DOI:10.16085/j.issn.1000-6613.2010.05.023

住寺约评述

微生物分子生态学技术及其在石油污染土壤修复中的  
应用现状与展望

吴作军，卢滇楠，张敏莲，刘 铮

(清华大学化学工程系，北京 100084)

**摘 要** ：概述了微生物分子生态学技术的原理及在土壤生物修复中的应用。该技术可以提供土壤微生物群落多 样性信息，跟踪降解菌株(群)的定植及发挥作用的过程，展现投加菌株与土著菌群相互作用的信息，为生物 修复中降解菌的筛选、修复过程的强化及修复结果的评估提供生物学信息。展望了该技术在土壤生物修复中应 用的前景。

**关键词**：土壤生物修复；分子生态学；微生物分子生态学；分子生物学

**中图分类号**：TQ 033 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6613 (2010) 05-0789-07

Progress in applications of microbiological molecular ecology in  
bioremediation of petroleum contaminated soil

*WU Zuojun*，*LU Diannan*，*ZHANG Minlian*，*LIU Zheng*

(Department of Chemical Engineering，Tsinghua University，Beijing 100084，China)

**Abstract**：This review starts with a brief introduction on principles and methods of microbiological molecular ecology as well as their applications in soil remediation. In addition to the genetic information of soil microbial community，the use of microbial molecular ecological tools enables the monitoring of the growth and function of inoculant degrading microbials，as well as their interaction with the indigenous microorganisms. These information are of fundamental importance for the selection and screening of degradation microbial communities，the intensification of degradation process，and the evaluation of remediated soil. Application perspective of microbiological molecular ecology is also discussed.

**Key words**：soil bioremediation；molecular ecology；microbial molecular ecology；molecular biology

分子生态学这一概念首先见诸于*《*Molecular Ecology》发刊词［1］,它是以分子生物学技术为工具 来研究特定环境中的微生物区系组成、结构、功能、 适应性发展及其分子机制等，从遗传、种类和生态 系统层次上揭示微生物群落演变的规律，反映生态 环境和外界胁迫对微生物群落的影响［2－4］。20世纪 70年代以前，微生物多样性的研究主要采用分离培 养方法，依据形态学、生长特征、生理生化特性进 行分类。此类方法无法反映出占土壤微生物中绝大 多数的未培养微生物的信息，所得到的环境微生物 群落多样性是不全面的。20世纪70〜80年代生物 标记技术的发展，提高了对于环境微生物群落多样 性的分析精度。 80〜90年代，现代分子生物学技术 的引入，可直接给出环境中微生物的遗传信息，提 供土著微生物组成和结构依据。

正如Vogel和Walter［5］所指出的那样“微生物

收稿日期：2010-01-11；修改稿日期：2010-03-19。 第一作者简介：吴作军（1982—），男，锡伯族，博士研究生。联系 人 ：刘铮，教授，博士生导师。电话 010-62799876 ； E-mail liuzheng@mail.tsinghua.edu.cn。 生态学问题是生物修复技术中最重要的部分。”解 析特定环境中的微生物群落结构可直接展示环境 体系生态功能特性、修复过程中微生物群落演变以 及投加菌株的定植情况，为生物修复过程中优化微 生物群落结构、筛选高效降解菌株、协调微生物群 落功能和确定工程实施方案提供依据，并可用于评 估生物修复的效果。微生物分子生态学为土壤生物 修复的基础创新和工程应用提供了有力的基础科 学工具。

1. 土壤生物修复技术研究现状

土壤生物修复是利用微生物及其它生物去除 存在于土壤和地下水体中的有毒有害污染物，或将 其转化成无害化物质的技术和方法。根据微生物来 源及施加方式划分，主要分为自然衰减技术(natural attenuation),生物强化技术(bioaugmentation)和 生物刺激技术(biostimulation)。生物修复技术是修 复石油污染耕地的有效措施，被美国国家环保局 ( USEPA )推荐作为原油污染土壤修复的首选措 施。表 1 总结了上述生物修复技术的主要特征。

表 1 生物修复技术的分类以及主要特点

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 修复途径 | 菌种来源 | 特点 |
| 自然衰减修复 | 环境中的原生  动物或者微生物 | 降解能力较弱，需要时间长 |
| 生物刺激修复 | 土著微生物 | 通过添加营养物质、电子受体、 (生物)表面活性剂或共代谢底物 活化土著微生物；无法保证修复 效率 |
| 生物强化修复 | 外源高效降解 | 菌浓高，污染物降解能力强；污染 |
|  | 菌或菌群 | 物降解迅速且有效 |

