农业环境科学学报 2010,29(11):2107-2113
Journal of Agro-Environment Science

玉米草(*Zea Mexicana*)与海藻寡糖联合修复石油烃污染土壤的研究

唐景春,王 斐,褚洪蕊,白晓瑞,王 敏,周启星

(南开大学环境科学与工程学院/环境污染过程与基准教育部重点实验室,天津 300071)

摘 要:采用玉米草及海藻寡糖联合修复技术研究了石油污染土壤的修复效果,对修复过程中酶活性变化进行了测定,并采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术测定了土壤中微生物群落的变化。结果表明,种植玉米草可以有效提高土壤中石油烃的降解,与对照相比石油烃降解率增加了11%;加入不同浓度海藻寡糖进一步增加了石油烃的降解效果,降解率最高达到28.6%。种植植物及加入海藻寡糖可以有效提高多酚氧化酶、脱氢酶及尿酶的活性。PCR-DGGE结果表明植物种植及海藻寡糖的加入增加了土壤中微生物数量,其微生物群落结构与未种植植物及修复前土壤相比发生了较大的变化。

关键词:石油烃;修复;玉米草;海藻寡糖;变性梯度凝胶电泳(DGGE)

中图分类号:X53 **文献标志码**:A **文章编号**:1672-2043(2010)11-2107-07

Bioremediation of Petroleum Contaminated Soils by Combination of *Zea Mexicana* and Alginate Oligosaccharides

TANG Jing-chun, WANG Fei, CHU Hong-rui, BAI Xiao-rui, WANG Min, ZHOU Qi-xing

(College of Environmental Science and Engineering, Nankai University / Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, Tianjin 300071, China)

Abstract: Phytoremediation is an important approach for the bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil. Alginate oligosaccharide, the product from alginate decomposition, is effective in enhancing plant growth. In this paper, combined effects of *Zea Mexicana* and alginate oligosaccharides on bioremediation of petroleum contaminated soil was studied. The enzyme activity of polyphenol oxidase, dehydrogenase and urease was tested and the microbiology community change in the soil was characterized by the PCR-DGGE method. The degradation rate of petroleum hydrocarbons could be improved by planting *Zea Mexicana*, with 11% higher degradation rate as compared to the control. Addition of different contents of oligosaccharides further increased the degradation of petroleum hydrocarbons, with maximum degradation rate of 28.6% after 3 months. The best remediation was achieved by addition of alginate oligosaccharide solution at dilution rate of 20 times. Planting and addition of seaweed oligosaccharides could effectively improve the activity of polyphenol oxidase, dehydrogenase and urease. Positive correlation was found between petroleum degradation and activity of dehydrogenase and urease, which indicated the important role of enzyme activity on the bioremediation process. PCR-DGGE results suggested that planting and alginate oligosaccharides addition to the soil had enhanced the growth of soil microorganisms, the microbial community structure had changed as compared to the soil without planting and that before remediation. The microbial community of soils with alginate oligosaccharide addition was classified into the same group in cluster analysis on the DGGE results.

Keywords: petroleum hydrocarbons; remediation; *Zea Mexicana*; alginate oligosaccharides; Denaturing Gradient Gel Elecrophoresis (DGGE)

收稿日期:2010-04-19

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(863计划,2007AA061201);天津市应用基础及前言技术研究计划(09JCYBJC08800);水体污染控制与治理重大专项(2008ZX07314-001-05)

作者简介:唐景春(1968—),男,博士,副教授,研究方向为环境修复及环境微生物学。E-mail:tangjch@nankai.edu.cn

植物修复技术已广泛用于石油烃等有机污染土壤的修复。研究表明植物根际微生物的数量平均比非根际高出 3 个数量级,植物根际环境的诱导和石油污染物的胁迫改变了土壤微生物种类的分布和活动[1]。Gurska 等[2]认为植物修复是一种有潜力的石油烃处理方法,如何提高植物修复的效果、促进根际微生物的生长繁殖是提高有机污染物植物修复效果的关键。

