

宋佳宇, 李昀照, 李兴春, 等. 石油污染土壤微生物群落结构及降污固碳潜力[J]. 环境科学与技术, 2024, 47(5): 90–102. Song Jiayu, Li Yunzhao, Li Xingchun, et al. Microbial community structure and carbon sequestration potential of petroleum-contaminated soil[J]. Environmental Science & Technology, 2024, 47(5): 90–102.

石油污染土壤微生物群落结构及降污固碳潜力

宋佳宇^{1,2,3*}, 李昀照^{1,2,3,4,5}, 李兴春^{1,2,3}, 付爱民^{2,3,6}, 彭梓怡^{1,2,3,4,5},
李丹丹^{2,3}, 任金蔓^{2,3,6}, 陈春茂^{1,4,5}

(1. 中国石油大学(北京)化学工程与环境学院, 北京 102249;

2. 石油石化污染物控制与处理国家重点实验室, 北京 102206;

3. 中国石油集团安全环保技术研究院有限公司, 北京 102206;

4. 重质油全国重点实验室, 北京 102249;

5. 油气污染防治北京市重点实验室, 北京 102249;

6. 大庆油田水务环保公司, 黑龙江 大庆 163712)

摘要:为探究石油污染土壤中微生物群落结构特征及降污固碳潜力, 该研究选取中国东部、中部、西北部、西南部4个典型油气田企业在役井场为研究区域, 结合16S rRNA高通量测序及生物信息学技术, 研究不同油田表层土壤(0~20 cm)潜在降污、固碳微生物群落结构变化规律及主要驱动环境因子, 并针对降污、固碳相关代谢通路进行预测及功能注释。结果表明: (1)不同油田土壤全量养分及微生物生物量大致呈东部油田最高, 西南部及西北部油田较为接近, 中部油田最低的规律。(2)研究区土壤微生物优势菌为变形杆菌门、放线菌门、绿弯菌门、拟杆菌门、酸杆菌门。(3)基于VPA、RDA分析结果推测, 微生物量碳、微生物量氮、RubisCO酶活性、总石油烃含量为影响污染土壤微生物群落结构变化的主要驱动环境因子, 其中, TPH ($r^2=0.67$, $P=0.001$)、MBC ($r^2=0.36$, $P=0.004$)、MBN ($r^2=0.74$, $P=0.003$) 和 RubisCO 酶活性 ($r^2=0.37$, $P=0.004$) 均与微生物群落结构具有显著相关性。(4)KEGG数据库功能注释结果表明, 不同油田污染土壤中与微生物固碳过程相关的代谢通路相对丰度均显著高于与石油烃等有机物降解相关的代谢通路, 且上述通路在不同油田间的相对丰度差异较小。研究结果为支撑新形势下石油石化行业减污增汇技术发展具有重要意义。

关键词:石油污染; 降污固碳微生物; 微生物群落结构特征; 代谢功能

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **doi:**10.19672/j.cnki.1003-6504.0131.24.338 **文章编号:**1003-6504(2024)05-0090-13

Microbial Community Structure and Carbon Sequestration Potential of Petroleum-contaminated Soil

SONG Jiayu^{1,2,3*}, LI Yunzhao^{1,2,3,4,5}, LI Xingchun^{1,2,3}, FU Aimin^{2,3,6}, PENG Ziyi^{1,2,3,4,5},
LI Dandan^{2,3}, REN Jinman^{2,3,6}, CHEN Chunmao^{1,4,5}

(1. College of Chemical Engineering and Environment, China University of Petroleum-Beijing, Beijing 102249, China;

2. State Key Laboratory of Petroleum Pollution Control, Beijing 102206, China;

3. CNPC Research Institute of Safety and Environment Technology, Beijing 102206, China;

4. National Key Laboratory of Heavy Oil Research, Beijing 102249, China;

5. Beijing Key Laboratory of Oil and Gas Pollution Control, Beijing 102249, China;

6. Daqing Oilfield Water Environmental Protection Company, Daqing 163712, China)

Abstract: In order to explore the characteristics of microbial community structure and the potential of pollution reduction and carbon sequestration in petroleum contaminated soil, four typical oil and gas field enterprises in-service well sites of eastern, central, northwestern and southwestern China are selected as the research areas, combined with 16S rRNA high-throughput sequencing and bioinformatics technology, the changes of microbial community structure and main environmental driving factors of potential pollution reduction and carbon sequestration in surface soil (0~20 cm) of different oil fields were explored, and the metabolic pathways related to pollution reduction and carbon sequestration were predicted and functionally annotated.

The results show that total nutrient and microbial biomass of soil in different oil fields generally exhibit the highest levels in the eastern oilfields, relatively close levels in the southwestern and northwestern oil fields, and the lowest levels in the central oil fields. The dominant bacteria in the soil of the study area were Proteobacteria, Actinobacteriota, Chloroflexi, Bacteroidota and Acidobacteriota. Based on the results of VPA and RDA analysis, MBC, MBN, RubisCO enzyme activity and TPH were the main driving environmental factors affecting the change of microbial community structure in contaminated soil. Among them, TPH ($r^2=0.67$, $P=0.001$), MBC ($r^2=0.36$, $P=0.004$ 2), MBN ($r^2=0.74$, $P=0.003$) and RubisCO enzyme activity ($r^2=0.37$, $P=0.004$ 1) were significantly correlated with microbial community structure. The functional annotation results of KEGG database showed that the relative abundance of metabolic pathways related to microbial carbon sequestration in contaminated soils of different oilfields was significantly higher than that of metabolic pathways related to the degradation of organic matter such as petroleum hydrocarbons, and the relative abundance of the above two types of pathways was small among different oilfields. The results are of great significance to support the development of pollution reduction and sink increase technology in petroleum and petrochemical industry under the new situation.

Key words: oil pollution; pollution-reducing and carbon-fixing soil microorganisms; microbial community structure characteristics; metabolic function

《京都议定书》签订以来,以全球变暖为代表的气候问题已成为最受关注的环境问题与发展挑战之一^[1-3]。石油和天然气行业是传统的碳排放“大户”,据国际能源署发布的《2022年二氧化碳排放报告》^[4]显示,全球二氧化碳排放量约368亿t/a,其中石油和天然气排放的二氧化碳约113亿t/a,占全球碳排放总量的近1/3。目前,全球各大石油公司相继提出“碳中和目标”及相应的碳减排举措^[5,6],主要包括优化产业结构、减少直接碳排放、清洁能源替代、碳捕集与封存和生态系统碳汇等。

陆地生态系统固碳是最经济可行和环境友好的降碳途径之一^[7],土壤作为陆地生态系统最大的碳库^[8,9],其碳储量相当于大气、植物碳库的2~3倍^[10]。我国土壤碳储量和固碳潜力巨大,其碳储量约为100~160 Pg C(相当于3 000亿t CO₂),年固碳速率约为2.8亿t CO₂^[11-13]。据此,提高土壤生态系统碳储量和固碳能力,已成为全球变化研究的热点和焦点。

传统上,土壤有机碳储量的研究集中在植物源碳对土壤有机碳库的重要贡献等方面^[14,15],然而,“土壤微生物碳泵”^[16,17]等新概念强调了微生物在土壤有机碳存储中的积极作用,逐渐将土壤有机碳库的主要贡献转向微生物源碳的周转和调控过程,研究热点主要集中在土壤碳汇和各组分的周转及其微生物响应机制^[18,19]。双碳背景下,石油石化场地污染形势较为严峻,石油污染对土壤微生物群落产生选择性压力,导致其形成独特的群落结构。近年来石油烃降解微生物在碳代谢中的作用受到越来越多国内外学者的关注^[20-23],但石油烃污染胁迫下土壤生境中是否存在固碳微生物及其固碳机制方面研究则鲜有报道。据此,本研究将传统生物修复技术关注的重点由“石油烃等污染物降解微生物”扩展至“降污、固碳微生物群体”,

开展石油污染土壤降污、固碳微生物群落结构特征与代谢功能研究,对支撑新形势下石油石化行业减污增汇技术发展具有重要意义。

综上,本研究以我国典型油气田企业在役井场石油污染表层土壤为对象,利用高通量测序技术及生物信息学分析手段,开展污染土壤潜在降污、固碳微生物群落结构分析,揭示潜在降污、固碳微生物群落与环境因子的响应关系及环境解释度,预测及注释微生物降污、固碳相关代谢通路,为解析石油烃等有机污染物胁迫下土壤生境中的微生物降污、固碳理论及其协同作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究区及样品基础信息

本研究选取我国东部、中部、西北部及西南部地区4个典型油气田企业在役井场为研究区域,各研究区开发阶段、地理位置、气候类型、土壤类型等见表1。于2023年9月,在各研究区在役井场随机选取4处不同污染区块为采样点,分别设置10 m×10 m的样方,利用五点采样法采集石油污染表层土壤(0~20 cm)约1 kg,充分混匀后装入无菌自封袋中,用冰袋冷藏运回实验室。本研究共计采集供试土壤样品16个,分别以E1~E4表示东部某油田样品、M1~M4表示中部某油田样品、NW1~NW4表示西北部某油田样品、SW1~SW4表示西南部某油田样品。

