

微生物与有机肥混合剂修复石油污染土壤的研究

齐建超^{1,2}, 张承东^{1,2,3}, 乔俊^{1,2}, 郭婷^{1,2}, 张清敏¹, 陈威^{1,2,3}

(1.南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071; 2.天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300457; 3.教育部环境污染过程与基准重点实验室, 天津 300071)

摘要:采用含有4种菌的菌剂与多种有机肥联合修复石油污染土壤,通过盆栽实验对不同浓度菌剂处理土壤中的石油烃降解率、16种多环芳烃(PAHs)浓度、脱氢酶活性、pH、阳离子交换量和微生物多样性等变化进行了研究。结果表明,腐植酸、诺沃肥和生物有机钙等有机肥和菌剂(4%处理)的加入使土壤盐碱环境得到明显改善,土壤pH稳定于6.9,阳离子交换量为 $201.94\text{ cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$;对比4个不同浓度菌剂处理的效果,4%菌剂处理与有机肥联合作用修复效果最显著,石油烃降解率可达到73%,大部分所测PAHs浓度显著降低,其中萘、蒽、苯并(a)芘和苯并(g,h,i)芘降解率分别达到了65.5%、57.7%、74.7%和55.5%,土壤微生物数量增加,多样性更为丰富。

关键词:混合菌;有机肥;石油污染土壤;脱氢酶活性;微生物多样性

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)01-0066-07

Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil by Mixed Microbes and Organic Fertilizer

QI Jian-chao^{1,2}, ZHANG Cheng-dong^{1,2,3}, QIAO Jun^{1,2}, GUO Ting^{1,2}, ZHANG Qing-min¹, CHEN Wei^{1,2,3}

(1.College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2.Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation & Pollution Control, Tianjin 300457, China; 3.Ministry of Education Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Tianjin 300071, China)

Abstract: In this study, bioremediation of petroleum-contaminated soil was investigated using 4 mixed cultures and organic fertilizer. The degradation efficiency, the concentrations of the 16 priority PAHs, the dehydrogenase activity, pH, the cation exchange capacity (CEC) and microbial diversity of the soil were monitored for different treatments in pot experiments. The results showed that the addition of organic fertilizer (humic acid, NovoGro and biological organic calcium) and mixed microbes (4% addition of mixed cultures) notably improved the fertility of the saline soil. The pH of the treated soil was stable at 6.9 and CEC increased to $201.94\text{ cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$. Combination of the 4% microbial consortium and organic fertilizer provided the greatest degradation efficiency. With this treatment, the total concentration of petroleum hydrocarbon decreased by 73% and most of the PAHs decreased significantly. The degradation percentages of naphthalene, anthracene, benzo(a)pyrene and benzo(g,h,i)perylene were 65.5%, 57.7%, 74.7% and 55.5%, respectively. Both the abundance and diversity of soil bacteria were stimulated during the bioremediation process.

Keywords: mixed microbes; organic fertilizer; petroleum-contaminated soil; dehydrogenase activity; microbial diversity

石油在开采、加工、运输过程中会有数量不等的石油和固体废弃物排放到周围土壤中,使土壤生态系统受到不同程度的破坏^[1-2],这已经成为当今重大的环

境问题之一。生物修复因其成本低、无二次污染、处理效果好等特点已成为修复石油污染土壤的关键技术,具有显著的社会效益和环境效益^[3-4]。影响微生物对石油组分降解效率的主要因素有石油组分的低水溶性、成分的复杂性以及环境中营养元素的限制^[5]等。为了增加石油组分的水溶性,许多人研究了生物表面活性剂的作用^[6-7],这些生物表面活性剂能促进烃类在水相中的乳化、分散以及增大微生物与烃类的接触面积,从而促进微生物对石油烃的降解。污染土壤的石油组分复杂,大致分为烷烃(占65%~70%)、芳香烃(占10%~15%)和树脂与沥青质(占8%~10%)三大类。各

收稿日期:2009-06-15

基金项目:863计划资助,油田区石油污染土壤生态修复技术与示范(2007AA061200);天津市自然科学基金(07JCYBJC16300);天津市科技发展计划科技创新能力与环境建设平台项目,天津地区土壤中典型有机污染物环境标准与污染控制技术(06TJJC14000);教育部留学回国人员启动资金

