石油污染土壤的生态风险评价和生物修复 *

Ⅱ石油污染土壤的理化性质和微生物生态变化研究

刘五星[1,2]　骆永明[1,2†]　滕　应[1,2]　李振高[1,2]　吴龙华[1,2]

(1 中国科学院南京土壤研究所土壤环境与污染修复重点实验室 ,南京　210008)

(2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所) ,南京　210008)

摘　要　采用常规土壤理化分析、微生物培养法以及碳素利用法(Biolog)和发光细菌生物毒性测定等新兴微生态研究方法 ,研究了石油污染引起的土壤理化性质和微生物功能多样性等微生态的变化。结果表明 ,石油污染使土壤有机质含量增加 ,pH 降低 ,而对全磷、全钾、速效钾、全氮和水解氮无显著影响。平板计数显示石油污染对土壤中的细菌总量没有显著影响 ,但由于石油污染物的刺激作用导致污染土壤中总烃降解菌数以及芳烃降解菌数增加了几个数量级。Biolog 的研究也表明 ,石油污染导致土壤微生物 Gini 指数、McIntosh 指数和 McIntosh 均匀度等多样性指数增加 ,说明石油污染刺激了土壤中微生物的生长 ,使土壤中微生物多样性增加。而生物毒性试验表明 ,石油污染土壤对发光细菌具有毒性 ,其 EC50 为 1 950 μg ml^{-1}。

关键词　石油;土壤污染;土壤理化性质;微生物生态

中图分类号　Q938. 1. 3　　**文献标识码**　A

石油是由数百种化合物组成的复合体。按烃组成一般可分为四类:饱和烃(包括正链烷烃、异构烷烃和环烷烃)、芳香烃(包括单环、双环和多环芳烃)、胶质(由嘧啶、喹啉、咔唑、噻吩、亚砜、氨基化合物组成的复合体)及沥青质(环烷酸、硫化物、多元酚、脂肪酸、金属卟啉的复合物)[1]。随着石油的生产和消费量的不断增加 ,在开采、炼制、贮运、使用过程中石油及各种石油产品进入环境而造成的污染问题日益严重。石油污染的土壤不仅影响植物的生长 ,还对人、畜健康造成威胁。目前对于石油污染土壤的修复主要有化学、物理以及生物修复三种。其中生物修复具有成本低、效果好以及对环境的二次污染小等优点 ,被认为是最有前景的修复手段[2]。生物修复主要是利用土壤中的微生物将有毒的有机物分解或降解成为低毒或无毒的物质的过程。在土壤生态系统中 ,土壤中大量的微生物作为分解者 ,是最活跃和具有决定性影响的组分之一 ,几乎参与了土壤中的一切生物化学反应 ,在减少或消除石油污染的毒性和降低土壤中的石油经食物链或其他途径对人和其他生物造成的危害方面起着关键作用。土壤受石油污染后 ,土壤的理化性质、微生物群落结构、物种多样性等将受到影响。因此 ,在进行微生物修复前 ,需要对土壤的理化性质及微生物生态开展研究。然而利用传统的培养技术在研究微生物生态方面面临很多问题 ,其中原因之一是土壤中的大多数微生物(90 %～99 %)是不可培养的[3,4]。近年来 ,基于非培养的生物标志物(biomarker)的测定方法(如磷脂脂肪酸等)已经应用于微生物多样性的研究[5,6] ,使用该方法无须分离培养就可反映包含那些传统方法不可培养的土壤微生物的群落结构信息。但是 ,由于是通过非培养的方法 ,因而无法获得有关微生物群落总体活性与代谢功能的信息。目前 ,以群落水平碳源利用类型为基础的 Biolog 氧化还原技术为研究土壤微生物群落功能多样性提供了一种简单、快速的方法[7]。1991 年 Garland 和 Mill 开始将这种方法应用于土壤微生物群落的研究[8]。本研究在分析石油污染土壤理化性质变化的基础上 ,采用常规平板法及 Biolog 等新兴技术 ,测试石油污染土壤的微生物生态变化 ,以揭示石油污染对土壤理化性质和微生物

