

芘污染盐碱土壤微生物-电动修复效率影响因素

范瑞娟^{1,2*}, 马艳¹, 张琇^{1,2}, 刘雅琴^{1,2} (1.北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021; 2.宁夏特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘要: 以芘污染盐碱土壤为供试土壤,采用高通量测序技术对微生物-电动联合修复(BIO-EK)芘的过程中微生物群落结构进行了监测,结合芘浓度和微环境变化特征,分析了 BIO-EK 修复过程中微生物群落结构与污染物浓度和土壤微环境变化之间的相关性。结果表明,91d 后 BIO-EK 中芘浓度由 288.03mg/kg 降至 73.40mg/kg,而微生物修复(BIO)和电动修复(EK)使芘浓度分别降至 114.23,150.27mg/kg。芘的降解速率在前期较大,随着处理时间的延长则逐渐降低。同时,电场的施加使一些土壤环境因子(温度、湿度和 pH 值)和微生物群落结构发生了明显变化。典型对应分析(CCA)表明,对微生物群落结构影响最大的因素为土壤 pH 值,其次为芘浓度和土壤温度,而微生物群落结构变化又是导致芘不能持续高效降解的重要原因。因而,通过调节土壤微环境、构建高效降解菌群等方式对 BIO-EK 修复过程进行调控,有望达到持续高效降解污染物的目的。

关键词: 电动修复; 生物修复; 多环芳烃; 高通量测序技术; 典型对应分析

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2021)02-0801-12

Factors affecting bio-electrokinetic remediation efficiency of pyrene contaminated saline-alkali soil. FAN Rui-juan^{1,2*}, MA Yan¹, ZHANG Xiu^{1,2}, LIU Ya-qin^{1,2} (1. College of Biological Science & Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021, China; 2. Ningxia Key Laboratory for the Development and Application of Microbial Resources in Extreme Environments, Yinchuan 750021, China). *China Environmental Science*, 2021,41(2): 801~812

Abstract: Using pyrene-contaminated saline-alkali soil as the test soil, the microbial community structure in the process of bio-electrokinetic remediation (BIO-EK) of pyrene was monitored by high-throughput sequencing technology, combined with the variation characteristics of pyrene concentration and microenvironment, the correlation among microbial community structure, pollutant concentration and soil microenvironment during BIO-EK remediation was analyzed. The results showed that the pyrene concentration in BIO-EK decreased from 288.03 mg/kg to 73.40 mg/kg after 91 days, while the bioremediation (BIO) and electrokinetics (EK) reduced the concentration of pyrene to 114.23 and 150.27 mg/kg, respectively. The degradation rate of pyrene was higher in the early stage, but gradually decreased with the extension of the treatment time. Meanwhile, the application of electric field caused obvious changes in some soil environmental factors (temperature, moisture content and pH) and microbial community structure, and the change of microbial community structure was the main reason that pyrene could not be degraded continuously and efficiently. Therefore, BIO-EK remediation process could be controlled by regulating soil microenvironment and constructing high-efficiency degrading bacteria, which is expected to achieve the aim of continuous and efficient degradation of pollutants.

Key words: electrokinetics; bioremediation; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); high-throughput sequencing; canonical correspondence analysis (CCA)

随着石油化工行业的发展,大量有毒有机污染物如多环芳烃(PAHs)通过各种途径进入土壤,对土壤环境造成严重污染^[1]。工业废水往往含盐量很高,因而石油烃类有机污染土壤常伴有盐碱化^[2]。开展 PAHs 污染盐碱土壤的修复工作,对农业生产和人类健康发展极其重要。

微生物修复(Bioremediation, BIO)在 PAHs 的去除中起着重要作用^[3-4]。然而,PAHs 水溶性低、生物可利用性差,尤其对于高环 PAHs(>4 个环),高盐环境更增加了其疏水性,延长了其半衰期^[5]。采用微生物-电动联合技术(Bio-electrokinetics, BIO-EK)可通过微

生物氧化代谢作用与电动力学效应或电化学氧化作用之间的耦合效应增强 PAHs 的去除效率^[6]。前期研究发现,在 BIO-EK 联合修复石油烃类污染土壤的过程中,随着修复的进行,污染物去除效率逐渐降低,而微生物群落结构的变化可能是导致污染物降解难度逐渐增加的重要原因^[7]。然而,BIO-EK 修复过程中微生物群落变化的关键影响因素及其与污

收稿日期: 2020-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21966001); 宁夏特色微生物资源开发与利用科技创新团队建设项目(2020TSW02)

* 责任作者, 讲师, fanruijuan@163.com

染物降解效率之间的关系有待于进一步探究。

微生物群落的变化受土壤环境因素影响,而电场的施加可能引起土壤理化性质发生变化。一方面,水的电解作用会导致土壤水分含量减少或分布发生变化,不利于微生物的呼吸、代谢;另一方面,电场的施加引起电极附近 pH 值极端化,从而导致微生物数量、丰度减少以及微生物呼吸作用下降^[8]。随着电流的持续产生,电极两端离子的聚集可能使土壤内渗透势增加,造成微生物细胞失水,使微生物数量下降,代谢能力减弱^[9]。不同的电场强度所引起的土壤理化性质变化幅度不同,因而所造成的微生物群落变化及其代谢水平变化幅度也不同。如 Alshawabkeh 等^[10]研究发现,较高场强下,土壤离子、水分、pH 值等土壤理化性质变化幅度较大,且较高的电流密度将增加土壤内电势降,影响微生物细胞膜电位,对微生物细胞内外酶系统及其代谢水平产生抑制作用,当电势降大于 1.5V/cm 时,土壤悬液中部分微生物将出现“休克”现象;刘广容等^[11]研究表明,弱电场(1V/cm)可激活底泥中脱氢酶活性,而强电场(3V/cm)则会降低细菌的活性。不同的电场强度也会引起不同的电流热效应,因而对微生物生长、活性及其代谢水平产生不同影响。如,Li 等^[12]研究发现,适当的电场强度(2V/cm)所产生的电流热效应有利于微生物的生长代谢,而较高的电场强度(3V/cm)使得土壤温度过高,将对微生物活性和代谢产生负面影响。另外,也有研究表明,随着土壤中营养物质的消耗和污染物浓度的变化,微生物群落也将随之发生变化,进而导致微生物代谢状态的改变^[13]。由此可见,土壤环境因素的改变可能导致微生物群落发生变化,从而改变其对污染物的降解能力。因此,深入研究土壤环境因素、污染物浓度与微生物群落之间的相关性,有望揭示 BIO-EK 修复中后期制约污染物高效降解的关键因素。

本研究以盐碱土壤中投加芘的方式,研究微生物-电动修复效率及影响因素。具体是通过监测 BIO-EK 修复过程中芘浓度、电流和土壤 pH 值、水分含量、温度等环境因子以及微生物群落变化特征,并分析它们之间的相关性,以期找到影响微生物群落变化的关键因素,并明确其与污染物降解效率之间的关系,从而为有机污染物 BIO-EK 修复过程调控提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验土壤 试验土壤采自北方民族大学实习基地附近(N 38°29'46",E 106°6'847")0~30cm 土层,除去石子颗粒等杂质,自然风干后过筛(<2mm),121℃灭菌 30min 以除去土著微生物。初始土壤部分理化性质见表 1。

