

植物和微生物修复石油污染土壤的研究进展^①

汪志荣, 马传鑫, 李燕妮, 朱小燕, 王伟荔, 王静兰

(天津理工大学环境科学与安全工程学院, 天津 300384)

摘要:阐述了植物和微生物降解环境中石油污染物及 PAHs 的重要作用和最新进展。国内外大量实验室研究表明, 不同植物和微生物(细菌、真菌和放线菌)联合修复石油污染土壤均得到了较为理想的效果, 在某种程度上微生物菌群要优于单一菌株; 土壤中植物根系与微生物形成根际效应对污染物的降解起到了促进作用; 生物表面活性剂较合成表面活性剂具有更好的生态适宜性和石油污染土壤修复能力; 土壤中多组分污染物共同修复虽处于起步阶段, 其作用机理也有待进一步研究, 但是, 发展前景值得期待。目前该领域的研究仍存在问题有待解决: 植物-微生物菌群降解石油污染物过程中, 微生物菌群间协同和竞争机制及试验结果的可重复性尚需证实; 实验室研究与大田环境条件的差异, 使得目前的研究成果尚需田间试验的验证和支持; 根据土壤类型和气候特点, 研究极端(高含盐量; 氮、磷等营养元素缺乏; 低温)条件下的石油高效降解菌株/群, 制备有效的便于大田应用的固体菌肥意义重大; 同时在确定石油污染物对环境致害的限值的基础上, 建立石油污染土壤评价体系也势在必行。

关键词:植物-微生物; 石油; PAHs; 生物表面活性剂; 根际效应; 多组分污染物共同修复

中图分类号: X53

土壤的石油污染是指土壤中石油类物质的含量超过其自净容量而造成土壤环境恶化的现象。石油污染土壤会改变原有的土壤物化性质, 阻碍植物根系呼吸及从土壤中摄取水分和养分, 影响植物的生长发育、产量和品质, 并通过食物链危害人类的健康和生命。同时, 也会改变土壤碳氮比, 引起土壤微生物群落结构变化。联合国环境规划总署(UNEP)将石油化合物代谢的多环芳烃类化合物(polycyclic aromatic hydrocarbons, 简称 PAHs)列为 12 种优先控制的持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)之一。近年来, 石油污染土壤的修复已成为国际研究的热点问题。

石油污染土壤修复的主要方法有物理修复、化学修复和生物修复。与物理、化学方法相比, 生物法修复石油污染土壤具有降解效率高、生物利用性强、不造成二次污染、成本低、不破坏土壤结构和组成等优点, 越来越多地受到人们的关注, 其中植物和微生物联合应用是最为广泛的一类生物修复方法。国内外学者对植物和微生物修复石油污染土壤方面的研究, 获得了丰富的研究成果。本文拟对近年来国内外在植物和微生物修复环境石油污染物方面的理论和应用研

究进行较为系统分析和讨论。

1 微生物对环境中石油污染物降解效率的研究

近年来, 国内外学者不断从环境中分离、筛选、纯化出具有降解石油烃类和 PAHs 的高效菌株, 或通过生物刺激等手段使环境微生物菌群的数量提高, 并将这些菌株或菌群应用于石油污染物修复研究中, 取得了较为显著的成果。有效的微生物涉及了细菌、真菌和放线菌, 其中以细菌和真菌的研究工作相对较多。

1.1 单一菌株对石油烃和 PAHs 降解效率的研究

单一菌株提取并应用于石油烃和 PAHs 的降解一直是人们关注和研究的重点。Liu 等^[1]在生物反应器中研究红串红球菌 NTU-1(*Rhodococcus erythropolis*)降解石油和柴油的效果, 4 天时 90% 的油被去除(30%生物降解, 60% 生物吸附); 增加反应器的油含量, 4 周降解了 87%(24% 生物降解, 63% 生物吸附)。Binazadeh 等^[2]发现, 红球菌 Moj-3449 (*Rhodococcus* sp.)能快速降解高浓度长链烷烃和石油烃, 降解速度与碳个数有关, $C_{14}(=C_{16}) > C_{12} > C_{18}$ 。Zhang 等^[3]、

^①基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(No. 11JCZDJC25000)资助。

作者简介: 汪志荣(1965—), 女, 辽宁大连人, 博士, 教授, 研究方向为水土资源利用与环境修复。E-mail: zhrwang@sohu.com

Ling 等^[4]、Zhang 等^[5]分别从油田污染土壤和炼油厂筛选了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)DQ8、死谷芽孢杆菌(*Bacillus vallismortis*)JY3A 和按蚊两面神菌株(*Janibacter anophelis*)JY11。研究表明, DQ8 对荧蒽(Flu)和芘(Pyr)的降解效率分别为 40.35% 和 34.5%(12 天); JY3A 能够以 PAHs 作为唯一碳源去除 90.5% 的 Pyr(15 天), 值得指出的是, JY3A 与黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)共培养, Pyr 的降解效率 7 天便达 55.4%; 当 PAHs 初始浓度为 500 mg/kg 时, 在不添加任何共代谢基质和表面活性剂条件下, JY11 能分别降解菲(Phe)98.5%、蒽(Ant)82.1% 和 Pyr 97.7%(5 天)。

1.2 菌群对石油烃类物质降解效率的研究

石油污染物成份复杂, 与单一菌种仅能利用其中有限碳源相比, 菌群降解石油和 PAHs 具有更加明显的优势。当外源菌群加入石油环境后, 其自身共代谢作用和协同作用能同时降解石油组分中的不同物质, 避免了单一菌株仅可利用有限碳源的弊端, 加快和提高复杂污染物的生物降解。

Liu 等^[6]从红树林底泥中分离出含 53 个可降解 PAHs 的细菌菌群, 其中 14 株 Phe 降解菌、13 株 Pyr 降解菌、13 株苯并[a]芘(Bap)降解菌和 13 株混合 PAHs(Phe+Pyr+Bap)降解菌。液体培养基试验及 HPLC 测定发现, Phe 降解菌群和混合 PAHs 降解菌群均对 Phe 有较强降解能力。Pyr 和 Bap 的各自降解菌群对 Pyr 和 Bap 的降解不理想, 但至 15~20 天出现 Pyr 和 Bap 降解率升高现象, 表明大分子量物质的生物降解过程需要更长时间。Bacosa 等^[7]利用菌群, 主要为 β -变形杆菌, 包括无色杆菌属(*Achromobacter*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)和贪铜杆菌属(*Cupriavidus*), 研究并关注具有等量碳个数(equivalent carbon number, EC)不同芳香烃类的微生物降解过程, 结果显示菌群具有利用毒性更大芳香族化合物的潜力: 芳香族 EC>7~8 和 EC>8~10 的组分在 3 天后全部降解, 而脂肪族 EC>6~8 和 EC>8~10 在 3 天后仅部分降解, 芳香族 EC>10~12 的组分降解率排在第三位, 脂肪族 EC>10~12 和 EC>12~16 的降解率最低。AL-Saleh 等^[8]在 Kuwait 岸边 7 个采样点分离出 272 株 6 个菌属的石油降解菌: 假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、考克氏菌属(*Kocuria*)和微球菌属(*Micrococcus*)。优势菌占整个石油降解菌群组成的 54.2%~89.7%。Tang 等^[9]研究藻类-细菌菌群亦能够有效降解石油中脂肪族和芳香族化合物。

