

石油污染土壤生物修复对土壤酶活性的影响

王华金¹, 朱能武^{1,2*}, 杨 崇¹, 党 志^{1,2}, 吴平霄^{1,2}

(1. 华南理工大学环境与能源学院, 广州 510006; 2. 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广州 510006)

摘 要: 土壤酶活性是土壤微生物生物化学过程的综合反映。为了探究石油污染土壤生物修复过程中土壤酶活性变化规律研究, 采用筛选和分离的 3 株对石油烃有良好降解效果的降解菌构建了混合菌体系, 开展了石油污染土壤模拟生物修复实验, 考察了不同修复时期土壤石油烃残留量、石油烃表观降解率以及四种土壤酶(脲酶、过氧化氢酶、脱氢酶、脂肪酶)活性的变化。结果表明, 石油污染土壤经 40 d 生物修复后, 石油烃表观降解率达到 64.4%。在石油污染土壤的生物修复过程中, 脲酶活性在 0~24 d 上升较快, 24 d 后趋于稳定; 过氧化氢酶和脱氢酶活性的变化规律相似, 均在前期上升随后略有下降; 脂肪酶活性有一个快速上升阶段(0~16 d), 而后又出现明显的下降。进一步统计分析表明, 脲酶与石油烃残留量呈显著负相关性($r=-0.916, P<0.05$); 过氧化氢酶和脱氢酶活性与石油烃残留量呈极显著负相关性, 相关系数分别为 $-0.974(P<0.01)$ 和 $-0.969(P<0.01)$; 而脂肪酶活性与石油烃残留量的相关性不显著($P>0.05$)。

关键词: 土壤; 石油; 生物修复; 土壤酶活性; 总石油烃

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2013)06-1178-07 doi:10.11654/jaes.2013.06.014

Effect of Soil Enzyme Activities During Bioremediation of Crude Oil-Contaminated Soil

WANG Hua-jin¹, ZHU Neng-wu^{1,2*}, YANG Chong¹, DANG Zhi^{1,2}, WU Ping-xiao^{1,2}

(1. College of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006; 2. Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou 510006)

Abstract: Soil enzyme activity comprehensively reflects the soil microorganism biochemical process. In order to explore the changes of soil enzyme activities during bioremediation of crude oil-contaminated soil, constructed crude oil degrading bacterial consortium were built with three strains isolated from oil-contaminated soil, bioremediation experiments of crude oil-contaminated soil were conducted, and the change of total petroleum hydrocarbon (TPH), apparent degradation efficiencies and soil enzyme activities (urease, catalase, dehydrogenase and lipase) were examined during the crude oil-contaminated soil bioremediation. The results showed that the apparent degradation efficiency of crude oil reached 64.4% after 40 d of bioremediation. Urease activity rapidly increased during 0~24 d, then tended to be stable. The catalase activity and dehydrogenase activity increased in early stage then slightly declined. However, lipase activity had a rapid rise phase (0~16 d), then obviously slowed down. The results of statistical analysis showed that soil urease activity and TPH had significant negative relationship ($-0.916, P<0.05$). Catalase and dehydrogenase activities were both significantly correlated with soil TPH concentration, and their correlation coefficients were $-0.974(P<0.01)$ and $-0.969(P<0.01)$, respectively. However, soil lipase activity did not have significant correlation with TPH ($P>0.05$). Therefore, soil enzyme activities are potential valuable indicators of oil biodegradation.

Keywords: soil; crude oil; bioremediation; soil enzyme activity; total petroleum hydrocarbon

土壤的石油污染是世界性的环境问题之一。石油污染土壤的生物修复技术以其处理成本低、无二次污

染等特点, 正逐步成为未来石油污染土壤治理研究的一个重要方向^[1]。然而, 生物修复的成功运作并非简单易事。事实证明, 恢复污染土壤原有生态功能和状态是一个长期而复杂的系统生态过程^[2]。在修复过程中, 土壤从污染状态逐渐向健康方向恢复, 并伴随着一系列科学指标的变化。因此, 有必要对土壤的修复过程及土壤的健康进行科学全面的监测和评价。

收稿日期: 2013-01-18

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目(9351064101000001); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0166)

