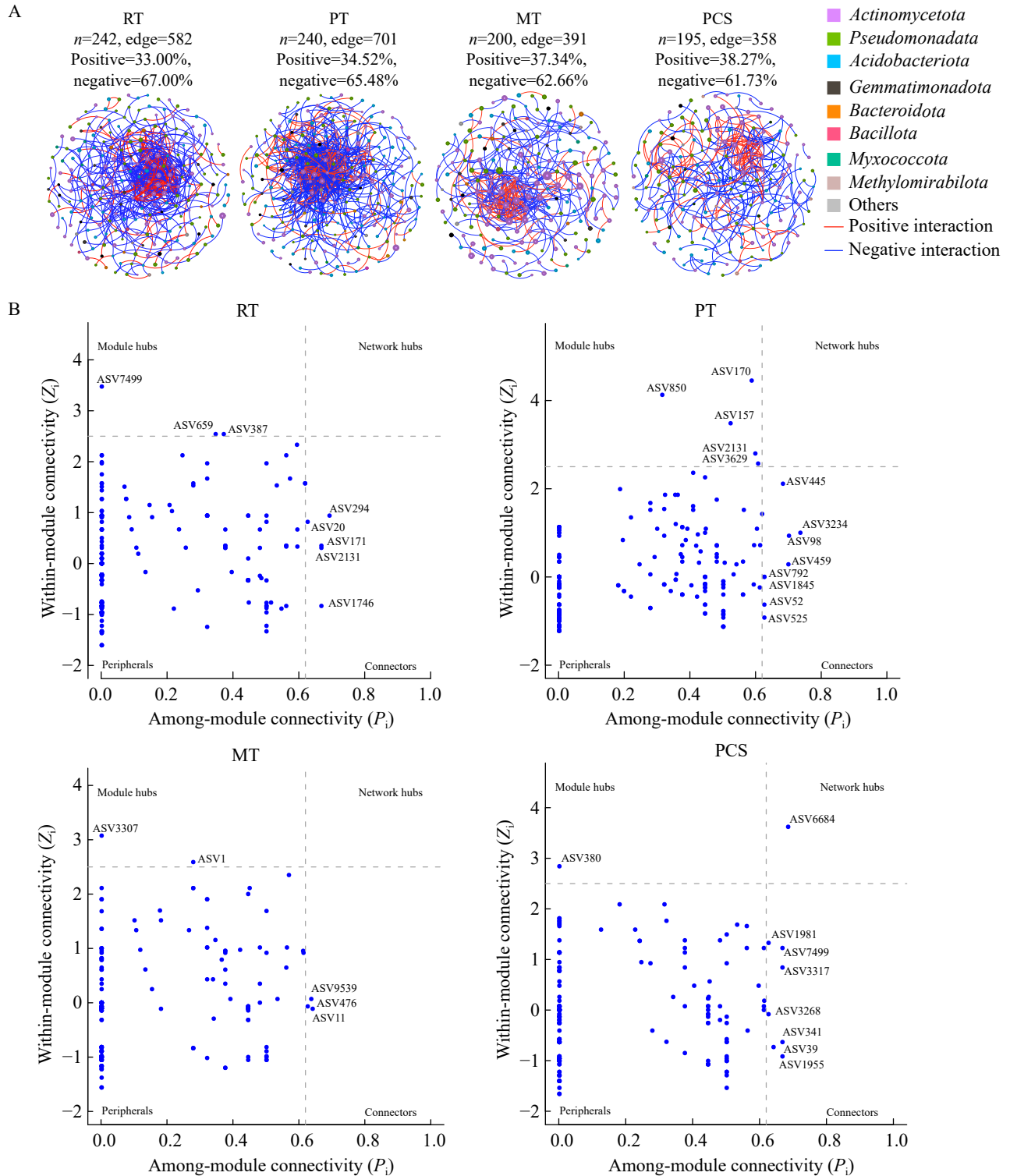


图6 不同处理石油污染土壤细菌群落分子生态网络(A)及节点拓扑角色分析(B)

Figure 6 Analysis of molecular ecological network (A) and node topological role (B) of bacterial community in petroleum contaminated soil under different treatments.

