



Neorhizobium petrolearium OS53 联合紫花苜蓿 协同修复石油污染土壤研究

柳晓东[#], 余天飞[#], 邓振山, 范晓虹, 张薇, 杨昱, 何颖, 艾加敏, 姜影影^{*}

延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000

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 Xiaodong, YU Tianfei, DENG Zhenshan, FAN Xiaohong, ZHANG Wei, YANG Yu, HE Ying, AI Jiamin, JIANG Yingying. *Neorhizobium petrolearium* OS53 combined with alfalfa (*Medicago sativa* L.) for remediation of petroleum-contaminated soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 854-868.

摘要: 【目的】探究 *Neorhizobium petrolearium* OS53 与紫花苜蓿协同修复石油污染土壤的机制。【方法】使用 Illumina 和 Nanopore 平台对菌株 OS53 进行全基因组测序, 构建菌株基因组完成图, 并进行基因预测及功能注释, 分析其中与结瘤促生及石油降解相关基因, 并通过实验测定菌株 OS53 产吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)、铁载体、溶磷和解钾等与促生相关的能力。使用试剂盒对联合修复前后土壤中土壤脲酶、脱氢酶、多酚氧化酶和脂肪酶活性及紫花苜蓿的叶绿素、丙二醛、脯氨酸、可溶性蛋白、可溶性糖和超氧化物歧化酶等生理指标进行测定。【结果】菌株 OS53 的基因组由一个 5.56 Mb 的环形染色体和 2 个大小分别为 0.92 Mb 和 0.38 Mb 的质粒组成, 基因组 G+C 含量为 60.2%, 共编码 6 968 个基因。菌株 OS53 与 *N. petrolearium* DSM 26482^T 的 16S rRNA 基因序列相似性最高, 为 99.86%, 且在系统发育树上形成稳定分支, 表明菌株 OS53 与 *N. petrolearium* 为同一种, 因此将 OS53 命名为 *N. petrolearium* OS53。试验结果表明, 菌株 OS53 具有产 IAA 能力, 并在其基因组中也发现相关基因。在初始石油含量为(4 403.30±222.10) mg/kg 时, 经过 120 d 修复, OS53 与紫花苜蓿协同修复效率能够达到 57.53%, 比不接种 OS53、仅接种

资助项目: 陕西省教育厅专项科研计划(21JK0992); 延安大学 2022 年校级大学生创新创业训练计划(D2022013); 国家自然科学基金(42207037); 延安市科技专项经费(2019-27, 203010105)

This work was supported by the Special Scientific Research Project of Shaanxi Education Department (21JK0992), the Innovation and Entrepreneurship Training Plan for 2022 College Students of Yan'an University (D2022013), the National Natural Science Foundation of China (42207037), and the Special Fund for Science and Technology of Yan'an City (2019-27, 203010105).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: jyy@yau.edu.cn

Received: 2023-08-30; Accepted: 2023-10-26; Published online: 2023-11-13

OS53 和仅种植苜蓿分别提高了 44.26%、41.69% 和 8.84%。在联合修复体系中, 紫花苜蓿叶绿素、可溶性蛋白和可溶性糖的含量有所提高, 丙二醛和脯氨酸的含量以及超氧化物歧化酶的活性有所降低, 同时土壤中多酚氧化酶、脱氢酶、脂肪酶和脲酶的活性都有所提高。【结论】菌株 OS53 具有产 IAA 的能力, 并且能够促进紫花苜蓿在石油污染土壤中的生长, 进而提高土壤中与石油降解相关部分酶活, 最终提高联合修复体系对石油污染土壤的修复效果。

关键词: *Neorhizobium petrolearium*; 全基因组测序; 紫花苜蓿; 石油; 联合修复

Neorhizobium petrolearium OS53 combined with alfalfa (*Medicago sativa* L.) for remediation of petroleum-contaminated soil

LIU Xiaodong[#], YU Tianfei[#], DENG Zhenshan, FAN Xiaohong, ZHANG Wei, YANG Yu, HE Ying, AI Jiamin, JIANG Yingying^{*}

College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

Abstract: [Objective] To explore the mechanism of *Neorhizobium petrolearium* OS53 combined with alfalfa (*Medicago sativa* L.) in the remediation of petroleum-contaminated soil. [Methods] Illumina and Nanopore were employed to sequence the whole genome of *N. petrolearium* OS53, and the complete genome map of the strain was constructed. Gene prediction and functional annotation were carried out to analyze the genes involved in nodulation and oil degradation. The abilities of strain OS53 to produce indole acetic acid (IAA), secrete siderophore, and solubilize phosphorus and potassium were tested. The activities of urease, dehydrogenase, polyphenol oxidase, and lipase in soil and the levels of chlorophyll, malondialdehyde, proline, soluble protein, soluble sugar, and superoxide dismutase in alfalfa were measured by kits. [Results] The genome of strain OS53 consisted of a circular chromosome of 5.56 Mb and two plasmids of 0.92 Mb and 0.38 Mb, respectively, with the G+C content of 60.2%. The genome encoded a total of 6 968 genes. The strain OS53 and *N. petrolearium* DSM 26482^T showed the 16S rRNA gene sequence similarity of 99.86%, and formed stable branches on the phylogenetic tree, indicating that strain OS53 and *N. petrolearium* were the same species. Therefore, OS53 was named as *N. petrolearium* OS53. The strain OS53 had the ability to produce IAA, and the related genes were identified in the genome. After 120 days of remediation of the soil with the initial oil content of (4 403.30±222.10) mg/kg, OS53 and alfalfa showed the remediation efficiency up to 57.53%, which was 44.26%, 41.69%, and 8.84% higher than that of no inoculation of strain OS53, inoculation of OS53 only, and planting alfalfa only, respectively. In the combined remediation system, alfalfa showed elevated the levels of chlorophyll, soluble protein, and soluble sugar and lowered levels of malondialdehyde, proline, and superoxide dismutase, and the soil showed increased activities of polyphenol oxidase, dehydrogenase, lipase, and urease. [Conclusion] The strain OS53 had the ability to produce

IAA to promote the growth of alfalfa in the petroleum-contaminated soil, which increased the activity of enzymes involved in oil degradation in the soil. Finally, the combined system improved the remediation efficiency of the soil.

Keywords: *Neorhizobium petrolearium*; whole genome sequencing; *Medicago sativa* L.; petroleum; combined system for remediation

石油污染是全球范围内面临的主要环境问题之一。石油污染土壤后会对土壤的化学性质(例如 pH、电导率和有机质含量)和肥力特性(例如氮、磷等)造成巨大影响,对植物产生毒害作用,并且石油中的部分组分也可以在农作物中积累,从而转移到陆地食物链中,最终对人类的健康造成严重威胁^[1-3]。虽然传统的物理和化学修复方法,例如燃烧、土壤洗涤和淋洗、热解吸以及化学氧化法等,可以高效去除土壤中石油,但是在修复过程中土壤的景观和结构极易遭受破坏,造成二次污染,此外,还需要投入大量的人力和物力。上述缺陷极大地限制了物理、化学修复技术的应用情景^[2-4]。因此具有经济环保、操作简便、适用范围广等特点的生物修复技术近年来受到广泛关注。

生物修复主要包括植物修复、微生物修复及联合修复,此外一些原生动物、藻类等也在某些生境中发挥重要作用。许多研究表明,植物修复是降低土壤中有害污染物含量和毒性最为有效且经济的方法^[5-7]。植物根系与土壤的巨大接触面积能够有效增加功能菌与土壤污染物接触面积,同时根系分泌物也能够促进功能菌的代谢活动,加快污染物降解,此外许多植物也能够通过植物积累、植物稳定、植物降解等来修复石油污染^[8-9]。大多数石油碳氢化合物的疏水性可能会降低植物养分的可利用度,因此养分缺乏已被认为是限制石油污染土壤植物修复技术发展的主要因素之一^[10-11]。豆科植物不仅可以与根瘤菌通过共生固氮以促进自身在氮素贫瘠土壤中的生长,而且共生体系也能够有