海藻寡糖是海藻酸降解后得到的不同分子量的海藻多糖,是一种生物活性物质。海藻寡糖可以有效促进植物根的生长[3-4],利用海藻酸对植物生长特别是根生长的促进作用,增强根际微生物的生长,可以提高植物修复作用的效果,相关研究还未见国内外报道。本研究利用之前得到的一株海藻酸降解菌[5],在研究其产酶及生长的基础上[6],利用该菌降解海藻酸得到的海藻寡糖,研究了海藻寡糖与玉米草联合作用对土壤中石油烃修复效果的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试土壤:胜利油田污染土壤,采集于胜利油田滨一污水处理厂,风干后过 10 目筛。土壤理化性质见表 1。

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of the soil used in the test

含油率/%	pH 值	总氮/g·kg^{-1}	总磷/g·kg^{-1}	有机质/%
7.70	7.66	3.35	0.12	1.2

供试植物:墨西哥玉米草,河南华丰种业购得。

供试寡糖:海藻酸降解菌 A7 在发酵培养基中(海藻酸钠、蛋白胨、酵母膏的质量分数分别为 0.5%、0.5%和 0.1%,NaCl 浓度 0.5 mol·L^{-1},pH9.5)于 30 ℃、160 r·min^{-1} 振动培养 72 h,将发酵液于 4 ℃、8 000 r·min^{-1} 离心 15 min 取上清液,得到海藻寡糖混合物。

1.2 盆栽实验

土壤风干后过 10 目筛,每盆放入 750 g 土,加水,使土壤含水量为田间持水量的 60%。将在光照培养箱中培养 6 d 的墨西哥玉米草幼苗移栽到盆中,每盆 7 株。设 7 个处理,如表 2 所示,每个处理设 3 个平行。生长过程中适时适量浇水。处理 3~7 种植玉米草,在生长过程中每周施用两次不同浓度(0.5%海藻酸降解液分别稀释 20、40、60、80、100 倍)的寡糖,每次 100 mL。盆栽实验从 2008 年 4 月 1 日开始至 2008 年 7 月 15 日结束。实验结束后将植物及根去除,土壤充分混合后取部分样品风干,过 60 目及 20 目筛分别供石油含量和土壤酶活性分析,其余样品-20 ℃保存供土壤 DNA 的提取。

1.3 土壤中石油含量的测定

称取 5 g 土样放入 50 mL 离心管中,加入 15 mL 石油醚,超声萃取 15 min,4 000 r·min^{-1} 离心 15 min 后取上清液倒入已烘干至恒重的 150 mL 锥形瓶中,重复萃取 3 次,将收集到的全部上清液在 60 ℃水浴热浸至石油醚挥发完全,称重。根据锥形瓶前后重量之差计算单位土壤的含油率。

1.4 土壤酶活性测定

多酚氧化酶:取 1 g 过 1 mm 筛的风干土壤置于 100 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 1%联苯三酚溶液为基质,振荡混匀并置于 30 ℃恒温培养箱中培养 3 h。培养结束后,加入 4 mL 柠檬酸-磷酸缓冲液(pH4.5),并加 35 mL 乙醚,振荡混合,使联苯三酚溶液经酶促作用生成的红紫棓精由水相被萃到乙醚相。静置数分钟后,取上层乙醚相,于 430 nm 处测定吸光度值。另设无联苯三酚溶液的土壤和联苯三酚溶液为对照,红紫棓精的量根据用重铬酸钾得出的标准曲线查知。土壤的多酚氧化酶活性以每百克土的红紫棓精的毫克数表示。

脱氢酶:称取过 1 mm 筛的风干土样 5 g 于 50 mL 离心管中,加入 0.1%TTC(缓冲液配置)溶液 5 mL,pH 值 7.6 的 0.2 mol·L^{-1} Tris-HCl 缓冲液 2 mL,充分振荡,使无颗粒状土壤存在,同时设置对照,对照以 pH 值 7.6 的 0.2 mol·L^{-1} Tris-HCl 缓冲液代替 TTC,在 37 ℃下置暗处培养 24 h。培养结束后,加 2 滴浓 H_2SO_4 终止反应,然后加入 5 mL 甲苯,摇床上振荡浸提 30 min,完全提取三苯基甲簪(TPF)。然后 4 000 r·min^{-1} 离心 10 min,取上层有机溶液于 492 nm 处测定吸光度值。根据 TTC 标准曲线得到生成的三苯基甲簪的量。酶活性以一定时间内 TPF 的生成量表示。

