

# 基于分子生物学的微生物修复技术在石油污染环境中的应用

叶振城, 苏亦凡, 杨云锋\*

清华大学环境学院 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084

叶振城, 苏亦凡, 杨云锋. 基于分子生物学的微生物修复技术在石油污染环境中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 739-757.

YE Zhencheng, SU Yifan, YANG Yunfeng. The application of molecular biology-based microbial remediation technologies in petroleum polluted environments[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 739-757.

**摘要:** 日益增长的人类活动和工业生产带来的石油污染已成为严重的环境问题。微生物修复技术绿色环保, 在石油污染修复中备受关注。分子生物学技术的应用使微生物修复技术发生了迅猛变革, 并为高效降解菌剂的开发提供了资源, 但目前还存在物种注释结果不够全面和精确、检测灵敏度有限等缺点。其他微生物修复技术在提高石油污染物的降解效率以及减少其对环境的危害等方面也具有相当大的潜力, 特别是生物表面活性剂和生物刺激剂, 修复周期较短, 修复成本相对较低, 在未来可以大规模应用。另外, 分子生物学与其他微生物修复技术的结合成为降解石油污染物的有效工具。本文总结了分子生物学手段在石油污染环境中的应用, 梳理了近年来微生物修复石油污染方法的研究进展, 讨论了现有微生物修复技术的修复效果, 并对未来微生物修复技术的发展方向进行了展望。

**关键词:** 石油污染; 微生物修复; 分子生物学; 生物表面活性剂; 生物刺激; 联合修复

## The application of molecular biology-based microbial remediation technologies in petroleum polluted environments

YE Zhencheng, SU Yifan, YANG Yunfeng\*

State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Abstract:** Owing to human activities and industrial production, petroleum pollution has become

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFC1806205)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1806205).

\*Corresponding author. E-mail: yangyf@mails.tsinghua.edu.cn

Received: 2023-06-12; Accepted: 2023-09-18

a serious environmental issue. Microbial remediation technology, characterized by its eco-friendly characteristics, has drawn significant attention in petroleum pollution remediation. The application of molecular biology technology has led to a drastic revolution in microbial remediation technology, providing resources for the development of highly efficient degrading agents. However, limitations such as the lack of precision in species annotation and the limited detection sensitivity still exist. Other microbial remediation technologies also have substantial potential in enhancing the degradation efficiency of petroleum pollutants and reducing their environmental harm, especially biosurfactants and bio-stimulants, which offer relatively shorter remediation periods and lower costs, promising large-scale application in the future. Moreover, the combination of molecular biology and other microbial remediation technologies may become an effective tool for petroleum pollutant degradation. This review summarized the application of molecular biology methods in petroleum polluted environments, reviewed the recent research progress on microbial remediation techniques for petroleum-contaminated sites, discussed the remediation effects of these microbial remediation techniques, and proposed the future development direction of microbial remediation technology.

**Keywords:** petroleum contamination; microbial remediation; molecular biology; biosurfactant; biostimulation; combined remediation

石油及其衍生产品在全球范围内广泛应用。有研究预测,石油的消费量将从2016年的8 500万桶增加到2030年底的1亿桶以上<sup>[1]</sup>。由于采油、运输以及使用过程中产生的泄漏等问题,加上石油本身在自然环境中难以降解<sup>[2]</sup>,石油污染已经成为全球范围的环境问题。石油污染对生态系统造成了许多负面影响,如土壤肥力降低、生物多样性减少、地下水污染和人类健康威胁等<sup>[3-4]</sup>。因此为了降低暴露风险、修复受污染环境并恢复生态系统服务功能,开发高效、环保的石油污染场地修复方法至关重要。

微生物修复技术作为一种独特且具有前景的生物技术,在石油污染场地修复中得到广泛应用。该技术利用微生物的降解能力将石油污染物分解为无害或低毒性的物质<sup>[5]</sup>。相对于物理和化学修复方法,微生物修复过程中所需能源较少,实现了减污和降低碳排放的目的(简称

减污降碳),从而实现土壤的绿色可持续修复<sup>[6]</sup>。随着生物信息学、分子生物学、基因工程等领域的快速发展,扩增子、宏基因组、宏转录组和基因芯片等生物技术手段相继被应用于石油污染场地修复中。特别是基于高通量测序的研究方法在挖掘石油降解微生物资源方面取得了许多突破,使得科研人员不断发现具有高效降解能力的功能微生物。此外,诸如生物刺激剂、表面活性剂以及固定化微生物等传统修复方法,通过改进材料使用和组合等方式也进一步促进了修复效率的提升。

本文对近年来分子生物学手段在石油污染环境中的应用进行了总结,对微生物修复石油污染土壤的研究进展进行了梳理,并讨论了基于传统方法改进的微生物修复技术的修复效果。同时,对微生物修复技术未来的发展方向进行了展望,旨在为国内石油污染场地微生物修复技术的优化提供有价值的参考和借鉴。

# 1 分子生物学技术

随着二代高通量测序技术的发展,学术界对环境微生物群落的识别能力得到了巨大提升。二代测序技术通过大规模平行测序,能够在短时间内获取大量的序列信息,从而显著提高测序效率并降低成本<sup>[7-8]</sup>。该技术在生物学领域广泛应用,能够全面、快速地解析生态系统的组成和功能<sup>[9]</sup>。十几年前,美国、欧洲等国家和地区就开始利用相关的分子生物技术研究石油污染场地中的微生物群落。相比之下,国内在这方面的研究起步较晚,但越来越多的研究者正在将基于高通量的分子生物技术应用于降解途径诊断中,为石油污染场地的修复带来了革新。

## 1.1 扩增子技术

扩增子技术是一种基于 PCR 扩增的分子生物学方法,其通过设计特定基因(如 16S rRNA 基因)的保守区引物,将基因的高变区扩增富集并进行测序,以分析环境中微生物群落的组成和多样性<sup>[10]</sup>。扩增子技术的优势在于成本较低,且能够平行、快速地分析大量环境样品,适用于大规模样品的初步筛查,从而帮助科研人员迅速获取环境微生物组成的信息。另外,结合扩增子数据与环境因子进行关联性分析,可以快速识别定位与石油污染物降解相关的微生物类群,为高效降解菌株的筛选提供依据。然而,扩增子技术也存在一些局限性,如对保守区引物设计的依赖、扩增偏好性以及无法提供微生物群落的定量信息等<sup>[11]</sup>。因此,为深入了解石油污染场地中降解微生物的功能特征和降解机制,需要结合其他组学技术的应用。

## 1.2 组学方法

### 1.2.1 宏基因组学

宏基因组学是一种用于研究环境中所有微

生物群落基因组的高通量测序技术。该组学方法不依赖于传统的实验室培养技术,且能够快速获取大量遗传信息,因此能更准确地反映环境微生物群落的组成和功能特征<sup>[12]</sup>。宏基因组学还可以用于挖掘关键功能基因和代谢途径,揭示微生物在环境中的功能作用和相互关系<sup>[13]</sup>,从而帮助识别石油污染场地中存在的具有降解功能的微生物类群,并揭示它们在污染物降解过程中的作用机制。另外,宏基因组学具有表征不可培养和未知生物体的优势<sup>[14]</sup>,能够帮助挖掘石油污染场地中未知的降解基因和代谢途径,从而为微生物修复提供新的靶点和策略。然而,与扩增子技术类似,应用宏基因组学也不能准确测量环境中每个物种的丰度,只能给出相对丰度,因此难以确定不同物种在石油污染环境中的绝对数量变化。

### 1.2.2 宏转录组学

宏转录组学是一种研究环境中微生物群落总 RNA 的技术,用于揭示微生物在特定条件下的基因表达情况<sup>[10]</sup>。宏转录组学通过高通量测序和生物信息学分析,能够捕捉微生物群落不同环境条件下基因表达的变化,从而反映出微生物在污染物降解过程中的生理状态,为优化修复条件提供理论参考<sup>[15]</sup>。此外,宏转录组学还能揭示微生物的降解途径、代谢活性和调控网络等功能特征,为深入了解石油污染物的降解机制提供重要信息。与宏基因组学相比,宏转录组学能够更加准确地反映微生物的活性变化,从而为判断哪些微生物群落对污染物的转化或降解有重要贡献提供了线索。因此,通过比较不同菌株的基因表达特征,宏转录组学可以辅助筛选出在污染环境下具有高适应性的降解菌株,从而提高微生物修复的效果。虽然宏转录组可以检测基因的表达情况,但其灵敏度仍然受到限制,低表达的基因可能在检测过

程中会被掩盖。

### 1.2.3 宏蛋白组学

宏蛋白组学是研究环境中微生物群落总蛋白质的技术。宏蛋白组学通过对环境样品中微生物总蛋白质进行高通量质谱分析和生物信息学处理,可以揭示微生物群落在特定条件下的蛋白质表达情况,从而提供对微生物群落生理活动的整体了解<sup>[16]</sup>。宏蛋白组学在石油污染修复中具有广泛应用。例如,通过宏蛋白组学技术,科研人员可以识别石油污染场地中具有降解功能的微生物的蛋白质表达情况,深入了解它们在污染物降解过程中的功能活性,为修复技术的优化提供依据。此外,宏蛋白组学还可以挖掘石油污染场地中未知的降解酶和降解途径,丰富了用于修复石油污染的微生物资源。尽管如此,宏蛋白组学在应用过程中也可能会存在遗漏低丰度蛋白质的风险。