我国目前对石油污染土壤生物修复技术研究 主要集中于高效降解菌株(群)的筛选及特性研究 和生物修复实施方法的改进两个方面［6－7］。中科院 沈阳应用生态研究所孙铁珩等［8－18］筛选了多株具有 高降解活性的微生物，在真菌对石油化合物的降解 行为进行了深入研究。南开大学周启星等［19－20］对石 油污染土壤的植物修复、微生物-植物复合修复方面 进行了系统的研究工作，采用蚯蚓对已修复的土 壤的生物毒性进行检测。南京土壤研究所的骆永 明等［21－23］利用微生物培养、碳素利用法( Biolog) 和发光细菌生物毒性测定对污染土壤的微生物数量 和多样性进行分析。清华大学刘铮等提出了土壤环 流诱导驯化筛选方法并得到了多株石油烃降解菌； 研制出固态大孔微生物制剂［24］，采用低温等离子体 诱变技术得到耐盐阴沟肠杆菌［25］；提出并实现了真 菌-细菌协同原位降解石油烃技术［26－27］及其与耕作 层麦秸填埋发酵相结合的油-盐混合污染耕地原位 修复技术［28－30］，将分子生态学技术应用于监控和强 化生物修复过程。该研究团队 2006 年在中原油田 (河南濮阳)完成了面积为 11 亩的石油污染耕地的 现场修复，修复地块小麦产量达到正常耕地的 70%， 品质符合国家规定，授权和公开专利 7 项［31－37］。

1. 分子生态学技术在土壤修复中的 应用

2.1 微生物分子生态学分析技术概述

现代微生物分子生态学技术主要分为基于 PCR扩增和不基于PCR扩增的分析技术。基于PCR 扩增的技术根据分析目标种群 DNA 片段的不同又 可以分为以一段特定种群 DNA 片段为研究对象的 种群 DNA 片段分析技术( partial community DNA analysis)和以全部种群DNA为研究对象的全种群 DNA 分析技术(whole community DNA analysis )［38］。 其中种群DNA片段分析技术又包括PCR片段克隆 测序技术和基因图谱技术，PCR片段克隆测序技术 主要用于分析不同地理位置，耕作模式和理化性质 土壤之间的微生物种群多样性［39］。此方法操作复 杂、耗时且克隆选择数目对微生物多样性分析的全 面性有较大影响。基因图谱技术是目前微生物分子 生态学分析广泛采用的一类分析技术，包括变性/ 温度梯度凝胶电泳技术(DGGE/TGGE) ［40］、扩增 核糖体DNA片段限制性分析(ARDRA) ［41］、末端 限制性酶切片段长度多样性分析(T-RFLP) ［42］、核 糖体基因间序列分析(RISA) ［43］和随机扩增DNA 片段多样性(RAPD) ［44］。与PCR片段克隆测序技 术相比，基因图谱技术更适宜于微生物组成更为复 杂的环境样品，且操作更为便捷。基于PCR扩增的 分析方法由于其中包括了对目的样品的DNA片段 的 PCR 扩增过程，所以 PCR 的扩增效率是这类技 术成败的关键因素。表2中列出了目前常用的基于 PCR的微生物分子生态学分析技术。

在不依赖于 PCR 的微生物分子生态学研究方 法中，应用最为广泛的是荧光原位杂交(FISH)分 析技术，此外还有荧光染色计数技术、微生物理化

|  |  |
| --- | --- |
| **表**2 | **常用的微生物分子生态学技术一览表** |
| 技术名称 | 技术原理和过程特点 |
| DGGE/TGGE | 1. 序列对象为16S rDNA V3区 2. 特异引物扩增，touchdown反应程序 3. 根据不同序列具有不同变性性质，在变性电泳   中迁移速率不同分离 |
| T-RFLP | 1. 序列对象为 16S rDNA 2. 荧光标记引物扩增 3. 根据不同序列的酶切片断长度不同，进行分离 4. 荧光检测器检测，灵敏度高 |
| RFLP/ARDRA | 1. 对象为 16S rDNA 2. 特异引物扩增 3. 根据不同序列的酶切片断长度不同分离 4. 灵敏度待提高 |
| RAPD | 1. 象为随机序列 2. 随机引物扩增 3. 序列信息相对匮乏，重复性待改进 |
| RISA | 1. 糖体基因间隔序列 2. 特异引物扩增 3. 序列信息相对16S rDNA序列信息匮乏，重复   性待改进 |
| RT-PCR | 1. 异序列检测 2. 可进行实时定量追踪，荧光检测灵敏 3. 操作复杂，仪器昂贵 |