表 1 土壤理化性质初始值

Table 1 Initial characteristics of the test soil

土壤理化性质	参数值
pH 值	8.5
盐度(%)	0.17
阳离子交换量(CEC, cmol/kg)	10.87
总有机碳(OC, g/kg)	3.48
总氮(TN, mg/kg)	350
速效氮(mg/kg)	19.49
速效磷(mg/kg)	4.26
电导率(EC, μS/cm)	1008
土壤粒径分布(μm, %)	
<2	13.9
2~20	29.7
20~2000	56.4

1.1.2 污染物 芘(纯度>98%,上海笛柏生物科技有限公司)。用二氯甲烷将芘溶解,以 300mg/kg 的比例加入土壤中,充分混匀,室温下避光平衡 14d,测得芘的实际初始浓度为 288mg/kg。

1.1.3 降解菌 以前期从石油污染土壤中分离出的 4 株可降解高环多环芳烃的耐盐碱菌 SYP-1、SYP-2、SYP-5 和 SYP-11 为供试细菌,其中 SYP-1 为代尔夫特菌属(*Delftia* sp.),SYP-2 和 SYP-11 为海杆菌属(*Marinobacter* sp.),SYP-5 为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)^[14]。用牛肉膏蛋白胨固体培养基活化后,接种于牛肉蛋白胨液体培养基中,30℃、140r/min 培养 3d,8000r/min 离心 5min,弃去上清液,用无机盐培养液重悬,再次离心、重悬,获得 OD_{600nm} 值约 0.25 的菌悬液。上述所用培养基的盐度均为 5%,pH 值均为 8.6,配制方法参照前期试验^[14]。

1.2 试验装置及设计

试验装置如图 1 所示。该装置包括 PVC 土壤室(20cm×10cm×8cm)、可调直流电源、继电器、电流表和土壤温度计各一个,以及不锈钢电极(20cm×1cm)两对。土壤室配有聚氯乙烯盖以防止水分蒸发,

继电器可以设定的时间间隔交替变换电极极性,电

极阴阳间距为 16cm, 极性相同两电极间距为 8cm.

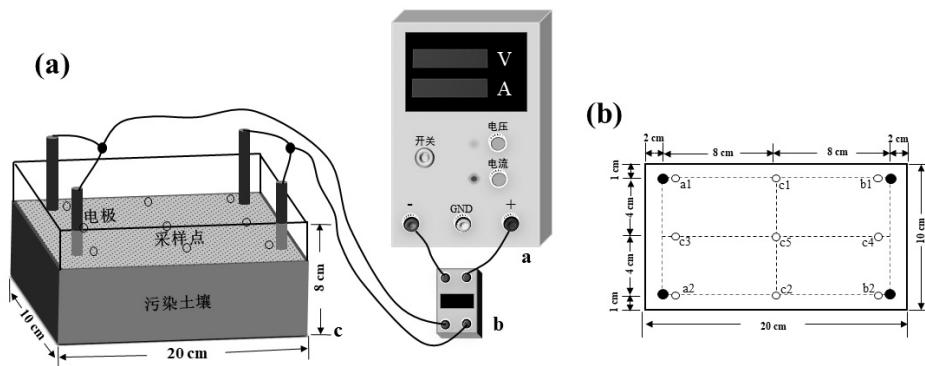


图 1 试验装置 (a) 及采样点 (b)

Fig.1 Schematic of the experimental set-up (a) and sampling positions (b)

a 电源; b 继电器; c 土壤室; ●电极; ○取样位置; a1、a2、b1 和 b2, 电极处; c1 和 c2, 极性相反的两电极中间; c3 和 c4, 极性相同的两电极中间; c5, 对角线中心

试验共设置三组处理:微生物-电动联合修复(bio-electrokinetics, BIO-EK)、电动修复(electrokinetics, EK)、微生物修复(bioremediation, BIO).此外,设置了对照组(CK).其中, BIO-EK 和 BIO 污染土壤中添加嗜盐碱降解菌的悬浮液,使土壤中的微生物数量达到 $10^7\sim10^8$ CFU/g, 土壤盐分和 pH 值分别为 1% 和 8.0, 土壤湿度为最大持水量的 67.5%; EK 和 CK 中添加相同量的无机盐培养液,使其盐度、pH 值和水分含量与 BIO-EK 和 BIO 中相同. BIO-EK 和 EK 在图 1a 所示的装置中进行,施加的直流电场为 1.0V/cm, 电极极性每 30min 切换一次; BIO 和 CK 在与 EK 和 BIO-EK 相同的土壤室中进行,但不施加电场. 将 1.5kg 处理好的土壤分层放入土壤室,每一层都被夯实以缩小间隙,试验共持续 91d, 定期向土壤中加入去离子水以保持土壤水分.

1.3 试验方法

1.3.1 电流及土壤理化性质的测定 BIO-EK 中的电流值直接从电流表读取, 每 5min 记录 1 次, 每天共记录 6 次. 土壤理化性质的测定参照《土壤农业化学分析方法》^[15]: 土壤电导率由电导率仪测定, 土壤水分比为 1:5 (W/V); 土壤温度用土壤温度计测量, 每天测量一次; 土壤 pH 值由 pH 计测定, 土壤水分比为 1:2.5 (W/V); 土壤含水量用烘干法测定; 土壤水溶性盐总量采用残渣烘干法测定; 阳离子交换量采用乙酸铵法测定; 土壤总有机碳含量采用重铬酸钾容量法测定; 土壤总氮含量采用凯氏法消解, 凯氏定氮仪测定; 土壤速效氮采用碱解扩散法测定; 土壤速效磷

含量采用钼锑抗比色法测定; 土壤粒径分布采用比重计法测定.

1.3.2 土壤中芘含量的测定 BIO-EK、EK、BIO 及 CK 试验过程中, 每 7d 从图 1b 所示的 9 个位点取样, 自然晾干后, 研磨过筛(40 目), 将不同位点土样充分混匀后提取芘, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定芘含量, 采用外标法进行定量, 从而得到芘含量随时间的变化值. 试验最后一天(91d), 除测定混匀后土样中的芘含量外, 还测定 9 个不同位点的芘含量, 从而得到芘含量随空间的变化值. 芘的提取方法及 HPLC 操作条件如下:

芘的提取: 将风干后的土样充分研磨过 40 目筛, 称取 1g 于 50mL 的离心管内, 加入丙酮和二氯甲烷混合溶剂(1:1)共 30mL, 盖好瓶盖振荡摇匀后超声萃取 30min(水温<35℃), 低温离心 2min(8000r/min), 上清液收集至锥形瓶中, 再用 30mL 丙酮和二氯甲烷混合溶剂(1:1)以相同的方法对沉淀物提取两次, 合并提取液. 将提取液通风浓缩至干, 用色谱纯乙腈溶解并定容至 1mL, 用 0.22μm 有机滤膜过滤到棕色液相小瓶中待测. HPLC 操作条件: 流动相为乙腈和水, 梯度比为: 乙腈/水 90:10, 0min; 乙腈(100%)1min; 乙腈/水 90:10, 9min; 柱温为 25.0℃; 流速为 1.0mL/min; 进样体积为 10.0μL.

$$\text{芘的降解率} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C_0 为 0d 时芘的实际测定浓度; C_t 为不同处理时间芘的浓度.