效改良土壤生态,为功能微生物的代谢提供良好的环境条件。此外,也有许多根瘤菌由于共生基因的丢失,丧失了共生固氮能力,但是其可以通过产生吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)等生长激素,促进植物生长。研究表明,根际促生菌(rhizosphere growth-promoting bacteria, PGPR)可以通过溶磷解钾、产生铁载体和植物激素等来改善植物营养状态^[12],促进植物生长,增强植物对生物和非生物胁迫的耐受性^[13-14],为植物在高浓度污染物环境中的生长提供支持。因此,基于植物-促生微生物联合修复策略修复体系要比单一体系更具优势^[15-16]。

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)为多年生草本豆科植物,具有适应性强、耐贫瘠干旱等特点,并且根系发达,在黄土高原地区广泛分布,是修复有机污染物和重金属污染土壤常用植物^[17-18]。同时,课题组在前期研究中,从陕北石油污染土壤中分离得到一株细菌,经 16S rRNA 基因序列比对分析,其与 *Neorhizobium petrolearium* DSM 26482^T 的相似性最高为 99.86%。*N. petrolearium* DSM 26482^T 为从石油污染土壤中分离得到的一株具有多环芳烃降解能力的菌株,并且其可以与紫花苜蓿共生结瘤^[19]。通过石油降解试验及共生结瘤试验发现,菌株 OS53 不能够降解石油,并且也不能够与紫花苜蓿形成共生根瘤。但是菌株 OS53 与紫花苜蓿在联合修复石油污染土壤中表现出较高的修复效率,因此为了探究联合修复机制,对菌株 OS53 进行全基因组测序,构建菌株 OS53 基因组完成图,对可编码的基因进行功能注释,探究该菌株基因组中

与石油降解及结瘤相关基因分布。同时也对联合修复体系修复前后土壤中多酚氧化酶(soil polyphenol oxidase, S-PPO)、脱氢酶(soil dehydrogenase, S-DHA)、脂肪酶(soil lipase, S-LPS)和脲酶(soil urease, S-UE)活性以及石油含量进行测定,并对紫花苜蓿的叶绿素、可溶性蛋白、可溶性糖、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和脯氨酸(proline, Pro)的含量以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性进行测定,以期揭示非石油降解促生菌 OS53 提高联合修复体系修复效率的机制。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

菌株 OS53 为课题组前期从石油污染土壤中分离得到,悬浮于 20% (体积分数)甘油中在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保藏。

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, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, pH 为 7.5, 配制固体培养基时需要加入 15.0 g/L 琼脂粉, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min 后使用。

基础盐培养基(minimal salt medium, MSM) (g/L): 葡萄糖 10.0, NH_4Cl 5.0, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCl_2 0.02, KCl 0.1, pH 为 7.5, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min 后使用。

1.3 供试草种

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。

1.4 菌株 OS53 生长特性

菌株的细胞形态使用场发射扫描电镜(JEOL 公司)进行观察。使用 PYG 液体培养基对菌株 pH 和 NaCl 耐受性进行测定。测定 pH 耐受范围时,培养基的 NaCl 浓度为 0.5%,使用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节培养基的 pH 依次

为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0;测定 NaCl 耐受范围时,培养基的 pH 为 7.0,使用 NaCl 配制盐度依次为 0、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%和 6.0%的 PYG 培养基。

使用 MSM 培养基对菌株的碳氮源利用情况进行测试。测定碳源时,培养基中的氮源为 KNO_3 ,在培养基中按 1% (质量体积分数)的比例添加碳源,所测试的碳源包括葡萄糖、淀粉、 α -酮戊二酸、柠檬酸、D-海藻糖、D-棉子糖、肌苷、D-纤维素、蜜二糖、水苏糖、D-苹果酸和 D-甘露醇;测定氮源时,培养基中的碳源为葡萄糖,在培养基中按 1% (质量体积分数)的比例添加氮源,所测试的氮源为天冬氨酸、丙氨酸、L-精氨酸、L-丝氨酸、组胺二盐酸盐、D-丝氨酸、L-脯氨酸、L-色氨酸、硫酸铵、硝酸钾、亚硝酸钠和硝酸铵。

最后按照 0.1% (体积分数)的比例在培养基中接种 OD_{600} 为 1.0 的菌株 OS53 种子液,在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 的条件下培养 48 h,测定 OD_{600} 的吸光度。

1.5 菌株 OS53 基因组的提取和测序

将菌株 OS53 接种在 PYG 液体培养基中,在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 的条件下培养 48 h。然后,取 10 mL 的培养液,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 条件下离心 20 min,收集菌体。将收集的菌体使用干冰运送至广东美格生物科技公司进行细菌基因组的提取和测序。

1.6 基因组及系统发育分析

将原始测序数据过滤后得到 clean data,使用 Unicycler 软件^[20]进行组装,并使用 BUSCO v5.4.7 软件^[21]对所组装的基因组完整性进行评估,将组装后的基因组序列上传至 GenBank 数据库。基于组装得到的基因组,分析基因组的编码基因和非编码的 RNA 等组分,将编码的基

因上传至京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库进行功能注释。提取基因组中 16S rRNA 基因完整序列并在 EzBioCloud 中进行 BLAST 比对^[22], 选择与菌株 OS53 相似性最高的 18 株模式菌, 在 MEGA 5.1 软件中使用邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建系统发育进化树^[23]。

1.7 菌株 OS53 促生特性分析

菌株 OS53 植物促生特性选择产 IAA、铁载体、溶磷、解钾为指标进行测定, 具体测定

方法参考文献[24]。

1.8 菌株 OS53 联合紫花苜蓿修复石油污染土壤研究

1.8.1 试验设计

于 2022 年 10 月-2023 年 4 月在室内开展了 OS53 联合紫花苜蓿修复石油污染土壤研究。具体试验设计见图 1。首先, 从野外采集未受石油污染的土壤, 去除岩石和树枝等杂物后, 按照 400 mg/kg 的氮素含量添加 KNO₃ 补充土壤中的氮素。然后, 按照 5 000 mg/kg 的浓度称

