

1,3-二氯苯污染底泥的零价铁修复对微生物群落结构的影响

王新新^{1,2}, 张颖¹, 韩斯琴¹, 李慧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, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:通过采用零价铁修复 1,3-二氯苯污染底泥,结合变性梯度凝胶电泳(DGGE)和磷脂脂肪酸(PLFA)技术分析了零价铁修复对底泥微生物群落结构的影响。结果表明,零价铁对底泥中 1,3-二氯苯具有较好的去除效果,培养 13 d 后去除率可达 70.4%,较未加零价铁的对照处理高 50.8%。DGGE 指纹图谱分析表明:1,3-二氯苯刺激了底泥中耐受性较高的假单胞菌的增殖;零价铁修复使增殖的耐受菌群的量减少,敏感菌群的量增多,并使底泥微生物的 Shannon 多样性指数恢复至未污染对照水平。PLFA 指纹图谱分析表明:尽管零价铁修复并未恢复底泥中任何一种 PLFA 的量,但是却恢复 G⁺细菌的量至未污染对照水平。

关键词:零价铁;底泥;1,3-二氯苯;微生物种群结构;变性梯度凝胶电泳;磷脂脂肪酸

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)01-0173-06

Impact of the Remediation of 1,3-Dichlorobenzene Contaminated Sediments on Microbial Communities Structure Using Zero-Valent Iron

WANG Xin-xin^{1,2}, ZHANG Ying¹, HAN Si-qin¹, LI Hui¹

(1. Key Laboratory of Terrestrial Ecological Processes, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The remediation of 1,3-dichlorobenzene contaminated sediments using zero-valent iron (ZVI) was studied, and its effect on the microbial community structures were monitored by using 16S rDNA PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and phospholipids fatty acid (PLFA) analysis. The results showed that ZVI could remove 1,3-dichlorobenzene effectively, with the removal efficiency 70.4% within a 13 day period, higher than the treatment without ZVI by 50.8%. DGGE fingerprint profiles showed that the 1,3-dichlorobenzene contamination resulted in a significant increase in *pseudomonas* spp. according to the sequence analysis using BLAST. The bacteria sensitive to 1,3-dichlorobenzene increased and bacteria resistant to 1,3-dichlorobenzene decreased, which may correlate to the decreasing concentration of 1,3-dichlorobenzene using ZVI. Shannon's index of diversity (H') calculated from DGGE fingerprint data was restored to the control level by ZVI. PLFA fingerprint profiles showed that the PLFA was mainly composed of even-numbered unsaturated fatty acid, while the contents of odd-numbered saturated fatty acid and even-numbered saturated fatty acid were relatively small in amount. Gram-positive bacteria, which were calculated according to the amount of a-15:0, i-15:0 and i-17:0, were significantly restored to the control level by ZVI, although none of the PLFA was restored to the control level.

Keywords: zero-valent iron (ZVI); sediments; 1,3-dichlorobenzene; microbial community structure; DGGE; PLFA

1,3-二氯苯是一种氯代芳香烃化合物,工业上用途广泛,是制造多种染料和农药的重要中间体。由于

在生产和使用过程中的废水排放和意外泄漏等原因,成为底泥沉积物中常见的污染物之一^[1]。1,3-二氯苯在自然环境下不易降解,对生态系统尤其对人类健康具有潜在危害,从而逐渐受到各国研究人员的关注^[2]。目前环境中 1,3-二氯苯的降解技术主要包括光催化降解、电化学方法和微生物方法等^[3-4]。零价铁(zero-valent iron, ZVI)技术是国际上新兴的一种污染修复技术,该技术已经成功地应用于土壤和地下水污染的

收稿日期:2008-04-09

基金项目:国家自然科学基金项目(30670391);国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418505)