$Z_i > 2.5$, $P_i < 0.62$)、网络枢纽物种(network hubs, $Z_i > 2.5$, $P_i > 0.62$)、连接枢纽物种(connector hubs, $Z_i < 2.5$, $P_i > 0.62$)及外围节点物种(peripherals, $Z_i < 2.5$, $P_i < 0.62$)^[22]。从生态学的角度来看,其中前三者被认为是关键物种,而外围节点物种被认为是非关键物种。RT组中关键物种有7个,包括4个连接枢纽物种(ASV171, ASV294, ASV1746, ASV2131)和3个模块枢纽物种(ASV387, ASV659, ASV7499);PT组中关键物种有12个,包括7个连接枢纽物种(ASV52, ASV98, ASV445, ASV459, ASV525, ASV792, ASV1845)和5个模块枢纽物种(ASV157, ASV170, ASV850, ASV2131, ASV3629);MT组中关键物种有5个,包括3个连接枢纽物种(ASV11, ASV476, ASV9539)和2个模块枢纽物种(ASV1, ASV3307);PCS组中关键物种有9个,包括7个连接枢纽物种(ASV39, ASV341, ASV1955, ASV1981, ASV3268, ASV3317, ASV7499)、1个模块枢纽物种(ASV380)和1个网络枢纽物种(ASV6684)(图6B)。上述关键物种中包含大量类诺卡氏菌属物种,如ASV9539、ASV341、ASV7499等,表明该属物种在各处理细菌网络中具有重要的作用;而红球菌属和假单胞菌属的微生物均未出现,表明石油污染土壤修复过程中添加的微生物并未成为土壤中的关键物种。

各处理分子生态网络拓扑属性见表3。在分

表3 不同处理土壤细菌群落分子生态网络拓扑参数

Table 3 Topological parameters of molecular ecological network of soil bacterial community under different treatments

Groups	Average degree	Average path distance	Average clustering coefficient	Modularity	Module numbers
RT	4.81	4.71	0.14	0.54	19
PT	5.84	4.16	0.15	0.43	18
MT	3.91	4.98	0.13	0.57	21
PCS	3.67	5.17	0.13	0.63	18

子生态网络中常用平均连接度(average degree)、平均路径距离(average path distance)、平均聚类系数(average clustering coefficient)和模块化指数(modularity)等拓扑学性质参数来描述网络规模大小及网络复杂程度^[23]。PT组的平均连接度(average degree, avgK)最大,为5.84;PCS组最小,为3.67。PCS组的平均路径距离最大,为5.17;PT组最小,为4.16。PT组的平均聚类系数最大,为0.15;MT组和PCS组最小,为0.13。PCS组的模块化指数最大,为0.63,PT组最小,为0.43,各组模块数量基本一致,为18–21个。

3 讨论

石油污染生物修复技术的本质是利用微生物代谢活动将石油中的烃类物质降解转变为细胞量、CO₂和水,大量石油污染物的出现导致土壤碳氮元素失衡,因此对石油污染土壤适量补充氮素是必要的^[16]。虽然紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)能够通过和根瘤菌形成共生体系进行固氮,但由于本研究持续时间较短(仅25 d),紫花苜蓿生长很弱且根系细小,难以进行样品采集,因此在结果中未考虑紫花苜蓿的影响。Chen等^[24]研究发现,生物刺激(营养物质的添加)与生物强化(外源微生物添加)均能有效促进土壤石油烃的降解,且二者无显著差异。本研究表明,添加硝酸钾溶液(PCS组)虽能促进土壤石油污染物的降解,但降解效率较低,为(21.07±3.52)% (表2、图1),低于加菌的PT组(34.23±4.82)%、RT组(53.78±2.61)%及MT组(63.08±2.64)%。这可能是由于本研究初始土壤石油污染浓度(5 382.25±146.31) mg/kg 远高于Chen等研究中土壤石油污染浓度(约500 mg/kg)所致。此外,Chen等的研究采用的石油污染土壤采集自炼油厂附近,由于长期受石油污染胁迫,可能富集了较多具有石油降解功能的微生物。高通量测序分析发现,PCS组与其他3种处理组的微生物群落结构类似,类诺卡氏菌属

的丰度最高, 在修复后期其相对丰度超过 50.0% (图 2B)。据报道许多陕北地区石油污染土壤在自然降解过程中类诺卡氏菌属均具有较高的丰度, 其在石油污染物自然衰减过程中被明显富集^[25-26], 并且部分类诺卡氏菌属微生物具有降解难分解有机化合物的能力^[27-29], 因此有学者推测其具有较强的石油降解潜力^[30]。然而, 本研究中丰度增高的类诺卡氏菌属微生物可能并不具有较强石油降解能力(PCS 组石油降解效率最低), 其丰度增加的原因及作用仍需进一步研究。当添加石油降解优良菌株 OS62 后, 石油降解效率显著提高 $[(53.78 \pm 2.61)\%, P < 0.05]$, 表明功能微生物的添加在修复过程中具有重要作用。虽然 *Rhodococcus* 属在土壤中的相对丰度较低($< 5\%$), 但其对土壤细菌群落差异、土壤酶活和石油降解效率具有较大影响(图 4、图 5)。越来越多的研究表明, 稀有微生物类群(rare taxa)在微生物群落功能及土壤碳氮循环中具有重要作用^[31-32]。