作者简介:齐建超(1986—),女,天津人,硕士研究生,主要研究方向:环境微生物学。E-mail:shangmt@126.com

通讯作者:张承东 E-mail:zhangchengdong@nankai.edu.cn

组分的生物可降解程度不同,降解过程复杂,其中芳香烃类最难被降解。单一的细菌或真菌因产生酶的种类比较少且浓度较低,所以一般只能降解少数特定烃类或只降解到某一阶段,复杂烃类的彻底降解往往需要多种微生物协同、联合作用^[8]。另外,碳氮磷等主要营养元素的缺乏也会限制微生物的生长,降低修复的效率。

基于以上问题,本研究将3株能产生表面活性剂的石油烃降解细菌(枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*、粪链球菌 *Streptococcus faecalis*)与一株真菌(热带假丝酵母菌 *Candida tropicalis*)的混合菌吸附于有机载体上,与腐植酸、诺沃肥和生物有机钙等有机肥联合修复石油污染的土壤。

本研究监测了修复过程中土壤 pH、阳离子交换量、石油烃降解率、16种 PAHs 浓度、脱氢酶的活性、土壤中细菌数量、土壤中微生物多样性的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

供试土壤:采自胜利油田表层 0~20 cm 石油污染土壤,经自然风干,过 100 目筛备用。其基本理化性质如表 1 所示,为盐碱土。

表 1 土壤基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of soil

指标	水解氮/ mg·kg ⁻¹	速效磷/ mg·kg ⁻¹	速效钾/ mg·kg ⁻¹	有机质/ %	pH	总石油烃 含量/(mg·kg ⁻¹)	含盐量/ %
测定值	18~20	233.2	7.8	2.99	8.2	32 000	2

主要培养基:LB 培养基;牛肉膏蛋白胨培养基;MRS 培养基;YEPD 培养基。

有机肥:腐植酸、诺沃肥(由天津市诺维信生物技术有限公司提供,为酶制剂经分离后形成的发酵残渣,其主要成分是发酵过程中未消耗尽的农产品、营养盐以及酶分离所使用的硅藻土等助滤物质。)、生物有机钙(主要成分为贝壳粉)。

1.1.2 微生物菌种来源

南开大学环境科学与工程学院环境生物技术研究室保存菌种。枯草芽孢杆菌为运动的、产芽孢的革兰氏阳性杆状细胞,能产生肽脂类表面活性剂并转化和降解石油的芳烃、烷烃和沥青质组分以及极性有机硫化化合物和有机氯化化合物,同时降低原油的重质馏分

含量,改善原油的物理化学性质。荧光假单胞菌为好氧革兰氏阴性菌,对原油有乳化、降解作用,在生长过程中分解少量原油,产生的鼠李糖脂表面活性剂、有机酸及气体等代谢产物均可影响原油的物理化学性质。粪链球菌为兼性厌氧革兰氏阳性球菌,能产生胞外蛋白,可在体外分解多环芳烃,当其与好氧细菌混合使用时,能达到更好的修复效果。热带假丝酵母能够利用正烷烃作为单一碳源快速生长,而且有研究表明^[9],热带假丝酵母产生的菌丝可以使土壤中其他菌种更自由地移动,使得它们与土壤接触更充分从而提高对石油烃类物质的降解能力。

1.2 实验方法

1.2.1 土壤盐碱化的改良及模拟原位修复处理方法

首先,对土壤进行盐碱改良,取 200 g 浇 1 次透水(即花盆底部有水渗出)后自然风干的土样,再加入 5%腐植酸-诺沃肥(1:1)粉末(W/W)、5%生物有机钙和 2%磷酸二氢铵并充分混合均匀。

然后,将改良后的土壤装入花盆,分别按照 0(记为 CK)、2%、4%、8%的比例加入混合菌剂,混合均匀后于室温下培养,每周浇水两次,保持含水率 20%左右。每个处理设置 3 个平行。分别于第 1、4、8、16、32、48 和 64 d 测定石油烃降解率、脱氢酶活性和 pH,并测定第 1、16、32、64 d 土壤的阳离子交换量和土壤中细菌总数。用 GC-MS 检测 4%处理第 1、16、64 d 残留 PAHs 浓度和其他物质浓度的变化。提取 4%处理第 1、32、64 d 土壤样品的总 DNA,然后进行聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)和变性梯度凝胶电泳(Denatured Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)。

