

石油污染盐碱土壤翅碱蓬根围的细菌多样性及耐盐石油烃降解菌筛选

王新新 白志辉 金德才 韩祯 庄国强*

(中国科学院生态环境研究中心 北京 100085)

摘要: 为了更好地了解石油污染盐碱土壤翅碱蓬根围的细菌多样性, 采用 16S rRNA 基因克隆文库方法对其进行分析, 在此基础上采用富集培养方法从该生境中分离筛选耐盐石油烃降解菌。16S rRNA 基因克隆文库分析结果表明, 海杆菌属(*Marinobacter*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)是该生境中的优势菌。他们可能在石油污染盐碱土壤翅碱蓬植物修复过程中起重要作用。进一步采用富集培养方法, 从该生境中分离得到 8 株耐盐石油烃降解菌, 可以耐受 6%–10%浓度的 NaCl, 石油烃降解率在 32.3%–57.0%之间。经 16S rRNA 基因序列分析, 8 株菌隶属于戈登氏菌属(*Gordonia*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、迪茨菌属(*Dietzia*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)。他们可能参与石油污染盐碱土壤翅碱蓬植物修复过程中的石油烃降解。

关键词: 石油污染盐碱土壤, 翅碱蓬, 细菌多样性, 耐盐石油烃降解菌, 16S rRNA 基因克隆文库

Bacterial diversity and halotolerant petroleum-degrading bacteria of the rhizosphere of *Suaeda salsa* (L.) in petroleum-contaminated saline-alkali soil

WANG Xin-Xin BAI Zhi-Hui JIN De-Cai HAN Zhen ZHUANG Guo-Qiang*

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

Abstract: Bacterial community associated with *Suaeda salsa* (L.) rhizosphere in petroleum-contaminated saline-alkali soil was investigated by 16S rRNA gene clone library analysis. Halotolerant petroleum-degrading bacteria were further isolated by enrichment using petroleum as the sole source of carbon and energy. *Marinobacter*, *Alcanivorax* and *Pseudomonas* dominated *Suaeda salsa* (L.) rhizosphere in petroleum-contaminated saline-alkali soil as revealed by 16S rRNA gene clone

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(No. kzcx1-yw-06-03); 北京市科技计划项目(No. D101105046410004); 天津市科技支撑计划项目(No. 11 ZCGYSFO1400)

* 通讯作者: Tel: 86-10-62849613; 信箱: gqzhuang@rcees.ac.cn

收稿日期: 2011-06-10; 接受日期: 2011-09-28

library analysis, which were likely to have a role in the phytoremediation of such soil by *Suaeda salsa* (L.). Eight halotolerant petroleum-degrading bacterial strains were isolated, which could grow up to 6%–10% NaCl, and could degrade 32.3%–57.0% petroleum hydrocarbon in 3% NaCl over a period of 14 days. They were identified to belong to the genus of *Gordonia*, *Achromobacter*, *Dietzia*, *Bacillus* and *Pseudomonas* by 16S rRNA gene sequence analysis. They may involve in the degradation of petroleum in the phytoremediation of such soil by *Suaeda salsa* (L.).

Keywords: Petroleum-contaminated saline-alkali soil, *Suaeda salsa* (L.), Bacterial diversity, Halotolerant petroleum-degrading bacteria, 16S rRNA gene clone library

我国大庆油田、胜利油田和大港油田的土壤均有不同程度的盐碱化^[1-2]。石油生产过程中容易发生石油污染,形成石油污染盐碱土壤,亟待修复^[3]。尽管植物修复措施已经成功应用于石油污染土壤的修复实践^[4],但是由于该类土壤含盐量高、pH 高,植物难以生长,限制了传统植物修复措施的开展。翅碱蓬对盐碱土壤具有较好的适应性,同时可以促进土壤石油烃降解,对修复该类土壤具有明显效果^[5-6]。植物根围是土壤-植物-微生物相互作用的一个特殊区域,特别是根围微生物在有机污染物植物修复过程中起着重要作用^[7-8]。然而关于石油污染盐碱土壤翅碱蓬根围的微生物多样性的研究罕见报道,特别对该生境中耐盐石油烃降解菌的认识十分有限。

本研究通过 16S rRNA 基因克隆文库方法对该生境中的细菌多样性进行分析,并进一步采用富集培养方法分离鉴定耐盐石油烃降解菌,以期为了解该生境的微生物多样性提供线索,为该类土壤的植物修复提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试土壤采自大港油田的盐碱化区域(38° 42' 12" N, 117° 29' 23" E),该处生长有大量的翅碱蓬。按五点取样法选取翅碱蓬植株,去除 0–5 cm 的表层

