

石油污染土壤水改旱田后污染物组份及微生物群落结构变化^{*}

任瑞霞^{1,2} 张颖^{1,*} 李慧¹ 王荣¹ 徐慧¹ 陈冠雄¹

(¹ 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; ² 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 对沈抚灌区水改旱田不同年限土壤的石油污染物浓度及组分进行了分析, 并采用变性梯度凝胶电泳和磷脂脂肪酸分析方法, 分析了污染土壤微生物群落结构的变化。结果表明: 1)石油污染土壤水改旱田后, 年限越长, 总多环芳烃在总石油烃中所占的比重越大, 高分子量多环芳烃在总多环芳烃中所占比重也越大; 2)总磷脂脂肪酸量与总石油烃呈显著正相关, 与总多环芳烃相关性不显著; 3)两种方法对土壤微生物群落结构的分析得出的结论一致, 石油污染土壤微生物群落结构主要与其相对地理位置有关, 当污染物的浓度达到一定程度时, 土壤微生物群落结构会发生明显的改变。

关键词 污水灌溉 微生物多样性 磷脂脂肪酸 变性梯度凝胶电泳 总石油烃 多环芳烃
文章编号 1001-9332(2007)05-1107-06 **中图分类号** X172 **文献标识码** A

Pollutant components and microbial community structure of oil-polluted soils after converted from paddy field to upland. REN Rui-xia^{1,2}, ZHANG Ying¹, LI Hui¹, WANG Rong¹, XU Hui¹, CHEN Guan-xiong¹(¹Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2007, 18(5): 1107–1112.

Abstract: With the oil-polluted soils after converted from paddy field to upland field for different years in the Shenuf wastewater irrigation area of Shenyang as test materials, the concentrations of their oil pollutants were determined, and the microbial community structure was investigated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and phospholipids fatty acid (PLFA) methods. The results showed that the proportions of total polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in total petroleum hydrocarbons (TPHs) and of high molecular weight PAHs in total PAHs increased with the increasing years of field conversion. Total phospholipid fatty acids (PLFAs) had a significant positive correlation with total TPHs, but no correlation with total PAHs. Both DGGE and PLFA analyses indicated that the community structure of soil microbes was mainly correlated with geographical location, and changed obviously when the concentrations of oil pollutants in soil increased to a definite level.

Key words: wastewater irrigation; microbial diversity; phospholipid fatty acid (PLFA); denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); total petroleum hydrocarbon (TPH); polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH).

1 引言

我国从 20 世纪 40 年代开始利用工业废水与生活污水进行农田灌溉。污水灌溉主要集中在北京、

资源严重短缺的海、辽、黄、淮四大流域^[12]。辽宁省沈抚灌渠建于 1960 年, 全长 70 km, 一直是沿途农田灌溉的主要水源。到 1985 年, 沈抚两地灌溉面积达 100 km², 成为中国最大的石油类污水灌区。污水来源主要是当地的几大石油化工厂, 由于长期用污水灌溉, 土壤中石油类污染物积累严重, 影响了土壤的正常功能, 对该地区的生态环境造成了严重影响^[4,11,19,23–24]。

* 国家自然科学基金项目(30670391)和国家重点基础研究发展计划资助项目(2004CB418505)。

* * 通讯作者. E-mail: yzhang@iae.ac.cn

2006-02-28 收稿, 2007-02-02 接受。

20世纪80年代,随着人们对污水灌溉危害的认识,沈抚污灌区逐步停止了污水灌溉,开始了清水灌溉和改为旱田耕作,促进了污染物的降解,使生态功能得到一定的恢复。环境中的石油类污染物的去除以微生物降解为主,好氧条件下的降解速度要比厌氧条件下快得多^[16]。大多数的多环芳烃都具有致癌性,尤其是高分子量多环芳烃(四环及四环以上的芳烃)在环境中具有较强的疏水性和化学稳定性,不易被降解,对土壤中微生物的多样性与活性产生胁迫作用^[3]。本文对沈抚灌区石油污染土壤水改旱田不同年限后的石油污染物浓度及大分子多环芳烃组分进行了分析,并采用变性梯度凝胶电泳(genaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和磷脂脂肪酸分析(phospholipid fatty-acid analysis, PLFA)技术,分析了水改旱田不同年限后污染土壤微生物多样性的变化。