性质检测鉴定技术、磷脂脂肪酸分析技术等。这类 技术主要依靠微生物本身细胞组成和生长特性的不 同进行分析，与基于 PCR 的分子生态学分析技术相 比，存在一定的不足，例如不能提供详细的微生物 群落信息或特定菌株(群)的生长信息等，但二者 可结合使用，得到更全面和准确的微生物群落结构 信息。

2.2 微生物分子生态学技术在土壤修复过程中的 应用

2.2.1变性/温度梯度凝胶电泳技术(DGGE/TGGE)

DGGE/TGGE 最早是一种应用于检测 DNA 的 点突变的电泳技术［45］，根据变性梯度和电场方向不 同，分为垂直梯度电泳和平行梯度电泳。垂直梯度 电泳中变性剂/温度梯度方向与电场方向相垂直，可 以具有较大的梯度应用范围，较多地应用于 DNA 突变的筛选；平行梯度电泳中变性剂/温度梯度方向 与电场方向相平行，变性剂/温度梯度范围相对较 窄，但是具有更高的分离精度，可以较好地满足微 生物多样性分析的要求。自 1993 年 Muyzer 等［40］ 首次将DGGE应用于土壤微生物生态学领域以来， 这项技术已应用于土壤、根系、沙丘、高温热泉、 湖泊、长江、海洋、水体、发酵食品等环境微生物 群体多样性的研究和微生物群体动态的追踪研 究上。

Wilfred等［46］将DGGE用于石油污染土壤的原 位修复过程研究中，在为期1 年的场地试验中采用 该技术跟踪土壤菌群变化，发现虽然石油烃降解效 率随着时间的增加而增加，但是菌落结构在不同时 间和不同处理中并没有较明显的变化。 Marc Vinas 等［47］将 PCR-DGGE 和主成分分析相结合对杂酚油 污染土壤的实验室修复过程中细菌群落变化的动 力学以及对多环芳烃的降解特性进行了研究，发现 在修复早期*a-Proteobacteria*纲在所有处理中都占 有优势，后期 *Y-Proteobacteria* 纲、*a-Proteobacteria* 纲和 *Cytopage*-*Flexibacter*-*Bacteroides* 纲在未添加 营养的处理中占优势，而*Y-Proteobacteria*纲、卜 *Proteobacteria* 纲和 *a*-*Proteobacteria* 纲在添加营养 的处理中占优势，说明特定的细菌类型既与不同的 生物修复阶段有关，也与污染土壤中营养的添加与 否有关。 Li 等［48］研究了石油污染土壤中的细菌多 样性和土壤酶活性变化。实验样品的石油烃含量从 277.11 mg/(kg 土)到 5213.37 mg/(kg 土)，结果表明， 随着石油烃浓度增加，细菌多样性和土壤脱氢酶活 也有一定的增加。Michael等［49］从多环芳烃(PAH) 污染土壤中分离得到一株可以降解PAH的鞘脂菌 属*(Sphingobium* sp.)细菌 B1， DGGE 发现投加 菌株明显影响土著菌群的组成，并且在土著菌群中 具有降解特性的菌群占据数量的多数。Nuria等［50］ 在治理西班牙北海岸石油污染沙滩时，采用 DGGE 分析表明细菌群落主要为 *a*-*Proteobacteria* 纲、 *Y*-*Proteobacteria* 纲和 *Bacteroides* 纲也同时存在， 但是数量相对较少。 Li 等［51］在 110 天的试验室模 拟试验中，采用 DGGE 对煤油污染土壤的生物修 复过程中的群落结构变化进行了动态监测，并将 DGGE 技术与微生物培养技术、土壤微生物酶活测 定等技术相结合。结果表明，在煤油污染土壤的生 物修复中*a*亚种中的*Sphingomonadaceae*菌科变化 较大，可以作为煤油污染土壤修复中的指示剂。 Coppotelli等［52］采用DGGE技术研究了由菲污染土 壤中分离得到的菌株 *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA 对菲污染土壤中菌群变化的影响。结果 表明，该菌株可以较好降解土壤中的菲，并且促 进土壤土著微生物的生长，特别是菲利用菌株的 生长。