土壤,将根系挖出,轻轻抖落根系外围的大土块,收集附着在根系上的土壤,置于冰盒中带回实验室。样品分为两部分:一部分 4 °C 保存,用于土壤微生物分析;另一部分自然风干,过 2 mm 筛,–20 °C 保存,用于土壤理化性质分析。采用重量法^[9]测定总石油烃(Total petroleum hydrocarbon, TPH)含量,采用常规分析方法^[10]分析土壤的含盐量、pH、含水量、有机质、全氮、有效磷和有效钾等基本理化性质,结果如表 1 所示。

1.2 16S rRNA 基因克隆文库分析

采用 Zhou 等^[11]报道的方法从土壤样品中提取总 DNA。利用琼脂糖凝胶回收试剂盒(Omega Bio-tek Inc., GA, USA)进行 DNA 纯化。以细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增^[12]。引物 27F 为: 5'-AGAGTTTGTGATCMTGGCTCAG-3', 引物 1492R 为: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-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 dNTPs 混合溶液 4 μL, 10 mmol/L 引物各 1 μL, 5 U/μL *Taq* 酶 0.25 μL, ddH₂O 36.75 μL。扩增反应程序为 94 °C 10 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 扩增产物采用 E.Z.N.A. Gel Extraction Kit 试剂盒(Omega Bio-tek Inc., GA, USA)进行纯化,按照产品说明书经切胶、融化、硅胶柱吸附、漂洗、洗脱等步骤获得纯化的 PCR 扩增产物。用 pGEM-T Easy

表 1 供试土壤的基本理化性质
Table 1 Physical and chemical properties of the soil

TPH 含量 TPH content (g/kg)	含盐量 Salinity (%)	pH	含水量 Moisture (%)	有机质 Organic matter (g/kg)	全氮 Total nitrogen (mg/kg)	有效磷 Available P (mg/kg)	有效钾 Available K (mg/kg)
10.5±2.5	1.8±0.1	8.3±0.1	15.3±5.9	17.4±3.4	418.5±12.0	27.9±2.4	750.0±67.9

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* DH5 α 细胞, 涂布于含有 Amp/IPTG/X-gal 的抗性筛选平板, 37 °C 培养 12–16 h。用蓝白斑筛选的方法挑取阳性克隆。

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/ μ L *Msp* I 0.25 μ L, 10 U/ μ L *Rsa* I 0.25 μ L, ddH₂O 7.5 μ L。37 °C 温浴 3 h, 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, OUT)。采用 ABI 3730 XL DNA analyzer 测序仪(Applied Biosystems, CA, USA)对阳性克隆进行测序分析。

1.3 耐盐石油烃降解菌的富集和分离

将 20 g 根围土壤接入 180 mL 以石油烃为唯一碳源的无机盐培养基中^[13]。置于 30 °C 恒温摇床 120 r/min 富集培养 30 d。取 20 mL 富集培养液, 接入 180 mL 以石油烃为唯一碳源的新鲜无机盐培养基中。重复上述操作, 不断提高培养基中的 NaCl 浓度至 3%。采用稀释平板涂布法和平板划线法, 从含有 3% NaCl 的以石油烃为唯一碳源的无机盐培养基平板上分离纯化单菌落。

1.4 耐盐石油烃降解菌的生长特性和降解特性

将分离得到的菌株接种到牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 观察菌落形态。以 10%的接种量接种到含有 2%–10% NaCl 的牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 30 °C 恒温摇床 120 r/min 培养 96 h, 测定培养液 OD₆₀₀, 考察菌株对 NaCl 的耐受能力。分别以 10%的接种量接种到含有 3% NaCl 的以石油烃、正十六烷和多环芳烃萘为唯一碳源的无机盐培养基中, 30 °C 恒温摇床 120 r/min 培养 14 d。以不添加任何烃类底物的接菌培养液做空白对照, 测定培养液 OD₆₀₀, 结合稀释平板计数法, 换算为细菌浓度, 考察菌株在以烃类底物为唯一碳源无机盐培养基中的

生长情况。采用三氯甲烷提取培养液中残留的石油烃, 以未接菌的培养液做空白对照, 重量法测定 TPH 含量, 考察菌株对石油烃的降解能力。

1.5 耐盐石油烃降解菌的鉴定

采用细菌 DNA 提取试剂盒(Omega Bio-tek Inc., GA, USA)提取菌株基因组 DNA。DNA 纯化、PCR 扩增、PCR 产物的连接转化、阳性克隆子的筛选和测序分析同 1.2。