1.3.3 微生物群落分析 对 0,7,21,63 和 91d BIO 和 BIO-EK 处理组共 10 个土壤样品以及 91d BIO-EK 处理组不同取样点的 4 个土壤样品进行微生物群落分析.其中, BIO-EK 组不同取样点的 4 个样品是将 9 个位点(图 1b)样品合并后所得,具体为:将 a1、a2、b1 和 b2 合并,表示为 a+b; c1 和 c2 合并,表示为 c1+c2;c3 和 c4 合并,表示为 c3+c4; c5 单独表示.

用土壤 DNA 提取试剂盒(QIAGEN GmbH, Germany)提取土壤细菌基因组 DNA 后,利用引物 338F(5'-ACTCCCTACGGGAGGCA-3') 和 806R(5'-GGACTTACHVTWTCTAAT-3')扩增 V3-V4 区的 16S rRNA 基因.扩增程序为 98℃ 变性 2min;98℃ 变性 30s,50℃ 变性 30s;72℃ 变性 60s,循环 30 次;72℃ 延伸 5min.PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒(Omega, America)纯化,然后采用 NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA)定量.使用 Illumina 的 NEBNext Ultra DNA 文库制备试剂盒(NEB, USA)建立测序文库,将质检合格的文库通过 Illumina HiSeq2500 平台(Biomarker Technologies Co., Ltd., Beijing, China)进行高通量测序.将得到的原始图像数据文件经碱基识别(Base Calling)分析转化为原始测序序列(Sequenced Reads),进行数据预处理:首先,采用 FLASH v1.2.7 通过 overlap 对每个样品的 reads 进行拼接,得到原始 Tags 数据(Raw Tags);其次,采用 Trimmomatic v0.33 对拼接得到的 Raw Tags 进行过滤,得到高质量的 Tags 数据(Clean Tags);最后通过 UCHIME v4.2 鉴定并去除嵌合体序列,得到最终有效数据(Effective Tags).通过 USEARCH v11.0.667 在 97% 的相似度水平上对 Tags 进行聚类,获得分类操作单位(OTUs),并基于 silva 分类学数据库对 OTU 进行分类学注释,用 Venn 图表示样品之间共有或特有的 OTUs.将 OTU 的代表序列与微生物参考数据库进行比对得到每个 OTU 对应的物种分类信息,进而在各水平(phylum、class、order、family、genus、species)统计各样品群落组成,利用 QIIME 软件生成不同分类水平上的物种丰度表,利用 R 语言工具绘制样品各分类学水平下的群落结构图.利用 Mothur(v. 1.30)对样品的 ACE 和 Chao1(物种丰度)、Shannon 和 Simpson (物种多样性)等 α 多样性指数进行评价.利用 qime (v1.8.0) 对 β 多样性指数进行分析,包括主成分分析(PCA)、

主坐标分析(PCoA)和非度量多维尺度分析(NMDS).利用典型对应分析(Canonical correspondence analysis, CCA)分析微生物群落结构对土壤理化因子的响应.

1.4 数据分析

每个分类层次上的群落结构图、热图、多样性指数分析图均采用 R 语言工具(v. 3.0.2)绘制,其他图形采用 Excel 2019 绘制;方差分析采用 SPSS 17.0 (SPSS Software, USA)中“Duncan”法;Beta 多样性基于 Bray Curtis 算法进行分析.

2 结果与讨论

2.1 土壤中芘的降解

由图 2 可知, 91d 后 BIO-EK、BIO、EK 和 CK 中芘的浓度由初始的 288.03mg/kg 分别降至 73.40, 114.23, 150.27, 256.09mg/kg(图 2(a)).采用一级动力学模型拟合不同处理过程中石油的降解,回归方程的相关系数为 0.9678~0.9827,模拟效果较好.在 91d 的处理过程中,BIO-EK 中芘的降解速率常数最大,为 0.0151d^{-1} ,半衰期为 45.90d,而 BIO 和 EK 中芘的降解速率常数分别为 0.0111 和 0.0078d^{-1} ,半衰期分别为 62.45 和 88.87d,而 CK 中芘的降解速率常数仅为 0.0012d^{-1} ,半衰期长达 577.62d(表 2).以上结果表明 BIO-EK 联合修复有利于促进芘的降解.相较而言,BIO、EK 和 BIO-EK 处理过程中,前期芘的降解速率较大,后随着处理时间的延长,降解速率逐渐降低(图 2a),与前期研究结果相似^[7].CK 和 BIO 中,芘在各取样点(a1、a2、b1、b2、c1、c2、c3、c4 和 c5)的降解率无明显差异($P>0.05$),而 EK 和 BIO-EK 组中离电极较近的取样点(a1、a2、b1 和 b2)降解率高于其他位点($P<0.05$).EK 和 BIO-EK 组中 a1、a2、b1 和 b2 点的降解率范围分别为 49.3%~49.6% 和 79.1%~80.5%;c1、c2、c3 和 c4 点的降解率范围分别为 45.3%~48.5% 和 69.9%~76.9%;离电极最远的 c5 点降解率最低,分别为 43.5% 和 65.2%(图 2(b)).电场强度在空间上的差异会引起污染物降解速率的不同,具体来说其与污染物降解速率呈正相关,该现象已在前期的研究中所证实^[7,13,16~17].除此之外,土壤微环境变化以及由此引起的微生物群落结构变化可能是导致芘降解效率发生时间和空间上变化的重要原因.

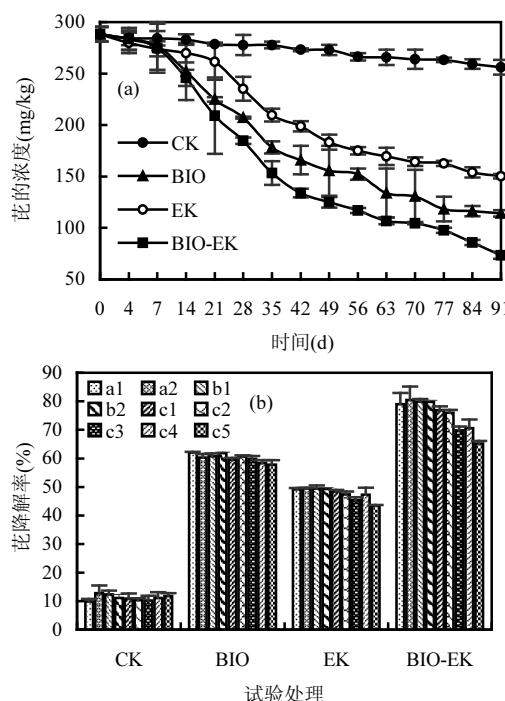


图2 不同处理土壤中芘浓度随时间变化及91d不同取样点
芘的降解率

Fig.2 The variation of pyrene concentration with time in different treatments and the degradation rate of pyrene at different sampling sites by day 91

数据为三次重复的平均值,下同

表2 不同处理芘降解的一级动力学方程

Table 2 First-order kinetic equations of pyrene degradation in different treatments

处理	动力学方程 $\ln(C_0/C_t)=$	降解速率常数 $K(d^{-1})$	R^2	半衰期 $t_{1/2}(d)$
BIO-EK	$0.0151t + 0.0084$	0.0151	0.9793	45.90
BIO	$0.0111t + 0.0135$	0.0111	0.9782	62.45
EK	$0.0078t + 0.0007$	0.0078	0.9678	88.87
CK	$0.0012t + 0.0027$	0.0012	0.9827	577.62

注:C为芘浓度,t为处理时间.

