

混合菌降解土壤中多环芳烃的试验研究

陈海英, 丁爱中, 豆俊峰, 杜勇超, 范福强

(北京师范大学水科学研究院, 地下水污染控制与修复教育部工程研究中心, 北京 100875)

摘要: PAHs 生物降解程度受多种因素影响。通过筛选驯化 PAHs 降解菌, 研究混合菌对土壤中菲、芘、苯并(a)蒽、苯并(b)蒽、苯并(k)蒽、茚并(1,2,3-cd)芘的生物降解性能, 并考察污染时间对土壤中 PAHs 降解效果的影响。结果表明, 筛选的混合菌具有很强的 PAHs 降解能力, 缩短了 PAHs 生物降解的半衰期, 且 PAHs 起始降解速率较快, 之后趋于平缓。27 d 内土壤中的菲、芘、苯并(a)蒽、苯并(b)蒽、苯并(k)蒽、茚并(1,2,3-cd)芘的平均降解率分别为 98.14%、89.97%、88.47%、63.55%、65.24%、60.49%, 其中菲在 5 d 之内的降解率高于 93%。污染 210 d 的土壤中各 PAHs 的起始降解速率高于污染 50 d 的土壤, 因此污染时间越长, PAHs 生物降解的停滞期越短。

关键词: PAHs; PAHs 降解菌; 生物降解; 污染土壤; 接触时间

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2010)06-1111-06

PAHs Biodegradation in Soil by Inoculation of Isolated Microorganisms

CHEN Hai-ying, DING Ai-zhong, DOU Jun-feng, DU Yong-chao, FAN Fu-qiang

(College of Water Sciences, Beijing Normal University, Engineering Research Center of Groundwater Pollution Control and Remediation, Ministry of Education, Beijing 100875, China)

Abstract: The rate and extent of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation in soil are affected by various factors, mainly including contact toxicity, soil-PAHs contact time, microbial population and environmental parameters. In this paper, the biodegradation efficiency of PAHs mixtures (consisting of phenanthrene, pyrene, benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene and indeno(1,2,3-cd)pyrene) with the inoculation of mixed microbial consortia was studied. The mixed microbial consortia were isolated from PAHs contaminated soil, mainly including *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Rhodobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Chryseobacterium* and *Microbacterium*. The results indicated that the isolated mixed microbial consortia were capable of mineralizing PAHs, and the half life of phenanthrene, pyrene, benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene and indeno(1,2,3-cd)pyrene in soil was 6.12, 8.25, 8.74, 19.31, 20.06 and 22.28 days, respectively. The initial biodegradation rates of these PAHs were faster at the beginning states, then became slower after the incubation of 17 days. The average biodegradation efficiency of phenanthrene, pyrene, benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene and indeno(1,2,3-cd)pyrene after 27 days was 98.14%, 89.97%, 88.47%, 63.55%, 65.24% and 60.49%, respectively. More than 93% of phenanthrene was degraded within the incubation of 5 days. The initial biodegradation rate of pyrene, benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene and indeno(1,2,3-cd)pyrene in soil contaminated for 210 days was 0.847 5, 0.898 5, 0.302 8, 0.197 6 and 0.137 8 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively. However, the initial biodegradation rate of these PAHs in soil contaminated for 50 days was 0.451 6, 0.662 8, 0.196 4, 0.165 3 and 0.093 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively. The lag phase of degradation was shorter with increasing soil-PAHs contact time.

Keywords: PAHs; PAHs degraders; biodegradation; contaminated soil; contact time

多环芳烃(PAHs)是一类难降解的有毒有机污染物,具有“三致”作用,且广泛分布于环境中。人为活动

使得环境中的 PAHs 逐渐增加,如工业生产、缺氧燃烧、垃圾焚烧和填埋、直接的交通排放等。由于 PAHs 具有强吸附性,使得它们在土壤环境中长期残留,并呈现出不断积累的趋势^[1]。进入土壤中的 PAHs 可以通过呼吸直接进入人体,或在一定条件下进入大气颗粒物、水和生物体等其他环境介质,间接影响人体健康。Menzie 等研究表明,由土壤进入人体的 PAHs 数

