

含油污泥的堆肥处理对微生物群落结构的影响

王新新, 韩 楨, 白志辉, 庄国强*

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要:采用堆肥方法处理含油污泥,评价堆肥处理对含油污泥中石油烃的去除效果,并采用 Biolog 方法和构建 16S rRNA 基因克隆文库的方法对处理过程中微生物碳源利用特征和微生物群落结构进行了研究。结果表明,含油污泥经过 90 d 的堆肥处理,石油烃降解率达 $53.3\% \pm 9.5\%$,显著高于对照处理。堆肥处理可以显著促进石油烃降解,是一种处理含油污泥的有效措施。Biolog 分析结果表明,堆肥处理的孔的平均颜色变化率(AWCD)显著高于对照处理,堆肥处理提高了土壤微生物代谢活性。主成分分析结果表明,对照处理和堆肥处理的微生物碳源利用特征明显不同,堆肥处理改变了含油污泥中微生物的代谢功能特征。对照处理和堆肥处理的 16S rRNA 基因克隆文库之间存在显著差异,对照处理的优势类群是 *γ-Proteobacteria*,堆肥处理的优势类群是 *Bacteroidetes*,堆肥处理显著改变了含油污泥中的微生物群落结构。*Marinobacter* 和 *Alcanivorax* 是对照处理中的优势菌,可能与石油烃的自然降解过程有关,而 *Pusillimonas* 和 *Agrobacterium* 可能对堆肥处理中石油烃的降解起一定作用。

关键词:含油污泥;堆肥处理;微生物群落结构;Biolog;16S rRNA 基因克隆文库

中图分类号:S141.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)07-1413-09

Impact of the Treatment of Oily Sludge on Microbial Communities Structure by Composting

WANG Xin-xin, HAN Zhen, BAI Zhi-hui, ZHUANG Guo-qiang*

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: The degradation dynamics of total petroleum hydrocarbon (TPH) and the structure of microbial communities were investigated in the process of composting oily sludge. The removal efficiency of TPH in oily sludge was $53.3\% \pm 9.5\%$ with compost treatment after 90 d incubation, which was significantly higher than that with control treatment ($P < 0.05$). Average well color development (AWCD) of Biolog ECO plates showed that there were significant differences of carbon substrate utilization patterns between two treatments ($P < 0.05$). The high AWCD value of compost treatment suggested that the soil microbial activity was enhanced by composting, which might be responsible for the enhanced degradation of petroleum hydrocarbon. The principal components analysis of the Biolog data indicated that two treatments were clearly separated from each other. Furthermore, 16S rRNA gene clone library analysis indicated that dominant populations of microbial community in the control and composting treatment were *γ-Proteobacteria* and *Bacteroidetes* respectively. *Marinobacter* and *Alcanivorax* which were abundant in the control treatment might naturally monitor degradation of petroleum hydrocarbon, and *Pusillimonas* and *Agrobacterium* which were rich in the composting treatment might also involve in the degradation of petroleum hydrocarbon.

Keywords: oily sludge; composting; microbial community structure; Biolog; 16S rRNA gene clone library

含油污泥是由大量石油烃、泥砂和水等物质组成的一种复杂的含油固体废弃物,是石油工业开采和转运过程产生的重要污染物之一,具有显著的生

态毒性^[1],特别是其中所含的大量多环芳烃等污染物具有“三致”效应,严重危害人体健康,已被世界上多个国家列为优先控制污染物^[2]。含油污泥的环境风险极大,急需有效的处理方式。目前,含油污泥的处理方式主要有溶剂萃取法、焚烧法和固化法等^[3]。尽管这些物化处理具有处理速度快等优点,但是同时也具有处理费用高昂和容易造成环境二次污染等诸多缺陷。与物化处理相比,生物处理方法具有费用低廉、处理效果好、无二次污染等优点,受到各国研究人

收稿日期:2011-01-04

基金项目:中国科学院知识创新工程(kzcx1-yw-06-03);北京市科技计划(D101105046410004);中国科学院生态环境研究中心知识创新工程(ZXPP2009113001)

作者简介:王新新(1983—),男,博士研究生,主要从事环境微生物学研究。E-mail:wangxx200899@163.com

* 通讯作者:庄国强 E-mail:gqzhuang@rcees.ac.cn

员的重视^[4-6]。采用堆肥方法处理含油污泥是行之有效的生物处理方法之一^[7]。然而目前采用该方法处理含油污泥的研究多集中在降解条件优化方面^[8-9],对堆肥处理中的微生物群落结构变化罕见报道,对微生物在降解过程中起的作用认识十分有限。

本研究采用堆肥方法处理含油污泥,动态监测总石油烃(total petroleum hydrocarbons,TPH)含量变化,以了解该处理对含油污泥中石油烃的降解效果。同时采用 Biolog 微生物自动分析系统和 16S rRNA 基因克隆文库分析方法对微生物群落结构变化进行了研究,以期获得微生物多样性的信息,为了解含油污泥堆肥处理的微生物生态功能提供线索。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试含油污泥采自某油田。采用常规分析方法^[10]分析含油污泥的全氮、有机质、碱解氮、有效磷、有效钾、含水量和 pH 值等基本理化性质,结果如表 1 所示。

表 1 供试含油污泥的基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the oily sludge

项目	含量
全氮/g·kg ⁻¹	1.2±0.1
有机质/g·kg ⁻¹	210.0±8.5
碱解氮/mg·kg ⁻¹	45.7±5.2
有效磷/mg·kg ⁻¹	10.8±0.1
有效钾/mg·kg ⁻¹	336.0±48.1
含水量/%	30.4±2.9
pH	7.8±0.1
TPH 含量/%	12.3±0.5