1.2.2 分析方法

混合菌剂的培养采用三级扩大培养法。在 30 ℃、200 r·min⁻¹ 条件下,将 4 种菌分别培养,经平板稀释法检查菌落数大于 1×10¹⁰ cfu·mL⁻¹ 后,以腐植酸-诺沃肥(1:1)粉末为载体将 4 种菌液等体积同时吸附于载体上(载体与菌液的质量比为 2.5:1)制备成菌剂,密封于聚乙烯塑料袋内,室温保存。用平板计数法测定土壤中细菌的数量。

土壤中总石油烃含量(Total petroleum hydrocarbons content, TPH)的测定采用重量法^[10]。用索式提取法提取土壤中的总石油烃,计算每克干土中总石油烃含量,进而按下式计算石油烃降解率:

$$\text{石油烃降解率} = \frac{(M_1 - M_i)}{M_1} \times 100\%$$

式中: M_1 为第 1 d 土壤中总石油烃含量, $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; M_i 为第 i d 土壤中总石油烃含量, $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

脱氢酶活性测定采用改进的 TTC-脱氢酶活性测定方法^[1], 将 1 h 产生 $1 \mu\text{g}$ TF 的量定义为一个酶活力单位。

pH 值使用 ORP 监测仪测定, 方法参照 NY/T1121.2—2006 土壤检测第 2 部分: 土壤 pH 的测定^[12]。

阳离子交换量(cation exchange capacity, CEC)的测定方法参照 NY/T1121.5—2006 土壤检测第 5 部分: 石灰性土壤阳离子交换量的测定^[13]。

用气相色谱质谱(GC-MS, Finnigan 公司)对石油烃组分变化进行分析, 分析条件为: 气化温度 260°C ; 载气 He ; 柱温 200°C ; 柱 SE-30(50 m)。质谱条件: 电子能量 70 eV , 质量范围 20~350。

土壤中细菌多样性的分子生物学分析方法如下: 对不同时间 4% 处理土壤样品进行核酸抽提, 然后进行 PCR-DGGE(PCR, 基因扩增仪 PTC-100, Bio-Rad 公司; Dcode 突变检测分析系统, Bio-Rad 公司)分析。土壤样品总 DNA 的提取和纯化使用试剂盒(ZR Soil Microbe DNA Kit™ D6001, Made in USA)。将纯化所得总 DNA 作为模板, 使用 16S rDNA 中 V3 区特异性引物^[14](5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', 5'-CGCCCGC CGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGCC TACGGGAGGCAGCAG-3')扩增目的片段。每 $50 \mu\text{L}$ 反应体系中正反向引物各 $2 \mu\text{L}$, 4 种 dNTP 各 $1 \mu\text{L}$, Taq 酶 $1 \mu\text{L}$, 模板 $2 \mu\text{L}$, Buffer $5 \mu\text{L}$, 双蒸水 $34 \mu\text{L}$ 。并设置阴性对照和阳性对照。 94°C 10 min; 94°C 45 s, 65°C 退火 45 s, 以后每个循环温度降低 1°C , 直至退火温度为 55°C , 72°C 延伸 1 min, 并且在 55°C 进行 20 个循环; 72°C 最终延伸 10 min。扩增产物用琼脂糖检验。16S rDNA V3 区扩增产物进行 DGGE 分析。电泳所用聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 变性梯度为 30%~60%。使用电泳缓冲溶液为 $1\times\text{TBE}$ 。电泳条件: 60°C 恒温, 200 V 电泳 4 h, 然后用 EB 染色 30 min, 紫外凝胶成像系统分析结果。

2 结果与分析

2.1 土壤 pH 和土壤阳离子交换量的变化

从图 1 可以看出, 在加入有机肥和菌剂的初期, 4 个处理土壤 pH 都有明显的降低, 原本的盐碱土壤得到改善。初期 CK 的 pH 值从原始土壤的 8.2 降到了 6.1, 而 2%、4% 和 8% 处理的 pH 则分别降到 6.3、6.9 和 7.3。土壤的 pH 值随加入菌剂量的增加而增高, 这

是因为菌剂载体成分诺沃肥呈强碱性。随着时间的增加, 各处理 pH 趋于稳定, 维持在 7.5 左右。后期 pH 值略有下降, 这可能与微生物降解石油污染物产生酸性代谢产物有关。