样品去除动植物残体及砾石后平均分为3份,一份自然风干后过2 mm筛,用于测定土壤理化指标及总石油烃含量;一份置于-20℃冰箱保存,用于测定土壤微生物量碳氮及1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RubisCO酶)活性;最后一份置于-80℃超低温冰箱保存,用于土壤微生物多样性测序。土壤理化指标、

表 1 研究区开发阶段、环境气象信息和土壤类型
Table 1 The development stage, environmental meteorological information and soil type in the study areas

研究区	开发阶段	地理位置	气候类型	平均 海拔/m	年平均 气温/℃	年平均 降水量/mm	土壤类型
东部某油田	开发中后期	38°43′00″N, 117°30′00″E	季风半湿润气候	<5	14~16	500~600	以草甸土和滨海盐土为主 ^[24, 25]
中部某油田	开发中后期	37°09′53″N, 107°37′11″E	半干旱/干旱气候	1 000~1 400	6~14	200~400	以栗钙土、棕壤、褐土为主 ^[26, 27]
西北部某油田	开发中后期	42°55′15″N, 89°25′53″E	温带大陆性气候	500~1 000	9~10	<100	以钙层土、漠土为主 ^[28, 29]
西南部某油田	开发中后期	31°74′24″N, 104°46′12″E	亚热带季风气候	250~1 500	17~20	1 200~1 300	以赤红壤、红壤、黄壤为主 ^[30, 31]

总石油烃含量、微生物量碳氮、RubisCO 酶酶活性均在收到样品后一周内完成测试。

1.2 土壤理化生指标及分析测试方法

本研究测定的指标分为物理、化学、生物 3 类指标,其中,物理指标为土壤含水率;化学指标包括土壤 pH、总磷(TP)、总氮(TN)、土壤有机碳(SOC)4 种;生物指标包括微生物量碳(MBC)、微生物量氮(MBN)2 种。每个样品设置 3 个平行。样品理化生指标及分析测试方法见表 2。

表 2 样品理化生指标及测试方法 Table 2 Physiochemical and biochemical indexes of samples and determination methods		
指标分类	测定指标	测试方法
物理指标	含水率	烘干法(105 ℃) ^[32]
	土壤 pH	1:2.5 水土比电位法 ^[32]
化学指标	TP	碱熔-钼锑抗分光光度法 ^[32]
	TN	凯氏定氮法 ^[32]
	SOC	燃烧法 ^[32]
生物指标	MBC	熏蒸提取法 ^[32]
	MBN	熏蒸提取法 ^[32]

1.3 土壤总石油烃测试方法

土壤总石油烃(total petroleum hydrocarbons, TPH)参照《土壤和沉积物 石油烃(C10~C40)的测定气相色谱法》(HJ 1021-2019)测定。测试方法如下:称取 10.00 g 新鲜土壤样品于研钵中,加入适量硅藻土研磨至流砂细粒状,利用快速溶剂萃取仪(AES-350 型,美国赛默飞世尔科技公司)萃取研磨后样品,萃取剂为丙酮-正己烷混合液(体积比 1:1,色谱级),萃取条件为:萃取压力 1 500 psi,萃取温度 120 ℃,静态萃取 5 min,淋洗体积 60%,氮气吹扫 60 s,循环 2 次,收集萃取液。萃取液经 100 mL 超纯水振荡(RS-2A 型,常州上特仪器有限公司)洗涤 2 次后保留上层有机相,利用无水硫酸钠(优级纯)脱水后旋转蒸发(RV 10 型,德国 IKA 公司)浓缩至 1.00 mL,即得待测样品。

利用气相色谱法测定待测样品中总石油烃含量,色谱柱选择毛细管色谱柱(DB-5MS 型,柱长 30 mm×内径 0.32 mm×膜厚 0.25 μm)。仪器条件为:进样口温度 300 ℃,检测器温度 325 ℃,不分流进样,进样量 1 μL。色谱柱升温程序设置为:初始温度 50 ℃保持 2 min,以 40 ℃/min 升温至 230 ℃,以 20 ℃/min 升温至

320 ℃保持 20 min;载气为高纯氮气(纯度≥99.999%,流量为 1.5 mL/min)。

样品中总石油烃含量见表 3。

表 3 不同油田污染土壤样品总石油烃含量 Table 3 Total petroleum hydrocarbon content of contaminated soil samples in different oil fields (mg/kg)			
样品编号	总石油烃含量	样品编号	总石油烃含量
E1	43.04±9.72 p	NW1	117.37±8.89 o
E2	247.53±23.51 m	NW2	224.33±14.73 n
E3	784.85±21.28 h	NW3	270.92±27.73 l
E4	1 266.18±16.26 f	NW4	323.56±30.66 k
M1	896.33±17.37 g	SW1	426.57±22.73 j
M2	1 636.67±58.54 c	SW2	770.74±52.33 i
M3	2 726.67±33.92 b	SW3	1 420.89±33.90 e
M4	3 950.04±30.65 a	SW4	1 600.41±39.59 d

注:不同字母代表显著性差异(P<0.05)。

1.4 RubisCO 酶活性测定方法

1.4.1 样品前处理

称取新鲜土壤样品 1.00 g,加入 10 mL 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2~7.4),置于多管漩涡振荡器(UMV-1 型,北京优晟联合科技有限公司)中震荡 30 s 后,4 000 r/min 离心(5427-R 型,德国 Eppendorf 公司)15 min,所得上清液即为待测样品。

1.4.2 RubisCO 酶酶联免疫分析方法

利用土壤 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RubisCO)ELISA 试剂盒(上海瑞番生物科技有限公司)测定 RubisCO 酶活性,测定方法严格参照试剂盒说明书,具体如下:(1)设置标准品孔。在 96 孔酶标板中设置 6 个标准品孔,每孔加入 50 μL 标准品,浓度梯度依次为 0、5、10、20、40、80 U/L,每个梯度设置 5 个平行。(2)加样。设置 16 个样品孔及 1 个空白孔,样品孔中加入待测样品 10 μL 后再加入样品稀释液 40 μL,每个样品设置 5 个平行。(3)温育。标准品孔和样品孔均加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的检测抗体 100 μL,封板膜封板后在 37 ℃下温育(HH-4 型,江苏省金坛市友联仪器研究所)60 min。空白孔除不加样品及酶标抗体外,其余步骤相同。(4)洗板。每孔注入洗液 350 μL,浸泡 1 min 后置于自动洗板机(RT-3000 型,北京维欣仪奥科技发展有限公司)洗板 5 次。(5)显色。每孔加入底物 A、B 各 50 μL,

37 ℃避光孵育 15 min。(6)测定。加入终止液 50 μL, 15 min内测定各孔 450 nm 波长吸光度(OD 值)(Synergy H1 型,美国 BioTek 公司)。(7)样品 RubisCO 酶活性值计算。以标准品浓度为横坐标,对应 OD 值为纵坐标绘制标准品线性回归曲线,按照曲线方程计算各样品浓度值,即为样品 RubisCO 酶活性值。

样品中 RubisCO 酶活性见表 4。

表 4 不同油田污染土壤样品 RubisCO 酶活性

Table 4 RubisCO enzyme activity in different oilfield contaminated soil samples (U/L)

样品编号	酶活性	样品编号	酶活性
E1	72.25±2.39 b	NW1	36.23±3.36 k
E2	39.73±1.25 ij	NW2	70.28±1.48 b
E3	53.21±3.04 f	NW3	60.50±2.05 d
E4	45.57±1.87 g	NW4	41.95±2.94 hi
M1	42.84±3.06 h	SW1	30.91±1.26 l
M2	77.12±2.31 a	SW2	57.27±1.83 e
M3	38.84±2.81 jk	SW3	45.94±2.49 g
M4	67.26±2.69 c	SW4	61.83±2.09 d

注:不同字母代表显著性差异($P<0.05$)。

1.5 高通量测序

1.5.1 土壤样品 DNA 提取

根据 DNeasy® 96 PowerSoil® Pro QIAcube® HT Kit 说明书提取样品微生物群落总 DNA,利用超微量分光光度计(NanoDrop 2000 型,美国赛默飞世尔科技公司)和 1% 的琼脂糖凝胶测定 DNA 浓度和纯度。

1.5.2 高通量测序与微生物多样性分析

采用引物 338F(5′-ACTCCTACGGGAGGCGAG-CAG-3′)和 806R(5′-GGACTACHVGGGTWTCTA-AT-3′)对样品 16S rRNA 基因的 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增。扩增反应程序为:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,29 个循环,72 ℃最终延伸 10 min。PCR 扩增体系(20 μL)为:5× FastPfu Buffer 4 μL,2.5 nmol/L dNTPs 2 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL,BSA 溶液 0.2 μL,引物 338F 和 806R 各 0.8 μL,模板 DNA 10 ng,加无菌 ddH₂O 至 20 μL。利用 Miseq PE300 平台(美国 Illumina 公司)进行样品微生物多样性测序,测序平台由上海美吉生物医药科技有限公司提供。