将DGGE与TGGE结合可以给出特定环境体系 的微生物组成结构信息，有助于分离和驯化高效的 污染物降解菌株。Smalla等［53］利用DGGE/TGGE分 析了马铃薯根系土壤的微生物组成，通过特定的营 养条件驯化出两种不同的菌群，这两种菌群对植物 根系的营养转换起到了关键作用， 显示出 DGGE/TGGE指导菌株分离的可能性。Wawer等［54］ 利用DGGE技术对硫酸盐还原菌群*Desulfovibrio*中 的脱氢酶基因的多样性进行分析，说明了不同的 *Desulfovibrio* 菌种在环境中的组成和分布情况。随 着功能基因序列信息越来越完整， 采用 PCR-DGGE/TGGE 的方法通过对功能基因的多样 性分析也是了解特定环境体系中功能微生物群落结 构的一种方法。

222末端限制性长度多样性技术(T-RFLP) 限制性内切酶和荧光标记引物 PCR 技术的发 展为T-RFLP奠定了基础oCancilla等［55］首次采用荧 光标记引物进行PCR扩增基因外重复回文序列，对 *Lactococcus lactis* 菌株的基因图谱进行分析，形成 了荧光加强的重复回文序列 PCR 技术( FERP)。 Avaniss-Aghajani 等［56］首次利用了荧光标记的引物 扩增了 16S rDNA 序列，形成了快速准确的广谱细 菌群落分析技术。 T-RFLP 技术融上述两种技术于一 体，其原理是根据微生物16S rDNA两端的保守区 设计通用引物，其中一个引物的 5'端用荧光物质进 行标记，常用的荧光物质有HEX、6-FAM等。所得 到的5'端荧光标记的PCR产物，进行限制性酶切反 应，根据限制性酶切位点的差异，酶切后获得长短 不一的限制性片段，这些末端带有荧光标记的限制 性片段用自动测序仪进行检测。由于不同长度的末 端限制性片段代表不同的微生物，而且相同长度的 末端限制性片段代表至少一种微生物的存在，所以 这些末端标记的片段可以用来反映微生物菌落的组 成情况［57－60］。

Liu 等［57］最早将 T-RFLP 技术应用于土壤微生 物群落组成结构的分析oKatsivela等［61］利用T-RFLP 技术对石油污染土壤原位修复的微生物群落结构和 数量的变化情况进行了分析，在14个月的修复过 程中，土壤中正构烷烃降解率可以达到75%〜 100%，石油降解菌群数量居土著微生物中主导地 位，与不添加石油降解菌株的处理相比，石油烃的 降解效率显著提高oDenaro等［62］利用T-RFLP技术 检测了3个石油烃污染水体的细菌群落分布，分析 了 3 个月内的细菌群落多样性的变化情况，结果表 明限制性末端数量占优势的菌群是石油烃降解菌 群，在生物修复不同阶段中，细菌菌群变化较明显。

T-RFLP 技术具有比电泳为基础的群落分析方 法(ARDRA)更好的灵敏度和准确性，但由于 T-RFLP难以像DGGE/TGGE技术那样提供详细的 序列信息，所以在微生物组成分析方面存在缺陷。 但 T-RFLP 技术因其荧光标记的灵敏性，是监控环 境体系中特定微生物如污染物降解菌群的生长的高 效工具。

2.2.3 其它方法

微生物多样性的分析检测方法仍然在发展中， 目前出现的新技术可归纳为三大类。

第一类是基于PCR的方法。例如核糖体基因间 序列分析(RISA)、随机扩增DNA片段多样性 (RAPD)和实时荧光定量PCR技术等。RISA原 理在于选择了微生物*rrs*和*rrl*基因之间的一段间隔 序列(IGS)作为分析对象，得到关于这段序列的 相关信息，对多样性进行分析，但是由于该段序列 的信息远远不如16S rDNA序列信息丰富，所以对 该技术的广泛应用有所抑制。RAPD主要是利用合 成的10 bp小引物进行随机结合扩增，产生的PCR 产物通过电泳检测具有不同的条带信息，但是这种 技术的重复性相对较差，并且这种技术不能提供详 细的种群信息，对于微生物组成的分析显然是不够 的。实时荧光定量PCR保留了 PCR技术的敏感性 和特异性，可以通过光电传导系统实时原位和定量 检测PCR扩增，汇集了 DNA杂交的高特异性和光 谱的高灵敏性［63］o