表 2 玉米草与海藻寡糖修复石油污染土壤不同处理

Table 2 Design of the experiment for bioremediation of petroleum hydrogen by *Zea Mexicana* and alginate oligosaccharides

处理 1 (Run1)	处理 2 (Run2)	处理 3 (Run3)	处理 4 (Run4)	处理 5 (Run5)	处理 6 (Run6)	处理 7 (Run7)
自然降解	玉米草	玉米草+稀释 20 倍的寡糖	玉米草+稀释 40 倍的寡糖	玉米草+稀释 60 倍的寡糖	玉米草+稀释 80 倍的寡糖	玉米草+稀释 100 倍的寡糖

脲酶：称取过 1 mm 筛的风干土样 5 g 于 100 mL 锥形瓶中，加入 1 mL 甲苯，用力摇荡，使土壤颗粒均匀分散。15 min 后加入 10 mL 10%尿素溶液和 20 mL pH6.7 的缓冲溶液，振荡混匀后，将其置于恒温培养箱中 37 ℃暗处培养 3 h。培养结束后取出，用分液漏斗过滤，取 3 mL 滤液注入 50 mL 容量瓶中，加 17 mL 蒸馏水。然后加入 4 mL 苯酚钠和 3 mL NaClO，随加随摇匀，显色 20 min 后定容。于 578 nm 处测定吸光度值。对每一土样设置用水代替基质的对照，对整个实验设置无土壤基质的对照。土壤的脲酶活性以每克土的 NH_3-N 的毫克数表示。

1.5 分子生物学技术（PCR-DGGE）分析土壤微生物多样性

1.5.1 土壤 DNA 的提取

按试剂盒 ZR Soil Microbe DNA Kit™ 中所述步骤操作。

1.5.2 土壤 DNA 的 PCR 扩增

PCR 引物为 16S rRNA 保守区通用引物，由南京金思特科技有限公司合成。所用的正向引物是 F357GC 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'，反向引物是 R518 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'，40 个 GC 夹加到 F357 前面，以保证 DGGE 实验的稳定和片断的分离，这一对引物能够扩增绝大多数的细菌。

以上述通用引物对提取 DNA 的 16S rDNA 保守区段进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为：10×PCR 缓冲液 2.5 μL，10 mmol·L^{-1} dNTP 0.5 μL，10 μmol·L^{-1} PCR 引物各 1 μL，Taq 酶 2.5U，模板 1 μL，加灭菌双蒸水补充到 25 μL。

PCR 反应采用降落 PCR 策略，即：预变性条件为 94 ℃ 5 min，前 10 个循环为 94 ℃ 1 min，65~55 ℃ 1 min 和 72 ℃ 1 min（其中每个循环后复性温度下降 1 ℃），后 20 个循环为 94 ℃ 1 min，55 ℃ 1 min 和 72 ℃ 1 min，最后在 72 ℃下延伸 7 min。PCR 反应的产物用 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.3 DGGE 分析土壤微生物的多样性

采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离。使用梯度胶制备装置，制备变性剂浓度从 30% 到 60%（100%的变性剂为 7 mol·L^{-1} 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物）的 8% 的聚丙烯酰胺凝胶，规格为 16 mm×16 mm×1.0 mm（L×W×H），其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增。待胶完全凝固后，将胶板放入装有电泳缓冲液的装置中，电泳缓冲液为 1×TAE 缓冲液。在每个加样孔加入含有 6×loading buffer 5 μL 的 PCR 样品 25 μL。电泳及染色：在 200 V 电压下，60 ℃电泳 4 h。电泳完毕后，将凝胶在 EB 中染色 30 min。将染色后的凝胶用凝胶影像分析系统分析，观察每个样品的电泳条带并拍照。图谱分析：采用 Quantity One 分析软件对 DGGE 谱图做聚类分析。