作者简介: 王华金(1986—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生态毒理与生物指示。

* 通信作者: 朱能武 E-mail: nwzhu@scut.edu.cn

近年来,国内外频繁地采用高等植物^[3]、指示微生物^[4]、蚯蚓^[5]、土壤酶活性^[6-7]等来描述、评价和监测污染土壤修复过程。其中土壤酶作为土壤重要的组成部分,在物质转化、能量代谢、污染土壤修复等过程中发挥着重要作用,被称为土壤生态系统的中心^[8]。由于土壤酶活性测定简便、快捷、准确,其活性受土壤污染状况和理化性质的共同影响,作为监测指标优势明显,逐渐成为土壤环境质量监测的重要研究方向^[9]。土壤酶活性已被用作农药^[10]、重金属^[11],甚至石油^[12]污染土壤的修复过程的监测,特别是土壤酶在有机物分解和有毒物质降解等重要代谢过程中起着催化剂的作用,可作为潜在指标用于评价和监测石油污染土壤修复过程。

在前期研究中,课题组分离筛选了三株石油组分降解菌,构建了混合菌体系,表现出了较好的修复效果^[13-16]。然而,该混合菌用于石油污染土壤修复过程中对应的酶活性的变化规律尚不清楚。因此,本文通过模拟实验研究了不同修复时期石油污染土壤中石油烃的表现降解率以及生物修复过程中脲酶、过氧化氢酶、脱氢酶和脂肪酶四种土壤酶活性的变化,并进一步分析了土壤酶活性与石油污染物去除之间的关系,为充分了解石油污染土壤的生物修复过程提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土壤和石油

供试土壤采自广东增城,为水稻田表层土壤(0~20 cm)。土壤取回后过 4.75 mm 筛,去除大颗粒物质后分为两份,一份保存于 4 ℃ 黑暗条件下用于测定新鲜土样指标,另一份置于阴凉处风干后过 2 mm 筛,保存待用。供试土壤理化性质的测定采用鲁如坤等^[17]的方法,其测定值见表 1。

表 1 供试土壤的部分理化性质

Table 1 Some physiochemical properties of tested soil

理化性质	数值
含水率/%	19.07
pH	6.42
TOC/%	1.62
TN/%	0.086
TP/%	0.052
TK/%	0.448
TPH	—

供试石油为广州石化提供的原油(密度为 0.863 g·cm⁻³,饱和烃 45.55%,芳烃 17.69%,胶质和沥青质 9.68%,其他组分 27.08%)。其他试剂购买于广州市文睿科学仪器有限公司,纯度均为分析纯,有机溶剂均经过重蒸纯化。

1.1.2 高效石油降解菌

本实验构建的石油混合菌降解体系包含以下 3 种菌株:GS3C 属于洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia-acepacia*),从广州石化总厂污水处理站旁的油泥混合物中筛选得到的一株烷烃降解菌^[13],其 16S rDNA 在 GenBank 中的登录号为 EU2821101;GY2B 属于鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.),从广州油制气厂附近污染土壤筛选得到的一株菲降解菌^[14],其 16S rDNA 在 GenBank 中的登录号为 DQ139343;GP3B 属于伯克菌科 *Pandoraea* 菌属的 *pnomenus* 种,从长期受石油污染土壤中驯化筛选得到的一株茈降解菌^[15],其 16S rDNA 在 GenBank 中的登陆号为 EU233279。

1.2 实验方法

石油污染土壤生物修复实验在口径 15 cm、深 20 cm 的塑料盆中进行,每盆 2 kg 干土,先将石油溶于石油醚中,向土壤中加入定量石油,使土壤中石油烃的初始浓度为 5000 mg·kg⁻¹ 干土,拌匀,待石油醚挥发完全后待用。

将驯化后的 GS3C、GY2B、GP3B 菌按等量配比的原则(1:1:1)制成混合菌液,用于石油污染土壤的修复实验。接种混合菌时,接种量为 10⁸ cfu·g⁻¹ 干土,并加入适量的 NH₄NO₃ 和 K₂HPO₄ 将 C:N:P 调节为 100:10:1,土壤田间持水量调节至 60%。然后,将土壤放置在恒温培养箱(30 ℃)中进行石油污染土壤的生物修复实验^[18]。同时,设置无污染土壤和未投加降解菌株的石油污染土壤对照。

在实验过程中,分别于第 0、8、16、24、32、40 d 采集土样,测定土壤中石油烃浓度和各种土壤酶的活性(包括脲酶活性、脱氢酶活性、过氧化氢酶活性和脂肪酶活性)。

1.3 测试项目及方法

1.3.1 土壤中总石油烃的提取及含量测定

准确称量 5 g 风干土壤,放入 50 mL 离心管中,加入适量无水硫酸钠,添加 10 mL 正己烷,在 1800 r·min⁻¹ 条件下振荡 1 min,再超声处理 30 min,然后在 3000 r·min⁻¹ 的条件下离心 10 min,收集上层液体。重复上述过程 4 次,确保土壤中的石油烃全部被洗出。将上层液体过 0.45 μm 有机系滤膜后移至旋转蒸发

