酸性土壤环境石油烃生物降解效应

戴冬娟 ,李广贺 ,张旭 ,钟毅 ,贾建丽
(清华大学环境科学与工程系 ,北京 100084)

摘要 :污染场地酸性土壤环境和生物修复土壤酸化 ,使得酸性土壤环境石油烃生物降解效应影响与有效调控成为污染土壤修复的重要内容 .本文通过监测酸性和偏碱性土壤中微生物数量 、活性以及石油烃含量变化 ,探讨酸性环境对除油微生物及烃降解效率的影响 .通过投加富集菌液和生物载体 ,调控酸性土壤微生态环境 ,揭示微环境调控对于烃生物降解效应影响 .研究结果表明 ,pH 为 5.4 ~ 5.7 的酸性土壤 ,对土著除油微生物活性和数量具有显著抑制性 ,烃降解处于停滞状态 .投加富集菌液未能有效地减弱酸性环境对除油微生物的强烈抑制作用 .微生物数量在 14d 内从 10^6 个/ g 减至 0 ,微生物 FDA(Fluorescein Diacetate) 活性很低 ,约 0.10 Abs/ g .生物载体的投加 ,能有效改善介质界面微生态环境 ,明显减弱酸性环境的抑制效应 ,减缓除油微生物死亡速率 .19d 时土壤中降解微生物由原来的 2×10^6 个/ g 下降到 2.2×10^2 个/ g ,第 49d 石油烃的生物降解率为 13.02 % .

关键词 :石油烃 ;生物降解 ;酸性土壤环境 ;抑制效应 ;生物载体
中图分类号 : X53 文献标识码 : A 文章编号 :0250-3301 (2005) 03-0146-06

Effects of Acid Soils on the Biodegradation of Hydrocarbons

DAI Dong-juan , LI Guang-he , ZHANG Xu , ZHONG Yi , JIA Jian-li
(Department of Environmental Science and Engineering , Tsinghua University , Beijing 100084 , China)

Abstract : Biodegradation efficiency of hydrocarbons and melioration of micro-ecosystem conditions in acid soils should be seriously concerned due to either occurrence of acid polluted soils or acidification during bioremediation process . The influence of acid situation on degrading microbes and the biodegradation rate were figured out by monitoring variations of biomass , microbial activities and petroleum contents with time in acid and alkaline polluted soils in laboratory . Injecting degrading microbes and meliorating micro-ecosystem conditions of acid soils were conducted . The results showed that acid soils (pH = 5.4 ~ 5.7) had extreme restraint on local microbe numbers and activities , and biodegradation rate almost reached zero . Injection of degrading microbes could not remarkably reduce the restriction of acid conditions . The microbe numbers quickly went down from 10^6 cells/ g dried soil to zero in 14 days and the Fluorescein Diacetate(FDA) activities were only about 0.10 Abs/ g dried soil . However , addition of bio-carriers could effectively improve micro-ecosystem conditions in acid soils , thus notably diminish the restraint to some extent . In 19 days , the amount of microorganisms decreased from 2×10^6 to 2.2×10^2 cells/ g dried soil . And up to 49 days , about 13 % hydrocarbons were removed from the polluted soils by microbes .

Key words : hydrocarbons ; biodegradation ; acid soils ; restraint ; bio-carriers

污染土壤的酸碱环境 ,通过影响土壤结构 、营养状况和微生物活性[1 ,2]和酶活性[3]进而影响石油烃生物降解效率 .土壤中石油烃的解吸有助于微生物对石油烃的降解 ,而 pH 通过影响土壤胶体的电荷数量 、石油烃的形态分布[4]和土壤有机质含量来影响石油烃的解吸[5 ,6] .大多数研究认为 pH 为 6 ~ 8 的土壤不会影响微生物活性 ,最佳 pH 值为 7.5 ~ 7.8[7 ~ 10] . Ronald C Sims[11]认为 pH 值在 5.5 ~ 8.5 范围之外 ,微生物的活性通常才会下降 ,土壤 pH 值接近中性有利于生物修复 ,而酸性土壤中真菌占统治地位 . Danie Pope[2]认为 pH 在 5 ~ 9 都是可行的 ,尽管不同污染物 、不同降解方式也许会有所差异 .甚至有研究指出[12] ,在 pH 为 3.8 的强酸性粘土和 9.6 的碱性沙质土壤中 ,通过接种真菌 ,56d 内五氯苯酚的降解率均可超过 85 % .