* 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB4108 —9)、国家科技攻关计划课题(2003BA808A18 - 1 - 2)资助

† 通讯作者 ,E-mail :ymluo @issas. ac. cn

作者简介:刘五星(1975～) ,男 ,湖北监利人 ,博士 ,主要从事环境微生物与生物修复方面的研究。E-mail :liuwuxin @issas. ac. cn

收稿日期:2006 - 06 - 02;收到修改稿日期:2007 - 05 - 22

群落结构及功能多样性的影响,并为石油污染土壤的生物修复奠定基础。

1 材料与方法

1.1 土样采集

供试土样采自南京近郊某炼油厂附近的耕层土壤(0～20 cm),土壤类型为潮土。将土壤中油含量小于临界值 500 mg kg^{-1}[8]的土样看作清洁土壤,油含量高于此值视作污染土壤。采集方法为多点取土后混匀,两种土壤各采 3 个样,经室温下阴凉处风干,过 2 mm筛。其基本理化性质采用常规方法分析[9]。

1.2 土壤中油含量的测定

采用重量法[1]测定。即将 10 g 风干过筛的土壤与等体积的无水 Na_2SO_4混匀,用称重的 K-D 瓶装入适量二氯甲烷(DCM)经索氏提取 24 h。然后将抽提液在减压旋转蒸发仪上减压蒸干,重新称量 K-D 瓶并计算出油含量。

1.3 土壤微生物数量测定

1.3.1 土壤中细菌、真菌及放线菌的数量测定

采用稀释平板法[10]。

1.3.2 土壤中总烃降解菌和芳烃降解菌数量的测定

参照最大或然数(Most probable number,MPN)法[11]。

1.4 土壤微生物活性和功能多样性分析

1.4.1 土壤微生物提取和酶联免疫吸附(Enzyme-linked immunosorbnent assay,ELISA)测定

采用革兰氏阴性(G^-)Biolog 板,具体方法参照文献[12]。

1.4.2 Biolog 数据处理方法

采用 95 个孔吸光度的平均值(Average well color development,AWCD)来表示微生物的平均活性。计算公式为:$AWCD = [\sum(C_i - R)]/95$,其中,$C_i$ 为除对照孔外各孔吸光度值,R 为对照孔吸光度值。用计算微生物群落功能多样性公式[13]来分析土壤微生物功能多样性(见表 1)。

表 1 基于 Biolog 分析的多样性指数

Table 1 Diversity indices based on Biolog

多样性指数 Indices of diversity	用途 Purpose	公式 Formula	备注 Note
Shannon 指数 Shannon indices	评估丰富度	$H' = -\sum P_i \cdot \ln(P_i)$	P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率 S 为发生颜色变化的孔的数目
Shannon 均匀度 Shannon evenness	通过 Shannon 指数算出的均度	$J_H = \frac{H'}{\ln S}$	S 为发生颜色变化的孔的数目
Gini 指数 Gini indices	用于评估某些最常见种的优势度的指数	$D = 1 - \sum(P_i)^2$	P_i 同上
McIntosh 指数 McIntosh indices	基于群落物种多维空间距离的多样性指数	$U = \sqrt{(\sum n_i^2)}$	n_i 为第 i 孔的相对吸光值
McIntosh 均匀度 McIntosh evenness	由 McIntosh 指数计算得出的均匀度	$J_U = \frac{N - U}{N - N/\sqrt{S}}$	N 为相对吸光值总和,S 为发生颜色变化的孔的数目

1.5 土壤生物毒性分析

1.5.1 土壤水浸提液

参照丁克强等[14]略有改动。具体方法为:按水土比 1∶1 加入无菌蒸馏水,在 25 ℃下,在振荡机上往复振荡(120 r min^{-1})1 h 后,离心 30 min(4 000 r min^{-1}),过滤备用。

1.5.2 土壤二氯甲烷(DCM)浸提液

称 5.0 g 过 2 mm 筛的风干土壤样品,用 DCM 索氏提取 16 h,减压旋转浓缩至 5 ml,加入 5 ml 二甲基亚砜(DMSO),然后将该混合物继续浓缩至 5 ml 备用。