1.6 序列分析

将得到的序列用 Bellerophon 程序^[14]和 Mallard 程序^[15]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。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 软件采用 Neighbor-Joining 方法和 Jukes-Cantor 模型进行系统发育分析, 构建系统发育树。同时重复取样 1 000 次进行自展值(Bootstrap)分析来评估系统发育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 为文库容量)计算文库覆盖率。通过 Analytic Rarefaction 1.3 软件绘制稀缺性曲线。本研究中克隆文库和纯菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中的登录号分别为: JF727666–JF727748 和 JF727657–JF727665。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因克隆文库分析

对石油污染盐碱土壤翅碱蓬根围土壤微生物构建 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, 共获得 83 个 OTU。Analytic Rarefaction 软件分析结果表明, 该克隆文库的稀缺性曲线均趋于平缓(图 1)。克隆文库覆盖率为 65.1%。这表明克隆文库库容较大, 挑取的克隆子可以较为充分地反映该土壤样品中的微生物多样性。

将获得的 166 个 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析, 结果如图 2 所示。部分序列无法确定所

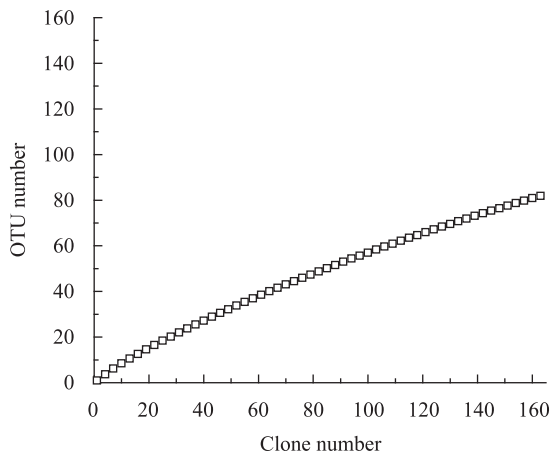


图1 16S rRNA 基因克隆文库稀有度曲线
Fig. 1 Rarefaction curves for 16S rRNA gene clone library

属类群, 标记为“Unclassified bacteria”。该土壤样品具有较高的微生物多样性, 包括 Actinobacteria、“Unclassified bacteria”、Nitrospira、Planctomycete、Verrucomicrobia、Acidobacteria、Firmicutes、Chloroflexi、 γ 、 α 、 δ -Proteobacteria 和 Bacteroidetes 共 12 个类群。其中 γ -Proteobacteria 是优势类群, 占该克隆文库的 43.4%。