1.3 微生物在石油污染土壤中的应用研究

投加外源微生物和采用生物刺激手段(加入营养物质、生物载体、木屑等), 改善污染土壤中微生物的生存环境, 提高土著微生物的数量, 是近年来应用微生物修复石油污染土壤时常用的方法。

Ros 等^[10]通过添加新鲜和经堆肥处理的底泥并以未处理土壤作为空白, 研究老化石油烃生物菌群降解发现, 加入新鲜底泥 8 个月后的土壤中烃类降解率最高达 46% 且细菌和真菌菌群中数量最大。Beškoski 等^[11]通过添加营养物质(氮、磷、钾), 机械掺混软木屑和河沙, 采用系统搅拌进行充氧等措施研究重油污染土壤异位修复。经 150 天后, 总石油烃(TPH)降解率为 94%, 而空白对照仅为 10%, 同时, 脂肪族、芳香族及沥青质等降解率亦达到了 80%~95%。Liang 等^[12]研究表明, 添加活性炭的土壤微生物数量和脱氢酶活性分别为添加沸石的土壤的 12 倍和 3 倍, 同时可提高石油降解能力达 48.89%。通过假设模型解释了多孔载体的作用机理, 认为生物载体能影响土壤非水相液体(NAPL)的降解条件, 如氧气、营养物质运输和土壤保水能力。Byss 等^[13]利用平菇真菌(*Pleurotus ostreatus*)和白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)降解杂酚油污染土壤中的 PAHs 并研究土壤细菌菌群变化结果显示, 真菌对 4~6 环 PAHs 的降解效果明显高于细菌菌群, 平菇真菌的降解率为 55%~67%, 且能促进土壤中 G⁺ 菌生长, 说明细菌和真菌间有一定的联合作用。

2 生物表面活性剂在石油污染土壤中的研究和应用

微生物降解石油烃的根本原因是由于其产生的表面活性剂, 因此表面活性剂的研究得到了广泛重视。

表面活性剂(surfactant)是一类同时具有疏水结构和亲水结构的两性化合物, 能通过混溶液体界面积累, 降低界面张力和表面张力, 增强碳水化合物乳化的同时, 增加疏水或不溶有机化合物的溶解性和移动性^[14]。表面活性剂可以提高污染土壤中石油的去除效率, 分为生物和合成表面活性剂两大类。

生物表面活性剂(biosurfactant, 简称 BS)是微生物的次级代谢产物^[15]。微生物产生的 BS 种类很多, 目前研究最多的有糖脂(glycolipids)、脂多糖(lipopolysaccharides)、低聚糖(oligosaccharides)、多肽(lipopeptides)、磷脂(phospholipids)、脂肪酸(fatty acids)和中性酸(neutral acids)等^[16-21]。已报道的大多数 BS 为非离子或阴离子表面活性剂, 阳离子表面活性剂鲜

有发现^[16,20]。合成表面活性剂(synthetic surfactant, 简称 STS)主要是指人工合成的一类表面活性剂。与 STS 相比, BS 具有良好的界面活性。BS 来源于微生物, 不仅能促进石油污染物降解, 且本身具有生物可降解性、生态适宜性、低毒性及在极端温度、pH 和盐分条件下有较高的稳定性等特点^[22]。近年来, 英国、印度、美国及中国的学者研究工作取得了重要的研究成果, 为指导 BS 在修复污染土壤的实际应用提供了理论依据。

2.1 生物表面活性剂主要影响因素的研究

离子强度能通过影响胶体聚集数量及表面活性剂的临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC), 而影响 BS 对疏水烃类(hydrophobic organic compounds, HOCs)的溶解度。pH 虽对表面活性剂无明显影响, 但会通过影响分子结构而影响 HOCs 的溶解能力。此外环境温度也是影响因素之一。近年, 国内外学者对表面活性剂的主要影响因素及其机理进行了大量研究, 优化并寻求 BS 最适宜的应用环境条件。

Darvishi 等^[23]从伊朗南部重油污染土壤中分离出阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)和假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)菌群 ERCPPI-2。通过实验室培养发现, ERCPPI-2 能在 70℃、6000 Pa、15%(w/v)盐分和 pH 2~4 条件下生长。40℃、pH 7 为其产生 BS 的最佳条件, 其 BS 可使表面张力和界面张力分别从 58.3 mN/m 和 16.9 mN/m 降低至 31.7 mN/m 和 0.65 mN/m。Abouseoud 等^[24]研究了荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)在不同 pH 和盐分条件下对萘(Nap)溶解性的影响。结果表明, pH 7 或无 NaCl 条件下, Nap 溶解度随表面活性剂浓度增加而增加; 当表面活性剂的浓度达到 4 g/L 时, Nap 的溶解度趋于稳定, 且过酸或过碱均会有影响; 萘的溶解度随盐分含量增加而降低。Yin 等^[18]研究含油废水中的绿脓杆菌 S6 产生的 BS 特性发现, pH 6~10 和盐浓度 2~10 g/L 条件下, BS 产量受轻微影响, 其界面活动对 pH 和盐不敏感, 这表明 BS 可在较宽的环境条件下起作用。Bordoloi 等^[15]利用实验室土柱研究 BS 对饱和石油污染沙土中石油污染物的去除效果时发现, 在 pH(2.5~11)和 100℃条件下, BS 的表面张力并没有减少。在研究嗜热微生物产表面活性剂在高温条件下对石油表面张力的影响时亦得到此结论^[25]。Ilori 等^[26]、Batista 等^[27]、Costa 等^[28]研究在极端环境条件(pH、温度和盐分)下 BS 对石油的降解效果都得到了相似的结论。显然, 在极端条件下微生物菌群能够产生 BS 的这种特性, 使在各种极端环境下应用微生物去