第二类是不依赖PCR的技术。例如荧光染色计 数技术［64］可以快速、简便计量活菌和死菌的数量， 采用不同染料即可在荧光检测器下进行活菌或死菌 计数。荧光原位杂交技术可以直接鉴定以及定量分 析样品中的特定的微生物或者是分类群［65］o该方法 中被研究的微生物细胞被固定，其原理是利用荧光 标记的特异核酸探针与环境样品内相应的靶 DNA 分子或 RNA 分子杂交，通过荧光显微镜或共聚焦 激光扫描仪下观察荧光信号，来确定与特异探针杂 交后被染色的细胞或细胞器的形态和分布［66－67］，或 者结合了荧光探针的DNA区域或RNA分子在染色 体或其它细胞器中的定位。

第三类是基于生物细胞内特征物质来分析微 生物多样性，利用这些特征性物质可以在属甚至种 的水平上对微生物生态状况进行分析。磷脂脂肪酸 谱图分析、脂肪酸谱图分析、甲基脂肪酸图谱分析、 生物醌图谱分析等，这些方法也可用于群落动态 分析。

综上所述，分子生态技术作为一种有效的生物 监控手段，直接反映了微生物菌株定植、菌群的动 态变化等，是修复过程监测和结果评估的科学工具， 也为修复过程优化的提供了重要依据。

1. 微生物分子生态学在土壤生物修 复中应用展望

土壤修复作为环保产业的组成部分，其发展首 先受到国家的经济和社会建设需求的牵引。据预测， 我国的环保产业市场规模将从1995年的29亿美元 扩展到2010年的130亿美元。在此之前，我国环保 领域的污染物处理产业主要集中于污水处理、废弃 物管理和空气污染治理。伴随着新一轮经济增长， 工业化和城镇化步伐加快，我国面临的土地紧张矛 盾将更加突出，而全社会科学水平和环境意识的提 高，将促使人们更加注重并追求生产和生活环境的 安全，更加关注地下水体、耕地、厂区、居民区的 土地安全问题。这些都为土壤修复产业的发展提供 了巨大的需求牵引力。

与之对应，污染土壤的修复得到了我国政府和 学术界的高度重视，“十一五”期间科技部启动了土 壤生物修复的系列重点项目。中国科学院完成的“中 国 2050 年生物质资源科技发展路线图”中也将土壤 生物修复纳入到重要的战略目标中，其重要性不言 自明——没有优质土壤作为基础，基于生物质的资 源和能源的生产和转化只能是梦想。

当前我国污染土壤的生物修复技术研究方兴 未艾，但也面临着严峻的挑战。要推进我国土壤修 复这一关乎国计民生的事业和产业的发展，需要先 进的科学技术和严格的环保法规体系“双轮驱动”。 在科学技术领域，当前需要解决的问题主要是以下 几个方面。

1. 提高土壤修复研究的科技水平。土壤组成 复杂、组分间相互作用(物理、化学、生物)复杂、 修复过程呈现开放体系特性，这对于揭示修复过程 的微观机理提出了特殊的挑战。如果研究工作只是 停留在宏观表象层面，则研究成果的可推广性会受 到严重影响，导致在修复技术研发方面的“重复投 资”。而要解决上述问题，需要引入更为先进的概念 和工具。本文所介绍的微生物分子生态学就有望全 面展现参与石油污染物降解的微生物群体的整体全 貌及其演变规律，而这是采用传统的培养法所难以 实现的。
2. 需要建立全面的土壤修复标准，推进依法 理赔、依法复耕。事实上，修复标准的内容和方法 也是科技进步的综合体现。我国当前耕地土壤污染 程度或者修复效果评估尚完全依据的是化学组分分 析，而赔偿标准则多是基于粮食产量的受损情况。 上述方法的待改进之处在于：化学分析方法反映的 是单一有毒有害成分的去除情况，而以产量定赔付 具有人为干预性，也影响到了农民修复土地上进行 复耕的积极性。从科学内涵上分析：上述指标均难 以直接衡量或者反映土壤涵养生物和生命过程的能 力——耕地最重要的功能。因此，应当将微生态指 标体系引入到耕地污染和修复评估体系中，以反映 耕地最重要的本征功能——参与生命活动的种群