对获得的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树,

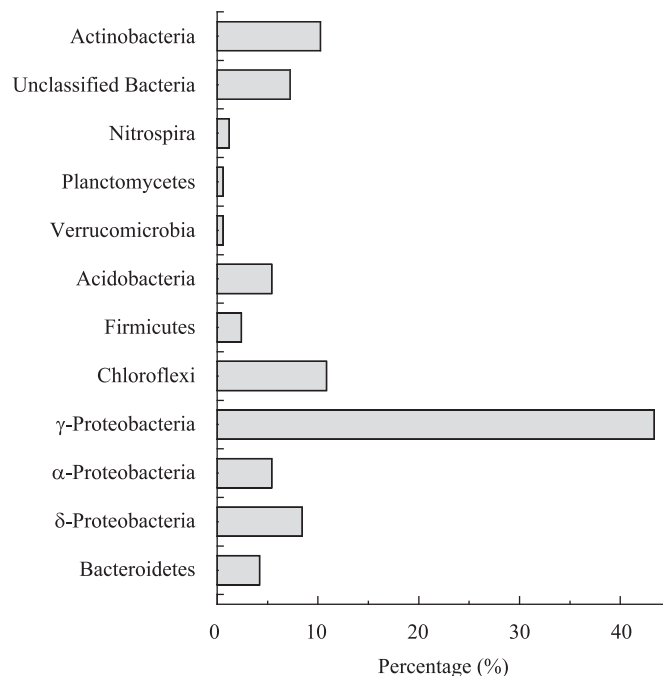


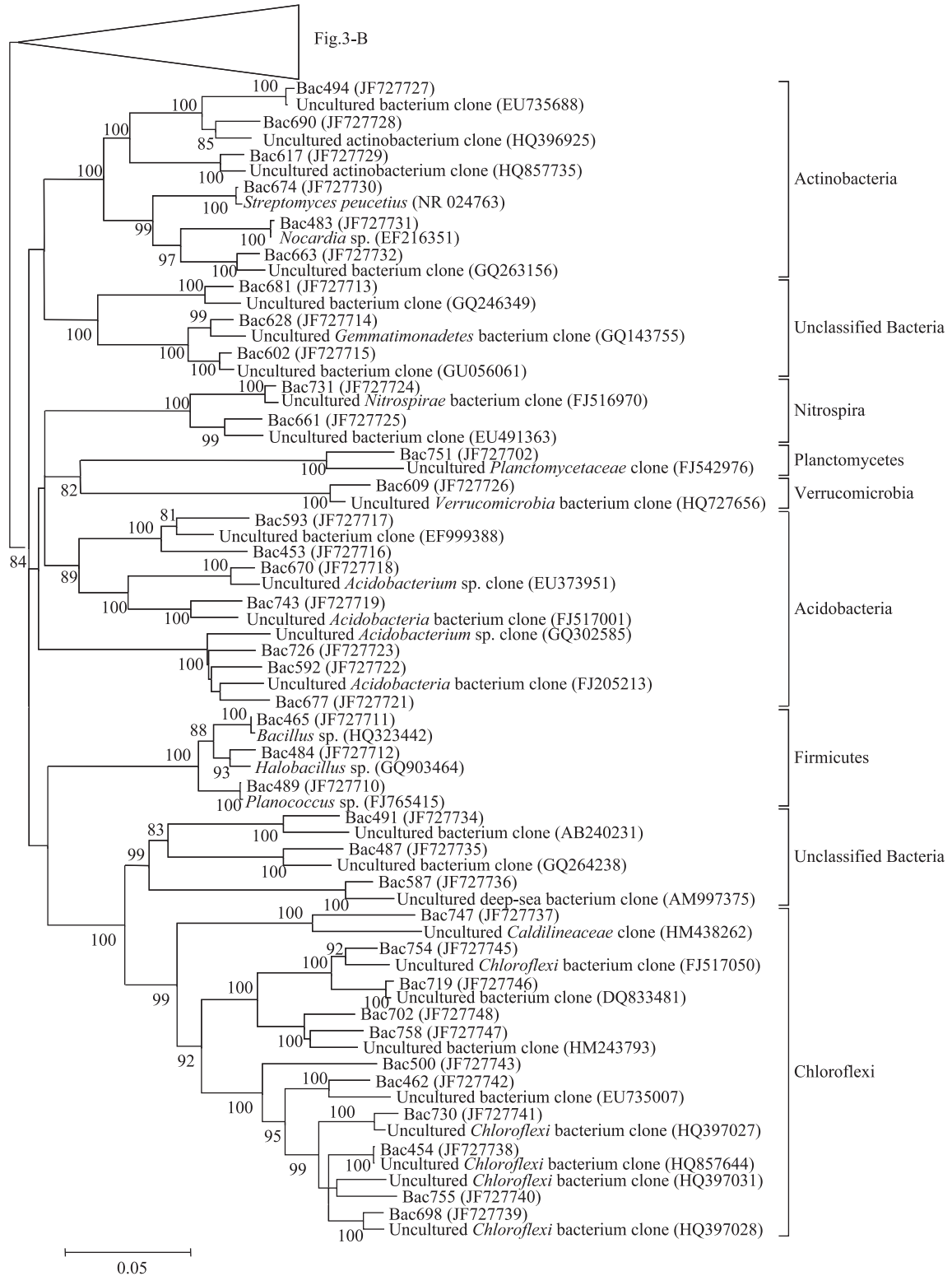
图2 16S rRNA 基因克隆文库中的微生物类群
Fig. 2 Microbial groups identified from 16S rRNA gene clone library

结果如图 3 所示。OTU Bac760 为克隆文库中的优势 OTU, 占克隆文库的 18.1%, 与分离于底泥的海杆菌 (*Marinobacter*) CF6-10 具有 98.7% 的序列同源性^[16]。OTU Bac669 占克隆文库的 10.8%, 与食烷菌 (*Alcanivorax*) Oha-1 具有 99.5% 的序列同源性。OTU Bac486 占克隆文库的 3.0%, 与假单胞菌 (*Pseudomonas*) BSs20169 具有 99.4% 的序列同源性。

2.2 耐盐石油烃降解菌的分离

通过富集驯化及分离纯化等步骤, 进一步经过复筛, 共得到菌落形态明显不同的 8 株耐盐石油烃降解菌, 其表型特征如表 2 所示。获得的 8 株菌可以在 6%–10% NaCl 的环境中生长, 说明他们对高盐环境具有一定的耐受性。特别是菌株 H1 可以耐受 10% 的 NaCl, 显示出对高盐环境具有较好的耐受性。8 株耐盐石油烃降解菌以烃类为唯一碳源和能源生长的生物量和石油烃降解率如表 3 所示。8 株菌均可以利用石油烃和正十六烷做为唯一碳源和能源生长, 特别是菌株 H2 还可以利用多环芳烃萘做为唯一碳源和能源生长。8 株菌的石油烃降解率在 32.3%–57.0% 之间, 其中菌株 H1 的石油烃降解率最高, 显示出较强的降解能力。