作者简介:王新新(1983—),男,山东德州人,硕士研究生,主要从事环境修复技术和环境微生物学方面的研究。

E-mail: wangxx2005@tom.com

通讯作者:张颖 E-mail: yzhang@iae.ac.cn

修复^[5-6],采用该技术脱氯降解氯代烃化合物的研究也有较多报道^[7-8]。然而未见有采用零价铁技术对底泥1,3-二氯苯污染修复的研究报道,也未见有学者对零价铁修复过程中微生物群落结构的变化进行探讨。本研究以还原铁粉作为反应介质脱氯降解底泥中1,3-二氯苯,应用变性凝胶梯度电泳(Denatured Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)技术和磷脂脂肪酸(Phospholipids Fatty Acid, PLFA)技术,分析了零价铁修复对底泥微生物群落结构的影响,以期有效控制低泥1,3-二氯苯污染提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:还原铁粉,纯度98%,过200目筛,0.5 mol·L⁻¹盐酸洗去表面油污,氮气保护下烘干备用。柠檬酸、柠檬酸钠、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、去离子甲酰胺、硝酸银等均为分析纯。1,3-二氯苯、氯仿、甲醇、甲苯、冰乙酸、丙酮、正己烷等均为色谱纯。

仪器:LDZX-40型自动高温灭菌锅、HZQ-C型气浴恒温摇床、PTC-100TM型PCR仪、GENIE-2型旋涡混合器、5415-C型高速离心机、DYY-6B型电泳仪、Bio-Rad凝胶成像系统、D-Code system DGGE电泳仪、12孔氮气吹干仪、Agilent 6890+气相色谱仪等。

1.2 实验设计

供试底泥于2006年10月采自辽河流域浑河沈阳段。采用100 mL培养瓶,每瓶均加入10 g底泥,90 mL蒸馏水。设置4个处理,每个处理3个重复:Ⅰ CK(无1,3-二氯苯污染);Ⅱ D(1,3-二氯苯污染,浓度500 mg·kg⁻¹);Ⅲ D+Fe(添加零价铁修复1,3-二氯苯污染,500 mg·kg⁻¹ 1,3-二氯苯+还原铁粉0.2 g);Ⅳ 灭菌+D+Fe(底泥灭菌后添加零价铁修复1,3-二氯苯污染,500 mg·kg⁻¹ 1,3-二氯苯+还原铁粉0.2 g)。每瓶均通入高纯氮气10 min驱除氧气以保证底泥的厌氧环境。用包有聚四氟乙烯膜的橡胶塞密封瓶口,25℃恒温摇床120 r·min⁻¹避光培养。参照水质氯化物的测定国家标准(GB11896—1989),采用硝酸银滴定法测定1,3-二氯苯脱氯产生的氯离子含量,由此计算其去除率。

1.3 底泥总DNA提取及PCR扩增

采用改进的化学裂解法从底泥样品中提取总DNA^[9-10]。采用TaKaRa agarose gel DNA凝胶回收试剂盒纯化粗提的总DNA。以纯化后的细菌总DNA为模板,选取细菌通用引物扩增16S rDNA V1~V3高变

区^[11-12]。引物63f为5'-CAGGCCTAACACATG-CAAGTC-3',引物518r为5'-ATTACCGCGGCT-GCTGG-3',在引物63f的5'端连有一段大约40bp富含GC的序列5'-CGCCCCGCCGCGCCCCGCGCC-CGGCCCCGCCGCCCCGCCCC-3',用以提高DGGE的分离效果。扩增反应体系(50 μL)包括DNA模板2 μL、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引物各1 μL、5U·μL⁻¹ Taq酶0.25 μL、灭菌超纯水36.75 μL。扩增程序为94℃预变性5 min,94℃变性1 min,65℃退火1 min,72℃延伸2 min,每个循环退火温度降低0.5℃直至55℃,共35个循环,最后72℃延伸8 min。采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR反应产物。