2.2 BIO-EK 处理过程中电流变化

图3为BIO-EK试验过程中电流变化情况。施加电场1d后电流略有上升(由240mA上升至247mA),随后则迅速降低,在整个试验过程中,虽然由于水分的补充使电流有所回升,但整体上呈下降趋势,至91d时,下降至23mA。本研究土壤盐度较高(1%),因而BIO-EK中的电流峰值高于其它研究^[18-19]。在一个稳定的电压梯度下,电流的变化反映了电导率的变化,而电导率的变化与土壤的含水量、离子浓度等参数密切相关^[20]。试验初期电流有所上升,可能由于

电场的施加促进了土壤中无机离子的解吸,增加了可溶态离子含量。随后电流强度快速降低,一方面可能源于电解作用引起的土壤含水率的降低(图4);另一方面,可能由于电解作用所产生的OH⁻同土壤中的一些阳离子,如Ca²⁺、Mg²⁺和Al³⁺等形成氢氧化物沉淀,使土壤溶液中可溶性离子减少^[21]。此外,电化学腐蚀引起的电极损耗可能也是引起电流降低的原因之一。在电动力学修复过程中,电流是影响电化学氧化效率的重要因素,通常情况下,电流越大,污染物去除效率越高^[22]。而在微生物-电动联合修复过程中,电流本身可能引起微生物生长繁殖、活性和群落结构发生变化^[23],或者通过影响土壤微环境从而对微生物群落产生影响,进而影响到污染物降解效率^[24]。

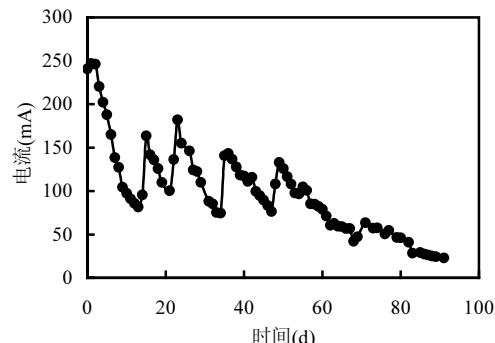


图3 BIO-EK 试验过程中电流变化

Fig.3 Changes in electric current during the experimental period of BIO-EK

2.3 土壤水分含量变化

在微生物-电动联合修复中,适当的土壤湿度是电化学反应正常进行以及微生物保持较高代谢能力的重要保证^[25]。图4为不同处理土壤湿度随时间和不同采样点变化情况。试验过程中,CK和BIO中的土壤平均湿度变化幅度较小,分别为最大持水量的63.1%~69.0%和60.3%~72.2%,而EK和BIO-EK中土壤湿度在施加电场后即由于电解作用而明显下降,14d后由最大持水量的68.9%和69.0%分别下降至40.7%和40.8%(图4a),虽然定期向土壤中补充水分,并周期性切换电场极性,但水分消耗明显大于以往研究结果^[26-27],可能由于本研究土壤盐度较高(1%),电流强度较大,因而所引起的电化学反应较强所致。土壤中水分含量的减少会导致土壤电阻增大,电流减小,从而对微生物群落产生负面影响^[12,28]。91d后,CK和BIO处理土壤中,不同取样点土壤湿度

无明显变化($P>0.05$),而 EK 和 BIO-EK 处理土壤中,各点之间土壤湿度分布呈现不均匀的状态,整体来看,电极附近(a1、a2、b1 和 b2)土壤湿度高于其它位点($P<0.05$)(图 4b),可能由于电渗析作用引起^[29],但由于周期性切换电极极性,使得土壤湿度在空间上并未发生极端变化.

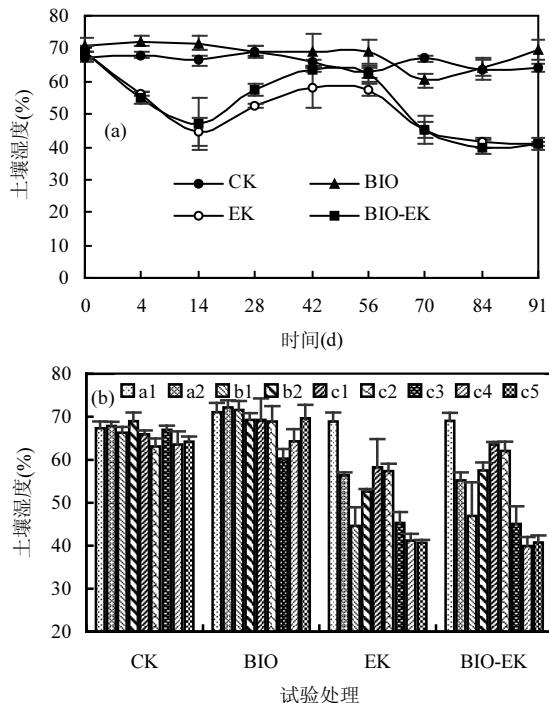


图4 不同处理土壤湿度随时间变化(a)及91d不同取样点土壤湿度(b)

Fig.4 Changes in soil moisture content with time in different treatments (a) and the soil moisture content at different sampling sites by day 91 (b)

2.4 土壤温度变化

图 5 为不同处理中土壤温度随时间的变化.监测结果表明,土壤温度随处理时间呈现上下波动的趋势,但波动幅度有所不同,施加电场的试验组(EK 和 BIO-EK)与未施加电场的试验组(CK 和 BIO)温度波动范围分别为 26~32℃ 和 27~37℃.施加电场的 EK 和 BIO-EK 组的平均温度比 CK 和 BIO 组的平均温度高 1~7℃.而前期研究发现施加电场与未施加电场的试验组之间土壤温度无明显差异^[7].Acar 等^[30]研究发现,不对电压梯度进行任何控制时,焦耳热可使土壤温度升高 10~20℃.又有研究表明电流密度较小时往往观察不到热效应^[31].在本研究中,由于较高的电流密度值,使得土壤产生了明显的温度变

化.土壤温度适当升高,一方面可通过影响有机污染物的物理状态、化学组成等加快污染物的生物转化速率^[32],另一方面可能通过影响微生物群落结构而影响污染物的降解效率^[24].