尽管大多研究报道中油田污染区的土壤呈碱性[5 ,13 ,14] ,但在酸雨沉降严重地区或热带雨林地区 ,酸性污染场地仍然占有相当比例 ,土壤 pH 值可低至 5.6[15] .在 Odu C[16]的研究中指出 ,热带地区的污染场地常常呈严重酸性 .另外 ,石油烃微生物修复过程中 ,由于石油烃组分的复杂性 、土壤介质的多相性 、微生物降解的不完全性和环境条件的不适宜性等造成的土壤酸化现象时常发生[13 ,17 ,18] .对此多数人认同的原因是[13 ,17 ~ 19] ,可能在缺乏电子受体的情况下 ,微生物对中间产物脂肪酸的氧化难于进

收稿日期 :2004-08-23 ;修订日期 :2004-10-18
基金项目 :国家自然科学基金资助项目(40202025) ,国家高技术研究发展计划(863) 项目(2003AA601090) .
作者简介 :戴冬娟(1980 ~) ,女 ,硕士研究生 ,主要研究方向为石油烃污染土壤的生物修复 . E-mail : daidj03 @mails . tsinghua . edu . cn

行,矿化不完全,导致短链烃脂肪酸在土壤中积累,造成土壤酸性增加,土壤 pH 值下降.在封闭或扩散效果较差的系统中,烃的矿化产物 CO_2 的滞留也可能使酸度增加.而在堆肥处理或添加了锯木屑、稻草等的土地翻耕中,微生物对这些有机质的降解会直接导致土壤酸度的增加[20].

土壤具有一定的缓冲能力[3],土壤的成分、结构和性质是造成其缓冲能力有所差异的主要因素[21].但土壤的缓冲能力是有限的[9],因此在修复过程中,评价土壤酸性环境烃降解效率对于修复技术选择和修复效果评价具有重要价值.

基于酸性土壤生物修复研究现状与存在问题的分析,本文通过偏碱性和酸性土壤环境微生物特性和石油烃含量等的动态变化研究,评价酸性环境对石油烃微生物降解抑制效应,量化抑制程度,探讨抑制机理.通过投加富集菌液和生物载体 2 种方式对烃降解与微生物活性作用效果研究,揭示改善介质界面微生态环境,可以抵消酸性环境的抑制效应.

1　材料与方法

1.1　供试土壤

供试土壤采自胜利油田已放置 1a 的油泥沙表层 10cm 的土壤,经 2mm 筛后的筛下组分.参照土壤农业化学分析方法和环境微生物学测试方法,对供试土壤的基本理化和生物学特性进行了测定,结果如表 1 所示.

表 1　供试土壤的基本理化和生物学特性

Table 1　Basic physico-chemical and biological properties of the experimented soils

含油率/ %	8.57	速效 P/ mg·g^{-1}	3.562
含水率/ %	1.09	腐殖质/ mg·g^{-1}	25.77
饱和含水率/ %	16.51	烃降解菌数/个·g^{-1}	2.25×10^{2}
pH	6.96	FDA[1)]活性/ Abs·g^{-1}	0.0956
速效 N/ mg·g^{-1}	15.321		

1)荧光双醋酸酯(Fluorescein Diacetate,FDA)

由表 1 可知,对土壤石油烃生物降解而言,含油率和 pH 值适宜,含水率和速效 N、P 偏低.供试土壤中已存在一定数量和活性的土著烃降解菌.

