



石油污染土壤自然衰减过程多环芳烃降解基因动态特征

吕杰¹, 马媛^{2,3*}, 李二阳^{2,3}, 张帅^{2,3}, 刘寒宇^{2,3}, 吕光辉^{2,3}

1 新疆大学生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017

2 新疆大学生态与环境学院 绿洲生态教育部重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017

3 新疆精河温带荒漠生态系统教育部野外科学观测研究站, 新疆 精河 833300

吕杰, 马媛, 李二阳, 张帅, 刘寒宇, 吕光辉. 石油污染土壤自然衰减过程多环芳烃降解基因动态特征[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2456-2471.

LÜ Jie, MA Yuan, LI Eryang, ZHANG Shuai, LIU Hanyu, LÜ Guanghui. Dynamic characteristics of genes involved in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons during natural attenuation of crude oil-contaminated soils in Xinjiang, China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2456-2471.

摘要: 新疆石油污染土壤中微生物多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)降解功能基因研究甚少, 且环境因子和功能基因之间相关性仍不清楚。【目的】揭示新疆石油污染砂质土壤自然衰减过程中多环芳烃降解关键基因结构和变化规律。【方法】以新疆准东油田为研究区, 分析同一采油区不同石油污染年限土壤理化因子和多环芳烃含量变化, 采用扩增子测序研究石油自然衰减过程中多环芳烃降解酶基因结构变化规律, 利用 Mental 检验探讨其环境驱动因子。【结果】石油污染时间 1 年和 3 年的土壤中有多项理化指标与背景土存在显著性差异, 而污染 5 年土壤与背景土之间仅 2 项指标具有显著性差异, 随石油自然衰减逐渐恢复至正常。石油污染 1 年的土壤中 16 种多环芳烃除蒽和蒎以外, 其余 14 种多环芳烃均高于石油污染 3 年和 5 年土壤, 多环芳烃总量和含油率污染 1 年土壤均显著高于污染 3 年和 5 年的土壤, 多环芳烃会在污染后短时间内迅速被降解。扩增子测序结果显示, 萘双加氧酶基因分类操作单元(operational taxonomic units, OTUs)序列随污染年限延长逐渐增多; 芳环羟化双加氧酶基因 OTUs 序列 BLAST(basic local alignment search tool)比对注释为 6 类多环芳烃降解基因, 随着污染年限延长呈现先升高后降低趋势, 污染 5 年土壤后 OTUs 急剧减少。Mental 检验结果显示, 土壤可溶性有机碳和含水量会显著影响功能基因结构, 多环芳烃并不能显著影响功能基因结构。【结论】新疆准东油田石油污染砂

资助项目: 国家自然科学基金(31860149); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2022D01C398)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860149) and the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022D01C398).

*Corresponding author. E-mail: xjmayuan@sina.com

Received: 2022-10-04; Accepted: 2022-12-08; Published online: 2023-04-12

质土壤自然衰减过程中多环芳烃降解基因结构主要受土壤可溶性有机碳和含水量影响。

关键词: 石油污染; 多环芳烃; 自然衰减; 功能基因; 动态特征

Dynamic characteristics of genes involved in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons during natural attenuation of crude oil-contaminated soils in Xinjiang, China

LÜ Jie¹, MA Yuan^{2,3*}, LI Eryang^{2,3}, ZHANG Shuai^{2,3}, LIU Hanyu^{2,3}, LÜ Guanghui^{2,3}

1 Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830017, Xinjiang, China

2 Key Laboratory of Oasis Ecology of Ministry of Education, College of Ecology and Environment, Xinjiang University, Urumqi 830017, Xinjiang, China

3 Xinjiang Jinghe Observation and Research Station of Temperate Desert Ecosystem, Ministry of Education, Jinghe 833300, Xinjiang, China

Abstract: There are few studies about the functional genes involved in the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in crude oil-contaminated soils in Xinjiang, and the correlations between environmental factors and functional genes remain unclear. **[Objective]** To reveal the structures and dynamic characteristics of key PAH-degrading genes during the natural attenuation of crude oil-contaminated sandy soils in Xinjiang. **[Methods]** We studied the variations in the physicochemical properties and the content of PAHs in the soils contaminated by crude oil for different years in the same oil production area in Zhundong Oilfield in Xinjiang. Amplicon sequencing was employed to study the dynamic characteristics of genes involved in the degradation of PAHs during the natural attenuation of crude oil-contaminated soils. Mental test was performed to explore the environmental driving factors. **[Results]** The soils contaminated by crude oil for 1 and 3 years had several physicochemical properties significantly different from the background soils, while that contaminated for 5 years had only 2 physicochemical properties significantly different, which gradually returned to normal levels with the natural attenuation of crude oil. Among the 16 PAHs studied, the remaining 14 PAHs except acenaphthylene and chrysene in the soils contaminated by crude oil for 1 year had higher content than those in the soil contaminated by crude oil for 3 and 5 years. The total PAHs and crude oil content in the 1-year contaminated soils were significantly higher than those in the 3-year and 5-year contaminated soils, which indicated that PAHs could be rapidly degraded in a short time after contamination. The amplicon sequencing results showed that the operational taxonomic units (OTUs) of naphthalene dioxygenase gene gradually increased with the extension of pollution years. The OTUs of aromatic ring-hydroxylating dioxygenase gene were annotated by BLAST alignment into 6 types of PAH-degrading genes, which first increased and then decreased with the extension of contamination time. The OTUs of aromatic ring-hydroxylating dioxygenase gene

presented dramatically decreased diversity within 5 years of contamination. The Mental test results showed that the functional gene structures were significantly affected by soil soluble organic carbon and water content and not by PAHs. **[Conclusion]** The structures of PAH-degrading genes are mainly affected by soil soluble organic carbon and water content during the natural attenuation of crude oil-contaminated sandy soil in the Zhundong Oilfield of Xinjiang.

Keywords: crude oil contamination; polycyclic aromatic hydrocarbons; natural attenuation; functional genes; dynamic characteristics

原油是一种复杂的混合物,含有多种不同类别的化学物质,如烷烃、芳香烃和非烃类化合物^[1],其中芳香烃当中的多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)在环境中广泛分布,是一种普遍存在的化学污染物,由于其环境持久性、高毒性、诱变性和致癌性以及食物链的生物积累,可对人类健康和生态系统安全构成威胁,因而引起社会广泛关注^[2-3]。PAHs 家族包括 150 多种成员,其中 16 种被欧盟和美国环境保护署列为优先考虑污染物^[4]。石油在开采、生产、运输、储存以及意外事件过程中会泄漏在环境当中^[5-6],因此在石油勘探区的污染土壤中可检测到高含量的烷烃和多环芳烃^[1,7]。新疆作为我国重要的石油产地,许多油田生产时间较长,因此有大量历史遗留石油污染土壤有待修复。而微生物修复是一种非常有前景的土壤清洁技术,利用微生物新陈代谢将土壤中的污染物转化为 CO₂、H₂O 和脂肪酸等无毒物质,从而降低有机污染物对环境的影响。如果采用微生物修复技术,则修复菌剂配伍及策略尤为重要,需要对石油污染状况进行修复前评估。因此开展石油污染土壤自然衰减不同阶段土壤微生物群落结构及功能基因变化研究,对于未来判断石油污染程度及状况十分必要。

微生物降解多环芳烃的关键步骤在于苯环结构的氧化开环,芳香烃双加氧酶具备氧化开环的重要功能^[8-9]。因此芳香烃双加氧酶基因可以

作为污染土壤细菌群落功能特征生物标记,用于表征受污染场地的微生物修复潜力^[10]。Shahi 等^[11]检测了石油污染土壤微生物修复过程中微生物群落结构及功能基因的变化,结果显示微生物菌群结构和功能基因多态性可以作为土壤修复过程中的监测方法。Han 等^[12]采用克隆文库法研究 PAH 污染土壤中 *pdo1*、*nah* 和 *C12O* 三个多环芳烃降解基因的多态性及相对丰度,结果显示 *pdo1* 和 *nah* 基因丰度与 PAHs 含量呈正相关,可以作为 PAHs 污染程度的指标物。李兴海等^[13]采用克隆文库法研究石油污染土壤自然衰减过程中双加氧酶基因变化规律,研究发现其类型及丰度会随石油自然衰减发生规律性的变化,可作为检测石油污染物衰减程度的分子标准。