除土壤中石油污染成为了可能。

近年来, 基质对微生物产生的 BS 量的影响引起国内外学者的关注。Pansiripat 等^[29]通过调整油/葡萄糖比例研究在序批式反应器中绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)SP4 产生 BS 的变化, 反应器在油与葡萄糖之比为 40:1 时达到最佳运行条件。流出液表面张力测定表明, 6 h 后表面张力从 66 mN/m 骤降至 35 mN/m, 说明 SP4 大量分泌 BS。Najafi 等^[30]优化微生物生长条件提高伊朗油田土著微生物蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*)BS 的产生量, 在 39.03℃, 葡萄糖 16.55 g/L、盐分 55.05 g/L 及 pH 7.37 时, BS 能最大程度降低污染物的表面张力。Kiran 等^[31]采用工农业固体废物为基质发现, 由短杆菌(*Brevibacterium aureum*)MSA13 产生的新型脂肽表面活性剂的量是糖蜜基质的 3 倍。而添加麦麸能大量增加海绵(*Dendrilla nigra*)中的嗜盐放线菌(*Nocardopsis lucentensis*)MSA04 的 BS 产量。在培养过程中分别以煤油和牛肉膏提取物作为碳源和氮源, C/N 为 0.5 时, BS 产生量最大, 说明表面活性剂产生过程中氮源的需要量更大^[32]。Nawawi 等^[33]经液体发酵培养, 研究淤泥棕榈油对微生物 BS 产量的影响发现, K₂HPO₄ 与 BS 产量呈现正相关, 而蔗糖、葡萄糖、FeSO₄、MgSO₄ 和 NaNO₃ 等表现出了负相关。

2.2 生物表面活性剂对石油及 PAHs 降解效率的研究

在生物法修复环境石油及 PAHs 等污染物时, 加入 BS 能够大幅提高石油疏水烃类化合物及 PAHs 的溶解度, 降低表面张力, 大大增强环境微生物的生物可利用性。

Thavasi 等^[34]利用德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)以花生油饼作为碳源提取 BS 达 5.35 g/L。加入 0.1% 肥料和 BS 的摇瓶试验发现, 石油降解率分别达到 61.25% 和 65% 左右, 继续增加对石油降解无明显作用。而在微生物、肥料和表面活性剂同时作用条件下, 石油降解效果最高达 75%。试验亦证明在 BS 单独作用下, 也能促进降解过程。分析海洋中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、棒状杆菌(*Corynebacterium kutscheri*)和绿脓杆菌产生的 BS 时发现, 7 天的绿脓杆菌对石油降解明显优于其余 2 株菌种。无肥料 BS 也能在很大程度上促进石油降解。Nayak 等^[35]发现, 假黄单胞菌(*Pseudoxanthomonas* sp.)PNK-04 产生的鼠李糖对沥青质和芳香烃具有较高的乳化能力, 有 60% 1-甲基萘被降解。Das 等^[36]研究印度东北部石油烃污染土壤中的枯草芽孢杆菌

和绿脓杆菌产生的 BS 对 PAHs 的降解效果,发现与空白相比,加入 BS, Pyr 溶解度提高了 5 倍多, Phe 和 Ant 溶解度提高了 2~3 倍;与绿脓杆菌产生的 BS 相比,由枯草芽孢杆菌产生的 BS 对 Ant 的溶解性影响更大。

Toledo 等^[37]发现废油中有 4 个菌属均能在 PAHs 上生长并有较高乳化能力,因不改变表面张力,被认为不是表面活性剂。但其中微球菌(*Micrococcus luteus*)212-4 产生的胞外聚合物具有高含量蛋白质和低含量的碳水化合物,经鉴定含有鼠李糖。

2.3 生物表面活性剂与合成表面活性剂的比较研究

目前研究表明,BS 在去除石油污染效率方面高于或与 STS 效率相当,但由于 BS 自身的低毒性和生态适宜性能够比 STS 更好地应用于石油污染土壤修复中。

Urum 等^[38]分别运用 STS 十二烷基硫酸钠(Sodium Dodecyl Sulphate, SDS)和七叶皂甙(aescin)、卵磷脂(lecithin)、鼠李糖脂(rhamnolipid)、皂甙(saponin)等进行土壤的淋洗试验,对比分析 STS 和 BS 在治理石油污染土壤中的作用。结果表明,鼠李糖脂和皂甙对石油的去除率均达到了 80%,而 SDS 能去除土壤中几乎 95% 的石油;所有的表面活性剂去除石油污染物的最佳条件均为在 50℃ 下淋洗 10 min。但由于 SDS 对环境具有极强毒性,因此不适宜在石油污染土壤的应用。而对风干石油污染土壤中 STS 和 BS 去除石油的效率对比发现,鼠李糖和 SDS 具有相似的去除效率,分别为 44% 和 46%^[39]。Kuyukina 等^[40]采用土柱试验,研究 STS-Tween60 和红球菌(*Rhodococcus*)产生的 BS 对石油污染物在土壤中的解吸和迁移作用表明,BS 对石油的去除率是 Tween60 的 1.9~2.3 倍。Lai 等^[41]考察 BS 鼠李糖脂和芽孢杆菌产生的 BS 与 Tween80 和 TritonX-100 对两种石油污染浓度土壤(3 000 mg/kg 和 9 000mg/kg)的修复效果,结果表明降解效率顺序为鼠李糖脂>芽孢杆菌表面活性剂>TritonX-100> Tween80。其他研究者也获得了相似的研究结果^[19,42-43]。

3 植物-微生物联合修复石油污染物的研究

3.1 植物修复石油及 PAHs 污染土壤的研究

植物能够利用降解、转移、同化、代谢和去除环境污染物的毒性^[44]。因此植物修复被认为是一种最有希望的绿色技术,但相关工作尚需在机理层面深入研究。目前研究认为,植物根部能够释放类黄酮等物

质,刺激多氯联苯(polychlorinated biphenyl, PCB)和 PAHs 降解菌的生长和活动;同时植物根系会促进土壤呼吸,提高难降解有机物的氧化能力^[45]。

Lin 和 Mendelssohn^[46]研究灯芯草(*Juncus roemerianus*)对湿地柴油污染物修复一年的效果发现,TPH(石油总烃)剩余量(约 20 000 mg/kg)要远远低于无植被条件(约 40 000 mg/kg),其中正构烷烃的去除率为 85%~99.8%,比无植被条件高 12.8%~47%。对 PAHs 的降解效果相同。鳗草(*Zostera marina*)对海洋底泥中 PAHs 和 PCBs 的原位修复(60 周),底泥中总 PAHs 和 PCBs 分别降低了 73% 和 60%,而对照中仅去除 25% 和 0%^[47]。Wang 等^[48]在黄河三角洲石油污染土壤修复过程中也进行了相似的研究。Muratova 等^[49]证实了高粱(*Sorghum bicolor*)根部分泌的过氧化物酶对 Phe 降解的重要作用。Cai 等^[50]经 4 个月温室试验发现,凤仙花(*Impatiens balsamina* L.)对土壤 TPH 平均降解率为 18.13%~65.03%,无植物时仅为 10.20%~35.61%,其中饱和烃类的降解率最高。