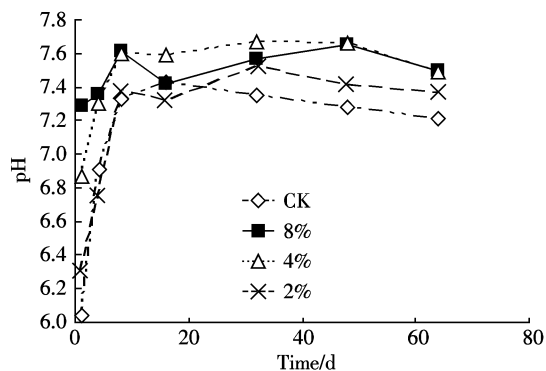


图 1 pH 随时间变化

Figure 1 Changes of soil pH with time

从表 2 可以看出, 没有加入菌剂的 CK 和 2% 处理 CEC 变化基本不大, 都在 $160 \text{ cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左右; 而 4% 和 8% 处理的 CEC 则随着时间的增加而增加, 到 64 d, 4% 和 8% 处理的 CEC 基本都在 $200 \text{ cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左右。这说明菌剂的加入对于土壤缓冲能力也有一定的影响, 可能与菌剂载体腐植酸类物质的缓冲特性有关。

表 2 阳离子交换量随时间变化

Table 2 Changes of CEC with time

时间/d	CEC			
	CK	2%	4%	8%
	$\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$			
1	163.37	158.69	148.58	176.24
16	164.15	176.16	178.20	179.70
32	157.46	160.58	193.13	203.93
64	175.40	165.69	201.94	187.46

从土壤 pH 和阳离子交换量变化可以看出, 4% 和 8% 处理土壤的盐碱环境得到了明显改善, 有机肥和菌剂的加入既调节了土壤 pH, 又增加了土壤的缓冲能力。

2.2 石油烃降解率和土壤中 PAHs 浓度的变化

不同时期各处理中石油烃降解率如图 2 所示。随着培养时间的增长各处理石油烃降解率不断增加, 直至 32 d 后变化速率减慢基本趋于平衡。前 4 d 各处理石油烃降解率差异不大, 这主要是因为菌剂中的微生物加入土壤后需要一段时间适应土壤环境, 而且产生表面活性剂和各种降解石油烃的酶也需要一定时间, 此时加入的菌剂还没有发挥其高效降解作用^[15]。陈荣

灿等^[16]研究表明,添加复合菌剂需保证足够的菌体适应期,一般可在 10 d 后达到高效降解周期。CK 处理中虽然没有加入菌剂,但是因为加入的有机肥中诺沃肥等成分能够刺激土著微生物的生长,使得石油烃降解率 64 d 后也达 43.91%。2%、4%和 8%处理石油烃降解率分别为 CK 的 1.17、1.64 和 1.57 倍,而 4%与 8%处理 64 d 的降解率差别并不显著,其原因可能是土壤中土著微生物与外源菌竞争和适应综合效率的时间效应所致,当外源菌加入的量少时无法成为优势菌,生长受到限制;加入量过多时土壤自身环境条件对菌剂的自然筛选作用会影响其存活率。