本研究选择位于古尔班通古特沙漠腹地准东油田作为研究区,采油区域生态环境十分脆弱,油井周边渗漏的石油会影响砂质土壤物理化学性质及土壤微生物群落及功能,但目前针对新疆石油污染砂质土壤中芳香烃双加氧酶基因种类及结构的研究鲜有报道。因此本研究选择萘双加氧酶基因作为表征简单多环芳烃代谢^[14];同时选择可以降解甲苯、间二甲苯、萘、苯并[a]蒽和苯并[a]芘等物质的广谱芳环羟化双加氧酶基因^[15-19],通过研究确定新疆准东油田石油污染砂质土壤中多环芳烃双加氧酶基因种类以及原油自然衰减过程中功能基因变化规律。此外,各种环境变量调节着土壤多环芳烃代谢基因的空

间分布,然而土壤理化因子和多环芳烃浓度与多环芳烃代谢基因之间的相关性仍不清楚^[20-21],因此本研究还针对原油自然衰减过程中功能基因变化环境驱动因子开展研究。本研究的开展对于未来评估石油污染衰减程度并制定相应的土壤修复方案具有一定指导意义。

1 材料与方法

1.1 样品采集和处理

2015年6月在新疆古尔班通古特沙漠准东油田(东经88°40′-89°22′,北纬43°40′-44°20′)同一个采油区内采集3个不同石油污染年限土和背景土。污染土和背景土之间距离超过50m,尽可能排除挥发性有机烃对背景土壤的影响。按照石油污染年限对样本进行编号,污染1年土样编号为ZD1,污染3年为ZD3,污染5年为ZD5,土壤石油污染后再无污染。污染土壤编号为ZD1A、ZD3A和ZD5A,背景土编号为ZD1B、ZD3B和ZD5B,3次重复。采样时剥离掉1-2cm表层土,排除空气中掉落杂质以及挥发性石油烃影响,采样深度20cm。采集土样用车载冰箱带回实验室,混匀后分为2份,一份进行理化性质测试,另一份进行扩增子测序分析。

1.2 土壤理化因子及多环芳烃含量测定

石油污染土壤含水率(water content, WC)采用烘干法测定^[22];土壤pH值、电导率(electrical conductivity, EC)、总氮(total nitrogen, TN)、总碳(total carbon, TC)、可溶性有机碳(dissolved organic carbon, DOC)、总磷(total phosphorus, TP)和总硫(total sulphur, TS)指标测定采用常规方法进行测定^[23];含油率(oil content, OC)采用比色法测定^[24];多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)采用高效液相色谱法进行测定^[25]。采用R语言对土壤理化因子和多环芳烃含量利用LSD法进行多重比较检验并绘图。

1.3 土壤基因组DNA提取及功能基因扩增子测序

采用MO BIO[®] PowerSoil[®] DNA Isolation Kit对土壤基因组DNA进行提取,进行琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度检测,合格后委托北京诺禾致源公司进行功能基因扩增子建库分析。芳香烃双加氧酶基因扩增子引物选择萘双加氧酶基因(naphthalene dioxygenase, *nah*)和芳环羟化双加氧酶基因(aromatic ring-hydroxylating dioxygenase, *nid*)通用引物,前期已验证其有效性。*nah*基因扩增引物为NAH-F和NAH-R^[26]; *nid*基因扩增引物为Nid-for和Nid-rev1/Nid-rev2的巢式引物^[16,27]。*nah*基因以带有barcode的NAH-F和NAH-R进行扩增,30个循环;*nid*基因先以Nid-for和Nid-rev1为引物进行第1轮扩增,25个循环,保证PCR产物在指数增长期,扩增结束后凝胶电泳检测扩增产物;产物稀释50倍后作为模板,以带有barcode的Nid-for和Nid-rev2进行第2轮扩增,30个循环,琼脂糖凝胶检测并回收相应的扩增条带,委托北京诺禾致源公司采用HiSeq2500测序平台进行测序分析。最后将测序原始数据上传至NCBI的SRA数据库,*nah*基因测序原始数据编号为PRJNA869211,*nid*基因测序数据编号为PRJNA869302。

1.4 多环芳烃功能基因扩增子测序及数据处理

针对*nah*和*nid*基因片段扩增子下机原始数据,根据barcode序列和PCR扩增引物序列拆分各样本数据,截去barcode和引物序列后使用FLASH V1.2.7^[28]对每个样本的reads进行拼接,得到的拼接序列为原始tags数据。使用Qiime V1.9.1^[29]对原始tags数据进行质控,将原始tags从连续低质量值(默认质量阈值≤19)碱基数达到设定长度(默认长度值为3)的第1个低质量碱基位点截断,进一步过滤掉其中连续高质量

碱基长度小于 tags 长度 75% 的 tags, 获得高质量 tags 序列, 其中 *nah* 基因获得 181 条分类操作单元(operational taxonomic units, OTUs)序列, *nid* 基因获得 123 条 OTUs 序列。

1.5 多环芳烃功能基因比对分析

将 *nah* 和 *nid* 基因所获所有 OTUs 序列使用 transeq 软件翻译为蛋白质序列, 去除非连续性序列, 并将蛋白质序列与 NCBI NR 数据库进行比对, 再去除非多环芳烃降解酶基因序列, 此时 *nah* 基因剩余 102 条序列, *nid* 基因剩余 112 条序列, 后续对数据进行抽平进行分析。使用 usearch 进行多样性指数计算, R 绘制 *nah* 和 *nid* 基因 α 多样性箱线图以及理化因子和多环芳烃含量柱状图, 添加显著性($P < 0.05$)标记; pheatmap 函数(pheatmap 包)绘制基因相对丰度前 35 聚类热图; 基于 Bary_curtis 距离进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)。BLAST 同源性比对选取与 *nah* 和 *nid* 基因相似性较高的序列作为标准序列, 利用 MEGA 7 软件采用邻接法进行聚类分析构建系统发育树。通过 Bioenv 函数(vegan 包)分析影响石油污染土壤多环芳烃降解酶基因多样性的环境因子和多环芳烃组合, 并进行 Mantel 检验。研究石油污染土壤自然衰减过程中功能基因结构变化驱动因子。

2 结果与分析

2.1 土壤理化因子测定和分析

土壤理化因子测定结果如图 1 所示, 在所测 8 项土壤理化指标中, 石油污染 1 年土壤与背景土之间, pH、含水率、电导率、总碳、可溶性有机碳和总硫 6 项指标具有显著性差异; 石油污染 3 年土壤与背景土之间, 含水率、电导率、总氮、总碳、可溶性有机碳、总磷和总硫 7 项指标具有显著性差异; 石油污染 5 年土壤与背景土之间仅 pH 和电导率具有显著性差异($P < 0.05$), 说

明石油污染土壤能显著地改变土壤理化性质, 随着污染年限增加, 有机污染物不断被微生物降解矿化, 自然衰减 5 年后, 污染土壤理化性质逐渐接近背景土壤。石油污染 1 年土壤中总碳含量显著高于污染 3 年和 5 年土壤, 但可溶性碳却是污染 3 年土壤显著高于污染 1 年和 5 年土壤, 污染 5 年土壤中可溶性碳含量与背景土中无显著性差异, 说明石油碳氢化合物并不能直接溶解在土壤溶液中, 而是需要微生物进行降解形成可溶性碳进行利用。此外污染 3 年土壤总氮、总磷和总硫含量均显著高于其他样本, 可能与污染石油成分不同有关。

石油污染土壤中多环芳烃含量测定结果如图 2 所示, 结果显示在测试的 16 种多环芳烃中, 石油污染 1 年的土壤中除萘烯和蒽以外的 14 种多环芳烃含量均高于石油污染 3 年和 5 年土壤, 其中萘、芴、苯并[a]蒽和苯并[g,h,i]花含量显著高于石油污染 3 年和 5 年土壤($P < 0.05$); 此外萘、蒽、荧蒽、芘、苯并[k]荧蒽、二苯并[a,h]蒽和茚并[1,2,3-cd]芘含量显著高于石油污染 3 年土壤($P < 0.05$), 且污染 5 年土壤中含量与污染 1 年和 3 年土壤均无显著性差异; 菲、苯并[b]荧蒽和苯并[a]芘含量在 3 个污染年份之间均无显著性差异。多环芳烃总量和土壤含油率均为污染 1 年土壤 > 污染 5 年土壤 > 污染 3 年土壤, 并具有显著性差异, 推测是因为污染之初散落在土壤中原油的总量不同, 自然衰减过程中烷烃、多环芳烃逐渐降解矿化, 石油中极难降解的沥青类物质残留在土壤中所致。实验结果还显示, TPAHs/OC 比率为污染 3 年土壤 > 污染 5 年土壤 > 污染 1 年土壤, 推测为多环芳烃自然挥发和降解速度比石油烷烃较慢造成, 石油自然降解过程中其含量与土壤含油率比例会逐渐增高, 自然降解一定时间后, 会被土壤微生物降解成小分子物质, 其与含油率比例随之降低。