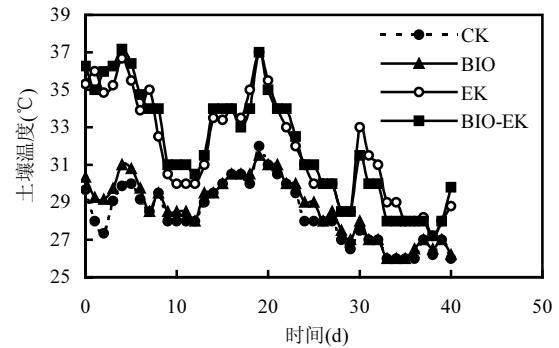


图 5 不同处理土壤温度变化

Fig.5 Changes in soil temperature in different treatments

2.5 土壤 pH 值变化

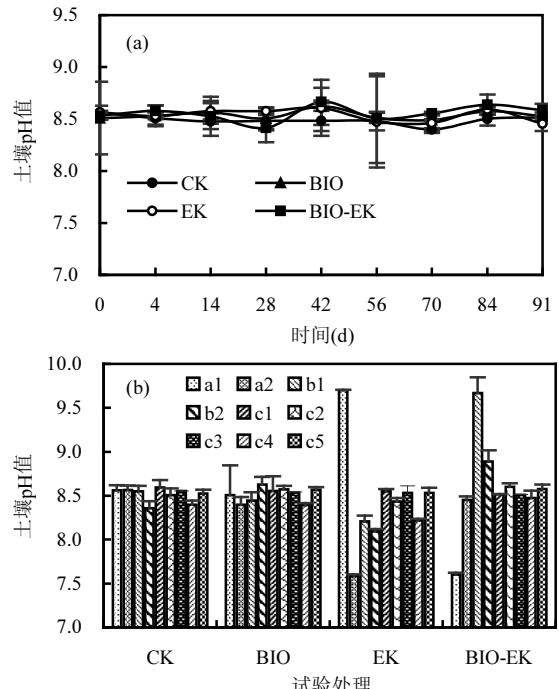


图 6 不同处理土壤 pH 值随时间变化(a)及91d不同取样点土壤 pH 值(b)

Fig.6 Changes in soil pH with time in different treatments (a) and the soil pH at different sampling sites by day 91 (b)

由图 6 可知,试验过程中,各处理土壤平均 pH 值在较小范围内波动(8.42~8.67).CK 和 BIO 试验中,各采样点之间 pH 值没有明显差异($P>0.05$),而 EK 和

BIO-EK 组不同点 pH 值之间变化幅度较大,尤其表现在电极附近.具体来看,EK 和 BIO-EK 中,电极附近的 a1、a2、b1 和 b2 点,pH 值变化范围分别为 7.59~9.70 和 7.60~9.67,而 c1~c5 点之间的 pH 值变化范围较小,分别为 8.22~8.55 和 8.48~8.60(图 6b).当向土壤中施加电场时,电极上发生的电解水反应会使电极附近土壤 pH 值发生大幅度变化^[33],而该变化一方面可以通过影响土壤中离子的吸附与解吸、沉淀与溶解而影响电渗流的方向和速度,进而对土壤中污染物的存在形态、电化学氧化反应速率等产生重大影响^[21],另一方面,可能通过影响微生物的活性、数量、多样性及群落结构等进而对污染物降解效率产生影响^[34].本研究通过每 30min 切换一次电极极性的方式消除了电极附近土壤极端 pH 值的产生,但相较于前期研究结果^[7],EK 和 BIO-EK 电极附近土壤 pH 值仍有较大幅度的变化,可能与较强电流引起的较强的电化学反应有关,而该变化可能影响微生物群落结构,进而对污染物降解效果产生影响.

2.6 微生物群落变化

14 个样品测序共获得 1,119,259 对 Reads, 双端 Reads 拼接、过滤后共产生 1,018,506 条 Clean tags, 每个样品至少产生 49,213 条 Clean tags, 平均产生 72,750 条 Clean tags. 在 97% 的相似度水平上对 tags 进行聚类, 获得每个样品的 OTU 数, 所有土样 16SrRNA 测序文库覆盖率均大于 99%, 说明测序深度合理(表 3).

2.6.1 土壤微生物多样性和丰度分析 由表 3 可知, 随着修复的进行,BIO 处理土壤中 OTUs 以及 ACE 和 Chao1 指数基本呈逐渐增加的趋势, 说明土壤微生物丰度逐渐增加, 从 Simpson 和 Shannon 指数变化情况来看, 其分别呈现逐渐减少和逐渐增大的趋势, 说明随着修复的进行,BIO 处理土壤中微生物多样性也逐渐增加; 而 BIO-EK 中, 从 Chao1 和 ACE 指数以及 Simpson 和 Shannon 指数来看, 处理 7d 后土壤微生物的丰度和多样性均达到最大. 结合 Venn 图(图 7a)进行分析,BIO-EK 中土壤微生物多样性和丰度整体上均高于 BIO, 说明电场的施加增加了土壤微生物的多样性和丰度. 使用电动力学的方法可促进污染物与微生物之间的传质作用, 从而有效增强微生物对污染物的生物可利用性, 使微生物代谢得到改善^[26], 阳极附近由于水的电解作用所产生的

氧气会促进微生物细胞的呼吸速率^[35], 这些均可能增加土壤微生物的多样性和丰度. 另外, 在本研究中,BIO-EK 中土壤温度较 BIO 中升高 1~7°C, 可能也是引起土壤微生物的多样性和丰度的增加的重要原因^[12, 24]. BIO-EK 中, Chao1 和 Ace 以及 Shannon 和 Simpson 在不同取样点之间变化不大, 初步表明不同取样点之间微生物丰度和多样性变化较小. pH 值和水分含量是影响微生物群落的重要因素^[36~37], 本研究中由于电极极性的周期性切换,pH 值和水分含量并未发生极端变化, 因而对微生物的多样性和丰度影响较小.

表 3 土壤样品微生物丰度与多样性

Table 3 Richness and microbial diversity indices in soil samples

样品名称	OUT 个数	ACE 指数	Chao1 指数	Simpson 指数	Shannon 指数	文库覆 盖率
BIO	0d	157	221.45	210.04	0.27	1.74
	7d	192	243.28	232.83	0.23	1.99
	21d	203	239.71	231.28	0.18	2.46
	63d	240	264.90	255.50	0.06	3.63
	91d	251	304.69	260.33	0.04	4.15
BIO-EK	0d	228	292.16	281.82	0.14	2.60
	7d	388	446.72	469.85	0.02	4.65
	21d	179	300.28	229.00	0.38	2.24
	63d	211	255.12	224.00	0.07	4.06
	91d	259	361.87	342.20	0.13	2.68
采样点	a+b	265	289.59	289.24	0.11	2.95
	c1+c2	240	292.20	285.93	0.16	2.47
	c3+c4	257	275.09	275.00	0.13	2.89
	c5	251	289.70	296.32	0.14	2.81

2.6.2 微生物群落结构分析 根据主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)(图 7b), BIO 中 0~21d 样品较为集中, 63~91d 较为集中, 说明 0~21d 微生物群落结构较接近, 而 63~91d 较接近, 同时说明微生物群落变化主要发生在 63d 后; 施加了电场的 BIO-EK 组各取样时间样品分布较分散, 说明电场的施加使微生物群落结构发生了明显的变化. 同时, BIO-EK 中不同采样点样品聚集在一起, 说明不同取样点之间微生物群落结构变化较小. 聚类分析(图 7c)结果进一步表明,BIO 中微生物群落变化主要发生在 63d 后, 而 BIO-EK 组中微生物群落结构在 7d 后即发生了明显的变化, 但在空间上的变化相对较小.