2 结果与分析

2.1 石油降解率

本实验测定了不同处理修复后土壤中的含油率，结果如图 1 所示。由图可知，受石油污染的土壤在自然降解情况下，石油去除率为 12.77%。采用玉米草修复（处理 2）的土壤中石油去除率明显增加，达到 23.63%，这与陈嫣等[7]得到的植物根际油污土中石油烃的降解率比无根系土壤高 9.1%~15.5%的结果相近。推其原因，一方面植物本身对石油具有一定的吸收、固定和代谢能力；另一方面植物对土壤水分、pH 值及土壤微生物群落结构等有重要影响，玉米草根系为其根际微生物生长提供了适宜的环境，从而促进了石油的降解。处理 3 至处理 7 在修复过程中，每周施用两次不同浓度的海藻寡糖，每次 100 mL。图 1 结果表明，施用了寡糖的玉米草对污染土壤的修复效果进一步提高，其中处理 3 的去除率最高，为 28.6%。由此可见，海藻寡糖在石油污染土壤的植物修复中起着积极的促进作用，其促进原理有待于进一步研究。可能是由于寡糖促进了玉米草根际的生长，从而改变了根际微生物结构，使得石油降解菌数量增多，提高了降解率。此外寡糖对植物病原菌的生长和萌发具有抑制作用，可以提高植物对不良环境的抗病能力。

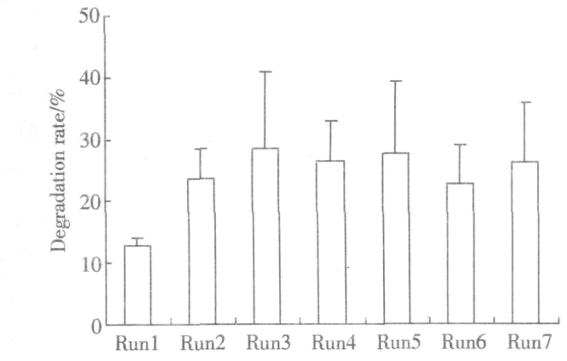


图 1 不同处理对石油污染土壤的修复去除率

Figure 1 Degradation of petroleum hydrocarbon by different treatments

2.2 酶活性测定结果

实验结果(图 2)表明,修复前土壤中多酚氧化酶活性仅为 211.67 μg·g^{-1}·3h^{-1},远远低于修复后土壤。自然降解情况下,土壤中酶活性为 323.01 μg·g^{-1}·3h^{-1},而采用玉米草修复的土壤中酶活性明显提高,达到 411.18 μg·g^{-1}·3h^{-1}。许多植物如牧草中的多酚氧化酶活性都很高,可以在其体内检测出大量与多酚氧化酶活性相关的酚类物质[8],修复过程中施用寡糖的土壤中多酚氧化酶活性可以进一步提高,其中处理 3 的土壤酶活性最高,为 537.69 μg·g^{-1}·3h^{-1}。寡糖对酶活性的影响主要是通过对微生物的影响而实现的。