A



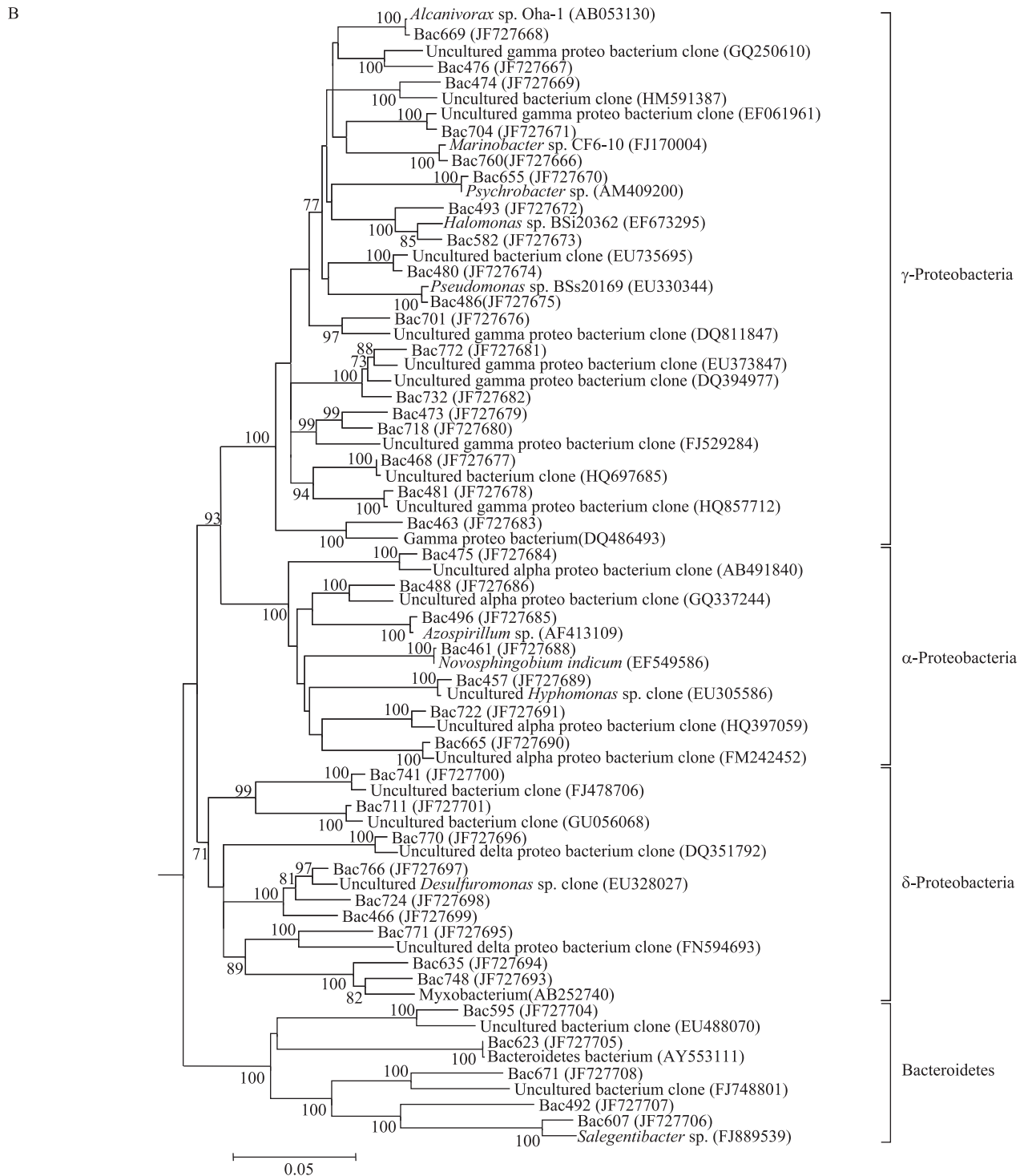


图3 16S rRNA 基因克隆文库的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of the obtained clones

注: A: 放线菌门, 未确定的细菌, 硝化螺旋菌门, 浮霉菌门, 疣微菌门, 酸杆菌门, 厚壁菌门和绿弯菌门; B: γ , α , δ -变形菌门和拟杆菌门; 括号内为序列登录号; 标尺代表 0.05 进化距离单位; Bootstrap 值(百分值)标注在分支处。

Note: A: Actinobacteria, Unclassified bacteria, Nitrospira, Planctomycete, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Firmicutes and Chloroflexi; B: γ , α , δ -Proteobacteria, and Bacteroidetes. GenBank accession numbers are given in parentheses. The scale bar indicates the 0.05 evolutionary distance unit. Bootstrap values (percent) are shown at branch nodes.