1.4 PCR产物的DGGE分析

DGGE分析应用Bio-Rad D-Code Universal Mutation System DGGE电泳系统,聚丙烯酰胺凝胶浓度梯度为6%~12%,变性剂浓度梯度为40%~75%(100%变性剂组成为7 mol·L⁻¹尿素和40%去离子甲酰胺)。每孔加入PCR产物20 μL。在60℃、1×TAE、80 V条件下电泳16 h。用0.01%GenefinderTM染料染色20 min。凝胶成像系统(Gel Doc 2000TM Chemi Doc™ Gel Documentation Systems, Bio-Rad)观察样品的电泳条带并拍照,用图形分析软件Quantity One 4.2.3对图谱进行分析。计算Shannon多样性指数:

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \times \ln P_i$$

其中 $P_i = n_i/N$, n_i 为第*i*条带的峰密度, N 为该条带所在泳道所有条带(S)峰密度之和。

切下DGGE凝胶上的目的条带置于20 μL灭菌超纯水中,4℃放置过夜。取DNA浸出液作为模板,PCR扩增,纯化,送至上海生工测序。序列输入NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库进行BLAST(Basic local alignment search tools)分析,同时用RDP(Ribosomal Database Project)数据库的Sequence Match分析进行验证。

1.5 PLFA分析

使用White等改进的Bligh/Dyer法通过氯仿-甲醇-柠檬酸缓冲液振荡提取底泥总脂^[13],用Frostegard等改进的方法通过硅胶柱层析分离得到磷脂脂肪酸^[14],甲酯化溶于正己烷,加十九烷甲酯(19:0 Me. Nonadecanoate)作为内标。用Agilent 6890+气相色谱仪测定,石英毛细管色谱柱HP5(30 m×0.32 mm×0.25 μm),氢火焰离子检测器(FID)。升温程序为:进样口

温度 250 ℃, 进样量 1 μL, 分流比 10:1; 起始柱温 140 ℃, 保持 3 min; 以 4 ℃·min⁻¹ 的速度升温至 230 ℃, 保持 2 min; 再以 2 ℃·min⁻¹ 的速度升温至 250 ℃, 保持 2 min; 最后以 10 ℃·min⁻¹ 的速度升温至 300 ℃, 保持 10 min。各脂肪酸的识别、定量和命名分别参照 Bacterial Acid Methyl Esters CP Mix (BAME 24,47080-U; Supelco)、Supelco 37 Component FAME Mix (FAME 37,47885-U; Supelco) 和相关报道^[15]。

1.6 统计分析

采用 spss13.0 for windows 统计软件对所测试验数据进行方差分析 (analysis of variance, ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 零价铁修复 1,3-二氯苯污染底泥

应用还原铁粉作为反应介质对底泥中 1,3-二氯苯进行脱氯降解, 结果如图 1 所示。底泥中起始浓度为 500 mg·kg⁻¹ 的 1,3-二氯苯在零价铁作用下逐渐脱氯降解, 去除率不断升高。培养 13 d 后, 添加零价铁修复的 D+Fe 处理中 1,3-二氯苯的去除率为 70.4%, 较未添加零价铁的 D 处理高 50.8%, 这说明零价铁对 1,3-二氯苯具有较好的催化脱氯能力。Xu 等^[16]在对 Pd/Fe 催化二氯苯脱氯的研究中也有类似的报道。氯代烃化合物的脱氯反应可以用下面的方程式表示: $\text{Fe}^0 + \text{H}_2\text{O} + \text{RCl}_x \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{RHCl}_{x-1} + \text{Cl}^- + \text{OH}^-$ 。培养 13 d 后, 灭菌+D+Fe 处理中 1,3-二氯苯的去除率为 52.9%, 较 D+Fe 处理低 17.5%, 说明底泥中的土著微生物可以降解 1,3-二氯苯。在没有添加零价铁的 D 处理中, 去除率也逐渐升高, 这进一步证明了土著微生物的降解能力。Lee S 等^[17]报道了土壤中的某些微生物具有降解 1,3-二氯苯的能力, 推测底泥中也有能够降解 1,3-二氯苯的微生物。

2.2 DGGE 分析

提取各处理底泥样品总 DNA, 利用细菌通用引物 63f-GC 和 518r 进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行