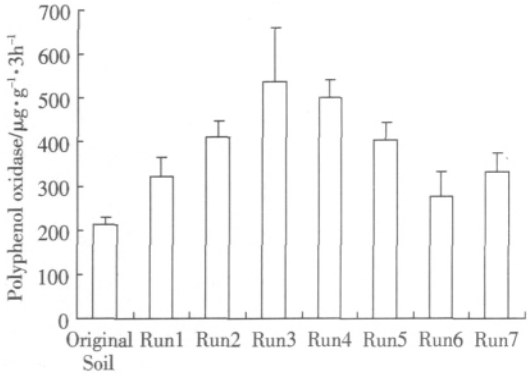


图 2 土壤中多酚氧化酶活性

Figure 2 Change of polyphenol oxidase in different soils after remediation

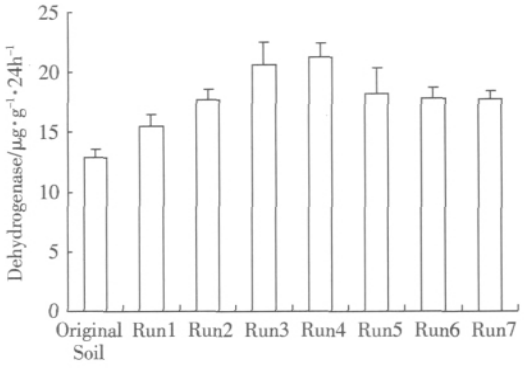


图 3 土壤中脱氢酶活性

Figure 3 Change of dehydrogenase in different soils after remediation

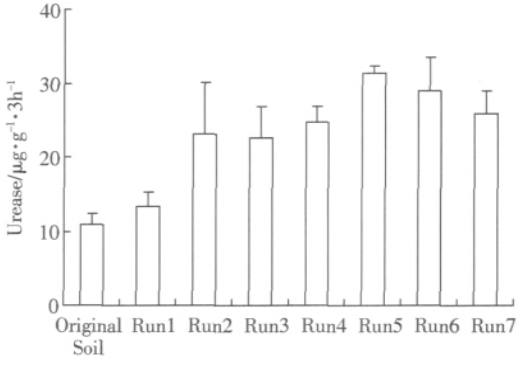


图 4 土壤中脲酶活性

Figure 4 Change of urease in different soils after remediation

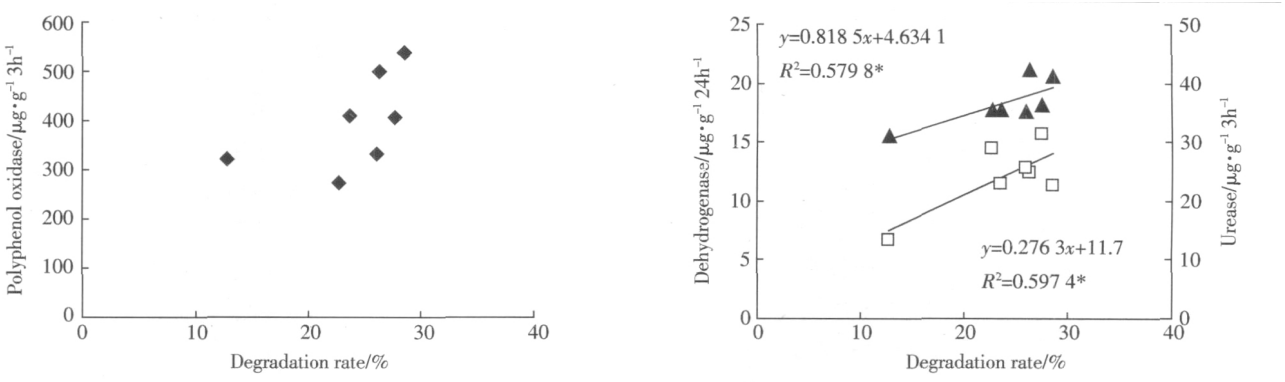
许多研究表明,脱氢酶活性与土壤中石油烃的含量具有正相关关系[9]。由脱氢酶的测定结果(图 3)可知,修复后土壤中脱氢酶活性明显高于修复前土壤,处理 3 与处理 4(稀释 40 倍)土壤中酶活性最高,为 21.15 μg·g^{-1}·24h^{-1}。而用稀释了 60、80、100 倍的寡糖浇灌的处理中酶活性差异不大,可能是由于稀释倍数太高导致寡糖浓度很低,对植物根际的作用差异不明显。

图 4 中,修复前土壤中脲酶活性为 10.90 μg·g^{-1}·3h^{-1},修复后土壤中脲酶活性明显提高,其中自然降解后的土壤中脲酶活性升高略低,为 13.28 μg·g^{-1}·3h^{-1},而玉米草修复的土壤中脲酶活性升高到 23.03 μg·g^{-1}·3h^{-1}。与多酚氧化酶和脱氢酶不同的是,施用低浓度的寡糖土壤中脲酶活性较高,在处理 5 中达到 31.35 μg·g^{-1}·3h^{-1},说明尿酶活性与海藻寡糖加入量之间关系不大。

对石油烃降解率与土壤酶活性间的相关性分析(图 5)结果表明,土壤中的多酚氧化酶活性与降解率之间无相关关系,而脱氢酶与尿酶与土壤中石油烃的降解率之间存在显著的正相关关系。这说明脱氢酶与尿酶在石油烃的植物修复过程中起到重要作用。

