

4株石油降解真菌的生长及降解特性分析

贾洪柏¹, 曲丽娜², 王秋玉^{1*}

(1.东北林业大学生命学院, 哈尔滨 150040; 2.大庆师范学院, 黑龙江 大庆 163712)

摘要:通过对4株石油降解真菌的生长速率及其对液体培养基中的原油和土壤中油污的降解情况进行测定, 分析了不同菌株对石油烃的降解特性。结果表明, J12(*Fusarium* sp.)菌株在液体和固体培养基中的生长速率最大。在原油液体培养基培养30 d后, 色谱-质谱检测表明: J12菌株对C₁₆~C₃₁的直链烃具有较强的降解能力; J3(*Bionectria* sp.)和J4(*Stachybotrys* sp.)菌株能够完全降解原油中的芳香烃和支链烃, 并且J4菌株还可以完全降解C₃₃的直链烃, 但是新增了C₁₄的直链烃和一种C₁₆H₂₂O₄; J11(*Fusarium* sp.)菌株可以完全降解C₁₀的芳香烃, 但是产生了两种C₁₆H₂₂O₄。从原油降解后的组分及土壤中油污的组分检测结果推断, C₇和C₁₀芳香烃可能是石油烃降解的中间产物; J12菌株对原油和油污30 d的降解率都最高, 分别为64.25%和30.58%; 除了J3菌株外, 其他3个菌株对土壤中的油污降解率都低于原油的降解率。通过对菌株的生长速率及降解率比较发现, 试验中石油的降解率与菌株的生长速率没有必然联系, 主要与菌株的降解特性及石油的组分含量有关。

关键词:石油降解真菌; 组分分析; 生长特性; 降解特性; 石油降解率

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2013)07-1361-07 doi:10.11654/jaes.2013.07.012

Growth Characteristics and Degradation Properties of Four Oil-Degradation Fungi

JIA Hong-bai¹, QU Li-na², WANG Qiu-yu^{1*}

(1. Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Daqing Normal University, Daqing 163712, China)

Abstract: To analyze the degradation properties of four oil-degradation fungi, the mycelial growth rates on the solid medium, the dry mycelial weights from the liquid medium and the degradation rates of the crude oil in the liquid medium and the oil in the soil were determined. The mycelial growth rate and the dry mycelial weight of J12(*Fusarium* sp.) were the largest. After 30 d cultivation in the liquid medium with the crude oil, the results by GC-MS showed that J12 could mainly degrade linear hydrocarbons C₁₆~C₃₁. Compared with the crude oil, two aromatic hydrocarbons C₁₀ appeared in the degradation products of J12 and the media without any inoculation. J3(*Bionectria* sp.) and J4(*Stachybotrys* sp.) could completely degrade aromatic hydrocarbons and branched hydrocarbons of the crude oil. J4 could completely degrade linear hydrocarbon C₃₃, C₁₆H₂₂O₄ and linear hydrocarbon C₁₄ were detected in its oil-degradation products. J11(*Fusarium* sp.) could completely degrade aromatic hydrocarbons C₁₀, linear hydrocarbons C₁₆ and C₂₆. Two C₁₆H₂₂O₄ were detected in its degradation products. Combined with the components analysis of the oil in the soil, aromatic hydrocarbons C₇ and C₁₀ may be the intermediate products of the oil degradation. The oil degradation rates of J12 in the liquid medium and the soil were the highest. They were 64.25% and 30.58%, respectively. The oil degradation rates in liquid medium were higher than those in the soil except J3 after 30 d degradation. The correlation analysis showed that the oil degradation rate related to fungal species and the components of the oil, not relevant with the growth characteristics of the fungi.