仪中进行浓缩,定容至 25 mL,于 225 nm 处测定其吸光度值,对照石油的标准曲线,计算出石油污染土样中石油烃残留量和表观降解率^[19]。

$$\eta = (W_1 - W_2) / W_1 \times 100\%$$

式中: W_1 为土样中石油烃的初始含量; W_2 为不同处理土样中石油烃的残留含量。

1.3.2 土壤酶活性的测定

土壤酶活性的测定参考周礼恺等^[20]的方法。

1.4 数据分析

实验数据使用 SPSS 17.0 进行双变量相关性分析及回归分析。

2 结果和讨论

2.1 土壤中石油烃残留量及表观降解率

各处理土样中石油烃残留量及表观降解率如图 1 所示。可以看出,投加菌剂的污染土样中石油烃表观降解率随时间的推移不断上升,第 8、16、24、32、40 d 的石油烃表观降解率分别达到 54.0%、57.5%、60.2%、64.1%、64.4%,到 32 d 后石油烃残留量基本保持稳定。这是由于在生物修复前期,油量丰富,促使微生物大量生长繁殖,石油烃组分降解速度快。随着时间的推移,易降解的石油烃组分被大量消耗,残留物主要为芳香烃等难降解组分,因此表现为降解速率的降低和残留量的相对稳定^[21]。而不投加菌剂的污染土样中石油烃的表观降解率同样随时间的延长逐渐增大,降解 40 d 后 16.78% 的石油烃被去除,其主要原因是石油烃中易挥发组分的挥发、吸附以及土壤中土著微生物对石油烃的去除^[22]。与不投加菌剂的污染土样相比,投加菌剂土样石油烃的表观降解率远高于未投加菌剂土样。这表明在生物修复过程中,发挥主导作用

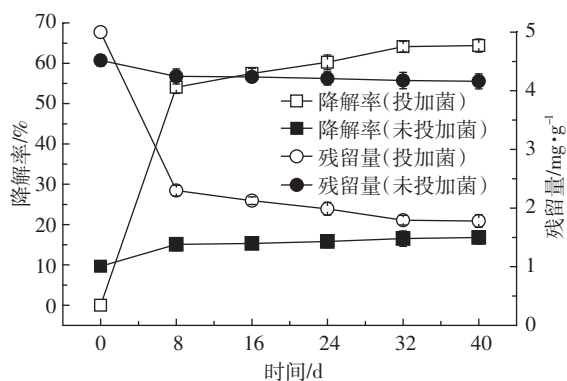


图 1 不同处理土样中石油烃残留量及表观降解率

Figure 1 Concentrations and apparent degradation efficiencies of crude oil in different processing soil samples

的是投加的高效降解菌。

不同的微生物对石油烃组分有着不同的降解能力,在降解过程中起着不同的作用。一般认为,石油烃组分可降解性次序为: 小于 C_{10} 的直链烷烃 $> C_{10}-C_{24}$ 或更长的直链烷烃 $>$ 小于 C_{10} 的支链烷烃 $> C_{10}-C_{24}$ 或更长的支链烷烃 $>$ 单环芳烃 $>$ 多环芳烃 $>$ 杂环芳烃^[23]。结合本实验所采用三种菌对石油烃各组分的降解特性可知^[13-16],GS3C 烷烃降解菌在降解 1 d 时的降解速率达到最大;GY2B 菲降解菌在 2 d 时降解速率达到最大;GP3B 芘降解菌同样也是在 2 d 时降解速率达到最大。GS3C 在降解 1 d 后培养液中开始出现小油滴,GY2B 在降解 2 d 后原油出现乳化现象,GP3B 在降解 5 d 后培养液中才出现一些小油滴,表层油膜仍较厚。结合图 1 可知,在 0~8 d 的修复过程中,主要表现为对石油烃中含量最高且易降解组分烷烃的降解,所以石油烃的降解速率最大;在 8~32 d 的修复过程中,易降解组分的减少,主要是对一些环数较小的芳烃类物质进行降解,其降解速率相对减弱;残留的是一些更难降解的芳烃等物质,该组分的生物利用性低,很难被微生物降解,表现为降解速率低下。

2.2 不同修复时期土壤中酶活性的变化

2.2.1 脲酶活性的变化

脲酶是一种酰胺酶,可酶促有机物质中碳氮键 ($CO-NH$) 的水解,对土壤氮素循环具有独特作用,其活性的提高可能有利于土壤中稳定性较高的有机氮向有效氮转化,从而改善土壤氮素供应状况。因此,土壤脲酶活性可表征土壤的氮素转化状况^[24]。从图 2 可以看出,投加菌剂的污染土样中土壤脲酶活性在整个修复时期均明显高于未投加菌剂和无污染土样。其中,投加菌剂的污染土样在 0~24 d 脲酶活性上升较