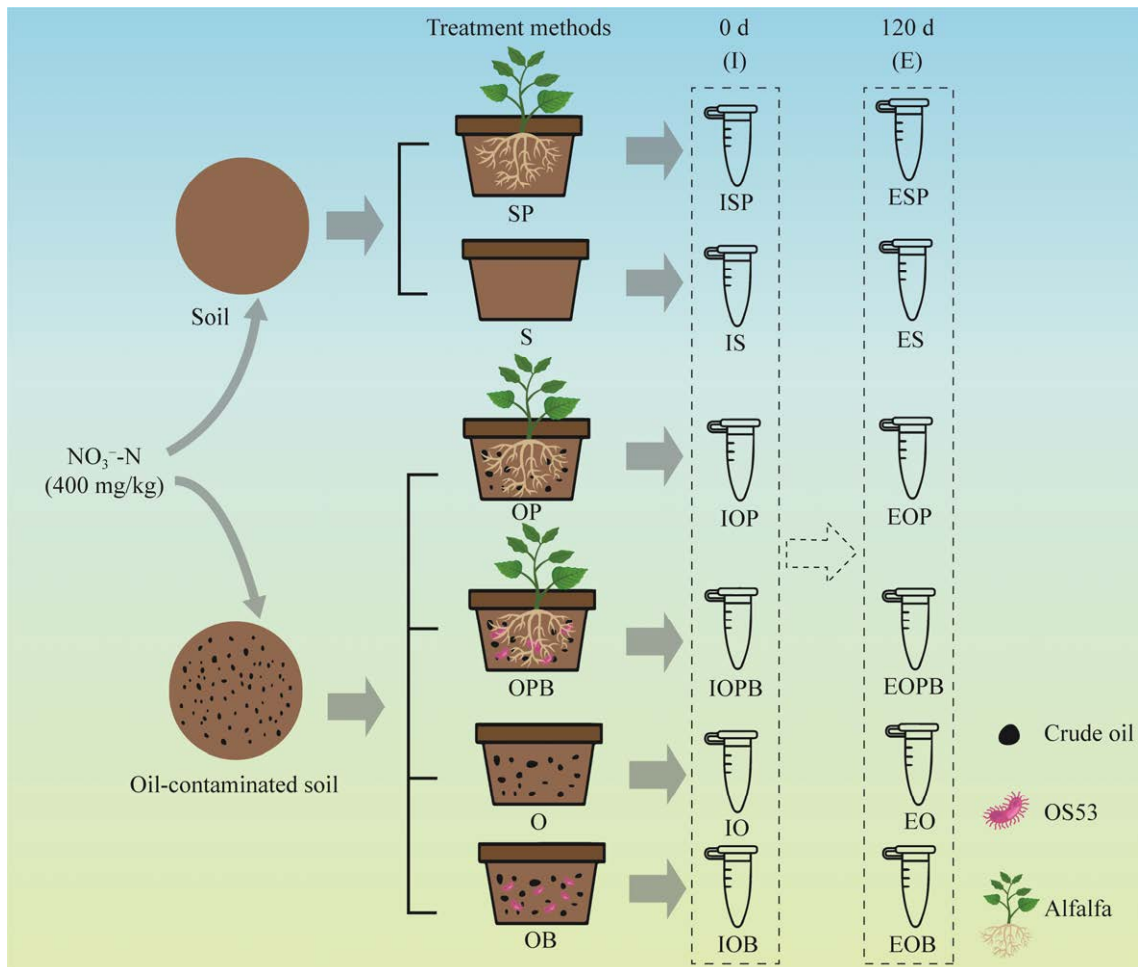


图 1 菌株 OS53 联合紫花苜蓿模拟修复石油污染土壤示意

Figure 1 Schematic diagram of simulated remediation of oil-contaminated soil by strain OS53 combined with alfalfa. SP: Soil+Alfalfa treatment; S: Soil; OP: Soil+Petroleum+Alfalfa treatment; OPB: Soil+Alfalfa+OS53 treatment; O: Soil+Petroleum treatment; OB: Soil+OS53 treatment. I: The initial samples; E: The sample after 120 days of treatment.

取石油, 将其溶于石油醚中, 均匀地添加至土壤中, 并在通风橱中将石油醚完全挥发干净。最后, 按照图 1 的方式对石油污染土壤进行为期 120 d 的修复处理。其中编号 S 为土壤; SP 为土壤+紫花苜蓿处理; OP 为土壤+石油+紫花苜蓿处理; OPB 为土壤+紫花苜蓿+OS53 处理; O 为土壤+石油处理; OB 为土壤+OS53 处理。采集修复前后的土壤样品, 测定其石油含量和酶活性(S-PPO、S-DHA、S-LPS 和 S-UE), 并收集植物叶片, 测定叶绿素、可溶性蛋白、可溶性糖、MDA 和 Pro 的含量以及 SOD 的活性, 以上每个试验设置 5 重复。

1.8.2 土壤样品中石油含量测定

土壤中石油含量测定参考国家标准《土壤 石油类的测定 红外分光光度法(HJ 1051—2019)》^[25], 具体步骤如下: 称取 10.0 g 土壤样品, 向其中添加 3.0 g 无水硫酸钠, 在研钵中研磨, 充分混匀以去除土壤样品中的水分, 然后将样品转移至锥形瓶中, 向其中添加 10.0 mL 四氯乙烯, 160 r/min 振荡 30 min 萃取石油, 使用玻璃纤维滤膜过滤, 收集萃取液, 再使用 20.0 mL 四氯乙烯重复萃取 1 次, 最后使用 10.0 mL 四氯乙烯清洗上述中所使用的玻璃仪器, 合并 3 次滤液, 过硅酸镁吸附柱, 收集流出液, 待测。

1.8.3 土壤酶活及植物相关指标测定

使用北京索莱宝科技有限公司生产的土壤脲酶(BC0120)、脱氢酶(BC0390)、多酚氧化酶(BC0110)和脂肪酶(BC3980)试剂盒, 对样本中的 4 种酶活性进行测定, 具体方法按照试剂盒所提供的说明书进行。植物叶片的叶绿素(BC0990)、MDA(BC0020)、Pro(BC0290)、可溶性蛋白(BC3720 和 PC0020)、可溶性糖(BC0030)和 SOD(BC0170)活性使用北京索莱宝科技有限公司生产的试剂盒进行测定, 具体方法按照试剂盒所提供的说明书进行。

1.9 数据统计与分析

以上试验均设置 5 个平行对照, 结果为平均值±标准差(standard deviation, SD), 使用 Origin 2022 和 R 4.1.3 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 OS53 生长特性

菌株 OS53 的菌落颜色为乳白色, 表面光滑, 能够产生胞外多糖, 革兰氏染色为阴性, 细胞形态为卵状, 大小为(1.8–2.8) μm×(2.7–3.5) μm。菌株 OS53 生长的 pH 范围为 5.0–11.0, 最适生长 pH 为 7.0, NaCl 的浓度耐受范围为 0–3.0%, 最适生长 NaCl 浓度为 0.5%。菌株 OS53 可利用葡萄糖、淀粉、蜜二糖、水苏糖和 D-甘露醇作为碳源, 可利用硝酸铵、硝酸钾、硫酸铵、亚硝酸钠、丙氨酸、D-丝氨酸和 D-色氨酸作为氮源。

2.2 菌株 OS53 全基因组测序、组装及功能注释

基于菌株 OS53 的全基因组测序结果, 构建基因组完成图, 菌株 OS53 基因组包括 1 个环形染色体和 2 个质粒, 其中环形染色体的大小为 5 559 109 bp, 质粒的大小分别为 916 660 bp 和 379 813 bp, 共编码 6 968 个基因, 编码基因的碱基数为 6 100 863 bp, 占整个基因组全长的 88.99%, 基因组的其他统计信息如表 1 所示。将 OS53 的基因组序列提交到 GenBank 数据库, 登录号为 GCA_029854435.1。

菌株 OS53 基因组在 KEGG 数据库注释结果表明, 代谢通路在 level-2 层级中被注释具有膜转运(membrane transport)功能的基因数目最多, 其次为细胞群落-原核生物(cellular community-prokaryotes)和氨基酸代谢(amino acid metabolism)。在 level-3 分类层级中, 被注释具有 ABC 转运

表 1 菌株 OS53 基因组组分统计

Table 1 Statistics of genome components of strain OS53

Genome features	Value
Genome size (bp)	6 855 582
Gene number	6 968
Gene total length (bp)	6 100 863
Gene length/Genome (%)	88.99
Gene density (per kb)	1.02
23S rRNA	3
5S rRNA	3
16S rRNA	3
tRNA	52

蛋白(ABC transporters)功能的基因数目最多, 为 355 个, 参与群体感应(quorum sensing)的基因数量次之, 为 315 个, 参与氨基酸生物合成(biosynthesis of amino acids)和碳代谢(carbon metabolism)的基因数量分别为 163 个和 149 个。

由于菌株 *N. petrolearium* DSM 26482^T 具有多环芳烃降解能力, 并且能够与紫花苜蓿共生结瘤, 但是这与前期结果完全相反, 因此对 OS53 全基因组 KEGG 注释结果进行分析, 寻找与石油和多环芳烃降解以及与结瘤相关的基因。然而经过筛选分析, 没有在基因组中发现常见的与石油降解相关基因及结瘤相关基因, 这与石油降解相关试验结果及结瘤试验结果相符合。表明菌株 OS53 与 *N. petrolearium* DSM 26482^T 虽然分类地位相同, 但是存在较大的功能差异。