### 1.3 基因芯片

基因芯片是目前唯一能同时鉴定和定量参与环境和生态响应过程关键微生物功能基因的高通量技术,具有高密度、高度平行化的特点。基因芯片通过将大量预定的核酸探针固定在固相载体上,将探针与荧光标记的目标样品进行杂交,能够实现对目标基因的快速检测<sup>[17]</sup>。基因芯片到目前为止已经发展到第五代,开发了包括 570 042 种寡聚核酸探针,可以靶向与生物地球化学循环过程相关的 268 059 种编码基因,包括碳、氮、硫和磷循环等<sup>[18]</sup>。此外,基因芯片还可以用于筛选与有机污染物生物降解相关的功能基因。芯片涵盖了 30 796 种与有机污染修复相关的功能基因探针,可用于揭示降解相关基因在污染条件下的表达模式和调控网络,进一步解析微生物的降解能力和降解途径。基因芯片的限制性在于只能关注已知基因,无法揭示未知基因和新功能的发现。

## 2 基于分子生物技术的降解微生物挖掘

近年来,不断有研究应用分子生物技术鉴定出石油降解相关的关键微生物和基因。例如,先前有研究从受石油烃污染的红树林沉积物中分离到了柴油、十六烷和菲降解菌,通过 16S rRNA 基因扩增子测序鉴定降解菌为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)<sup>[19]</sup>,这些沉积物中的土著微生物在 1 个月之内对十六烷(250 mg/kg)和菲(150 mg/kg)的降解率均大于 99%,而对柴油(500 mg/kg)的降解率也达到 88%,表现出了优异的石油烃降解能力。此外,表 1 列出了在石油污染环境中应用组学技术的部分相关研究及关键降解微生物和基因。对于土壤和沉积物污染环境,Bastida 等<sup>[20]</sup>利用蛋白质组学的方法评估了堆肥改良剂增强土壤微生物修复能力的潜力,结果表明堆肥辅助的微生物修复效果的提升主要是由鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)和一些未培养的细菌驱动的,这些细菌具有丰富的分解代谢酶,如邻苯二酚 2,3-双加氧酶、顺式二氢二醇脱氢酶和 2-羟己二烯二酸半醛水解酶。正是由于这些降解菌代谢活性的提高,50 d 后土壤中多环芳烃和烷烃(2%质量分数)的降解率达到 88%。此外,Atashgahi 等<sup>[21]</sup>和 Cabral 等<sup>[22]</sup>采用宏转录组技术分别从受污染的土壤和红树林沉积物中挖掘出了高效降解石油烃的基因。

对于海洋污染环境,最近的一项研究利用宏基因组学揭示了海洋微生物群落中总石油烃代谢途径和基因丰度的差异,发现漏油事件后,解环菌属(*Cycloclasticus*)、海命菌属(*Marivita*)和亚硫酸盐杆菌属(*Sulfitobacter*)的相对丰度增加,*bphAa*、*bsdC*、*nahB*、*doxE* 和 *mhpD* 等功

表 1 分子生物学技术在石油污染相关研究中的应用

Table 1 Application of molecular biology techniques in research related to petroleum pollution

Habitat/System	Key microorganisms/Functional genes	Contaminant	Techniques	References
Soil	Catechol 2,3-dioxygenases, <i>cis</i> -dihydrodiol dehydrogenase and 2-hydroxymuconic semialdehyde	Petroleum	Metaproteomics	[20]
Soil	Bam-like genes ( <i>AbcA</i> and <i>AbcD</i> )	Benzene	Metatranscriptomics	[21]
Mangrove sediment	<i>catA</i>	Crude oil	Metatranscriptomics	[22]
Seawater	<i>bphAa</i> , <i>bsdC</i> , <i>nahB</i> , <i>doxE</i> , <i>mhpD</i>	Petroleum hydrocarbons	Metagenomics	[23]
Seawater	NAD(P)-dependent dehydrogenase, short-chain alcohol dehydrogenase family genes, acyl-CoA dehydrogenase encoding genes	Petroleum hydrocarbons	Metagenomics	[24]
Seawater	<i>alkB</i> , <i>nagG</i> , <i>pchCF</i>	Petroleum hydrocarbons	Geo-chips	[25]
Seawater	<i>phdCI</i> gene encoding carboxylate isomerase	Hydrocarbon	Geo-chips	[26]
Seawater	<i>catA</i>	Polycyclic aromatic hydrocarbons	Metatranscriptomics	[27]
Groundwater	Benzylsuccinate synthase genes	Toluene	Metatranscriptomics	[28]
Groundwater	<i>Burkholderiales</i> , <i>Rhodococcus</i>	Naphthalene, fluorene	Metaproteomics	[29]
Groundwater	<i>Reyranelia</i> , <i>Novosphingobium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Acidovorax</i> , and <i>Bordetella</i>	Petroleum hydrocarbons	Metagenomics	[30]

能基因显著富集,表明这些细菌属和功能基因对海洋石油污染环境具有很强的适应性,可能与石油污染物的生物降解密切相关<sup>[23]</sup>。Song 等<sup>[24]</sup>采用宏基因组学鉴定出与石油烃代谢相关的短链醇脱氢酶编码基因和酰基辅酶 A 脱氢酶编码基因。McFarlin 等<sup>[25]</sup>利用第五代基因芯片解析了北极海水中的原油生物降解途径,发现与石油降解相关的基因 *alkB*、*nagG*、*pchCF* 的相对丰度随着石油浓度的增加而增加。此外,还有研究通过这些组学方法发现了海洋环境中其他与石油烃降解相关的功能基因,例如 *catA* 和 *phdCI*<sup>[26-27]</sup>。

对于地下水污染环境,有研究通过宏转录组学发现在受苯系物污染的地下水中,参与甲苯分解代谢的苄基琥珀酸合成酶基因在污染源附近高度表达,证实了含水层中苯系物存在持

续的生物降解<sup>[28]</sup>。Herbst 等<sup>[29]</sup>利用宏蛋白组学结合稳定性同位素分析,鉴定出伯克氏菌目 (*Burkholderiales*)是驱动地下水污染物降解的关键微生物,而芴的降解主要与红球菌属 (*Rhodococcus*)有关。此外,Cai 等<sup>[30]</sup>则通过宏基因组学鉴定出微杆菌属 (*Microbacterium*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、食酸菌属 (*Acidovorax*)和鲍特氏菌属 (*Bordetella*)具有降解地下水石油烃的能力。

除了这些已报道的研究,笔者所在的研究团队曾对河南省某一已经关闭的炼油厂进行污染土壤的采集分析,该炼油厂主要为长链石油烃污染。通过对土壤样品进行扩增子测序,发现高污染水平会导致土壤微生物  $\alpha$  多样性下降,但不同类别微生物的相对丰度对污染浓度增加表现出不同的变化模式。通过网络分析发

现在重油罐区中形成了专门用于降解各种有机污染物的网络模块[模块中主要包括沙壤土杆菌属(*Ramlibacter*)、食酸菌属(*Acidovorax*)、多环螺杆菌属(*Polycyclovorans*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和溶杆菌属(*Lysobacter*)],以及专门用于甲烷和甲基氧化的网络模块[模块中主要包括生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、苯基杆菌属(*Phenylobacterium*)、甲基杆菌属(*Methylobacter*)和甲基暖菌属(*Methylocaldum*)],表明了这些微生物在重污染区域中存在互作关系以及它们对石油烃具有较强的降解潜力<sup>[31]</sup>。通过宏基因组测序进一步对土壤样品进行功能基因注释,解析了石油污染物降解的代谢通路。研究发现脂肪酸降解通路、苯甲酸降解通路以及甲苯降解通路中相关基因在场地不同污染区域的分布均较为完整,从而为石油烃污染物的生物自然降解提供了有力的证据支持。

相比于传统培养筛选的方法,这些分子生物学技术避免了培养、纯化、筛选等烦琐的步骤,同时还可以检测到低丰度甚至难以培养的微生物种类,极大地拓展了降解微生物资源的挖掘,从而帮助研究人员深入挖掘与石油污染物降解相关的关键微生物,并表征这些微生物在污染物降解过程中的动态变化,为高效降解菌剂和降解策略的开发提供了基础。从 Web of Science 数据库的检索结果来看,宏基因组和宏转录组方法在石油降解微生物的鉴定识别中应用较多,特别是在海洋和地下水环境中。尽管宏蛋白组和基因芯片可以识别石油污染场地中的降解途径,但由于价格与操作等原因,这两种组学方法在实际研究中应用相对较少。另外,目前的研究更多关注石油污染环境微生物群落、降解物种相对丰度的变化,对降解过程的代谢通路、降解机制等关注相对较少。