1.2 试验方案

设置堆肥和对照两个处理。堆肥处理(COM):将 15 kg 含油污泥、10 kg 麦麸、5 kg 棉花秸秆、2 kg 牛粪和 1 kg 尿素放入塑料箱中(长 60 cm,宽 45 cm,高 45 cm),混合均匀,调节堆体含水量至 55%。堆体覆盖塑料薄膜,以保温保湿。堆肥开始的第 1 周每 3 d 翻堆 1 次,之后每周翻堆 1 次。以自然堆放的含油污泥做为对照处理(CK)。分别于第 0、30、90 d 采样。样品分为两部分:一部分风干,用于总石油烃含量分析;另一部分保存于 4℃冰箱,用于 Biolog 分析和克隆文库分析。

1.3 TPH 含量分析

TPH 含量采用重量法测定^[4]。称取 10 g 风干样品,与 1 g 无水 Na₂SO₄混匀。采用 100 mL 正己烷、二

氯甲烷和氯仿分别连续超声浸提 20 min,过滤收集上清液。用无水 Na₂SO₄除水,置于已知重量的烧杯中,室温挥发至恒重,重量法测定 TPH 含量。

1.4 Biolog 分析

采用 Biolog 微生物自动分析系统(Biolog, Hayward, CA, USA)分析土壤微生物碳源利用特征。称取相当于 10 g 烘干土壤的新鲜土壤,加入 100 mL 无菌的 0.145 mol·L⁻¹的 NaCl 溶液,180 r·min⁻¹摇床振荡 20 min。静置 5 min,取上层土壤浸提液,用上述 NaCl 溶液梯度稀释至 1 000 倍。用 8 通道加样器将稀释液加入到 Biolog Eco 微孔板中,每孔添加 150 μL。25℃恒温培养,每隔 24 h 读取 590 nm 波长下的吸光值,培养时间共 240 h。

孔的平均颜色变化率(average well color development,AWCD)的计算方法如下:

$$AWCD = \sum (C_i - R) / n$$

式中 C_i 为第 i 孔的吸光值, R 为对照孔的吸光值, n 为 Biolog 微孔板的碳源种类数。Biolog ECO 微孔板有 β-甲基-D-葡萄糖苷等 31 种碳源, n 取 31。

1.5 16S rRNA 基因克隆文库分析

1.5.1 土壤基因组 DNA 的提取和聚合酶链式反应扩增(polymerase chain reaction,PCR)

采用 Zhou 等^[11]报道的方法从土壤样品中提取总 DNA。采用 Omega 琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化粗提的总 DNA。以纯化后的土壤总 DNA 为模板,以细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增^[12]。引物 27F 为:5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3',引物 1492R 为:5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。PCR 扩增反应体系(50 μL)包括 DNA 模板 2 μL、10×PCR 缓冲溶液 5 μL、2.5 mmol·L⁻¹ dNTP 混合溶液 4 μL、10 mmol·L⁻¹ 引物各 1 μL、5 U·μL⁻¹ Taq 酶 0.25 μL 和灭菌超纯水 36.75 μL。扩增反应程序为:94℃预变性 10 min,94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,共 30 个循环,最后 72℃延伸 7 min。采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物。

1.5.2 16S rRNA 扩增产物的连接转化

将上述 PCR 产物用 Omega 琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化,电泳验证。用 pGEM-T easy vector system 试剂盒(Promega, Madison, WI, USA)将 PCR 纯化产物与 pGEM-T easy 载体连接,热激法转化 *E. coli* DH5α 细胞,涂布于含有 Amp/IPTG/X-gal 的抗性筛选平板,37℃培养 12~16 h。每个文库用蓝白斑筛选的方法随机挑取 400 个阳性克隆子。

1.5.3 扩增 rDNA 限制性酶切分析

采用扩增 rDNA 限制性酶切(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)对随机挑取的阳性克隆子进行分析。用 pGEM-T easy 载体克隆位点的上、下游特异性引物 T7 和 SP6 重新扩增插入片段,验证阳性克隆。扩增产物用 *Msp* I 和 *Rsa* I 双酶切。酶切反应体系 20 μ L 包括:PCR 扩增产物 10 μ L, 10 $\times$ 酶切缓冲溶液 2 μ L, 10 U $\cdot\mu$ L⁻¹ *Msp* I 限制性内切酶 0.25 μ L, 10 U $\cdot\mu$ L⁻¹ *Rsa* I 限制性内切酶 0.25 μ L 和灭菌超纯水 7.5 μ L。37 $^{\circ}$ C 温浴 3 h。酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。酶切图谱相同的克隆子归为一个操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)。

1.5.4 序列分析

采用 ABI 3730 XL DNA analyzer 测序仪对代表克隆进行测序,由北京擎科生物技术有限公司完成。将得到的序列用 Bellerophon 程序^[13]和 Mallard 程序^[14]进行分析,剔除嵌合体序列。相似性高于 97% 的序列归为同一 OTU。采用 Libshuff 软件分析克隆文库之间的差异。用 BLAST 程序与 GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 数据库中已有的序列进行比对,获得相似性较高的 16S rRNA 基因序列。通过 ClustalW 程序进行多序列比对,用 MEGA 4.0(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件采用 Neighbor-Joining 方法和 Jukes-Cantor 模型进行系统发育分析,构建系统进化树。同时重复取样 1 000 次进行自展值(bootstrap value)分析来评估系统进化树的拓扑结构的稳定性。按公式 $C=1-n/N$ (其中 n 为文库中仅出现过一次的 OTU 数量, N 为文库库容)计算文库覆盖率。通过 Analytic Rarefaction 1.3 软件绘制稀缺性曲线。本研究所得的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中的登录号为:HQ727562~HQ727662。