从基因组测序结果中提取菌株 OS53 的 16S rRNA 基因序列, BLAST 比对分析结果表明, 菌株 OS53 与 *N. petrolearium* DSM 26482^T 的 16S rRNA 基因序列的相似性为 99.86%, 并且通过 NJ 法构建的系统发育树也显示菌株 OS53 与标准菌株 *N. petrolearium* DSM 26482^T 聚在一起, 形成稳定的分支, 因此, 确定菌株 OS53 与 *N. petrolearium* 为同一物种不同菌株, 并将

菌株 OS53 命名为 *N. petrolearium* OS53。

2.3 菌株 OS53 促生特性分析

全基因组测序结果分析表明, 菌株 OS53 基因组中具有吲哚-3-乙酰胺(indole-3-acetamide, IAM)途径中色氨酸-2-单加氧酶基因(*iaaM*)和吲哚-3-乙酰水解酶基因(*iaaH*), 为菌株 OS53 生成 IAA 提供了分子基础。同时试验结果也表明, 菌株 OS53 具有产 IAA 的能力, IAA 产量可达到 37.5 g/L, 但是无产铁载体、溶磷和解钾的能力。

2.4 菌株 OS53 联合紫花苜蓿修复石油污染

2.4.1 不同处理下的石油浓度的测定

在初始石油浓度为(4 402.30±222.10) mg/kg 时, 经过 120 d 处理后, 菌株 OS53 处理组(EOB)的石油浓度降低至(3 705.21±149.87) mg/kg, 与自然衰减组(EO)相比[(3 818.41±130.12) mg/kg]无显著差异($P>0.05$), 表明单独接种菌株 OS53 并不能提高石油降解率(图 2)。经过紫花苜蓿处理后(EOP), 土壤中的石油浓度与自然衰减组(EO)相比显著降低($P<0.05$), 降低至(2 259.31±222.47) mg/kg; 紫花苜蓿和菌株 OS53 联合处理后(EOPB)石油浓度与紫花苜蓿处理组(EOP)相比显著下降($P<0.05$), 降低至(1 870.00±81.88) mg/kg。以上结果说明, 相较于单独接菌或单独种植植物, 联合修复体系具有更好的石油污染修复效果。

2.4.2 植物指标测定

经过 120 d 不同修复方式处理后, 对 ESP、EOP 和 EOPB 组中的紫花苜蓿叶绿素、可溶性蛋白、可溶性糖、MDA、Pro 和 SOD 活性的含量进行测定, 结果如图 3 所示。栽种在未受石油污染土壤(ESP)中的植物叶绿素、可溶性蛋白和可溶性糖的含量分别为(5.12±0.18) mg/g、(5.46±0.30) mg/g 和(99.25±3.52) mg/g, 石油污染土壤(EOP)中植株的叶绿素、可溶性蛋白和可溶性糖含量降低至(2.94±0.13) mg/g、(3.46±0.39) mg/g

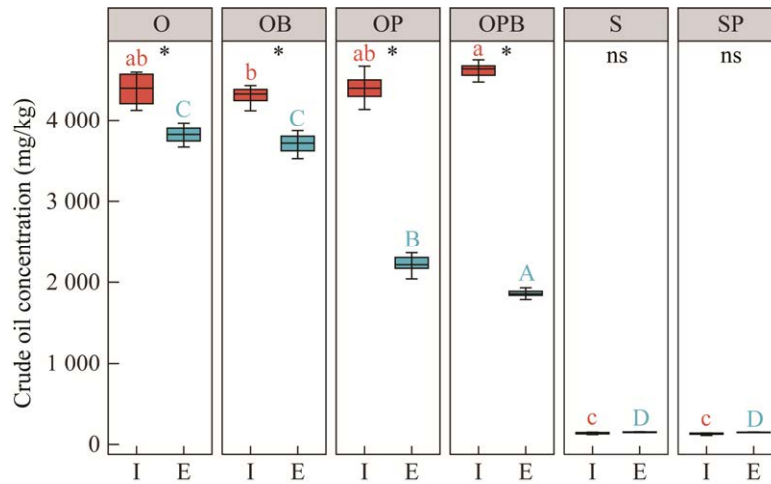


图2 不同处理方式样品中的石油含量

Figure 2 Petroleum content in samples with different treatment methods. “I” stands for the initial sample number, and “E” stands for the sample after 120 days of treatment; The “*” in the plot represent the oil content in sample I and sample E in different treatment methods were significant differences at the levels of $P < 0.05$ by *t*-test; The “ns” represents no significant difference between the oil content in sample I and sample E; The red lowercase letters in the diagram represent the enzyme activity of different treatment methods in the I samples was significant different at $P < 0.05$ level after one-way analysis of variance (one-way ANOVA); The blue uppercase letters in the diagram represent the enzyme activity of different treatment methods in the E samples was significant different at $P < 0.05$ level after one-way ANOVA.

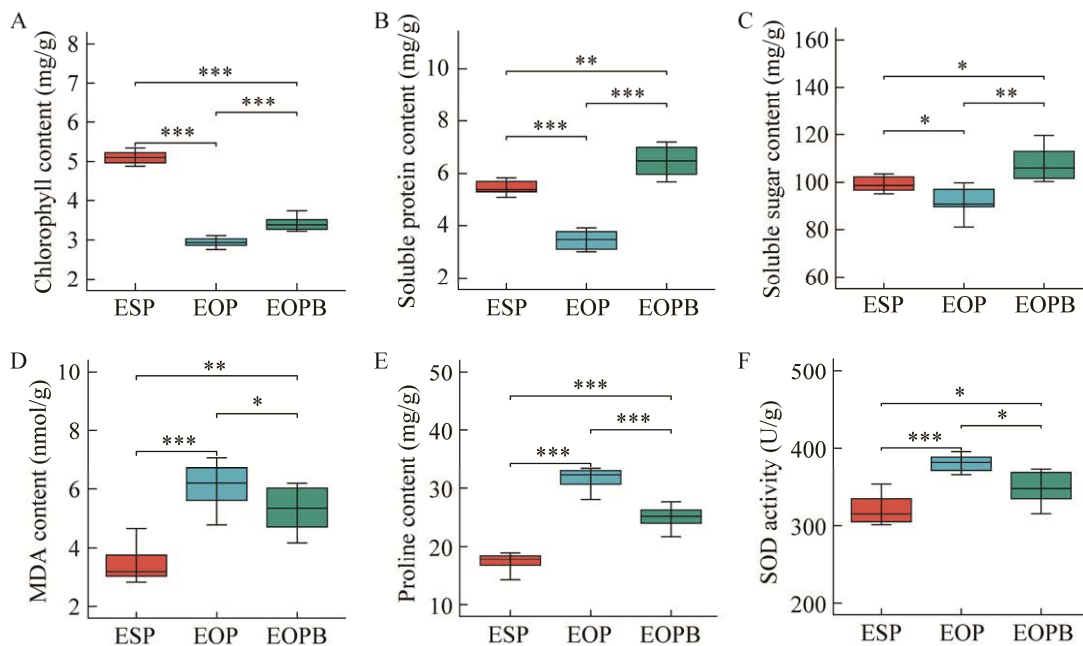


图3 ESP、EOP 和 EOPB 组中紫花苜蓿生理指标

Figure 3 The contents of chlorophyll, soluble protein, soluble sugar, MDA, proline (A–E) and the activities of SOD (F) of alfalfa in ESP, EOP and EOPB groups. The “*, **, and ***” in the figure represent the significant differences at the levels of $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$ using *t*-test under different treatment methods, respectively.