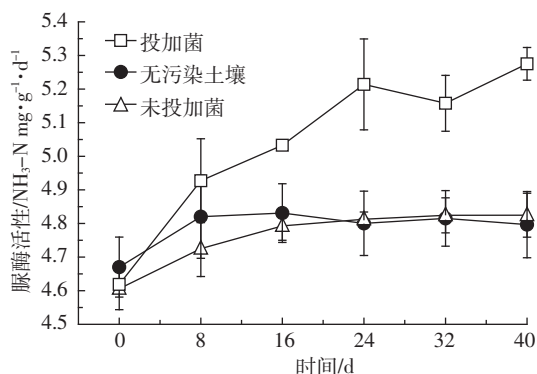


图 2 不同处理土样中脲酶的活性变化

Figure 2 Change of urease activity in different processing soil samples

快,24 d 后其活性趋于稳定,这说明投加菌剂的污染土样中氮素的生物转化较为活跃。脲酶活性增大可能是由于投加的高效石油降解菌能很快地适应土壤环境,并能利用石油烃为碳源,微生物的活性增强。生物修复后期脲酶活性上升速率下降的原因可能是由于:营养物质的大量消耗;易降解组分的减少,多环芳烃(PAHs)含量的相对增加。Margesin 等^[25]指出,柴油污染会导致土壤脲酶活性增加,而多环芳烃污染会导致脲酶活性降低。这与本实验的结果是基本一致的。而未投加菌剂的污染土样中脲酶活性并没有产生抑制作用,反而表现出一定程度的刺激作用,这可能是由于土壤中的土著微生物对石油有一定的适应性以及石油中的部分组成物质可为土壤中与脲酶相关的微生物所利用^[26]。

脲酶活性的增大说明经生物修复处理后土壤的氮素转化能力得到很大程度的提高。脲酶参与的有效氮增加有利于土壤中微生物的生长,也为微生物参与石油烃的降解提供了更为充足的营养条件^[24]。土壤脲酶活性不仅与土壤中氮素有密切的关系,还与土壤全磷、有机质等有极显著的正相关关系^[26]。王梅等^[27]研究表明,受石油污染的不同类型土壤中脲酶活性也存在差异。因此,石油污染土壤修复过程中脲酶活性的变化是多种因素影响的综合体现,包括石油组分、微生物的生长代谢以及土壤理化性质等方面。

2.2.2 过氧化氢酶活性的变化

过氧化氢酶是在生物呼吸和有机物的生物化学氧化反应过程中形成的,广泛存在于微生物和植物细胞中,在土壤营养物质的转化过程中起着重要作用。它能促进 H_2O_2 分解,解除 H_2O_2 对微生物的毒害作用,从而为土壤微生物活动提供良好的土壤环境^[6]。从图 3 可以看出,未投加菌剂的污染土样中过氧化氢酶活性明显低于无污染的土样,始终维持在较低水平,说明石油对其活性产生了抑制作用。

在投加菌剂的污染土样中过氧化氢酶活性有一个明显增大的过程,在 0~8 d 过氧化氢酶活性的增长速率最大,随后酶活性的增长速率有所下降,在第 24 d 达到最大,24 d 后略有下降,这与 Margesin 等^[25]的研究结果是一致的。过氧化氢酶活性的增强,是由于在修复过程中优势微生物大量繁殖,微生物参与了石油烃的降解过程,大量过氧化氢的产生使得微生物及土壤生境增大,解除了呼吸过程产生过氧化氢的能力^[24]。24 d 后过氧化氢酶活性略有下降,其原因可能是生物修复后期土壤中 C:N:P 的比例严重失衡,