使用 fastp(<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.20.0)及 FLASH(<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>, version 1.2.7)软件对原始测序序列进行质控及拼接;根据 97% 的相似度,选择 UPARSE 软件(<http://drive5.com/uparse/>, version 7.1)对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体;利用 RDPclassifier(<http://rdp.cme.msu.edu/>, version 2.2)对每条序列进行物种分类注释,比对 Silva 16S rRNA 数据库(v138),设置比对阈值为 70%。使用 R 语言软件(version 3.3.1)绘制分

别绘制 Venn 图及群落组成图;使用 R 语言软件(version 3.3.1)vegan 包(2.4.3)进行方差膨胀因子分析并绘制冗余分析图;利用 PICRUST2 软件(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy>)结合 KEGG 数据库预测样品中微生物群落基因功能并进行功能注释,利用 OriginPro 2016 软件绘制代谢通路相对丰度图。

1.6 数据统计方法

图表中数据以均值±标准差($n=3$)形式表示,利用 SPSS 20.0 软件单因素方法进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 不同油田污染土壤理化生指标变化

不同油田污染土壤样品理化生指标变化情况见图 1。由图 1 可知,不同油田土壤基础理化生指标整体存在较大地域差异。从物理指标来看,土壤含水率呈现东部油田>西南部油田>西北部油田>中部油田的趋势,分别为 23.75%±1.12%、12.43%±0.22%、6.28%±0.09%、5.36%±0.37%。从化学指标来看,研究区土壤平均 pH 呈碱性,除东部油田土壤 pH<8.5 外,中部、西北部及西南部油田土壤 pH 均>8.5,在 8.53~8.74 之间;土壤有机碳含量方面,东部油田最高,有机碳含量为(60.25±0.94) g/kg,其次为中部油田,有机碳含量为(38.68±1.90) g/kg,西南部及西北部油田有机碳含量最低,分别为(15.15±0.54) g/kg 和(4.19±0.02) g/kg;东部油田土壤 TN 含量最高,达(3.44±0.07) g/kg,中部、西北部、西南部油田土壤 TP 含量差异不大,分别为(0.56±0.02)、(0.75±0.03)和(0.70±0.03) g/kg;东部、中部油田土壤 TN 含量较为接近,分别为(1.30±0.05)和(1.72±0.02) g/kg,西南部与西北部油田土壤 TN 平均含量基本一致,分别为(0.58±0.04)和(0.46±0.06) g/kg。从生物指标来看,不同油田土壤 MBC 及 MBN 变化趋势基本相似,均为西南部油田(MBC 为(1 575.85±182.43) mg/kg,MBN 为(184.26±4.03) mg/kg)高于东部、中部及西北部油田(MBC 分别为(2 308.96±184.73)、(393.56±29.13)、(341.17±49.51) mg/kg;MBN 分别为(35.13±1.27)、(20.70±1.74)、(12.56±0.37) mg/kg)。

综上,不同油田土壤 pH 均呈碱性,其全量养分及微生物生物量大致呈东部油田最高,西南部及西北部较为接近,中部油田最低的趋势,表明东部油田土壤质量和营养状况最优^[33]。

2.2 不同油田污染土壤微生物群落结构变化

Alpha 多样性指数是用于评价土壤微生物群落多样性和丰富度的综合性指标^[34],常用的度量指数包括 Shannon、Sobs、Ace 等指数。其中,Shannon 指数代表

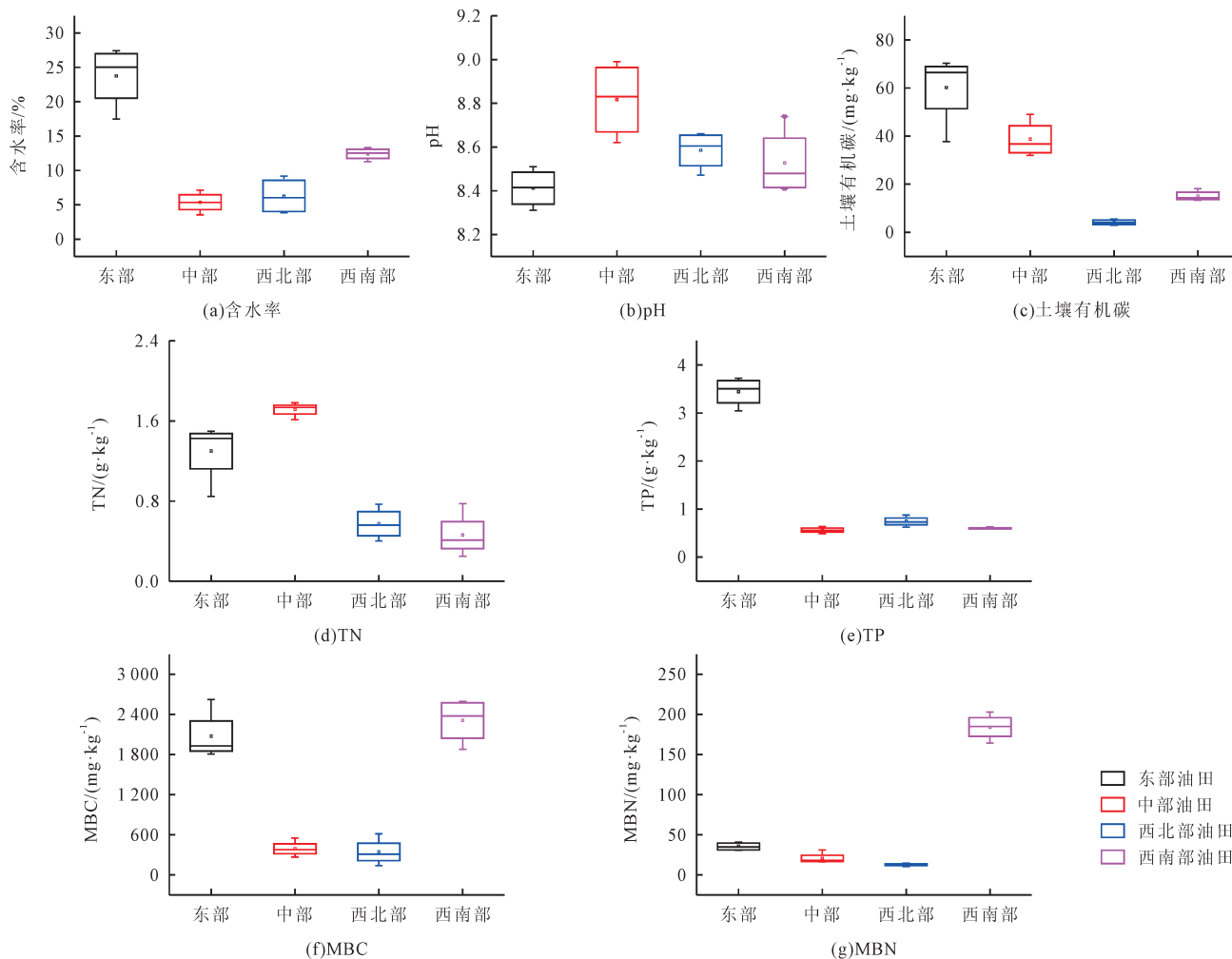


图1 不同油田污染土壤样品理化生指标变化情况

Fig.1 The changes of basic physical, chemical and biological indexes of contaminated soil samples in different oil fields

样品群落多样性,其数值越高,反映对应样品的群落多样性越丰富;Ace、Sobs 指数代表样品群落丰富度,其数值越高,反映对应样品的物种数越多。不同油

田污染土壤样品 Alpha 多样性变化情况见表5。由表5可知,所有样品覆盖度(Coverage)均在0.97 以上,表明所得测序结果可以代表土壤样品所提取 DNA 中的

表 5 不同油田污染土壤样品 Alpha 多样性指数
Table 5 Alpha diversity index of contaminated soil samples from different oil fields

研究区	样品编号	Shannon	Ace	Sobs	Coverage
东部油田	E1	6.71	4 859.73	3 359.00	0.98
	E2	6.69	4 740.41	3 302.00	0.97
	E3	6.22	4 277.82	2 983.00	0.97
	E4	5.90	4 892.10	2 710.00	0.97
中部油田	M1	5.63	1 746.65	1 389.00	0.99
	M2	5.53	1 906.62	1 493.00	0.99
	M3	5.46	1 985.44	1 516.00	0.98
	M4	5.26	1 739.92	1 315.00	0.99
西北部油田	NW1	4.85	1 347.80	1 033.00	0.99
	NW2	5.77	2 545.89	2 089.00	0.98
	NW3	5.80	2 235.53	1 782.00	0.98
	NW4	5.78	3 186.91	2 388.00	0.97
西南部油田	SW1	3.85	934.18	680.00	0.99
	SW2	4.07	817.60	548.00	0.99
	SW3	4.61	1 234.40	939.00	0.99
	SW4	4.56	1 342.06	991.00	0.99