1.5.3 生物毒性测定与计算

采用明亮发光细菌(*Photobacterium phosphoreum*)法测定,具体方法参照 Jacob 等[15]。毒性计算:将样品的发光输出(mV)除以对照样的发光输出为相对发光强度 T3(以 %表示),然后求出样品浓度与相对发光强度之间的方程,用样品的 EC50 表征样品的毒性。

2 结果与分析

2.1 土壤中油含量与基本理化性质

由表 2 可知,污染土壤中的油含量显著高于清洁土壤,也明显高于临界值 500 mg kg^{-1}。石油污染对土壤理化性质的影响表现在,污染使土壤有机质显著增加、pH 显著降低,而对其他理化性质没有显著影响。石油是一种含碳的有机化合物,因此石油污染后土壤中的有机质含量明显增加。有机质是土壤有机碳总和的反映,一般而言其含量是土壤潜在肥力的表现,但这种由于石油污染而引起的有机质提高,并不能完全释放出有效养以供植物吸收利用。因此,对于石油

污染的土壤不应该用有机碳指标来判断土壤肥力。关于石油污染对土壤 pH 的影响,Leahy 等[16]认为土壤微生物在降解石油烃时会产生羧酸类中间产物,可能会使pH 在一段时间内降低。由于大多数土著微生物的最适 pH 在中性附近,而本试验清洁土壤 pH 为 8.1,污染后 pH 有所降低而更接近中性,可能更有利于土壤中微生物对石油的降解。尽管有研究[17]认为石油污染会导致土壤中氮素不足,为固氮微生物提供选择优势,从而导致在石油污染地区土壤中有效氮的浓度增加。但本文所研究的土壤,在受到石油污染后其中的全氮和水解氮均没有显著变化。刘五星(1) 曾对不同油田 46 个土壤中的全氮和水解氮进行分析,也发现土壤中的氮含量与油含量之间没有对应关系。另外,从表 2 还可以看出,石油污染对土壤的全磷、全钾和速效钾含量没有显著影响,这可能与石油的化学组成有关,因为组成石油的化学元素主要为碳(83 %～87 %)、氢(11 %～14 %)、硫(0.06 %～0.8 %)、氧(0.08 %～1.82 %)等(1) 。有研究表明,土壤中生物可利用的C∶N∶P在 120∶10∶1 时有利于土壤中微生物对石油污染物的降解,石油烃污染导致土壤中的碳含量大幅度增加,因此会使氮、磷含量严重不足[20]。尽管如此,Trindade 等[19]的研究表明,在不同处理的石油污染土壤中烃降解菌占整个细菌的比例为 72.03 %～99.67 %,而本文的研究也表明土壤受到石油污染后石油烃降解菌是土壤中的绝对优势菌。由此可见,石油污染土壤后导致的氮、磷缺乏,为固氮微生物提供选择优势,从而导致土壤中有效氮的浓度增加是不可能发生的。因此在进行石油污染土壤修复时需要添加相应的氮、磷营养元素来增强土壤中微生物的活性,从而加快石油的分解。

表 2 土壤中的油含量与主要理化性质1)

Table 2 Oil contents and physico-chemical properties of the soils

土样 Type of soils	油含量 Oil content (mg kg^{-1})	pH (H_2O)	有机质 O.M. (g kg^{-1})	全氮 Total N (g kg^{-1})	水解氮 Hydrolysable N (mg kg^{-1})	全磷 Total P (g kg^{-1})	全钾 Total K (mg kg^{-1})	速效钾 Available K (mg kg^{-1})
污染土壤 Contaminated soil	12 170 ±630 Aa	7.4 ±0.2 Aa	48.4 ±8.1 Aa	2.86 ±1.55 Aa	97.13 ±15.90 Aa	0.81 ±0.05 Aa	21.23 ±0.91 Aa	131.0 ±8.2 Aa
清洁土壤 Clean soil	280 ±120 Bb	8.1 ±0.2 Bb	25.4 ±7.2 Bb	0.86 ±0.22 Aa	69.60 ±21.51 Aa	0.79 ±0.04 Aa	19.58 ±1.84 Aa	166.3 ±93.9 Aa