和(91.76±6.98) mg/g, 显著低于未受石油污染土壤(ESP)中的植株($P<0.05$)。经过与 OS53 协同处理(EOPB)后, 植株的叶绿素、可溶性蛋白和可溶性糖的含量分别为(3.42±0.19) mg/g、(6.47±0.63) mg/g 和(107.91±7.82) mg/g, 均显著高于 EOP 组($P<0.05$), 其中可溶性蛋白和可溶性糖的含量恢复至未受污染的水平。在 EOP 组中植株的 MDA 和 Pro 含量以及 SOD 活性分别为(6.09±0.86) nmol/g、(31.53±2.04) mg/g 和(380.40±12.20) U/g, 均显著高于($P<0.05$) ESP 组中植株[(3.46±0.69) nmol/g、(17.29±1.74) mg/g 和(321.16±21.01) U/g]。在 EOPB 组中, MDA 和 Pro 含量以及 SOD 活性相比于 EOP 组含量均显著降低($P<0.05$), 含量分别为(5.30±0.86) nmol/g、(24.98±2.11) mg/g 和(347.91±22.88) U/g。以上结果说明, 石油污染使紫花苜蓿的生长受到胁迫, 导致紫花苜蓿的叶绿素、可溶性蛋白和可溶性糖的含量降低, MDA、Pro 和 SOD 活性升高, 而接种菌株 OS53, 植株受石油胁迫得到缓解。

2.4.3 土壤酶活性测定

对处理前后土壤 S-PPO、S-LPS、S-DHA 和 S-UE 的活性进行了测定, 结果如图 4 所示。经过 6 种方式处理后, 土壤中的 4 种酶活性均出现了升高, 并且第 120 天的样本(E)酶活性显著高于($P<0.05$)起始的样本(I)。在 EOPB、EOP、EOB、EO、ES 和 ESP 组中, S-PPO 活性分别为(25.31±0.83)、(19.69±1.35)、(14.86±1.27)、(16.27±1.17)、(13.60±0.85)和(14.81±0.90) U/g; S-LPS 活性分别为(39.73±1.01)、(34.19±1.40)、(25.87±1.10)、(23.83±2.14)、(16.90±1.33)和(25.92±1.35) U/g; S-DHA 活性分别为(53.31±3.46)、(44.35±2.47)、(38.19±2.23)、(36.66±2.24)、(21.36±2.30)和(35.11±1.08) U/g; S-UE 活性分别为(24.52±1.97)、(22.52±0.75)、(14.49±0.69)、(15.01±1.62)、(15.99±0.41)和(19.83±1.55) U/g。所

测定的 4 种酶活性均在 EOPB 组中最高, 其次为 EOP 组, 并且 EOPB 组中的酶活性显著高于 EOP 组($P<0.05$), EOP 组显著高于 EOB 组($P<0.05$), EOB 组与 EO 组无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论与结论

本研究使用 Illumina 和 Nanopore 平台对菌株 OS53 进行了全基因组测序, 其基因组由 1 个大小为 5 559 109 bp 的环形染色体和 2 个大小分别为 916 660 bp 和 379 813 bp 的质粒组成, G+C 含量为 60.2%, 共编码 6 968 个基因, 与模式菌株 *N. petrolearium* DSM 26482^T 基因组的 16S rRNA 基因序列相似性高达 99.86%, 结合系统发育分析结果, 确定菌株 OS53 属于 *N. petrolearium* 的一个新菌株。*Neorhizobium* 属在 2015 年建立, 目前隶属于该属的微生物共有 8 种^[26], 但是 *N. petrolearium* 在 Genome 数据库中仅有 1 个基因组草图, 因此本研究对 *N. petrolearium* OS53 进行基因组完成图测序分析, 将有助于更进一步揭示该种遗传信息, 挖掘该种的相关功能。

根瘤菌因其能与豆科植物共生固氮而被广泛研究, 根瘤菌结瘤基因(*nod*、*nol* 和 *noe*)是绝大部分根瘤菌与豆科植物形成共生体系所必需的基因^[27], 但是也有研究表明部分根瘤菌可以在缺少结瘤基因的情况下与豆科植物共生结瘤^[28-29]。通过对 OS53 全基因组预测基因分析, 菌株 OS53 缺少完整的结瘤相关基因, 表明菌株 OS53 极难与豆科植物形成根瘤; 而随后本研究结瘤试验结果也证明, 该菌株既不能与紫花苜蓿结瘤, 也不能与大豆、刺槐、三叶草等其他豆科植物结瘤。根瘤菌共生固氮作用由固氮酶基因(*nif*)调控, 发挥固氮功能至少需要 9 个 *nif* 基因参与: *nifH*、*nifE*、*nifN*、*nifS*、*nifU*、*nifV*、*nifB* 和 *nifQ*^[30]。通过对全基因组基因分析发现, 该菌基因组中