土壤酶活是土壤生态的重要指标之一^[33]。本研究通过对过氧化氢酶(CAT)、多酚氧化酶(PPO)、脱氢酶(DHA)和脂肪酶(LPS) 4 种与石油降解相关的酶进行检测, 探究不同处理对土壤酶活的影响。CAT 可促进微生物在环境胁迫条件下产生的过氧化氢(H_2O_2)的解毒代谢, 提高微生物对石油胁迫的耐受能力^[34]; PPO 是一类重要的功能酶, 能将难降解有机物质转化为不稳定态碳源, 尤其在环烃开环反应中发挥关键作用^[35]; DHA 属于氧化还原酶类, 广泛参与有机污染物的降解过程^[36]; LPS 是一类能够催化脂肪水解的酶, 在土壤有机质分解、土壤养分循环及生态功能维持方面具有重要作用^[37]。本研究表明, 随着修复时间的延长, 所有处理中 4 种酶活均有一定程度的升高, 这与 Wang 等^[34]及 Rong 等^[35]的研究结果一致。其中 MT 组的酶活最高, 表明 OS62 与 P35 组成的菌群能够极大改善土壤中的微生物活性, 提高土壤酶活, 进而增强修复效果。由于 RT 组的 CAT 和 PPO 酶

活与 PCS 组和 PT 组差异不大, 但 RT 组的石油降解效率却显著高于二者, 因此推测本研究中石油降解贡献较大的土壤酶为 LPS 和 DHA。

细菌分子生态网络中相关拓扑学参数能够反映细菌群落间的相互作用关系, 筛选关键细菌类群^[23,38]。在构建的分子生态网络中负相关边的比例介于 61.73%–67.00%, 远高于正相关边数比例(图 6A), 这与 Chen 等^[24]的研究结果相反。生态网络中的正相关连接可能代表物种间的生态位重叠、共生或寄生关系, 而负相关连接则代表物种间的生态位分化、竞争或捕食关系^[39]。本研究中高比例的负相关边数可能是由于石油胁迫及微生物竞争性摄取营养物质造成的。在分子生态网络中平均连接度能够反映网络复杂程度, 其值越大网络越复杂。本研究发现 PT 组的平均连接度最高, 其次是 RT 组和 MT 组, PCS 组最低, 表明外源微生物的加入增加了石油污染土壤修复过程中细菌网络的复杂程度。平均路径距离和平均聚类系数能够在一定程度上反映分子生态网络中群落及物种间的联系程度, 平均路径距离越小, 平均聚类系数越大, 表明群落与物种间联系越紧密。PT 组的平均路径距离最小, 平均聚类系数最大, 说明假单胞菌 P35 的加入使土壤中细菌群落间的联系比其他处理更加紧密。模块化指数能够反映网络结构的模块化程度, 通常认为其值大于 0.44, 网络结构达到了一定的模块化程度, 模块化指数越高, 表明该网络抵御外界干扰的能力越强。PCS 组的模块化指数要高于其他 3 种处理, 暗示该处理抵御外界干扰的能力要强于其他 3 组。从表 3 可以看出, 不同处理下土壤细菌分子生态网络拓扑参数均具有一定的差异, 表明不同处理对土壤微生物分子生态网络造成了一定影响, 但大部分差异并不明显。

4 结论

石油降解能力较弱的菌株假单胞菌 P35 能够协同石油降解优良菌红球菌 OS62 进行石油污

染土壤修复,二者以较低的相对丰度展现出最强的石油修复效率。菌株 OS62 和 P35 通过增强土壤中与石油降解相关酶的活性提高修复效率,并且二者的加入对土壤细菌群落 α 多样性和分子生态网络影响较小。本研究为红球菌 OS62 与假单胞菌 P35 在石油污染土壤修复中提供了理论依据与实践参考。然而本研究尚未解决外加菌群在石油污染土壤修复过程中动态变化等问题,因此后续研究需结合荧光蛋白标记、荧光定量 PCR 及宏基因组测序技术,系统探究红球菌 OS62 与假单胞菌 P35 在石油污染土壤中绝对丰度变化规律及代谢活性,进而深入解析复合菌群介导的石油污染土壤修复机制。