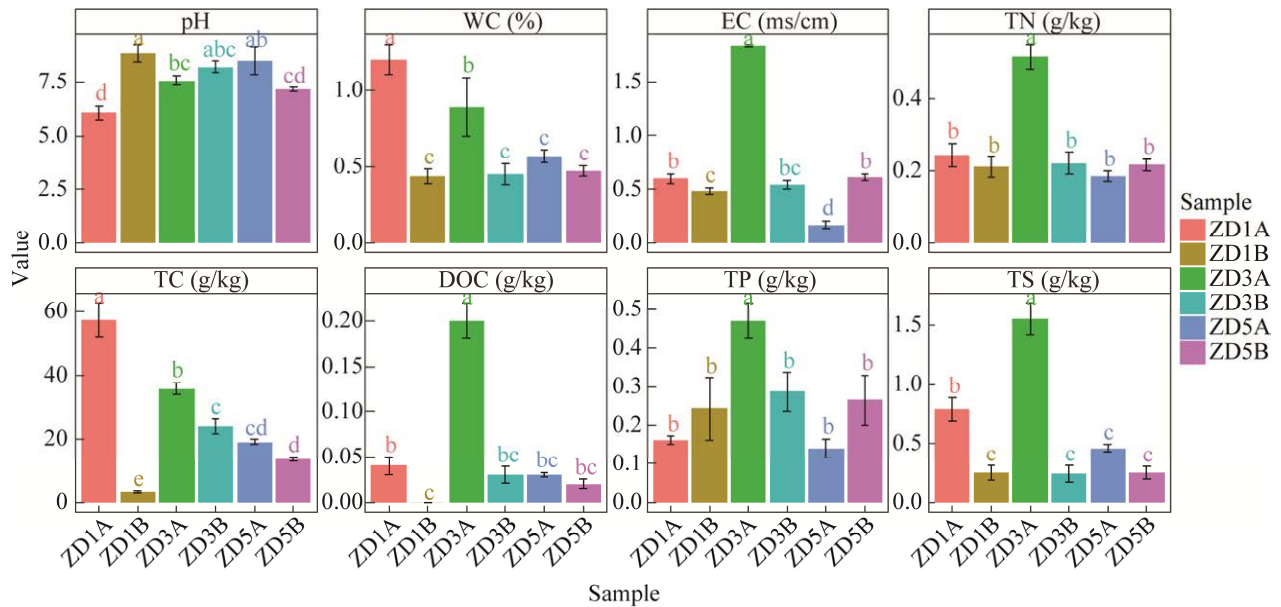


图 1 准东油田石油污染和背景土理化性质

Figure 1 Soil properties of oil-contaminated and background soil in Zhundong oilfield. The different lowercase letters indicate significant differences between soil samples ($P < 0.05$). The same below. The letter abbreviations represent different soil properties. WC: Water content; EC: Electrical conductivity; TN: Total nitrogen; TC: Total carbon; DOC: Dissolved organic carbon; TP: Total phosphorus; TS: Total sulphur.

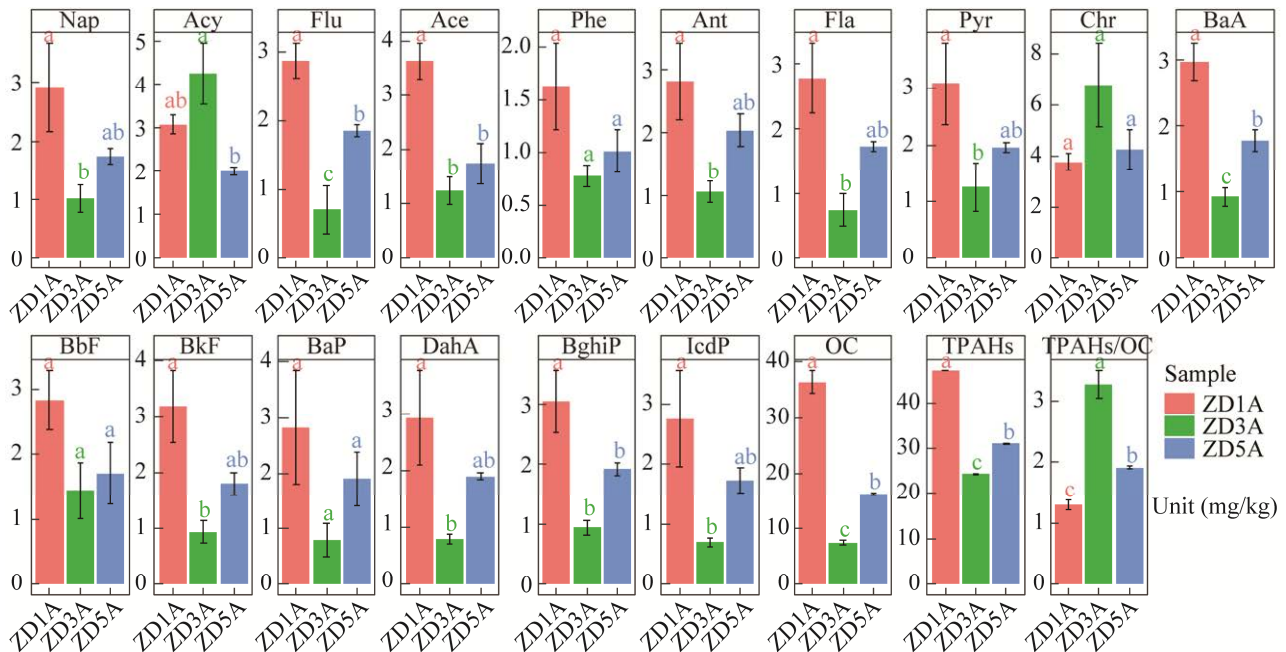


图 2 准东油田石油污染土壤中多环芳烃含量

Figure 2 Polycyclic aromatic hydrocarbons content in oil-contaminated soils of Zhundong oilfield. The letter abbreviations represent different polycyclic aromatic hydrocarbons. Nap: Naphthalene; Acy: Acenaphthylene; Flu: Fluorene; Ace: Acenaphthene; Phe: Phenanthrene; Ant: Anthracene; Fla: Fluoranthene; Pyr: Pyrene; Chr: Chrysene; BaA: Benz[a]anthracene; BbF: Benzo[b]fluoranthene; BkF: Benzo[k]fluoranthene; BaP: Benzo[a]pyrene; DahA: Dibenz[a,h]anthracene; BghiP: Benzo[g,h,i]perylene; IcdP: Indeno[1,2,3-cd]pyrene; TPAHs: Total polycyclic aromatic hydrocarbons; OC: Oil content.

2.2 不同石油污染年限土壤芳香烃双加氧酶基因分布

原始数据通过质控拼接、核酸序列翻译以及数据库比对, 去除非芳香烃双加氧酶基因的 OTUs 序列, 最后 *nah* 基因剩余 102 条 OTUs 序列, *nid* 基因剩余 112 条。将 2 个基因剩余序列进行 OTUs 分布 Venn 图绘制(图 3)。结果显示 *nah* 基因污染 1 年土壤 3 个样本共 92 条, 污染 3 年 94 条, 污染 5 年 96 条, 污染 1 年和 3 年共有 87 条, 污染 1 年和 5 年共有 87 条, 污染 3 年和 5 年共有 89 条, 3 个年限共有 83 条, 实验结果显示随污染年限延长, *nah* 基因多样性逐渐增多, 但增幅并不明显, 其核心基因种类在 3 个不同污染年份中相似。*nid* 基因污染 1 年 62 条, 污染 3 年 91 条, 污染 5 年仅 7 条, 污染 1 年和 3 年共有 44 条, 污染 1 年和 5 年共有 2 条, 污染 3 年和 5 年共有 4 条, 3 个年限共有 2 条, 推测污染 5 年后大分子量多环芳烃多数已被降解开环, 因此 *nid* 基因 OTUs 数随即下降。

2.3 不同石油污染年限土壤芳香烃双加氧酶基因 α 多样性分析

根据所获 *nah* 和 *nid* 基因 OTUs 序列丰度进行 α 多样性指数的计算, 结果如图 4 所示。*nah* 基因丰富度指数(richness index)、ACE、Chao1、Shannon 和 Simpson 指数在石油污染不同年限土壤中均无显著性差异。*nid* 基因丰富度指数和 ACE 指数为污染 3 年土壤>污染 1 年土壤>污染 5 年土壤, 3 个不同污染年限之间均具有显著性差异($P<0.05$); Chao1、Shannon 和 Simpson 指数为污染 3 年土壤>污染 1 年土壤>污染 5 年土壤, 污染 3 年和 1 年之间无显著性差异, 但与污染 5 年之间有显著性差异($P<0.05$), 说明污染 3 年土壤中 *nid* 基因种类最多, 基因多样性最高。