1) 表中同一列数据后的小写字母为 5 %显著差异水平,大写字母为 1 %显著差异水平 The lower case letters stand for 5 % significant level of difference and the capital letters for 1 % significant level of difference

2.2 土壤中细菌、真菌、放线菌、总烃降解菌和芳香烃降解菌的数量

表 3 显示,两种土壤中的细菌、放线菌数量不存在显著差异。但石油污染土壤中真菌、总烃降解菌和芳香烃降解菌的含量较清洁土壤中高,其中污染土壤中总烃降解菌和芳香烃降解菌较清洁土壤中的菌高出两到三个数量级,经统计差异显著。可能原因是污染土壤中的石油丰富了土壤中的碳源,从而刺激微生物生长,特别是烃降解菌的大量繁殖。Forsyth 等[20]研究表明,当土壤中内源性烃降解菌高于 10^6 cfu g^{-1}时,土壤中石油类污染物自身降解速度会较快。由表 3 可知,该土壤受到石油污染后,在石油烃类物质的选择作用下总烃降解菌高达 18.1 × 10^6cfu g^{-1},而芳烃降解菌数也有6.98 ×10^6 cfu g^{-1},说明在今后的修复中可以不用考虑在其中添加烃降解菌。

表 3 土壤中细菌、真菌、放线菌、总烃降解菌和芳香烃降解菌数量1)

Table 3 Biomass of bacteria, fungi, actinomycetes, hydrocarbon-degrader and PAHs-degrader

土样 Type of soils	细菌 Bacteria (×10^5 cfu g^{-1})	放线菌 Actinomecetes (×10^4 cfu g^{-1})	真菌 Fungi (×10^3 cfu g^{-1})	总烃降解菌数 Hydrocarbon-degraders (×10^5 cfu g^{-1})	芳烃降解菌数 PAH-degraders (×10^4 cfu g^{-1})
污染土壤 Contaminated soil	180 ±43 Aa	79 ±86 Aa	570 ±238 Aa	181 ±91 Aa	698 ±31 Aa
清洁土壤 Clean soil	138 ±83 Aa	384 ±214 Aa	23.20 ±4.35 Ab	2.19 ±1.53 Ab	0.342 ±0.462 Bb

1) 表中同一列数据后的小写字母为 5 %显著差异水平,大写字母为 1 %显著差异水平 The lower case letters stand for 5 % significant level of difference and the capital letters for 1 % significant level of difference

(1) 刘五星. 石油污染土壤的微生物生态特征和生物修复研究. 中国科学院博士学位论文,2006

2.3 微生物群落结构分析

2.3.1 平均吸光值(AWCD)的变化 在评价微生物群落结构中,Biolog 体系的检测原理是根据微生物利用碳源引起指示剂的颜色变化来检测和判断不同土壤的微生物群落结构。这种方法简单快速,并能得到大量原始数据,目前已被国际上广泛用于评价不同作物、草地、森林等土壤中的微生物生态特征[21]。供试的两种土壤的平均吸光值(AWCD)随时间的变化趋势如图 1 所示。可见,污染土壤与清洁土壤的平均吸光值(AWCD)均随着培养时间的延长而升高。然而,污染土壤的 AWCD 始终显著高于清洁土壤,直至 100～120 h 时 AWCD 达到稳定。而 AWCD 是反映微生物群落整体活性的有效指数之一[22]。这说明石油污染丰富了土壤中的碳源,从而刺激了土壤中微生物的生长。