收稿日期:2009-11-13

基金项目:北京市科技计划项目(D08040900360804);北京师范大学自
主科研基金(2009SAT-15)

作者简介:陈海英(1984—),女,山东潍坊人,在读硕士,从事土壤污染
修复研究。E-mail:chy1025@126.com

通讯作者:豆俊峰 E-mail:doujfbnu.edu.cn

量要高于来自大气和水^[2]。因此 PAHs 污染土壤的修复已成为环境科学研究中的热点问题之一。

生物修复技术是去除土壤中 PAHs 的有效治理方法^[3-5]。由于 PAHs 的毒性强、脂溶性高、水溶性差及其特殊而稳定的环状结构,自然条件下 PAHs 很难被生物利用,尤其是高分子量 PAHs 对微生物生长有强抑制作用,生物可利用性很低^[6-7]。然而,部分微生物经过一段时间的驯化,也可以提高其对高环 PAHs 的降解能力^[8]。已发现大量微生物具有降解 PAHs 的能力,对于高分子量 PAHs,混合菌的降解效果优于单一菌种^[9-13]。PAHs 的生物降解程度与速率受各种物理、化学、生物因素的制约,如污染时间、PAHs 的毒性、微生物数量与活性等。有关研究表明,土壤-PAHs 接触时间的延长可以提高 PAHs 的矿化度与矿化速率,但是目前对于这一研究结果仍存在争议^[14-16]。尽管国内外进行了大量 PAHs 生物降解的试验研究,但成功地将筛选菌应用到土壤修复中的实例还很少^[17]。因此,筛选 PAHs 高效降解菌,研究制约因素对降解效果的影响对 PAHs 污染土壤的生物修复至关重要。

本文通过接种驯化培养得到的 PAHs 降解菌,研究混合菌对土壤中各种 PAHs(菲、芘、苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽、茚并(1,2,3-cd)芘)的生物降解性能及不同污染时间对土壤中 PAHs 生物降解的影响,并计算 PAHs 的降解速率与半衰期,为 PAHs 污染土壤的生物修复技术选择和设计提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菲、芘、苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽、茚并(1,2,3-cd)芘等购自美国 Sigma 公司,乙腈(色谱纯)、正己烷(色谱纯)、多环芳烃混合标准样品等购自美国 Supelco 公司。

试验采用无 PAHs 污染的土壤,风干过 2 mm 筛后,根据设定的各种 PAHs 的浓度配制污染土壤^[8]。待土壤中的有机溶剂挥发干后,将土壤用棕色瓶保存,于 4℃冰箱放置 50 d 和 210 d。土壤的部分理化性质如表 1 所示。

1.2 供试菌剂及菌悬液的制备

本试验所用的微生物菌种由北京焦化厂污染土壤中筛选,利用 PAHs 筛选、富集培养而得到土著混合菌。采用平板划线法对混合菌进行逐步分离,分离纯化的单菌用 16SrDNA 进行 PCR 扩增,扩增产物回收纯化后测序,并将测序结果在 NCBI 网站上进行核

表 1 试验土壤部分理化性质
Table 1 Characteristic of the experimental soil

测定项目	数据
pH	8.07
总氮(TN)/%	0.091
总磷(TP)/%	0.034
总钾(TK)/%	1.936
总有机质/%	2.54
粒径>20 μm/%	50.2
粒径 2~20 μm/%	22.7
粒径<2 μm/%	27.1

苷酸同源性比较,找出最为接近的细菌种类(同源性均在 97%以上),经过鉴定,分离纯化的单菌可归类为以下 8 个种属:鞘氨醇单胞菌属、甲基杆菌属、伯克霍尔德氏菌属、红球菌属、慢生根瘤菌属、叶杆菌属、金黄杆菌属、微杆菌属。试验用菌剂为菌悬液,即在无菌条件下将经过驯化的处于对数生长期的混合菌液,室温下 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集菌体,用磷酸盐缓冲液清洗,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,反复清洗 3 次,制成菌悬液,含菌量为 1.25×10⁸ CFU·mL⁻¹。