2.4 不同石油污染年限土壤芳香烃双加氧酶基因 β 多样性及构成分析

根据所获 *nah* 和 *nid* 基因 OTUs 代表性序列丰度表, 基于 Bary_curtis 距离矩阵进行 PCoA 分析(图 5), 展示不同石油污染土壤中 *nah* 和 *nid*

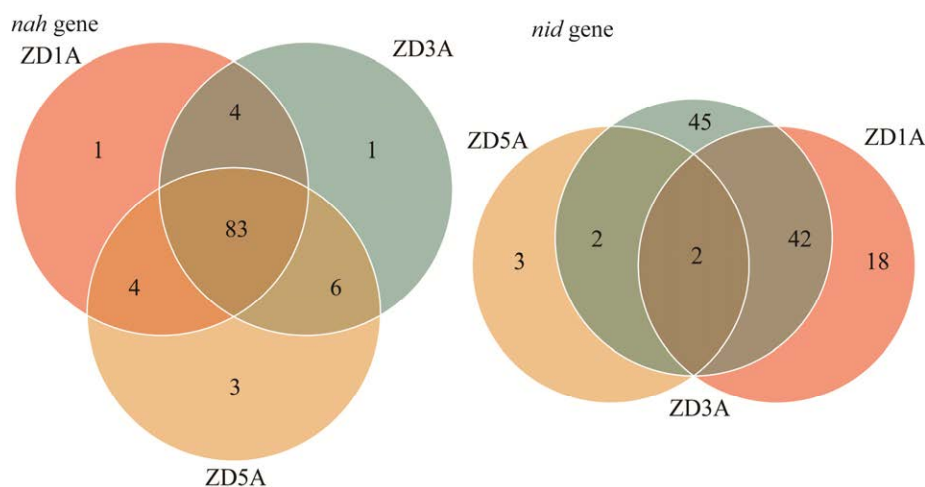


图 3 准东油田不同年限石油污染土壤 *nah* 和 *nid* 基因 Venn 图

Figure 3 Venn diagram of *nah* and *nid* gene in oil-contaminated soils with different pollution years of Zhundong oilfield.

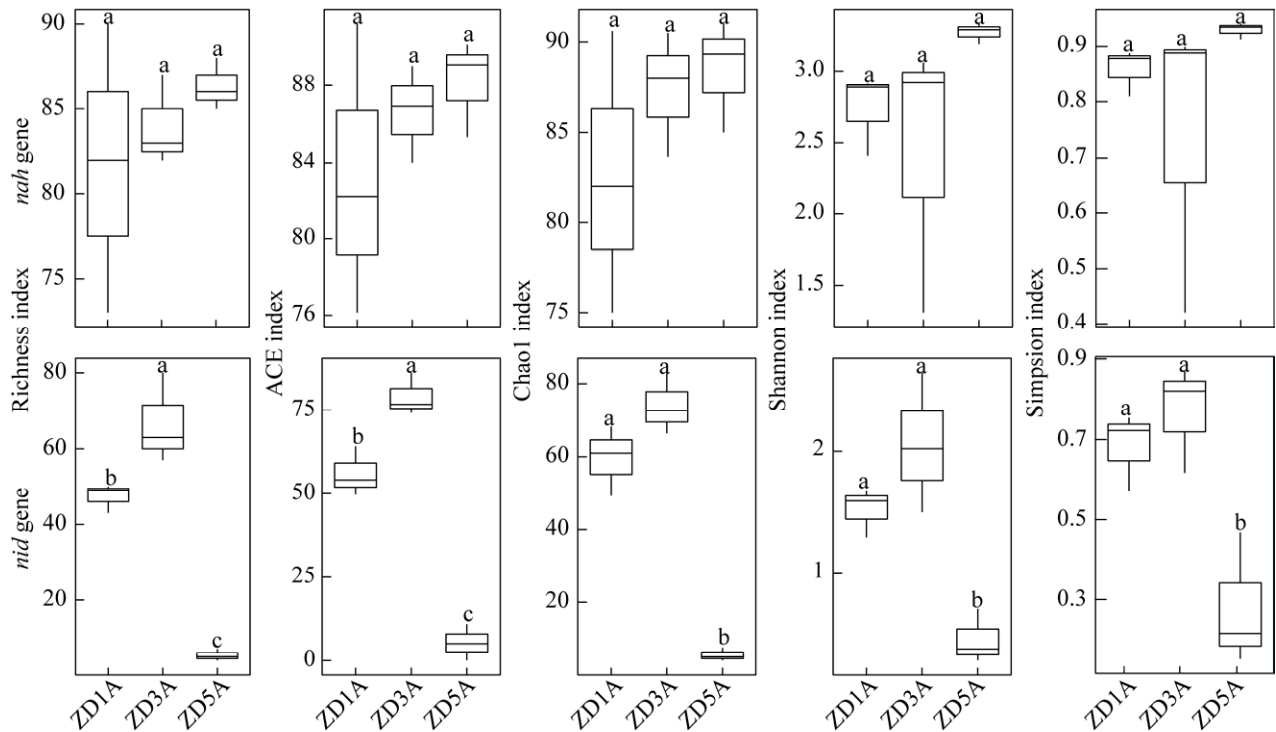


图 4 准东油田不同年限石油污染土壤 *nah* 和 *nid* 基因 α 多样性

Figure 4 The alpha diversity index of *nah* and *nid* gene in oil-contaminated soils with different pollution years of Zhundong oilfield. The different lowercase letters indicate significant differences between soil samples ($P < 0.05$).

基因多态性在组间差异。结果显示, 3 个不同石油污染年限土壤中 *nah* 和 *nid* 基因结构均存在显著性差异($P < 0.05$)。对于 *nah* 基因, 石油污染 1 年和污染 5 年土壤中基因 OTUs 序列结构较为类似, 结构均较为发散, 石油污染 3 年 *nah* 基因结构与其余 2 个样本差异较大; 对于 *nid* 基因 OTUs 序列, 3 个石油污染年限土壤组基因结构组内差异较小, 但不同样本彼此之间均存在显著性差异。选取 2 个芳香烃双加氧酶基因 OTUs 代表性序列丰度前 35 个序列数值进行 \log_2 对数变换后, 绘制聚类热图(图 5)。结果显示, 对于 *nah* 基因, 相对丰度前 35 *nah* 基因序列在不同污染年限土中均有存在, 聚类结果显示污染 1 年和 3 年结构较为类似, 与 β 多样性分析结果相似; 对于 *nid* 基因, 相

对丰度前 35 基因序列在不同污染年限土中相对丰度显著不同, 且污染 5 年后 *nid* 基因种类稀少, 聚类结果显示污染 1 年和 5 年结构较为类似, 结果显示随多环芳烃降解, 多环芳烃含量减少, 芳环羟化双加氧酶基因 OTUs 逐渐减少。

2.5 不同石油污染年限土壤芳香烃双加氧酶基因聚类分析

将 102 条 *nah* 基因序列和 112 条 *nid* 基因核酸序列分别采用 BLASTp 程序与本地 NCBI NR 数据库进行比对, 并选取得分最高的序列信息作为本研究扩增子序列基因名。其中 *nah* 基因序列名均为萘双加氧酶 (naphthalene dioxygenase), *nid* 基因引物扩增则获得 6 类基因序列, 分别为芳环羟化双加氧酶 (aromatic

ring-hydroxylating dioxygenase)占 48.83%、多环芳烃环羟基化双加氧酶(PAH ring-hydroxylating dioxygenase)占 25.95%、邻苯二甲酸双加氧酶(phthalate dioxygenase)占 17.54%、末端双加氧酶 α 亚基(alpha subunit of terminal dioxygenase

component)占 4.67%、Rieske 型铁硫中心结构域蛋白(rieske 2Fe-2S domain-containing protein)占 3.01% , 苯甲酸 1,2- 双加氧酶 (benzoate 1,2-dioxygenase)仅在污染 3 年和污染 5 年土壤中含有少量序列。