尽管这些组学方法的应用拓展了微生物资

源的挖掘,但这些方法在实际应用中还存在以下瓶颈:采用分子生物学方法对降解微生物进行鉴定很大程度上是基于现有数据库的注释,但由于目前仍然存在许多微生物尚未被鉴定和记录,导致现有数据库不够全面,无法涵盖所有可能的微生物资源,在实际应用中面临物种注释可信度的问题;不同组学方法在应用过程中存在的缺点在上文已经提及,这些缺点也可能导致一些重要的降解微生物、基因和途径被遗漏;另外,从现场采集合适的样品并保持其原始特性对于分子生物技术的应用至关重要,但样品采集和处理过程中可能会引入外来微生物或导致原有微生物群落的改变,加之样品保存条件苛刻(-20 °C以下),保存不当也会影响最终的分析结果;数据的处理上,测序数据上游处理产生的数据量庞大,高度依赖于高性能的计算机进行处理,在下游数据处理过程中,不同的数据分析方法可能导致不同的结果,单一的分析方法可能会产生误导性的结论。

对于上述问题,可以通过以下方法进行改进。利用纳米孔测序和单分子实时测序等三代测序技术取代二代测序可以产生更长的序列读数<sup>[32]</sup>,更好地捕捉物种的信息,从而提高物种注释的准确性和全面性。还可以采用多重注释策略来保证注释结果的准确性,将不同的数据库和工具结合使用,进行交叉验证,可以有效减少误差并获得更全面的物种注释结果。单一组学方法的应用缺陷可以通过同时采用两种以上的多组学联合技术来进行克服,这有助于促进科研人员对石油生物降解过程的内在生物学机制进行完整、多维度的认识<sup>[33]</sup>。另外,条件允许时,在采样现场采用基于第三代测序的便携式纳米孔测序仪 MinION 进行野外现场微生物测序可以保证后续分析不受样品保存的影响。在对微生物数据进行分析处理的过程中,

应同时采用多种分析工具进行数据处理,并根据实际情况和专业知对结果进行合理解读,这样可以避免分析方法的偏好性,从而得出正确的结论。

综上所述,基于分子生物技术的降解微生物资源挖掘为石油污染环境修复提供了快捷、高效的研究手段和方法,且能够快速定位与石油降解相关的微生物类群,便于构建高效降解菌剂。然而,实际污染场地的条件与实验室条件差异巨大,这导致高通量测序得到的降解微生物在实际污染场地中的修复效果可能不稳定。因此,对这些组学方法得到的降解微生物应该进一步通过实验室实验来验证其在不同污染条件下的降解效果,以保证所获得的降解菌株的可靠性。同时还要在实际应用中对这些降解微生物进行长期监测和管理,以确保其生态安全性和稳定性。

### 3 微生物修复方法及其基于分子生物技术的优化应用

除了高效降解微生物资源的挖掘外,其他微生物修复方法也可以提高石油污染的修复效率。这些方法包括表面活性剂、固定化微生物、生物刺激、基因工程菌和植物-微生物联合修复等(图 1),在石油污染修复中得到了广泛的应用。近几年来,研究者们在这些修复技术的基础上通过改进材料使用、组合方式和应用策略等方面,进一步促进了修复效率的提升。本部分综述了近几年来改进的微生物修复技术及其对石油污染物的降解效果,并进一步探讨了如何将分子生物技术应用于微生物修复技术的优化。

#### 3.1 微生物修复技术

##### 3.1.1 生物表面活性剂

由于石油烃疏水性较强容易被土壤中的有

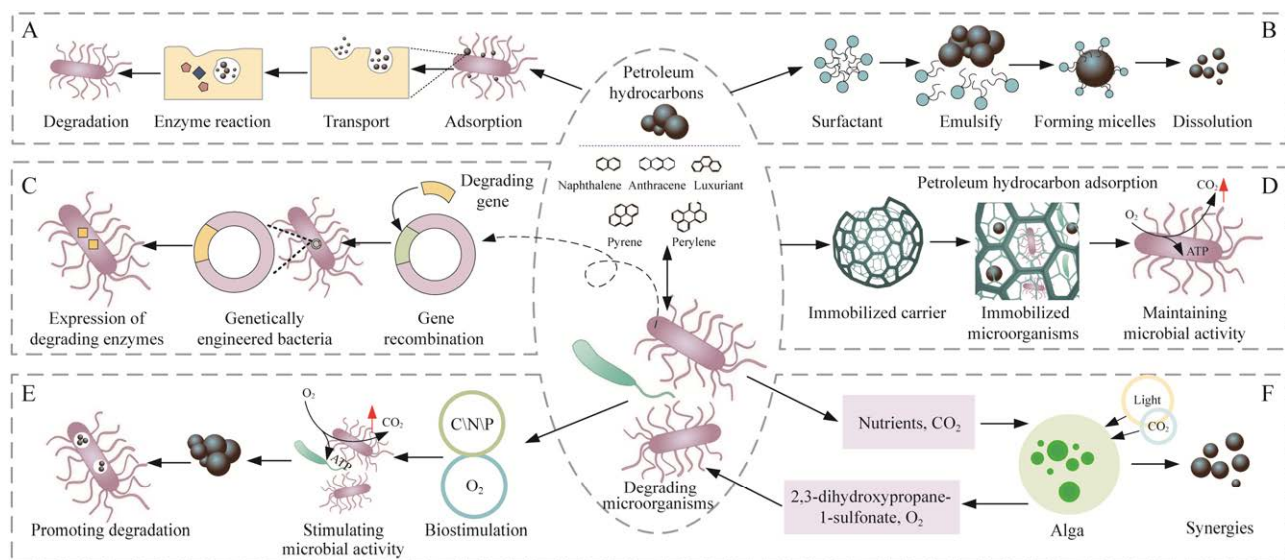


图 1 不同微生物修复方法的修复机制 A: 高效降解微生物. B: 生物表面活性剂. C: 基因工程菌的降解机制. D: 固定化载体. E: 生物刺激. F: 藻类-微生物协同作用

Figure 1 Mechanism of different microbial remediation methods. A: Degrading microorganisms. B: Biosurfactants. C: Genetically engineered bacteria. D: Immobilized microorganisms. E: Biological stimulation. F: Algae microbial synergism.



机物所吸附, 导致游离在土壤水中的石油烃较少, 难以被微生物降解<sup>[34]</sup>。为了提高石油烃的可利用性, 需要将其转化为微生物能够利用的碳源<sup>[35]</sup>。表面活性剂的分子结构具有亲水和疏水两性, 可以通过增加界面的表面积来降低油水界面的张力。因此, 在石油污染修复中应用表面活性剂可以达到提高有机污染物生物利用性的目的, 使其更容易被微生物降解。

传统使用的表面活性剂以化学表面活性剂为主, 包括  $\beta$ -环糊精、聚氧乙烯醚(Tween-80)和十二烷基硫酸钠等<sup>[36]</sup>, 也包括一些生物表面活性剂, 例如糖脂类、脂肽类表面活性剂等。通常来说, 这些传统表面活性剂的适用范围有限, 且无法在高温高盐的极端环境中发挥最佳效果。最近一项研究报道的热稳定表面活性剂则可以克服该缺陷<sup>[37]</sup>。该表面活性剂由芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) SGD-AC-13 制备而成, 属于脂肪烯烴, 具有高达 160 °C 的热稳定性, 优于大多数由细菌和酵母产生的生物表面活性剂(125–130 °C)<sup>[38–39]</sup>。此外, 该热稳定表面活性剂还能适应 50 g/L 的 NaCl 浓度, 因此对于海洋环境中的石油污染修复具有良好的潜力。但是该生物表面活性剂由于由长链脂肪烯烴组成, 具有一定的生物毒性, 在实际应用中应采取相应措施来降低其毒性。Zargar 等<sup>[40]</sup>报道了一种对环境条件适应性较广的生物表面活性剂, 该表面活性剂由芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) IITD106 产生, 为皂苷类物质, 在温度 30–70 °C、盐度 0–150 g/L 和 pH 4.0–10.0 的条件下依然具有较高的稳定性; 使用该皂苷类表面活性剂后, 培养基的表面张力降低到了 54%, 明显提高了石油烃的生物利用性。因此, 该生物表面活性剂在不同污染条件的场地中具有广泛的应用前景。

除了从特定的微生物中提取生物表面活性剂外, 还可以通过表面改性的方法构造具有新

性质和功能的表面活性剂。例如, Christopher 等<sup>[41]</sup>利用表面修饰技术提高了由马拉加芽孢杆菌(*Bacillus malacitensis*)产生的脂肽生物表面活性剂表面结构中极性氨基酸的含量, 改性后的表面活性剂能够更加有效地螯合多环芳烴。使用该改性表面活性剂与活性炭的组合 28 d 后, 土壤中总石油烃的去除率达到了 61.8%, 在难降解芳香烴污染的土壤中具有有良好的应用前景。