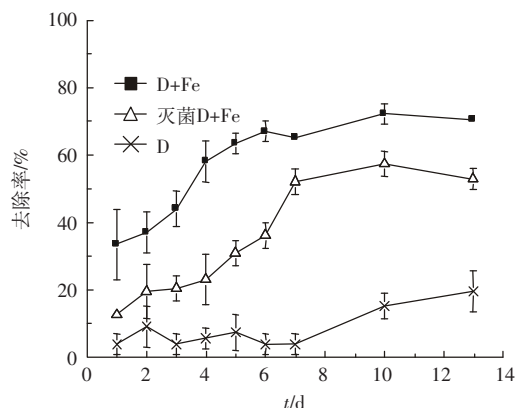


图 1 零价铁对底泥中 1,3-二氯苯的去除效果

Figure 1 Removal of 1,3-dichlorobenzene in sediments by ZVI
(The data points indicate the means, error bars=±1SE.

The same as bellow)

DGGE 分析, 结果如图 2 所示。对 DGGE 凝胶中 6 条特异性条带进行切胶测序, 将所得序列与 GenBank 数据库中的已登录序列进行同源性分析, 结果如表 1 所。

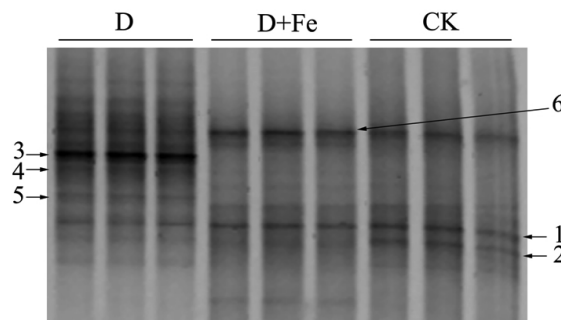


图 2 各处理的 PCR-DGGE 图谱

Figure 2 DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA
V1-V3 gene fragments from sediment samples

CK 处理的带型代表未受 1,3-二氯苯污染的底泥微生物群落结构。其中条带 1、2、6 为优势条带。条带 1 在各处理中均存在, 说明各处理对此条带影响不大。NCBI 数据库中与条带 1 同源性最高的是 *Pseudomonas* sp. Pi3-8 (97%), 来源于日本海的一株嗜冷

表 3 DGGE 切胶回收条带序列分析

Table 3 Sequence analysis of bands excised from DGGE gels

条带	Genbank 数据库中的同源序列(登录号)	来源	相似性/%	登录号
条带 1	<i>Pseudomonas</i> sp. Pi 3-8 (AB365065)	海冰	97%	EU294332
条带 2	Uncultured bacterium clone NGA37 (EF613956)	稻田土	98%	EU360972
条带 3	<i>Pseudomonas</i> sp. TRM24 (AM911673)	根际	97%	EU360974
条带 4	Gamma proteobacterium ISSDS-867 (EF634040)	农田土	98%	EU360975
条带 5	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> strain P17 (AY972173)	污泥	99%	EU360973
条带 6	Uncultured gamma proteobacterium clone NOW2.WWL (AY043694)	森林土	97%	EU360976