采用 GC-MS 和原油族组分柱层析测定方法,对供试土壤中石油烃的组分进行了定性和定量分析,测定结果见图 1 和表 2.

由图 1 和表 2 可知,原油组分以 C_7 ~ C_{29}的饱和烷烃为主,饱和烃约占石油烃总量的 50 %,而胶质和沥青含量低于 25 %仅占小部分.已有研究指出[8],饱和烃生物降解速率最高,其次是分子量较低的芳香烃,分子量较高的重质芳香烃、胶质和沥青则难以降解.供试土壤石油烃组分中易生物降解烃类占大部分,因此该污染土壤有利于生物降解的开展.

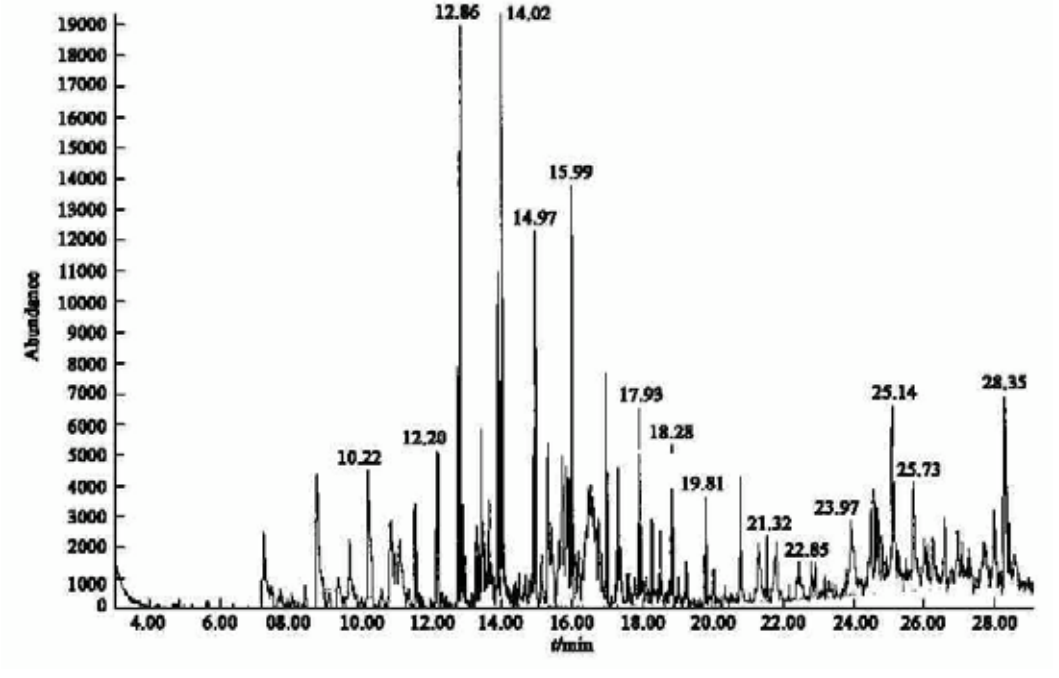

图 1　供试土壤石油烃的 GC-MS 分析

Fig.1　GC-MS analysis of the oil in the experimented soils

表 2 供试土壤中石油烃的组分分布/ %

Table 2 Contents of petroleum constitutes in the experimented soils / %

回收率	饱和烃	芳香烃	胶质	沥青
95.96	49.68	21.58	20.96	3.74

1.2 富集菌液和生物载体制备

富集菌液和生物载体是利用自行研制的生物富集系统,使用液体石蜡作为唯一碳源和能源,用供试土壤中土著微生物作为接种菌培养而得.载体材料为柱状活性炭.制备的菌液中复合除油微生物的数量为 9×10^7 个/ mL,FDA 活性为 3.354 Abs/ mL,生物载体表面附着生长的除油微生物数量为 1.16×10^8 个/ g 湿活性炭,FDA 活性为 11.653 Abs/ g 湿活性炭.