总之, 近年来这些改进的生物表面活性剂与传统使用的表面活性剂相比在环境友好性、适应性以及有效性方面具有一定的优势。首先, 这些生物表面活性剂是由天然生物来源提取的, 与人工合成的化学表面活性剂相比, 在保证发挥降解作用的同时更容易被环境中的微生物降解, 减少了对环境的持久污染, 更加环保<sup>[42]</sup>; 其次, 这些生物表面活性剂具备在恶劣且传统表面活性剂难以发挥效果的环境中(例如高温、高盐等)表现出更高的稳定性和适应性的潜力, 适用范围更加广泛<sup>[43]</sup>; 最后, 通过表面改性的生物表面活性剂由于表面结构发生了针对性的变化, 与传统表面活性剂相比, 在降解特定污染物方面更加有效。

虽然这些生物表面活性剂在实验室中表现出良好的潜力, 但其在实践中仍存在一些挑战和限制。例如, 生物表面活性剂的生物毒性和对生态系统的影响需要进一步评估和监测, 避免其对土著微生物甚至降解菌株产生毒性影响。对于具有生态毒性的生物表面活性剂, 在实际应用过程中应采用靶向释放技术, 针对性地将表面活性剂释放到特定的污染源区域, 将表面活性剂的影响控制在一定的范围内。另外, 可以通过表面修饰技术改变生物表面活性剂的分子结构和性质, 从而减少其对环境的毒性。还可以结合具有特定降解能力的微生物, 在生物表面活性剂发挥作用后, 将其与石油污



染物一同生物降解,从而避免其对环境产生长期毒害作用。这些生物表面活性剂的存储也是需要重点关注的问题。对于不易于储存的表面活性剂,可以考虑通过向场地投加产生生物表面活性剂的微生物并加以刺激来原位产生大量的生物表面活性剂。此外,生物表面活性剂的生产成本较化学表面活性剂高,这限制了其在微生物修复中的大规模应用。在今后的应用中则可以考虑通过将廉价的废物材料作为发酵培养基底物、优化发酵参数等方式降低生物表面活性剂发酵生产的成本,同时选择成本和损耗更低的分离纯化方法<sup>[42]</sup>。

### 3.1.2 固定化载体

固定化技术是利用物理或化学方法将微生物固定在限定的空间内,避免微生物处于游离状态以保持其生物活性。目前常用的固定微生物的方法包括吸附法、包埋法、交联法和共价结合法<sup>[44]</sup>。微生物固定化载体材料按照其性质可以分为无机载体材料、有机载体材料和复合载体材料等<sup>[45]</sup>。这些载体在吸附微生物的同时为它们提供了良好的生长环境。然而,传统载体材料在应用中难免会出现微生物失活、降解效果有限以及有毒代谢产物积累等问题。为此,研究者致力于开发更稳定、高效和环保的天然植物材料作为载体。

近年来,不断有新的植物材料被探索并应用于微生物固定。例如,国内学者研究发现,使用凤眼莲秸秆和浒苔生物碳作为载体能有效固定微生物,并促进碳氢化合物的降解。经过 30 d,凤眼莲秸秆和浒苔生物碳固定的微生物分别使土壤中的石油烃和海水中的柴油降解率达到 52%和 57%<sup>[46-47]</sup>。此外,固定载体的尺寸也会影响石油烃的降解效率。Hajieghrari 等<sup>[48]</sup>将铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)固定在不同网眼大小的椰子纤维上,研究了不同尺

寸的椰子纤维对烷烃降解的影响。结果显示,网眼大小在 1.19–2.38 mm 之间的椰子纤维能有效保护降解细菌免受烷烃毒害,并提高微生物活性。与直接将细菌接种到土壤中相比,将细菌固定在最佳尺寸的椰子纤维中能将十六烷的降解率提高 50%。某些固定载体在发挥吸附作用的同时还具备其他一些特性。例如, Martins 等<sup>[49]</sup>在软木材料传统应用的基础上进行了创新研究,同时研究其吸附和激发特性,发现粒径 0.3–1.0 mm 大小的软木颗粒不仅能有效吸附烷烃,还能通过激发浑浊红球菌(*Rhodococcus opacus*) B4 和泊库岛食烷菌(*Alcanivorax borkumensis*) SK2 等碳氢化合物降解菌的生长活性来进一步促进烷烃的降解。与未使用软木吸附剂的处理相比,软木吸附剂的存在使得 *R. opacus* 和 *A. borkumensis* 对正构烷烃的降解分别提高了 6%和 24%,对降解微生物具有良好的激发作用。

综上所述,这些植物材料作为固定载体可以提高微生物修复石油污染的有效性和可行性。它们具有生物相容性、化学稳定性和低成本的特点,能够满足不同微生物种植的需求,在石油污染修复中具有广泛前景。然而,虽然这些固定化载体能够有效提高微生物对石油的降解率,但将它们应用到实际大规模场地修复中还存在一定的限制。例如,上述报道的这些载体主要是通过吸附的方式来固定降解微生物,吸附法虽然对微生物的活性影响较小,但固定微生物的数量受载体影响较大,且附着强度较弱,在大规模应用中可能会导致固定效果不稳定<sup>[44]</sup>。另外,这些载体材料在前期虽然能表现出优异的固定效果,但由于这些天然植物材料容易被微生物降解,在修复后期可能会导致固定化微生物的泄漏与扩散,从而使修复效果降低。鉴于包埋法具有较高的固定化强度且

可以将微生物与外界环境隔离,在实际应用中可以考虑将吸附法与包埋法联合使用,来克服这些天然植物材料的缺陷。

### 3.1.3 生物刺激

在碳氢化合物污染修复过程中,微生物通常受到养分、氧气有效性、pH值、温度以及碳氢化合物的可利用性等环境因素的限制。为了克服这些限制,生物刺激被用来改变微生物的外部生长环境<sup>[50]</sup>。传统的生物刺激方法主要包括通气、添加营养剂和共代谢生长基质等<sup>[34]</sup>。有研究表明电子受体也可以刺激微生物的降解作用<sup>[51]</sup>。最常见的电子受体是氧气,主要用于刺激微生物的好氧降解途径,而诸如  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 和  $\text{SO}_4^{2-}$ 等电子受体主要用于改善微生物的厌氧降解作用。例如, Mu 等<sup>[52]</sup>研究发现在受多环芳烃污染的海洋沉积物中添加  $\text{HCO}_3^-$ 可以使多环芳烃的降解率达到 85%,与未投加电子受体的处理相比降解率提高了大约 18%。此外,为了促进海洋沉积物中石油烃的降解, Marzocchi 等<sup>[53]</sup>在沉积物中通入了电化学通气管,并在此基础上引入电缆细菌,以改善缺氧沉积物与含氧上覆水之间的长距离电子传递,从而激发缺氧沉积物中的硫酸盐去除,加速石油烃的降解。与不使用电化学通气管和电缆细菌的处理相比,结合电化学通气管和电缆细菌的方法可以将烷烃的降解率提高 46%。

在石油污染环境,一些具有降解潜力的微生物可能处于可存活但不可培养的状态,这降低了石油污染的生物修复效率。为解决这一问题, Bodor 等<sup>[54]</sup>利用来自藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)的胞外有机物(extracellular organic matter, EOM)作为刺激剂。EOM中含有复苏促进因子(recovery promoting factor, Rpf),能够逆转微生物的低活性状态,从而提高污染土壤的净化效率。与仅进行生物刺激处理相比,

在生物刺激的基础上加入 EOM 以及降解强化菌株红串红球菌(*Rhodococcus erythropolis*) PR4 和庆笙红球菌(*Rhodococcus qingshengii*) KAG C,能够在 60 d 内将润滑油的降解率提高 15%。这是因为 EOM 中的 Rpf 可以重新激活对 EOM 响应的降解细菌[如假单胞菌属(*Pseudomonas*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)以及戈登氏菌属(*Gordonia*)]的活性,从而提升对污染物的降解效果。此外,肉骨粉作为一种动物来源的营养添加剂,与其他添加剂相比更适合刺激微生物的活性。国内有研究<sup>[55]</sup>发现,在添加肉骨粉的情况下,微生物能够在 99 d 内将碳氢化合物含量降低 91.2%,与传统使用尿素的效果相当。然而,使用尿素会导致土壤酸化,而肉骨粉处理下的土壤 pH 可以保持在与自然衰减修复相当的水平,避免了 pH 值剧烈变化对微生物活性的影响。

这些刺激策略和刺激剂的应用可以有效提高石油污染物的降解效率。特别是胞外有机物和肉骨粉等刺激剂,来源于天然有机物或生物提取物,具有低成本的优势以及良好的可降解性,不会造成持久性的环境负荷。目前相关的研究都只是重点关注这些刺激剂对石油污染物的降解效果。然而,在实际应用中,这些刺激剂的长期稳定性也是一个关键的问题。在自然环境中,生物刺激剂可能受到温度、湿度、pH 等因素的影响<sup>[56]</sup>,导致其活性下降或失效,加之这些生物刺激剂都是有机生物材料,在应用过程中可能会被生物不断利用降解,从而可能导致后期修复效果不佳。生物刺激剂对不同类型的石油污染和环境条件可能有不同的适用性,但目前相关研究都只考虑刺激剂在特定污染环境下的效果,对这些刺激剂在其他污染环境是否适用尚不可知,应进一步加强对生物刺激剂的系统模拟评估,评估自然环境中不同条