菌。

D 处理的带型代表受 1,3-二氯苯污染的底泥微生物群落结构,与 CK 相比发生了较大的变化。出现了 CK 中没有的条带(如条带 3、4、5),推测它们所代表的微生物对 1,3-二氯苯具有一定的耐受能力。条带 3 在 D 处理中的亮度最高,为优势条带,这说明其所代表的微生物为优势种。NCBI 中与条带 3 同源性最高的是 *Pseudomonas sp.* TRM24(97%),分离于水稻根际。与条带 4 同源性最高的是 *Gamma proteobacterium* ISSDS-867(98%),分离于农田土。与条带 5 同源性最高的是 *Pseudomonas plecoglossicida* strain P17(99%),分离于活性污泥^[18]。聚类分析表明条带 3、4、5 均属于假单胞菌。Thompson 等^[19]在对 1,2-二氯苯对土壤微生物的影响的研究中报道了一定浓度的 1,2-二氯苯可以刺激假单胞菌的增殖。关于假单胞菌降解 1,2-二氯苯和 1,4-二氯苯的研究也有报道^[20-22],对 1,3-二氯苯的降解报道却比较罕见,然而本实验 DGGE 图谱显示假单胞菌对 1,3-二氯苯也具有耐受能力,至于是否具有降解能力有待进一步研究。D 处理使 CK 中的部分条带减弱(如条带 2、6),推测它们所代表的微生物可能对 1,3-二氯苯比较敏感。NCBI 中与条带 2 同源性最高的是 *Uncultured bacterium* clone NGA37,分离于稻田土壤。与条带 6 同源性最高的是 *Uncultured gamma proteobacterium* clone NOW2. WWL,该克隆是在对森林土壤微生物多样性的研究获得的^[23]。

D+Fe 处理使 D 处理中部分条带消失(如条带 3、4、5),使部分条带亮度升高(如条带 6)。零价铁修复与 1,3-二氯苯的耐受菌群的减少和敏感菌群的增多存在一定正相关。其原因可能是零价铁修复降低了 1,3-二氯苯浓度,从而导致 1,3-二氯苯耐受菌群的适应性减少,敏感菌群迅速增殖成为群落中的优势菌群。

根据 DGGE 图谱各条带峰面积计算各处理底泥的微生物 Shannon 多样性指数(H'),结果如图 3 所示。与 CK($H'=2.868$)相比,添加 1,3-二氯苯的 D 处理的多样性指数($H'=3.078$)显著增大。分析其原因可能是 1,3-二氯苯污染改变了微生物种群之间的竞争关系,使繁殖最快的优势种群受到抑制,减轻了其他种群的竞争压力从而使其迅速增殖,表现为多样性指数的升高。而采用零价铁修复的 D+Fe 处理的多样性指数($H'=2.822$)与 CK 没有显著差异,这说明零价铁修复可使底泥微生物的多样性指数恢复至未污染对

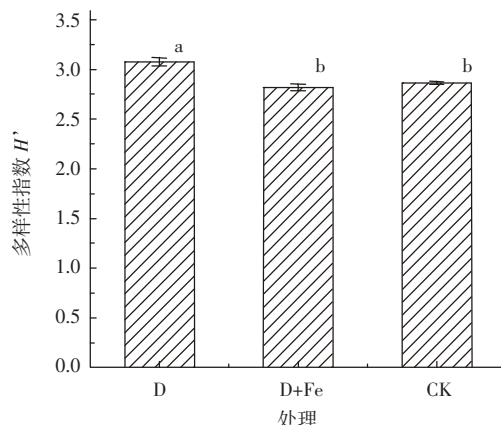


图 3 不同处理底泥的微生物 Shannon 多样性指数(H')

Figure 3 Shannon's index of diversity (H') in sediment samples with different treatments (Bars marked with the same letter are not significantly different at $P<0.05$)

照水平,这对底泥微生物生态的恢复具有重要意义。

2.3 PLFA 分析

PLFA 是构成微生物细胞膜的重要组成部分,具有对环境因素敏感、细胞死亡后迅速降解等特点^[24],可以作为活体微生物的生物标记物,因而逐渐发展成为微生物生态学研究的一种新技术。利用该技术分析不同处理底泥微生物群落的 PLFA 组成,结果如图 4 所示。检测到的 PLFA 共计 13 种,其中偶数不饱和脂肪酸的相对含量最高,为 43.0%,是各处理中含量最高的 PLFA 种类;其次是奇数饱和脂肪酸,相对含量为 30.7%;再次是偶数饱和脂肪酸,相对含量为 25.2%。在各种 PLFA 中,16:0、16:1 ω 9、17:0、18:1 ω 9c 占总量的 59.2%,为优势 PLFA。CK 处理检测到了全部的 13 种 PLFA。D 处理使 17:0、18:0、18:1 ω 9c 的量增多,使 13:0、14:0、18:2 ω 9,1、cy17:0、i-17:0 的量减少,这表明它们所代表的微生物对 1,3-二氯苯污染的反应并不相同:敏感菌群减少,耐受菌群增多。D+Fe 处理使 D 处理中 16:1 ω 9、18:1 ω 9c、i-17:0 的量增多,但并未使任何一种 PLFA 恢复到未污染对照水平。