表 2 耐盐石油烃降解菌的菌落形态和 NaCl 耐受能力
Table 2 Colony morphology and NaCl tolerance of the halotolerant bacteria

菌株 Strains	菌落形态 Colony morphology	NaCl 耐受 NaCl tolerance				
		2%	4%	6%	8%	10%
H1	鲜红色, 表面湿润, 不透明, 圆形, 凸起	+	+	+	+	+
H2	白色, 表面湿润, 透明, 圆形	+	+	+	-	-
H3	浅黄色, 表面干燥, 略透明, 边缘不规则	+	+	+	+	-
H4	浅黄色, 表面湿润, 透明, 圆形	+	+	+	+	-
H5	浅黄色, 表面湿润, 透明, 边缘不规则	+	+	+	+	-
H8	棕黄色, 表面干燥, 略透明, 边缘不规则	+	+	+	+	-
H18	白色, 表面干燥, 不透明, 圆形	+	+	+	-	-
H20	橘红色, 表面湿润, 不透明, 圆形, 凸起	+	+	+	+	-

表 3 耐盐石油烃降解菌以烃类为唯一碳源和能源生长的生物量和石油烃降解率
Table 3 Biomass and petroleum degradation of the halotolerant bacteria with hydrocarbons as sole sources of carbon and energy

菌株 Strains	生物量 Biomass [log(cell/mL)]				石油烃降解率 Petroleum degradation (%)
	无烃类底物对照 Control without hydrocarbon	石油烃 Petroleum	正十六烷 <i>n</i> -Hexadecane	萘 Naphthalene	
	H1	7.1±0.1 ^a	8.8±0.1 ^b	8.5±0.3 ^b	
H2	7.4±0.0 ^a	8.7±0.3 ^{b,c}	9.0±0.2 ^b	8.3±0.3 ^c	41.5±2.3
H3	7.7±0.2 ^a	8.9±0.6 ^b	8.8±0.3 ^b	7.8±0.1 ^a	37.6±0.3
H4	7.7±0.0 ^a	9.1±0.4 ^b	8.9±0.3 ^b	7.8±0.2 ^a	37.4±6.6
H5	7.7±0.1 ^a	8.5±0.3 ^b	8.9±0.4 ^b	7.7±0.1 ^a	38.6±2.3
H8	7.7±0.1 ^a	8.7±0.5 ^b	8.7±0.1 ^b	7.7±0.1 ^a	39.8±11.8
H18	7.1±0.1 ^a	8.5±0.1 ^b	8.4±0.4 ^b	7.4±0.1 ^a	32.3±6.2
H20	7.2±0.2 ^a	8.3±0.1 ^b	8.3±0.2 ^b	7.3±0.1 ^a	35.7±3.7

注: 数据为平均值±标准差. 每行不同小写字母表示显著差异 ($P<0.05$).

Note: Values are shown as means ± standard deviation. Different lowercase letters in the same row indicate significant difference ($P<0.05$).

采用 16S rRNA 基因序列分析对所获得的 8 株耐盐石油烃降解菌进行鉴定, 构建系统发育树(图 4)。菌株 H1 与土地戈登氏菌(*Gordonia terrae*) DSM43249^T 的同源性最高(99.7%)。菌株 H2 与少见无色杆菌(*Achromobacter insolitus*) LMG6003^T 的同源性最高(99.0%)^[17], 但是与拉氏无色杆菌(*Achromobacter ruhlandii*) ATCC15749^T、反硝化无色杆菌(*Achromobacter denitrificans*) DSM 30026^T 和木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*) DSM10346^T 同样显示出较高的序列同源性。因此, 菌株 H2 仅可鉴定到属的水平, 进一步的鉴定还需 DNA 杂交等实验。菌株 H3 和 H8 与施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) ATCC17588^T 同源性最高,

序列同源性分别为 99.3%和 99.9%。菌株 H4 和 H5 与黄色海假单胞菌(*Pseudomonas xanthomarina*) KMM1447^T 同源性最高^[18], 序列同源性分别为 98.9%和 98.6%。菌株 H18 与罕见芽孢杆菌(*Bacillus barbaricus*) VII-B3-A2^T 同源性最高, 为 99.1%^[19]。菌株 H20 与海迪茨氏菌(*Dietzia maris*) DSM43672^T 同源性最高, 为 99.8%^[20]。