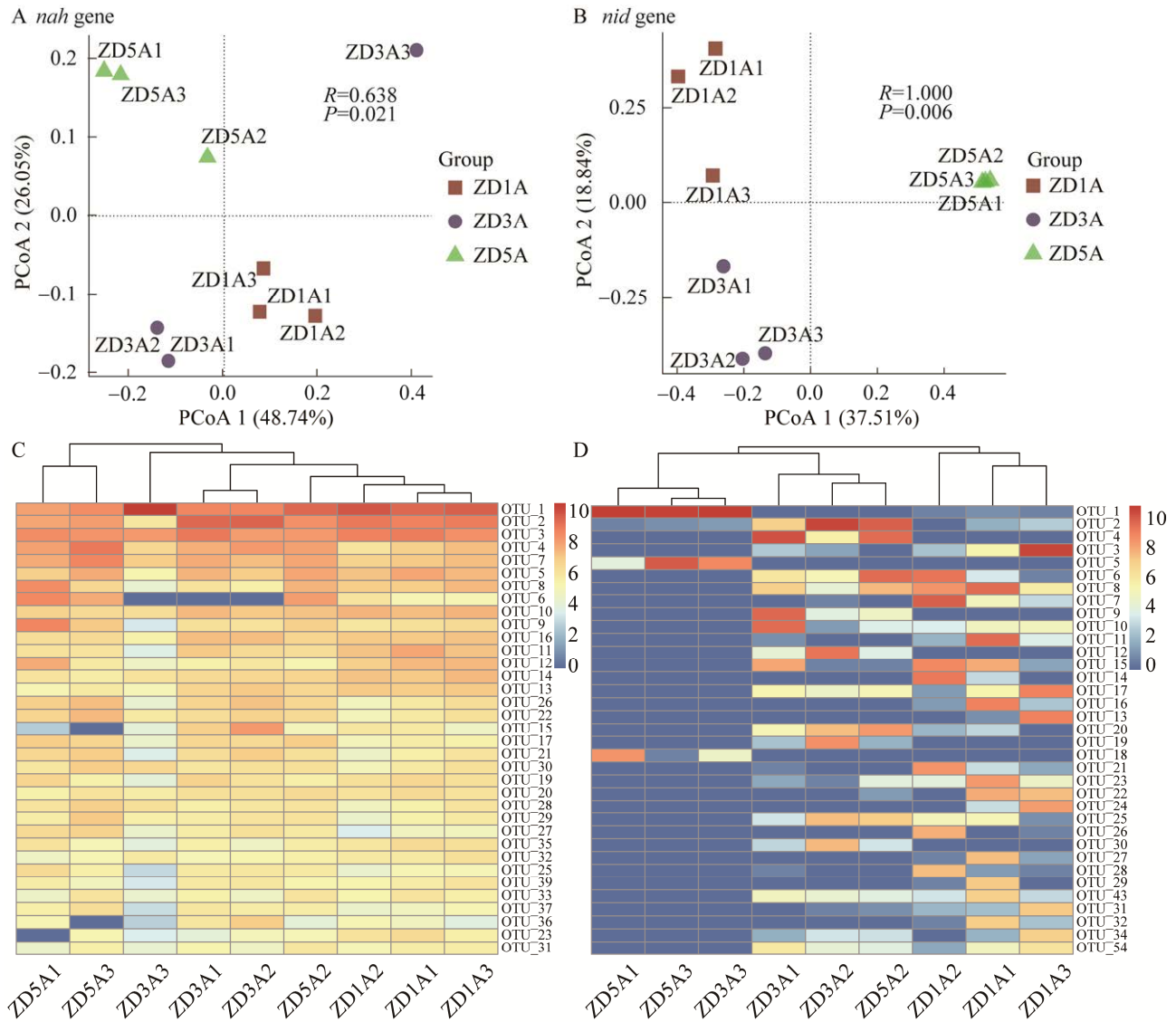


图 5 准东油田不同年限石油污染土壤 *nah* 和 *nid* 基因主坐标分析图和相对丰度聚类热图

Figure 5 Principal co-ordinates analysis and the relative abundances heat map of *nah* and *nid* gene in oil-contaminated soils with different pollution years of Zhundong oilfield. A: Principal co-ordinates analysis of *nah* gene. B: Principal co-ordinates analysis of *nid* gene. C: Heat map of *nah* gene. D: Heat map of *nid* gene.

将 *nid* 基因 6 种类型基因的相对丰度在 3 个石油污染年限进行多重比较分析(图 6), 结果显示芳环羟化双加氧酶、多环芳烃环羟基化双加氧酶和邻苯二甲酸双加氧酶不同污染年限土壤中存在显著性差异, 芳环羟化双加氧酶基因相对丰度随着污染年限延长逐年增加, 污染 5 年土壤显著高于污染 1 年和 3 年; 多环芳烃环羟基化双加氧酶随着污染年限延长逐年减少, 污染 5 年土壤显著高于污染 1 年, 污染 3 年与其余 2 类样本均无显著性差异; 邻苯二甲酸双加氧酶基因则为污染 3 年土壤>污染 1 年土壤>污染 3 年土壤, 污染 5 年土壤显著低于污染 1 年和 3 年($P<0.05$)。说明随着石油污染时间的延长, 多环芳烃降解的功能基因在不同污染年限土壤样本中的相对丰

度会发生相应的变化, 显示了微生物群体功能随石油自然衰减成分改变的变化趋势。

2.6 不同石油污染年限土壤芳香烃双加氧酶基因系统发育分析

采用 CD-hit 软件对 *nah* 基因剩余 102 条序列和 *nid* 基因剩余 112 条序列按照 97% 的相似性进行去冗余分析, 去冗余后 *nah* 基因剩余 8 条基因序列, *nid* 基因剩余 31 条。将 2 个基因序列与 NCBI 核酸数据库分别进行 BLAST 同源性比对, 选取相似性较高的序列作为标准序列采用邻接法构建系统发育树(图 7, 图 8)。图 7 聚类分析结果显示准东油田萘双加氧酶基因扩增子测序所获 OTUs 聚类为 3 个 cluster, 其中 Cluster1 与来源于假单胞菌属(*Pseudomonas*)

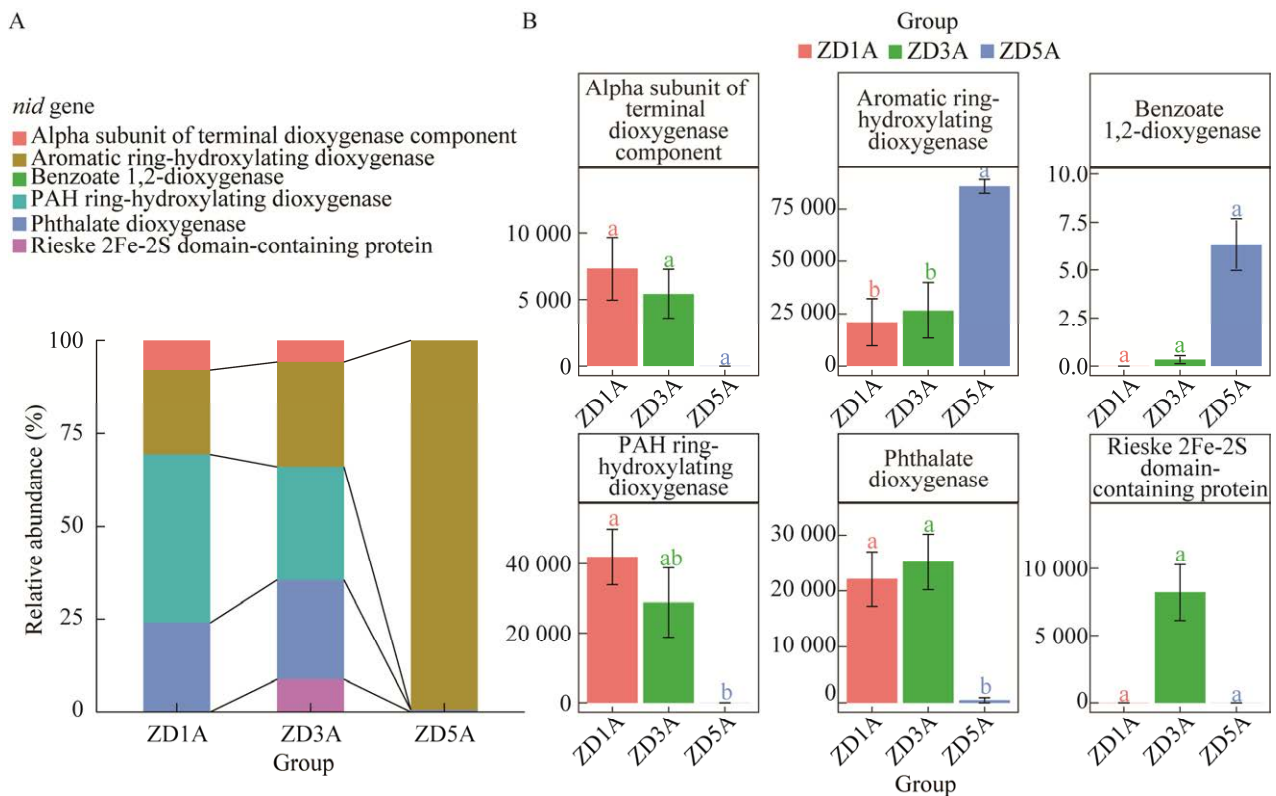


图 6 准东油田不同年限石油污染土壤 *nid* 类基因相对丰度

Figure 6 Relative abundance of different *nid*-like genes in oil-contaminated soils with different pollution years of Zhundong oilfield. A: Column stacking diagram of the relative abundance of different *nid* gene types. B: Box-plot of different *nid* gene types, $P<0.05$.