不同微生物种属具有不同的 PLFA 组成,目前积累的有关微生物脂肪酸组成的大量数据,成为区分微生物种属的有力工具^[25-26]。但是目前只有少数几种 PLFA 对某些特定种属的微生物具有特异性^[27-28],不同微生物种属之间存在 PLFA 的重叠,并且环境中的脂类干扰 PLFA 的测定^[29]。这些缺陷都限制了 PLFA 技术在微生物群落结构分析上的应用。尽管如此,PLFA 方法对微生物类群的区分仍十分有效。本文采用 a-

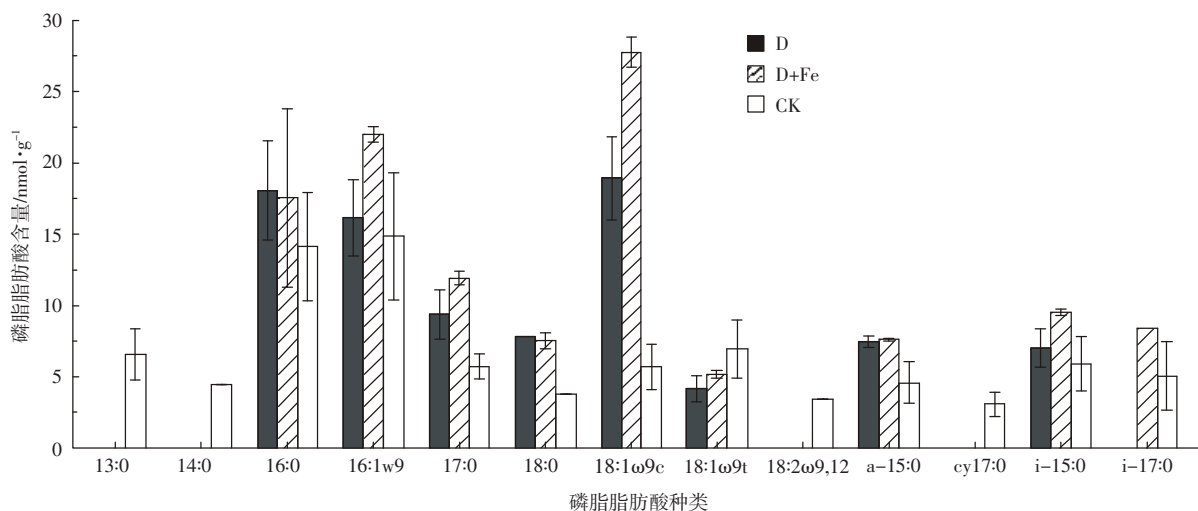


图 4 不同处理底泥微生物群落的 PLFA 组成

Figure 4 Composition of PLFA in sediment samples with different treatments

15:0、i-15:0、i-17:0 估算革兰氏阳性细菌 (G^+), 16:1 ω 9、cy17:0、18:1 ω 9c、18:1 ω 9t 估算革兰氏阴性细菌 (G^-), 18:2 ω 9,12、18:1 ω 9c、18:1 ω 9t 估算真核生物, 14:0、16:0、18:0 估算微生物量^[30-32], 结果如图 5 所示。统计分析表明: 虽然各处理对 G^- 细菌、真核生物、微生物量没有显著影响, 但是却对 G^+ 细菌的量有显著影响 ($P < 0.05$)。D 处理中 G^+ 细菌的量 ($12.0 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 较 CK ($30.5 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 显著减少, 这表明 1,3-二氯苯污染减少了 G^+ 细菌的量。Thompson 等^[33]在对土壤 1,2-二氯苯污染的研究中发现, 单一 1,2-二氯苯污染导致 G^+ 细菌的减少, 特别是节杆菌 (*Arthrobacter*)、微球菌 (*Micrococcus*) 等, 本研究结果也对此给予部分支持。D+Fe 处理中 G^+ 细菌的量 ($25.5 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$) 较 D 处理显著增多, 并且与 CK 无显著差异, 这说明零价铁修复