3.2 植物-微生物联合修复石油及 PAHs 污染土壤的研究

植物-微生物联合修复石油或 PAHs 的过程中,很难将植物修复作用与根际效应(rhizosphere)分离开。Heinonsalo 等^[51]提出了菌根根际假说,在自然界木质素较多的腐殖土或石油碳氢化合物污染土壤中,富碳基质分泌到根际,增强了微生物对碳源的利用能力,促进了石油类污染物的降解。近年来,国内外学者进行了大量的有关根际效应修复石油污染土壤的研究,获得了丰富的研究成果。主要集中在植物-微生物单一菌种联合修复和植物-微生物菌群联合修复两方面。

3.2.1 根际效应及其对植物和根系土壤中微生物的影响 丛枝菌根真菌(AMF)在与植物根系形成根际效应之后,其对石油污染土壤中植物的生物量和抗逆性产生了重要的影响。耿春女等^[52]在三叶草(*Trifolium subterraneum* L.)盆栽试验(石油浓度分别为 0、5 000、10 000 和 50 000 mg/kg)中,分别选用 3 种 AMF(*G.mosseae*, *G.geospora* 和 *G.constrictum*),接菌处理的植物生物量(地上部分茎的干重)比未接菌处理显著增加了 62.2%~261.7%;王丽萍等^[53]采用单接种和混合接种方式,利用两种 AMF,即摩西球囊霉菌(*Glomus mosseae*)和地表球囊霉菌(*Glomus versiforme*)对 0.2% 和 2% 石油浓度的玉米进行侵染,双接种玉米植株干重分别为 34.09 g 和 11.73 g,

显著高于对照(14.09 g 和3.73g),根部干重呈现最高值(1.731 g 和 0.724 g)。Chiapusio 等^[54]研究恒温条件下3种土壤中Phe对黑麦草(*Lolium perenne* L.)和三叶草(*Trifolium*)与菌根真菌形成的根际土壤的毒性效应。因总生物量在有无污染土壤中无显著差异,证明Phe对黑麦草生物量无影响;而三叶草的生物量干重在污染土壤中比对照组要高出大约20 mg/盆。Meharga 和 Cairney^[55]在利用树本植物的根际效应修复土壤的研究中发现,植物生物量大幅提高且根系变得发达。Nicolotti 和 Egli^[56]研究证明AMF侵染的石油污染土壤对黑杨树苗也无影响。Kaimi 等^[57]在研究黑麦草对柴油的生物可降解性中发现,TPH的降低和根系伸长同时发生,随根系生长减缓,TPH含量下降速度也降低。

土壤中植物和微生物的根际效应一旦形成,二者就形成了互利共生关系,不仅提高了石油污染物降解效率,同时植物通过根系分泌有机物质,使根际微生物的密度、多样性和活动增加^[58-59]。Sorkhoh 等^[60]的研究发现,豆科和非豆科植物根系土壤微生物数量分别为 $(21.2 \sim 50.1) \times 10^6$ CFU/g 和 $(6.5 \sim 8.7) \times 10^6$ CFU/g,其主要降油微生物为微杆菌属(*Microbacterium oxydans*)、假单胞菌属(*Pseudomonas plecoglossicida*)和嗜酸菌属(*Acidovorax delafieldii*),且这些微生物可在无氮源条件下生长,这为沙地根际修复节省了氮肥,使植物修复更经济和环境友好。Yousaf 等^[61]从26种植物中筛选出对石油污染物具有修复作用的意大利黑麦草(*Lolium multiflorum*)和百脉根三叶草(*Lotus corniculatus*),并从黑麦草根部分发现了大量且多样的烷烃降解菌。Nie 等^[62]在黄河三角洲的石油烃污染盐渍化土壤中发现,在根际土壤中的正十六烷降解菌、柴油降解菌、PAHs降解菌显著高于非根际土壤;且TPH浓度是决定土壤总细菌丰度的主要因素,对烃类降解菌产生正面影响;盐渍化土壤的根际细菌的丰度能降低盐渍化对植物根系的胁迫,为根系微生物生长提供良好环境;根系土壤中大量、多样的微生物总量能显著提高在被降解生态体系中微生物的生态功能。Phillips 等^[63]研究了内生细菌和平原植被联合降解烃类物质的潜力,用标准平板计数法考察根际和非根际土壤中微生物的数量。在有植被条件下,微生物的数量相对稳定,平均为 10^7 CFU/g(干土)和 10^8 CFU/g(湿根系),与植物类型无关;而无植被土壤的微生物数量比根际土壤低几个数量级。Zhang 等^[64]研究盆栽药用蒲公英(*Taraxacum officinale*)、串叶松香草(*Silphium perfoliatum* L.)和铁苋菜(*Acalypha australis* L.)对石油污染土壤(0.25和0.5 kg/盆)微生物

多样性的影响,发现加入石油使药用蒲公英和铁苋菜根际和非根际土壤间基质丰度和多样性的差异增加。

3.2.2 植物与单一菌种联合修复石油污染物的研究 植物与单一菌种联合修复石油污染物的研究工作相对丰富,涉及到的植物和微生物种类也十分广泛。

Soleimani 等^[65]将内生真菌(*Neotyphodium coenophialum*和*Neotyphodium uncinatum*)侵染与未侵染高羊茅(*Festuca arundinacea* Schreb.)和草甸羊茅(*Festuca pratensis* Huds.)培养7个月后发现,内生真菌侵染的植物根系和生物量明显增加,石油污染土壤中的TPH和PAHs降解率分别达到了80%~84%和64%~72%。Debiane 等^[66]通过菊苣试验验证了AMF能够缓解PAHs类Bap诱导的氧化应激,保护植物根系。有丛植真菌作用的根系较长,且暴露在Bap中时,表现出较低毒性。Hernández-Ortega 等^[67]研究白花草木樨(*Melilotus albus*)与AMF联合修复柴油污染土壤时也发现,AMF能够减少柴油毒性并提高植物生物量、养分含量和抗氧化能力。