图 7(d)显示了不同时间和不同位点土样中微生

物种类在门水平上的组成和相对丰度。对各样品前10种优势菌门的相对丰度进行分析,结果表明,厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)丰度较高,而这些菌门在烃类污染土壤的修复方面起重要作用^[38-41]。BIO处理土壤中 *Firmicutes* 在前63d所占比例最高(42.7%~52.2%),91d时降低至19.0%,*Proteobacteria* 在前21d的丰度(39.1%~48.7%)仅次于*Firmicutes*,后期则明显降低,至91d时降至12.9%;*Actinobacteria* 和 *Bacteroidetes* 的丰度整体上随处理时间呈现逐渐上升的趋势,至91d时,分别由初始的0.5%和0.2%增加至34.1%和23.4%。相较而言,BIO-EK处理土壤中微生物群落结构7d后即发生了明显变化。其中,*Firmicutes* 和 *Proteobacteria* 均呈现先下降后上升的趋势,具体为,前21d由初始的58.8%和31.4%分别降至11.5%和11.2%,至91d时又分别上升至45.3%和22.1%;*Actinobacteria* 丰度随处理时间呈逐渐增加的趋势,91d后其比例由初始的6.5%增至28.6%;且与 BIO 不同的是,在7~63d的土样中检测到了较高丰度的蓝藻门(*Cyanobacteria*),其丰度随时间呈现先上升后下降的趋势,21d比例达62.3%。研究表明,*Cyanobacteria* 可生活在极端环境中,能降解包括石油烃、PAHs 等在内的多种有机污染物^[42]。

纲水平(图7e)变化特征进一步说明 BIO 处理土壤中微生物群落机构在63d后发生了明显的变化,而施加了电场的 BIO-EK 组,其土壤微生物群落结构变化尤为明显,7d后即发生了明显变化。对各样品前10种优势菌纲的相对丰度分析表明,BIO 中杆菌纲(*Bacilli*)和γ-变形菌纲(*gammaproteobacteria*)在前21d丰度最大,分别为37.6%~50.3%和38.9%~48.6%,后期则快速降至8.6%~13.3%和2.4%~5.0%;放线菌纲(*Actinobacteria*)和拟杆菌纲(*bacteroidia*)丰度随处理时间大体上呈逐渐增加的趋势,至91d时,其比例由初始的0.5%和0.2%分别上升至34.0%和23.2%。BIO-EK 中 *Bacilli* 和 *gammaproteobacteria* 丰度在7d后即明显降低,21d后分别由初始的58.8%和31.4%降至11.5%和11.2%,后期又逐渐上升,91d后分别增至45.2%和19.9%;7~63d的土样中检测到了较高丰度的产氧光细菌纲(*Oxylphotobacteria*),其在21d的丰度达62.3%。

不同取样点之间微生物群落组成相似,但各组成丰度有一定的变化。从门水平看,离电极最远的c5点,其 *Actinobacteria* (14.9%)丰度低于其他位点(20.8%~41.9%),而 *Firmicutes*(41.7%)、*Proteobacteria* (29.0%)和 *Bacteroidetes* (10.9%)丰度均稍高于其他位点(三个菌门丰度分别为30.4%~41.4%、19.7%~28.0%和1.3%~6.4%)。从纲水平看,不同取样点 *Bacilli* 丰度变化范围为30.3%~38.5%;电极附近(a+b)土样中 *gammaproteobacteria* (16.8%)丰度稍低于其它位点(22.7%~23.8%),而 a+b 和 c1+c2 点 *Actinobacteria* (34.1%~39.8%)丰度稍高于其它位点(13.8%~18.1%)。这种空间上的差异可能与土壤含水率(图4b)和 pH 值(图6b)所发生的空间上的变化有关^[35]。

不同处理时间及不同采样点土样中优势菌属的变化如图7f所示。BIO 修复过程中,前21d 海杆菌属(*Marinobacter*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、枝孢杆菌属(*Virgibacillus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势菌属,其中 *Marinobacter* 和 *Bacillus* 为试验初期所添加的外源菌株,说明其在芘污染盐碱土壤中具有较强的竞争力和适应性,而同时接种的代尔夫特菌属(*Delftia*)并未被检测到,说明其竞争力及适应性较弱。*Marinobacter* 是一种耐盐碱菌属,其可利用多种不同碳氢化合物作为碳和能量的唯一来源^[43-44];*Bacillus* 是一种常见烃类化合物降解菌属^[45];研究证明 *Staphylococcus*^[46]、*Virgibacillus*^[47] 均具有PAHs降解能力。BIO 修复后期优势菌属发生了明显的变化,且丰度明显降低,其中,63d 所检测出的优势菌属为 *uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae* 和乳杆菌属(*Lactobacillus*),而91d后红球菌属(*Rhodococcus*)成为优势菌属,其被证明可产生胞外表面活性剂,能降解多种烃类化合物^[48]。BIO-EK 处理过程中,初始优势菌属为 *Bacillus*、*Marinobacter* 和 *Staphylococcus*,7d 后则发生了明显的变化,其中7~63d 主要的优势菌属为 *Lactobacillus*、*Rhodococcus* 和 *uncultured_bacterium_f_Muribaculaceae*,91d 后 *Bacillus* 和 *Marinobacter* 丰度明显回升,除此之外,优势菌属还有 *Staphylococcus*、盐单胞菌属(*Halomonas*)和气微菌属(*Aeromicrobium*)。其中,*Halomonas* 多具有耐盐碱性^[49],并具有PAHs降解能力^[50],*Aeromicrobium* 中的某些菌种也具有耐盐碱性^[51],并具有PAHs 降解能力^[52]。不同取样点优势菌

属为 *Staphylococcus*、*Aeromicrobium*、*Marinobacter*、*Halomonas* 和 *Bacillus*.