1.3 试验设计

为了量化酸性环境对石油烃微生物降解的抑制效应,研究能够减弱抑制效应措施,评价措施的可行性,探讨抑制效应的作用机理,通过构建微生物降解系统,监测降解菌数量和活性的动态变化,考察石油烃的降解效果,量化抑制效应弱化程度,确认措施的可行性.

根据供试土壤物化特性,调节含水率在 8 %左右,温度控制在 30 ℃,每 2d 翻耕充氧并调节含水率.试验设计如表 3 所示,各系统均含 500g 土,调节 3 、4 和 5 号成酸性,4 号投加 150 mL 富集菌液,5 号投加 120g 生物载体.

1.4 测定方法

(1)土壤含油率和原油组分的测定 土壤含油率测定用超声波加索氏抽提法[14].原油组分测定用族组分柱层析法[22].原油组分定性测定采用 GC-MS 分析[23].

(2)土壤基本物化性质的测定 土壤含水率测定采用烘干法.土壤 pH 测定采用电位法,水土比为 2.5∶1.速效氮测定采用 MgO-代氏合金蒸馏法,速效磷测定采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法[24].

表 3 对照实验设计

Table 3 Design of the experiments

编号	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号
实验目的	考察实验条件下石油烃的挥发程度[1)]	考察酸性环境下石油烃自然降解的受抑制程度		考察富集菌液对抑制效应的削弱程度	考察生物载体对抑制效应的削弱程度
土壤 pH	8.5 ~ 8.8[2)]	6.9 ~ 7.5	5.4 ~ 5.7[3)]	5.4 ~ 5.73[3)]	5.4 ~ 5.7[3)]
ΔpH[4)]			1.5 ~ 2.0	1.5 ~ 2.0	1.5 ~ 2.0

1) 2 % NaN_3 水溶液浸泡 8h 灭菌;2) 土壤未调 pH,但 pH 的测定受残留 NaN_3 的影响呈碱性;3) 调节土壤 pH 呈酸性;4) 与原土 pH 的差值

(3)土壤微生物学特性的测定 土壤烃降解菌数量的测定采用三管法(MPN),以液体石蜡为唯一碳源,培养一周计数[25].土壤微生物活性采用荧光素双醋酸酯(Fluorescein Diacetate , FDA)法,称取 1g 土样,放入 20 mL 灭菌后 pH = 7 的磷酸缓冲液中,于 30 ℃、200r/ min 的摇床中培养 15 min 后加入 2 mg/ mL 的 FDA 溶液 0.1 mL,于摇床中显色 2.75h,3 000r/ min离心 5 min,取上清液测其 498nm 波长处的吸光度值(Abs),计算单位重量干土的 FDA 活性.

2 实验结果

2.1 酸性土壤环境对石油烃降解的影响

为考察酸性环境对土著微生物降解石油烃的影响,监测偏碱性的 2 号和呈酸性的 3 号系统中土壤微生物数量活性和含油率的动态变化,结果见图 2 ~ 4.

由图 2 可知,偏碱性土壤中除油微生物经过适应期后,第 11 d 起数量迅速增长,达到 10^6 数量级.