2 材料与方法

2.1 土壤样品的采集及土壤理化性质分析

供试土壤样品于2003年7月采自沈抚灌区干渠上、中、下游地区水田改旱田土壤(0~20 cm),共采集10个样地(表1),以中国科学院沈阳应用生态研究所位于沈阳十里河生态实验站的旱田土壤作为清洁土壤样品对照。每个样地随机选取5个采样点,混匀分装,-20℃保存、备用。

表1 土壤样品基本情况

Tab. 1 Information of soil samples

样品编号 Sample	采样地点 Sampling site	作物 Crop	水改旱年限 Years after converting paddy field into upland (a)
1	三宝屯 Sanbaotun	小葱 Mhallots	30
2	三宝屯 Sanbaotun	芹菜 Celery	30
3	三宝屯 Sanbaotun	大豆 Soybean	30
4	四方台 Sifangtai	芥菜 Leaf mustard	15
5	四方台 Sifangtai	萝卜 Rabish	15
6	康宏 Kanghong	大豆 Soybean	10~15
7	康宏 Kanghong	大豆 Soybean	1~3
8	深井子镇兴农村 Xingnong Village of Shenjingzi Town	大豆 Soybean	6~7
9	深井子镇兴农村 Xingnong Village of Shenjingzi Town	大豆 Soybean	10
10	深井子镇兴农村 Xingnong Village of Shenjingzi town	玉米 Maize	10
11	沈阳生态站 Shenyang Ecological Station	玉米 Maize	-

2.2 土壤理化性质分析

土壤有机质含量用K₂Cr₂O₇容量法测定;土壤全氮用凯氏定氮法测定;土壤全磷用钼锑抗比色法测定;土壤有效磷用Olsen法测定;土壤全钾和有效钾用火焰原子吸收光谱法测定^[6]。

2.3 总石油烃(TPH)和多环芳烃(PAHs)的测定

取5 g土壤,风干、过筛(1 mm),用20 ml正己烷、20 ml三氯甲烷、20 ml二氯甲烷依次超声提取20 min,3 000 r·min⁻¹离心10 min,合并3次上清液,过无水硫酸钠柱子,去水,收集滤液,置于已知质量的烧杯中,在室温下用氮气吹干,重量法测定总石油烃(total petroleum hydrocarbons, TPH)含量。多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)用HPLC法测定^[9,14],其中测定的高分子量多环芳烃包括茚并[1,2,3-cd]芘、苯并[g,h,i]芘、二苯并蒽、苯并芘、苯并[k]荧蒽、苯并[b]荧蒽、屈、苯并[a]蒽、芘和荧蒽,每个样品做3次重复。

2.4 DNA提取

取0.5 g在-20℃保存的土壤样品,与1 ml DNA提取缓冲液和10 μl蛋白酶K(10 mg·ml⁻¹)旋涡混合,置于37℃水浴中,温浴1 h。温浴后将样品置于-65℃~65℃,反复冻融3次,加入100 μl 20% SDS溶液,混匀,放入65℃水浴中,温浴2 h,每隔15~20 min轻轻摇动1次,使细胞充分裂解。6 000 r·min⁻¹离心10 min,收集上清液,加等体积的氯仿-异戊醇(24:1,V/V),混匀,6 000 r·min⁻¹离心10 min。吸取水相,加入0.6倍体积冷异丙醇,轻轻混匀,室温放置2 h,12 000 r·min⁻¹离心20 min,收集沉淀DNA,用70%的冷乙醇洗涤,室温干燥。用50 μl TE缓冲液溶解,得到DNA粗提液。DNA粗提液用TaKaRa agarose gel DNA凝胶回收,试剂盒纯化,储存于-20℃,备用。