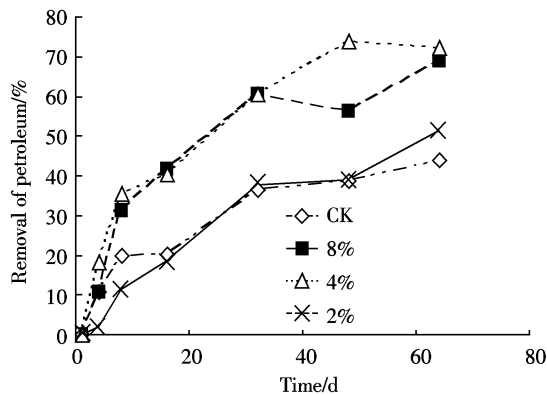


图 2 石油烃降解率随时间的变化

Figure 2 Degradation of total petroleum hydrocarbons with time

表 3 为 4%处理第 1、16 和 64 d 残油中 16 种 EPA 规定的优先污染物 PAHs 的浓度变化。16 种 PAHs 中大部分浓度都有明显的降低,其中萘、蒽、苯并(a)芘和苯并(g,h,i)芘的降解率分别达到了 65.5%、57.7%、74.7%和 55.5%。另有暂时未鉴定保留时间为 11.83、13.18、15.41 和 18.25 min 的物质第 64 d 降解率分别达到了 65.92%、32.00%、26.61%和 71.53%,如表 4 所示。图 3 为 4%处理不同时间的 GC-MS 图谱。随着时间的增加,各主要的 PAHs 分子峰丰度都有不同程度的降低,且前 16 d 变化比较明显。由此可见,用 4 种菌制成的混合菌剂与有机肥联合作用不仅能够改善土壤盐碱环境,有效地降解土壤中石油烃类物质,而且对多环芳烃也有较好的降解效果。

2.3 微生态的变化

2.3.1 脱氢酶活性的变化

在有机物的氧化过程中脱氢酶是作用在代谢物上的第一个酶,也是微生物降解有机污染物获得能量所必需的酶。生物体的脱氢酶活性在很大程度上反映了生物体的活性,而且能直接表示生物细胞对其基质

表 3 4%处理土壤中 PAHs 的含量随时间的变化

Table 3 Changes of PAH concentrations in soil as function of time with 4% addition of mixed cultures

PAHs	保留时间/ min	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		
		1 d	16 d	64 d
Naphthalene	8.39	1.629 3	0.585 7	0.562 4
Acenaphthylene	12.27	0.353 8	0.184 2	0.195 7
Acenaphthere	12.69	0.291 9	0.146 5	0.178 4
Fluorene	13.97	0.448 4	0.248 2	0.291 2
Phenanthrene	16.5	2.188 1	1.376 8	1.108 3
Anthracene	16.68	0.497 3	0.330 4	0.210 5
Fluoranthene	20.36	0.251 2	0.187 8	0.190 9
Pyrene	21.01	0.897 0	0.643 7	0.592 6
Benzo(a)anthracene	24.63	0.407 3	0.293 6	0.284 0
Chrysene	24.76	3.700 7	2.367 8	2.533 6
Benzo(b)Fluoranthene	29.6	6.721 5	4.149 9	7.600 1
Benzo(k)Fluoranthene	29.72	1.264 9	0.982 9	1.831 8
Benzo(a)pyrene	31.22	60.194 6	4.353 7	15.217 9
Indeno(1,2,3-(d)pyrene	36.75	4.985 8	2.170 8	5.673 3
Dibenz(α ,h)anthracene	36.78	10.647 5	3.628 7	13.890 1
Benzo(g,h,i)perylene	38.85	21.306 6	18.880 8	9.488 9

表 4 未鉴定物质的降解率

Table 4 Degradation rate of substance unidentified

保留时间/min	降解率/%	
	16 d	64 d
11.83	73.95	65.92
13.18	34.67	32.00
15.41	33.86	26.61
18.25	65.80	71.53

降解能力的强弱^[17]。如图 4 所示,随着培养时间的增加脱氢酶活性逐渐增大,说明修复过程中微生物的活性逐渐增强,这也与石油烃降解率变化趋势基本相同。在整个培养过程中,2%、4%和 8%处理脱氢酶含量要明显高于 CK,32 d 后各处理脱氢酶含量分别为 CK 的 1.78、3.58、4.41 倍。但是 32 d 后脱氢酶活性的变化速率却逐渐减小,末期甚至有所降低。这是因为修复后期随着易降解污染物的减少,难降解化合物的累积及有毒代谢产物的积累导致微生物活性降低。

2.3.2 土壤中微生物数量的变化

表 5 为各处理中细菌总数的变化。向土壤中加入菌剂的初期,2%、4%和 8%处理土壤中细菌总数量都要明显高于 CK,但是对比这 3 个处理第 1 d 细菌总数,虽然 4%、8%处理的细菌数量都高于 2%处理,但彼此之间相差无几。如上所述,有限的营养物质是限制微生