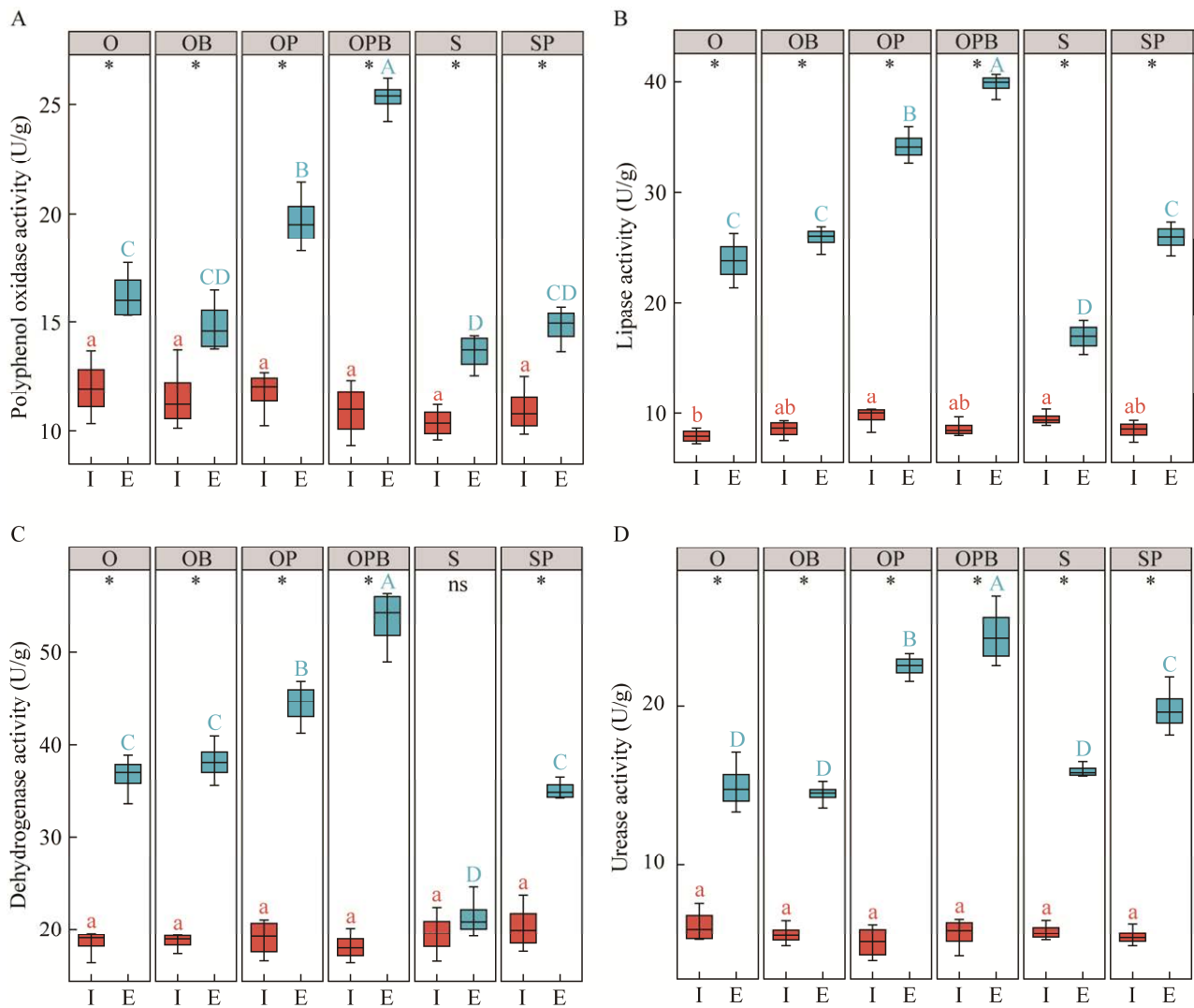


图 4 不同处理方式样品中的酶活性

Figure 4 The polyphenol oxidase (A), lipase (B), dehydrogenase (C) and urease activities (D) in samples treated by different methods. “I” is the initial sample number; “E” is the sample after 120 days of treatment; “*” in the plot indicated that the enzyme activity in samples I and E in different treatment methods was significantly different at the levels of $P < 0.05$ after t -test; “ns” represents no significant difference between samples I and E. The red lowercase letters in the diagram represent the enzyme activity of different treatment methods in the I samples was significant different at $P < 0.05$ level after one-way ANOVA; The blue uppercase letters in the diagram represent the enzyme activity of different treatment methods in the E samples was significant different at $P < 0.05$ level after one-way ANOVA.

无完整固氮酶基因簇, 仅有 *nifU* 和 *nifS* 这 2 个基因, 可能是在进化过程中发生了固氮基因丢失。基因组分析结果与结瘤试验结果都表明, 菌株 OS53 不能够与紫花苜蓿形成共生固氮体

系, 这与菌株 *N. petrolearium* DSM 26482^T 的结瘤表型完全相反^[19]。因此, 在不同生境下分离的根瘤菌同种不同菌株, 其表型可能存在巨大差异。

固氮根瘤菌作为根际促生菌体系中的一类,除了生物固氮以外,还具有产生植物激素、铁载体、溶解磷酸盐和 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)脱氨酶的促生作用^[31]。目前微生物依赖色氨酸产 IAA 的途径有吲哚-3-乙酰胺(IAM)、吲哚-3-丙酮酸、色胺、吲哚-3-乙腈和色氨酸侧链氧化等途径^[32]。虽然菌株 OS53 不能够进行共生固氮,但是在菌株 OS53 基因组中发现完整的 IAM 途径所编码的 2 个关键酶基因——色氨酸-2-单加氧酶基因(*iaaM*)和吲哚乙酰胺水解酶基因(*iaaH*),表明该菌株可能具有产 IAA 的能力。菌株 OS53 的 IAA 产量能够达到 37.5 g/L,因此,菌株 OS53 具有促进植物生长的潜力。

石油污染会对植物生长造成胁迫作用,影响植物正常生长。植物细胞叶绿素、可溶性蛋白、可溶性糖、Pro、MDA 和 SOD 等含量能够在一定程度上反映植物受胁迫的大小。为了抵御胁迫,植物胞内的 Pro、MDA 和 SOD 等物质会明显上升,同时当胁迫较为严重时,叶绿素、可溶性蛋白及可溶性糖的含量则会降低^[33-36]。在本研究中石油污染土壤(EOP)紫花苜蓿的叶绿素、可溶性蛋白、可溶性糖含量相比于未污染土壤(ESP)均显著下降($P < 0.05$), Pro、MDA 和 SOD 的含量相比于 ESP 组显著升高($P < 0.05$),这与先前的研究结果发现石油会对植物的生长产生负面影响的结果一致^[37]。当紫花苜蓿联合菌株 OS53 处理石油污染土壤(EOPB)之后,紫花苜蓿叶绿素、可溶性蛋白、可溶性糖含量相比单独种植植物都有显著上升;而 MDA、Pro 的含量及 SOD 的活性则有显著降低(图 3)。上述结果表明,接种 OS53 能够在一定程度上帮助紫花苜蓿抵御来自石油污染的胁迫,进而提高石油降解效率。但是菌株 OS53 与紫花苜蓿

的具体作用机制、协同修复过程土壤中石油降解微生物群落变化、土壤养分情况是否有所改善等,仍需进一步地研究。

土壤酶活是土壤生态重要指标之一,能够反映环境压力变化,并且在维持土壤健康和肥力方面发挥着重要作用^[38]。土壤酶主要来自土壤微生物的生长代谢,因此土壤酶活性强弱能够在一定程度上反映土壤微生物活力。多酚氧化酶(S-PPO)能够催化石油降解过程中产生的一些酚类物质的转化,因此 S-PPO 活性能间接反映土壤中石油降解程度。本研究中,经过 120 d 后,所有组别的 S-PPO 活性都有不同程度的升高,表明各处理中都有一定的微生物活动;其中 OPB 组的 S-PPO 活性要显著高于其他组别,表明该组的微生物活动要多于其他组。在脂肪酶(S-LPS)的作用下,土壤中的脂类物质分解成脂肪酸和甘油,为微生物生长提供能源,已成为评价土壤质量一个很重要的指标^[39-40]。与 S-PPO 结果类似,所有处理组在经过 120 d 后, S-LPS 活性都有一定程度的升高,同时 OPB 组的 S-LPS 活性显著高于其他组别。在石油污染的土壤里,土壤脱氢酶(S-DHA)的活性与石油代谢强度相关;而脲酶(S-UE)对土壤的稳定起着重要的作用,催化尿素水解成 NH_4^+ 和 CO_3^{2-} ,进而为植物提供氮素营养^[41]。S-DHA 与 S-UE 的测定结果与 S-PPO 也十分相似,即所有处理组在经过 120 d 后, S-DHA 与 S-UE 活性都有一定程度的升高,同时 OPB 组的 S-DHA 与 S-UE 活性显著高于其他组别。较高的酶活表明 OPB 组的微生物活动最多,这也与该组最高的石油降解效率相一致(图 2)。然而在李炜的研究中发现,使用微生物菌剂+营养液进行为期 18 周的修复试验后,石油污染土壤中过氧化氢酶活及 S-LPS 酶活具有明显的上升趋势,但是 S-DHA

和 S-PPO 的酶活却不断下降^[39]。而王傲的研究结果则表明, 使用微生物+碱蓬进行为期 32 d 的石油污染土壤修复, S-DHA、S-LPS 和 S-UE 的酶活具有增加趋势, 而土壤过氧化氢酶活则先升高后降低^[42]。综上所述, 利用微生物-植物联合修复石油污染土壤具有较高的修复效率, 但是修复过程中土壤酶活变化则受到土壤质地、植物和微生物种类、营养情况等影响, 不同酶活具有不同的变化趋势。并且土壤酶活的主要来源——土壤微生物的群落结构及代谢如何响

应联合修复体系仍需进一步了解。

根据上述结果及讨论, 推测菌株 OS53 促进其与紫花苜蓿协同修复机制如图 5 所示。OS53 具有产 IAA 能力, 能够促进紫花苜蓿在污染土壤中的生长, 改善在石油污染胁迫下的部分生理指标, 从而改变紫花苜蓿根际微环境, 为石油降解微生物提供有利的条件; 联合修复体系通过自己本身及土壤微生物的作用, 改善石油污染土壤酶活, 进而提高石油污染修复效率。