程国玲和李培军^[68]采用单、双和混合接种(4种等量混合)的盆栽实验,研究小叶白蜡(*Fraxinus sogdiana*)和4种外生菌根真菌,即毛边滑锈伞(*Hebelomam esophaeusm*)、劣味乳菇(*Lactarius insulsns*)、松塔牛肝菌(*Strobilomyces floccopus*)和丝膜菌(*Cortinarius russus*)降解土壤中石油烃类的结果显示,单接种降解石油烃的效果均小于双接种,而混合接种的降解效率最高,比空白高出23.6%,说明外生菌根真菌对石油烃具有较强的降解能力,同时真菌之间的协同作用表现得极为明显。耿春女等^[69]选择20#重柴油、AMF(*G.mosseae*, *G.geospora*和*G.constrictum*)及沈阳污灌区水田分离的细菌,采用单接种和混合接种方式,研究AMF对万寿菊生长及柴油降解的影响,在5000 mg/kg浓度条件下,单接种*G.geospora*或混合接种AMF和细菌均能够提高柴油在土壤中的降解效率。Tesar 等^[70]在研究布莱克白杨(black poplar)、草本植物(herbal plants)和细菌的根际效应降解柴油也得到了相似的结论。

菌根修复污染土壤中PAHs是目前研究最多的一种土壤修复方式,根际作用能够提高PAHs的降解和矿化程度。Meharga 和 Cairney^[55]研究表明,高于50%的难降解PAHs(包括Bap)可被外生菌根降解,未污染土壤中外生菌根真菌也均表现出降解PAHs的能力。Lefrancois 等^[71]研究赤杨-弗兰克氏菌属(*Alder-Frankia*)共生修复(2季)石油污染砂土时发现,在弗兰克氏菌属作用条件下,正十六烷、Nap和Phe的矿化度显著增加。Fan 等^[72]研究60天紫花苜蓿(*alfalfa*)

对 Pyr 的降解效果表明,根际土壤细菌和真菌含量分别比非根际土壤高 5.0 ~ 7.5 和 1.8 ~ 2.3 倍,根际的 Pyr 平均去除率比非根际高 6%。Chiapusio 等^[54]证实黑麦草和红三叶草对 3 种人工 Phe 污染土壤具有修复作用;Joner 等^[73]证实了混合三叶草和黑麦草修复苯并[a,h]蒽(BaA)过程中菌根真菌的作用;Johnson 等^[74]用黑麦草和白三叶草共同修复 PAHs 污染土壤时,接种菌根真菌的根系土壤会提高 PAHs 降解率。AMF 对 Bap 污染土壤的降解盆栽试验得到相似的结论^[75]。

3.2.3 植物与菌群联合修复石油污染物的研究

菌群与植物联合降解环境中石油及 PAHs 越来越多地受到人们的重视。目前,在植物-微生物修复过程中主要关注的问题有:微生物菌群本身的固氮能力,以便评价贫瘠土壤中微生物是否能够靠自身提供氮源;向土壤添加基质后的植物-微生物联合修复作用;土壤中 PAHs 在植物-微生物菌群作用下的降解效率等。

Dashti 等^[76]从豆科植物蚕豆(*Vicia faba*)和羽扇豆(*Lupinus albus*)与细菌菌群联合修复石油污染土壤中筛选出 11 株能以石油为唯一碳源的菌株,包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)8 株、芽孢杆菌属(*Bacillus*)2 株及诺卡氏菌属(*Nocardia*)1 株,并且根瘤植物对石油利用的能力高于非根瘤植物。Al-Mailem 等^[77]发现盐节木(*Halonemum strobilaceum*)能够自然生长在阿拉伯湾高盐岸边,其根际微生物数量是无植被区的 14 ~ 38 倍。根际常见菌属为古细菌嗜盐杆菌属(*Archaea Halobacterium* sp.)、嗜盐球菌属(*Halococcus* sp.)、波茨坦短芽孢杆菌(*Brevibacillus borstenlensis*)、变形菌属(*proteobacteria Pseudoalteromonas ruthenica*)和盐单胞菌属(*Halomonas sinaensis*),以上菌种均可以在 1 ~ 4 mol/L NaCl 中生长,并且根际微生物菌群在含氮与不含氮培养基中均可减少石油含量。

通过加入基质,刺激土壤中微生物菌群的生长,进而能够达到较为理想的植物-微生物联合修复效果。Agamuthua 等^[78]研究表明在有机废物(香蕉皮、酿酒谷物残渣和真菌堆肥)条件下,麻疯树(*Jatropha curcas*)对含油量(润滑油)25 000 mg/kg 和 10 000 mg/kg 土壤的油去除率达到 56.6% 和 67.3%,植物根部无积累的碳氢化合物。在酿酒谷物残渣中微生物数量显著高于其余添加物,且油类降解率亦最高,达到 89.6% 和 96.6%。Zhang 等人^[79]发现,牵牛花(*Pharbitisnil* L.)和菌群联合作用对石油降解率(27.63% ~ 67.42%)比无植被时(10.20% ~ 35.61%)显著增加;土壤石油浓度大于 10 000 mg/kg 时,菌群数量开始急剧下降;石油浓度小于 10 000 mg/kg 时,微生物可通过调节自身的代谢和酶系统来适应石油环境。Mohsenzadeh 等^[80]

发现,蓼科首乌属植物(*Polygonum aviculare* L.)与根际真菌修复石油污染土壤时,来自石油污染区植被根际微生物的多样性比非污染区域高;镰刀菌属(*Fusarium*)微生物具有高耐油特点(10% v/v),可用于重石油污染区;真菌在降解过程中起主要作用,植物根系加速了这一过程。Lu 等^[81]采用真桦鬼针草(*Bidens maximowicziana*)修复 Pyr 污染土壤, Pyr 含量 50 天降低了 79%。Mikkonen 等^[82]研究山黄麻(*Galega orientalis*)对燃油根际修复时亦得到了类似结论。Cheema 等^[83-84]研究牛毛草及牛毛草、黑麦草、苜蓿和油菜籽联合修复作用发现,联合植物修复对 Phe 和 Pyr 的降解率能够分别达到 98.3% ~ 99.2% 和 79.8% ~ 86.0%,比单一植物修复的降解率有所提高。

3.3 土壤石油和重金属污染物同时修复效果研究

工业废水和矿区污染土壤中常同时存在有机污染物和重金属,由于作用方式和处理方法不同,同时修复土壤有机污染物(石油、杀虫剂等)和重金属是一个复杂的问题。近年来,将能够沉淀重金属的微生物和降解石油的微生物联合培养,研究其对体系中重金属和石油同时修复成为新的国际热点研究。