的 *nah* 基因相似性较高, Cluster2 与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)的 *nah* 基因相似性较高, 而 Cluster3 与罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)的 *nah* 基因相似性较高。通过计算准东油田 *nah* 基因源于罗尔斯通氏菌属仅占 0.02%, 其余全部来源于假单胞菌属。

图 8 聚类分析结果显示, 准东油田芳环羟化双加氧酶基因扩增子测序所获 OTUs 聚类为 4 个分支, 其中有 2 个芳环羟化双加氧酶基因分支、1 个邻苯二甲酸双加氧酶分支和 1 个多环芳烃环羟基化双加氧酶分支。其中邻苯二甲酸双加氧酶基因分支与红球菌属微生物质粒上相关基因相似性较高; 多环芳烃环羟基化双加氧酶基因分支包含 4 类基因类型, 与分枝杆菌科的分枝杆菌属(*Mycobacterium*)和分枝菌酸杆菌属(*Mycolicibacterium*)微生物基因组相关基因相似性较高; 此外芳环羟化双加氧酶基因分支 1 还含有 Rieske 型铁硫中心结构域蛋白基因序列信

息, 说明该分支基因含有 Rieske 型铁硫中心结构域蛋白。

2.7 不同石油污染年限土壤芳香烃双加氧酶基因与环境因子相关性分析

将 *nah* 和 *nid* 基因列表进行合并, 采用 Bioenv 函数对 3 个不同石油污染年限土壤芳香烃双加氧酶基因结构距离矩阵和土壤理化因子及多环芳烃浓度距离矩阵相关系数进行计算, 分析影响石油污染土壤中芳香烃双加氧酶基因结构的土壤理化因子及多环芳烃种类组合(表 1, 表 2)。土壤理化因子与功能基因 Bioenv 分析结果显示(表 1), 土壤可溶性有机碳和土壤含水量是影响石油污染土壤中芳香烃双加氧酶基因结构的主要因素组合, 相关系数最高为 0.590 7, Mantel 检验显示污染土壤可溶性有机碳和含水量对功能基因结构变化具有显著影响, 此外土壤总硫、可溶性有机碳、电导率和含油率因子组合也对功能基因结构具有显著性影响($P < 0.05$)。

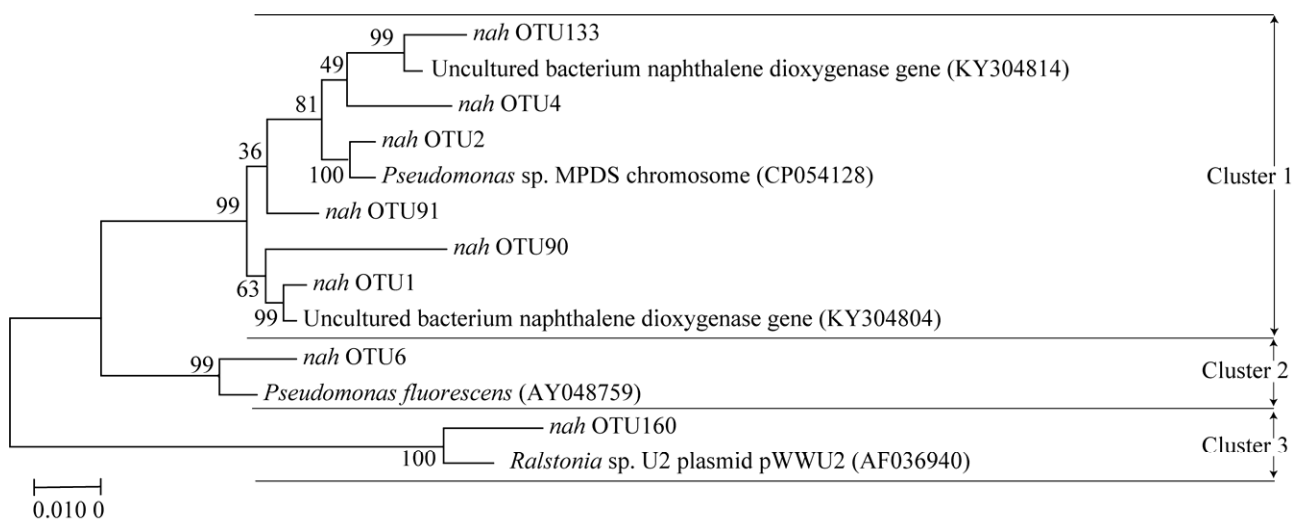


图 7 准东油田不同年限石油污染土壤中 *nah* 基因系统发育分析

Figure 7 Phylogenetic analysis of naphthalene dioxygenase gene fragments in oil-contaminated soils with different pollution years of Zhundong oilfield. The numbers at nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1 000 resamples date sets. Bar: 0.01 sequence divergence. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences.

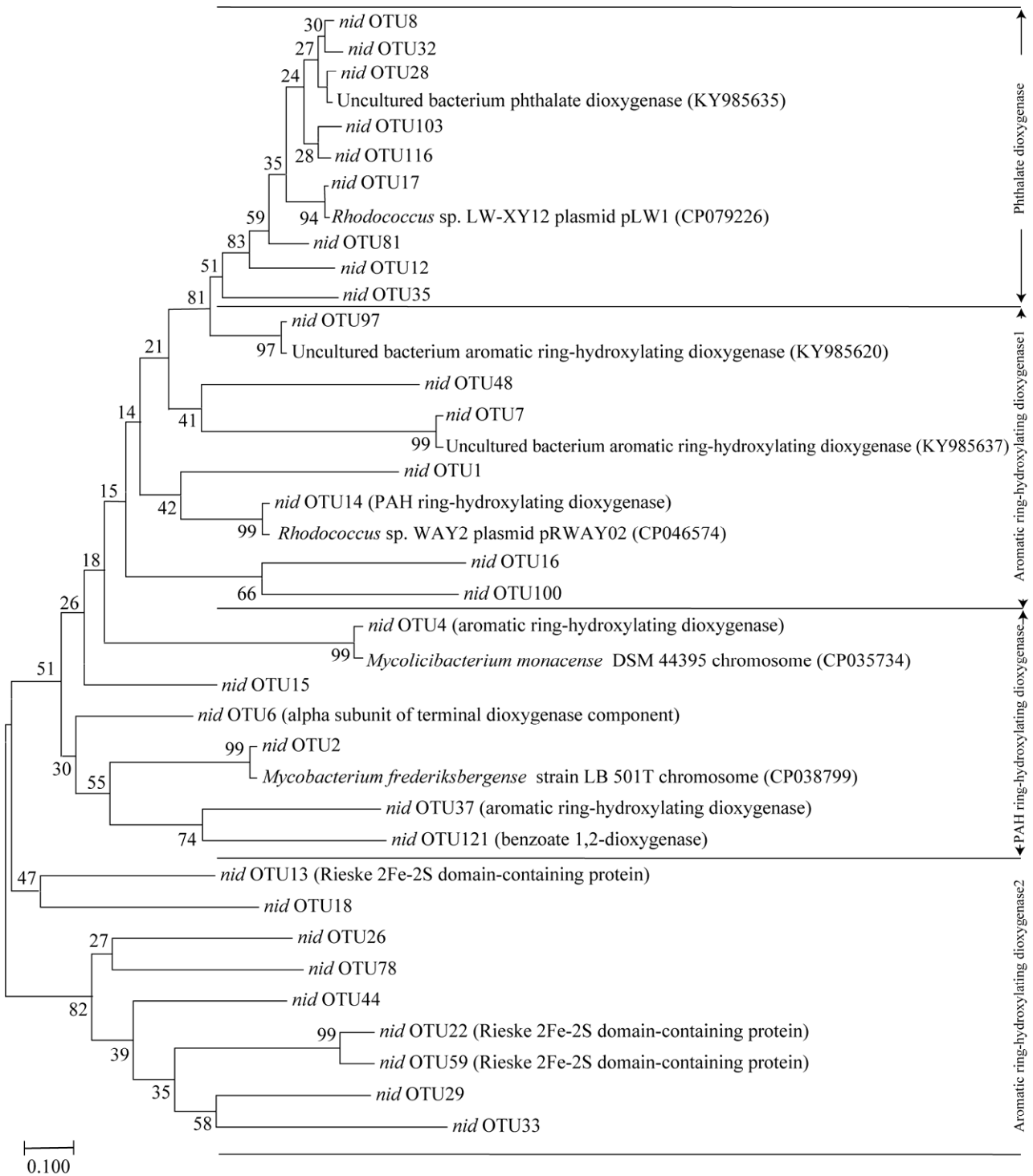


图 8 准东油田不同年限石油污染土壤中 *nid* 基因系统发育分析

Figure 8 Phylogenetic analysis of aromatic ring-hydroxylating dioxygenase gene fragments in oil-contaminated soils with different pollution years of Zhundong oilfield. The numbers at nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1 000 resamples date sets. Bar: 0.1 sequence divergence. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences.