(功能基因)的数量和组成。

1. 环保法规的建设和实施。依法推进污染土 壤的修复和修复后耕地的复耕是保护国家土地和耕 地资源的基本措施，也是推进土壤修复产业发展和 技术进步的法律动力。

土壤微生物在众多生命活动中起着至关重要 的作用，采用微生物分子生态学的方法可以从基因 层面上深入解析土壤宏观微生物和功能微生物种群 的组成和数量，用以反映土壤的生物学特性，为生 物修复的评估提供重要的、客观的、全面的指标。 促进分子生态学在土壤修复领域中的应用将为加速 我国污染土壤的修复、保障国家珍贵的土地资源、 实施生物质资源路线、最终实现可持续发展等提供 科技动力。

参 考 文 献

1. Burke T， Seidler R， Smith H. Editorial[J]. *Molecular Ecology*， 1992，

1 ( 1 )： 1.

1. 杨芳，徐秋芳.土壤微生物多样性研究进展[J].浙江林业科技，

2002， 22(6)：39-55.

1. 杨海君，肖启明，刘安元.土壤微生物多样性及其作用研究进展[J]. 南华大学学报：自然科学版， 2005， 19(4)：21-31.
2. Louise M D， Gwyn S G， John H， et al. Management influences no soil microbial communities and their function in botanically diverse hay meadows of northern England and Wales[J]. *Soil Biology and Biochemistry*， 2000， 32：253-263.
3. Vogel T M， Walter M V. Bioaugmentation：In Manual of Environmental Microbiology[M]. Hurst C J， Crawford R L， Knudsen G R， et al. Washington ， DC， USA：American Society for Microbiology Press，

2001： 952-959.

1. Janmejay P，Archana C，Rakesh K J. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation[J]. *FEMS Microbiol Rev.*，2009，33：324-375.
2. Seo J S，Keum Y S，Li Q X. Bacterial degradation of aromatic compounds[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*，2009，1(6)：278-309.
3. 孙铁珩，宋玉芳，许华夏，等. 污染土壤中多环芳烃生物降解的 调控研究[J].应用生态学报，1998，9 (6)： 640-644.
4. 孙铁珩，宋玉芳，许华夏，等.植物法生物修复PAHs和矿物油污 染土壤的调控研究[J].应用生态学报，1999，10 (2)： 225-229.
5. 宋玉芳，孙铁珩，许华夏，等.表面活性剂TW-80对土壤中多环 芳烃生物降解的影响[J].应用生态学报，1999，10 (2)： 230-232.
6. 姜昌亮，孙铁珩，李培军，等. 石油污染土壤长料堆式异位生物 修复技术研究[J].应用生态学报，2001，12 (2)： 279-282.
7. 丁克强，尹睿，孙铁珩，等.石油污染土壤堆制微生物降解研究[J]. 应用生态学报， 2002， 13(9)：1137-1140.
8. 宋雪英，宋玉芳，孙铁珩，等. 矿物油污染土壤中芳烃组分的生 物降解与微生物生长动态[J].环境科学，2004, 25 (3)： 115-119.
9. 宋雪英，宋玉芳，孙铁珩，等. 石油污染土壤生物修复中外源微 生物的影响[J].环境科学学报，2007，27 (7)： 1168-1173.
10. 丁克强，孙铁珩.真菌对石油污染土壤的降解研究[J].微生物学杂 志， 1999， 19(4)：25-34.
11. 丁克强，孙铁珩.石油污染土壤的生物降解研究[J].生态学杂志， 2001， 20(4)：16-18.
12. 蔺昕，李培军，孙铁珩，等. 石油污染土壤的生物修复与土壤酶 活性关系[J].生态学杂志，2005，24 (10)： 1226-1229.
13. 王鑫，郭书海，孙铁珩，等. 稠油高效降解菌的降解特性及其应 用 [J]. 环境工程学报， 2009， 4( 4)：586-590.
14. 宋玉芳，周启星，宋雪英，等. 石油污灌土壤污染物的残留与生 态毒理[J].生态学杂志，2004，23 (5)： 61-66.
15. 祝儒刚，李玉双，周启星，等. 菲降解细菌 L2 的培养条件研究及 菲降解率测定[J].安徽农业科学，2006，34 (3)： 407-408.
16. 刘五星，骆永明，腾应，等. 石油污染土壤的生态风险评价和生 物修复I.—株具有乳化石油能力的细菌分离鉴定[J]. 土壤学报， 2006， 43(3)：461-466.
17. 刘五星，骆永明，腾应，等. 石油污染土壤的生态风险评价和生 物修复II.石油污染土壤的理化性质和微生物生态变化研究[J]. 土 壤学报， 2007， 44( 5)：848-853.
18. 刘五星，骆永明，腾应，等. 石油污染土壤的生态风险评价和生 物修复III.石油污染土壤的植物-微生物联合修复[J]. 土壤学报， 2009， 45( 5)：994-999.
19. Zhang K， Xu Y Y， Liu Z， et al. An intensified degradation of phenanthrene with macroporous alginate-lignin beads immobilized *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Biochemical Engineering Journal*， 2008， 41：251-257.
20. Hua X F， Wang J， Liu Z， et al. A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil[J]. *Biochemical Engineering Journal*， 2010， 49( 2)：201-206.
21. 韩慧龙，汤晶，刘铮，等. 真菌-细菌修复石油污染土壤的协同作 用机制研究[J].环境科学，2008，29 (1)： 189-195.
22. 韩慧龙，陈镇，刘铮，等. 真菌-细菌协同修复石油污染土壤的场