Keywords: oil-degradation fungi; components analysis; growth characteristics; degradation properties; oil degradation rate

随着石油应用范围的不断扩大, 其消费量日益增加。由于开采、冶炼、运输等环节工艺水平和处理技术

的限制, 使石油对环境造成了严重的污染。污染物通过蒸发、地表径流和渗透作用进入大气、地下水和地表水中, 也残留在土壤环境中。石油污染物进一步通过多种途径可以转移到动物和植物体中, 通过食物链最终对人体造成危害^[1]。

油污的处理方法很多, 包括填埋、焚烧和生物修复等方法, 其中生物修复技术因具有安全、经济、没有

收稿日期: 2013-01-17

基金项目: 国家林业局“948”项目(2008-4-34); 黑龙江省科技攻关计划项目(GB07B306)

作者简介: 贾洪柏(1978—), 男, 辽宁辽阳人, 在读博士。

E-mail: laochao3107@126.com

* 通信作者: 王秋玉 E-mail: wqyll@sina.com

二次污染和操作相对简单等优点^[2-3]成为最具有应用前景的方法。近年来对生物修复技术的研究很多,包括土地耕作、堆肥^[4-8]、生物反应器、生物刺激和蚯蚓的应用^[9-11]等,同时也有对微生物代谢产物,如生物表面活性剂、脱氢酶活性与油污降解关系的研究^[12-14]。但具有强降解石油污染物能力的微生物是决定生物修复效率的关键因素,筛选高效降解石油的微生物菌种及菌群是近年来研究的热点和研究者不断探索的重点^[15-24]。本研究针对筛选的4株石油降解真菌对原油组分的降解特异性进行了分析,为微生物修复技术的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

从大庆油井附近表层(0~20 cm)油污污染土壤筛选得到4株降解石油真菌,经鉴定J3属于黄白生丛赤壳菌属(*Bionectria* sp.),J4属于葡萄穗酶菌属(*Stachybotrys* sp.),J11和J12属于镰孢霉属(*Fusarium* sp.)。

1.1.2 原油及油污污染土壤

原油来自大庆油田采油二厂;油污污染土壤取自大庆1961年勘探的油井附近的表层油污污染土壤,经测定含油量为 $(16.5 \pm 0.5) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.2 方法

1.2.1 培养基配方

(1)基础液体培养基:大量元素($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):KCl 0.25, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.24, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10.46, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NH_4NO_3 1.0。微量元素($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1。蔗糖 $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。pH7.0。其中每1000 mL液体培养基中加入18.0 g琼脂即配成基础固体培养基。

(2)原油液体培养基:用原油代替基础液体培养基中的蔗糖。

1.2.2 丝状真菌生长速率及菌丝干质量的测定

用打孔器在真菌固体平板上打直径为1 cm的菌饼接种于新鲜的固体基础培养基中,28℃暗培养6 d,每日测量菌丝的生长半径。

在培养7 d的真菌平板上用打孔器打直径1 cm的菌饼接种到已灭菌的30 mL基础液体培养基中,经28℃、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养,每24 h取出培养液,用滤纸过滤,蒸馏水冲洗两次,置烘箱中100℃烘至恒重并计算菌丝重量。

以上试验均重复3次。

1.2.3 液体培养基原油降解试验

在培养7 d的真菌平板上用打孔器打直径1 cm的菌饼加入已灭菌的30 mL原油液体培养基中,经28℃、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养,分别在第6、12、18、24、30 d利用重量法测定原油降解率,以无添加菌种的液体培养基作为空白对照(CK)。每个处理3次重复。

1.2.4 油污污染土壤生物修复试验

取经风干、过2 mm筛的油污污染土壤10 g装入三角瓶中灭菌,在培养7 d的真菌平板上用打孔器打直径1 cm的菌饼添加到灭菌的油污污染土壤中,捣碎,并加入已灭菌的无机盐液体培养基(不含蔗糖的基础液体培养基)4 mL,充分混匀后置于28℃培养箱中静置培养,每6 d添加定量的灭菌水,使土壤的含水量在20%~40%,分别在第6、12、18、24、30 d利用重量法测定石油降解效率,以无添加菌种的油污污染土壤作为空白对照(CK)。每个处理3次重复。