2.3 玉米草根际微生物多样性的变化

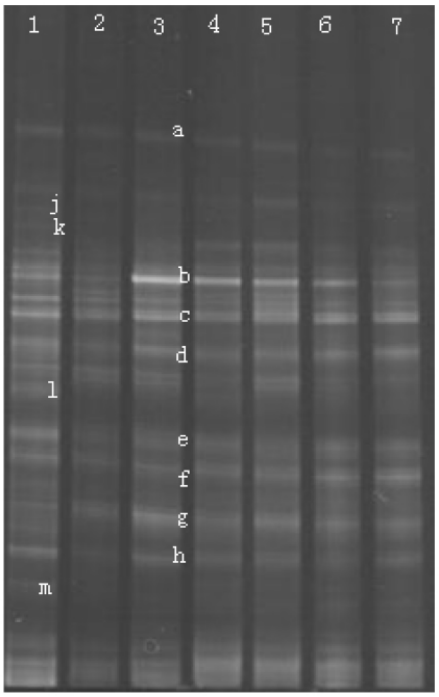
采用 PCR-DGGE 可以对不同土壤的微生物种类进行研究,从而得出其中微生物多样性的信息。将所得各个土壤样品的 16S rDNA 片段通过变性梯度凝胶电泳,得到如图 6 所示的 DGGE 图谱。图中所示每种土壤样品中具有许多共同的条带,如 a,b,c,d,e,f,g,h 等条带,说明在 7 种土壤样品中均可能存在这几种条带所代表的基本的微生物类型;而 2~7 土壤样品比 1 土壤样品分别缺少条带 j,k,l 和 m。也有研究发现石油烃修复过程中随着营养物质的加入,DGGE 条带有减少的现象发生[10-11]。这些现象可以说明各种土壤样品中既有着共有的几种微生物的种类,也有着自己独特的微生物类型。处理 3 至处理 7 中条带的亮度明显高于处理 2,处理 3 的条带最亮,表明寡糖的施用提高了土壤中某种微生物的数量,同时土壤中的污染



*5%显著水平 *5% significant level

图 5 石油烃降解率与土壤酶活性间的相关性分析

Figure 5 Relation between petroleum hydrocarbon degradation and soil enzyme activity



图中 1~7 分别代表 Run1~Run7

1~7 represents Run1~Run7, respectively.

图 6 土壤 PCR 扩增产物的变性梯度凝胶电泳图谱

Figure 6 Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplification products of the soil

物也会对其微生物群落的变动产生影响[12]。

对 DGGE 电泳图谱进行聚类分析，结果如图 7 所示。表明样品 5 和 7 之间相似程度较高，1 与各样品的相似性较低。因为样品 1 是自然降解土壤，即非根际土壤。而样品 2~7 中均种植了玉米草，为根际土壤。样品 3~7 又均施用了海藻寡糖，所以根际微生物结构相似度较高。这进一步说明了海藻寡糖的施用改变了土壤的根际微生物结构，从而增强了对石油的去除效果。

3 讨论

不同植物如黑麦草、高羊茅、苜蓿及一些花卉如紫茉莉等被用于石油污染土壤的修复[13-15]。土壤本身对石油污染具有一定的降解能力，即土壤微生物在适宜的环境条件下，可以把石油类物质的一定组成作为碳源和能量来源进行正常的生长和繁殖，即使盐碱土壤条件下也具有降解石油烃的微生物[16]。污染土壤中石油的去除是一个综合复杂的过程，涉及众多因素，其中石油烃中碳原子数的多少被认为是影响其降解效果的主要因素[17]。石油烃浓度是影响石油烃降解率的另一个重要因素，如刘鹏等[18]对初始值为 2 228.25

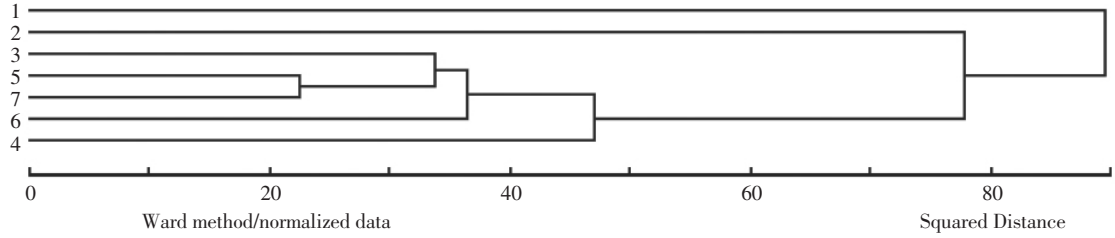


图 7 玉米草修复后 DGGE 图谱聚类分析

Figure 7 Cluster analysis diagram of DGGE profiles after corn grass remediation

$mg \cdot kg^{-1}$(以 1 kg 干土计)的石油污染土壤经过 135 d 的植物-微生物联合修复,石油烃降解率达 63.65%~83.26%。本研究石油烃的降解率偏低,可能与石油烃浓度较高以及所使用的土壤性质相关。