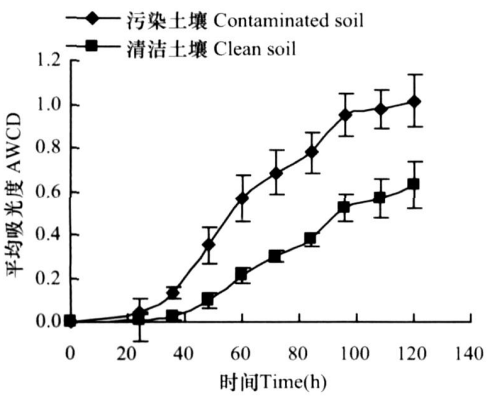

图 1 土壤微生物群落温育过程中 AWCD 变化

Fig. 1 AWCD changes during incubation of soil microbial community

2.3.2 土壤微生物群落功能多样性分析 由表 4 可以看出,污染土壤中的各项微生物多样性指数均高于清洁土壤,其中污染土壤中的 Gini 指数、McIntosh 指数和 McIntosh 均匀度显著高于清洁土壤,差异显著($p < 0.05$)。这与通常认为污染导致土壤中微生物多样性降低相反。Leahy 和 MacNaughton[15,23]的研究也曾发现同样的结果。这可能与供试土壤来自长江外滩,质地偏砂,土壤肥力总体较低有关。而受石油污染后,由于土壤中碳源的量和种类增加导致细菌活力增强,最终使土壤中微生物多样性增加。

2.4 生物毒性

试验表明,两种土壤的水浸提液均对发光细菌的发光没有抑制作用,说明试验所用的土壤中不存在水溶性有毒物质。由于试验所用的土壤中主要污染物为不溶于水的石油类物质,因此利用通常用来提取有机物的溶剂二氯甲烷(DCM)进行抽提。又由于 DCM 对发光细菌具有强毒性,因此在用 DCM 提取后,再在提取物中加入对发光细菌低毒的二甲基亚砜(DMSO),然后通过旋转蒸发去除 DCM,以获得 DCM 提取物的 DMSO 溶液。以 DMSO 为对照,以不同浓度的 DMSO 溶液进行毒性试验。试验表明,清洁土壤的 DCM/DMSO 提取物对发光细菌发光强度没有影响。结合水浸提液毒性试验,说明该土样的水浸液和有机溶剂提取液均对发光细菌没有毒性。而污染土壤的 DCM/DMSO 提取液对发光细菌的发光产生明显抑制作用,具体数据见表 5。用 5 %～0.1 %的污染土壤 DCM/DMSO 提取液浓度的对数值与 T3(相对发光强度)之间求得相关方程:$T3 = 16.65 - 25.35\lg C$。式中,C 为土壤提取液的浓度,T3 为相对发光强度,经计算,决定系数 $R^2 = 0.928$,这表明发光细菌相对发光强度和土壤中 DCM/DMSO 提取物浓度具有良好的相关性。由表 5 可见,随着土壤提取液浓度的缩小,相对发光强度显著升高。根据以上方程可以算出,当相对发光强度为 50 %时加入的土壤提取液浓度为 0.195 %。故该土壤的 EC50 为 1 950 μg ml^{-1}。根据谢思琴等[24]的研究,$HgCl_2$的 EC50 值为 0.126 μg ml^{-1}。这说明本试验所用的石油污染土壤 1 950 μg ml^{-1}的毒性值与 0.126 μg ml^{-1}的$HgCl_2$毒性相当。

表 4 土壤微生物功能多样性指数1)

Table 4 Functional diversity indices of soil microbial community

土样 Type of soils	Shannon 指数 Shannon index	Shannon 均匀度 Shannon evenness	Gini 指数 Gini index	McIntosh 指数 McIntosh index	McIntosh 均匀度 McIntosh evenness
污染土壤 Contaminated soil	4.514 ±0.141 Aa	1.001 ±0.036 Aa	0.984 ±0.001Aa	8.238 ±0.955Aa	0.976 ±0.005 Aa
清洁土壤 Clean soil	4.083 ±0.193 Aa	0.901 ±0.458 Aa	0.972 ±0.005Ab	4.760 ±0.479Bb	0.928 ±0.015 Ab

1) 表中同一列数据后的小写字母为 5 %显著差异水平,大写字母为 1 %显著差异水平 The lower case letters stand for 5 % significant level of difference and the capital letters for 1 % significant level of difference

表 5 石油污染土壤的生物毒性

Table 5 Biotoxicity of the petroleum-contaminated soil

提取液浓度 Concentration of extract (%)	T3 (%)
2.50	0.13
1.00	15.94
0.50	27.54
0.25	41.77
0.10	85.73