地试验[J].环境科学，2008，29 (2)： 454-461.

1. 张坤，徐圆圆，刘铮，等. 麦秸强化石油烃污染耕地水浸洗盐过 程研究及场地试验[J].环境科学，2009，30 (1)： 231-236.
2. 张坤，徐圆圆，刘铮，等. 麦秸强化微生物降解石油烃及场地试 验[J].环境科学，2009，30 (1) : 237-241.
3. Zhang K， Hua X F， Liu Z， et al. Enhanced bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil using wheat straw[J]. *Chemosphere*， 2008， 73：1387-1392.
4. 刘铮，韩慧龙，王福远，等. 一种用于石油污染物降解的液体微 生物制剂：中国， ZL200510130676.3[P]. 2007-07-12.
5. 韩慧龙，刘铮，王福远，等. 一种石油烃污染土壤的异位生物修 复方法：中国， ZL200510130677.8[P]. 2005-12-21.
6. 刘铮，韩慧龙，王福远，等. 一种石油污染土壤的原位生物修复 方法：中国， ZL200510130674.4[P]. 2005-12-21.
7. 刘铮，韩慧龙，周鑫，等. 一种土壤修复用固体复合微生物微球 及其制备方法：中国， ZL200510130675.9[P]. 2005-12-21.
8. 花秀夫，刘铮，张坤，等. 一种石油烃降解菌的高密度发酵方法： 中国， CN101130754[P]. 2007-08-01.
9. 刘铮，张坤，徐圆圆，等. 一种生物质强化石油污染土壤的原位 生物修复方法：中国， CN101104177[P]. 2007-08-01.
10. 刘铮，张坤，花秀夫，等. 一种用于有机污染物生物修复的固体 复合微生物微球及其制备方法：中国， CN101134955[P]. 2007-08-02.
11. Ranjard L ， Franck P ， Sylvie N. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques ： Application to soil environment[J]. *Research in Microbiology*， 2000， 151：167-177.
12. Hugenholtz P**，**Goebel B M， Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity[J]. *Journal of Bacteriology*， 1998， 180：4765-4774.
13. Muyzer G， de Waal E C， Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*， 1993， 59： 695-700.
14. Donegan K K， Palm C J， Fieland V J， et al. Changes in level， species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin[J]. *Appied Soil Ecology*， 1995：111-124.
15. Clement B G， Kehl L E， DeBord K L， et al. Terminal restriction fragment patterns [TRFPs]， a rapid， PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*， 1998， 31：135-142.
16. Borneman J**，**Triplett E W. Molecular microbial diversity in soil from eastern amazonia ： Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*， 1997， 63：2647-2653.
17. Hadrys H， Balick M， Baker P， et al. Application of random amplified polymorphic DNA( RAPD) in molecular ecology[J]. *Microbial. Ecology*， 1992， 1：55-63.
18. Fischer S， Lerman L. Sequence-determined DNA separations[J]. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*， 1984， 13：399-423.
19. Wilfred F M， Michael G M， Martin J， et al. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a Mudflat Beach contaminated with buried oil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*， 2004， 70(5)： 2603-2613.
20. Marc V， Jordi S， Maria J E， et al. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degrasation during bioremediation of heavily Creosote-Contaminated soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*， 2005， 71：7008-7018.
21. Li H， Zhang Y， Zhang C G， et al. Effect of petroleum-contamining wastewater irrigation on bacterial diversities and enzymatic activities in a Paddy Soil Irrigation Area[J]. *Journal of Environmental Quality*， 2005， 34：1073-1080.
22. Michael C， Michael A K. Effect of Sphingobium yanoikuyae B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in aged and freshly PAH-contaminated soils[J]. *Environmental Pollution*， 2006， 144： 228-237.
23. Nuria J， Marc V， Josep M B， et al. The *Prestige* oil spill：Bacterial community dynamics during a field biostimulation assay[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*， 2007， 77：935-945.
24. Li H， Zhang Y， Kravchenko I， et al. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds：A laboratory experiment[J]. *Journal of Environmental Sciences*， 2007， 19：1003-1013.
25. Coppotelli B M， Ibarrolaza A， Del Panno M T. Effects of the inoculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA on soil bacterial community and biodegradation in phenanthrene- contaminated soil[J]. *Microbial Ecology*， 2008， 55：173-183.
26. Smalla K， Wachterdorf U， Heuer H， et al. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*， 1998， 64：7008-7018.
27. Wawer C， Jetten M S M， Muyzer G. Genetic diversity and expression of the [NiFe] hydrogenase gene large subunit gene of *Desulfovibrio* spp. In environmental sample[J]. *Applied and Environmental Microbiology*， 1997， 63：4360-4369.
28. Cancilla M R， Powell I B， Hillier A J， et al*.* Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with 32P and fluorescent labels[J]. *Applied and Environmental Microbiology*， 1992， 58：1772-1775.
29. Avaniss-Aghajani E， Jones K， Holtzman A， et al. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal

RNA sequences[J]. *Biotechniques*， 1994， 17：144-149.

1. Liu W T， Marsh T L， Cheng H， et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*， 1997， 63：4516-4522.
2. Wu X L， Chin K J， Conrad R. Effect of temperature stress on the structure and function of the methanogenic archaeal community in a rice field soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*， 2002， 39：211-218.
3. Wu X L， Friedrich M W， Conrad R. Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic archaea in temperate anoxic soils[J]. *Environmental Microbiology*， 2006， 8(3)：394-404.
4. 章戴荣，白林，周东胜.利用T-RFLP技术分析微生物的多样性[C]// 中国畜牧兽医学会动物微生态分会第三届第八次学术研讨会论文 集，广州， 2006.
5. Katsivela E， Moore E R B， Maroukli D， et al. Bacterial community dynamics during *in-situ* bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites[J]. *Biodegradation*， 2005， 16：169-180.
6. Denaro R， Auria G D， Di Marco G， et al. Assessing terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbon-polluted marine environments[J]. *Environmental Microbiology*， 2005， 7(1)：78-87.
7. Holland P M， Abramson R D， Watson R， et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of thermos aquaticus DNA polymerase[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*， 1991， 88：7276-7280.
8. Boulos L， Prejavost M， Barbeau B， et al. Live/dead backlight： Application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water[J]. *Journal of Microbiological Methods*， 1999， 37：77-86.
9. Gall J G， Pardue M L. Formation of RNA-DNA hybrid molecules in cytogenetical preparations[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*， 1969， 63：378-383.
10. Amann R I， Ludwig W， Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individualmicrobial cells without cultivation[J]. *Microbiological Reviews*， 1995， 59(1)：143-169.
11. Wu X L ， Conrad R. Functional and structural response of a cellulose-degrading methanogenic microbial community to multiple aeration stresses at two different temperatures[J]. *Environmental Microbiology*， 2001， 3：355-362.

**《化工进展》 :**

欢迎投稿、订阅、刊登广告!

§