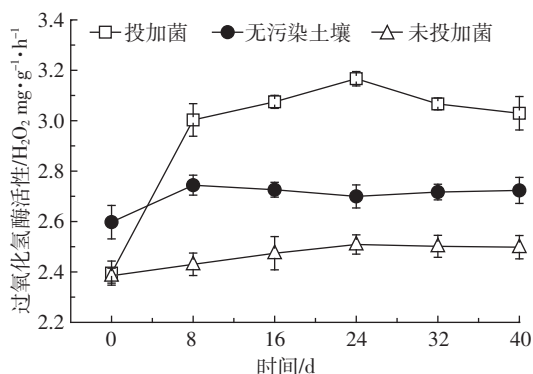


图 3 不同处理土样中过氧化氢酶的活性变化

Figure 3 Change of catalase activity in different processing soil samples

影响了微生物的活性。Graham 等^[28]研究表明,降解石油的细菌细胞化学组成可以用 $C_{106}H_{180}O_{45}N_{16}P_1$ 表示,微生物降解过程中最佳可生物利用的组分比例为 C:N:P=100:15:1。石油烃在生物修复过程中产生了某些具有强烈毒性的中间产物而对微生物产生抑制所致^[29]。生物呼吸过程中产生的过氧化氢在土壤中积累,对微生物产生毒害作用。实际上,土壤中过氧化氢酶活性表征土壤的生物化学氧化过程的强弱,它还与土壤有机质和氮素有着密切关系。有研究表明,供试土壤的过氧化氢酶活性与土壤有机质含量和土壤全氮量存在极显著正相关关系,而与土壤其他性质不存在显著性相关关系^[30]。

2.2.3 脱氢酶活性的变化

微生物体内含有各种各样的酶,一些酶能够催化石油烃的氧化反应,参加生物氧化的重要酶分为氧化酶和脱氢酶两大类,其中脱氢酶类尤为重要。脱氢酶可使石油烃的氢原子活化并传递给特定的受氢体,实现石油烃的氧化和转化。在大多情况下,微生物对石油污染物的降解或转化从脱氢开始,因此可以利用脱氢酶的活性反映石油降解微生物的活性,进而评价降解性能^[31]。从图 4 可以看出,随着生物修复的进行,投加菌剂的污染土样的脱氢酶活性逐渐增强,在 32 d 达到最大,随后酶活性出现下降趋势。土壤脱氢酶活性增强,这表明石油中含有容易被土壤微生物氧化的组分。0~8 d 脱氢酶活性上升速率最大,说明土壤中石油烃的氧化和转化最快,石油烃的降解速率也最大,与图 1 的结果是一致的。脱氢酶活性的增大可能是投加的高效降解菌能很快适应石油污染物的胁迫环境,而且有新的碳源可以利用,微生物活性有所增加^[32]。在未投加菌剂的土样中脱氢酶活性有一定的增强也

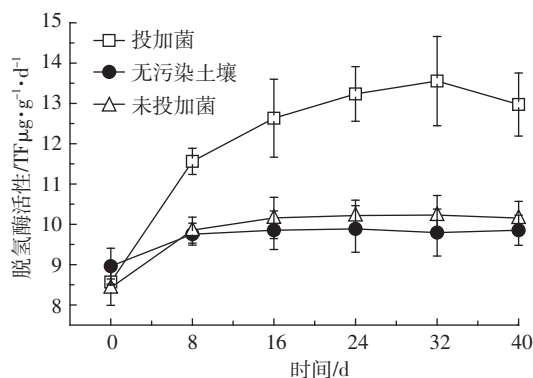


图4 不同处理土样中脱氢酶的活性变化

Figure 4 Change of dehydrogenase activity in different processing soil samples

证明了石油污染土壤中的一些土著微生物可利用石油污染物为新的碳源。在生物修复的后期脱氢酶活性有所下降,可能是由于在修复后期易降解污染物减少,难降解物质积累以及有毒代谢产物增加,导致微生物活性降低^[30]。Frankenberger 等^[33]对石油和精炼石油产品对土壤脱氢酶活性的影响进行了研究,认为脱氢酶活性在石油污染土壤中的变化随着油的种类不同存在明显差异。其中原油是一种天然产品,与精炼油相比在土壤中能更容易被氧化。

2.2.4 脂肪酶活性的变化

脂肪酶广泛存在于动植物和微生物体内,不仅可水解三酰甘油生成二脂酰甘油和脂肪酸,并且能催化水解反应的逆反应——酯化反应。在脂肪酶作用下,土壤中羧酸脂类的有机化合物脂肪被水解成可溶性的物质,该酶在土壤生物动力学中具有重要的作用^[6]。从图5可以看出,未投加菌剂的污染土样脂肪酶活性在前期略有上升,随后变化不大,且其活性值维持在较低水平。而投加菌剂的污染土样中的脂肪酶活性有