1.3 土壤 PAHs 生物降解试验

将含有菲、芘、苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽、茚并(1,2,3-cd)芘的 50 g 土壤加入到三角瓶中,加入 100 mL 无机盐培养液、1 mL 微量元素培养液,加入制备的菌悬液,调节 pH=7。其中,无机盐培养液的组成为:NH₄Cl (1.5 g·L⁻¹),KH₂PO₄ (1.5 g·L⁻¹),MgCl₂(0.25 g·L⁻¹),CaCl₂·2H₂O(0.10 g·L⁻¹);微量元素培养液的组成为:CoCl₂·6H₂O(35 mg·L⁻¹),CuCl₂(0.20 mg·L⁻¹),H₃BO₃(6.0 mg·L⁻¹),MnCl₂·4H₂O(25 mg·L⁻¹),Na₂MoO₄·2H₂O(3.0 mg·L⁻¹),NiCl₂·2H₂O(2.0 mg·L⁻¹),ZnCl₂(2.5 mg·L⁻¹)。在温度为 25℃、转速为 160 r·min⁻¹ 的条件下振荡,运行过程中采集泥浆样品,分析测定 PAHs 的残留量。试验所用的所有容器及培养液都经过 120℃高压灭菌 30 min。

1.4 土壤 PAHs 的测定

本试验研究参照 EPA 方法 3550 超声波提取,方法 3630 硅胶净化和方法 8310PAHs 类,建立了一套系统的 PAHs 预处理流程^[19-21]。用高压灭菌的玻璃离心管采集 30 mL 泥浆样品,4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,置于冷冻干燥机干燥 48 h 后,称取 2 g 干土于玻璃离心管中,加入 2 g 无水硫酸钠和 10 mL 二氯甲烷与丙酮的混合溶剂(体积比为 1:1),超声萃取 20 min 后在

4 000 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min, 收集萃取液, 如此连续超声萃取 3 次。用旋转蒸发器将萃取液浓缩, 更换溶剂为正己烷, 然后过硅胶柱净化, 收集洗脱液, 氮气吹干后用乙腈定容至 2 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 保存于棕色进样瓶待测。

PAHs 浓度采用戴安 U-3000 高效液相色谱仪测定, 色谱条件如下: 温度 25 ℃, 检测波长 254 nm, 注射体积 10 μL, 使用安捷伦 Eclipse PAH 4.6 mm×250 mm 色谱柱, 流动相为乙腈和水, 流速 1.2 mL·min⁻¹。

2 结果与讨论

2.1 土壤 PAHs 生物降解分析

图 1 为试验过程中 (27 d) 混合菌对各种 PAHs 的

生物降解曲线。图 1 结果显示, 混合菌接种到泥浆体系之后, 能够很快适应反应器内的环境, 对供试的几种 PAHs 表现出了较强的降解能力。在试验前 17 d, 混合菌对土壤中 PAHs 的生物降解能力较强, 随着时间的增加降解率逐渐升高, 降解速率逐渐降低。但在试验进行到 17 d 之后, 混合菌的生物降解效率基本保持稳定, 说明降解过程基本停止, 这可能是由于 17 d 后, 营养物质逐渐消耗, 微生物数量逐渐减少, 接种的混合菌生物活性减弱, 使其降解能力下降。另外, 污染物浓度降低也是降解速率下降的可能原因之一。由图 1 可以看出, 菲在第 5 d 降解率即高于 93%, 表明混合菌可以实现对土壤中菲的高效快速降解。