3 讨论

本研究发现 γ -Proteobacteria 是石油污染盐碱土壤翅碱蓬根围的优势类群, 这一结果与 Lee 等^[21]的报道一致。进一步的分析表明海杆菌属(*Marinobacter*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)和假单胞菌

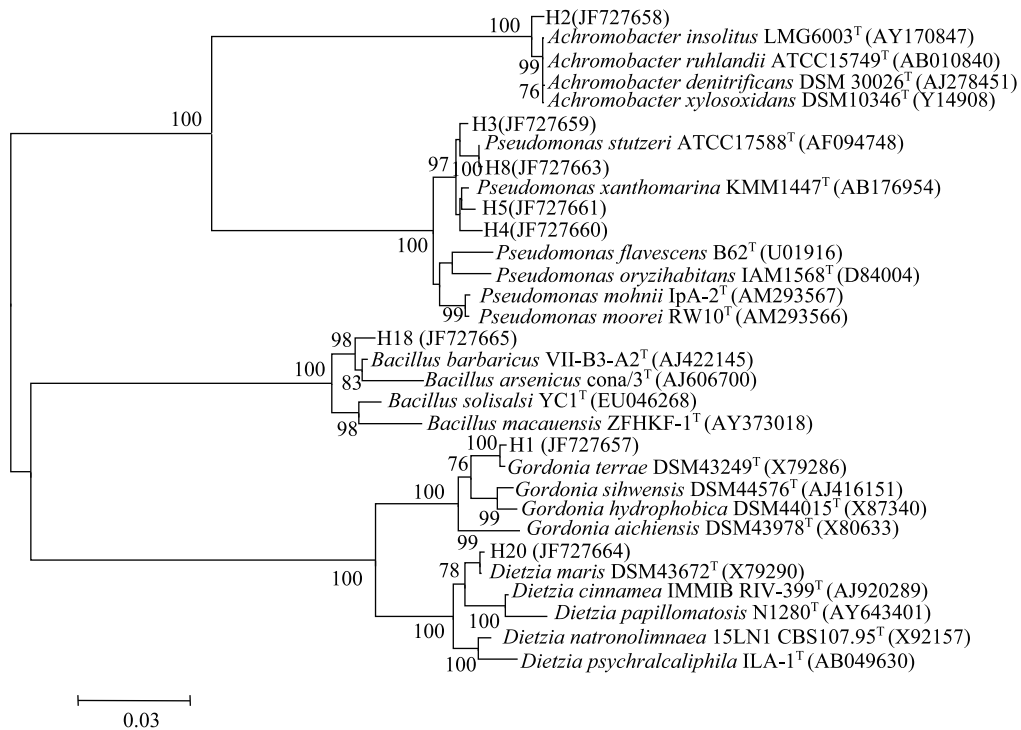


图 4 石油污染盐碱土壤翅碱蓬根围的耐盐石油降解菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the halotolerant petroleum-degrading bacteria associated with *Suaeda salsa* (L.) rhizosphere in petroleum-contaminated saline-alkali soil

属(*Pseudomonas*)是该生境中的优势菌。这与罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)和伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)是烃类污染非盐碱土壤植物根际优势菌的报道不同^[22],可能是由于本研究土壤具有较高的盐碱化程度所造成的。这也进一步暗示了它们可能是该生境中的特有种群。海杆菌属(*Marinobacter*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)均可以在高盐环境下降解烃类污染物^[13,23-24]。因此,他们可能在石油污染盐碱土壤翅碱蓬植物修复过程中起重要作用。

进一步从该生境中分离得到 8 株耐盐石油烃降解菌,分别属于戈登氏菌属(*Gordonia*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、迪茨菌属(*Dietzia*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)。这 8 株菌均具有在高盐环境下降解石油烃的能力,这与文献报道一致^[24-28]。特别是菌株 H2 还可以利用多环芳烃萘做为唯一碳源和能源生长,暗示了该菌株对芳香烃化合物的降解能力。因此,他们可能参与石

油污染盐碱土壤翅碱蓬植物修复过程中的石油烃降解。

16S rRNA 基因克隆文库分析表明海杆菌属(*Marinobacter*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)是该生境中的优势菌,尽管我们筛选了多株耐盐石油烃降解菌,但并未获得海杆菌属(*Marinobacter*)和食烷菌属(*Alcanivorax*)的纯培养菌株,这可能是由于这两个属菌株的培养条件较为特殊所致。进一步改良分离培养条件可能会分离得到这两个属的菌株。尽管如此,具有耐盐石油烃降解能力的假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株的成功分离支持了 16S rRNA 基因克隆文库中该属菌株大量存在的实验结果,进一步暗示了该属在石油污染盐碱土壤翅碱蓬植物修复过程中的重要作用。