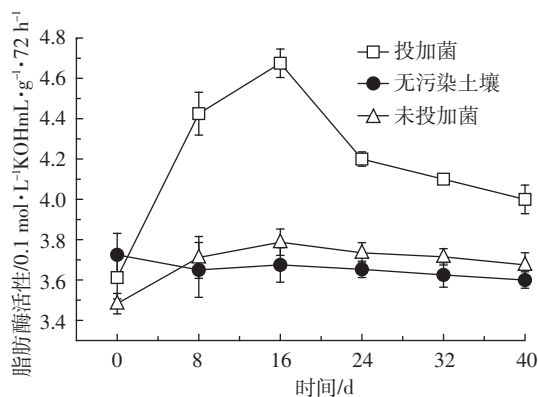


图5 不同处理土样中脂肪酶的活性变化

Figure 5 Change of lipase activity in different processing soil samples

一个快速上升阶段(0~16 d),在第16 d其活性达到峰值,16 d后不断下降,与李玉瑛等^[7]的研究结果一致。在生物修复的前期,土壤脂肪酶活性明显增强可能是由于石油污染土壤中的油脂类物质刺激了解析石油烃的微生物菌群的生长与代谢^[6]。Margesin 等^[22]认为,土壤脂肪酶在石油污染土壤的生物修复过程中是一个很有价值的指示指标。土壤脂肪酶活性被刺激,酶活性增大。在生物修复的后期,脂肪酶的活性并没有因可生物利用组分的减少而受到抑制,反而保持在较高的水平。也有一些研究表明,生物修复后期可生物利用组分的减少和难降解物质积累对土壤中脂肪酶活性的影响不明显^[34]。在本研究中,生物修复后期土壤脂肪酶的活性出现明显下降,可能是生物修复过程中产生了某些有毒中间代谢产物,其毒性比原始污染物毒性更大,导致微生物活性受到抑制。Gibson 等^[35]研究发现,某些烃尤其是 PAHs 的氧化中间产物具有比母本烃更强的生物毒性。

2.3 土壤酶活性与石油烃残留量的相关性

通过对石油污染土壤修复过程中土样酶活与石油残留量的相关性分析表明,四种土壤酶活性均与石油残留量呈负相关。其中脲酶活性和石油残留量呈显著相关,相关系数为 $-0.916(P=0.0102)$;过氧化氢酶活性与石油残留量呈极显著相关性,相关系数为 $-0.974(P=0.00101)$;脱氢酶活性与石油残留量呈极显著相关性,相关系数为 $-0.969(P=0.00147)$;脂肪酶与石油残留量的相关性不明显,相关系数为 $-0.653(P=0.1608)$ 。以土壤酶活性为自变量(X),土壤石油烃残留量为因变量(Y)进行模型分析,分别得到以下线性相关回归方程。

$$\text{脲酶: } Y = -4.728X + 26.328$$

$$\text{过氧化氢酶: } Y = -4.317X + 15.257$$

$$\text{脱氢酶: } Y = -0.648X + 10.334$$

$$\text{脂肪酶: } Y = -2.220X + 11.750$$

研究表明,石油在土壤生物修复过程中逐步降解,一般把石油烃总量作为一项常规性指标来度量石油污染土壤的修复进程^[36]。然而,生物修复的成功实现并非简单易事。事实证明,恢复污染土壤原有生态功能和状态是一个长期而复杂的系统生态过程^[2]。在石油污染土壤中,即使石油目标污染物的含量达到了环境标准,但由于难降解组分的残留和次生代谢产物或中间产物的存在,土壤的生态毒性依然很强,最终会在生物体上表现出来^[3]。目前度量石油污染土壤生物修复过程中的生态毒性大多采用间接的生物学方

法^[3-7]。石油污染土壤修复过程中生态毒性的变化在一定程度上会影响土壤微生物的活性,从而导致土壤酶活性的变化。土壤酶活性作为土壤环境的综合指标,是土壤微生物新陈代谢的重要因素^[8],将其作为土壤生态毒性的指示物,具有一定的可行性。在本研究中,选取了脲酶、过氧化氢酶、脱氢酶和脂肪酶等四种有代表性的土壤酶,考察了它们在接种外源性石油降解混合菌剂的石油污染土壤修复过程中的变化,并将其与石油烃残留量进行耦合建立了回归模型,用于估计该生物修复体系中土壤酶活性和石油烃残留量的关系。在今后的工作中,也可将单一降解菌的不同酶活性指标与混合菌体系进行对比,以更好地解释修复过程中酶活性的变化。需要指出的是,只采用土壤酶活性作为评价土壤生态毒性的唯一指标还不太适宜,应结合其他生态毒性评价方法更加全面地表征污染土壤的修复效果及土壤健康状况。

3 结论

(1)构建石油污染土壤生物模拟修复实验修复效果良好,污染土壤经40 d生物修复后,石油烃表观降解率达到64.4%。

(2)在石油污染土壤的生物修复过程中,四种土壤酶活性变化规律不尽相同。脲酶活性在0~24 d快速上升,24 d后趋于稳定;过氧化氢酶和脱氢酶活性的变化规律相似,均在前期上升随后略有下降;脂肪酶活性有一个快速上升阶段(0~16 d),而后又出现明显的下降。