2.5 PCR-DGGE

选取细菌通用引物^[5,10]。其中,8f-GC为5'-CGCCCGCCGCCGGCGCCCGTCCGCCGCC-
GCCCGAGAGTTGATCCTGGCTCAG-3';519r为5'-
GTATTACCGCGGCTGCTGG-3',由宝生物工程(大连)有限公司合成。扩增反应体系为50 μl,包括2 μl DNA模板,10×PCR反应缓冲液5 μl,2.5 mmol·L⁻¹ dNTP混合溶液4 μl,20 pmol·L⁻¹引物一1 μl,20 pmol·L⁻¹引物二1 μl,Taq酶(5 U·μl⁻¹)0.25 μl,灭菌去离子水36.75 μl。反应条件为94℃,预变性5 min;94℃变性1 min,60℃退火1 min,72℃延伸3 min,30个循环,最后再在72℃延伸8 min。

PCR 反应的产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色检测。DGGE 采用 D-Code system (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA), 聚丙烯酰胺浓度为 6%, 变性梯度为 45% ~ 75% (100% 变性相当于 7 mol · L⁻¹ 尿素和 40% 去离子甲酰胺), PCR 产物加样量 20 μl, 在 60 °C、1 × TAE、80 V 条件下电泳 16 h, 电泳胶片用 GeneFinderTM 染料 (1:10 000 稀释) 的 1 × TAE 缓冲液中染色 20 min. 用凝胶成像系统 (Gel Doc 2000TM Chemi DocTM Gel Documentation Systems, Bio-Rad) 捕获凝胶数字图像, 并用图形分析软件 (Quantity One 4.2.3, Bio-Rad) 对凝胶图像进行分析。

2.6 PLFA 分析

用 Bligh 等^[2]方法提取总脂, 用 Frostegård 等^[7]改进的方法提取磷脂脂肪酸, 经甲酯化、加十九烷甲酯 (19:0 Me. Nonadecanoate) 后, 将其作为内标, 定性标准品为 Bacterial Acid Methyl Esters CP Mix (BAME 24,47080-U; Supelco), 定量标准品为 Supelco 37 Component FAME Mix (FAME 37,47885-U; Supelco), 用 Agilent 6890 + (色谱柱: HP 5) 气相色谱仪测定, 升温程序为: 进样口温度 250 °C, 进样量 1 μl, 分流比 10:1; 起始柱温 140 °C, 保持 3 min; 以 4 °C · min⁻¹ 的速度升温至 230 °C, 保持 2 min; 再以 2 °C · min⁻¹ 的速度升温至 250 °C, 保持 2 min; 最后以 10 °C · min⁻¹ 的速度升温至 300 °C, 保持 10 min. 用 GC-MS HP 5890 II -TRACE MS 定性每种脂肪酸^[8,18,20~21], 每个样品重复 3 次。