4 结论

海杆菌属(*Marinobacter*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)是石油污染盐碱土壤

翅碱蓬根围土壤中的优势菌,他们可能在该类土壤翅碱蓬植物修复过程中起重要作用。戈登氏菌属(*Gordonia*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、迪茨菌属(*Dietzia*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等耐盐石油烃降解菌可能参与该类土壤翅碱蓬植物修复过程中的石油烃降解。

参 考 文 献

- [1] Yang JC, Zhang SW, Li Y, et al. Dynamics of saline-alkali land and its ecological regionalization in western Songnen Plain, China[J]. Chinese Geographical Science, 2010, 20(2): 159–166.
- [2] Weng YL, Gong P, Zhu ZL. A spectral index for estimating soil salinity in the Yellow River Delta region of China using EO-1 Hyperion data[J]. Pedosphere, 2010, 20(3): 378–388.
- [3] Zhang K, Hua XF, Han HL, et al. Enhanced bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil using wheat straw[J]. Chemosphere, 2008, 73(9): 1387–1392.
- [4] Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, et al. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses[J]. Chemosphere, 2010, 81(9): 1084–1090.
- [5] 何洁, 贺鑫, 高钰婷, 等. 石油对翅碱蓬生长及生理特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(4): 650–655.
- [6] 许崇彦, 刘宪斌, 刘占广, 等. 翅碱蓬对石油烃污染的海岸带修复的初步研究[J]. 安全与环境学报, 2007, 7(1): 37–39.
- [7] Kirkpatrick WD, White PM Jr, Wolf DC, et al. Petroleum-degrading microbial numbers in rhizosphere and non-rhizosphere crude oil-contaminated soil[J]. International Journal of Phytoremediation, 2008, 10(3): 210–221.
- [8] Yateem A, Al-Sharrah T, Bin-Haji A. Investigation of microbes in the rhizosphere of selected trees for the rhizoremediation of hydrocarbon-contaminated soils[J]. International Journal of Phytoremediation, 2008, 10(4): 311–324.
- [9] Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, 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.
- [10] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 106–196.
- [11] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316–322.
- [12] Hollister EB, Engledow AS, Hammett AJM, 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] Dastgheib SMM, Amoozegar MA, Khajeh K, et al. A halotolerant *Alcanivorax* sp. strain with potential application in saline soil remediation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(1): 305–312.
- [14] Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments[J]. Bioinformatics, 2004, 20(14): 2317–2319.
- [15] Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, 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.
- [16] Zhou MY, Chen XL, Zhao HL, et al. Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the South China Sea[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(3): 582–590.
- [17] Coenye T, Vancanneyt M, Falsen E, et al. *Achromobacter insolitus* sp. nov. and *Achromobacter spanius* sp. nov., from human clinical samples[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(6): 1819–1824.
- [18] Romanenko LA, Uchino M, Falsen E, et al. *Pseudomonas xanthomarina* sp. nov., a novel bacterium isolated from marine ascidian[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2005, 51(2): 65–71.
- [19] Täubel M, Kämpfer P, Buczolis S, et al. *Bacillus barbaricus* sp. nov., isolated from an experimental wall painting[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(3): 725–730.
- [20] Rainey FA, Klatt S, Kroppenstedt RM, et al. *Dietzia*, new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1995, 45(1): 32–36.
- [21] Lee EH, Cho KS, Kim J. Comparative study of rhizobacterial community structure of plant species in oil-contaminated soil[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(9): 1339–1347.
- [22] Palmroth MRT, Koskinen PEP, Kaksonen AH, et al. Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals[J]. Biodegradation, 2007, 18(6): 769–782.
- [23] Gauthier MJ, 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] Brusa T, Borin S, Ferrari F, et al. Aromatic hydrocarbon

- degradation patterns and catechol 2, 3-dioxygenase genes in microbial cultures from deep anoxic hypersaline lakes in the eastern Mediterranean sea[J]. *Microbiological Research*, 2001, 156(1): 49-58.
- [25] Kummer C, Schumann P, Stackebrandt E. *Gordonia alkanivorans* sp. nov., isolated from tar-contaminated soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1999, 49(4): 1513-1522.
- [26] 唐玉斌, 孙常宇, 陈芳艳, 等. 一株[+屈]高效降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(4): 593-597.
- [27] Kleinstaub S, Riis V, Fetzer I, et al. Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3531-3542.
- [28] Yateem A, Al-Sharrah T. Enhanced hydrocarbons degradation in the rhizosphere of mangrove plants by a halophilic *Bacillus subtilis subtilis* strain[J]. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 2011, 20(3): 261-273.

(上接 p.1761)

征 稿 简 则

3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>