Pérez 等^[85]在厌氧反应器中观察硫酸盐还原菌硫弧菌(*Desulfovibrio* sp.)的重金属沉降效果发现,95%的重金属在 24 h 后被沉降。石油污染物 2%(v/v)和重金属共存时,绿脓杆菌 AT18 的石油降解率为 60%,Cr(III)、Cu(II)、Mn(II)和 Zn(II)的去除率分别为 99%、93%、88% 和 46%。

Sorkhoh 等^[86]研究植物和根际细菌对重金属汞和石油污染土壤的修复时,从蚕豆根际细菌中筛选出可利用石油同时耐受重金属汞的微生物,分别为弗氏枸橼酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、金橙黄微小杆菌(*Exiguobacterium aurantiacum*)、维罗纳假单胞菌(*Pseudomonas veronii*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)、节杆菌(*Arthrobacter* sp.)和嗜冷黄杆菌(*Flavobacterium psychrophilum*)。这些菌种均具有固氮能力,可应用于贫瘠土壤。研究表明,当土壤中 HgCl₂ 含量达 40 mg/L 时,根际细菌对石油的降解能力受到抑制;当 HgCl₂ 浓度高于 40 mg/L 时,降油能力可保持原有水平的 50% 并且植物和根系细菌有着相同去除土壤 Hg 的能力。

生物法修复多组分污染物目前仍处于起步阶段。虽然试验已经表明微生物在一定程度上在降解石油的同时通过沉降或吸附等作用去除重金属,但其作用机理及影响因素还需进一步研究。

4 展望

植物-微生物修复土壤石油污染物已成为发展趋势,但在理论和技术层面仍存在诸多问题尚待解决。

在理论层面,植物和微生物修复石油污染物的机理还需进一步深入研究:

(1) 微生物在利用并降解石油污染物过程中会产生BS,同时通过添加BS可以提高污染物的生物可利用性,这些结论均通过不同试验得以证明。虽然可以通过BS的分子结构对其起作用的机理进行解释,但是微生物如何产生BS或者BS是否为微生物本身代谢过程中的产物仍需做进一步的机理研究。目前,为提高石油污染物的降解效率,会人为添加BS或可产生BS的菌株,但是外源菌种的加入是否会对土著微生物本身造成影响,其协同或竞争机制有待进一步查明。

(2) 自然土壤中微生物种类繁多,越来越多的学者开始关注利用菌群降解土壤中的污染物,结果表明,菌群在某种程度上对石油污染物的降解能力要明显高于单一菌种。考虑到应用环境不同,利用菌群来修复石油污染物仍存在一些尚需解决的问题,如菌群修复是否具有可重复性;是否可以人工构建菌群;如何解决菌群间的协同机制,使所构建菌群最大限度地降解石油污染物。

(3) 植物-微生物联合修复石油污染物过程中,根际效应在治理土壤中石油污染物所发挥的作用已通过大量试验得以证实。通过对照试验发现根际土壤和非根际土壤在降解石油方面的差别,国外学者还提出根际假说理论,但是植被根系和土壤中微生物的根际关系如何发挥作用及在石油胁迫条件下微生物是如何通过这种关系调控自身的代谢活动的理论依据尚不明确。

(4) 对于多组分污染物同时存在情况(如重金属和石油)下,利用生物法降解污染物时应该首先研究微生物对不同污染物类型的降解机制,进而研究在多组分污染物共存的条件下,微生物是否会优先利用和降解某一种污染物及对最终土壤污染物降解效果产生影响。

在应用技术方面:

(1) 目前,生物法降解土壤中石油污染物基本上是在实验室条件下完成的,考虑到实际环境条件与室内差别极大,是否在田间试验也能得到与盆栽试验相似的降解效果尚需大量的田间试验来证实。同时,田间试验植物-微生物之间是否能形成良好的根际关系,及微生物在利用石油污染物过程中是否可以正常

产生BS,仍需进一步查明。

(2) 考虑到不同地区土壤类型的特点,如何筛选高效石油降解菌株或菌群已成为近年来研究的热点问题。在极端条件(高含盐量、营养元素氮、磷缺乏)下,可以考虑选用嗜盐菌或固氮菌进行驯化培养,以期找到适合特定土壤环境的高效石油降解菌株或菌群。

(3) 石油污染土壤中剩余石油浓度对土壤中动物、植物、微生物的毒性效应,需深入研究,以确定石油污染对环境致害的限值,同时为石油污染土壤评价体系的建立提供理论依据。

参考文献:

- [1] Liu CW, Liu HS. *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46: 202-209
- [2] Binazadeh M, Karimi IA, Li Z. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 45: 195-202
- [3] Zhang ZZ, Hou ZW, Yang CY, Ma CQ, Tao F, Xu P. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 411-416
- [4] Ling JY, Zhang GY, Sun HB, Fan YY, Ju JH, Zhang CK. Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409: 1994-2000
- [5] Zhang GY, Ling JY, Sun HB, Luo J, Fan YY, Cui ZJ. Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Janibacter anophelis* strain JY11[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172: 580-586
- [6] Liu HJ, Yang CY, Tian Y, Lin GH, Zheng TL. Using population dynamics analysis by DGGE to design the bacterial consortium isolated from mangrove sediments for biodegradation of PAHs[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65: 269-275
- [7] Bacosa H, Suto K, Inoue C. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64: 702-710
- [8] AL-Saleh E, Drobia H, Obuekwe C. Predominant culturable crude oil-degrading bacteria in the coast of Kuwait[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, 63: 400-406
- [9] Tang X, He LY, Tao XQ, Dang Z, Guo CL, Lu GN, Yi XY. Construction of an artificial microalgal-bacterial consortium that efficiently degrades crude oil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 181: 1158-1162