1.2.5 石油样品的萃取与降解率计算

(1)液体培养基中石油的萃取:用1:1硫酸酸化培养液至pH值为2~2.5,加入10 mL石油醚-正己烷1:1混合液(V/V),振荡溶解石油;将培养液和石油醚溶液转移至50 mL离心管中,漩涡振荡3 min, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心3 min,取上清萃取液;用10 mL石油醚-正己烷混合液清洗培养用的三角瓶,再转移到离心管中,振荡、离心、取上清萃取液;重复上步操作;向离心管中加入15 mL三氯甲烷溶液,漩涡振荡5 min,吸取三氯甲烷的萃取液;残液再加入10 mL三氯甲烷溶液,振荡、离心,取萃取液。合并萃取液,用铺有10 mm无水硫酸钠的三氯甲烷浸过的滤纸过滤,接收滤液于已知重量的恒重烧杯中,再用20 mL三氯甲烷溶液分两次浸洗过滤后的滤纸,洗液用同样方法过滤,收集滤液至同一烧杯中,置于60℃烘箱中使有机溶剂挥发至恒重,取出放在干燥器中冷却0.5 h后称重。

以0 d时从无菌原油液体培养基中萃取的原油为试验的初始原油质量,并用于原油组分分析。

(2)油污污染土壤中石油的萃取:待测土壤样品风干、研碎,装入50 mL离心管中,加入15 mL石油醚-正己烷1:1混合液(V/V),漩涡振荡5 min,70 W超声25 min, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心3 min,取上清萃取液;重复以上步骤两次,再用三氯甲烷溶液萃取至溶液无色;合并萃取液,过滤及称重步骤同(1)。

(3)石油降解率(%)的重量法计算公式:

$$\text{降解率} = \frac{\text{降解前石油质量} - \text{降解后石油质量}}{\text{降解前石油质量}} \times 100\%$$

1.2.6 石油组分分析

将干燥恒质量的石油样品加入 5 mL 的石油醚完全溶解,检测前将样品稀释 3 倍。测定仪器为 Agilent GC-MSD 6890N-5973 气质联用仪,色谱条件为:毛细管色谱柱为 DB-17MS,柱长 30 m,内径 0.25 mm,膜厚 0.25 μm ,汽化室温度 270 $^{\circ}\text{C}$,载气为氦气,柱流量 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,不分流进样,进样量 1 μL ,柱温 80 $^{\circ}\text{C}$ 保留 2 min,以 10 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$ 保留 20 min,GC-MSD 接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱条件:电离源 EI,电子能量 70 eV,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,扫描范围 15~500 amu (原子质量单位),利用 NIST02 谱库进行分析。

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析和相关分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的生长特性

不同菌株在固体培养基和基础液体培养基中的生长情况如图 1。在固体培养基中,J12 菌株的菌丝平

均生长速率最大 (0.30 $\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$),J11 菌株最小 (0.18 $\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$)。方差分析表明,在固体培养基中,不同菌株的菌丝平均生长速率差异显著 ($F=9626^{**}, P<0.01$)。在基础液体培养基中,不同菌株的菌丝干质量在第 4~6 d 达到最大,而后逐渐降低;不同菌株的菌丝干质量有较大差别,J12 最大时达到 0.178 3 g;J4 菌株的菌丝干质量均低于同时期的其他菌株,最大时只有 0.068 3 g。

2.2 石油组分分析

2.2.1 原油与土壤中油污组分分析

原油及土壤中油污的色谱-质谱检测结果如图 2 (石油组分以碳原子数表示)。原油组分中: C_7 及 5.982 min 和 6.115 min 出现的 C_{10} 为芳香烃,含有一个苯环,两个 C_{10} 为同分异构体,芳香烃占原油总质量的 0.47%;11.413 min 出现的 C_{19} 和 12.585 min 出现的 C_{20} 为支链烷烃,占总质量的 11.16%;其余为直链烷烃。原油的主要组分为 $\text{C}_{18} \sim \text{C}_{28}$ 的直连烷烃,占原油总质量的 73.4%。