细菌微生物群落的真实情况。不同油田土壤微生物群落多样性及丰富度存在差异,其中,东部油田样品 Shannon、Ace 及 Sobs 指数均高于其他3个油田,表明该区域土壤微生物物种丰度及多样性最高,其次为中部及西北部油田,西南部油田最低。

对不同油田的16个土壤样品进行16S rRNA 基因 V3~V4 区测序,共获得2 587 096 条优化序列,以97%的核酸相似性聚类,得到6 309 个操作性分类单元 (operational taxonomic units, OTU),其包含6 门,62 纲,234 目,446 科,996 属,2 195 种,不同油田污染土壤样品属水平物种 Venn 图见图2。由图2可知,研究区土壤样品检测到的共有属水平物种数为456 个,占属水平物种总数的45.78%。特有属水平物种数东部油田最多(2 715 个),其次为中部油田(2 230 个),西北部和西南部油田特有属水平物种数较少,分别为605 个和377 个。

将OTU 平均相对丰度小于1%的门水平物种归入其他类别(others),绘制不同油田污染土壤样品门水平微生物群落结构图,见图3。如图3所示,不同油田样品相对丰度前2的门水平优势物种类别相同,均为变形杆菌门(Proteobacteria,东部、中部、西北部、西南

部油田样品平均相对丰度分别为42.25%、33.89%、22.99%和40.52%)、放线菌门(Actinobacteriota,东部、中部、西北部、西南部油田样品平均相对丰度分别为29.93%、23.61%、26.78%和29.62%);相对丰度排名第3的门水平物种种类略有不同,其中,东部及中部油田为绿弯菌门(Chloroflexi,东部及中部油田平均相对丰度分别为7.07%和19.19%),西北部油田为拟杆菌门(Bacteroidota,平均相对丰度为14.94%),西南部油田为酸杆菌门(Acidobacteriota,平均相对丰度为11.94%)。

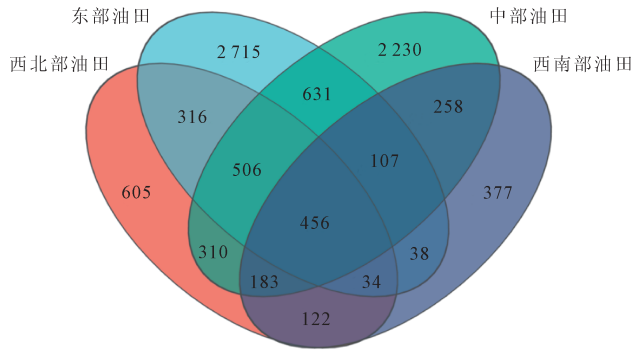


图2 不同油田污染土壤样品物种Venn图(属水平)
Fig.2 Venn diagram of different oilfield contaminated soil samples (genus level)

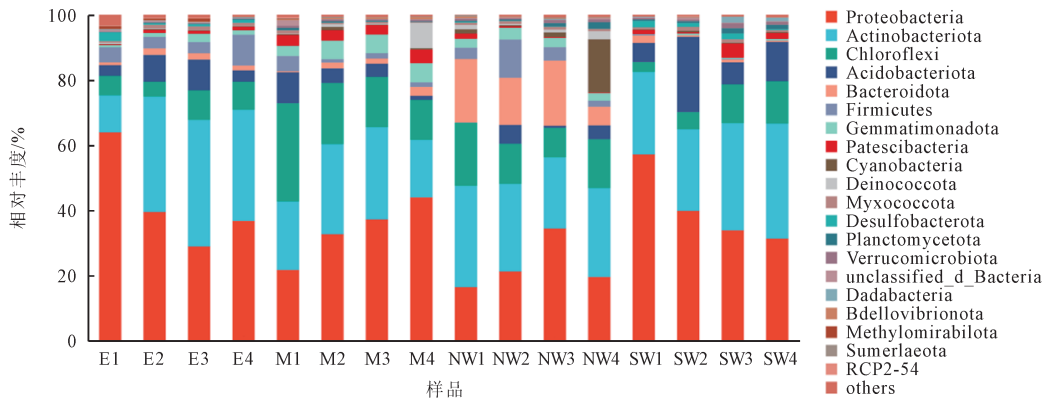


图3 不同油田污染土壤样品微生物群落组成图(门水平)
Fig.3 Microbial community composition map of contaminated soil samples from different oil fields (phylum level)

上述5个优势菌门均为已报道的石油污染土壤中常见优势物种^[35-44],且亦被发现具备较强的固定CO₂能力^[45-51],多通过卡尔文循环、还原性三羧酸循环等微生物固碳途径实现光合碳固定^[34],为我国东部平原^[46]、北部草原^[52]、西北部黄土高原^[53]、西南部农田^[54]等陆地生态系统碳固定的特征微生物。据此,推测变形杆菌门、放线菌门、绿弯菌门等5个优势菌门为石油污染土壤中潜在降污、固碳微生物物种,可能兼具降解石油烃等有机物及固定二氧化碳的双重能力,该推测有待进一步论证。

2.3 不同油田污染土壤潜在降污、固碳微生物群落

与环境因子的相关性分析及环境解释
为明确环境因子对研究区土壤降污、固碳微生物群落结构的影响,本研究选取TPH代表石油烃污染因素类环境因子,选取土壤pH、含水率、SOC、TN、TP等5种理化指标代表土壤因素类环境因子,选取MBC、MBN、RubisCO酶活性等3种微生物指标代表微生物因素类环境因子。将上述3类9种环境因子进行方差膨胀因子(variance inflation factor, VIF)分析,剔除具有共线性关系(VIF>10)的环境因子,筛选后环境因子(VIF<10)如表6所示。

表 6 VIF 筛选后环境因子
Table 6 Environmental factors after VIF screening

筛选后环境因子	土壤 pH	SOC	TN	TP	MBC	MBN	TPH	RubisCO 酶活性
VIF 值	2.19	5.43	6.43	4.25	6.74	3.84	2.86	2.26

选取 VIF 筛选后环境因子进行 VPA (variance partitioning analysis) 方差分解分析(图 4), 定量评估 3 类环境因子对不同油田污染土壤微生物群落差异的单独解释度和共同解释度, 揭示不同类别环境因子对菌群结构/功能特征变化的影响。VPA 分析发现, 3 类环境因子共同解释了微生物群落变异的 47.13%, 其中微生物因素类环境因子单独解释度最高, 为 21.98%, 其次为石油烃污染因素类环境因子, 单独解释度为 15.50%, 单独解释度最低的为土壤因素类环境因子, 单独解释度仅为 6.61%; 微生物因素类及石油烃污染因素类环境因子可共同解释 12.28% 的微生物群落变异。据此, 推测 MBC、MBN、RubisCO 酶活性、TPH 为不同油田污染土壤生物群落组成和结构变化的主要驱动环境因子。微生物量碳、微生物量氮作为土壤碳库和氮库的重要组成部分, 在调节土壤碳氮循环中发挥着重要作用^[55,56], 可能是导致研究区土壤微生物群落变化的主要原因之一; 卡尔文循环参与土壤生态系统的 CO₂ 固定和初级产物的合成^[57], 是土壤自养微生物同化 CO₂ 的主要途径^[58], RubisCO 酶是控制其循环速率的关键限速酶^[20]; 石油类污染物是影响土壤生态环境和微生物群落功能、结构的另一重要因素^[59-61], 刘志号等^[62]、左小虎等^[63]研究者均证实, 石油污染水平主要作用于土壤微生物碳代谢过程, 与碳代谢及碳固定相关的微生物群落基本可以代表石油污染土壤的关键群落, 上述结论与 2.2 节结论吻合。

此外, 本研究中 3 类环境因子的共同解释度相对较低, 尚有 52.87% 的变异无法解释, 这可能与其它未测量但重要的环境因子^[64] (例如, 微生物间相互作用等^[65,66]) 或方法^[67] 的局限性有关。

主要驱动环境因子(MBC、MBN、RubisCO 酶活性、TPH)与土壤微生物群落结构冗余分析(redundancy analysis)结果显示(图 5、表 7), RDA 轴 1 和轴 2 的

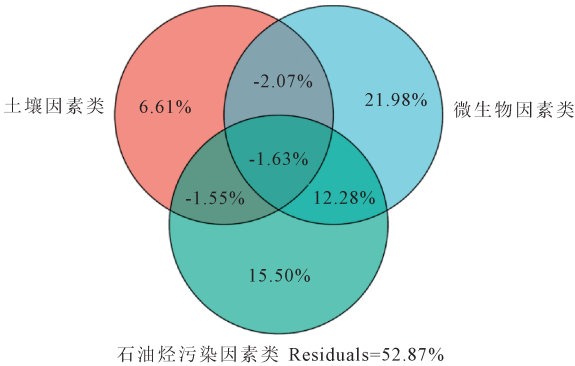


图4 环境因子解释微生物群落变异百分比的方差分解分析(VPA)
Fig.4 Variance decomposition analysis (VPA) of environmental factors explaining the percentage variation of microbial communities