件,包括污染物类型、浓度、温度、湿度和 pH 等因素对刺激剂的影响,并持续跟踪刺激剂的活性和降解情况。条件允许时,可以考虑采取小批量现场试验以确定生物刺激剂的实际应用效果。对于生物刺激剂,尤其是微生物,其在实际场地中可能需要时间来适应并建立适合污染修复的种群。因此,可以考虑预先对生物刺激剂和土著微生物进行适应性培养,之后共同投加到污染场地中,以提高刺激剂和微生物在现场的活性和降解效率。此外,某些类型的刺激剂,例如电子受体,在发挥作用后会产生代谢产物,这些代谢产物可能会对环境造成二次污染,进一步导致修复效果降低或修复成本提高。因此,在实际应用前,应对所选择使用的刺激剂进行全面的代谢产物评估,分析刺激剂产生的代谢产物的性质和可能的环境影响。针对可能产生有害代谢产物的刺激剂应谨慎选择,必要时可以考虑结合投加菌剂的方法,引入其他降解菌或途径,促进代谢产物的进一步降解或转化。

### 3.1.4 基因工程菌

利用基因工程技术,科研人员可以构建具有增强污染物降解能力的高效工程菌,从而提高对污染物的降解效率。常用的构建基因工程菌的策略包括:诱导突变、基因克隆、基因表达调控以及基因敲除等<sup>[57]</sup>。基于这些策略,研究者们构建了不同类型的石油高效降解基因工程菌。例如,有研究通过增加铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) N6P6 菌株中群体感应基因 *LasI* 和 *RhlI* 的表达促进了酰基高丝氨酸内酯酶的合成以及细胞生物膜的形成,从而提高了多环芳烃的生物转化<sup>[58-59]</sup>。Muneeswari 等<sup>[60]</sup>利用香坊肠杆菌(*Enterobacter xiangfangensis*) STP-3 进行转座子诱导实验,在 2 500 个突变体中筛选出 2 个高产脂蛋白生物表面活性剂的突

变株 M<sub>257E.xiangfangensis</sub> 和 M<sub>916E.xiangfangensis</sub> 与野生型菌株相比,这 2 个突变株的表面活性剂产量分别提高 98%和 134%,对含油污泥中的石油降解率分别达到 82%和 88%。与其他基因操作方法相比,转座子技术具有更高的操作效率和适用性,可实现全基因组范围内的基因筛选和功能研究,在高效降解菌株的筛选研究中具有一定的技术优势。另外, Ji 等<sup>[61]</sup>通过基因克隆的手段将甲酸脱氢酶基因 *fdh* 导入大肠杆菌(*Escherichia coli*)并成功诱导表达,最终基于醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)产生的胞内酶和功能表达的甲酸脱氢酶构建出可进行还原性辅酶 1 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)再生的混合酶制剂。对于含油量为 10% (质量分数)的污泥,使用该混合酶制剂 12 h 后,降解率可达 35.6%。该混合酶制剂可以连续提供还原态 NADH 给石油烃降解酶,可以有效提高降解效率,在含油污泥的大规模修复中具有良好的应用前景。还有研究将基因工程构建的微生物全细胞传感器用于监测石油污染物,可进一步评估污染物的生物可利用性和环境污染毒性,具有简单和经济的优势<sup>[62-63]</sup>。

基因工程技术为生物修复提供了强大的工具,使科研人员能够按照场地需求来构建具有增强污染物降解能力的高效工程菌,为解决石油污染等环境问题提供了新的思路和方法。然而,目前相关研究还只是重点关注对工程菌降解通路和关键酶的改造,全细胞的代谢网络改造与优化还很欠缺。另外,考虑到实际污染场地条件复杂,将基因工程菌应用于大规模石油污染场地修复还面临一些挑战和瓶颈。例如,目前基因工程菌在真实污染场地中可能会面临不同的环境压力以及与土著微生物之间的竞争,从而导致其无法发挥最佳效果。对此,需要进行更多包含不同环境梯度的模拟试验来评

估基因工程菌对复杂环境的适应潜力,并可以考虑将基因工程菌与固定化载体相结合,以确保基因工程菌在复杂环境中具有足够的生存能力。此外,基因工程菌在实际应用中还存在安全性问题<sup>[64]</sup>,在修复污染的同时可能会引入新的基因或代谢产物,从而对环境造成潜在的影响。对此,在导入目标降解基因的同时应考虑能够引导自动灭活的基因,在达到特定修复目标时引导工程菌自动灭活。灭活后如何处理残留的DNA也是一个关键的问题。在实际应用中可以结合降解酶以及紫外线处理等方法,促进残留DNA损伤和降解,以防止未被灭活的DNA在环境中传播和产生潜在的安全风险。解决了上述这些安全性问题才能保证基因工程菌在原位污染修复中的大规模应用,否则建议将基因工程菌仅应用于异位修复。构建完基因工程菌后,大规模获取工程菌的成本也是限制其实际应用的重要因素。现代发酵工艺的应用则可以缩减大规模培养的成本,该工艺配备有自动化控制系统,可以提供更好的培养条件,从而在较短的时间内生产出大量的基因工程菌,并显著降低获取基因工程菌的成本。

### 3.1.5 植物/藻类-微生物联合修复

植物-微生物联合修复技术是利用植物、土壤和微生物的协同作用来促进彼此对环境的适应性,从而提高对石油烃污染物降解能力的修复技术<sup>[65]</sup>,具有环境友好和社会认可度高的优点。一方面,植物根系可以为微生物提供良好的生存环境;另一方面,微生物通过降解石油烃可以为植物提供充足的碳源,并降低石油烃对植物的毒害作用。目前,小麦、油菜、杨树和苕麻等植物已成功应用于土壤修复<sup>[66]</sup>。

近年来,研究人员发现了一些新的高效植物-微生物联合体,包括植物生长促进菌群[酸胞菌(*Acidocella*)、伯克霍尔德菌(*Paraburkholderia*)

和酸杆菌(*Acidobacterium*)-紫花苜蓿联合体]<sup>[67]</sup>、根际促生菌[假节杆菌(*Pseudarthrobacter phenanthrenivorans*)和固氮螺菌(*Azospirillum oryzae*)-玉米联合体]<sup>[68]</sup>等。这些联合体不仅能显著提高石油污染物的降解率,还具备促进植物生长的特性,使得它们在修复受石油污染的土壤中更具适用性和应用潜力。为了更高效地去除土壤中的石油烃,Zhang等<sup>[69]</sup>在鸢尾花-微生物联合修复体系中引入了微米级磁铁矿,并结合外源电极形成导电网络。该导电网络能够消耗细胞外电子,提高功能性微生物的活性,从而促进多环芳烃、二甲苯和嘧啶的降解。与不添加磁铁矿和外源电极的对照组相比,这种改进的联合修复体系将石油烃的降解率提高了174%–232%,具有经济成本可控、现场应用可行的优点。此外,研究人员还发现,将大型藻类墨角藻(*Fucus vesiculosus*)与其附生的烃氧化菌共同暴露于被碳氢化合物污染的水生环境中,经过6 d处理后可消耗80%的石油烃<sup>[70]</sup>。而小球藻(*Chlorella* sp.) MM3和弗罗茨瓦夫红球菌(*Rhodococcus wratislaviensis*)的联合体则能够在30 d内完全降解土壤中10 mg/L的非、萘和苯并萘混合物<sup>[71]</sup>。

尽管植物/藻类-微生物联合修复技术在石油污染的绿色修复中具有巨大的应用潜力,但植物/藻类-微生物联合修复技术通常需要较长的修复周期,无法在短时间内彻底修复污染场地,对于一些亟须修复的场合不太适用。植物-微生物联合修复技术在实际应用中的适用性也容易受到环境条件的限制。例如,在高度污染或难以种植植物的场地,该技术的应用可能不太实际。植物-微生物联合修复体系在降解效果方面的长期稳定性也是值得关注的问题。由于易降解的组分在前期率先被植物和微生物降解,导致后期残留的都是难以降解的石油组分,这些

难降解组分对植物和微生物活性的负面影响可能会在此时凸显出来,从而使降解速率逐渐变慢<sup>[72]</sup>。对此,可以考虑将植物-微生物联合修复技术与生物刺激的方法相结合,在修复后期通过添加适当的生物刺激剂来促进微生物和植物的活性提升,从而维持长期的降解效果。另外,植物-微生物联合修复技术需要投入较高的成本,包括植物引种、微生物添加、维护等费用,限制了其在大规模应用中的可行性和经济性。在实际应用中可以通过优先考虑本土优势植物及其根际微生物的组合来降低此类成本。

### 3.2 不同微生物修复技术的对比及其优化

在实际应用中,影响上述微生物修复技术选择的一个关键因素是修复周期。修复周期受到多种因素的影响,包括污染物类型和浓度、场地条件等<sup>[73]</sup>。但通常来说,基于传统方法改进的生物表面活性剂、生物刺激以及菌剂的修复周期相对较短,一般在数周到数月的时间内就能完成修复。其次是固定化微生物,由于后期来源于生物材料的载体存在被降解的风险,导致降解效果降低,可能需要数月甚至数年的时间来达到修复目标。新的植物-微生物联合体系虽然降解效果有所提升,但相较于其他修复技术,修复时间持续较久<sup>[74]</sup>,一般要数年时间才能完成修复。