土壤中油污比原油增加了 4 种芳香族组分,即为两种 C_{10} 的同分异构体、14.03 min 出现的 C_{12} 和

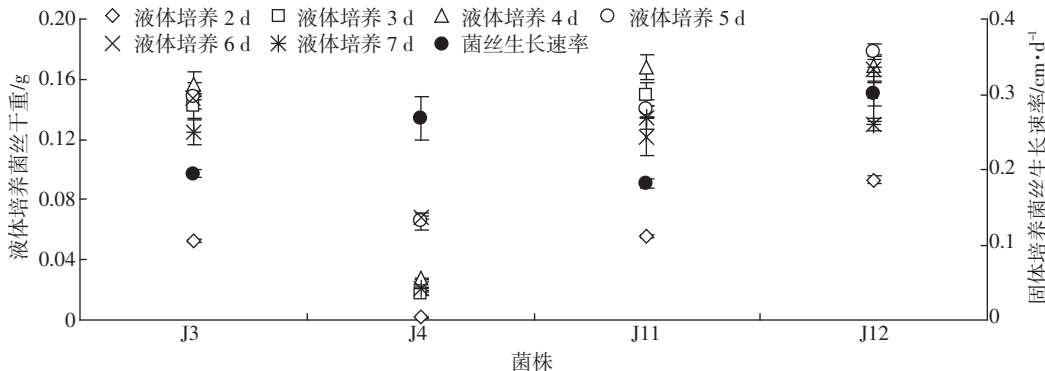


图 1 丝状真菌在固体和液体培养基中的生长状态

Figure 1 The mycelial growth of the filamentous fungi on the agar and the liquid medium

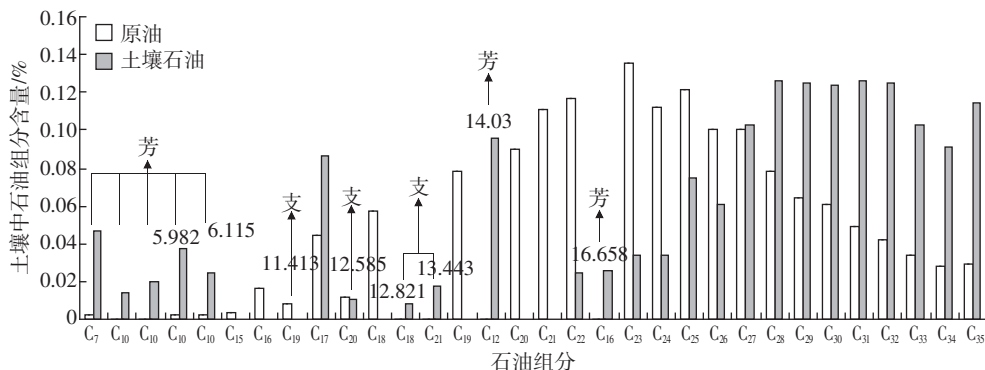


图 2 土壤中油污与原油成分的比较

Figure 2 Components of the oil from the soil and the crude oil

16.658 min 出现的 C_{16} , 芳香族组分占油污总质量的 16.01%; 12.585 min 出现的 C_{18} 、12.821 min 出现的 C_{20} 和 13.443 min 出现的 C_{21} 为支链烷烃, 占总质量的 2.29%; 其余为直链烷烃。油污的主要组分为 $C_{27}\sim C_{35}$ 的长链烃, 占油污总质量的 62.7%。

2.2.2 液体环境中原油降解后的组分分析

在液体环境下, 空白对照处理及经不同菌株降解培养 30 d 后原油组分变化如图 3 和图 4。由图 3 可以看出, 对照组 CK 的原油组分中 $C_{18}\sim C_{35}$ 的有机物均明显减少, 但分子量较小的 $C_{15}\sim C_{17}$ 直链烃、芳香烃及支链烃含量都有所增加, 并且还增加了两种 C_{10} 的芳香烃同分异构体。

由图 4 可以看出, 4 株真菌对原油组分中 $C_{18}\sim C_{31}$ 之间的化合物均有普遍的降解能力, 但不同的菌株可以特异的降解不同的原油组分。J3 菌株完全降解了 C_7 、 C_{10} 的芳香烃和 C_{19} 、 C_{20} 的支链烃, $C_{15}\sim C_{17}$ 的有机物增多。J4 菌株也完全降解了 C_7 和 C_{10} 的芳香烃、 C_{19} 和 C_{20} 的支链烃及 C_{33} 的直链烃, 但产生了 C_{14} 的直链烃和一种 $C_{16}H_{22}O_4$ 芳香族化合物, $C_{15}\sim C_{17}$ 的有机物增多。J11 菌株能够完全降解 C_{10} 的芳香烃和 C_{16} 、 C_{26} 的