土壤中 PAHs 的初始浓度、最终浓度及最终降解

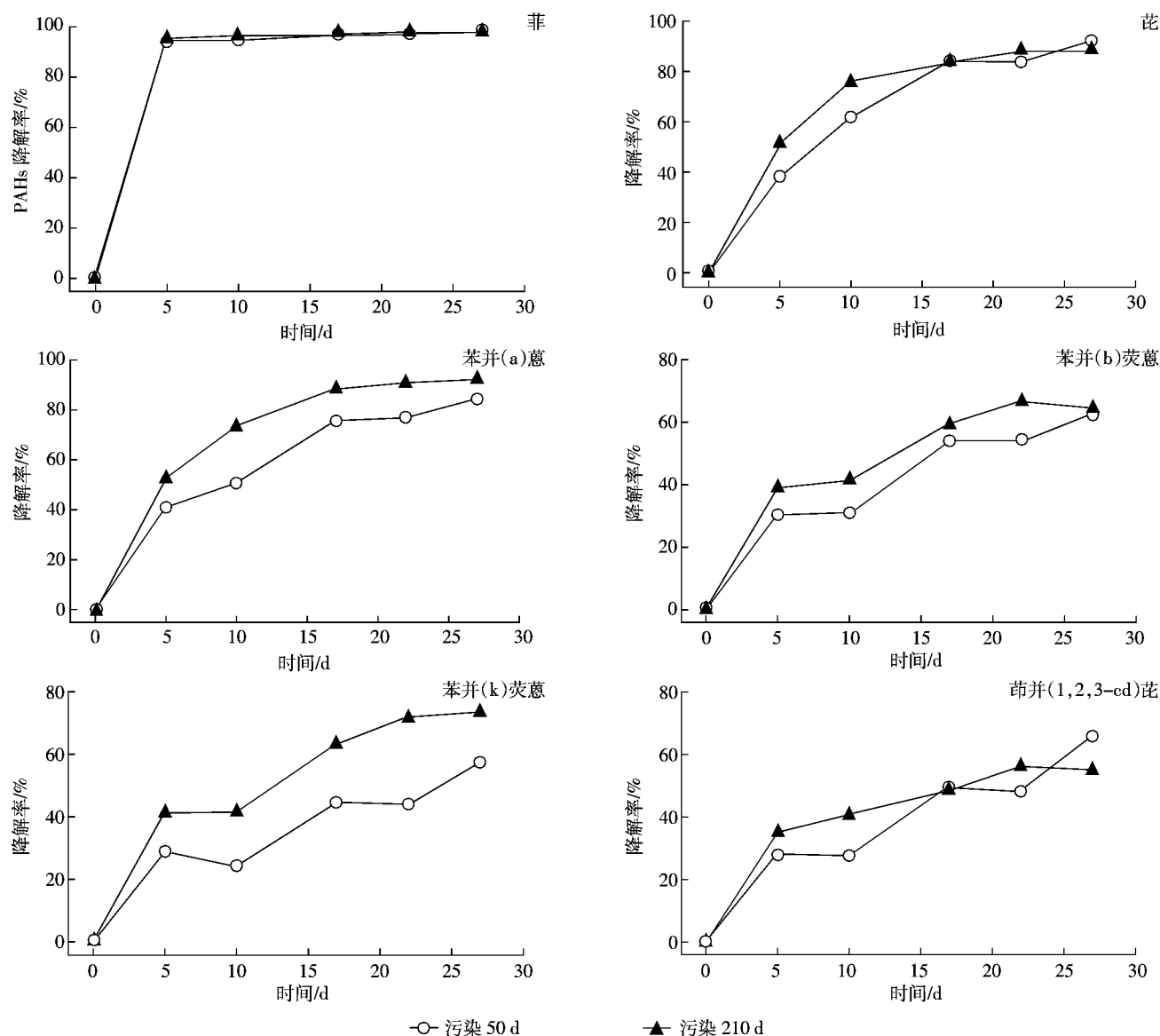


图 1 土壤中 PAHs 生物降解曲线

Figure 1 Biodegradation curves of PAHs in soil slurry with time

率如表 2 所示。从表 2 和图 1 可看出,随着分子量的增加,PAHs 的生物降解率大体呈现出减小的趋势,其中 27 d 后两种土壤中低分子量 PAHs-菲的降解率分别为 98.50%和 97.77%,芘和苯并(a)蒽的降解率分别为 92.00%和 87.94%、84.64%和 92.30%,苯并(b)荧蒽和苯并(k)荧蒽的降解率分别为 62.62%和 64.48%、57.20%和 73.27%,茚并(1,2,3-cd)芘的降解率分别为 65.82%和 55.16%。这主要是由于随着分子量的增大,PAHs 的沉积物-水分配系数增大,土壤有机质越容易吸收并保留它们,PAHs 从土壤中释放的速度也就越慢,且 PAHs 环状结构越复杂,越不易被微生物分解。国内外已开展了大量关于 PAHs 生物降解的研究,与已有研究相比,本研究驯化得到的混合菌对上述 PAHs 表现出了很强的降解能力,为成功修复 PAHs 污染土壤提供了强有力的保障。