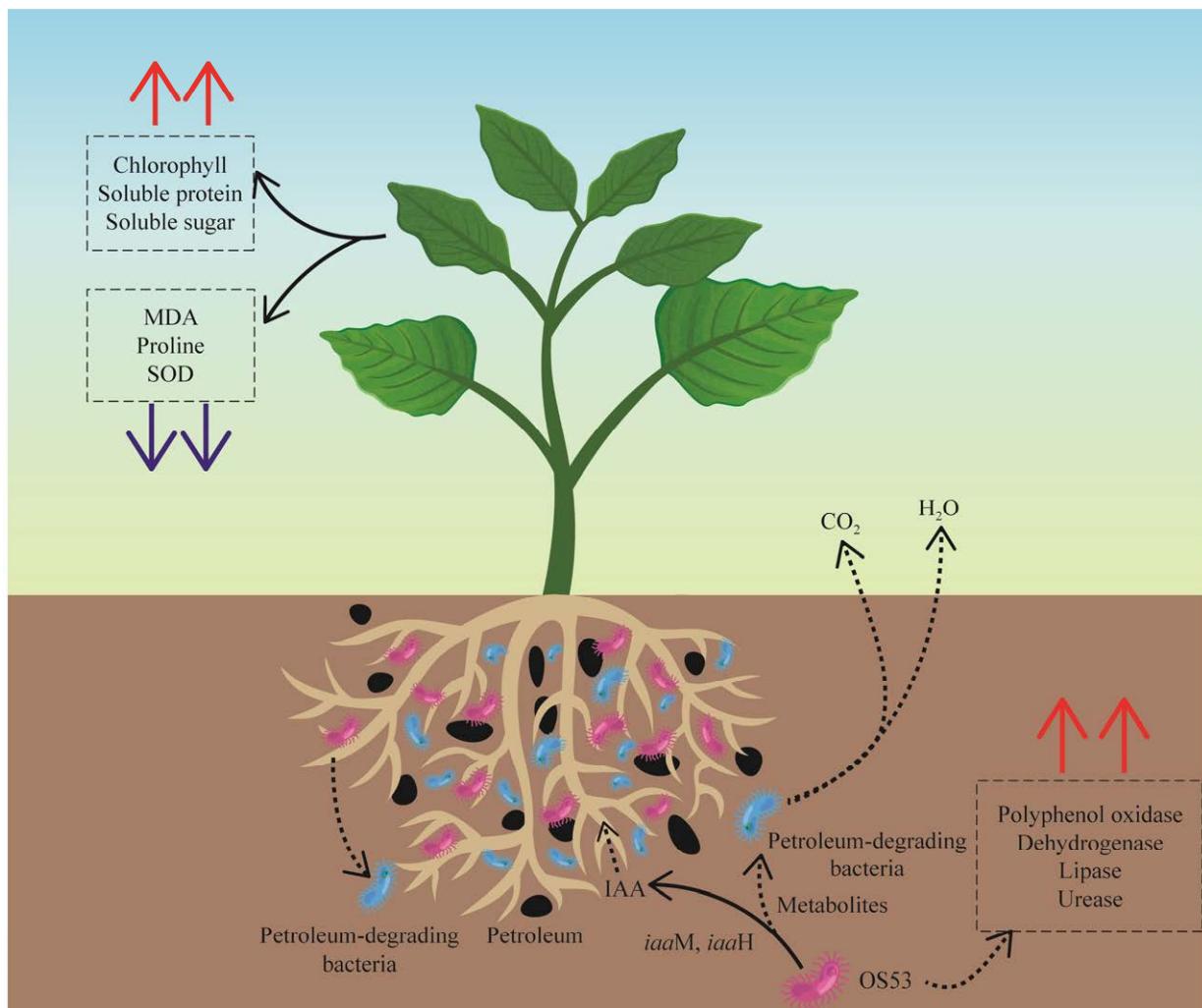


图 5 菌株 OS53 促进联合修复体系修复效率的机制

Figure 5 The mechanism of strain OS53 promoting the repair efficiency of the combined repair system.

参考文献

- [1] BOLAN N, SARKAR B, YAN YB, LI Q, WIJESKARA 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.
- [2] YUAN LM, WU YQ, FAN QH, LI P, LIANG JJ, LIU YH, MA R, LI RJ, SHI LP. Remediating petroleum hydrocarbons in highly saline-alkali soils using three native plant species[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 339: 117928.
- [3] HAGHOLLAHI A, FAZAEIPOOR MH, SCHAFFIE M. The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils[J]. *Journal of Environmental Management*, 2016, 180: 197-201.
- [4] IQBAL A, MUKHERJEE M, RASHID J, KHAN SA, ALI MA, ARSHAD M. Development of plant-microbe phytoremediation system for petroleum hydrocarbon degradation: an insight from *alkb* gene expression and phytotoxicity analysis[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 671: 696-704.
- [5] HOU JU, WANG QL, LIU WX, ZHONG DX, GE YY, CHRISTIE P, LUO YM. Soil microbial community and association network shift induced by several tall fescue cultivars during the phytoremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 792: 148411.
- [6] LIN QX, MENDELSSOHN IA. Impacts and recovery of the *Deepwater horizon* oil spill on vegetation structure and function of coastal salt marshes in the northern gulf of Mexico[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(7): 3737-3743.
- [7] WANG K, HUANG HG, ZHU ZQ, LI TQ, HE ZL, YANG XE, ALVA A. Phytoextraction of metals and rhizoremediation of PAHs in co-contaminated soil by co-planting of *Sedum alfredii* with ryegrass (*Lolium perenne*) or castor (*Ricinus communis*)[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2013, 15(3): 283-298.
- [8] XIE WJ, ZHANG YP, LI R, YANG HJ, WU T, ZHAO LP, LU ZH. The responses of two native plant species to soil petroleum contamination in the Yellow River Delta, China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(31): 24438-24446.
- [9] SARWAR N, IMRAN M, SHAHEEN MR, ISHAQUE W, KAMRAN MA, MATLOOB A, REHIM A, HUSSAIN S. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives[J]. *Chemosphere*, 2017, 171: 710-721.
- [10] KIAMARSI Z, KAFI M, SOLEIMANI M, NEZAMI A, LUTTS S. Conjunction of *Vetiveria zizanioides* L. and oil-degrading bacteria as a promising technique for remediation of crude oil-contaminated soils[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 253: 119719.
- [11] LIU Z, LI Z, CHEN SG, ZHOU WZ. Enhanced phytoremediation of petroleum-contaminated soil by biochar and urea[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 453: 131404.
- [12] 付严松, 李宇聪, 徐志辉, 邵佳慧, 刘云鹏, 宣伟, 张瑞福. 根际促生菌调控植物根系发育的信号与分子机制研究进展[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(9): 42-48.
- FU YS, LI YC, XU ZH, SHAO JH, LIU YP, XUAN W, ZHANG RF. Research progressing in signals and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria to regulate plant root development[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(9): 42-48 (in Chinese).
- [13] ETESAMI H. Can interaction between silicon and plant growth promoting rhizobacteria benefit in alleviating abiotic and biotic stresses in crop plants?[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2018, 253: 98-112.
- [14] PÉREZ-MONTAÑO F, ALÍAS-VILLEGAS C, BELLOGÍN RA, del CERRO P, ESPUNY MR, JIMÉNEZ-GUERRERO I, LÓPEZ-BAENA FJ, OLLERO FJ, CUBO T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(5/6): 325-336.
- [15] POURBABAEI AA, KHAZAEI M, ALIKHANI HA, EMAMI S. Root nodulation of alfalfa by *Ensifer meliloti* in petroleum contaminated soil[J]. *Rhizosphere*, 2021, 17: 100305.
- [16] 陈科言. 野大豆-根瘤菌共生固氮体系联合石油降解菌修复石油污染土壤的研究[D]. 曲阜: 曲阜师范大学硕士学位论文, 2022.
- CHEN KY. Study on remediation of petroleum contaminated soil by wild soybean-rhizobia symbiotic nitrogen fixation system combined with petroleum degrading bacteria[D]. Qufu: Master's Thesis of Qufu Normal University, 2022 (in Chinese).