1.6 统计分析

采用 SPSS 13.0 for windows 统计软件对所得数据进行方差分析、主成分分析和相关分析。

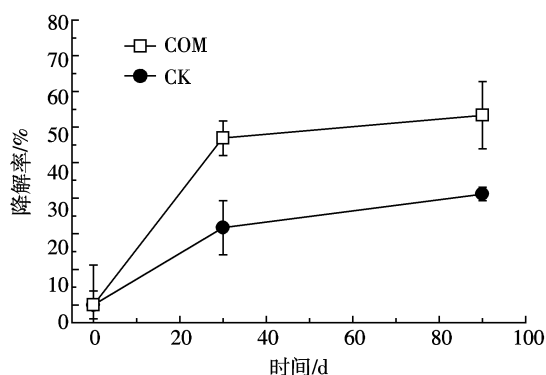
2 结果与分析

2.1 堆肥过程中石油烃降解动态

采用堆肥方法对含油污泥进行处理,石油烃降解动态如图 1 所示。经过 90 d 的堆肥处理,石油烃降解率达 53.3% $\pm$ 9.5%,较对照高 22.1%,差异具有显著性 ($P<0.05$)。这说明堆肥处理可以显著促进含油污泥中的石油烃降解。起始浓度为 12.3% $\pm$ 0.5% 的石油烃在对照处理中降解率随处理时间延长逐渐升高,90 d 后

降解率达 31.2% $\pm$ 1.9%,低于堆肥处理。这说明含油污泥中的石油烃可以自然降解,但是降解速率较慢。

余冬梅等^[7]报道了含油污泥的堆肥处理效果:含油污泥中的石油烃经过 115 d 的堆肥处理降解率达 42%,低于本研究中的降解率。这种差异可能是由于本研究中堆肥的碳氮比较低造成的,尽管二者的碳氮比均在文献推荐的范围以内^[15]。氮元素是影响土壤微生物代谢活性的重要因素之一,特别是含油污泥中石油烃含量较高,碳源过量,造成氮源相对不足,因此碳氮比被认为是影响石油烃降解效果的关键因子。补充氮源、降低碳氮比是促进石油烃降解的有效方法。本研究中堆肥的碳氮比较低,为 15.0 $\pm$ 0.7,与文献推荐的碳氮比较为接近^[16-17]。因此较低的碳氮比可能是本研究中石油烃降解率较高的原因之一。



误差线表示 3 次重复的标准差,下同。Error bars indicate the standard deviation of triplicate determinations, the same below.

图 1 含油污泥堆肥处理过程中总石油烃的降解动态

Figure 1 Dynamics of TPH degradation in the period of treatment of oily sludge by composting

2.2 Biolog 分析

Biolog 方法广泛应用于土壤等环境样品的微生物群落功能特征的分析。其中根据 Biolog 数据计算得出的 AWCD 值可以反映土壤微生物对碳源利用的程度,指示土壤微生物的代谢活性。堆肥处理过程中的 AWCD 值变化如图 2 所示。结果表明:堆肥处理的 AWCD 值均显著高于对照处理 ($P<0.05$)。这一结果说明堆肥处理提高了土壤微生物代谢活性,从而促进了含油污泥中的石油烃降解。Liu 等^[18]在对含油污泥降解的研究中发现,添加河沙、锯末和粪肥处理提高了 AWCD 值,增强了土壤微生物代谢活性。因此,土壤微生物代谢活性的提高可能是含油污泥中石油烃降解率较高的原因之一。

采用主成分分析方法,将培养 96 h 的每孔相对

吸光值转化为几个综合变量(主成分),以反映堆肥处理对微生物群落功能特征的影响,结果如图 3 所示。提取的前 2 个主成分的方差累积贡献率为 79.3%,其中第一主成分和第二主成分分别解释变量方差的 62.8%和 16.5%。从图 3 可以看出:对照处理位于第 1 象限,而堆肥处理位于第 4 象限。对照处理与堆肥处理很好地区分开来。这一结果揭示堆肥处理改变了微生物代谢功能特征,从而导致了不同的碳源利用图谱。对每一主成分得分系数和 31 种碳源相对吸光度值进行相关分析表明:与第一主成分显著相关的有 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-半乳糖醛酸和苯乙胺共 3 种