情况,以提取的不同土壤样品总DNA为模板,采用16S rDNA基因V3区的通用引物进行扩增,获得长为233 bp的16S rDNA基因V3区扩增产物。以扩增产物进行DGGE分析,结果如图5所示(左图为通过变性梯度凝胶电泳分离所得到的凝胶相片,右图为用Quantity-One处理得到的谱带注解图)。图谱上条带信息反映了土壤中微生物种群多样性及其构成。结果显示了4%处理第1、32和64 d的DGGE谱图在条带数目与亮度上均存在差异。由图5中的右图可以看出,修复过程中微生物多样性得到一定恢复,表现为谱带数目的增加。谱带亮度的提高则反映了菌群密度的增加,如图5左图所示。研究表明修复过程中土壤微生物的群落结构和组成发生了变化,土壤中微生物多样性变得更加丰富。

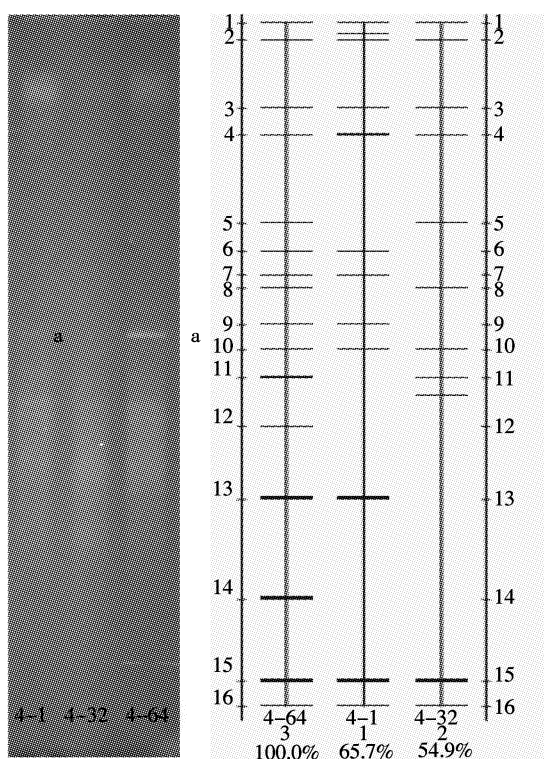


图5 4%处理不同时间土样DGGE分离图谱及示意图

Figure 5 DGGE profiles of bacterial community in soil with 4% addition as function of sampling time

3 结论

本文研究了菌剂与多种有机肥联合作用对石油污染土壤的修复能力,并对不同菌剂浓度处理的修复效果及土壤微生态变化进行了研究。结果表明:

(1)经过菌剂和腐植酸、诺沃肥、生物有机钙等有机肥的联合作用,土壤盐碱环境得到了明显改善,表

现为土壤pH的下降和CEC的增加,为菌剂和土壤中微生物提供了良好的生活环境。

(2)经过64 d的修复,土壤中各处理总石油烃含量都有明显下降,CK、2%、4%和8%处理石油烃降解率分别达到43.91%、51.39%、72.13%和68.79%;各处理的土壤脱氢酶活性随着培养时间的延长逐渐增强,其中4%和8%处理的脱氢酶活性要远高于CK和2%处理。

(3)对比各处理,4%菌剂处理与有机肥联合修复效果最显著,石油烃降解率高达72.13%,而且大部分PAHs浓度明显下降,其中难降解的苯并(a)芘和苯并(g,h,i)芘的降解率也分别达到74.7%和55.5%,土壤中微生物数量和多样性都有明显的增加。