- [10] Ros M, Rodríguez I, García C, Hernández T. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 6 916–6 923
- [11] Beškoski VP, Gojgić-Cvijović G, Milić J, Ilić M, Miletić S, Šolević T, Vrvic MM. *Ex situ* bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) – A field experiment[J]. *Chemosphere*, 2011, 83: 34–40
- [12] Liang YT, Zhang X, Dai DJ, Li GH. Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, 63: 80–87
- [13] Byss M, Elhottová, Třiska J, Baldrian P. Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study[J]. *Chemosphere*, 2008, 73: 1 518–1 523
- [14] Paria S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2008, 138: 24–58
- [15] Bordoloi NK, Konwar BK. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 63: 73–82
- [16] Mulligan CN. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009, 14: 372–378
- [17] Saeki H, Sasaki M, Komatsu K, Miura A, Matsuda H. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 572–577
- [18] Yin H, Qiang J, Jia Y, Ye JS, Peng H, Qin HM, Zhang N, He BY. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44: 302–308
- [19] Ruggeri C, Franzetti A, Bestetti G, Caredda P, Colla LP, Pintus M, Sergi S, Tamburini E. Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, 63: 936–942
- [20] Thu TT, Youssef NH, McInerney MJ, Sabatini DA. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation[J]. *Water research*, 2008, 42: 1 735–1 743
- [21] Zhang QZ, Cai WM, Wang J. Stimulatory effects of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 on rice straw decomposing[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20: 975–980
- [22] Das P, Mukherjee S, Sen R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin[J]. *Chemosphere*, 2008, 72: 1 229–1 234
- [23] Darvishi P, Ayatollahi S, Mowla D, Niazi A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 84: 292–300
- [24] Abouseoud M, Yataghene A, Amrane A, Maachi R. Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 180: 131–136
- [25] Plaza GA, Zjawiony I, Banat IM. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils[J]. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 2006, 50: 71–77
- [26] Ilori MO, Amobi CJ, Odocha AC. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas spp.* isolated from a tropical environment[J]. *Chemosphere*, 2005, 61: 85–92
- [27] Batista SB, Mounter AH, Amorim FR, Tótola MR. Isolation and characterization of biosurfactant/ bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 68–75
- [28] Costa SG, Nitschke M, Haddad R, Eberlin MN, Contiero J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 483–488
- [29] Pansiripat S, Pornsunthorntawe O, Rujiravanit R, Kitiyanan B, Somboonthanate P, Chavadej S. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effect of oil-to-glucose ratio[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 49: 185–191
- [30] Najafi AR, Rahimpour MR, Roostaazad R, Arabian D, Ghobadi Z. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 163: 188–194
- [31] Kiran GS, Thomas TA, Selvin J, Sabarathnam B, Lipton AP. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 2 389–2 396
- [32] Kiran GS, Thomas TA, Selvin J. Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardia opacensis* MSA04 in solid-state cultivation[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 78: 8–16
- [33] Nawawi WM, Jamal P, Alam ZM. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 9 241–9 247
- [34] Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 772–778
- [35] Nayak AS, Vijaykumar MH, Karegoudar TB. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, 63: 73–79

- [36] Das K, Mukherjee AK. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 1 339–1 345
- [37] Toledo FL, Calvo C, Rodelas B, González-López J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, 29: 244–252
- [38] Urum K, Pekdemir T, Gopur M. Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2003, 81: 203–209
- [39] Urum K, Grigson S, Pekdemir T, McMenamy S. A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils[J]. *Chemosphere*, 2006, 62: 1 403–1 410
- [40] Kuyukina MS, Ivshina IB, Makarov SO, Litvinenko LV, Cunningham CJ, Philp JC. Effect of biosurfactant on crude oil desorption and mobilization in a soil system[J]. *Environment International*, 2005, 31: 155–161
- [41] Lai CC, Huang YC, Wei YH, Chang JS. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 167: 609–614
- [42] Pornsunthorntawe O, Arttaweeporn N, Paisanjit S, Somboonthanate P, Abe M, Rujiravanit R, Chavadej S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 42: 172–179
- [43] Zhou WJ, Yang JJ, Lou LJ, Zhu LZ. Solubilization properties of polycyclic aromatic hydrocarbons by saponin, a plant-derived biosurfactant[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159: 1 198–1 204
- [44] Kirk JL, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 133: 455–465
- [45] Leigh MB, Prouzová P, Macková M, Macek T, Nagle DP, Fletcher JS. Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB contaminated site[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2006, 72: 2 331–2 342
- [46] Lin QX, Mendelssohn IA. Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands[J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35: 85–91
- [47] Huesemann MH, Hausmann TS, Fortman TJ, Thom RM, Cullinan V. In situ phytoremediation of PAH-and PCB-contaminated marine sediments with *eelgrass* (*Zostera marina*) [J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35: 1 395–1 404
- [48] Wang ZY, Xu Y, Zhao J, Li FM, Gao DM, Xing BS. Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 190: 677–685
- [49] Muratova A, Pozdnyakova N, Golubev S, Wittenmayer L, Makarov O, Merbach W, Turkovskaya O. Oxidoreductase activity of sorghum root exudates in a phenanthrene-contaminated environment[J]. *Chemosphere*, 2009, 74: 1 031–1 036
- [50] Cai Z, Zhou QX, Peng SW, Li KN. Promoted biodegradation and microbiological effects of petroleum hydrocarbons by *Impatiens balsamina* L. with strong endurance[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 183: 731–737
- [51] Heinonsalo J, Jørgensen KS, Haahtela K, Sen R. Effects of *Pinus sylvestris* root growth and mycorrhizosphere development on bacterial carbon source utilization and hydrocarbon oxidation in forest and petroleum-contaminated soils[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46: 451–464
- [52] 耿春女, 李培军, 陈素华, 肖宝英, 张海荣, 韩桂云, 张春桂. 不同 AM 真菌对三叶草耐油性的影响. 应用与环境生物学报[J], 2002, 8(6): 648–652
- [53] 王丽萍, 郭光霞, 华素兰, 张玮玮. 丛枝菌根真菌-植物对石油污染土壤修复实验研究. 中国矿业大学学报[J], 2009, 38(1): 91–95
- [54] Chiapusio G, Pujol S, Toussaint ML, Badot PM, Binet P. Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils[J]. *Plant Soil*, 2007, 294: 103–112
- [55] Meharga AA, Cairney JW. Ectomycorrhizas-extending the capabilities of rhizosphere remediation? [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 1 475–1 484
- [56] Nicolotti G, Egli S. Soil contamination by crude oil: Impact on the mycorrhizosphere and on revegetation potential of forest trees[J]. *Environmental Pollution*, 1998, 99: 37–43
- [57] Kaimi E, Mukaidani T, Miyoshi S, Tamaki M. Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 55: 110–119
- [58] Phillips LA, Greer CW, Germida JJ. 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: 2 823–2 833
- [59] Shann JR. The role of plants and plant/microbial systems in the reduction of exposure[J]. *Environ Health Perspect*, 1995, 103: 13–15
- [60] Sorkhoh NA, Ali N, Salamah S, Eliyas M, Khanafer M, Radwan SS. Enrichment of rhizospheres of crop plants raised in oily sand with hydrocarbon-utilizing bacteria capable of hydrocarbon consumption in nitrogen free media[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64: 659–664
- [61] Yousaf S, Andria V, Reichenauer TG, Smalla K, Sessitsch A. Phylogenetic and functional diversity of alkane degrading bacteria associated with Italian ryegrass (*Lolium*