改进后的微生物修复技术对石油的降解率和降解速率也是其在实际应用中需要进行权衡的两个重要因素。总体来说,对于有紧急修复需求、需要在有限时间内完成修复以及高浓度污染物存在的项目可以优先考虑以降解速率为主,迅速减少污染物的含量,快速改善受污染环境状况,从而在短时期内减少污染物对环境和生态系统的负面影响。在这种情况下,可以选择以投加高效菌剂、改性生物表面活性剂和生物刺激剂为主的短周期修复技术。当需要

长期修复污染区域或需要达到较高修复效果的情况下,选择以降解率为主更有利于对污染环境进行完整全面的修复。在这种情况下,可以选择将这些改进的微生物修复技术联合使用,以此保证降解效果的稳定性。

影响微生物修复技术大规模推广应用到实际中的另一个重要因素是成本。本综述中提到的相关研究示例,例如固定化载体和生物刺激剂等均来源于生物材料,材料本身以及加工过程具有较低的成本。应用基因工程菌以及生物表面活性剂的成本主要来源于目标产物的大规模获取和分离纯化<sup>[75]</sup>。现阶段发酵工程已经相当成熟,设备工艺也相对完善,大规模获取目标菌株以及生物表面活性剂的成本虽然要高于固定化载体和生物刺激剂的应用成本,但与传统培养和提取的方法相比,成本已经大大降低。相比于其他微生物修复技术,应用改进后的植物-微生物联合修复体系的成本可能相对较高,其修复成本主要源于植物引种、微生物添加、期间维护等,但可以通过利用本土优势植物及其根际微生物的组合来降低此类成本。基于不同修复技术之间的对比,从业人员可以根据场地实际情况以及修复目标等来确定最适合实际应用场景的修复技术。

分子生物技术不仅可以用来挖掘高效降解微生物,还可以与这些改进的微生物修复技术相结合,以此来提高微生物修复技术在实际应用场景中的修复效果。例如,综合运用这些分子生物技术,可以全面了解改性表面活性剂和天然生物刺激剂与降解微生物之间的相互作用机制,以及它们对降解基因的调控效应。通过分析降解微生物的丰度、多样性、功能和基因表达等特征的变化,可以为表面活性剂和生物刺激剂使用的最佳浓度和剂量提供参考。固定化微生物修复技术是载体与微生物共同作用的

结果, 所固定的微生物的降解能力对土壤修复效果有重要的影响。因此, 可以结合宏基因组、宏转录组以及宏蛋白组技术对具备特定降解功能的高效微生物进行筛选。此外, 还可以通过宏基因组和基因芯片探究不同尺寸的固定载体对具有降解功能的微生物群落和基因的影响, 以此来确定最佳的载体尺寸, 从而提高修复效果。基因芯片的应用还可以快速筛选适用于特定污染环境的降解基因, 为高效基因工程菌的构建提供了更加丰富的选择。植物-微生物联合修复技术的修复效果很大程度上也依赖于降解微生物的选择。通过分子生物技术, 可以对改进后的植物-微生物联合修复系统中微生物群落的组成和功能进行深入研究, 了解不同植物和微生物之间的相互作用机制。这有助于筛选适合的降解微生物, 进而优化植物和降解微生物的组合, 提高修复效果。

## 4 总结与展望

分子生物学方法的应用促进了高效降解石油的微生物资源的挖掘, 为修复石油污染场地奠定了基础。微生物修复技术, 例如生物表面活性剂、生物刺激剂等, 也为修复石油污染场地提供了更高效、环保和低成本的选择。然而, 在分子生物方法和微生物修复技术实际应用的过程中还存在较多问题, 例如, 物种注释结果不够全面和精确、检测灵敏度有限、修复技术与本土微生物群落之间的相互作用机制不明确以及难以在实际场地修复中发挥最佳降解效果等。针对上述问题, 未来可从以下几方面来深化微生物修复石油污染的研究。

(1) 提高微生物测序和物种注释的精度。相比于二代测序技术, PacBio 和 Oxford Nanopore 等第三代测序技术具有更长的读长和更高的测序精度。利用第三代测序技术, 可以更深入和

准确地解析石油污染场地中微生物群落的功能和代谢途径。未来研究还需要对下机数据处理的算法进行改进, 加强序列的质控和降噪处理, 提高对高质量数据的筛选。同时, 不断完善和更新物种数据库, 利用机器学习和深度学习等人工智能方法, 对大规模的测序数据进行更精准的分析 and 注释, 从而提高物种注释结果的可信度。

(2) 多组学方法联合使用。随着高通量测序成本的不断降低, 在未来的研究中将多组学技术联合应用将有助于全面诊断石油降解过程中的代谢途径和互作机制。通过直观地分析本土微生物的丰度、多样性、基因表达水平和降解酶等特征的变化, 可以解析修复技术与本土微生物之间的互作机制。另外, 通过构建互作网络模型加强对石油污染场地中微生物相互作用机制的分析, 有助于深入了解降解微生物之间的合作与竞争关系, 从而为构建高效降解复合菌群提供理论依据。

(3) 多种修复技术联合应用。实际污染环境远比实验室模拟的环境复杂, 单一修复技术可能无法达到修复目标。因而在工程实际中为达到最佳修复效率可以采用多种修复技术联合应用的方式, 避免单一修复方法存在的缺陷, 并在修复过程中形成协同效应, 从而提高实际应用中的修复效率。同时, 可以借助于分子生物方法, 对微生物修复技术在实际场地中的应用进行合理的调整和优化。

(4) 研发持久稳定的新型生物材料。将现有的生物材料与材料工程和合成技术相结合, 探究既来源于天然生物材料又具备持久稳定效果的固定化载体和生物刺激剂, 从而提高它们在真实污染环境中的稳定性和耐降解性。但后续如何降低合成材料的制作生产成本并确保材料的环境友好性成为该技术领域需要重点关注的瓶颈问题。

## REFERENCES

- [1] IGUNNU ET, CHEN GZ. Produced water treatment technologies[J]. *International Journal of Low-Carbon Technologies*, 2014, 9(3): 157-177.
- [2] NAEEM U, QAZI MA. Leading edges in bioremediation technologies for removal of petroleum hydrocarbons[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(22): 27370-27382.
- [3] 李书鹏, 康绍果, 刘鹏, 王文峰, 李广贺. 石油污染含水层介质表面活性剂脱附净化效应[J]. *环境工程学报*, 2019, 13(7): 1662-1669.  
LI SP, KANG SG, LIU P, WANG WF, LI GH. Surfactant desorption and purification effect on petroleum contaminated aquifer medium[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2019, 13(7): 1662-1669 (in Chinese).
- [4] 魏样. 土壤石油污染的危害及现状分析[J]. *中国资源综合利用*, 2020, 38(4): 120-122.  
WEI Y. The harm and present situation of soil oil pollution[J]. *China Resources Comprehensive Utilization*, 2020, 38(4): 120-122 (in Chinese).
- [5] 张健. 微生物修复有机污染土壤的研究[J]. *皮革制作与环保科技*, 2023, 4(2): 86-88.  
ZHANG J. Study on remediation of organic contaminated soil by microorganisms[J]. *Leather Manufacture and Environmental Technology*, 2023, 4(2): 86-88 (in Chinese).
- [6] CHEN M, XU P, ZENG G, YANG C, HUANG D, ZHANG J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(6): 745-755.
- [7] MARGULIES M, EGHOLM M, ALTMAN WE, ATTIYA S, BADER JS, BEMBEN LA, BERKA J, BRAVERMAN MS, CHEN YJ, CHEN ZT, DEWELL SB, DU L, FIERRO JM, GOMES XV, GODWIN BC, HE W, HELGESEN S, HO CH, IRZYK GP, JANDO SC, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 376-380.
- [8] ATHANASOPOULOU K, BOTI MA, ADAMOPOULOS PG, SKOUROU PC, SCORILAS A. Third-generation sequencing: the spearhead towards the radical transformation of modern genomics[J]. *Life (Basel, Switzerland)*, 2021, 12(1): 30.
- [9] LAMENDELLA R, STRUTT S, BORGLIN S, CHAKRABORTY R, TAS N, MASON OU, HULTMAN J, PRESTAT E, HAZEN TC, JANSSON JK. Assessment of the deepwater horizon oil spill impact on gulf coast microbial communities[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 130.
- [10] BOUCHEZ T, BLIEUX AL, DEQUIEDT S, DOMAIZON I, DUFRESNE A, FERREIRA S, GODON JJ, HELLAL J, JOULIAN C, QUAISER A, MARTIN-LAURENT F, MAUFFRET A, MONIER JM, PEYRET P, SCHMITT-KOPLIN P, SIBOURG O, D'OIRON E, BISPO A, DEPORTES I, GRAND C, et al. Molecular microbiology methods for environmental diagnosis[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2016, 14(4): 423-441.
- [11] EISENSTEIN M. Microbiology: making the best of PCR bias[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(5): 317-320.
- [12] DANIEL R. The metagenomics of soil[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 470-478.
- [13] PRAKASH T, TAYLOR TD. Functional assignment of metagenomic data: challenges and applications[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2012, 13(6): 711-727.
- [14] BILAL T, MALIK B, HAKEEM KR. Metagenomic analysis of uncultured microorganisms and their enzymatic attributes[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 155: 65-69.
- [15] YUNUSA YR, UMAR ZD. Effective microbial bioremediation *via* the multi-omics approach: an overview of trends, problems and prospects[J]. *UMYU Journal of Microbiology Research (UJMR)*, 2021, 6(1): 127-145.
- [16] MARON PA, RANJARD L, MOUGEL C, LEMANCEAU P. Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(3): 486-493.
- [17] HE Z, van NOSTRAND JD, ZHOU J. Applications of functional gene microarrays for profiling microbial communities[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 460-466.
- [18] NOSTRAND JD, HE ZL, ZHOU JZ. Use of functional gene arrays for elucidating *in situ* biodegradation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 339.
- [19] TIRALERDPANICH P, SONTHIPHAND P, LUEPROMCHAI E, PINYAKONG O, POKETHITIYOOK P. Potential microbial consortium involved in the biodegradation of diesel, hexadecane and phenanthrene in mangrove sediment explored by metagenomics analysis[J]. *Marine Pollution Bulletin*,