表 1 环境因子组合与不同石油污染土壤中多环芳烃降解基因结构的相关关系

Table 1 Correlation between different combination of environmental variables and aromatic dioxygenase gene structure in different oil-contaminated soils of Zhundong oilfield

Different combination of environmental factors	Correlation coefficient	Mantel test	
		rM	P
DOC	0.518 9	0.296 3	0.102 7
DOC WC	0.590 7	0.480 8	0.005 1
TS DOC WC	0.571 2	0.460 0	0.009 5
TS DOC EC OC	0.564 0	0.451 7	0.010 6
TS DOC WC EC OC	0.538 5	0.428 1	0.014 0
TS DOC WC EC pH OC	0.537 2	0.531 5	0.002 1
TS DOC WC EC pH OC TPAHs	0.505 3	0.428 1	0.011 2
TN TS DOC WC EC pH OC TPAHs	0.473 6	0.379 9	0.020 4
TN TC TS DOC WC EC pH OC TPAHs	0.431 9	0.378 4	0.016 6
TN TC TP TS DOC WC EC pH OC TPAHs	0.382 2	0.314 0	0.037 9

The letter abbreviations represent different soil properties are shown in figure 1 note.

多环芳烃含量与功能基因 Bioenv 分析结果显示(表 2), 16 种多环芳烃中芴、苯并[a]蒽和苯并[a]芘组合对石油污染土壤中芳香烃双加氧酶基因结构影响最大, 相关系数为 0.483 1, 但差异均不显著, 此外其余 13 种多环芳烃因子组

合均未对芳香烃双加氧酶基因结构产生显著性影响。实验结果显示多环芳烃虽具毒性且环境持久, 但因其含量相较其他石油烃较低, 因此不能显著影响本研究所扩增多环芳烃降解基因结构。

表 2 多环芳烃组合与不同石油污染土壤中多环芳烃降解基因结构的相关关系

Table 2 Correlation between PAH combination variables and aromatic dioxygenase gene structure in different oil-contaminated soils of Zhundong oilfield

Different combination of PAHs	Correlation coefficient	Mantel test	
		rM	P
Fla	0.414 1	0.290 8	0.050 6
Flu Fla	0.426 8	0.243 2	0.066 0
Flu BaA BaP	0.483 1	0.204 6	0.117 9
Flu BaA BaP IcdP	0.475 2	0.203 3	0.115 1
Flu Ant Fla BaA IcdP	0.481 1	0.195 9	0.127 7
Flu Ant Fla BaA BaP BghiP	0.465 6	0.213 6	0.103 1
Flu Ant Fla BaA BaP BghiP IcdP	0.464 1	0.217 0	0.101 7
Flu Ant Fla BaA BaP DahA BghiP IcdP	0.435 3	0.193 1	0.125 0
Acy Flu Phe Ant Fla BaA DahA BghiP IcdP	0.404 9	0.220 1	0.098 2
Nap Acy Flu Ant Fla BaA BkF DahA BghiP IcdP	0.395 1	0.228 8	0.094 8
Nap Acy Flu Phe Ant Fla BaA BaP DahA BghiP IcdP	0.386 6	0.213 1	0.105 8
Nap Acy Flu Ant Fla Pyr BaA BkF BaP DahA BghiP IcdP	0.360 6	0.221 4	0.098 3
Nap Acy Flu Ace Phe Ant Fla Chr BaA BaP DahA BghiP IcdP	0.336 7	0.165 5	0.160 4
Nap Acy Flu Phe Ant Fla Pyr Chr BaA BkF BaP DahA BghiP IcdP	0.320 2	0.175 0	0.143 4
Nap Acy Flu Ace Phe Ant Fla Pyr BaA BbF BkF BaP DahA BghiP IcdP	0.287 8	0.164 0	0.168 6
Nap Acy Flu Ace Phe Ant Fla Pyr Chr BaA BbF BkF BaP DahA BghiP IcdP	0.243 5	0.126 1	0.181 5

The letter abbreviations represent different polycyclic aromatic hydrocarbons are shown in figure 2 note.

3 讨论与结论

微生物对石油烃的降解在石油自然衰减过程中发挥了重要作用,微生物通过产生一系列酶来降解和利用石油有机污染物。多环芳烃因环境持久及对人的高致癌性引起广泛关注,然而多环芳烃时空分布及代谢基因和土壤理化因子相关关系仍不清晰,因此需要研究石油污染自然衰减过程中多环芳烃浓度及降解功能基因结构变化的规律,指导石油烃污染土壤修复方案的制定。

3.1 准东油田石油污染土壤自然衰减过程中理化因子变化规律

石油污染能显著改变土壤理化性质,如增加土壤总碳含量,随污染年限增加,有机污染物会不断被微生物降解矿化,含量降低。值得注意的是石油污染土壤中总碳和可溶性有机碳含量变化规律,说明古尔班通古特沙漠砂土中营养物质匮乏,石油污染后,大量烷烃和芳香烃等有机污染物增加土壤总碳含量,自然衰减过程中石油烃经土著微生物降解转变为可溶性碳逐年被利用并矿化^[13]。研究中多环芳烃总量并未随石油自然衰减逐年递减,可能与污染之初渗漏原油总量有关。但污染3年和5年的土壤中TPAH/OC均显著大于污染1年的土壤,说明多环芳烃自然降解速度较烷烃缓慢,为环境持久性污染物^[30]。污染土壤理化因子测试结果显示,石油污染经过一定年限自然衰减后,经土壤微生物自然修复,部分指标会逐渐恢复至背景值。

3.2 准东油田石油污染土壤中多环芳烃降解基因结构变化特征

芳香烃双加氧酶为微生物降解芳香烃氧化开环关键限速步骤,隶属于Rieske型非血红素铁加氧酶家族^[31]。Rieske型芳香环双加氧酶是含有Rieske[2Fe-2S]中心的多组分酶系统,多数由末端氧化酶、还原酶和铁氧还原蛋白3部分组成,

部分缺少铁氧还原蛋白部分为双组分系统^[32]。本研究中萘双加氧酶基因为三组分系统,而扩增所获*nidA-like*基因根据聚类分析结果显示为含有Rieske[2Fe-2S]中心的末端氧化酶的双组分系统^[8]。此外*nidA-like*基因引物根据来源于红树林沉积物中*Mycobacterium*、*Sphingomonas*、*Terrabacter*、*Sphingopyxis*、*Sphingobium*和*Rhodococcus*属微生物多环芳烃环羟基化加氧酶基因进行设计,本研究从沙漠石油污染土壤中扩增获得与*Mycobacterium*和*Rhodococcus*属多环芳烃环羟基化加氧酶基因高相似性的基因序列^[16]。此外*nid*基因结构随石油衰减变化程度大于*nah*基因,随时间延长基因OTUs及多样性先升高随后显著降低,表明大量多环芳烃类物质可在污染前期一段时间内被降解,随后其含量下降,导致芳香烃双加氧酶基因多样性也随之下降,这与Bacosa等^[5]的研究结果类似。实验结果显示在寡营养环境中,石油烃降解微生物群落和降解规律存在一定相似性。

3.3 准东油田石油污染土壤多环芳烃降解基因结构环境驱动因子

原油组成和性质各不相同,但是烷烃和芳香烃的比例可达80%^[33],其中烷烃在原油中的比例约为50%–70%,芳香烃仅占10%–30%^[34]。研究显示多环芳烃组合并未显著影响功能基因结构组成,但污染土壤理化因子中可溶性有机碳和土壤含水量会显著影响功能基因结构,推测干旱沙漠土壤微生物需以水为介质降解多环芳烃,降解产生的小分子物质溶解于水溶液同时增加了土壤电导率,并最终作为其自身代谢的碳源和能源物质,进入TCA循环供其生长所需能量,并最终转化为CO₂进行释放^[35]。此外土壤总硫、可溶性有机碳、电导率和含油率组合也会显著影响功能基因结构,推测采集深度为20 cm的沙漠土中,石油污染中多环芳烃存在厌氧降解,能以