本研究初步证实了在实验室条件下添加菌剂与复合有机肥对石油污染土壤有较好的修复效果,但要大规模的实际应用还需探索工程化的条件。另外,对于细菌-真菌协同修复的机理还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 许增德. 微生物法处理落地原油油泥中烃类污染物研究[J]. 油田建设设计, 2001, 1(1): 29-33.
XU Zeng-de. Treatment of petroleum hydrocarbons pollutants in the crude oil sludge by microbial technology[J]. *Oil Design*, 2001, 1(1): 29-33.
- [2] 姚德明, 许华夏, 张海荣, 等. 石油污染土壤生物修复过程中微生物生态研究[J]. 生态学杂志, 2002, 21(1): 26-28.
YAO De-ming, XU Hua-xia, ZHANG Hai-rong, et al. Microbiological ecology during bioremediation for oil contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2002, 21(1): 26-28.
- [3] 何良菊, 魏德洲, 张维庆. 土壤微生物处理石油污染的研究[J]. 环境科学进展, 1999, 7(3): 110-115.
HE Liang-ju, WEI De-zhou, ZHANG Wei-qing. Research of microbial treatment of petroleum contaminated soil[J]. *Advances in Environmental Science*, 1999, 7(3): 110-115.
- [4] 李习武, 刘志培. 石油烃类的微生物降解[J]. 微生物学报, 2002, 42(6): 764-767.
LI Xi-wu, LIU Zhi-pei. Microbial biodegradation of petroleum hydrocarbons[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(6): 764-767.
- [5] 何良菊, 李培杰, 魏德洲. 石油烃微生物降解的营养平衡及降解机理[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 91-94.
HE Liang-ju, LI Pei-jie, WEI De-zhou. Nutrient balance and mechanism of biological degradation of oil[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(1): 91-94.
- [6] 谢丹平, 尹华, 彭辉. 生物表面活性剂对菌XD-1降解原油的作用[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2004, 25(3): 365-369.
XIE Dan-ping, YIN Hua, PENG Hui. The effect of biosurfactants on the oil-degradation by strain XD-1 [J]. *Journal of Jinan University: Natural Science & Medicine Edition*, 2004, 25(3): 365-369.

- [7] Calvo C, Toledo F L, Gonzalez-lopez J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 109:255-262.
- [8] 顾传辉, 陈桂珠. 石油污染土壤生物降解生态条件研究[J]. *生态科学*, 2000, 19(4):67-71.
- GU Chuan-hui, CHEN Gui-zhu. Research of bioremediation condition of petroleum contaminated soil[J]. *Ecologic Science*, 2000, 19(4):67-71.
- [9] 韩慧龙, 汤 晶, 江 浩, 等. 真菌-细菌修复石油污染土壤的协同作用机制研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(1):189-195.
- HAN Hui-long, TANG Jing, JIANG Hao, et al. Synergy between fungi and bacteria in fungi-bacteria augmented remediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(1):189-195.
- [10] 奚旦立, 孙裕生, 刘秀英. 环境监测[M]. 修订版. 北京:高等教育出版社, 1995:404-405.
- XI Dan-li, SUN Yu-sheng, LIU Xiu-ying. Environmental Monitoring [M]. revision. Beijing: Higher Education Press, 1995:404-405.
- [11] 牛志卿, 刘建荣, 吴国庆. TTC-脱氢酶活性测定法的改进[J]. *微生物学通报*, 1994, 21(1):59-61.
- NIU Zhi-qing, LIU Jian-rong, WU Guo-qing. The amendment of TTC-dehydrogenases measurement[J]. *Microbiology*, 1994, 21(1):59-61.
- [12] NY/T1121. 2-2006 土壤检测第2部分:土壤 pH 的测定[S]. 北京:中国农业出版社, 2006.
- NY/T1121. 2-2006 Soil Testing Part 2:Method for determination of soil pH[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2006.
- [13] NY/T1121. 5-2006 土壤检测第5部分:石灰性土壤阳离子交换量的测定[S]. 北京:中国农业出版社, 2006.
- NY/T1121. 5-2006 Soil Testing Part 5:Method for determination of soil cation exchange capacity in calcareous soil[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2006.
- [14] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695-700.
- [15] 赵 敏, 马宏瑞. 石油降解菌的降解特性研究[J]. *油气田环境保护*, 2007, 17(2):8-10.
- ZHAO Min, MA Hong-rui. Study on the degradation of petroleum degradation bacteria[J]. *Environmental Protection of Oil & Gas Fields*, 2007, 17(2):8-10.
- [16] 陈荣灿, 卞卫国, 王林霞. 石油烃降解复合菌对含油污泥的降解特性[J]. *干旱区研究*, 2007, 11(24):850-853.
- CHEN Rong-can, BIAN Wei-guo, WANG Lin-xia. Study on biodegradation of oily sludge treated with complex bacteria[J]. *Arid Zone Research*, 2007, 11(24):850-853.
- [17] 解 军, 祁 峰, 裴海燕, 等. 脱氢酶活性检测方法及其在环境监测中的应用[J]. *中国环境监测*, 2006, 22(5):13-18.
- XIE Jun, QI Feng, PEI Hai-yan, et al. Determining method of dehydrogenase activity and its application in environmental monitoring[J]. *Environmental Monitoring in China*, 2006, 22(5):13-18.