- 2018, 133: 595-605.
- [20] BASTIDA F, JEHLICH N, LIMA K, MORRIS BEL, RICHNOW HH, HERNÁNDEZ T, von BERGEN M, GARCÍA C. The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 135: 162-169.
- [21] ATASHGAHI S, HORNUNG B, van der WAALS MJ, da ROCHA UN, HUGENHOLTZ F, NIJSSE B, MOLENAAR D, van SPANNING R, STAMS AJM, GERRITSE J, SMIDT H. A benzene-degrading nitrate-reducing microbial consortium displays aerobic and anaerobic benzene degradation pathways[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 4490.
- [22] CABRAL L, PEREIRA de SOUSA ST, LACERDA JÚNIOR GV, HAWLEY E, DINI ANDREOTE F, HESS M, de OLIVEIRA VM. Microbial functional responses to long-term anthropogenic impact in mangrove soils[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 160: 231-239.
- [23] ZHOU Y, WANG Y, YANG L, KONG Q, ZHANG H. Microbial degradation mechanisms of surface petroleum contaminated seawater in a typical oil trading port[J]. *Environmental Pollution*, 2023, 324: 121420.
- [24] SONG B, LI Z, LI S, ZHANG Z, FU Q, WANG S, LI L, QI S. Functional metagenomic and enrichment metatranscriptomic analysis of marine microbial activities within a marine oil spill area[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 274: 116555.
- [25] McFARLIN KM, PERKINS MJ, FIELD JA, LEIGH MB. Biodegradation of crude oil and corexit 9 500 in Arctic seawater[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1788.
- [26] HAZEN TC, DUBINSKY EA, DESANTIS TZ, ANDERSEN GL, PICENO YM, SINGH N, JANSSON JK, PROBST A, BORGLIN SE, FORTNEY JL, STRINGFELLOW WT, BILL M, CONRAD ME, TOM LM, CHAVARRIA KL, ALUSI TR, LAMENDELLA R, JOYNER DC, SPIER C, BAELUM J, et al. Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria[J]. *Science*, 2010, 330(6001): 204-208.
- [27] KADRI T, ROUISSI T, KAUR BRAR S, CLEDON M, SARMA S, VERMA M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: a review[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 51: 52-74.
- [28] TAŞ N, BRANDT BW, BRASTER M, van BREUKELEN BM, RÖLING WFM. Subsurface landfill leachate contamination affects microbial metabolic potential and gene expression in the Banisveld aquifer[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94(10): f156.
- [29] HERBST FA, BAHR A, DUARTE M, PIEPER DH, RICHNOW HH, von BERGEN M, SEIFERT J, BOMBACH P. Elucidation of *in situ* polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by functional metaproteomics (protein-SIP)[J]. *Proteomics*, 2013, 13(18/19): 2910-2920.
- [30] CAI PP, NING Z, ZHANG NN, ZHANG M, GUO CJ, NIU ML, SHI JS. Insights into biodegradation related metabolism in an abnormally low dissolved inorganic carbon (DIC) petroleum-contaminated aquifer by metagenomics analysis[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(10): 412.
- [31] ZHUANG JG, ZHANG RH, ZENG YF, DAI TJ, YE ZC, GAO Q, YANG YF, GUO X, LI GH, ZHOU JZ. Petroleum pollution changes microbial diversity and network complexity of soil profile in an oil refinery[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1193189.
- [32] WASFI A, AWWAD F, AYESH AI. Graphene-based nanopore approaches for DNA sequencing: a literature review[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 119: 191-203.
- [33] BELL TH, JOLY S, PITRE FE, YERGEAU E. Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches[J]. *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(5): 271-280.
- [34] 钟磊, 卿晋武, 陈红云, 栗高源, 陈冠益, 孙于茹, 李金磊, 宋英今, 颜蓓蓓. 微生物修复石油烃土壤污染技术研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3636-3652.
- ZHONG L, QING JW, CHEN HY, LI GY, CHEN GY, SUN YR, LI JL, SONG YJ, YAN BB. Advances in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(10): 3636-3652 (in Chinese).
- [35] DECESARO A, MACHADO TS, CAPPELLARO ÂC, REINEHR CO, THOMÉ A, COLLA LM. Biosurfactants during *in situ* bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(26): 20831-20843.
- [36] 邓春萍, 肖鹏, 崔学严, 万利琼, 郑舒丽, 王林娟. 表面活性剂对石油污染土壤生物修复的影响研究[J].

- 当代化工研究, 2021(24): 106-108.
- DENG CP, XIAO P, CUI XY, WAN LQ, ZHENG SL, WANG LJ. Effect of surfactant on bioremediation of petroleum contaminated soil[J]. Modern Chemical Research, 2021(24): 106-108 (in Chinese).
- [37] RAM H, KUMAR SAHU A, SAID MS, BANPURKAR AG, GAJBHIYE JM, DASTAGER SG. A novel fatty alkene from marine bacteria: a thermo stable biosurfactant and its applications[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 380: 120868.
- [38] BALAN SS, KUMAR CG, JAYALAKSHMI S. Aneurinifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-11 isolated from Gulf of Mannar: purification, characterization and its biological evaluation[J]. Microbiological Research, 2017, 194: 1-9.
- [39] BEZZA FA, CHIRWA EMN. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN<sub>2</sub>[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 101: 168-178.
- [40] ZARGAR AN, LYMPERATOU A, SKIADAS I, KUMAR M, SRIVASTAVA P. Structural and functional characterization of a novel biosurfactant from *Bacillus* sp. IITD106[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 423: 127201.
- [41] CHRISTOPHER JM, SRIDHARAN R, SOMASUNDARAM S, GANESAN S. Bioremediation of aromatic hydrocarbons contaminated soil from industrial site using surface modified amino acid enhanced biosurfactant[J]. Environmental Pollution, 2021, 289: 117917.
- [42] 姚芙蓉, 李军, 张莹, 阎贺静, 朱凤妹, 周洁芳. 生物表面活性剂生产及应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1889-1901.
- YAO FR, LI J, ZHANG Y, YAN HJ, ZHU FM, ZHOU JF. Recent advances in production and applications of biosurfactants[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1889-1901 (in Chinese).
- [43] 姚丹丹, 王辉, 田坤, 王宁, 代威, 程功弼, 刘云. 土壤多环芳烃污染生物表面活性剂强化修复的研究进展[J]. 应用化工, 2023, 52(1): 164-170.
- YAO DD, WANG H, TIAN K, WANG N, DAI W, CHENG GB, LIU Y. Research on biosurfactant-enhanced remediation in PAHs-contaminated soil[J]. Applied Chemical Industry, 2023, 52(1): 164-170 (in Chinese).
- [44] 钱林波, 元妙新, 陈宝梁. 固定化微生物技术修复 PAHs 污染土壤的研究进展[J]. 环境科学, 2012, 33(5): 1767-1776.
- QIAN LB, YUAN MX, CHEN BL. Research progress about bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with immobilized microorganism technique[J]. Chinese Journal of Environmental Science, 2012, 33(5): 1767-1776 (in Chinese).
- [45] 刘维涛, 李剑涛, 郑泽其, 李法云. 微生物固定化技术修复石油烃污染土壤[J]. 应用技术学报, 2021, 21(4): 339-347.
- LIU WT, LI JT, ZHENG ZQ, LI FY. Microbial immobilization technology for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil[J]. Journal of Technology, 2021, 21(4): 339-347 (in Chinese).
- [46] TAO K, ZHANG X, CHEN X, LIU X, HU X, YUAN X. Response of soil bacterial community to bioaugmentation with a plant residue-immobilized bacterial consortium for crude oil removal[J]. Chemosphere, 2019, 222: 831-838.
- [47] XUE JL, LIU YX, SHI K, QIAO YL, CHENG DL, BAI Y, SHEN CC, JIANG Q. Responses of seawater bacteria in the bioremediation process of petroleum contamination by immobilized bacteria[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2022, 10(2): 107133.
- [48] HAJIEGHRARI M, HEJAZI P. Enhanced biodegradation of n-hexadecane in solid-phase of soil by employing immobilized *Pseudomonas Aeruginosa* on size-optimized coconut fibers[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 389: 122134.
- [49] MARTINS VR, FREITAS CJB, CASTRO AR, SILVA RM, GUDIÑA EJ, SEQUEIRA JC, SALVADOR AF, PEREIRA MA, CAVALEIRO AJ. Corksorb enhances alkane degradation by hydrocarbonoclastic bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 618270.
- [50] 屠明明, 王秋玉. 石油污染土壤的生物刺激和生物强化修复[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(8): 129-134.
- TU MM, WANG QY. Biostimulation and bioaugmentation repair of oil contaminated soil[J]. China Biotechnology, 2009, 29(8): 129-134 (in Chinese).
- [51] SARKAR P, ROY A, PAL S, MOHAPATRA B, KAZY SK, MAITI MK, SAR P. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for *in situ* bioremediation[J]. Bioresource Technology, 2017, 242: 15-27.