研究表明微生物对石油烃的降解与土壤中一些酶的活性如脱氢酶活性有正相关的关系[19-20]。土壤多酚氧化酶主要来源于土壤微生物、植物根系分泌物及动植物残体分解释放的酶,能把土壤中芳香族化合物氧化成醌。脱氢酶同样是土壤中重要的氧化还原酶,在环状有机化合物的分解转化过程中起着重要的作用,其主要参与 PAHs 加氧化后形成中间产物转-二聚氢脱氢生成儿茶酚的过程,其活性的大小同样反映土壤对有机化合物降解能力的强弱。脲酶存在于大多数细菌、真菌和高等植物里,它是一种酰胺酶,能酶促有机物分子中肽键的水解。在联合修复条件下,3 种酶活性都得到不同程度的提高,说明它们参与了石油烃的代谢降解过程。因酶活性测定只是修复结束后的结果,而没有修复过程中的变化,对修复过程中酶活性的变化还需要进一步的研究。

修复过程中微生物的变化与石油烃的降解密切相关。DGGE 技术已经被广泛的用于修复过程中土壤微生物群落的测定[21-23]。一些研究表明,修复过程中加入营养物可以促进污染物降解,但微生物多样性不但没有增加,反而有所减少[24-25]。研究认为,污染物的加入比土壤性质变化更能改变土壤中的微生物组成,因此微生物群落也随着污染物的降解而逐渐改变。我们的研究也发现修复过程中微生物群落的多样性并未发生大的变化,修复前后及不同处理之间都具有较高的微生物多样性,但微生物数量及个别微生物的动态发生了较大的变化。这说明修复过程促进了石油烃降解微生物的生长繁殖,同时植物修复过程中微生物群落有较大的相似性,植物的生长对微生物群落的组成起到了决定性的作用,植物根系分泌物及植物的生长都会对微生物的生长起到促进作用。海藻寡糖的加入可对个别微生物的生长起到促进作用,进一步增强植物根系的功能,促进石油烃的降解。

4 结论

(1) 由 7 个不同处理对石油的去除效果可知,玉米草对于石油污染土壤的修复效果远远好于自然降解,使用稀释 20 倍的寡糖浇灌玉米草能进一步增强修复效果,石油去除率可达到 28.60%。

(2) 通过测定修复前后土壤中多酚氧化酶、脱氢酶和脲酶的活性,可知修复后土壤中 3 种酶的活性均有较明显的提高。寡糖浓度对 3 种酶的活性影响不同。较高浓度的寡糖有利于多酚氧化酶和脱氢酶活性的提高,而寡糖对脲酶活性影响不明显。

(3) DGGE 分析结果表明玉米草修复后土壤中微生物结构发生了变化,有些条带的亮度明显增强。用稀释 20 倍的寡糖溶液浇灌的玉米草土壤中条带最亮。PCR-DGGE 研究结果能很好地反映土壤微生物群体的多样性及其变化。

参考文献:

[1] 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(2): 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(2): 36-40.

[2] Gurska J, Wang W X, Gerhardt K E, et al. Three year field test of a plant growth promoting rhizobacteria enhanced phytoremediation system at a land farm for treatment of hydrocarbon waste[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(12): 4472-4479.

[3] Cao L X, Xie L J, Xue X L, et al. Purification and Characterization of alginate lyase from streptomyces species strain A5 isolated from banana rhizosphere [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55: 5113-5117.

[4] Iwasaki K, Matsubara Y. Purification of alginate oligosaccharides with root growth-promoting activity toward lettuce [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2000, 64: 1067-1070.

[5] Tang J C, Taniguchi H, Chu H, et al. Isolation and characterization of alginate-degrading bacteria for disposal of seaweed wastes[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 48: 38-43.