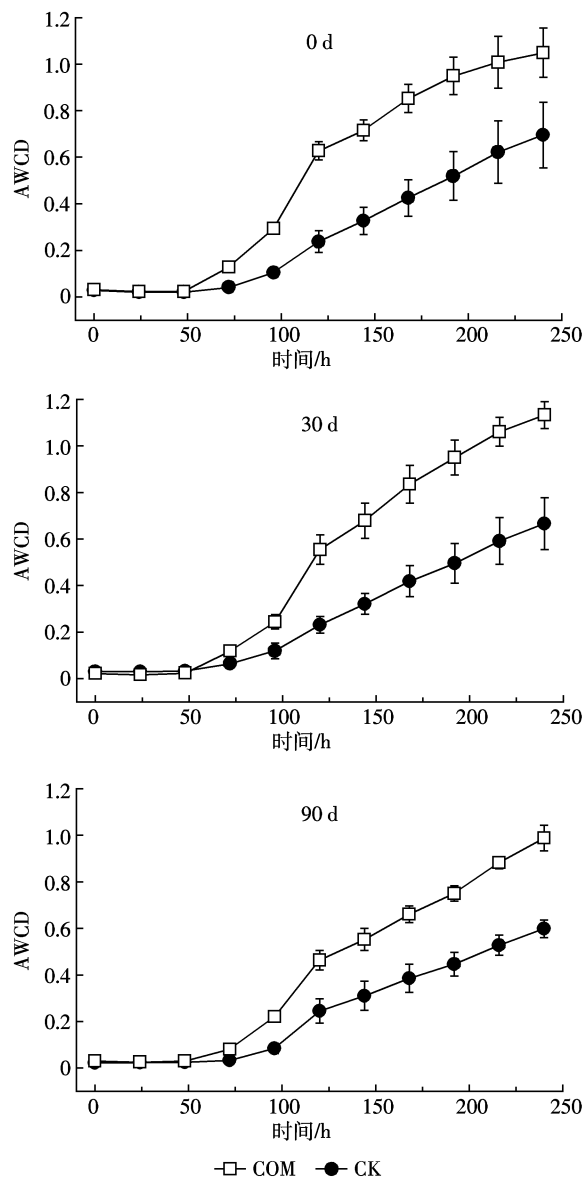


图 2 堆肥处理对含油污泥微生物 AWCD 值的影响

Figure 2 Effects of compost treatment on AWCD value of microbial communities in oily sludge

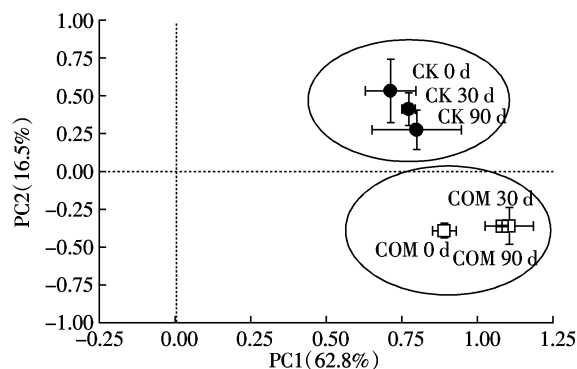


图 3 不同处理微生物群落对碳源利用的主成分分析

Figure 3 Principal components analysis of substrate utilization patterns of microbial communities with different treatments

碳源;与第二主成分显著相关的有 L-精氨酸、D-半乳糖醛酸、L-天冬酰胺、D-甘露醇、4-羟基苯甲酸、D-葡萄糖胺、甘氨酸-L-谷氨酸、D,L- α -磷酸甘油和腐胺共 9 种碳源。这一结果提示堆肥处理和对照处理的微生物群落在对上述碳源的利用能力上存在明显差异。

2.3 16S rRNA 基因克隆文库分析

对 90 d 的堆肥处理样品和对照处理样品分别构建 16S rRNA 基因克隆文库,采用 *Msp* I 和 *Rsa* I 双酶切进行 ARDRA 分析,进一步对代表克隆进行测序分析。嵌合体检查程序分析结果表明,这两个克隆文库中分别有 41 个和 36 个嵌合体序列,分别占克隆文库的 18.3%和 18.5%。从堆肥处理样品中获得 51 个 OTU,从对照处理样品中获得 50 个 OTU。Analytic Rarefaction 软件分析结果表明,两个克隆文库的稀缺性曲线均趋于平缓(图 4)。进一步计算克隆文库覆盖率,结果表明,堆肥处理克隆文库的覆盖率为 87.4%,对照处理克隆文库的覆盖率为 84.3%。这表明两个克

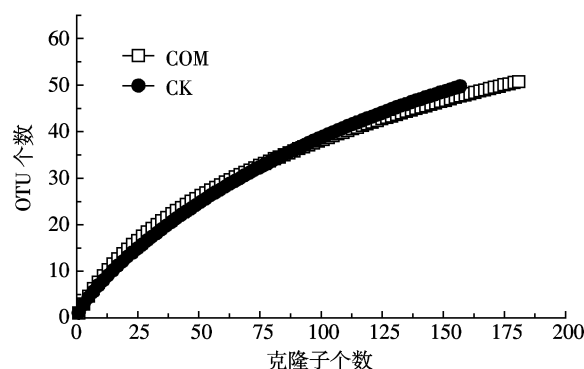


图 4 不同处理 16S rRNA 基因克隆文库稀有度曲线

Figure 4 Rarefaction curves for 16S rRNA gene clone libraries derived from different treatments

隆文库库容较大,挑取的克隆子数量能够较为完整地反映样品中微生物的多样性。Libshuff 软件分析结果表明两个克隆文库之间存在显著性差异($P<0.05$),说明堆肥处理显著改变了微生物群落结构。

将获得的 101 个 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析,结果(图 5)表明:共识别了 13 个类群,部分序列无法确定所属类群,标记为“Unidentified bacteria”。对照样品具有较高的微生物多样性,包括 *Verrucomicrobia*、*Planctomycete*、*Actinobacteria*、*Chloroflexi*、*Bacteroidetes*、 γ 、 δ -*Proteobacteria*、*Acidobacteria* 和“Unidentified bacteria”共 9 个类群。其中 γ -*Proteobacteria* 是优势类群,占克隆文库的 52.8%。堆肥处理样品同样具有较高的微生物多样性,包括 *Verrucomicrobia*、*Deinococcus-Thermus*、*Planctomycete*、*Bacteroidetes*、 α 、 β 、 γ -*Proteobacteria*、*Firmicutes* 和“Unidentified bacteria”共 9 个类群,其中 *Bacteroidetes* 是优势类群,占克隆文库的 31.1%。