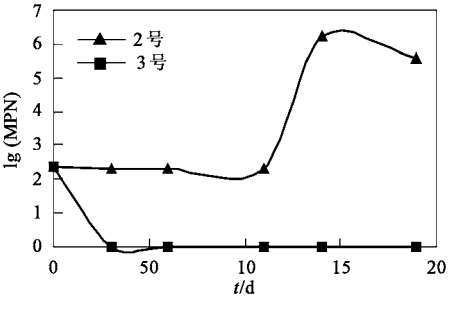

图 2 2 号和 3 号土壤中除油微生物的数量

Fig.2 Microbial amounts in number 2 and 3 soils

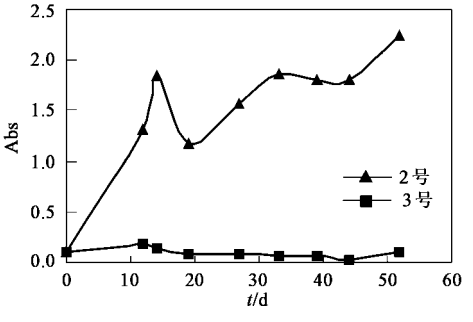

图 3 2 号和 3 号土壤中微生物的 FDA 活性

Fig.3 FDA activities of number 2and 3 soils

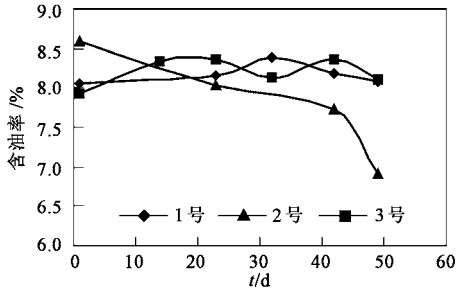

图 4　1 号 、2 号和 3 号土壤的石油烃含量

Fig .4　Petroleum contents of number 1 ,2and 3 soils

而酸性土壤中除油微生物数量急速下降,第 3d 未能检出.由图 3 可知,偏碱性土壤中微生物 FDA 活性持续上升,而酸性土壤中则一直很低,几乎为 0.由此可见,酸性土壤环境中微生物数量和活性都受到强烈抑制作用.

根据图 4 含油率的变化,计算 49d 时 1 号 、2 号和 3 号系统的除油率,结果见表 4.

表 4　1 号 、2 号和 3 号系统的除油率(49d)/ %

Table 4　Decrease of oil contents in number 1 ,2and 3 soils (49d) / %

系统编号	1 号	2 号	3 号
除油率	5.71	19.38	5.38

由表 4 可见,无生物作用的 1 号系统仅靠挥发作用含油率就下降 5.71 %.对比 1 号和 3 号可见,3 号酸性环境中含油率的下降主要靠挥发,基本无生物作用.而偏碱性土壤(2 号)扣除挥发作用后生物降解导致 13.67 %的除油率.较高温度(30 ℃)的水浴和较频繁的翻耕导致挥发作用较强.原油组分以 C7 ~ C29 的较易挥发饱和烷烃为主,大分子难挥发的胶质和沥青质含量偏低,又致使挥发作用较强.

以上结果表明,土著除油微生物在酸性土壤环境(pH = 5.5) 中不仅活性很低,而且难以存活.酸性土壤环境对石油烃的微生物降解具有极其严重的抑制效应.

2.2　富集菌液和生物载体投加对抑制效应的影响

为考察改善微生态环境对酸性环境中受抑制的除油微生物的影响,通过添加富集菌液或生物载体,提高初始除油微生物的数量,提供生长附着的载体.试验土壤 pH 值 、石油烃含量 、微生物数量与活性的动态变化监测结果见图 5 ~ 7 所示.