作者贡献声明

郭一丹:完成实验;姜影影:数据分析;马雨曦:协助实验;邓振山:提出概念;贺晓龙:提供资源;柳晓东:提供基金,撰写文章。

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] Onyena AP, Sam K. A review of the threat of oil exploitation to mangrove ecosystem: insights from Niger Delta, Nigeria[J]. *Global Ecology and Conservation*, 2020, 22: e00961.
- [2] Bolan N, Sarkar B, Yan YB, Li Q, Wijesekara H, Kannan K, Tsang DCW, Schauerte M, Bosch J, Noll H, Ok YS, Scheckel K, Kumpiene J, Gobindlal K, Kah M, Sperry J, Kirkham MB, Wang HL, Tsang YF, Hou DY, et al. Remediation of poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) contaminated soils-to mobilize or to immobilize or to degrade?[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401: 123892.
- [3] 郭萍,李红娜,李峰,叶婧.石油污染微生物修复技术研究进展[J].*生物技术通报*, 2017, 33(10): 18-25.
Guo P, Li HN, Li F, Ye J. Review of petroleum hydrocarbon pollution and microorganism remediation[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(10): 18-25 (in Chinese).
- [4] Stepanova AY, Gladkov EA, Osipova ES, Gladkova OV, Tereshonok DV. Bioremediation of soil from petroleum contamination[J]. *Processes*, 2022, 10(6): 1224.
- [5] Jampasri K, Pokethitayook P, Poolpak T, Kruatrachue M, Ounjai P, Kumsopa A. Bacteria-assisted phytoremediation of fuel oil and lead co-contaminated soil in the salt-stressed condition by *Chromolaena odorata* and *Micrococcus luteus*[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2020, 22(3): 322-333.
- [6] 柳晓东,刘鑫慧,姜影影,王佳敏.非运动型红球菌 OS62-1 在紫花苜蓿根系吸附及迁移[J].*延安大学学报(自然科学版)*, 2024, 43(4): 7-13.
Liu XD, Liu XH, Jiang YY, Wang JM. Adsorption and migration of non-motile *Rhodococcus* sp. OS62-1 in alfalfa roots[J]. *Journal of Yan'an University (Natural Science Edition)*, 2024, 43(4): 7-13 (in Chinese).
- [7] 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.
- [8] Wang MZ, Ding MZ, Yuan YJ. Bioengineering for the microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants[J]. *Bioengineering*, 2023, 10(3): 347.
- [9] Zhou HH, Liu Q, Jiang LJ, Shen Q, Chen CL, Zhang CF, Tang JW. Enhanced remediation of oil-contaminated intertidal sediment by bacterial consortium of petroleum degraders and biosurfactant producers[J]. *Chemosphere*, 2023, 330: 138763.
- [10] Atakpa EO, Zhou HH, Jiang LJ, Ma YH, Liang YP, Li YH, Zhang DD, Zhang CF. Improved degradation of petroleum hydrocarbons by co-culture of fungi and biosurfactant-producing bacteria[J]. *Chemosphere*, 2022, 290: 133337.
- [11] Chen WW, Kong YC, Li JD, Sun YY, Min J, Hu XK. Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2020, 154: 105047.
- [12] Yu TF, Liu XD, Ai JM, Wang JM, Guo YD, Liu XH, He XL, Deng ZS, Jiang YY. Microbial community succession during crude oil-degrading bacterial enrichment cultivation and construction of a degrading consortium[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1044448.
- [13] Liu H, Wu ML, Gao H, Gao JH, Wang SJ. Application of (15)N tracing and bioinformatics for estimating microbial-mediated nitrogen cycle processes in oil-contaminated soils[J]. *Environmental Research*, 2023, 217: 114799.
- [14] 柳晓东,余天飞,邓振山,范晓虹,张薇,杨昱,何颖,艾加敏,姜影影. *Neorhizobium petrolearium* OS53 联合紫花苜蓿协同修复石油污染土壤研究[J].*微生物学报*, 2024, 64(3): 854-868.
Liu XD, Yu TF, Deng ZS, Fan XH, Zhang W, Yang Y, He Y, Ai JM, Jiang YY. *Neorhizobium petrolearium* OS53 combined with alfalfa (*Medicago sativa* L.) for remediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(3): 854-868 (in Chinese).
- [15] Feng K, Peng X, Zhang Z, Gu SS, He Q, Shen WL, Wang ZJ, Wang DR, Hu QL, Li Y, Wang S, Deng Y. iNAP: an integrated network analysis pipeline for microbiome studies[J]. *iMeta*, 2022, 1(2): e13.