- [17] 毛正君, 耿咪咪. 紫花苜蓿根系抗拉力学特性及其影响因素研究[J]. 干旱区研究, 2023, 40(2): 235-246. MAO ZJ, GENG MM. Study on tensile mechanical properties of alfalfa roots and the influencing factors[J]. Arid Zone Research, 2023, 40(2): 235-246 (in Chinese).
- [18] MEHMANNAVAZ R, PRASHER SO, AHMAD D. Rhizospheric effects of alfalfa on biotransformation of polychlorinated biphenyls in a contaminated soil augmented with *Sinorhizobium meliloti*[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(9): 955-963.
- [19] ZHANG XX, LI BM, WANG HS, SUI XH, MA XT, HONG Q, JIANG RB. *Rhizobium petrolearium* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(Pt_8): 1871-1876.
- [20] WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. PLoS Computational Biology, 2017, 13(6): e1005595.
- [21] MANNI M, BERKELEY MR, SEPPEY M, SIMÃO FA, ZDOBNOV EM. BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(10): 4647-4654.
- [22] HA SM, KIM CK, ROH J, BYUN JH, YANG SJ, CHOI SB, CHUN J, YONG D. Application of the whole genome-based bacterial identification system, TrueBac ID, using clinical isolates that were not identified with three matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems[J]. Annals of Laboratory Medicine, 2019, 39(6): 530-536.
- [23] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA 7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [24] 晋婷婷, 曹永清, 李云玲, 白凤麟, 白变霞, 任嘉红, 孟静, 李琳, 王莹. 一株连香树根际促生细菌 LWK2 的分离鉴定及其全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1917-1940. JIN TT, CAO YQ, LI YL, BAI FL, BAI BX, REN JH, MENG J, LI L, WANG Y. Isolation, identification, and whole-genome sequence analysis of a plant growth-promoting bacterium LWK2 from *Cercidiphyllum japonicum* rhizosphere[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1917-1940 (in Chinese).
- [25] 辽宁省鞍山生态环境监测中心. 土壤石油类的测定红外分光光度法[Z]. 生态环境部生态环境监测司, 生态环境部生态环境法规与标准司. 2019: 10. Anshan Ecological Environment Monitoring Center, Liaoning Province. Determination of petroleum in soil by infrared spectrophotometry[Z]. Department of Ecological Environment Monitoring, Department of Ecological Environment Regulations and Standards, Ministry of Ecological Environment. 2019: 10 (in Chinese).
- [26] SOENENS A, GOMILA M, IMPERIAL J. *Neorhizobium tomejilense* sp. nov., first non-symbiotic *Neorhizobium* species isolated from a dryland agricultural soil in southern Spain[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2019, 42(2): 128-134.
- [27] 侯卫国, 连宾. 慢生根瘤菌属结瘤基因的进化及遗传分析[J]. 遗传, 2007, 29(1): 118-126. HOU WG, LIAN B. Phylogenetic and genetic analysis of symbiotic nodulation genes within the *Bradyrhizobium*[J]. Hereditas, 2007, 29(1): 118-126 (in Chinese).
- [28] GIRAUD E, MOULIN L, VALLENET D, BARBE V, CYTRYN E, AVARRE JC, JAUBERT M, SIMON D, CARTIEAUX F, PRIN Y, BENA G, HANNIBAL L, FARDOUX J, KOJADINOVIC M, VUILLET L, LAJUS A, CRUVEILLER S, ROUY Z, MANGENOT S, SEGURENS B, et al. Legumes symbioses: absence of *Nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia[J]. Science, 2007, 316(5829): 1307-1312.
- [29] OKAZAKI S, TITTABUTR P, TEULET A, THOUIN J, FARDOUX J, CHAINTREUIL C, GULLY D, ARRIGHI JF, FURUTA N, MIWA H, YASUDA M, NOUWEN N, TEAUMROONG N, GIRAUD E. *Rhizobium*-legume symbiosis in the absence of *Nod* factors: two possible scenarios with or without the T3SS[J]. The ISME Journal, 2016, 10(1): 64-74.
- [30] 荆晓姝, 丁燕, 韩晓梅, 王哲, 高德艳. 联合固氮菌的合成生物学研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(10): 3026-3034. JING XS, DING Y, HAN XM, WANG Z, GAO DY. Advances in synthetic biology of associated nitrogen-fixation bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(10): 3026-3034 (in Chinese).
- [31] GUAN CF, FU WT, ZHANG XG, LI ZM, ZHU YL, CHEN FY, JI J, WANG G, GAO XP. Enhanced phytoremediation efficiency of PHE-contaminated soil by rape (*Brassica napus* L.) assisted with PHE-degradable PGPR through modulating

- rhizobacterial communities[J]. *Industrial Crops and Products*, 2023, 202: 117057.
- [32] 刘婉慧. 吡咯伯克霍尔德氏菌 JK-SH007 合成 IAA 及其吲哚-3-乙酰胺途径分析[D]. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2020.
- LIU WH. Synthesis of IAA and its indole-3-acetamide pathway analysis by *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007[D]. Nanjing: Master's thesis of Nanjing Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [33] 霍会玲. 罗布泊不同地区红柳叶片生理特征对区域环境的响应[D]. 石家庄: 河北师范大学硕士学位论文, 2023.
- HUO HL. Response of physiological characteristics of *Salix* leaves in different areas of Lop Nur to regional environment[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei Normal University, 2023 (in Chinese).
- [34] 张林, 陈翔, 吴宇, 于敏, 蔡洪梅, 柳彬彬, 倪芊芊, 刘绿洲, 许辉, 房浩, 李金才. 脯氨酸在植物抗逆中的研究进展[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2023, 51(1): 42-51.
- ZHANG L, CHEN X, WU Y, YU M, CAI HM, LIU BB, NI QQ, LIU LZ, XU H, FANG H, LI JC. Research progress of proline in plant stress resistance[J]. *Journal of Jiangnan University (Natural Science Edition)*, 2023, 51(1): 42-51 (in Chinese).
- [35] 魏婧, 徐畅, 李可欣, 贺洪军, 徐启江. 超氧化物歧化酶的研究进展与植物抗逆性[J]. *植物生理学报*, 2020, 56(12): 2571-2584.
- WEI J, XU C, LI KX, HE HJ, XU QJ. Progress on superoxide dismutase and plant stress resistance[J]. *China Industrial Economics*, 2020, 56(12): 2571-2584 (in Chinese).
- [36] 鲁敏, 高鹏, 赵洁, 张凌方, 卢佳欢, 崔琰. 苯污染胁迫下室内植物 POD 活性与 MDA 含量变化分析研究[J]. *山东建筑大学学报*, 2017, 32(3): 205-211.
- LU M, GAO P, ZHAO J, ZHANG LF, LU JH, CUI Y. Study on changes of peroxidase activity and malondialdehyde content in indoor plants under indoor benzene pollution[J]. *Journal of Shandong Jianzhu University*, 2017, 32(3): 205-211 (in Chinese).
- [37] VÁZQUEZ-LUNA D. Biological indices of toxicity in tropical legumes grown in oil-contaminated soil[J]. *Ecological Indicators*, 2015, 53: 43-48.
- [38] CALDWELL BA. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review[J]. *Pedobiologia*, 2005, 49(6): 637-644.
- [39] 李炜. 油污土壤修复过程中土壤酶活性及微生物群落结构变化[D]. 西安: 西安建筑科技大学硕士学位论文, 2017.
- LI W. The effect of bioremediation on soil enzymatic activity and microbial community[D]. Xi'an: Master's Thesis of Xi'an University of Architecture and Technology, 2017 (in Chinese).
- [40] DINDAR E, TOPAÇ ŞAĞBAN FO, BAŞKAYA HS. Variations of soil enzyme activities in petroleum-hydrocarbon contaminated soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 105: 268-275.
- [41] PINTO VILAR R, IKUMA K. Adsorption of urease as part of a complex protein mixture onto soil and its implications for enzymatic activity[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 171: 108026.
- [42] 王傲. 微生物—盐生植物模式降解石油烃的机理及细菌群落分析[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2022.
- WANG A. Mechanism and bacterial community analysis of petroleum hydrocarbon degradation by microorganism-halophyte model[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2022 (in Chinese).