解释变异量之和为 34.65% (轴 1、轴 2 分别解释变异量的 27.17% 和 7.48%), 再次证实上述 4 种环境因子在一定程度上影响土壤微生物群落的相对变化。同时, TPH ($r^2=0.67$ 、 $P=0.001$) 与微生物群落结构具有显著相关性, MBC ($r^2=0.36$ 、 $P=0.004\ 2$)、MBN ($r^2=0.74$ 、 $P=0.003$)、RubisCO 酶活性 ($r^2=0.37$ 、 $P=0.004\ 1$) 次之, 且共同影响了微生物群落关系。

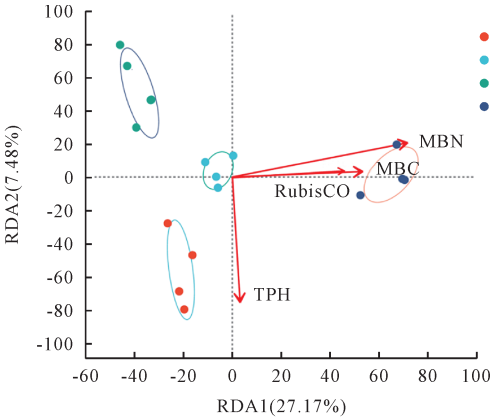


图5 微生物群落结构与主要驱动环境因子的冗余分析(RDA分析)
Fig.5 Redundancy analysis (RAD) of microbial community structure and main driving environmental factors

表 7 微生物群落组成与主要驱动环境因子相关性系数 (门水平)
Table 7 Correlation coefficient between microbial community composition and main driving environmental factors (phylum level)

主要驱动环境因子	MBC	MBN	RubisCO 酶活性	TPH
r^2	0.36	0.74	0.37	0.67
P	0.042	0.003	0.041	0.001

2.4 不同油田污染土壤微生物潜在降污、固碳代谢通路分析

基于 2.2、2.3 节结论, 为进一步探究不同油田污染土壤中潜在降污、固碳微生物基因功能信息, 本研究

利用 PICRUST2 软件、KEGG 基因数据库对比分析, 预测各样品中微生物群落基因功能^[68]。KEGG 数据库^[34]包括细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、新陈代谢和机体系统共计 6 类一级代谢通路。

不同油田污染土壤样品微生物一级代谢通路相对丰度见表8。由表8可知,各样品微生物一级代谢通路相对丰度呈新陈代谢>遗传信息处理>环境信息处理>

细胞过程>人类疾病>机体系统的规律,且新陈代谢通路占比均高于76.00%,故后续重点针对该通路进行深入分析。

表8不同油田污染土壤样品微生物一级代谢通路相对丰度

Table 8Relative abundance of primary metabolic pathways in different oilfield contaminated soil samples (%)

样品名称	一级代谢通路					
	新陈代谢	遗传信息处理	环境信息处理	细胞过程	人类疾病	机体系统
E1	78.26	6.67	5.37	4.44	3.33	1.93
E2	79.17	6.28	5.18	3.99	3.35	2.02
E3	77.52	6.95	5.46	4.58	3.59	1.91
E4	78.10	6.61	5.52	4.55	3.35	1.86
M1	78.65	7.11	4.82	4.42	3.26	1.75
M2	78.29	6.62	5.08	4.58	3.57	1.86
M3	77.95	6.54	5.21	4.74	3.68	1.88
M4	77.57	6.55	5.49	4.84	3.71	1.84
NW1	79.43	6.79	4.86	3.93	3.16	1.82
NW2	78.38	6.89	5.20	4.38	3.32	1.84
NW3	78.54	6.68	5.18	4.37	3.38	1.85
NW4	78.56	6.41	5.31	4.23	3.57	1.92
SW1	77.32	5.89	6.02	4.81	3.87	2.09
SW2	78.33	6.33	5.06	4.54	3.81	1.94
SW3	79.68	6.39	4.78	3.87	3.35	1.93
SW4	79.71	6.38	4.81	3.86	3.31	1.94

新陈代谢二级通路包括能量代谢及外源物质生物降解2条通路。其中,能量代谢中与微生物固碳过程密切相关的2条三级代谢通路分别为原核生物碳固定及光合作用生物碳固定;外源物质生物降解涵盖21条三级代谢通路,其中,苯酸盐降解、氨基苯甲酸酯降解、苯乙烯降解等16条通路与石油烃等有机物降解过程密切相关。据此,本研究选取上述18条三级代谢通路分别表征微生物固碳过程^[69]和石油烃等有机物降解过程^[70,71]。不同油田污染土壤微生物降污、固碳相关代谢通路功能注释及相对丰度见图6。

由图6可知,全部样品中与微生物固碳过程相关的代谢通路相对丰度均显著高于与石油烃等有机物降解相关的代谢通路,且上述2类代谢通路占比在不同油田之间差异较小,分别介于9.28%~10.75%和1.36%~1.55%之间,表明石油污染胁迫下土壤碳代谢微生物普遍存在且光合碳固定过程更为活跃。固碳相关代谢通路方面,均注释到原核生物碳固定及光合作用生物碳固定2条通路,其中,原核生物碳固定通路平均相对丰度为14.18%(东部、中部、西北部、西南部油田分别为14.20%、15.31%、14.12%、13.10%),光合作用生物碳固定通路平均相对丰度为6.04%(东部、中部、西北部、西南部油田分别为5.89%、6.20%、6.63%、5.45%),推测土壤微生物光合碳固定的主要贡献者为细菌等原核生物,该结论与Lu等^[72]、Tian等^[73]、韩亚西等^[74]研究结果相同。石油烃等有机物降解方面,注释到相对丰度排名前3的通路依次为苯酸盐降解(平均

相对丰度为6.86%,东部、中部、西北部、西南部油田分别为7.28%、6.55%、6.54%、5.09%)、氨基苯甲酸酯降解(平均相对丰度为3.04%,东部、中部、西北部、西南部油田分别为2.96%、3.06%、2.61%、3.52%)、氯烷和氯烯烃降解(平均相对丰度为2.64%,东部、中部、西北部、西南部油田分别为2.43%、2.62%、2.49%、3.00%)。苯环类及卤代烃类有机物降解通路相对丰度较高,表明石油烃类难降解有机底物所产生的环境胁迫压力,激发了微生物对底物碳源代谢酶系的选择性表达^[75-77]。据此,进一步证实不同油田污染土壤中存在具备降污、固碳功能的微生物类群,与本课题组前期研究结论相符^[71]。

目前,土壤固碳微生物的研究热点主要集中在农田、森林、草原等无污染生境土壤的有机碳组分转化及微生物互作关系^[78],针对石油烃等难降解有机物胁迫下降污、固碳微生物类群共存及作用机制等方面的研究鲜有报道,后续亟待围绕石油污染胁迫下碳代谢微生物协同作用机制开展深入研究。

3 结论

不同油田土壤基础理化指标地域变化较大,土壤全量养分大致呈东部油田>西南部油田>西北部油田>中部油田的趋势;中部油田样品石油烃污染较为严重;不同油田土壤微生物群落多样性及丰富度存在差异。东部油田土壤样品 Shannon、Ace 及 Sobs 指数均高于其他3个油田;土壤微生物优势菌为变形杆菌门、放线菌门、绿弯菌门、拟杆菌门、酸杆菌门,以上门