- [16] Sun YY, Chen WW, Wang YB, Guo J, Zhang HK, Hu XK. Nutrient depletion is the main limiting factor in the crude oil bioaugmentation process[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2021, 100: 317-327.
- [17] Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263-276.
- [18] Ławniczak Ł, Woźniak-Karczewska M, Loibner AP, Heipieper HJ, Chrzanowski Ł. Microbial degradation of hydrocarbons-basic principles for bioremediation: a review[J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 856.
- [19] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41 (Database issue): D590-D596.
- [20] Edgar RC, Flyvbjerg H. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(21): 3476-3482.
- [21] Pappu AR, Bhattacharjee AS, Dasgupta S, Goel R. Nitrogen cycle in engineered and natural ecosystems: past and current[J]. *Current Pollution Reports*, 2017, 3(2): 120-140.
- [22] Olesen JM, Bascompte J, Dupont YL, Jordano P. The modularity of pollination networks[J]. *PNAS*, 2007, 104(50): 19891-19896.
- [23] Montoya JM, Pimm SL, Solé RV. Ecological networks and their fragility[J]. *Nature*, 2006, 442(7100): 259-264.
- [24] Chen JY, Zhuang JG, Dai TJ, Zhang RH, Zeng YF, Jiang B, Guo HM, Guo X, Yang YF. Enhancing soil petrochemical contaminant remediation through nutrient addition and exogenous bacterial introduction[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 476: 135078.
- [25] 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.
- [26] Wu ML, Liu ZL, Gao H, Gao JH, Xu YR, Ou YW. Assessment of bioremediation potential of petroleum-contaminated soils from the Shanbei oilfield of China revealed by qPCR and high throughput sequencing[J]. *Chemosphere*, 2022, 308: 136446.
- [27] Schippers A, Schumann P, Spröer C. *Nocardioideis oleivorans* sp. nov., a novel crude-oil-degrading bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(4): 1501-1504.
- [28] Ma YC, Wang JX, Liu Y, Wang XY, Zhang BL, Zhang W, Chen T, Liu GX, Xue LG, Cui XW. *Nocardioideis*: “specialists” for hard-to-degrade pollutants in the environment[J]. *Molecules*, 2023, 28(21): 7433.
- [29] Zhu L, Yang BY, Guo WJ, Hu XY, Liu SK, Xiao X, Wei W. *Nocardioideis limicola* sp. nov., an alkaliphilic alkane degrading bacterium isolated from oilfield alkali-saline soil[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2024, 117(1): 14.
- [30] Ou YW, Wu ML, Zhang XH, Liu ZL, Hu M, Huang XY, Gao H, Wu XJ. Differential microbial mechanisms of TPH degradation and detoxification during stepwise bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2025, 13(6): 119642.
- [31] Wang YC, Lv YH, Wang C, Deng Y, Lin YT, Jiang GY, Hu XR, Crittenden JC. Stochastic processes shape microbial community assembly in biofilters: hidden role of rare taxa[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 402: 130838.
- [32] Shade A, Jones SE, Caporaso JG, Handelsman J, Knight R, Fierer N, Gilbert JA. Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity[J]. *mBio*, 2014, 5(4): e01371-14.
- [33] Huang XM, Zhou HH, Ni QL, Dai CH, Chen CL, Li YH, Zhang CF. Biosurfactant-facilitated biodegradation of hydrophobic organic compounds in hydraulic fracturing flowback wastewater: a dose-effect analysis[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2020, 19: 100889.
- [34] Wang A, Fu WX, Feng Y, Liu ZM, Song DH. Synergetic effects of microbial-phytoremediation reshape microbial communities and improve degradation of petroleum contaminants[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 429: 128396.
- [35] Rong LG, Zheng XH, Oba BT, Shen CB, Wang XX, Wang H, Luo Q, Sun LN. Activating soil microbial community using *Bacillus* and rhamnolipid to remediate TPH contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2021, 275: 130062.
- [36] Burns RG, Deforest JL, Marxsen J, Sinsabaugh RL, Stromberger ME, Wallenstein MD, Weintraub MN, Zoppini A. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 58: 216-234.
- [37] 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]. *Huanjing Kexue*, 2023, 44(8): 4599-4610.
- [38] Deng Y, Jiang YH, Yang YF, He ZL, Luo F, Zhou JZ. Molecular ecological network analyses[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13(1): 113.
- [39] Hernandez DJ, David AS, Menges ES, Searcy CA, Afkhami ME. Environmental stress destabilizes microbial networks[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(6): 1722-1734.