2.7 统计分析

实验数据用 SPSS 12.0 for Windows 统计软件进行相关性检验、主成分分析 (principal component

表 2 土壤样品的理化性质

Tab. 2 Physical and chemical properties of soils

样品 Sample	有机质 Organic matter (g · kg ⁻¹)	全氮 Total N (g · kg ⁻¹)	速效氮 Available N (mg · kg ⁻¹)	全磷 Total P (mg · kg ⁻¹)	速效磷 Available P (mg · kg ⁻¹)	全钾 Total K (g · kg ⁻¹)	速效钾 Available K (mg · kg ⁻¹)
1	29.9	2.2	130.4	1200.0	16.06	4.4	94.10
2	21.8	2.8	84.0	2181.9	48.44	4.0	93.41
3	33.8	2.9	76.8	942.8	21.65	4.5	65.84
4	36.1	3.2	115.2	2565.6	16.55	4.1	97.80
5	21.2	3.0	96.0	2037.8	15.91	3.4	84.16
6	34.6	3.5	168.0	426.9	42.28	4.0	87.22
7	20.3	2.6	108.0	961.9	18.46	3.6	207.48
8	14.0	2.8	95.9	904.0	18.78	3.7	85.88
9	11.5	1.4	253.8	360.0	11.35	4.5	122.85
10	13.6	2.2	108.7	900.5	29.98	3.9	84.88
11	12.1	2.2	107.6	1543.2	52.58	4.5	70.59

analysis, PCA) 和方差分析 (analysis of variance, ANOVA).

3 结果与分析

3.1 土壤理化性质

土壤样品理化性质见表 2. 由表 2 可以看出, 中上游地区土壤有机质含量较高, 下游有机质含量较低; 土壤全氮差异不大; 各土壤中速效氮、全磷、速效磷、全钾、速效钾含量无明显规律, 可能与当地的土壤质地和作物有关。

3.2 土壤 TPH、PAHs 含量

土壤样品 TPH、PAHs 含量见表 3. 相关性分析结果表明, 污染土壤中 TPH、总多环芳烃 (Total-PAHs) 与土壤有机质含量无显著相关性; TPH、Total-PAHs 与改旱年限长短无显著相关性; 而 Total-PAHs/

表 3 水改旱田不同年限土壤样品 TPH、PAHs 和 PLFA 含量

Tab. 3 Concentration of TPH, total PAHs and total PLFAs in soils

样品 Sample	总石油烃 TPH (mg · kg ⁻¹)	总多环芳烃 Total-PAHs [*] (mg · kg ⁻¹)	总多环芳烃在总 石油烃中的比例 Total-PAHs / TPH	高分子量多环芳烃在 总多环芳烃中的比例 HMW-PAHs/ Total-PAHs	总磷脂脂肪酸 Total PLFAs (nmol · g ⁻¹)
1	448.1 ± 124.3	3.24 ± 0.23	0.67	0.72	26.5 ± 0.3
2	414.8 ± 52.4	2.90 ± 0.88	0.70	0.70	25.6 ± 1.5
3	311.2 ± 172.8	2.99 ± 0.84	0.82	0.96	10.9 ± 0.3
4	604.4 ± 90.6	2.36 ± 0.00	0.65	0.39	10.2 ± 0.1
5	1015.7 ± 103.7	1.64 ± 1.08	0.72	0.16	13.9 ± 0.1
6	2489.9 ± 142.3	4.50 ± 0.37	0.73	0.18	46.8 ± 0.7
7	645.5 ± 188.0	1.09 ± 0.09	0.36	0.17	21.9 ± 0.1
8	686.9 ± 56.1	1.16 ± 0.09	0.58	0.17	17.6 ± 0.6
9	486.0 ± 101.2	0.60 ± 0.00	0.61	0.12	25.2 ± 0.1
10	479.0 ± 165.6	0.69 ± 0.03	0.61	0.14	15.3 ± 0.3
11	255.3 ± 74.0	0.90 ± 0.06	0.67	0.72	19.5 ± 0.5

* Total-PAHs 是指 16 种常见的多环芳烃量的总和, 包括茚并 [1,2,3-C,D] 芘、苊、苊烯、蒽、1,2-二苯并蒽、苯并 [b] 荧蒽、䓛、苯并 [g,h,i] 芘、䓛并 [a] 芘、䓛、䓛并 [1,2,5,6-二苯并] 荧蒽、䓛、䓛并 [1,2,5,6-二苯并] 荧蒽、䓛并 [1,2,5,6-二苯并] 荧蒽、
assistant