- multiflorum*) and Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) in a petroleum oil-contaminated environment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 184: 523–532
- [62] Nie M, Zhang XD, Wang JQ, Jiang LF, Yang J, Quan ZX, Cui XH, Fang CH, Li B. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41: 2 535–2 542
- [63] Phillips LA, Germida JJ, Farrell RE, Greer CW. Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008 40: 3 054–3 064
- [64] Zhang QR, Zhou QX, Ren LP, Zhu YG, Sun SL. Ecological effects of crude oil residues on the functional diversity of soil microorganisms in three weed rhizospheres[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2006, 18: 1 101–1 106
- [65] Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, Nourbakhsh F, Sabzalian MR, Christensen JH. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses[J]. *Chemosphere*, 2010, 81: 1 084–1 090
- [66] Debiante D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A, Sahraoui AL. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1 421–1 427
- [67] Hernández-Ortega HA, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Zavaleta-Mancera HA, López-Delgado HA, Mendoza-López MR. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phyto-remediation of a diesel-contaminated substrate[J]. *Journal of Environmental Management*, 2011, 95: S319–S324
- [68] 程国玲, 李培军. 小叶白蜡接种外生菌根真菌对土壤石油烃的降解效果. *生态学杂志*[J], 2007, 26 (3): 389–392
- [69] 耿春女, 李培军, 陈素华, 张海荣, 韩桂云. 不同丛枝菌根真菌对万寿菊生长及柴油降解率的影响[J]. *应用生态学报*, 2003, 14 (10): 1 775–1 779
- [70] Tesar M, Reichenauer TG, Sessitsch A. Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34: 1 883–1 892
- [71] Lefrançois E, Quoreshi A, Khasa D, Fung M, Whyte LG, Roy S, Greer CW. Field performance of *alder-Frankia* symbionts for the reclamation of oil sands sites[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 46: 183–191
- [72] Fan SX, Li PJ, Gong ZQ, Ren WX, He N. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Chemosphere*, 2008, 71: 1 593–1 598
- [73] Joner EJ, Leyval C, Colpaert JV. Ectomycorrhizas impede phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) both within and beyond the rhizosphere[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 142: 34–38
- [74] Johnsen AR, Wick LY, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 133: 71–84
- [75] 刘世亮, 骆永明, 丁克强. 苯并[a]芘污染土壤的丛枝菌根真菌强化植物修复作用研究[J]. *土壤学报*, 2004, 41(3): 336–341
- [76] Dashti N, Khanafer M, El-Nemr I, Sorkhoh N, Ali N, Radwan S. The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils[J]. *Chemosphere*, 2009, 74: 1 354–1 359
- [77] Al-Mailem DM, Sorkhoh NA, Marafie M, Al-Awadhi H, Eliyas M, Radwan SS. Oil phytoremediation potential of hypersaline coasts of the Arabian Gulf using rhizosphere technology[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 5 786–5 792
- [78] Agamuthua P, Abioyea OP, Aziz AA. Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 179: 891–894
- [79] Zhang ZN, Zhou QX, Peng SW, Cai Z. Remediation of petroleum contaminated soils by joint action of *Pharbitis nil* L. and its microbial community[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408: 5 600–5 605
- [80] Mohsenzadeh F, Nasser S, Mesdaghinia A, Nabizadeh R, Zafari D, Khodakaramian G, Chehregani A. Phytoremediation of petroleum-polluted soils: Application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73: 613–619
- [81] Lu SJ, Teng YG, Wang JS, Sun ZJ. Enhancement of pyrene removed from contaminated soils by *Bidens maximowicziana*[J]. *Chemosphere*, 2010, 81: 645–650
- [82] Mikkonen A, Kondo E, Lappi K, Wallenius K, Lindström K, Hartikainen H, Suominen L. Contaminant and plant-derived changes in soil chemical and microbiological indicators during fuel oil rhizoremediation with *Galega orientalis*[J]. *Geoderma*, 2011, 160: 336–346
- [83] Cheema SA, Khan MI, Tang XJ, Zhang CK, Shen CF, Malik Z, Ali S, Yang JJ, Shen KL, Chen XC, Chen YX. Enhancement of phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*) [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 166: 1 226–1 231
- [84] Cheema SA, Khan MI, Shen CF, Tang XJ, Farooq M, Chen L, Zhang CK, Chen YX. Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177: 384–389
- [85] Pérez RM, Cabrerab G, Gómez JM, Ábalos A, Cantero D. Combined strategy for the precipitation of heavy metals and biodegradation of petroleum in industrial wastewaters[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 182: 896–902
- [86] Sorkhoh NA, Ali N, Al-Awadhi H, Dashti N, Al-Mailem DM, Eliyas M, Radwan SS. Phytoremediation of mercury in pristine and crude oil contaminated soils: Contributions of rhizobacteria and their host plants to mercury removal[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*: 2010, 73: 1 998–2 003

Research Advances in Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-contaminated Soil by Plant-Microbial Combined Method

WANG Zhi-rong, MA Chuan-xin, LI Yan-ni, ZHU Xiao-yan, WANG Wei-li, WANG Jing-lan

(School of Environmental Sciences and Safety Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China)

Abstract: The importance and recent progresses on the plant-microbial remediation of petroleum contaminants and PAHs in the environment were reviewed. Large numbers of laboratory studies indicated that the joint effect of different groups of plant-microbe (such as bacteria, fungi and actinomycetes bacteria) in remediation of soil contaminants could be significant, and to some extent microbial flora perform better than a single strain. The rhizosphere formed by root of plant and microbe enhances the degradation rate of contaminants. Meanwhile, biological surfactant is superior to synthetic surfactant in ecological suitability and remediation of soil contaminated. Synchronous remediation of multicomponent pollutants is still in its initial stage, more studies needs to be done in order to understand the mechanism further. However, the technique looks promising. Some related open problems needs special care. In the process of degradation of petroleum contaminants using plant and microbial flora, it is necessary to confirm collaborative and competitive mechanism of microbial flora. The reproducibility of the experimental results needs justification. The results of the laboratory research need to be confirmed and supported by field experiments. It is necessary to find microbial flora or a single strain which can degrade contaminants at high efficiency under the extreme conditions (high salt content, lack of N and P, low temperature etc) according to different soil types and climatic characteristics. It will also be imperative to establish petroleum pollutant evaluation system for soil, the foundation of which is to identify limit of damage to environment by petroleum pollutant.

Key words: Plant-microbial, Crude oil, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Bio-surfactant, Rhizosphere effect, Combined method