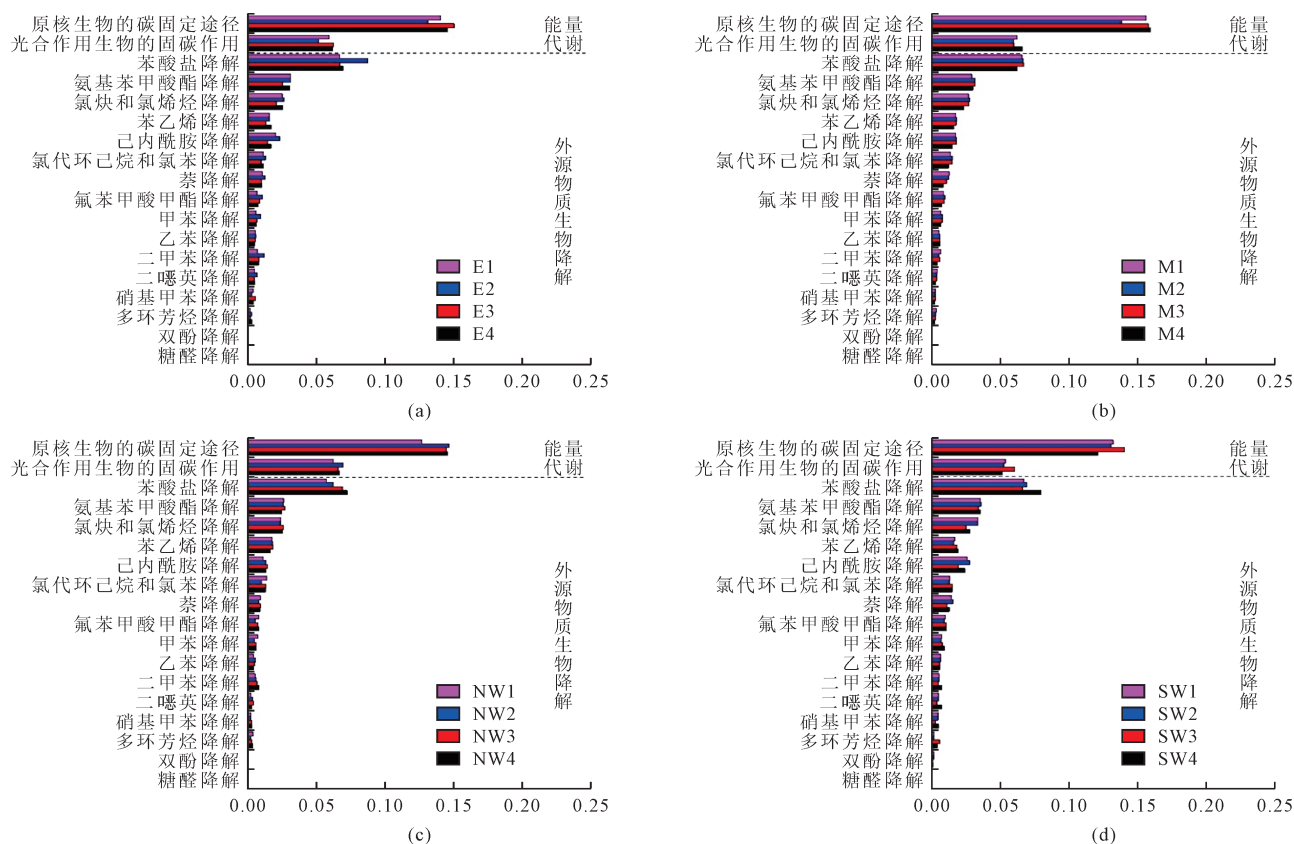


图6 不同油田污染土壤样品微生物降污固碳相关代谢通路相对丰度图
Fig.6 The relative abundance of metabolic pathways related to microbial pollution reduction and carbon sequestration in different oilfield contaminated soil samples

水平微生物推测为石油污染土壤中潜在降污、固碳微生物物种; VPA、RDA 分析结果推测, MBC、MBN、RubisCO 酶活性、TPH 可能为不同油田污染土壤生物群落结构变化的主要驱动环境因子。KEGG 数据库功能注释结果表明, 不同油田污染土壤微生物降污、固碳相关代谢通路占比差异较小, 分别介于 9.28%~10.75% 和 1.36%~1.55% 之间, 表明不同油田污染土壤碳代谢微生物普遍存在且光合碳固定过程更为活跃。

[参考文献]

- [1] 李瑞祥,王鑫,李田. 低碳污水微生物氮转化工艺研究进展[J]. 工业水处理, 2022,42(6):22-32.
- Li Ruixiang, Wang Xin, Li Tian. Research progress on the microbial technology of nitrogen transformation from low carbon wastewater[J]. Industrial Water Treatment, 2022, 42(6):22-32.
- [2] 李瑞祥,李田,张晓林,等. 微生物电化学技术在石油烃污染土壤修复中的应用研究进展[J]. 中国环境科学, 2023,43(6):3042-3054.
- Li Ruixiang, Li Tian, Zhang Xiaolin, et al. Application and progress of microbial electrochemical technology in the remediation of petroleum contaminated soil[J]. China Envi-

Environmental Science, 2023,43(6):3042–3054.

- [3] Abraham J, Cheng L J, Mann M E, et al. The ocean response to climate change guides both adaptation and mitigation efforts[J]. Atmospheric and Oceanic Science Letters, 2022, 15(4):58–66.
- [4] 王铃. IEA发布《2022年全球二氧化碳排放》报告[J]. 石油炼制与化工, 2023,54(6):110.
Wang Ling. The Report on “Global CO₂ Emissions 2022” Released by IEA[J]. Petroleum Processing and Petrochemicals, 2023,54(6):110.
- [5] 崔翔宇,刘光全,薛明,等. “碳中和”目标下我国油气行业甲烷管控的挑战与应对[J]. 油气与新能源, 2021,33(2):43–45.
Cui Xiangyu, Liu Guangquan, Xue Ming, et al. “carbon neutrality” targeted regulation of methane in petroleum industry [J]. Petroleum and New Energy, 2021,33(2):43–45.
- [6] 李司宇,张琬. 关于国际石油公司能源转型和碳资产管理的思考[J]. 天然气与石油, 2021,39(5):115–119.
Li Siyu, Zhang Wan. Thoughts on energy transformation and carbon assets management of international oil companies[J]. Natural Gas and Oil, 2021,39(5):115–119.
- [7] 刘峰,赵鹏程,张昀,等. 从微生物角度揭示气候变暖对土壤有机碳转化影响的研究综述[J]. 土壤通报, 2022,53(6): 1492–1498.

- Liu Feng, Zhao Pengcheng, Zhang Yun, et al. Effects of climate warming on soil organic carbon storage from the viewpoint of soil microorganism[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2022,53(6):1492–1498.
- [8] 杨颖,吴福忠,吴秋霞,等. 陆地生态系统土壤铁结合态有机碳:含量、分布与调控[J]. 科学通报, 2023,68(6):695–704.
- Yang Ying, Wu Fuzhong, Wu Qiuxia, et al. Soil organic carbon associated with iron oxides in terrestrial ecosystems: content, distribution and control[J]. Chinese Science Bulletin, 2023,68(6):695–704.
- [9] 刘苗,刘国华. 土壤有机碳储量估算的影响因素和不确定性[J]. 生态环境学报, 2014,23(7):1222–1232.
- Liu Miao, Liu Guohua. Impact factors and uncertainties of the estimation on soil organic carbon storage[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2014,23(7):1222–1232.
- [10] Chen L Y, Liu L, Qin S Q, et al. Regulation of priming effect by soil organic matter stability over a broad geographic scale[J]. Nature Communications, 2019,10(1):5112.
- [11] Tang X L, Zhao X, Bai Y F, et al. Carbon pools in China's terrestrial ecosystems: new estimates based on an intensive field survey[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018,115(16):4021–4026.
- [12] Schuh A E, Byrne B, Jacobson A R, et al. On the role of atmospheric model transport uncertainty in estimating the Chinese land carbon sink[J]. Nature, 2022,603(7901):E13–E14.
- [13] Wang J, Feng L, Palmer P I, et al. Large Chinese land carbon sink estimated from atmospheric carbon dioxide data[J]. Nature, 2020,586(7831):720–723.
- [14] Sanderman J, Hengl T, Fiske G J. Soil carbon debt of 12,000 years of human land use[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(36):9575–9580.
- [15] Lehmann J, Hansel C M, Kaiser C, et al. Persistence of soil organic carbon caused by functional complexity[J]. Nature Geoscience, 2020,13:529–534.
- [16] 梁超,朱雪峰. 土壤微生物碳泵储碳机制概论[J]. 中国科学:地球科学, 2021,51(5):680–695.
- Liang Chao, Zhu Xuefeng. The soil microbial carbon pump as a new concept for terrestrial carbon sequestration[J]. Scientia Sinica (Terrae), 2021,51(5):680–695.
- [17] Liang C, Schimel J P, Jastrow J D. The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage[J]. Nature Microbiology, 2017,2:17105.
- [18] 江娴,王润发,黄开耀,等. 基于文献计量学的中国生物固碳领域研发态势分析[J]. 中国科学基金, 2015,29(6):449–456.
- Jiang Xian, Wang Runfa, Huang Kaiyao, et al. Analysis of Chinese CO₂ bio-sequestration R & D situation based on bibliometrics[J]. Bulletin of National Natural Science Foundation of China, 2015,29(6):449–456.
- [19] 刘波,李学斌,陈林,等. 基于文献计量分析的土壤固碳研究进展[J]. 土壤通报, 2021,52(1):211–220.
- Liu Bo, Li Xuebin, Chen Lin, et al. Research progress on soil carbon sequestration based on bibliometric analysis[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2021,52(1):211–220.
- [20] 陈晓娟,吴小红,简燕,等. 农田土壤自养微生物碳同化潜力及其功能基因数量、关键酶活性分析[J]. 环境科学, 2014, 35(3):1144–1150.
- Chen Xiaojuan, Wu Xiaohong, Jian Yan, et al. Carbon dioxide assimilation potential, functional gene amount and RubisCO activity of autotrophic microorganisms in agricultural soils[J]. Environmental Science, 2014, 35(3): 1144 – 1150.
- [21] 刘茗,曹林桦,刘彩霞,等. 亚热带4种典型森林植被土壤固碳细菌群落结构及数量特征[J]. 土壤学报, 2021,58(4): 1028–1039.
- Liu Ming, Cao Linhua, Liu Caixia, et al. Characterization of population and community structure of carbon-sequestration bacteria in soils under four types of forest vegetations typical of subtropical zone[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58(4):1028–1039.
- [22] 陈玉莹,张志好,刘勇勤. 冰川生态系统固碳微生物研究进展[J]. 微生物学报, 2020,60(9):2012–2029.
- Chen Yuying, Zhang Zhihao, Liu Yongqin. Research progress of carbon fixation microorganisms in glaciers[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020,60(9):2012–2029.
- [23] 刘金波,孔维栋,王君波,等. 纳木错湖水体固碳微生物数量、群落结构及其驱动因子[J]. 生态学报, 2019,39(8): 2772–2783.
- Liu Jinbo, Kong Weidong, Wang Junbo, et al. Abundance, community structure, and the driving factors of carbon fixing microorganisms in the Nam Co Lake[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019,39(8):2772–2783.
- [24] Wang J N, Shi Y Y, Zheng L Y, et al. Isolation and identification of petroleum degradation bacteria and interspecific interactions among four *Bacillus* strains[J]. 2015,36(6):2245–2251.
- [25] 韩祯. 石油污染盐碱土壤的生态修复研究[D]. 北京:中国科学院研究生院, 2011.
- Han Zhen. Study on Ecological Restoration of Petroleum Contaminated Saline-alkali Soil[D]. Beijing: Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2011.
- [26] 高晓奇,肖能文,叶瑶,等. 基于Biolog-ECO分析长庆油田土壤微生物群落功能多样性特征[J]. 应用与环境生物学报, 2014,20(5):913–918.
- Gao Xiaoqi, Xiao Nengwen, Ye Yao, et al. Analysis of microbial community functional diversity in the Changqing Oilfield based on Biology-ECO method[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(5): 913–