直链烃, 同时产生了两种 $C_{16}H_{22}O_4$ 的同分异构体; $C_{18}\sim C_{30}$ 直链烃减少较多, C_{19} 、 C_{20} 支链烃及 $C_{32}\sim C_{35}$ 的直链烃含量有所增加。J12 新增加了两种 C_{10} 的芳香烃, $C_{16}\sim C_{31}$ 的直链烃减少较多, 其他组分略有增加。

2.3 不同菌株对原油和油污的降解

4 株真菌在液体和土壤中对原油和油污的降解情况如表 1。

在液体培养基中, 30 d 后 J12 对原油的降解率最大, 达到 64.25%, 其次为 J11 和 J4, J3 的降解率最小, 只比对照组多 1.95%, 为 21.06%。在油污污染土壤中, J12 对石油的降解率也最大 (30.58%); J4 菌株最小, 为 22.49%。除了 J3 菌株处理外, 其他处理的油污降解率都低于原油的降解率, J12 菌株处理减少的最多, 达到了 33.67%。相关分析表明, 菌丝最大干质量与液体培养基中原油的降解率、菌丝平均生长速率与土壤中油污的降解率相关性较低, 没有达到显著性水平, 相关系数分别为 0.307 和 0.395。

3 讨论

试验 30 d 后, 液体和土壤试验中的对照组 CK 的

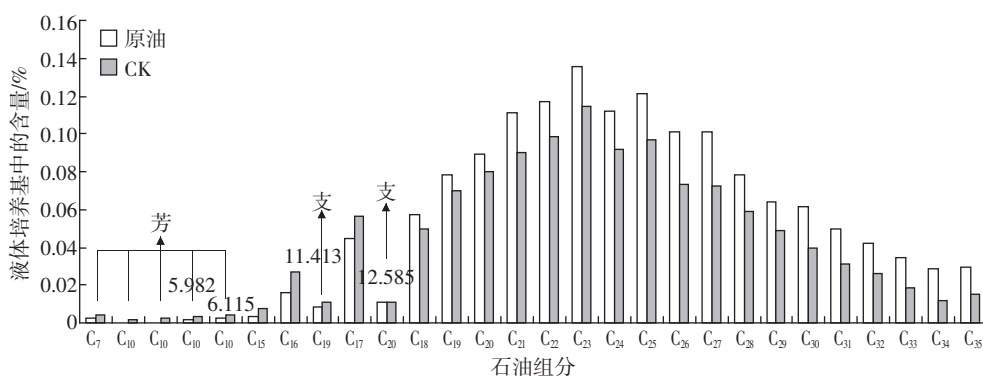


图3 原油和液体培养下对照组 CK 的组分变化

Figure 3 Changes in the components of the crude oil and the liquid media without inoculation

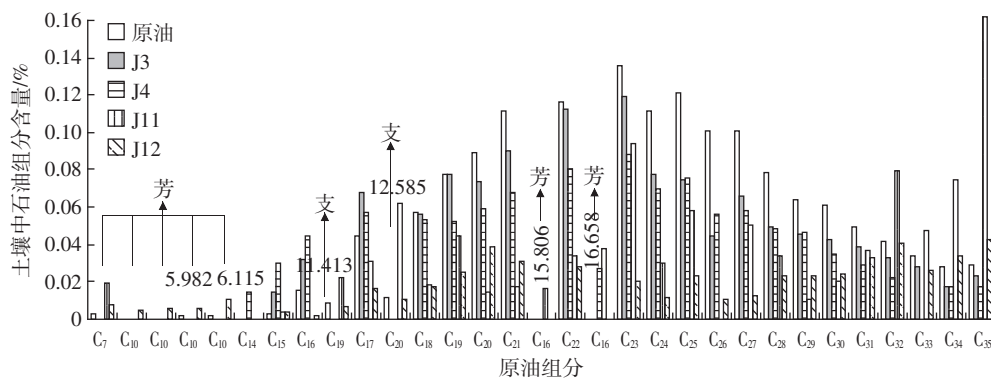


图4 液体培养下真菌对原油组分的降解情况

Figure 4 Degradation of components of the crude oil by the fungi in liquid medium