2.2 PAHs 降解动力学方程

PAHs 降解动力学方程采用一级动力学模型进行拟合:

$$C=C_0e^{-\lambda t} \quad (1)$$

式中: C 为 t 时间土壤中 PAHs 的浓度; C_0 为土壤中 PAHs 的初始浓度; λ 为反应速率常数。采用最小二乘法和拟牛顿法,根据图 1 中的数据对土壤中 PAHs 各基质降解的动力学方程进行拟合,可以得到降解动力学模型中的各个参数值,结果如表 3 所示。

从表 3 可看出,在试验条件下,土壤中 PAHs 的生物降解速率随着环数的增加而减小,半衰期随环数的增加而延长。已有研究发现,三环 PAHs 半衰期 < 100 d,而大多数四环、五环 PAHs 生物可利用性较低,其半衰期一般都 > 100 d^[22-23]。本试验中,两种土壤中菲、芘、苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽、茚并(1,2,3-cd)芘的平均半衰期分别为 6.12、8.25、8.74、19.31、20.06、22.28 d,PAHs 的半衰期都显著缩短,表

表 3 PAHs 降解动力学方程和模型参数

Table 3 PAHs biodegradation kinetic equations and parameters

土壤污染时间	PAHs	降解动力学方程	R^2	半衰期/d
土壤污染 50 d	菲	$C=12.695e^{-0.119t}$	0.72	5.82
	芘	$C=5.693e^{-0.091t}$	0.97	7.62
	苯并(a)蒽	$C=7.340e^{-0.067t}$	0.97	10.34
	苯并(b)荧蒽	$C=2.955e^{-0.054t}$	0.94	20.38
	苯并(k)荧蒽	$C=2.698e^{-0.027t}$	0.91	25.67
	茚并(1,2,3-cd)芘	$C=1.599e^{-0.035t}$	0.93	19.8
土壤污染 210 d	菲	$C=9.197e^{-0.108t}$	0.60	6.42
	芘	$C=6.147e^{-0.078t}$	0.91	8.88
	苯并(a)蒽	$C=6.834e^{-0.097t}$	0.96	7.14
	苯并(b)荧蒽	$C=3.309e^{-0.038t}$	0.90	18.24
	苯并(k)荧蒽	$C=2.127e^{-0.038t}$	0.95	14.44
	茚并(1,2,3-cd)芘	$C=1.660e^{-0.028t}$	0.86	24.75

明筛选的混合菌可以快速降解土壤中的 PAHs。从表 3 还可以看出菲的拟合效果不是很好(50 d 污染土壤拟合 $R^2=0.72$, 210 d 污染土壤拟合 $R^2=0.60$),这主要是由于土壤中的菲在 5 d 之内基本就被微生物降解,之后土壤中残余的少量菲降解速率很小的缘故。

2.3 污染时间对 PAHs 生物降解的影响

PAHs 与土壤接触时间的长短会影响微生物对 PAHs 的生物降解效果。本试验采用两种污染时间的土壤,即污染 50 d 与 210 d。从表 2 和表 3 可以看出,两种土壤中 PAHs 的降解结果没有明显的规律,污染 50 d 的土壤中菲、芘、茚并(1,2,3-cd)芘的降解效率高、半衰期短,而苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽的降解结果却相反,其在污染 210 d 的土壤中生物降解效率高、半衰期短。然而,从图 1 PAHs 生物降解曲线可以看出,在降解试验的前 17 d,污染 210 d 的土壤中菲、芘、茚并(1,2,3-cd)芘、苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽的降解率皆高于污染 50 d 的土壤。表 4 为各种 PAHs 在 5 d 内的降解速率计算