* Total-PAHs 是指 16 种常见的多环芳烃量的总和, 包括茚并 [1,2,3-C,D] 芘、苊、苊烯、蒽、1,2-二苯并蒽、苯并 [b] 荧蒽、䓛、苯并 [g,h,i] 芘、䓛并 [a] 芘、䓛、
assistant

* Total-PAHs 是指 16 种常见的多环芳烃量的总和, 包括茚并 [1,2,3-C,D] 芘、苊、苊烯、蒽、1,2-二苯并蒽、苯并 [b] 荧蒽、䓛、苯并 [g,h,i] 芘、䓛并 [a] 芘、
assistant

* Total-PAHs 是指 16 种常见的多环芳烃量的总和, 包括茚并 [1,2,3-C,D] 芘、苊、苊烯、蒽、1,2-二苯并蒽、苯并 [b] 荧蒽、
assistant

* Total-PAHs 是指 16 种常见的多环芳烃量的总和, 包括茚并 [1,2,3-C,D] 芘、苊、苊烯、蒽、1,2-二苯并蒽、苯并 [b] 荧蒽、

TPH、HMW-PAHs(高分子量多环芳烃 High molecular weight PAHs)/Total-PAHs 比值与改旱年限长短呈显著相关,其中 Total-PAHs/TPH 与改旱田年限呈正相关,相关系数 $r = 0.918$ ($P < 0.01$)。HMW-PAHs/Total-PAHs 与改旱年限也呈正相关, $r = 0.704$ ($P < 0.05$),表明石油污染稻田改旱田的年限越长,土壤中 PAHs 在 TPH 中所占的比重越大, HMW-PAHs 在 Total-PAHs 中所占的比重也越大。水改旱促进了 TPH 中烷烃和低分子量 PAHs 的降解。水改旱后,由于光照和氧气充足,地表温度相对较高,从而促进了土壤石油类污染物的物理化学降解;水改旱后的土壤环境有利于好氧微生物的生长,好氧降解微生物充分发挥其降解性能,使土壤中相对容易降解的烷烃和低分子量多环芳烃在不同程度上得到加速降解。

3.3 土壤微生物多样性

3.3.1 用 PLFA 分析的土壤微生物多样性 从目前的微生物多样性研究方法来看,除利用传统培养技术,最大限度地培养各种微生物群体以外,使用 Biolog 分析、PLFA 分析和分子生物学技术等方法,可获得更多更完整的信息^[1,25]。Biolog 分析方法是一种基于微生物利用碳源能力的群落水平的生理特性分析方法,具有快速、可再现的特点,但利用 Biolog 系统所观察到的底物利用模式,只能反映那些在 Biolog 微滴定板孔中能够生长的微生物的功能特性^[13,25]。PLFA 常被用于研究复杂微生物群落的多样性,磷脂的结构多样性和生物学特异性可作为其有效的生物标记物,用于了解微生物的群落结构^[8,17,21-22],且 PLFA 的总量可用来指示土壤样品中的微生物生物量^[7],是一种快速、可靠且可重现的分析土壤微生物群落结构的方法,可表征在数量上占优势的土壤微生物群落(包括不可培养微生物),但 PLFA 的组成和浓度受土壤微生物生长条件和生理状态的影响较大^[25]。分子生物学方法已广泛用于分析环境样品中的微生物多样性,该方法避开了传统的微生物培养分离环节,直接从样品中抽取所含微生物的总 DNA,然后利用 16S rDNA、PCR、RAPD, DGGE 和 RFLP 等多种分子生物学研究手段,对直接提取的总 DNA 进行分析,了解其所包含的 DNA 种类和含量,以研究样品中微生物的实际组成(包括不可培养微生物),但该方法也存在 PCR 偏倚(bias)、凝胶电泳分辨率等问题^[15,25]。本文采用