表 1 液体和土壤条件下丝状真菌对石油的降解率

Table 1 The oil degradation rates of the filamentous fungi in the liquid medium and the soil

处理环境	菌株	降解率/%				
		6 d	12 d	18 d	24 d	30 d
液体培养基	CK	5.71±1.11	9.63±1.58	10.12±1.40	15.43±2.37	19.11±1.39
	J3	7.05±1.64	11.99±2.71	14.01±2.01	18.83±2.86	21.06±2.58
	J4	14.99±2.25	18.26±2.22	23.34±1.62	25.83±3.06	29.83±3.29
	J11	10.39±1.94	20.48±2.27	24.06±2.08	27.72±3.12	31.90±2.12
	J12	23.04±2.12	31.88±2.33	38.44±1.24	51.15±1.73	64.25±3.74
石油污染土壤	CK	3.84±0.11	6.39±0.72	9.96±0.11	13.62±0.34	16.35±0.56
	J3	10.33±1.75	15.45±1.24	18.73±0.43	20.33±0.28	25.61±0.20
	J4	6.69±1.26	11.58±0.55	14.43±1.19	19.49±0.55	22.49±0.87
	J11	9.86±0.99	13.82±0.98	18.08±1.24	21.05±0.74	26.39±0.98
	J12	11.90±1.12	17.12±0.67	23.31±1.55	27.67±0.58	30.58±0.92

石油都不同程度的降解,这主要是由物理风化作用引起的,由于长链烃的断裂产生了短链烃,使短链烃组分增加。经色谱-质谱检测发现,在原油降解试验中空白对照组 CK 和 J12 处理 30 d 后的原油组分都增加了两种 C_{10} 的芳香烃,并且原来的两种 C_{10} 的芳香烃含量增加;油污染土壤中的油污也检测到这 4 种 C_{10} 的芳香烃,说明 C_{10} 的芳香烃可能是石油烃降解的中间产物。J3、J4 和 J11 菌株降解后的原油没有检测到这些芳香烃,说明这 3 株真菌能够特异地降解这些芳香烃。因此,推测 C_7 芳香烃也可能是石油烃降解的中间产物,还需要进一步用标准品和 NIST 库比对分析确定。

一般认为微生物降解石油烃的关键是底物被氧化酶(包括锰过氧化物酶、酶漆等)氧化的过程^[25-27],此过程需要分子氧的参与。正烷烃先转化成羧酸而后靠 β 氧化降解,此外烷烃有时还可在脱氢酶作用下形成烯烃或酮,再进一步代谢。芳香烃一般通过烃基化形成二醇、邻苯二酚,然后环断开,邻苯二酚继而降解为三羧环的中间产物^[28-29]。因此, C_7 、 C_{10} 的芳香烃可能是烷烃经过加氧酶和脱氢酶作用的产物,而 $C_{16}H_{22}O_4$ 可能是降解过程中形成的醇和酸经过酯化反应后形成的化合物,其他小分子链烃则是大分子石油烃降解后的产物。

4 株菌株对石油的降解率有很大差异,主要与菌株的降解特性及石油组分含量有关。在原油液体降解试验中,因为 J12 菌株对于 $C_{16}\sim C_{31}$ 的直链烃降解能力较强,这也是试验中原油的主要组分,所以其降解率最大。J11 菌株对 $C_{18}\sim C_{30}$ 的直链烃有很强的降解能力,但产生了 $C_{16}H_{22}O_4$ 的芳香族化合物,

$C_{32}\sim C_{35}$ 的直链烃组分增加,因此降解率不高。J3 和 J4 菌株能够完全降解原油中的芳香烃和支链烷烃,但这两种组分含量少,并且对其他组分降解率较小;虽然 J4 还完全降解了 C_{33} 的直链烃,但是也产生了 C_{14} 的直链烃和一种 $C_{16}H_{22}O_4$,这两个新增组分的含量比 C_{33} 的含量还高,因此这两个菌株的原油降解率都较低。