(3)过氧化氢酶活性和脱氢酶活性与石油残留量呈极显著相关,脲酶活性和石油残留量呈显著相关,而脂肪酶与石油残留量不存在显著相关关系。

参考文献:

- [1] 周启星,宋玉芳.污染土壤修复原理与方法[M].北京:科学出版社,2004:22-42.
ZHOU Qi-xing, SONG Yu-fang. Principle and method of contaminated soil remediation[M]. Beijing: Science Press, 2004: 22-42.
- [2] 宋玉芳,宋雪英,张薇,等.污染土壤生物修复中存在问题的探讨[J].环境科学,2004,25(2):129-133.
SONG Yu-fang, SONG Xue-yin, ZHANG Wei, et al. Issues concerned with the bioremediation of contaminated soils[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(2): 129-133.
- [3] Al-Mutairi N, Bufarsan A, Al-Rukaibi F. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels[J]. *Chemosphere*, 2008, 74(1): 142-148.
- [4] Phillips T M, Liu D, Seech A G, et al. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, 24(2): 132-139.
- [5] Geissen V, Gomez-Rivera P, Lwanga E H, et al. Using earthworms to test the efficiency of remediation of oil-polluted soil in tropical Mexico[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(3): 638-642.
- [6] 蔺昕,李培军,孙铁珩,等.石油污染土壤的生物修复与土壤酶活性关系[J].生态学报,2005,24(10):1226-1229.
LIN Xin, LI Pei-jun, SUN Tie-heng, et al. Bioremediation of petroleum-contaminated soil and its relationship with soil enzyme activities[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(10): 1226-1229.
- [7] 李玉瑛,李冰.柴油污染土壤生物修复对土壤酶活性的影响[J].生态环境学报,2009,18(5):1753-1756.
LI Yu-ying, LI Bing. Effect of bioremediation of diesel oil contaminated soil on soil enzyme activity[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(5): 1753-1756.
- [8] Tabatabai M A, Dick W A. Enzymes in soil: Research and developments in measuring activities//Burns R G, Dick R P. Eds. *Enzymes in the Environment, Activity, Ecology, and Applications*[M]. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002: 567-595.
- [9] Olga M. Effects of heavy metals on some soil biological parameters[J]. *Journal of Geochemical Exploration*, 2006, 88(1-3): 220-223.
- [10] Sannino F, Gianfreda L. Pesticide influence on soil enzymatic activities[J]. *Chemosphere*, 2001, 45(4): 417-425.
- [11] Oliveir A, Pampulha M E. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics[J]. *Journal of Bioscience And Bioengineering*, 2006, 102(3): 157-161.
- [12] Baran S, Bielińska J E, Oleszczuk P. Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Geoderma*, 2004, 118(3): 221-232.
- [13] 吴仁人,党志,易筱筠,等.氨基酸对烷烃降解菌GS3C降解性能的影响[J].环境科学研究,2009,22(6):702-706.
WU Ren-ren, DANG Zhi, YI Xiao-yun, et al. Effect of amino acids on degrading capability of an-alkanes degrading strain GS3C[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2009, 22(6): 702-706.
- [14] 陶雪琴,卢桂宁,党志,等.非降解菌株GY2B的分离鉴定及其降解特性[J].中国环境科学,2006,26(4):478-481.
TAO Xue-qin, LU Gui-ning, DANG Zhi, et al. Isolation and identification of phenanthrene-degrading strain GY2B and its degradation character[J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(4): 478-481.
- [15] 陈晓鹏,易筱筠,陶雪琴,等.石油污染土壤中芘高效降解菌群的筛选及降解特性研究[J].环境工程学报,2008,2(3):413-417.
CHEN Xiao-peng, YI Xiao-yun, TAO Xue-qing, et al. Screening and characterization of pyrene-degrading microbial[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2008, 2(3): 413-417.
- [16] 何丽媛,党志,唐霞,等.混合菌对原油的降解及其降解性能的研究[J].环境科学学报,2010,30(6):1220-1227.
HE Li-yuan, DANG Zhi, TANG Xia, et al. Biodegradation characteristics of crude oil by mixed bacterial strains[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(6): 1220-1227.
- [17] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].南京:中国农业科技出版社,