PCR-DGGE 和 PLFA 两种分析技术,对土壤微生物多样性进行了分析。

土壤样品中获得的磷脂脂肪酸经 GC、GC-MS 测定,每个样品均可得到 25~30 种脂肪酸成分图谱及其含量。相关检验表明,总 PLFAs 与 TPH 呈显著正相关($r = 0.737$, $P < 0.05$),与 Total-PAHs 无显著相关性。石油污染物(特别是石油烷烃)可作为土壤微生物生长、代谢所需的碳源和能源。对各类脂肪酸进行的分类、统计结果表明,TPH 与分支脂肪酸(指示 G⁺ 细菌)、单不饱和脂肪酸(指示 G⁻ 细菌)均呈显著正相关,与 10Me18:0(指示放线菌)和 18:2w6,9(指示真菌)无相关性,而总 PAHs 与各类脂肪酸均无显著相关性。放线菌和真菌的指示脂肪酸虽然与 TPH 无显著相关性,但并不表明放线菌与真菌不参与 TPH 降解,因为这两种脂肪酸(10Me18:0 和 18:2w6,9)与放线菌、真菌生物量的关系没有明确的报道,这点与细菌不同。

对所有的磷脂脂肪酸组分进行的主成分分析(PCA)结果见图 1。由图 1 可见,位于沈抚灌渠上游的三宝屯的 3 个样点(1、2、3 号)TPH、PAHs 含量接近,其改旱年限相同,用 PCA 图谱分析的土壤微生物种群结构接近;位于中游的四方台的两个样点(4、5 号),改旱年限相同,PAHs、TPH 差异较大,但它们的微生物种群结构接近;7、8 号位点地理位置较远,改旱年限不同,TPH、PAHs 相近,微生物群落结构较近;污染最重的康宏样点(6 号)微生物群落结构不同于其它样点;沈阳生态实验站对照样品(11 号)同样也离其它样点较远,自聚为一类。由此可见,石油污染土壤中的微生物群落结构主要与其相对地理位置有关,但当污染达到一定程度时,土壤

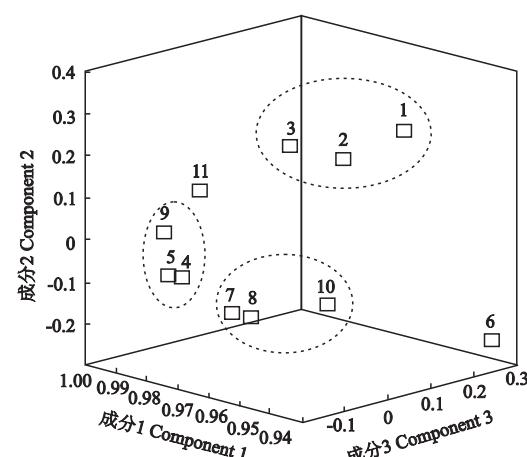


图 1 PLFAs 主成分分析

Fig. 1 Principal component analysis of PLFAs.

中的微生物群落结构会发生明显改变。例如9号样品,虽然已经进行了近10年的旱田耕作,到采样时其污染物TPH、PAHs含量不是很高,但是其微生物群落结构与和它相近的8号、10号样品有很大差别,反而与4号、5号样品更接近;6号和7号样品地理位置接近,但污染物组成和含量均有显著差异,这可能是污水来源不同的缘故,6号因其TPH、总PAHs含量显著高于其它样品,微生物群落结构也明显与其它样品不同。

综上所述,沈抚灌区石油污染在部分地区已达到严重程度,仅以水改旱的方法来促进石油污染物降解,仍不能解决多环芳烃尤其是高分子量多环芳烃的严重积累问题,与清洁土壤相比,污灌区土壤微生物群落结构发生了不同程度的改变。