[6] 褚洪蕊, 唐景春. 褐藻酸降解菌 A7 的发酵及产酶条件研究[J]. 海洋科学, 2008, 32(11): 93-96.
CHU Hong-rui, TANG Jing-chun. Study on culture conditions for alginase production by alginate degrading bacterium *Gracillibacillus* sp. A7 [J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(11): 93-96.

[7] 陈 嫣, 李广贺, 张 旭, 等. 石油污染土壤植物根际微生态环境与降解效应[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2005, 45(6): 784-787.
CHEN Yan, LI Guang-he, ZHANG Xu, et al, ZHANG Ling. Effect of petroleum biodegradation and rhizosphere micro eco-system in phytoremediation of the polluted soil in oilfield[J]. *Journal of Tsinghua University (Science and Technology)*, 2005, 45(6): 784-787.

[8] Parveen I, Threadgill M D, Moorby J M, et al. Oxidative phenols in forage crops containing polyphenol oxidase enzymes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(3): 1371-1382.

[9] Zhang Z Z, Su S M, Luo Y J, et al. Improvement of natural microbial remediation of petroleum-polluted soil using graminaceous plants[J]. *Water Science and Technology*, 2009, 29(5): 1025-1035.

[10] Juck D, Charles T, Whyte L G, et al. Polyphasic microbial community

analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities[J]. *FEMS Microbiol Ecology*, 2000, 33(3): 241-249.

[11] Supaphol S, Panichsakpatana S, Trakulnaleamsai S, et al. The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: Example using petroleum contaminated tropical soils [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 65(3): 432-441.

[12] Maila M P, Randima P, Drønen K, et al. Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(2): 303-310.

[13] Huang X D, El-Alawi Y, Gurska J, et al. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils[J]. *Microchemical Journal*, 2005, 81(1): 139-147.

[14] Phillips L A, Greer Charles W, Farrell R E, et al. Field-scale assessment of weathered hydrocarbon degradation by mixed and single plant treatments[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 42(1): 9-17.

[15] Gurska J, Wang W X, Gerhardt K E, et al. Three year field test of a plant growth promoting rhizobacteria enhanced phytoremediation system at a land farm for treatment of hydrocarbon waste[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(12): 4472-4479.

[16] **王震宇, 赵　建, 李锋民, 等. 盐渍化土壤中土著菌的石油烃降解潜力研究**[J]. **农业环境科学学报**, 2009, 28(7): 1416-1421.
WANG Zhen-yu, ZHAO Jian, LI Feng-min, et al. Petroleum hydrocarbons degradation potential of autochthonous bacteria from saline soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(7): 1416-1421.

[17] **齐永强, 王红旗, 刘敬奇, 等. 土壤中石油污染物微生物降解过程中各石油烃组分的演变规律**[J]. **环境科学学报**, 2003, 23(6): 834-836.
QI Yong-qiang, WANG Hong-qi, LIU Jing-qi, et al. Component changes of hydrocarbon during the precess of bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2003, 23(6): 834-836.

[18] **刘　鹏, 李大平, 王晓梅, 等. 石油污染土壤的生物修复技术研究**[J]. **化工环保**, 2006, 26(2): 91-94.
LIU Peng, LI Da-ping, WANG Xiao-mei, et al. Study on in-situ bioremediation process of oil-contaminated soil[J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2006, 26(2): 91-94.

[19] Li H, Zhang Y, Zhang C G, et al. Effect of petroleum-containing wastewater irrigation on bacterial diversities and enzymatic activities in a paddy soil Irrigation Area [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2005, 34: 1073-1080.

[20] 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: 602-607.

[21] Kirk J L, Klironomos J N, Lee H, et al. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 133(3): 455-465.

[22] Phillips L A, Greer C W, Germida J J. Culture-based and culture-independent assessment of the impact of mixed and single plant treatments on rhizosphere microbial communities in hydrocarbon contaminated flare-pit soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38(9): 2823-2833.

[23] Dashti N, Khanafer M, El-Nemr I, et al. The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils[J]. *Chemosphere*, 2009, 74(10): 1354-1359.

[24] Juck D, Charles T, Whyte L G, et al. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 33(3): 241-249.

[25] Supaphol S, Panichsakpatana S, Trakulnaleamsai S, et al. The selection of mixed microbial inocula in environmental biotechnology: Example using petroleum contaminated tropical soils [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 65(3): 432-441.