对获得的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树,结果如图 6。对照样品中 γ -*Proteobacteria* 类群中的 OTU COM694 占克隆文库的 19.5%,与 *Marinobacter* sp. PR52-13 具有 97.9%的同源性。*Marinobacter* 广泛分布于受烃类污染的土壤、底泥^[19]和水环境^[20]中,可降解多种烃类化合物,例如十四烷、二十烷、菲、萘和甲苯等^[21-23]。OTU COM696 占克隆文库的 20.1%,与 *Alcanivorax* sp. Oha-1 具有 99.5%的同源性。*Alcanivorax* 同样广泛分布于受烃类污染的环境中,可以产生生物表面活性剂^[24],具有降解多种烃类化合物的能力^[25-26]。基因组学研究进一步从分子水平上证实了 *Alcanivo-*

rax 具有较广的降解谱^[27]。因此,*Marinobacter* 和 *Alcanivorax* 可以通过石油烃降解获得碳源和能源,从而使其在含油污泥中大量繁殖。这一结果暗示了 *Marinobacter* 和 *Alcanivorax* 可能与含油污泥中石油烃的自然降解过程有关。

含油污泥堆肥处理中的 *Bacteroidetes* 是该克隆文库中的优势类群(图 5)。Green 等^[28]研究发现 *Bacteroidetes* 是牛粪堆肥中的优势类群。Takaku 等^[29]的研究表明 *Bacteroidetes* 是厨余垃圾腐熟期的优势类群。*Bacteroidetes* 中的多种微生物可以降解淀粉、纤维素和几丁质等大分子有机物,例如 *Sporocytophaga myxococcoides*^[30]和 *Cytophaga hutchinsonii*^[31]具有强大的纤维素分解能力,可以高效地降解纤维素。本研究使用了富含纤维素的麦麸和秸秆作为堆肥调理剂,堆肥中大量的纤维素可能是 *Bacteroidetes* 成为优势类群的原因之一。*Bacteroidetes* 中的部分微生物具有降解烃类化合物的能力,例如 *Yeosuana aromativorans* 可以降解萘和苯并萘^[32]。但是本研究获得的 *Bacteroidetes* 相关 16S rRNA 序列没有提供与石油烃降解菌相关的信息,因此 *Bacteroidetes* 在含油污泥石油烃降解过程中的作用仍不明确。

含油污泥堆肥处理中的 β -*Proteobacteria* 仅在该克隆文库中发现,在对照处理中没有检出(图 5)。 β -*Proteobacteria* 仅包含 COM420 这一个 OTU,占克隆文库的 6.0%,与 *Pusillimonas noertemannii* BN9^T 具有 97.3%的同源性(图 6)。*Pusillimonas noertemannii* BN9^T 菌株分离于 6-氨基萘-2-磺酸钠的降解菌群,可以降解 5-氨基水杨酸、3-氨基苯甲酸和二羟基苯甲酸等