3.3.2 PCR-DGGE 分析微生物多样性 采用细菌通用引物(8f-GC 和 519r),扩增 16S rDNA 片段,获得 DGGE 指纹图谱(图 2),并对图谱进行聚类分析(图 3)。结果表明,三宝屯 3 个样点(1、2、3 号)DGGE 指纹图最为相近,聚为一大类,其中污染相对较重的 1 号又与 2、3 号有所差异,可划分到另一个小分支上;位于沈抚灌渠中游四方台的两个样点(4、5 号)与下游 9 号样点的 DGGE 指纹图谱接近,聚为一类;中下游 7、8 和 10 号样点的 DGGE 指纹图谱接近,聚为一大类上;污染最重的康宏土壤样品(6 号)自成一类;沈阳生态实验站洁净对照土壤与污染相对较轻的土壤聚为一大类。聚类分析结果与 PLFA 分析结果基本一致,这两种方法可相互印证。

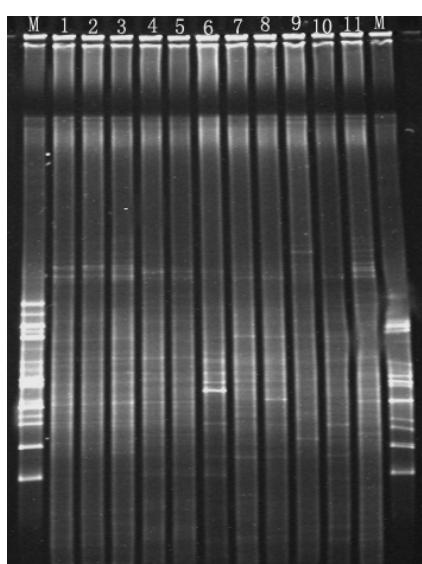


图 2 土壤样品 DGGE 指纹图谱

Fig. 2 DGGE fingerprints of soil samples.

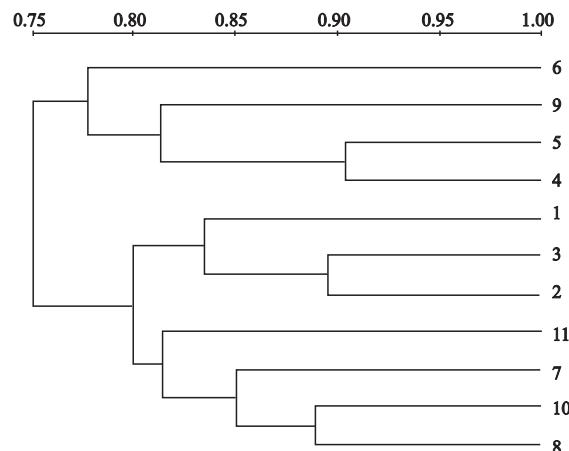


图 3 DGGE 指纹图谱聚类分析树状图

Fig. 3 Hierarchical cluster dendrogram of DGGE profile of soil samples.

4 结 论

1) 沈抚灌区水改旱田石油污染土壤中,土壤有机质含量与土壤 PAHs 和 TPH 无显著相关性。

2) 沈抚灌区水改旱田石油污染土壤中,PAHs 和 TPH 的含量与改旱年限有关。总 PAHs 在 TPH 中所占的比例和 HMW-PAHs 在总 PAHs 中所占的比例都随改旱田年限的增长而增大。

3) 石油污染土壤中,总 PLFAs、G⁺ 细菌、G⁻ 细菌随土壤 TPH 含量的增大而增大,而与 PAHs 相关不显著。

4) 用 PLFA 和 PCR-DGGE 两种方法分析土壤微生物群落结构,得到的结果一致:石油污染土壤中的微生物群落结构主要与其相对地理位置有关;当污染物的浓度达到一定程度时,土壤微生物群落结构也会发生明显的改变。

参考文献

- [1] Bai Q, Göttinger A, Zelles L. 2000. Characterization of microbial consortia in paddy rice soil by phospholipid analysis. *Microbial Ecology*, **39**: 273-281
- [2] Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**: 911-917
- [3] Boonchan S, Britz ML, Stanley GA. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(3): 1007-1010
- [4] Chen X-D (陈晓东), Chang W-Y (常文越), Feng X-B (冯晓斌), et al. 2002. Primary study on the approach of farmland ecological resume in Shen-Fu irrigation area. *Environmental Protection Science* (环境保护)