- 918.
- [27] 管芳萌. 长庆油田石油污染土壤的原位修复微生物的筛选和鉴定[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2010.
- Guan Wumeng. Filtration and Identification of In-Situ Remediation Microbial Ecological for Oil Contaminated Soil in Changqing Oilfield[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2010.
- [28] 梁建芳,杨江科,杨杨,等. 克拉玛依油田石油污染土壤细菌群落结构与环境因子的关系[J]. 微生物学报, 2016,56(8): 1301-1313.
- Liang Jianfang, Yang Jiangke, Yang Yang, et al. Effect of environmental factors on bacterial community structure in petroleum contaminated soil of Karamay Oilfield[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016,56(8):1301-1313.
- [29] 陈明珠,施宠,何飞焱,等. 克拉玛依油田石油污染土壤的修复植物筛选[J]. 广东化工, 2022,49(4):129-132.
- Chen Mingzhu, Shi Chong, He Feiyan, et al. Plant screening for remediation of oil-contaminated soil in the Karamay Oilfield[J]. Guangdong Chemical Industry, 2022, 49(4): 129-132.
- [30] 陈宏坤,杜显元,张心昱,等. 页岩气开发对植被和土壤的影响研究进展[J]. 生态学报, 2018,38(18):6383-6390.
- Chen Hongkun, Du Xianyuan, Zhang Xinyu, et al. Effects of shale gas development on vegetation and soil: a review [J]. Acta Ecologica Sinica, 2018,38(18):6383-6390.
- [31] 杨英还,杨渝红,蒋娇娇,等. 石油烃在页岩气开采区土壤中的迁移特性[J]. 环境科学与技术, 2021,44(7):100-107.
- Yang Yinghuan, Yang Yuhong, Jiang Jiaojiao, et al. Adsorption, desorption and migration behavior of petroleum pollutants in the soil of shale gas exploitation area[J]. Environmental Science & Technology, 2021,44(7):100-107.
- [32] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 2000.
- Bao Shidan. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing:China Agriculture Press, 2000.
- [33] 付志高,肖以华,许涵,等. 南亚热带常绿阔叶林土壤微生物生物量碳氮的年际动态特征及其环境影响因子研究[J]. 生态学报, 2024(3):1-12.
- Fu Zhigao, Xiao Yihua, Xu Han, et al. Inter-annual dynamics of soil microbial biomass carbon and nitrogen in subtropical evergreen broad-leaved forest and its environmental impact factors[J]. Acta Ecologica Sinica, 2024(3):1-12.
- [34] 宋佳宇,李昀照,李兴春,等. 石油污染胁迫下土壤潜在降解固碳微生物互作关系研究[J]. 环境科学研究, 2023,36(7): 1392-1403.
- Song Jiayu, Li Yunzhao, Li Xingchun, et al. Potential pollution-reducing and carbon-fixing microorganisms in soils under oil pollution stress interaction relationship study[J]. Research of Environmental Sciences, 2023,36(7):1392-1403.
- [35] Zhang X L, Li R X, Song J T, et al. Combined phyto-microbial-electrochemical system enhanced the removal of petroleum hydrocarbons from soil: a profundity remediation strategy[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021,420:126592.
- [36] 林学政,沈继红,杜宁,等. 北极海洋沉积物石油降解菌的筛选及系统发育分析[J]. 环境科学学报, 2009,29(3):536-541.
- Lin Xuezheng, Shen Jihong, Du Ning, et al. Screening and phylogenetic analysis of petroleum-degrading bacteria in sediments from the Arctic Ocean[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2009,29(3):536-541.
- [37] 王婉丽. 克隆整合和石油污染对黄河三角洲芦苇湿地土壤微生物群落的影响[D]. 北京:北京林业大学, 2019.
- Wang Wanli. Effects of Clonal Integration and Crude Oil Pollution on Soil Microbial Communities of *Phragmites australis* Wetland in the Yellow River Delta[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.
- [38] 韩笑,梁玉祥,夏代宽. 生化法处理酸气菌株的筛选培养研究[J]. 石油与天然气化工, 2002,31(6):316-318.
- Han Xiao, Liang Yuxiang, Xia Daikuan. Study on a kind of bacterium for cleaning acid gas[J]. Chemical Engineering of Oil and Gas, 2002,31(6):316-318.
- [39] 蒋亚萍,黄宗万,陈余道,等. 石油类污染含水砂柱中BTEX的自然衰减与厌氧生物降解特征[J]. 桂林工学院学报, 2005,25(2):229-233.
- Jiang Yaping, Huang Zongwan, Chen Yudao, et al. Natural attenuation and anaerobic biodegradation of BTEX compounds in groundwater contaminated by petroleum hydrocarbons[J]. Journal of Guilin Institute of Technology, 2005,25(2):229-233.
- [40] 刘海军,原志敏,韩俊,等. 石油污染土壤非培养放线菌多样性分析[J]. 环境科学与技术, 2014,37(11):121-127.
- Liu Haijun, Yuan Zhimin, Han Jun, et al. Diversity of uncultured actinomycetes in oil-contaminated soil[J]. Environmental Science & Technology, 2014,37(11):121-127.
- [41] 原晓艳. 海岸带石油降解菌的分离及多样性分析[D]. 青岛:青岛理工大学, 2015.
- Yuan Xiaoyan. Isolation and Diversity Analysis of Petroleum Degrading Bacteria in Coastal Zone[D]. Qingdao: Qingdao Technology University, 2015.
- [42] 胡琳慧. 莱州湾表层海水石油烃时空分布及细菌多样性研究[D]. 青岛:青岛科技大学, 2021.
- Hu Linhui. Study on the Spatial and Temporal Distribution of Petroleum Hydrocarbon and Bacterial Diversity in the Surface Seawater of Laizhou Bay[D]. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology, 2021.
- [43] 任随周,郭俊,邓穗儿,等. 石油降解菌的分离鉴定及石油污染土壤的细菌多样性[J]. 生态学报, 2005,25(12):3314-3322.
- Ren Suizhou, Guo Jun, Deng Sui'er, et al. Isolation and Identification of petroleum degrading strains and the diversi-