由图 5 可知,酸性土壤中除油微生物的数量均呈下降趋势,但投加富集菌液和生物载体都减缓了下降的幅度,4 号 14d 时数量才降为 0,lg(MPN) 的

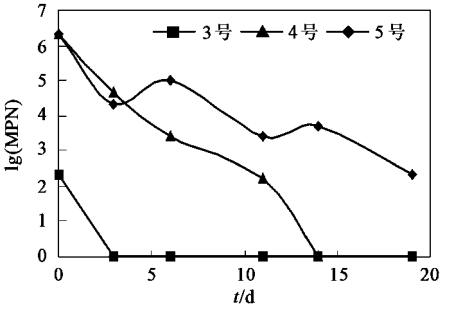

图 5　3 号 、4 号和 5 号土壤中除油微生物的数量

Fig .5　Microbial amounts in number 3 ,4and 5soils

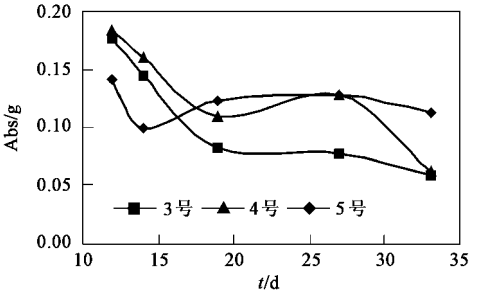

图 6　3 号 4 号和 5 号土壤中微生物的 FDA 活性

Fig .6　FDA activities of number 3 ,4and 5 soils

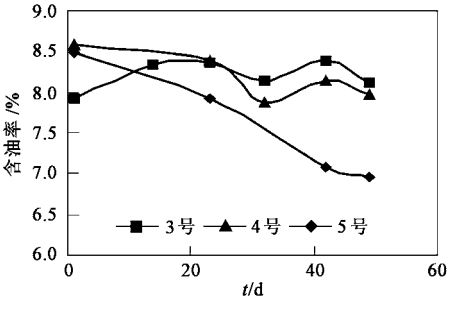

图 7　3 号 、4 号和 5 号土壤的石油烃含量

Fig .7　Petroleum contents of number 3 ,4and 5 soils

减小速率为 0.5/ d,约为 3 号速率 0.8/ d 的一半.5 号到 19d 时土壤中除油微生物数量仍保持在 10^2 数量级,lg(MPN) 的减小速率为 0.2/ d,是 3 号的 1/4.对照图 6 和图 3 可知,偏碱性环境中微生物 FDA 活性为 1.0 ~ 2.0 Abs/ g 干土,酸性环境中约为 0.1 Abs/ g干土,只占前者的 1/10 ~ 1/20.

根据图 7 含油率的变化,计算 49d 时各系统的除油率,结果见表 5.

表 5　1 号 、3 号 、4 号和 5 号的除油率(49d)/ %

Table 5　Decrease of petroleum contents in number 1 ,3 ,4 and 5 soils (49d) / %

编号	1 号	3 号	4 号	5 号
除油率	5.71	5.38	7.00	18.73

由图 7 和表 5 可知,扣除挥发作用引起的含油率减小后,投加菌液(4 号)的系统除油率为 1.29 %,投加载体(5 号)的系统除油率为 13.02 %.

实验结果表明,酸性土壤环境严重抑制微生物数量和活性,投加富集菌液和生物载体均难以减弱对活性的抑制.虽然投加菌液可在一定程度上降低菌的死亡速率,延长菌的存活寿命,但所起作用非常有限,14d 后土壤中的除油微生物全部死亡.生物载体的投加可明显维持部分微生物的存活,19d 后土壤中除油微生物数量为 2.2×10^2 个/kg 干土.对速效氮、速效磷的分析数据(速效氮 240 ~ 2200 mg/kg 干土,速效磷 290 ~ 510 mg/kg 干土)表明,除 2 号系统(速效氮约 10 mg/kg 干土,速效磷约 5 mg/kg 干土)的营养水平偏低外,其他系统的氮磷营养都足以满足微生物的需求.

3 分析讨论

3.1 酸性环境对土壤石油烃微生物降解的影响

实验结果表明,pH 为 5.5 的酸性土壤环境导致土著微生物活性丧失,数量锐减,石油烃微生物降解停止.适宜的酸碱环境[17]对微生物生长至关重要.鉴于实验所采用的原土属碱性土壤,土著菌群经过较长时间演化,已适应试验土样的原始环境条件.试验过程中酸碱环境的改变,导致微生物的不适应,造成酸性土壤环境中微生物数量和活性锐减.已有研究[3]认为,土壤微生物对 pH 值的变化敏感,pH < 5 时,其活性随 pH 下降而下降.基于本次实验结果,烃降解微生物对 pH 的变化可能比通常微生物更为敏感.由图 3 和图 4 可知,3d 后烃降解微生物数量为 0,但 FDA 活性不为 0,说明土壤中可能有对酸性环境耐受性更强的非除油微生物存活.此结论还有待进一步研究确认.