使 1,3-二氯苯污染底泥中 G^+ 细菌的量得以恢复。

3 结论

(1) 零价铁修复对底泥中 1,3-二氯苯具有较好的去除效果。

(2) 采用 DGGE 技术分析零价铁修复 1,3-二氯苯污染对底泥微生物群落结构的影响, 结果表明, 1,3-二氯苯污染刺激了底泥中耐受性较高的假单胞菌的增殖; 零价铁修复使增殖的耐受菌群的量减少, 敏感菌群重新出现; 根据 DGGE 图谱计算得出的微生物多样性指数恢复至未污染对照水平。

(3) PLFA 分析结果表明, 尽管零价铁修复并未恢复底泥中任何一种 PLFA 的量, 但是根据相关 PLFA 估算得出的 G^+ 细菌的量却恢复至未污染对照水平。

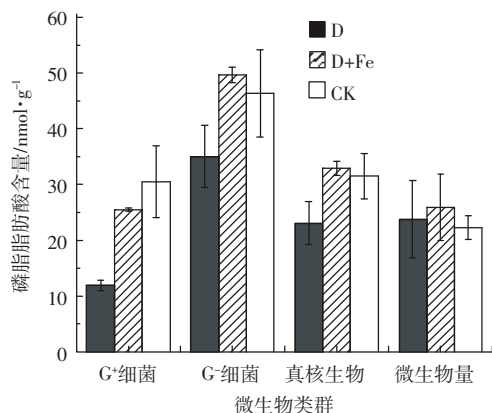


图 5 各处理微生物类群的 PLFA 含量

Figure 5 Content of PLFA in different microbial groups in sediment samples with different treatments

参考文献:

- [1] Iannuzzi T J, Armstrong T N, Thelen J B, et al. Characterization of chemical contamination in shallow-water estuarine habitats of an industrialized river, Part 1: Organic compounds [J]. *Soil and Sediment Contamination*, 2005, 14(1): 13-33.
- [2] McCauley P T, Robinson M, Daniel F B, et al. Toxicity studies of 1,3-dichlorobenzene in Sprague-Dawley rats [J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 1995, 18(2-3): 201-221.
- [3] Lichtenberger J, Amiridis M D. Deactivation of $\text{V}_2\text{O}_5/\text{TiO}_2$ catalysts during the oxidation of meta-dichlorobenzene in the presence of methyl-naphthalene [J]. *Catalysis Today*, 2004, 98(3): 447-453.
- [4] Wang L, Zhou Q, Zhang B S, et al. The biodegradation of 1,3-dichlorobenzene by an adapted strain *Bacillus cereus* PF-11 derived from town-gas industrial effluent [J]. *Journal of Environmental Science*