3 讨 论

本文通过从南京近郊某炼油厂附近采集受到石油污染的土壤以及邻近的清洁土壤(对照),研究了石油污染对土壤理化性质和微生物生态的影响。从现场来看,石油污染场地上寸草不生,而邻近的清洁土壤上长有许多植被,说明石油污染对局部的生态环境产生了严重影响。另外,通过发光细菌生物毒性试验表明,石油污染土壤的 DCM/DMSO 提取液对发光细菌也具有一定毒性。对两种土壤的理化性质分析表明,石油污染使土壤有机质显著增加、pH 显著降低。而对全氮、水解氮、全磷、全钾以及速效钾含量无显著影响。由于石油污染导致土壤中的碳含量大量增加,而前人研究表明土壤中生物可利用的 C∶N∶P 在 120∶10∶1 时有利于土壤中微生物对石油污染物的降解。故对于该石油污染土壤自身修复来说,土壤中 N、P 严重缺乏。因此,在对该石油污染土壤进行修复时,需要补充适量 N、P 营养元素来满足土壤中微生物的生长繁殖需求,从而加快石油的分解。对于土壤 pH 来说,该处的清洁土壤为偏碱性,受到污染后由于代谢中间产物的影响使土壤 pH 降低而近中性,更有利于土壤中土著微生物对石油的降解。

通过对两种土壤中多种微生物数量研究,表明在污染土壤和清洁土壤中细菌、放线菌数量无显著差异,但石油污染使土壤中真菌、总烃降解菌和芳香烃降解菌显著增加。其中污染土壤中总烃降解菌和芳香烃降解菌数量较清洁土壤中的菌量高出两到三个数量级,总烃降解菌含量高达 18.1×10^{6} cfu g^{-1}。因此,今后在对该处土壤进行生物修复时无需添加外源的烃降解菌。同时,利用碳素利用法对两种土壤的生物多样性进行了研究,结果表明污染土壤的 AWCD 始终显著高于清洁土壤,并且各项微生物多样性指数如 Gini 指数、McIntosh 指数和 McIntosh 均匀度显著高于清洁土壤。这组数据也进一步证明了受到石油污染后该土壤中微生物具有较强的活性,可能在不投加石油降解菌的情况下就具有较强的自身修复能力。

参 考 文 献

[1] Sugiura K, Ishihara M, Harayama S T. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. Environ. Sci. Technol., 1997, 31: 45～51

[2] Ding K Q, Luo Y M, Sun T H, *et al*. Bioremediation of soil contaminated with petroleum using forced-aeration composting. Pedosphere, 2002, 12(2): 145～150

[3] Rollins D M, Colwell R R. Viable but nonculturable stage of Campylobacter jejuni and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52: 531～538

[4] Rozsak D B, Colwell R R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev., 1987, 51: 365～379

[5] 白清云. 土壤微生物群落结构的化学估价方法. 农业环境保护, 1997, 16(6): 252～256, 265. Bai Q Y. Chemical evaluation of the microbial community of soil (In Chinese). Agro-Environmental Protection, 1997, 16(6): 252～256, 265

[6] Yao H Y, He Z L, Huang C Y. Phospholipid fatty acid profiles of Chinese red soils with varying fertility levels and land use histories. Pedosphere, 2001, 11(2): 97～103

[7] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 等. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用. 土壤学报, 2004, 41(3): 456～461. Zheng H, Ouyang Z Y, Fang Z G, *et al*. Application of biolog to study on soil microbial community functional diversity (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(3): 456～461

[8] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57(8): 2 351～2 359

[9] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. Lu R K. Analytical Methods of Soil and Agro-chemistry (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999

[10] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学试验(第三版). 北京: 高等教育出版社, 1999. 92. Shen P, Fan X R, Li G W. Experiment of Microbiology (In Chinese). Beijing: Higher Education Press, 1999. 92

[11] Wrenn B A, Venosa A D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. Can. J. Microbiol., 1996, 42 (3): 252～258

[12] 杨永华, 姚健. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响. 微生物学杂志, 2000, 20(2): 23～25. Yang Y H, Yao J. Effect of pesticide pollution against functional microbial diversity in soil (In Chinese). Journal of Microbiology, 2000, 20(2): 23～25

[13] Magurran A E. Ecological Diversity and Its Measurement. Princeton, N J: Princeton University Press, 1988. 179

[14] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 等. 土壤提取液中汽油的毒性研究. 土壤, 2003, 35(1): 41～44. Ding K Q, Luo Y M, Liu S L, *et al*.