土壤中油污的组分中,芳香烃占 16.01%,支链烃含量占 2.29%, C_{27} 以上的直链烃占 62.7%,而原油中主要以 $C_{18}\sim C_{28}$ 的直链烃为主,占总质量的 73.4%,芳香烃和支链烃占 11.63%。因此,在降解土壤中油污时,以降解中短链烃为主的 J4、J11 和 J12 菌株的降解率都下降了,而以降解芳香烃和支链烃为主的 J3 菌株的降解率增加了。

综合菌株生长速率与石油降解率的相关分析结果及菌株对石油组分的降解特性表明,真菌对石油烃的降解与菌株的生长速率没有必然的关系,主要与菌株的降解特性和石油组分有关。

4 结论

(1)不同菌株能够特异的降解不同的石油组分, J3 和 J4 菌株能够完全降解 C_7 、 C_{10} 的芳香烃及 C_{19} 、 C_{20} 的直链烃;J4 菌株还可以完全降解 C_{33} 的直链烃,但产生 C_{14} 的直链烃和一种 $C_{16}H_{22}O_4$;J11 能够完全降解 C_{10} 的芳香烃和 C_{16} 、 C_{26} 的直链烃,但产生了两种 $C_{16}H_{22}O_4$ 的同分异构体;J12 虽然没有完全降解的组分,但是对 $C_{16}\sim C_{30}$ 的直链烃具有很强的降解能力。

(2)在液体培养基和土壤环境下,J12 菌株对原油和油污的降解率都最高,30 d 的降解率分别达到了

64.25%和30.58%。液体培养基环境下J3菌株对原油的降解率最低,土壤环境下J4菌株对污油的降解率最低。

(3)菌株对石油的降解率主要与菌株对石油组分的降解能力及石油组分的含量有关,与菌株的生长速率没有必然的联系。

参考文献:

- [1] 林道辉,朱利中,高彦征.土壤有机污染植物修复的机理与影响因素[J].应用生态学报,2003,14(10):1799-1803.
LIN Dao-hui, ZHU Li-zhong, GAO Yan-zheng. Main mechanism and affecting factors of phytoremediation of organic contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(10): 1799-1803.
- [2] Hubalek T, Vosahlova S, Mateju V, et al. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: A case study[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2007, 52(1): 1-7.
- [3] Diplock E E, Mardlin D P, Killham K S, et al. Predicting bioremediation of hydrocarbons: Laboratory to field scale[J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(6): 1831-1840.
- [4] Gestela K V, Mergaert J, Swings J, et al. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste[J]. *Environmental Pollution*, 2003, 125(3): 361-368.
- [5] Cai Q Y, Mob C H, Wu Q T, et al. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting processes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 142(1-2): 535-542.
- [6] Marin J A, Moreno J L, Hernandez T, et al. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions[J]. *Biodegradation*, 2006, 17(3): 251-261.
- [7] Anastasi A, Varese G C, Bosco F, et al. Bioremediation potential of basidiomycetes isolated from compost[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(14): 6626-6630.
- [8] Semple K T, Reid B J, et al. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants[J]. *Environmental Pollution*, 2012, 112(2): 269-283.
- [9] 李洁明,孙红文,李阳,等.蚯蚓辅助微生物修复芘污染土壤[J].环境科学学报,2008,28(9):1854-1860.
LI Jie-ming, SUN Hong-wen, LI Yang, et al. Earthworm assisted bioremediation of pyrene-contaminated soils[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2008, 28(9): 1854-1860.
- [10] Contreras-Ramos S M, Alvarez-Bernal D, Dendooven L. Characteristics of earthworms (*Eisenia fetida*) in PAHs contaminated soil amended with sewage or vermicompost[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 41(3): 269-276.
- [11] Hanna S H S, Weaver R W. Earthworm survival in oil contaminated soil[J]. *Plant and Soil*, 2002, 240(1): 127-132.
- [12] 张娜,郑青松,刘玲,等.产表面活性剂石油降解菌的筛选及发酵条件优化[J].南京农业大学学报,2011,34(4):133-137.
ZHANG Na, ZHENG Qing-song, LIU Ling, et al. Isolation of oil-degrading bacteria with biosurfactant production and its fermentation condition optimization[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2011, 34(4): 133-137.
- [13] Arca-Ramos A, Eibes G, Moreira M T, et al. Surfactant-assisted two phase partitioning bioreactors for laccase-catalyzed degradation of anthracene[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47: 1115-1121.
- [14] 陆昕,陈立,李娟,等.假单胞菌 Nwul-mu 对陕北石油污染土壤的生物修复作用研究[J].农业环境科学学报,2010,29(5):910-917.
LU Xin, CHEN Li, LI Juan, et al. Bioremediation of petroleum-contaminated soil in Northwest of China by *Pseudomonas* sp. Nwul-mu[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(5): 910-917.
- [15] 齐建超,张承东,乔俊,等.微生物与有机肥混合剂修复石油污染土壤的研究[J].农业环境科学学报,2010,29(1):66-72.
QI Jian-chao, ZHANG Cheng-dong, QIAO Jun, et al. Bioremediation of petroleum-contaminated soil by mixed microbes and organic fertilizer[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(1): 66-72.
- [16] Joseph P J, Joseph A. Microbial enhanced separation of oil from a petroleum refinery sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 161(1): 522-525.
- [17] Cunningham C J, Ivshina I B, Lozinsky V I, et al. Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol[J]. *International Biodeterioration Biodegradation*, 2004, 54(2-3): 167-174.
- [18] 秦晓,唐景春,张清敏,等.两株真菌的分离及其在石油污染土壤修复中的作用[J].农业环境科学学报,2010,29(10):1999-2004.
QIN Xiao, TANG Jing-chun, ZHANG Qing-min, et al. Isolation of two strains of fungi and their effect on bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(10): 1999-2004.
- [19] 张楠,陈波水,杨致邦,等.润滑油降解菌的分离、鉴定及降解特性[J].环境科学研究,2010,23(6):748-753.
ZHANG Nan, CHEN Bo-shui, YANG Zhi-bang, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of bacterial strains for biodegradation of lubricating oil[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2010, 23(6): 748-753.
- [20] Greenwood P F, Wibrow S, George S J, et al. Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure[J]. *Organic Geochemistry*, 2009(40): 293-300.
- [21] 陆泗进,王红旗,姚治华.砂土中柴油的微生物降解研究[J].环境科学研究,2007,20(2):14-18.
LU Si-jin, WANG Hong-qi, YAO Zhi-hua. Study on micro-biological degradation of diesel oil in the sandy soil[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2007, 20(2): 14-18.
- [22] 赵硕伟,沈嘉澍,沈标.复合菌群的构建及其对石油污染土壤修复的研究[J].农业环境科学学报,2011,30(8):1567-1572.
ZHAO Shuo-wei, SHEN Jia-shu, SHEN Biao. Construction of multiple bacterial consortium and its application in bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(8): 1567-1572.
- [23] Ali N, Hameed A, Ahmed S. Physicochemical characterization and bioremediation perspective of textile effluent, dyes and metals by in-

- digenous bacteria[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164(1): 322–328.
- [24] Greenwood P F, Wibrow S, George S J, et al. Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure[J]. *Organic Geochemistry*, 2009, 40(3): 293–300.
- [25] Gullotto A, Branciamore S, Duchi I, et al. Combined action of a bacterial monooxygenase and a fungal laccase for the biodegradation of mono- and poly-aromatic hydrocarbons[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(17): 8353–8359.
- [26] Pozdniakova N N, Nikitina V E, Turkovskaia O V. Bioremediation of oil-polluted soil with an association including the fungus *pleurotus ostreatus* and soil microflora[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2008, 44(1): 69–75.
- [27] Garon D, Sage L, Wouessidjewe D, et al. Enhanced degradation of fluorine in soil slurry by *Abisidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin[J]. *Chemosphere*, 2004, 56(2): 159–166.
- [28] 李 丽, 张利平, 张元亮. 石油烃类化合物降解菌的研究概况[J]. 微生物学通报, 2001, 28(5): 89–92.
LI Li, ZHANG Li-ping, ZHANG Yuan-liang. Proceeding of degrading microorganisms of oil hydrocarbons[J]. *Microbiology*, 2001, 28(5): 89–92.
- [29] 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.