- 科学), **28**(2): 33–35 (in Chinese)
- [5] Coates JD, Ellis DJ, Elizabeth L. 1998. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 1504–1509
- [6] Division of Agro-Chemistry, Soil Science Society of China(中国土壤学会农业化学专业委员会). 1983. Normal Analysis Methods of Soil and Agro-Chemistry. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- [7] Frostegård Å, Tunlid A, Bååth. 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*, **14**: 156–163
- [8] Green CT, Scow KM. 2000. Analysis of phospholipids fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeology Journal*, **8**: 126–141
- [9] Guerin TF. 1999. The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) residues from a clay soil using sonication and a soxhlet procedure: A comparative study. *Journal of Environmental Monitoring*, **1**: 63–67
- [10] Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, et al. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**: 6955–6959
- [11] Liang C-F (梁传福), Jiang R-S (姜若松), Wei H (魏 虹), et al. 1998. The effect on the Shenfu irrigation area by the wastewater from oil plant in Fushun. *Liaoning Agricultural Science* (辽宁农业科学), (3): 53–54 (in Chinese)
- [12] Liu R-T (刘润堂), Xu J-Z (许建中). 2002. Sewage water irrigation problems and solutions in China. *China Water Resources* (中国水利), (10): 123–125 (in Chinese)
- [13] Smalla K, Wachtendorf U, Hener H, et al. 1998. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 1220–1225
- [14] Song Y-F (宋玉芳), Chang S-J (常士俊), Li L (李利), et al. 1997. Accumulation and dynamic change of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wastewater irrigated soils. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **8**(1): 93–98 (in Chinese)
- [15] Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**: 503–549
- [16] Van Hamme JD, Singh A, Ward OP, et al. 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *Journal of Microbiological Methods*, **32**: 133–154
- [17] Vestal JR, White DC. 1989. Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities. *Bioscience*, **39**: 535–541
- [18] White DC, Davis WM, Nickels JS, et al. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia*, **40**: 51–62
- [19] Yuan W (袁伟), Guo Z-L (郭宗楼), Yuan H (袁华). 2005. Analyses of the research status and the application of sewage water irrigation. *China Rural Water and Hydropower* (中国农村水利水电), (6): 19–21 (in Chinese)
- [20] Zelles L, Bai QY. 1993. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biology and Biochemistry*, **25**: 495–507
- [21] Zelles L, Bai QY, Beck T, et al. 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **24**: 317–323
- [22] Zelles L, Bai QY, Rackwitz R, et al. 1995. Determination of phospholipid and lipopolysaccharide-derived fatty acids as an estimate of microbial biomass and community structures in soils. *Biology and Fertility of Soils*, **19**: 115–123
- [23] Zhang D-G (张大庚), Yi Y-L (依艳丽), Zheng X-L (郑西来). 2003. Effect of petroleum groups on soil and rice in the Shen-Fu irrigation region. *Chinese Journal of Soil Science* (土壤通报), **34**(4): 333–336 (in Chinese)
- [24] Zheng X-L (郑西来), Qiu H-X (邱汉学), Jing J (荆静), et al. 2000. Numerical modeling on elimination of oil-polluted soils in Shenyang-Fushun irrigation area. *Journal of China University of Geosciences* (Earth Science) (中国地质大学学报 · 地球科学版), **25**(5): 462–466 (in Chinese)
- [25] Zhong W-H (钟文辉), Cai J-C (蔡祖聪). 2004. Methods for studying soil microbial diversity. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), **15**(5): 899–904

作者简介 任瑞霞,女,1980年生,硕士研究生。主要从事环境微生物学领域研究。Tel:024-83970370; E-mail: renruixia4@ hotmail. com

责任编辑 梁仁禄