- and Health, Part A, 2003,38(9):1837-1848.
- [5] Mu Yang, Yu Hanqing, Zheng Jiachuan, et al. Reductive degradation of nitrobenzene in aqueous solution by zero-valent iron[J]. *Chemosphere*, 2004,54(7):789-794.
- [6] Xu Yinhuai, Zhao Dongye. Reductive immobilization of chromate in water and soil using stabilized iron nanoparticles[J]. *Water Research*, 2007,41(10):2101-2108.
- [7] Liao C J, Chung T L, Chen W L, et al. Treatment of pentachlorophenol-contaminated soil using nano-scale zero-valent iron with hydrogen peroxide [J]. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2007,265 (1-2): 189-194.
- [8] Zhang Weihua, Quan Xie, Zhang Zhuoyong. Catalytic reductive dechlorination of p-chlorophenol in water using Ni/Fe nanoscale particles[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007,19(3):362-366.
- [9] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1999,65 (11): 4715-4724.
- [10] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1996,62(2): 316-322.
- [11] Geets J, Borremans B, Vangronsveld J, et al. Molecular monitoring of SRB community structure and dynamics in batch experiments to examine the applicability of in situ precipitation of heavy metals for groundwater remediation[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2005, 5(3):149-163.
- [12] Yu Z, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2004,70(8):4800-4806.
- [13] White D C, Flemming C A, Leung K T, et al. In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1998,32(2):93-105.
- [14] Frostegard A, Tunlid A, Baath E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1991,14(3):151-163.
- [15] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1999,29(2):111-129.
- [16] Xu Xinhua, Zhou Hongyi, Wang Dahui. Structure relationship for catalytic dechlorination rate of dichlorobenzenes in water [J]. *Chemosphere*, 2005,58(11):1497-1502.
- [17] Lee S, Kommalapati R R, Valsaraj K T, et al. Bioavailability of reversibly sorbed and desorption-resistant 1,3-dichlorobenzene from a louisiana superfund site soil[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2004,158(1):207-221.
- [18] De Gelder L, Vandecasteele F P J, Brown C J, et al. Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-1{beta} plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2005,71(9):5309-5317.
- [19] Thompson I P, Bailey M J, Boyd E M, et al. Concentration effects of 1,2-dichlorobenzene on soil microbiology[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999,18(9):1891-1898.
- [20] Ziajova M, Liakopoulou-Kyriakides M. Comparison of cometabolic degradation of 1,2-dichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus xylosus* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007,40(5): 1244-1250.
- [21] Leahy J G, Tracy K D, Eley M H. Degradation of volatile hydrocarbons from steam-classified solid waste by a mixture of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria[J]. *Biotechnology Letters*, 2003,25(6):479-483.
- [22] Leahy J G, Tracy K D, Eley M H. Degradation of mixtures of aromatic and chloroaliphatic hydrocarbons by aromatic hydrocarbon-degrading bacteria[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003,43(2):271-276.
- [23] Axelrood P E, Chow M L, Radomski C C, et al. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002,48(7):655.
- [24] Harvey H R, Fallon R D, Patton J S. The effect of organic matter and oxygen on the degradation of bacterial membrane lipids in marine sediments[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1986,50(5):795-804.
- [25] Zelles L. Identification of single cultured microorganisms based on their whole-community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure[J]. *Chemosphere*, 1999,39(4):665-682.
- [26] Guckert J B, Ringelberg D B, White D C, et al. Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the proteobacteria [J]. *Journal of General Microbiology*, 1991,137(11): 2631.
- [27] Fang J, Barcelona M J. Structural determination and quantitative analysis of bacterial phospholipids using liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1998,33(1):23-35.
- [28] Sakamoto K, Iijima T, Higuchi R. Use of specific phospholipid fatty acids for identifying and quantifying the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004,36(11):1827-1834.
- [29] Dowling N, Widdel F, White D. Phospholipid ester-linked fatty acid biomarkers of acetate-oxidizing sulphate-reducers and other sulphide-forming bacteria [J]. *Journal of General Microbiology*, 1986,132(7): 1815-1825.
- [30] Mummey D L, Stahl P D, Buyer J S. Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation [J]. *Applied Soil Ecology*, 2002,21(3):251-259.
- [31] Frostegard A, Baath E, Tunlid A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993,25(6):723-730.
- [32] Bai Q, Gattinger A, Zelles L. Characterization of microbial consortia in paddy rice soil by phospholipid analysis[J]. *Microbial Ecology*, 2000,39(4):273-281.
- [33] Thompson I P, Bailey M J, Ellis R J, et al. Response of soil microbial communities to single and multiple doses of an organic pollutant[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998,31(1):95-105.