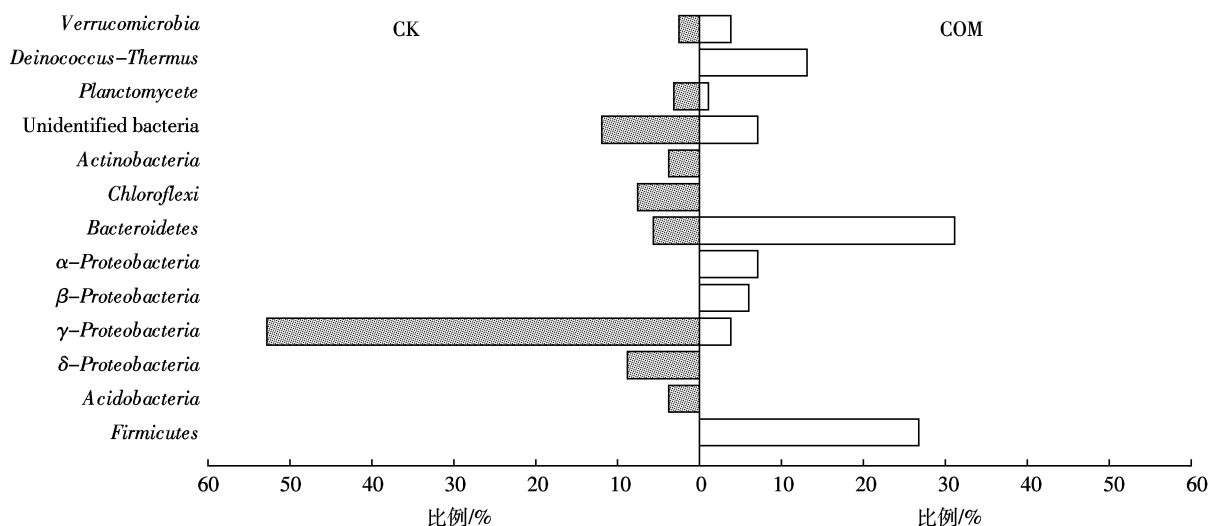
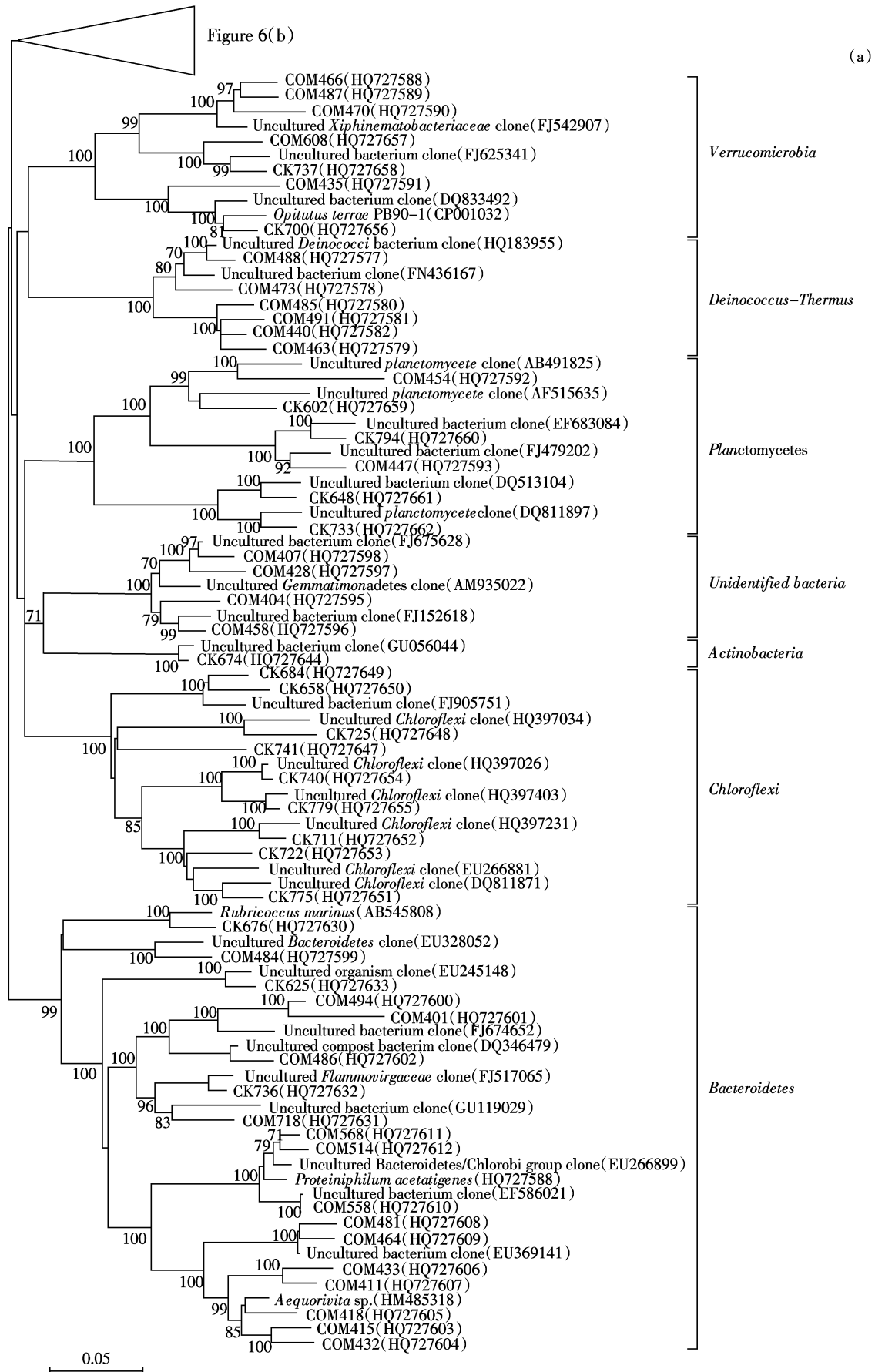
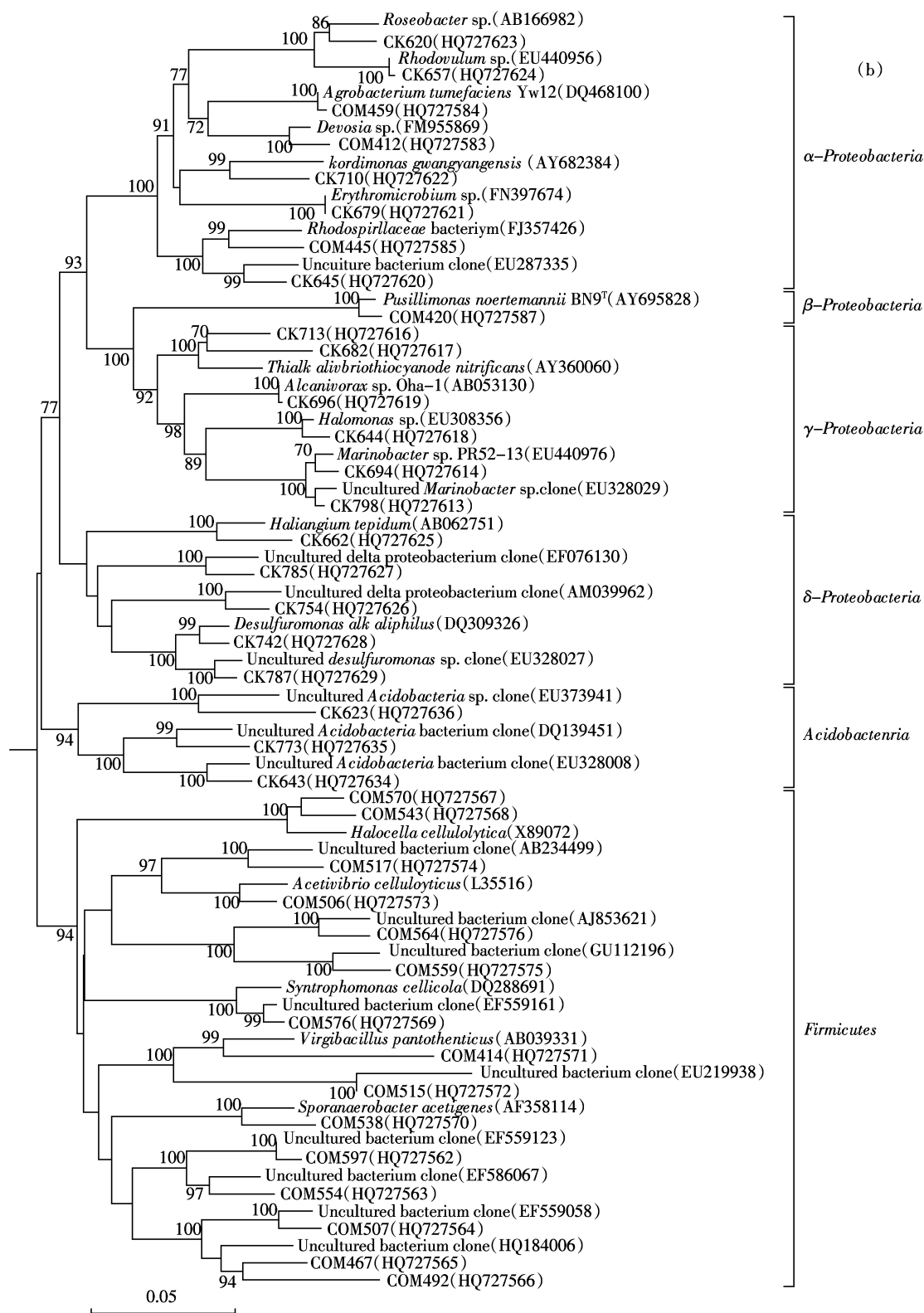