- [52] MU J, CHEN Y, SONG Z, LIU M, ZHU B, TAO H, BAO M, CHEN Q. Effect of terminal electron acceptors on the anaerobic biodegradation of PAHs in marine sediments[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 438: 129569.
- [53] MARZOCCHI U, PALMA E, ROSSETTI S, AULENTA F, SCOMA A. Parallel artificial and biological electric circuits power petroleum decontamination: the case of snorkel and cable bacteria[J]. *Water Research*, 2020, 173: 115520.
- [54] BODOR A, BOUNEDJOUR N, FEIGL G, DUZS Á, LACZI K, SZILÁGYI Á, RÁKHELY G, PEREI K. Exploitation of extracellular organic matter from *Micrococcus luteus* to enhance *ex situ* bioremediation of soils polluted with used lubricants[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 417: 125996.
- [55] LIU XX, SELONEN V, STEFFEN K, SURAKKA M, RANTALAINEN AL, ROMANTSCHUK M, SINKKONEN A. Meat and bone meal as a novel biostimulation agent in hydrocarbon contaminated soils[J]. *Chemosphere*, 2019, 225: 574-578.
- [56] 祁慧鹂, 朱国繁, 王鑫伟, 孙明明, 王风贺, 张胜田, 叶茂, 蒋新. 农药污染土壤生物刺激修复技术研究进展[J]. *土壤*, 2021, 53(2): 221-228.  
QI HY, ZHU GF, WANG XW, SUN MM, WANG FH, ZHANG ST, YE M, JIANG X. Biostimulation methods for remediation of pesticide-contaminated soil: a review[J]. *Soils*, 2021, 53(2): 221-228 (in Chinese).
- [57] LIU L, BILAL M, DUAN X, IQBAL HMN. Mitigation of environmental pollution by genetically engineered bacteria—current challenges and future perspectives[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 667: 444-454.
- [58] CHONG G, KIMYON O, RICE SA, KJELLEBERG S, MANEFIELD M. The presence and role of bacterial quorum sensing in activated sludge[J]. *Microbial Biotechnology*, 2012, 5(5): 621-633.
- [59] MANGWANI N, KUMARI S, DAS S. Involvement of quorum sensing genes in biofilm development and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* N6P6[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(23): 10283-10297.
- [60] MUNEESWARI R, IYAPPAN S, SWATHI KV, VINU R, RAMANI K, SEKARAN G. Biocatalytic lipoprotein bioamphiphile induced treatment of recalcitrant hydrocarbons in petroleum refinery oil sludge through transposon technology[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 431: 128520.
- [61] JI L, FU XW, WANG MT, XU C, CHEN GH, SONG FY, GUO SH, ZHANG Q. Enzyme cocktail containing NADH regeneration system for efficient bioremediation of oil sludge contamination[J]. *Chemosphere*, 2019, 233: 132-139.
- [62] LEHTINEN T, SANTALA V, SANTALA S. Twin-layer biosensor for real-time monitoring of alkane metabolism[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(6): fnx053.
- [63] PATEL R, ZAVERI P, MUKHERJEE A, AGARWAL PK, MORE P, MUNSHI NS. Development of fluorescent protein-based biosensing strains: a new tool for the detection of aromatic hydrocarbon pollutants in the environment[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 182: 109450.
- [64] 宫兆波, 郭瑛瑛, 张燕萍, 杨永霞, 赵增义, 刘艳伟, 史斌, 毕磊, 阴永光, 宋茂勇. 基因工程菌在石油污染修复中的研究进展与前景[J]. *环境化学*, 2024, 43(1): 1-13.  
GONG ZB, GUO YY, ZHANG YP, YANG YX, ZHAO ZY, LIU YW, SHI B, BI L, YIN YG, SONG MY. The application of genetically engineered bacteria in petroleum hydrocarbon pollution remediation: progress and challenges[J]. *Environmental Chemistry*, 2024, 43(1): 1-13 (in Chinese).
- [65] 申春妮, 曹小方, 李腾, 方祥位, 张伟, 余咏平. 植物-微生物联合修复柴油污染土试验研究[J]. *土木与环境工程学报(中英文)*, 2023, 45(3): 145-153.  
SHEN CN, CAO XF, LI T, FANG XW, ZHANG W, YU YP. Experimental study on remediation of diesel contaminated soil by plant-microorganism combination[J]. *Journal of Civil and Environmental Engineering*, 2023, 45(3): 145-153 (in Chinese).
- [66] 康凯璇, 兰秀茹, 付娜, 赵静. 生物技术在石油污染修复领域的最新进展[J]. *石油化工安全环保技术*, 2015, 31(5): 71-75, 4.  
KANG KX, LAN XR, FU N, ZHAO J. The latest progress of biotechnology in the field of oil pollution remediation[J]. *Petrochemical Safety and Environmental Protection Technology*, 2015, 31(5): 71-75, 4 (in Chinese).
- [67] EZE MO, THIEL V, HOSE GC, GEORGE SC, DANIEL R. Enhancing rhizoremediation of petroleum hydrocarbons through bioaugmentation with a plant growth-promoting bacterial consortium[J]. *Chemosphere*, 2022, 289: 133143.
- [68] SAEED M, ILYAS N, ARSHAD M, SHEERAZ M, AHMED I, BHATTACHARYA A. Development of a

- plant microbiome bioremediation system for crude oil contamination[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9(4): 105401.
- [69] ZHANG X, LI R, WANG J, LIAO C, ZHOU L, AN J, LI T, WANG X, ZHOU Q. Construction of conductive network using magnetite to enhance microflora interaction and petroleum hydrocarbons removal in plant-rhizosphere microbial electrochemical system[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 433: 133600.
- [70] RYZHIK I, PUGOVKIN D, MAKAROV M, ROLEDA MY, BASOVA L, VOSKOBOYNIKOV G. Tolerance of *Fucus vesiculosus* exposed to diesel water-accommodated fraction (WAF) and degradation of hydrocarbons by the associated bacteria[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 254: 113072.
- [71] SUBASHCHANDRABOSE SR, VENKATESWARLU K, VENKIDUSAMY K, PALANISAMI T, NAIDU R, MEGHARAJ M. Bioremediation of soil long-term contaminated with PAHs by algal-bacterial synergy of *Chlorella* sp. MM3 and *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9 in slurry phase[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 659: 724-731.
- [72] 樊鑫, 刘璐. 生物修复技术在石油污染治理中的应用研究进展[J]. *现代化工*, 2021, 41(12): 64-68.  
FAN X, LU L. Research progress on application of bioremediation technology in petroleum pollution control[J]. *Modern Chemical Industry*, 2021, 41(12): 64-68 (in Chinese).
- [73] 郑瑾, 付雅丽, 宋权威, 谢加才, 林双君, 梁如冰. 微生物强化修复石油污染土壤的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3622-3635.  
ZHENG J, FU YL, SONG QW, XIE JC, LIN SJ, LIANG RB. Advances in the bioaugmentation-assisted remediation of petroleum contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(10): 3622-3635 (in Chinese).
- [74] 王秀璞, 张慧, 王语萱, 李彦, 杜道林. 水生植物-微生物联合去除水体有机污染物的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4918-4931.  
WANG XP, ZHANG H, WANG YX, LI Y, DU DL. Application of aquatic plant-microbe association in removal of organic pollutants in water bodies: a review[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4918-4931 (in Chinese).
- [75] 顾信娜, 陈辉, 李珊珊, 成卓韦, 陈建孟, 蒋轶锋. 生物表面活性剂的产生及其在环境污染治理中的应用[J]. *环境科学与技术*, 2012, 35(61): 155-162.  
GU XN, CHEN H, LI SS, CHENG ZW, CHEN JM, JIANG YF. Biosurfactant production and its application in the environmental pollution control[J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 35(61): 155-162 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)