- ty of microbes in petroleum-contaminated soils[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005,25(12):3314-3322.
- [44] 孔令姣,陈吉祥,杨智,等. 石油污染土壤强化修复前后细菌多样性变化研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018,37(8):3426-3433.
- Kong Lingjiao, Chen Jixiang, Yang Zhi, et al. Research on the change of bacteria diversity before and after strengthened repair of the petroleum contaminated soil[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018,37(8):3426-3433.
- [45] Wegner C E, Liesack W. Unexpected dominance of elusive acidobacteria in early industrial soft coal slags[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017,8:1023.
- [46] 马静,董文雪,朱燕峰,等. 东部平原矿区复垦对土壤微生物固碳潜力的影响[J]. *煤炭学报*, 2022,47(3):1306-1317.
- Ma Jing, Dong Wenxue, Zhu Yanfeng, et al. Impact of land reclamation on the carbon sequestration potential of soil microorganisms in the disturbed mining area of eastern plain [J]. *Journal of China Coal Society*, 2022,47(3):1306-1317.
- [47] 李明奇. 堆肥过程中自养固碳微生物群落结构及固碳特性的研究[D]. 南宁:广西大学, 2019.
- Li Mingqi. Study on Community Structure and CO₂-fixing Characteristics of Autotrophic CO₂-fixing Bacteria during Composting[D]. Nanning:Guangxi University, 2019.
- [48] 禹飞. 林冠受损对南岭森林土壤固碳微生物的影响[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2017.
- Yu Fei. Effects of Canopy Damage on Community Structure of Soil CO₂ Fixation Bacteria in Nanling Forest[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2017.
- [49] 孙永琦. 毛乌素沙地地衣结皮层微生物的群落结构及其固碳功能[D]. 北京:北京林业大学, 2019.
- Sun Yongqi. Community Structure of Soil Microorganisms in Lichen Crusts and Its Function on Carbon Sequestration in the Mu Us Desert[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.
- [50] 黄倩. 黄土高原土壤固碳微生物及其固定 CO₂ 的机理[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2021.
- Huang Qian. The Mechanism of CO₂ Fixation by Soil Carbon-fixation Microorganisms in the Loess Plateau[D]. Yangling:Northwest A & F University, 2021.
- [51] 李欢,王磊,王亚楠. 硫代硫酸钠对排硫硫杆菌固碳能力的影响及其作用机制[J]. *环境科学*, 2017,38(6):2496-2501.
- Li Huan, Wang Lei, Wang Yanan. Effect of thiosulfate on the carbon fixation capability of *Thiobacillus thioparus* and its mechanism[J]. *Environmental Science*, 2017,38(6):2496-2501.
- [52] Lu C, Hong Y, Liu J, et al. A PAH-degrading bacterial community enriched with contaminated agricultural soil and its utility for microbial bioremediation[J]. *Environmental Pollution*, 2019,251:773-782.
- [53] 郭彦青. 黄土高原退耕还草区土壤微生物群落研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2017.
- Guo Yanqing. Dynamics of Soil Microbial Communities in Revegetation Areas on the Loess Plateau of China[D]. Yangling:Northwest A & F University, 2017.
- [54] 周盛,韦彬勤,张琼,等. 一种能同时固定 CO₂ 和 N₂ 的微生物:兼性固 CO₂、N₂ 菌的分离鉴定及其验证实验[J]. *环境科学学报*, 2013,33(4):1043-1050.
- Zhou Sheng, Wei Binqin, Zhang Qiong, et al. Isolation, identification and validation of the facultative fixed carbon and nitrogen bacteria: a type of microorganisms that can fix CO₂ and N₂ at the same time[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013,33(4):1043-1050.
- [55] 俞冰倩. 我国不同盐碱土生态系统土壤微生物群落多样性研究[D]. 镇江:江苏大学, 2019.
- Yu Bingqian. Research on the Diversity of Microbial Community in Different Saline-alkaline Soil Ecosystems in China[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019.
- [56] 王一,刘彦春,刘世荣. 暖温带森林土壤酶活性对增温的响应及其环境解析[J]. *林业科学研究*, 2017,30(1):117-124.
- Wang Yi, Liu Yanchun, Liu Shirong. Response of soil enzyme activities to soil warming and explanation of environmental factors in warm-temperate oak forest[J]. *Forest Research*, 2017,30(1):117-124.
- [57] 袁红朝,秦红灵,刘守龙,等. 固碳微生物分子生态学研究[J]. *中国农业科学*, 2011,44(14):2951-2958.
- Yuan Hongzhao, Qin Hongling, Liu Shoulong, et al. Advances in research of molecular ecology of carbon fixation microorganism[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011,44(14):2951-2958.
- [58] Ragsdale S W. Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO₂ fixation[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1991,26(3/4):261-300.
- [59] 钟毅,张旭,梁玉婷,等. 基于基因芯片技术的石油污染土壤微生物群落结构[J]. *清华大学学报:自然科学版*, 2010,50(9):1396-1399.
- Zhong Yi, Zhang Xu, Liang Yuting, et al. Microbial community structure in oil contaminated soil using the GeoChip technique[J]. *Journal of Tsinghua University: Science and Technology*, 2010,50(9):1396-1399.
- [60] Lindstrom J E, Barry R P, Braddock J F. Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999,31(12):1677-1689.
- [61] Mills D K, Fitzgerald K, Litchfield C D, et al. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003,54(1):57-74.
- [62] 刘志号,张腾飞,杨苏才,等. 多环芳烃污染土壤真菌群落组成及驱动因子[J]. *环境科学与技术*, 2021,44(5):148-153.

- Liu Zhihao, Zhang Tengfei, Yang Sucai, et al. Composition and driving factors of fungal community in polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021,44(5):148–153.
- [63] 左小虎,王明霞,姚炎红,等. 江汉油田区典型农田土壤烃类降解微生物功能基因 *bssA* 的遗传多样性研究[J]. *土壤学报*, 2017,54(3):794–803.
- Zuo Xiaohu, Wang Mingxia, Yao Yanhong, et al. Genetic diversity of hydrocarbons degrading microbial functional gene(*bssA*) in the farmland soil typical of Jiangnan Oilfield [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017,54(3):794–803.
- [64] 罗正明,刘晋仙,周妍英,等. 亚高山草地土壤原生生物群落结构和多样性海拔分布格局[J]. *生态学报*, 2021,41(7): 2783–2793.
- Luo Zhengming, Liu Jinxian, Zhou Yanying, et al. Community structures and diversity patterns of the soil protist communities along an altitudinal gradient in a subalpine grassland[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021,41(7):2783–2793.
- [65] Geisen S, Mitchell E A D, Adl S, et al. Soil protists: a fertile frontier in soil biology research[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018,42(3):293–323.
- [66] Gao Z L, Karlsson I, Geisen S, et al. Protists: puppet masters of the rhizosphere microbiome[J]. *Trends in Plant Science*, 2019,24(2):165–176.
- [67] Dini-Andreote F, Stegen J C, van Elsas J D, et al. Disentangling mechanisms that mediate the balance between stochastic and deterministic processes in microbial succession[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015,112(11):E1326–E1332.
- [68] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013,31(9):814–821.
- [69] Chen K J, He R, Wang L A, et al. The dominant microbial metabolic pathway of the petroleum hydrocarbons in the soil of shale gas field: carbon fixation instead of CO₂ emissions [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 807(Pt 2): 151074.
- [70] Wang Q H, Liang J H, Zhang S M, et al. Characteristics of bacterial populations in an industrial scale petrochemical wastewater treatment plant: composition, function and their association with environmental factors[J]. *Environmental Research*, 2020,189:109939.
- [71] Silva C C, Hayden H, Sawbridge T, et al. Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol degrading sludge from petroleum refinery wastewater treatment system[J]. *AMB Express*, 2012,2(1):18.
- [72] Lu X M, Chen C, Zheng T L. Metagenomic insights into effects of chemical pollutants on microbial community composition and function in estuarine sediments receiving polluted river water[J]. *Microbial Ecology*, 2017,73(4):791–800.
- [73] Tian X L, Liu J J, Liu Q C, et al. The effects of soil properties, cropping systems and geographic location on soil prokaryotic communities in four maize production regions across China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022,21(7):2145–2157.
- [74] 韩亚西,张彦龙,张多英,等. 自养微生物 CO₂ 固定机理研究进展[J]. *生物技术*, 2019,29(4):391–397.
- Han Yaxi, Zhang Yanlong, Zhang Duoying, et al. Research progress on CO₂ fixation mechanism of autotrophic microorganisms[J]. *Biotechnology*, 2019,29(4):391–397.
- [75] 荆佳维,王卅,郭书海. 典型油田区油污土壤微生物群落区域性分布研究[J]. *环境科学学报*, 2021,41(11):4660–4675.
- Jing Jiawei, Wang Sa, Guo Shuhai. Regional distribution of crude oil-contaminated soil microbial communities in typical oilfields[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021,41(11): 4660–4675.
- [76] 徐苗,段魏魏,赵亚光,等. 石油污染土壤理化性质对微生物代谢特征的影响[J]. *环境工程*, 2018,36(2):178–183.
- Xu Miao, Duan Weiwei, Zhao Yaguang, et al. Impact on microbial metabolic characteristics by physical and chemical properties of oil contaminated soil[J]. *Environmental Engineering*, 2018,36(2):178–183.
- [77] 宋佳宇,陈梅梅,张海涛,等. 石油污染土壤微生物群落代谢特征分析[J]. *环境科学与技术*, 2013,36(10):63–66.
- Song Jiayu, Chen Meimei, Zhang Haitao, et al. Metabolic characteristics of oil contaminated soil microbial communities[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013,36(10): 63–66.
- [78] 张志丹,杨学明,李春丽,等. 土壤有机碳固定研究进展[J]. *中国农学通报*, 2011,27(21):8–12.
- Zhang Zhidan, Yang Xueming, Li Chunli, et al. Research progresses of soil organic carbon sequestration[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011,27(21):8–12.