- 1999;13-165.
- LU Ru-kun. The analytical methods for soil and agro-chemistry[M]. Nanjing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999;13-165.
- [18] Vouillamoz J, Milke M W. Effect of compost in phytoremediation of diesel-contaminated soils[J]. *Water Science Technology*, 2001, 43:291-295.
- [19] Han Mei, Ji Guo-dong, Ni Jin-ren. Washing of field weathered crude oil contaminated soil with an environmentally compatible surfactant, alkyl polyglucoside[J]. *Chemosphere*, 2009, 76(5):579-586.
- [20] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 科技出版社, 1987:292-293.
- ZHOU Li-kai. Soil enzymology[M]. Science and Technology Press, 1987:292-293.
- [21] Langbehn A, Steinhart H. Biodegradation studies of hydrocarbons in soils by analyzing metabolites formed[J]. *Chemosphere*, 1995, 30(5):855-868.
- [22] Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F. Soil lipase activity a useful indicator of oil biodegradation[J]. *Biotechnology Techniques*, 1999, 13(12):859-863.
- [23] Grishchenkov V G, Townsend R T, McDonald T J, et al. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions [J]. *Process Biochemistry*, 2000, 35(9):889-896.
- [24] 吴伟林, 张秀霞, 单宝来, 等. 不同处置方式对石油污染土壤理化性质和生物学特性的影响[J]. 石油学报(石油加工), 2010, 26(5):831-834.
- WU Wei-lin, ZHANG Xiu-xia, SHAN Bao-lai, et al. Effect of different treatment methods on the physicochemical and biochemical properties of an oil polluted soil[J]. *Acta Petrolei Sinica(Petroleum Processing Section)*, 2010, 26(5):831-834.
- [25] Margesin R, Walder G, Schinner F. The impact of hydrocarbon remediation(diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil[J]. *Acta Biotechnologica*, 2004, 20(3-4):313-333.
- [26] 李东坡, 武志杰, 陈利军, 等. 长期培肥黑土脲酶活性动态变化及其影响因素[J]. 应用生态学报, 2003, 14(12):2208-2212.
- LI Dong-po, WU Zhi-jie, CHEN Li-jun, et al. Dynamics of urease activity in a long-term fertilized black soil and its affecting factors[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(12):2208-2212.
- [27] 王梅, 江丽华, 刘兆辉, 等. 石油污染物对山东省三种类型土壤微生物种群及土壤酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2010, 47(2):341-346.
- WANG Mei, JIANG Li-hua, LIU Zhao-hu, et al. Impacts of petroleum pollutants on microbial population and enzyme activity in three different types of soils in Shandong Province[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2010, 47(2):341-346.
- [28] Graham D W, Smith V H, Law K P. Effects of nitrogen and phosphorous supply on hexadecane biodegradation in soil systems[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1999, 111(1/4):1-18.
- [29] 鲁莽, 张忠智, 孙珊珊, 等. 植物根际强化修复石油污染土壤的研究[J]. 环境科学, 2009, 30(12):3703-3709.
- LU Mang, ZHANG Zhong-zhi, SUN Shan-shan, et al. Rhizosphere enhanced remediation of petroleum contaminated soil[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(12):3703-3709.
- [30] 戴伟, 白红英. 土壤过氧化氢酶活性及其动力学特征与土壤性质的关系[J]. 北京林业大学学报, 1995, 17(1):37-41.
- DAI Wei, BAI Hong-ying. Correlations of soil catalase activity and its kinetic characteristic with some soil properties[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 1995, 17(1):37-41.
- [31] 李广贺, 张旭, 卢晓霞. 土壤残油生物降解性与微生物活性[J]. 中国地质大学学报, 2002, 27(2):181-185.
- LI Guang-he, ZHANG Xu, LU Xiao-xia. Biodegradation of residual petrochemicals and microbial activities in polluted soil[J]. *Journal of China University of Geosciences*, 2002, 27(2):181-185.
- [32] 王靖, 张忠智, 苏幼明, 等. 石油污染土壤植物修复根际效应研究[J]. 石油化工高等学校学报, 2008, 21(6):36-40.
- WANG Jing, ZHANG Zhong-zhi, SU You-ming, et al. The rhizosphere effect in phytoremediation of the petroleum polluted soil[J]. *Journal of Petrochemical Universities*, 2008, 21(6):36-40.
- [33] Frankenberger W T, Johanson J B. Influence of crude oil and refined petroleum products on soil dehydrogenase activity[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1982, 11(4):602-607.
- [34] Margesin R, Schinner F. Biological decontamination of oil spills in cold environments[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1999, 74(5):381-389.
- [35] Gibson D T. Microbial degradation of organic compounds[M]. Marcel Dekker, 1984:181-252.
- [36] 刘五星, 骆永明, 滕应, 等. 石油污染土壤的生态风险评价和生物修复[J]. 土壤学报, 2007, 44(5):848-853.
- LIU Wu-xing, LUO YONG-ming, TENG ying, et al. Eco-risk assessment and bioremediation of petroleum contaminated soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(5):848-853.