表 2 试验前后土壤中 PAHs 的浓度变化及平均降解率

Table 2 Changes of PAHs concentrations in soil slurry and the biodegradation efficiency

PAHs	污染 50 d			污染 210 d		
	初始浓度/mg·kg ⁻¹	最终浓度/mg·kg ⁻¹	降解率/%	初始浓度/mg·kg ⁻¹	最终浓度/mg·kg ⁻¹	降解率/%
菲	41.62	0.62	98.50	38.91	0.87	97.77
芘	5.93	0.47	92.00	8.32	1.00	87.94
苯并(a)蒽	8.07	1.24	84.64	8.57	0.66	92.30
苯并(b)荧蒽	3.21	1.20	62.62	3.89	1.38	64.48
苯并(k)荧蒽	2.89	1.24	57.20	2.41	0.64	73.27
茚并(1,2,3-cd)芘	1.67	0.57	65.82	1.97	0.88	55.16
总量	63.39	5.34	91.58	64.07	5.43	91.52

表 4 试验 5 d 内混合菌对不同土壤中各种 PAHs 的降解速率($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)Table 4 The biodegradation rate of PAHs by mixed microbes in different soil after the incubation of five days($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)

土壤污染时间	菲	芘	苯并(a)蒽	苯并(b)荧蒽	苯并(k)荧蒽	茚并(1,2,3-cd)芘
土壤污染 50 d	7.806 5	0.451 6	0.662 8	0.196 4	0.165 3	0.093 6
土壤污染 210 d	7.430 9	0.847 5	0.898 5	0.302 8	0.197 6	0.137 8

结果。

从表 4 可以看出,在 PAHs 初始浓度相近的情况下(表 2),除菲的降解速率差别微小之外,污染 210 d 的土壤中其他 PAHs 的降解速率均明显高于污染 50 d 的土壤,表明污染时间越长,越有利于 PAHs 生物降解的快速启动。国外开展的许多污染时间对 PAHs 生物降解的研究得到了类似的结果,如 Macleod 等^[24]发现土壤中芘的矿化率随着土壤-芘接触时间的延长而增加;Angela 等^[25]研究表明,污染 84 d 比污染 1 d 的土壤中菲的矿化率提高了约 15%,污染 84 d 的土壤中菲的降解停滞期明显缩短,甚至可忽略。污染时间影响 PAHs 生物降解可能是由于其影响土壤对 PAHs 的吸附与解吸,土壤-PAHs 接触时间越长,PAHs 越不容易从土壤中解吸,PAHs 对微生物的毒性减小,缩短了微生物的适应期,从而缩短 PAHs 生物降解的停滞期,提高 PAHs 的矿化程度^[24,26-28]。污染时间对 PAHs 降解程度与降解速率的影响与土壤本身的性质及微生物种类、降解特性等有关,有待于进一步深入研究。

3 结论

(1)由 PAHs 污染土壤中筛选驯化的混合菌具有很强的 PAHs 降解能力,可以很快适应泥浆环境体系,高效地降解土壤中的菲、芘、苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽、茚并(1,2,3-cd)芘,且在降解过程中,起初降解速率较快,之后趋于平缓。PAHs 环数越多,其生物降解率越低。

(2)PAHs 降解动力学模型分析结果表明,土壤中 PAHs 的生物降解速率随着环数的增加而减小,半衰期随环数的增加而延长。两种土壤中菲、芘、苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽、茚并(1,2,3-cd)芘的平均半衰期分别为 6.12、8.25、8.74、19.31、20.06、22.28 d。

(3)不同污染时间对土壤中 PAHs 的生物降解速率产生了一定的影响。尤其在降解初期,污染 210 d 的土壤中,除菲之外的各种 PAHs 的降解速率高于污染 50 d 的土壤,说明污染时间的延长缩短了 PAHs 的

生物降解停滞期。

参考文献:

- [1] Jones K C, Voogt P. Persistent organic pollutant (POPs): State of science [J]. *Environmental Pollution*, 1999, 100:209-221.
- [2] Menzie C A, Potocki B B, Santodonato J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment[J]. *Environmental Science & Technology*, 1992, 16:1278-1284.
- [3] Bossert I D, Bartha R. Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic-hydrocarbons in soil[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1986, 37:490-495.
- [4] Carmichael L M, Pfaender F K. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils[J]. *Biodegradation*, 1997, 8:1-13.
- [5] Wilson S C, Jones K C. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-A review[J]. *Environmental Pollution*, 1993, 81:229-249.
- [6] Juhasz A L, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000, 45:57-88.
- [7] Lotfabad S K, Gray M R. Kinetics of biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60:361-365.
- [8] Li X, Li P, Lin X, et al. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 150(1):21-26.
- [9] Chung W K, King G M. Isolation, characterization, and polyaromatic hydrocarbon degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediments and description of *Lutibacterium anuloderans* gen. nov., sp. nov., and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov. [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67:5585-5592.
- [10] Guo C L, Zhou H W, Wong Y S, et al. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 51:1054-1061.
- [11] Kanaly R A, Bartha R, Watanabe K, et al. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66:4205-4211.
- [12] Grant A S, Margaret L B, Sudarat B, et al. Detoxification of soils containing high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by gram-negative bacteria and bacterial-fungal co-cultures[C]//Donald L W, Debra J T, Edward J C, et al. Bioremediation of contaminated soils. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 2000:409-432.

- [13] 李培军, 许华夏, 张春桂, 等. 污染土壤中苯并(a)芘的微生物降解[J]. 环境污染治理技术与设备, 2001, 2(5):37-40.
- LI Pei-jun, XU Hua-xia, ZHANG Chun-gui, et al. The degradation of B(a)P by microorganism in contaminated soil[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2001, 2(5):37-40.
- [14] Leahy J G, Colwell R R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment[J]. *Microbiological Reviews*, 1990, 54:305-315.
- [15] Macleod C J A, Semple K T. Influence of contact time on extractability and degradation of pyrene in soils[J]. *Environmental Science and Technology*, 2000, 34(23):4952-4957.
- [16] Macleod C J A, Semple K T. The influence of single and multiple applications of pyrene on the evolution of pyrene catabolism in soil[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 139(3):455-460.
- [17] 房妮, 俱国鹏. 多环芳烃污染土壤的微生物修复研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(7):1425-1426.
- FANG Ni, JU Guo-Peng. Research progress in microbial remediation of PAHs contaminated soil[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2006, 34(7):1425-1426.
- [18] Doick K J, Lee P H, Semple K T. Assessment of spiking procedures for the introduction of a phenanthrene-LNAPL mixture into field-wet soil[J]. *Environmental Pollution*, 2003, 126(3):399-406.
- [19] USEPA. Method 3550B:Organic extraction and sample preparation[S]. Washington, 1996:1-15.
- [20] USEPA. Method 3630C:Solid gel cleanup[S]. Washington, 1996:1-15.
- [21] USEPA. Method 8310:Polynuclear aromatic hydrocarbons[S]. Washington, 1996:1-13.
- [22] Michael J S, Gordon L, Richard G B. Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 152:141-147.
- [23] 胡广军, 梁成华, 李培军, 等. 固定化微生物对多环芳烃污染土壤的降解[J]. 生态学杂志, 2008, 27(5):745-750.
- HU Guang-jun, LIANG Cheng-hua, LI Pei-jun, et al. Degradation of soil polycyclic aromatic hydrocarbons by immobilized microbes[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2008, 27(5):745-750.
- [24] Macleod C J A, Semple K T. The adaptation of two similar soils to pyrene catabolism[J]. *Environmental Pollution*, 2002, 119:357-364.
- [25] Angela H R, Jakub H, Kirk T S. Development of phenanthrene catabolism in natural and artificial soils[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 152:424-430.
- [26] Kelsey W, Alexander M. Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, 16:582-585.
- [27] White J C, Kelsey W, Hatzinger P B, et al. Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, 16:2040-2045.
- [28] Hatzinger P B, Alexander M. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability[J]. *Environmental Science & Technology*, 1995, 29(2):537-545.