硫酸盐、二氧化碳作为最终电子受体,将石油烃有机物转化为 CH_4 等物质^[36-37],也正因此土壤总硫会显著影响功能基因结构,但强度小于有氧降解途径。

新疆准东油田石油污染砂质土壤中芳环羟化双加氧酶基因类群及多样性均会随石油自然衰减发生显著变化,而萘双加氧酶基因却无此变化。石油污染土壤中多环芳烃相较土壤理化因子并不能显著影响芳环羟化双加氧酶基因结构,土壤可溶性有机碳和土壤含水量会显著影响功能基因结构类型。

参考文献

- [1] LIANG Y, ZHANG X, WANG J, LI G. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 241/242: 371-378.
- [2] PENG RH, XIONG AS, XUE Y, FU XY, GAO F, ZHAO W, TIAN YS, YAO QH. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(6): 927-955.
- [3] NIEPCERON M, MARTIN-LAURENT F, CRAMPON M, PORTET-KOLTALO F, AKPA-VINCESLAS M, LEGRAS M, BRU D, BUREAU F, BODILIS J. *Gammaproteobacteria* as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils[J]. *Environmental Pollution: Barking, Essex*, 2013, 180: 199-205.
- [4] FIELD JA, SIERRA-ALVAREZ R. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls[J]. *Environmental Pollution: Barking, Essex*, 2008, 155(1): 1-12.
- [5] BACOSA HP, ERDNER DL, ROSENHEIM BE, SHETTY P, SEITZ KW, BAKER BJ, LIU Z. Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to light Louisiana sweet crude oil[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(10): 2532-2543.
- [6] LIANG Y, VAN NOSTRAND JD, DENG Y, HE Z, WU L, ZHANG X, LI G, ZHOU J. Functional gene diversity of soil microbial communities from five oil-contaminated fields in China[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(3): 403-413.
- [7] ALCÁNTARA MT, GÓMEZ J, PAZOS M, SANROMÁN MA. Combined treatment of PAHs contaminated soils using the sequence extraction with surfactant-electrochemical degradation[J]. *Chemosphere*, 2008, 70(8): 1438-1444.
- [8] 于寒颖, 杨慧. 石油烃降解酶及其基因的结构、功能和表达调控[J]. *应用与环境生物学报*, 2012(6): 1066-1074.
YU HY, YANG H. Structure, function and expression regulation of hydrocarbon-degrading enzymes and their encoding genes[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2012(6): 1066-1074 (in Chinese).
- [9] ABU-OMAR MM, LOAIZA A, HONTZEAS N. Reaction mechanisms of mononuclear non-heme iron oxygenases[J]. *Chemical Reviews*, 2005, 105(6): 2227-2252.
- [10] SUN W, CUPPLES AM. Diversity of five anaerobic toluene-degrading microbial communities investigated using stable isotope probing[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(4): 972-980.
- [11] SHAHI A, AYDIN S, INCE B, INCE O. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 125: 153-160.
- [12] HAN XM, LIU YR, ZHENG YM, ZHANG XX, HE JZ. Response of bacterial *pdol*, *nah*, and *C12O* genes to aged soil PAH pollution in a coke factory area[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2014, 21(16): 9754-9763.
- [13] 李兴海, 吕杰, 马媛, 吕光辉. 石油污染土壤自然老化过程中微生物菌群及功能基因变化规律[J]. *新疆大学学报: 自然科学版: 中英文*, 2021(4): 472-480.
LI XH, LYU J, MA Y, LYU GH. Dynamic properties of microbial communities and aromatic dioxygenase gene during oil-contaminated soils natural aging[J]. *Journal of Xinjiang University: Natural Science Edition*, 2021(4): 472-480 (in Chinese).
- [14] PARK W, PADMANABHAN P, PADMANABHAN S, ZYLSTRA GJ, MADSEN EL. *nahR*, encoding a LysR-type transcriptional regulator, is highly conserved among naphthalene-degrading bacteria isolated from a coal tar waste-contaminated site and in extracted community DNA[J]. *Microbiology: Reading*, 2002, 148(pt 8): 2319-2329.
- [15] KWEON O, KIM SJ, FREEMAN JP, SONG J, BAEK S, CERNIGLIA CE. Substrate specificity and structural characteristics of the novel Rieske nonheme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases NidAB and NidA3B3 from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1[J]. *mBio*, 2010, 1(2): e00135-e00110.
- [16] ZHOU HW, GUO CL, WONG YS, TAM NFY. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 262(2): 148-157.

- [17] SHAHSAVARI E, ABURTO-MEDINA A, TAHA M, BALL AS. A quantitative PCR approach for quantification of functional genes involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils[J]. *MethodsX*, 2016, 3: 205-211.
- [18] PENG JJ, CAI C, QIAO M, LI H, ZHU YG. Dynamic changes in functional gene copy numbers and microbial communities during degradation of pyrene in soils[J]. *Environmental Pollution: Barking, Essex*, 2010, 158(9): 2872-2879.
- [19] DEBRUYN JM, CHEWNING CS, SAYLER GS. Comparative quantitative prevalence of *Mycobacteria* and functionally abundant *nidA*, *nahAc*, and *nagAc* dioxygenase genes in coal tar contaminated sediments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(15): 5426-5432.
- [20] YANG Y, WANG J, LIAO J, XIE S, HUANG Y. Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4): 1935-1946.
- [21] YANG Y, WANG J, LIAO J, XIE S, HUANG Y. Distribution of naphthalene dioxygenase genes in crude oil-contaminated soils[J]. *Microbial Ecology*, 2014, 68(4): 785-793.
- [22] 陈伟胜, 童玲, 唐国斌. 石油污染土壤含水率的测定[J]. *华北水利水电学院学报*, 2012(4): 93-96.
CHEN WS, TONG L, TANG GB. Determination of water content of the oil-contaminated soil[J]. *Journal of North China Institute of Water Conservancy and Hydroelectric Power*, 2012(4): 93-96 (in Chinese).
- [23] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
LU RK. *Agricultural Chemical Analysis Method of Soil*[M]. Beijing: China Agriculture Sciencetech Press, 2000 (in Chinese).
- [24] 孙玉萍, 刘素辉, 徐晓燕, 赵丽萍, 毛元飞, 王红英. 新疆不同石油产区油污土壤含油量的测定[J]. *疾病预防控制通报*, 2011(2): 8-10.
SUN YP, LIU SH, XU XY, ZHAO LP, MAO YF, WANG HY. Determination of mineral oil content in soil in different oilfield of Xinjiang[J]. *Bulletin of Disease Control and Prevention*, 2011(2): 8-10 (in Chinese).
- [25] 河南省环境监测中心. 土壤和沉积物多环芳烃的测定高效液相色谱法. HJ 784-2016[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2016.
Henan Environmental Monitoring Center. *Soil and Sediment-Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-high Performance Liquid Chromatography*. HJ 784-2016[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2016 (in Chinese).
- [26] BALDWIN BR, NAKATSU CH, NIES L. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3350-3358.
- [27] BREZNA B, KHAN AA, CERNIGLIA CE. Molecular characterization of dioxygenases from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* spp.[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 223(2): 177-183.
- [28] MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [29] CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK, FIERER N, PEÑA AG, GOODRICH JK, GORDON JI, HUTTLEY GA, KELLEY ST, KNIGHTS D, KOENIG JE, LEY RE, LOZUPONE CA, MCDONALD D, MUEGGE BD, PIRRUNG M, REEDER J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [30] DAT ND, CHANG MB. Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies[J]. *The Science of the Total Environment*, 2017, 609: 682-693.
- [31] GIBSON DT, PARALES RE. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11(3): 236-243.
- [32] MASON JR, CAMMACK R. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1992, 46: 277-305.
- [33] WIDDEL F, RABUS R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(3): 259-276.
- [34] 米镇涛. 化学工艺学[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2006.
MI ZT. *Chemical Technology*[M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2006 (in Chinese).
- [35] 吴慧君, 宋权威, 郑瑾, 于文赫, 张坤峰, 林双君, 梁如冰. 微生物降解石油烃的功能基因研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(10): 3355-3368.
WU HJ, SONG QW, ZHENG J, YU WH, ZHANG KF, LIN SJ, LIANG RB. Function genes in microorganisms capable of degrading petroleum hydrocarbon[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(10): 3355-3368 (in Chinese).
- [36] VOGT C, KLEINSTEUBER S, RICHNOW HH. Anaerobic benzene degradation by bacteria[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(6): 710-724.
- [37] FUCHS G, BOLL M, HEIDER J. Microbial degradation of aromatic compounds-from one strategy to four[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(11): 803-816.