图 5 不同处理 16S rRNA 基因克隆文库中微生物类群的比较

Figure 5 Comparison of microbial groups identified from 16S rRNA gene clone libraries derived from different treatments





(a):疣微菌门,异常球菌-栖热菌门,浮霉菌门,未确定的细菌,放线菌门,绿弯菌门和拟杆菌门;(b): α 、 β 、 γ 、 δ -变形菌门,酸杆菌门和厚壁菌门

(a): *Verrucomicrobia*, *Deinococcus-Thermus*, *Planctomycete*, *Unidentified bacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* and *Bacteroidetes*; (b): α 、 β 、 γ 、 δ -*Proteobacteria*, *Acidobacteria* and *Firmicutes*.

图6 不同处理的16S rRNA基因序列的系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of obtained clones derived from different treatments.

环状化合物^[33]。*Pusillimonas* 是石油和苯酚降解菌群的成员之一^[34-35],此外还具备降解蒽、菲和芘等多环芳烃的能力^[36]。*α-Proteobacteria* 同样仅在含油污泥堆肥处理中发现,在对照处理中则没有检出。其中 OTU COM459 占堆肥处理克隆文库的 2.2%,与 *Agrobacterium tumefaciens* Yw12 具有 99.6%的同源性(图 6)。*Agrobacterium* 可以降解多种烃类化合物,例如,二苯并噻吩^[37]、苯、甲苯、二甲苯^[38]、蒽、菲和芘^[39-40]等。因此 *Pusillimonas* 和 *Agrobacterium* 可能与堆肥处理加速石油烃降解有关。

3 结论

(1)经过 90 d 的堆肥处理,含油污泥中的石油烃降解率达 53.3%±9.5%,较对照处理高 22.1%。堆肥处理可以显著促进石油烃降解,是一种处理含油污泥的有效措施。

(2)Biolog 分析结果表明,堆肥处理的 AWCD 值显著高于对照处理。堆肥处理提高了土壤微生物代谢活性,这可能是石油烃降解率较高的原因之一。主成分分析方法能够有效地区分对照处理和堆肥处理。堆肥处理改变了含油污泥中微生物代谢功能特征,从而导致了不同的碳源利用图谱。

(3)对照处理和堆肥处理的 16S rRNA 基因克隆文库之间存在显著性差异。对照处理的优势类群是 *β-Proteobacteria*,而堆肥处理的优势类群是 *Bacteroidetes*,堆肥处理显著改变了微生物群落结构。*Marinobacter* 和 *Alcanivorax* 可能与含油污泥中石油烃的自然降解过程有关。而 *Pusillimonas* 和 *Agrobacterium* 可能对堆肥处理中的石油烃降解起一定作用。

参考文献:

- [1] Wang S J, Yan Z G, Guo G L, et al. Ecotoxicity assessment of aged petroleum sludge using a suite of effects-based end points in earthworm *Eisenia fetida*[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010, 169 (1):417-428.
- [2] 匡少平,孙东亚,孙玉焕,等. 中原油田油泥及周边土壤中 PAHs 的污染特征[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(3):855-861.
KUANG Shao-ping, SUN Dong-ya, SUN Yu-huan, et al. Pollution characteristics of PAHs in oily sludge and around soils of Zhongyuan Oil Field[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(3):855-861.
- [3] Karamalidis A K, Voudrias E A. Cement-based stabilization/solidification of oil refinery sludge: Leaching behavior of alkanes and PAHs[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 148(1-2):122-135.
- [4] Mishra S, Jyot J, Kuhad R C, et al. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4):1675-1681.
- [5] Liu W X, Luo Y M, Teng Y, et al. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes[J]. *Environmental Geochemistry and Health*, 2010, 32(1):23-29.
- [6] Verma S, Bhargava R, Pruthi V. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2006, 57(4):207-213.
- [7] 余冬梅,骆永明,刘五星,等. 堆肥法处理含油污泥的研究[J]. *土壤学报*, 2009, 46(6):1019-1025.
YU Dong-mei, LUO Yong-ming, LIU Wu-xing, et al. Treatment of oily sludge through composting[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(6):1019-1025.
- [8] Kriipsalu M, Marques M, Nammari D R, et al. Bio-treatment of oily sludge: the contribution of amendment material to the content of target contaminants, and the biodegradation dynamics[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 148(3):616-622.
- [9] Fountoulakis M S, Terzakis S, Georgaki E, et al. Oil refinery sludge and green waste simulated windrow composting[J]. *Biodegradation*, 2009, 20(2):177-189.
- [10] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业出版社, 2000:106-196.
LU Ru-kun. Agriculture chemical analytical methods of soil[M]. Beijing:China Agricultural Science and Technology Press, 2000:106-196.
- [11] 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.
- [12] Hollister E B, Engledow A S, Hammett A J M, et al. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(6):829-838.
- [13] Huber T, Faulkner G, Hugenoltz P. Bellerophon: A program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(14):2317-2319.
- [14] Ashelford K E, Chuzhanova N A, Fry J C, et al. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9):5734-5741.
- [15] Huesemann M H. Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils[J]. *Journal of Soil Contamination*, 1994, 3(3):299-318.
- [16] Beaudin N, Caron R F, Legros R, et al. Identification of the key factors affecting composting of a weathered hydrocarbon-contaminated soil[J]. *Biodegradation*, 1999, 10(2):127-133.
- [17] Cai Q Y, Mo C H, Wu Q T, et al. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting processes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 142(1-2):535-542.
- [18] Liu W X, Luo Y M, Teng Y, et al. Prepared bed bioremediation of oily sludge in an oilfield in northern China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 161(1):479-484.

- [19] Gu J, Cai H, Yu S L, et al. *Marinobacter gudaonensis* sp. nov., isolated from an oil-polluted saline soil in a Chinese oilfield [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(2): 250–254.
- [20] Al-Awadhi H, Sulaiman R H D, Mahmoud H M, et al. Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon-utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(1): 183–186.
- [21] Berlendis S, Cayol J L, Verhé F, et al. First evidence of aerobic biodegradation of BTEX compounds by pure cultures of *Marinobacter* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(7): 1992–1999.
- [22] Hedlund B P, Geiselbrecht A D, Staley J T. *Marinobacter* strain NCE312 has a pseudomonas-like naphthalene dioxygenase [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 201(1): 47–51.
- [23] Gauthier M J, Lafay B, Christen R, et al. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1992, 42(4): 568–576.
- [24] Qiao N, Shao Z. Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(4): 1207–1216.
- [25] Liu Y C, Li L Z, Wu Y, et al. Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the *alkB* gene[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(1): 310–316.
- [26] Olivera N L, Nieves M L, Lozada M, et al. Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: Hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis[J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(1): 19–26.
- [27] Schneiker S, dos Santos V, Bartels D, et al. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(8): 997–1004.
- [28] Green S J, Michel Jr F C, Hadar Y, et al. Similarity of bacterial communities in sawdust-and straw-amended cow manure composts [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 233(1): 115–123.
- [29] Takaku H, Kodaira S, Kimoto A, et al. Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(1): 42–50.
- [30] Vance I, Blayden S L, Tampion J. Cellulose degradation and carboxymethylcellulase production by *Sporocytophaga myxococcoides* grown in an air-lift fermenter[J]. *Biotechnology Letters*, 1981, 3(1): 45–48.
- [31] Zhu Y, Li H, Zhou H, et al. Cellulose and celloextrin utilization by the cellulolytic bacterium *Cytophaga hutchisonii*[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(16): 6432–6437.
- [32] Kwon K K, Lee H S, Jung H B, et al. *Yeosuana aromativorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic marine bacterium belonging to the family *Flavobacteriaceae*, isolated from estuarine sediment of the South Sea, Korea[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(4): 727–732.
- [33] Stolz A, Burger S, Kuhm A, et al. *Pusillimonas noertemannii* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Alcaligenaceae* that degrades substituted salicylates[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1077–1081.
- [34] Wang W P, Wang L P, Shao Z Z. Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes in the subtropical seawater of Xiamen island[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(2): 429–439.
- [35] Elliott D R, Scholes J D, Thornton S F, et al. Dynamic changes in microbial community structure and function in phenol-degrading microcosms inoculated with cells from a contaminated aquifer[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 71(2): 247–259.
- [36] Hilyard E J, Jones-Meehan J M, Spargo B J, et al. Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(4): 1176–1182.
- [37] Constant M, Giralt J, Bordons A. Degradation and desulfurization of dibenzothiophene sulfone and other sulfur compounds by *Agrobacterium* MC501 and a mixed culture[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19(3): 214–219.
- [38] Prantera M T, Drozdowicz A, Gomes Leite S, et al. Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two N₂-fixing soil bacteria[J]. *Biotechnology Letters*, 2002, 24(1): 85–89.
- [39] Ben Said O, Goñi-Urriza M S, El Bour M, et al. Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(4): 987–997.
- [40] Aitken M D, Stringfellow W T, Nagel R D, et al. Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, 44(8): 743–752.