Toxicity of gasoline in soil extracting solution (In Chinese). Soils, 2003, 35(1): 41～44

[15] Jacob G B, Graeme I P, Colin D C, *et al*. Combined microbial community level and single species biosensor responses to monitor recovery of oil polluted soil. Soil Biology & Biochemistry, 2004 (36): 1 149～1 159

[16] Leahy J G, Colwell R R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol Rev., 1990, 54(3): 305～315

[17] 金文标,李秀珍. 油污土壤微生物生态研究. 油气田环境保护, 1998, 8(3): 2～4. Jin W B, Li X Z. Ecological research on microorganism in crude oil polluted soil (In Chinese). Oil and Gas Field Environmental Protection, 1998, 8(3): 2～4

[18] Graham D W, Smith V H, Law K P. Effects of Nitrogen and Phosphorous Supply on Hexadecane Biodegradation in Soil Systems. Washington: Kluwer Academic Publishers, 1999. 1～18

[19] Trindade P V O, Sobral L G, Rizzo A C L, *et al*. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: A comparison study. Chemosphere, 2005, 58: 515～522

[20] Forsyth J V, Tsao Y M, Bleam R D. Bioremediation: When is augmentation needed? *In*: Hinchee R E, Fredrickson J, Alle-man B C. eds. Bioaugmentation for Site Remediation. Columbus: Battelle Press, 1995. 1～14

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

[22] 姚槐应,何振立,黄昌勇. 不同土地利用方式对红壤微生物多样性的影响. 水土保持学报, 2003, 17(2): 51～54. Yao H Y, He Z L, Huang C Y. Effect of land use history on microbial diversity in red soil (In Chinese). Journal of Soil and Water Conservation, 2003, 17(2): 51～54

[23] MacNaughton S J, Stephen J R, Venosa G A, *et al*. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65: 3 566～3 574

[24] 谢思琴,顾宗濂,周德智. 工业固体废弃物的急性生物毒性研究. 应用生态学报, 1994, 5(1): 103～105. Xie S Q, Gu Z L, Zhou D Z. Acute biotoxicity of industrial solid wastes (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 1994, 5(1): 103～105

ECO-RISK ASSESSMENT AND BIOREMEDIATION OF PETROLEUM CONTAMINATED SOIL Ⅱ. CHANGES IN PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND MICROBIAL ECOLOGY OF PETROLEUM CONTAMINATED SOIL

Liu Wuxing[1,2] Luo Yongming[1,2†] Teng Ying[1,2] Li Zhengao[1,2] Wu Longhua[1,2]

(1 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Sciences, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Routine analyses and new biotechnologies, such as sole carbon source utilization tests (Biolog), were applied to investigate changes in physico-chemical properties and microbial ecology of petroleum contaminated soil. Results show that petroleum contamination did not affect much soil hydrolysable N, total N, total P, available K and total K. But the observed increases in soil organic matter and decreases in soil pH, might have led to changes in microbial ecology of the soil. Although there was no significant difference found between the clean and the contaminated soils in numbers of cultivable heterotrophic bacteria and actinomycetes, hydrocarbon-degraders and PAHs-degraders in the contaminated soil were about 100 to 1 000 times higher in number than in the clean soil. Community level physiological profile using Biolog sole carbon source utilization tests was used to investigate effect of petroleum on soil microbial diversity. Diversity indices, such as Gini index, McIntosh index, and McIntosh evenness, increased in the contaminated soil. The above results indicate that petroleum contamination increased microbial diversity of the soil. Besides, the acute bio-toxicity test by the luminous bacteria method showed that the DCM/DMSO extract from the petroleum contaminated soil is toxic to the bacteria and only 1 950 $\mu g\ ml^{-1}$ in EC50.

Key words Petroleum; Soil contamination; Soil physico-chemical properties; Microbial ecology