氢离子对土壤酶活性、微生物活性具有抑制作用[3,15].通过影响酶的电离基团,或引起酶的单向失活,或改变酶与腐殖质、粘粒等的吸附行为,或改变土壤的结构,或影响营养物质的可利用性,从而抑制酶的活性和微生物活性.在刘广深[3]的研究中,H^+ 对脲酶、转化酶、磷酸酶的最大抑制率分别为 43.1 %、61.4 %、73.1 %.而在本研究中,H^+ 对土壤微生物 FDA 酶活的抑制率为 86.5 % ~ 98.6 %.H^+ 对微生物酶活抑制的严重导致微生物迅速死亡.

3.2 微生态环境调控对酸性土壤环境烃降解效应的影响

土著微生物在长期演化中对环境已形成很强的适应性和依赖性,当环境突然酸化,这种强适应性和依赖性反成了继续生存的阻力.投加富集菌液并不能有效地减弱酸性环境对微生物的强烈抑制效应,而投加生物载体却可以减慢微生物死亡速率,维持部分菌的存活.分析认为,菌液的添加仅提高了微生物的初始数量,并没有明显改善其对酸性环境的适应能力,没有降低死亡速率,因此没有实质性地延长微生物在酸性环境中的存活时间.

生物载体的投加能削弱酸性环境抑制效应.分析认为:在酸性环境下,土著微生物和载体附着微生物栖居在固体载体表面,在凹面或缝隙等相对适宜的微生态环境下生存.C. O. Obuekwe[26]在其研究中发现,在炎热干旱环境极其恶劣的沙漠地区,石子等固形物与土壤接触界面附着生长着微生物,认为固体介质表面的存在可能为微生物提供了一个相对适宜的生存环境.

研究表明,生物载体的投加在一定程度上为微生物的生存营造相对适宜微生态环境,改善微生物生存大环境,降低酸性环境对微生物的抑制程度,促进酸性土壤环境中烃生物降解效率.

4 结论

(1)在 pH 为 5.5 的酸性土壤环境中,石油烃生物降解停止,微生物 FDA 活性受强烈抑制(几乎为 0),数量 3d 内从 2.25×10^2 个/g 干土迅速减至 0.而偏碱性土壤中微生物数量和活性逐渐增长,19d 时数量达到 10^5 个/g 干土,51d 时活性超过 2.0 Abs/g 干土,石油烃生物降解率大于 13 %.土著微生物对环境酸碱性突然改变的不适应,导致微生物受到强烈抑制,从而石油烃生物降解受到显著影响.

(2)投加富集菌液,提高微生物初始数量到 10^6 个/g 干土,但因未能改善酸性土壤的微生态环境,微生物数量持续下降 14d 时减为 0,FDA 活性很低(0.10 Abs/g 干土),酸性环境对烃降解的严重抑制效应未能得到有效减弱,石油烃的生物降解基本为 0.生物载体为酸性土壤中微生物提供适宜的微生态环境,微生物死亡速率减至酸性对照土样的 1/4,49d 时石油烃生物降解率达 13 %.可见投加生物载体可在一定程度上有效降低酸性环境对微生物的抑制效应,促进石油烃的生物降解.

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. 221.

[2] Daniel Pope. Natural attenuation of soils[A]. In: United States Environmental Protection Agency. Bioremediation of hazardous waste sites: practical approaches to implementation(EPA/625/K-96/001)[C]. Washington: USEPA, 1996. 16-1 ~ 16-3.

[3] 刘广深,徐冬梅,等. 酸雨、铜和莠去津对土壤水解酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2004,**15**(1):127 ~ 130.

[4] Daniel Pope. Natural attenuation of soils[A]. In: United States Environmental Protection Agency. Bioremediation of hazardous waste sites: practical approaches to implementation(EPA/625/K-96/001)[C]. Washington: USEPA, 1996. 16-5 ~ 16-13.

[5] 展惠英,姜梅,等. 玉门矿区污染黄土中原油的解吸研究[J]. 安全与环境学报,2003,**3**(2):54 ~ 57.

[6] 李静,张甲耀,等. 原油在土壤中的吸附和解吸研究,环境科学与技术,1997,**79**(4):5 ~ 8.

[7] 丁克强,等. 石油污染土壤的生物修复技术[J]. 生态学杂志,2000,**19**(2):50 ~ 55.

[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 ~ 72.

[9] Dibble J T, Bartha R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge [J]. Appl. Environmental Microbiology, 1979, **37**(4): 729 ~ 739.

[10] Carl L Potter. Biopile treatment of soils contaminated with hazardous waste [A]. In: United States Environmental Protection Agency. Bioremediation of hazardous waste sites: practical approaches to implementation (EPA/625/K-96/001) [C]. Washington: USEPA, 1996. 10-1 ~ 10-5.

[11] Ronald C Sims. Background information for bioremediation applications[A]. In: United States Environmental Protection Agency. Bioremediation of hazardous waste sites: practical approaches to implementation (EPA/625/K-96/001) [C]. Washington: USEPA, 1996. 1-3 ~ 1-13.

[12] John A Glaser. Effective treatment of hazardous waste constituents in soil by lignin-degrading fungi[A]. In: United States Environmental Protection Agency. Bioremediation of hazardous waste sites: practical approaches to implementation (EPA/625/K-96/001)[C]. Washington: USEPA, 1996, 11-1 ~ 11-4.

[13] 丁克强,骆永明,等. 通气对石油污染土壤生物修复的影响[J]. 土壤,2001,**4**:185 ~ 188.

[14] 贾建丽,李广贺,等. 油污土微生态环境非生物因子与微生物活性关系[J]. 环境科学,2004,**25**(3):110 ~ 114.

[15] Udosen E D, Essien J P, *et al*. Bioamendment of petroleum contaminated ultisol: effect on oil content, heavy metals and pH of tropical soil[J]. Environ. Sci., 2001, **13**(1): 92 ~ 98.

[16] Odu C. Oil spillage and the use of infant organisms for enhanced biodegradation[A]. In: Warri. Proceedings of an international seminar on the petroleum industry and Nigerian environment [C]. Nigeria: Petroleum Training Institute, 1987. 175 ~ 191.

[17] 魏德洲,等. H_2O_2 在石油污染土壤微生物治理过程中的作用[J]. 中国环境科学,1997,**17**(5):429 ~ 432.

[18] 丁克强,尹睿,等. 石油污染土壤堆制微生物降解研究[J]. 应用生态学报,2002,**13**(9):1137 ~ 1140.

[19] 丁克强,骆永明,等. 利用改进的生物反应器研究不同通气条件下土壤中菲的降解[J]. 土壤学报,2004,**41**(2):245 ~ 251.

[20] Nyborg M, McGill W B. Restoration of oil spills on forest soils [A]. In: Banff. Proceedings of the conference on the environmental effect of oil and salt water spills on land[C]. Alberta: University of Calgary and Alberta environment, 1975, 277 ~ 290.

[21] Sierra J, Marti E, *et al*. Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal[J]. The Science of the Total Environment, 2001, 279: 207 ~ 214.

[22] 中华人民共和国石油天然气行业标准. 可溶性有机物和原油族组分柱层析分析方法[S]. SY 5119, 1995.

[23] Jia J L, Li G H, Zhong Y. Microbial eco-system of the contaminated soil with petrochemical hydrocarbons in the oilfields of northern China [J]. Water Resources and the Urban Environment, 2003, **11**: 216 ~ 220.

[24] 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,1999. 113 ~ 165.

[25] 俞毓馨,吴国庆,孟宪庭,等. 环境工程微生物检验手册[M]. 北京:中国环境科学出版社,1990. 138 ~ 142.

[26] Obuekwe C O, Al-Zarban S S. Bioremediation of crude oil pollution in the Kuwaiti desert: the role of adherent microorganisms[J]. Environment International, 1998, **24**(8): 823 ~ 834.