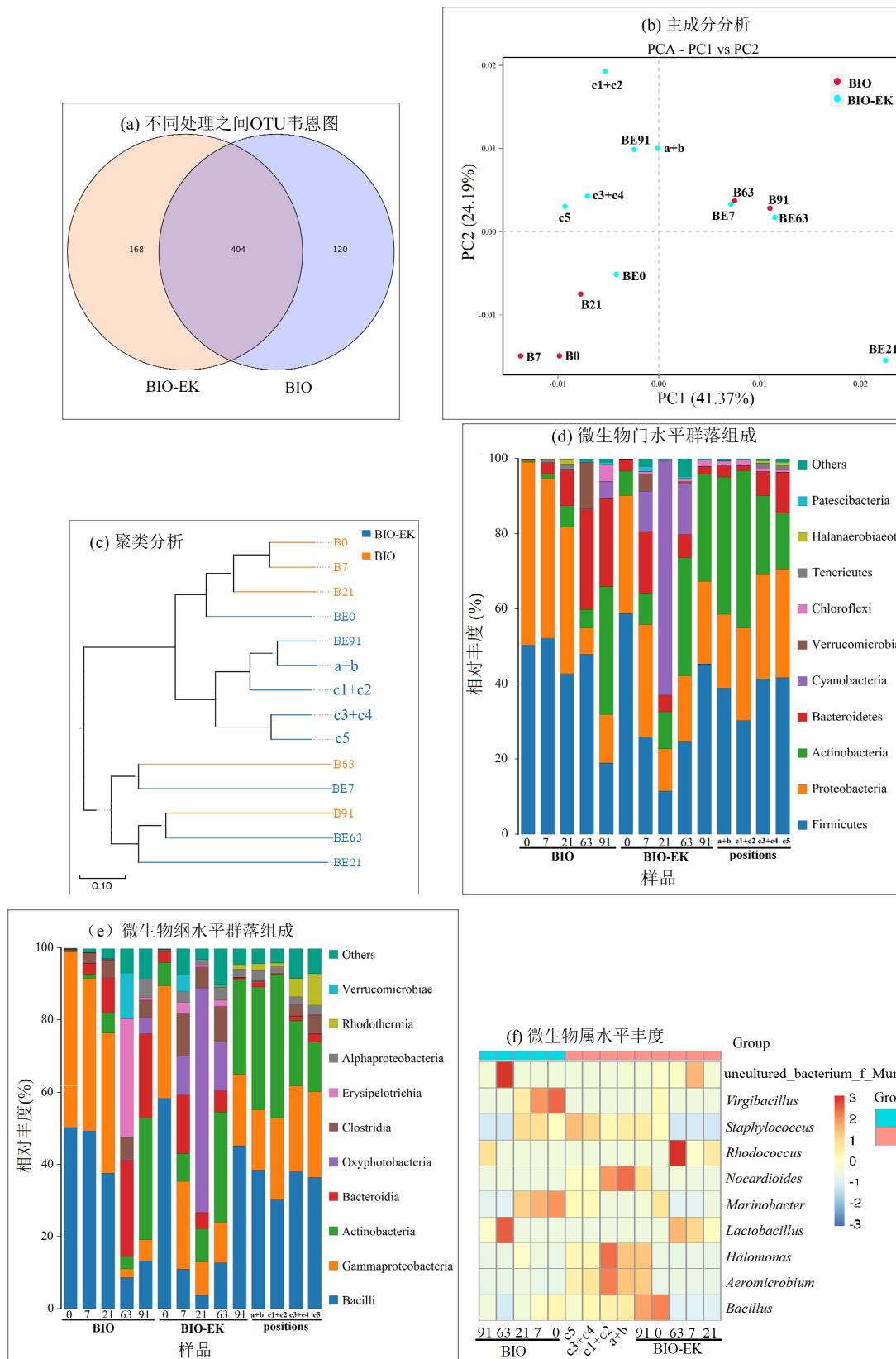


图 7 土壤微生物群落变化

Fig.7 Changes in soil microbial community

2.7 土壤环境因子与微生物群落结构的关系

土壤中污染物浓度的降低以及营养物质的消耗使得土壤营养比例发生变化,可能导致微生物群落结构改变,除此之外,BIO-EK 修复过程中,电场的施加引起土壤性质如 pH 值、含水量、温度等发生变化,也可能导致土壤微生物群落的改变,进而影响到污染物的降解效率^[27,35]。为分析 BIO 和 BIO-EK 处理过程中土壤环境因子与微生物群落结构的关系,以土壤中芘浓度、pH 值、土壤湿度(土壤含水量占最大持水量的比例)和温度为土壤环境变量,以微生物群落在属水平上的相对丰度为物种数据,作典型对应分析(CCA)(图 8)。根据图 8a,前两个排序轴分别解释了 BIO 处理土壤中微生物群落变化的 48.5% 和 40.5%,前两轴总共解释了 89.0%,轴 1 大部分被芘浓度、温度所解释,与 *Staphylococcus*、*Bacillus* 呈正相关;轴 2 主要被 pH 值所解释,与 *Rhodococcus* 呈正相关。根据图 8b,前两个排序轴分别解释了 BIO-EK 处理土壤中微生物群落变化的 45.4% 和 24.1%,前两轴总共解释了 69.5%,对微生物群落结构影响最大的因素为土壤 pH 值,其次为芘浓度和土壤温度,其与 *Marinobacter*、*Staphylococcus*、*Bacillus*、*Aeromicrobium* 呈正相关,尽管 BIO-EK 中土壤湿度有较大幅度的波动,但其对土壤微生物群落结构未产生重大影响。结果表明,土壤 pH 值、芘浓度以及温度的变化是引起 BIO 和 BIO-EK 处理土壤中微生物群落结构发生变化的主要原因,而微生物群落结构的变化又可能是造成芘不能持续高效降解的重要原因。

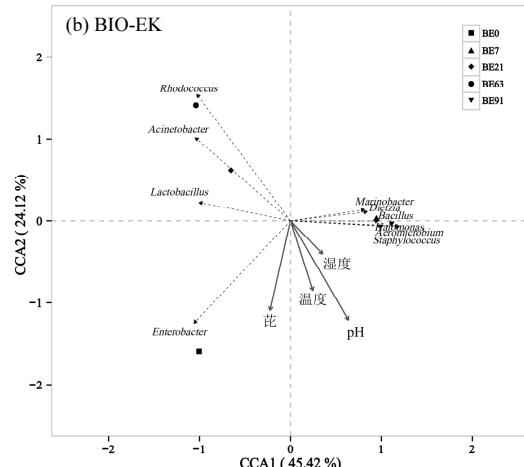
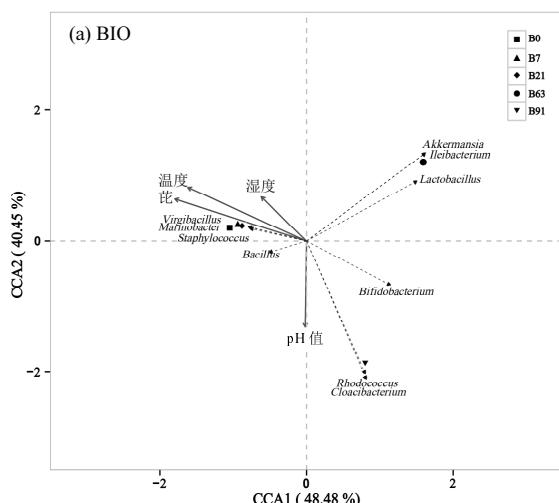


图 8 BIO 和 BIO-EK 处理过程中微生物群落结构与土壤环境因子的典型对应分析

Fig.8 Canonical correspondence analysis (CCA) of microbial community composition and soil environmental factors in the treatments of BIO and BIO-EK
代表 BIO, BE 代表 BIO-EK

3 结论

3.1 BIO-EK 联合修复有利于促进土壤中芘的降解。在 91d 的处理过程中,BIO-EK 中芘的降解速率常数为 0.0151d^{-1} ,半衰期为 45.90d,而单独的 BIO 和 EK 修复中芘的降解速率常数分别为 0.0111 和 0.0078d^{-1} ,半衰期分别为 62.45 和 88.87d;采用一级动力学模型拟合不同处理过程中石油的降解,回归方程的相关系数为 0.9678~0.9827,模拟效果较好。

3.2 BIO-EK 处理过程中芘的降解不能持续高效地进行.CCA 分析表明,电场的施加所引起的土壤 pH 值和温度的变化,修复过程中芘浓度的变化,以及由此引起的微生物群落结构的变化可能是导致芘不能持续高效降解的重要原因。

3.3 通过调节土壤微环境、构建高效降解菌剂等方式对 BIO-EK 修复过程进行调控,有望达到持续高效降解污染物的目的。

参考文献:

- [1] 鲁根涛,王雪雯,张士超,等.黄河全流域岸边表层土壤中 PAHs 的分布、来源及风险评估 [J]. 中国环境科学, 2019,39(5):2078~2085.
Lu Y T, Wang X W, Zhang S T, et al. Distribution, source and risk assessment of PAHs in surface soil of the Yellow River Basin [J]. China Environmental Science, 2019,39(5):2078~2085.
- [2] 郭婷,张承东,张清敏.生物修复石油污染盐碱土壤小试模拟系统中土壤性质与微生物特性变化 [J]. 中国环境科学, 2010,30(8):

- 1123–1129.
- Guo T, Zhang C D, Zhang Q M. Changes of soil properties and microorganism characteristic during bioremediation of petroleum-contaminated saline soil in microscale simulation study [J]. *China Environmental Science*, 2010,30(8):1123–1129.
- [3] 厉舒祯, 邓晔, 张照婧, 等. 生物降解芳香族化合物的分子检测技术研究进展 [J]. *中国环境科学*, 2019,39(6):2577–2587.
- Li S Z, Deng Y, Zhang Z J, et al. Advances in molecular detection on aromatic bioremediation [J]. *China Environmental Science*, 2019, 39(6):2577–2587.
- [4] 杜丽娜, 高大文. 青顶拟多孔菌对单一和复合多环芳烃的降解特性 [J]. *中国环境科学*, 2011,31(2):277–282.
- Du L N, Gao D W. Degradation characteristics of single and mixed PAHs by *Polyporellus picipes* [J]. *China Environmental Science*, 2011, 31(2):277–282.
- [5] Means J C. Influence of salinity upon sediment–water partitioning of aromatic hydrocarbons [J]. *Marine Chemistry*, 1995,51(1):3–16.
- [6] Huang D N, Guo S H, Li T T, et al. Coupling interactions between electrokinetics and bioremediation for pyrene removal from soil under polarity reversal conditions [J]. *Clean–Soil, Air, Water*, 2013,41(4): 383–389.
- [7] Guo S H, Fan R J, Li T T, et al. Synergistic effects of bioremediation and electrokinetics in the remediation of petroleum-contaminated soil [J]. *Chemosphere*, 2014,109:226–233.
- [8] Lear G, Harbottle M J, Sills G, et al. Impact of electrokinetic remediation on microbial communities within PCP contaminated soil [J]. *Environmental Pollution*, 2007,146 (1):139–146.
- [9] Chaïneau C, Rougeux G, Yéprémian C, et al. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005,37(8):1490–1497.
- [10] Alshawabkeh A N, Maillacheruvu K. Electrochemical and biogeochemical interactions under dc electric fields [J]. *Physicochemical Groundwater Remediation*, 2002;73–90.
- [11] 刘广容, 叶春松, 钱勤, 等. 电动生物修复底泥中电场对微生物活性的影响 [J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2011,57(1):47–51.
- Liu G R, Ye C S, Qian Q, et al. Effects of electrokinetic bioremediation of electric field on sediment microbial activity [J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 2011,57(1):47–51.
- [12] Li F M, Guo S H, Wang S, et al. Changes of microbial community and activity under different electric fields during electro-bioremediation of PAH-contaminated soil [J]. *Chemosphere*, 2020,254:126880.
- [13] 范瑞娟, 郭书海, 李凤梅, 等. 二维电场中微生物群落动态及混合有机物降解特征 [J]. *环境科学学报*, 2017,37(9):3543–3552.
- Fan R J, Guo S H, Li F M, et al. Dynamics of microbial community and degradation characteristics of mixed organics in a 2-dimensional electric field [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017,37(9):3543–3552.
- [14] 范瑞娟, 刘雅琴, 张琇. 嗜盐碱高环PAHs降解菌的分离及其降解特性研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2019,38(6):1280–1287.
- Fan R J, Liu Y Q, Zhang X. Isolation and degradation characteristics of haloalkaliphilic high molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019,38(6):1280–1287.
- [15] 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, 2000:12–13.
- Lu R K. Soil agrochemistry analysis protocoles [M]. Beijing: China Agriculture Science Press, 2000:12–13.
- [16] 范瑞娟, 郭书海, 李凤梅, 等. 混合烃污染土壤微生物-电动修复中的互补性研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2018,37(1):64–71.
- Fan R J, Guo S H, Li F M, et al. Complementarity of bioelectrokinetics in the remediation of soil contaminated with multiple hydrocarbons [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018,37(1): 64–71.
- [17] Fan R J, Guo S H, Li T T, et al. Contributions of electrokinetics and bioremediation in the treatment of different petroleum components [J]. *Clean–Soil, Air, Water*, 2015,43(2):251–259.
- [18] Williams K H, Nevin K P, Franks A, et al. Electrode-based approach for monitoring in situ microbial activity during subsurface bioremediation [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010,44(1): 47–54.
- [19] Zhu S F, Han D L, Zhou M, et al. Ammonia enhanced electrokinetics coupled with bamboo charcoal adsorption for remediation of fluorine-contaminated kaolin clay [J]. *Electrochimica Acta*, 2016,198:241–248.
- [20] Fan X Y, Wang H, Luo Q S, et al. The use of 2D non-uniform electric field to enhance in situ bioremediation of 2,4-dichlorophenol-contaminated soil [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007,148(1/2): 29–37.
- [21] Saichek R E, Reddy K R. Effect of pH control at the anode for the electrokinetic removal of phenanthrene from kaolin soil [J]. *Chemosphere*, 2003,51(4):273–287.
- [22] Domínguez J R, González T, Palo P, et al. Anodic oxidation of ketoprofen on boron-doped diamond (BDD) electrodes. Role of operative parameters [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2010,162(3): 1012–1018.
- [23] Kim S H, Han H Y, Lee Y J, et al. Effect of electrokinetic remediation on indigenous microbial activity and community within diesel contaminated soil [J]. *Science of the Total Environment*, 2010,408(16): 3162–3168.
- [24] Ramadan B S, Sari G L, Rosmalina R T, et al. An overview of electrokinetic soil flushing and its effect on bioremediation of hydrocarbon contaminated soil [J]. *Journal of Environmental Management*, 2018,218:309–321.
- [25] 范瑞娟, 郭书海, 李凤梅, 等. 有机污染土壤电动-微生物修复过程中的影响因素及优化措施 [J]. *生态环境学报*, 2017,26 (3):522–530.
- Fan R J, Guo S H, Li F M, et al. Influencing factors and optimization measures in the electro-bioremediation of organic contaminated soil [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2017,26(3):522–530.
- [26] Luo Q S, Zhang X H, Wang H, et al. The use of non-uniform electrokinetics to enhance in situ bioremediation of phenol-contaminated soil [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2005,121(1–3): 187–194.
- [27] Harbottle M J, Lear G, Sills G C, et al. Enhanced biodegradation of pentachlorophenol in unsaturated soil using reversed field electrokinetics [J]. *Journal of Environmental Management*, 2009,90(5):

- 1893–1900.
- [28] Li F M, Guo S H, Hartog N. Electrokinetics-enhanced biodegradation of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons in soil around iron and steel industries [J]. *Electrochimica Acta*, 2012, 85(15):228–234.
- [29] Acar Y B, Gale R J, Alshawabkeh A N, et al. Electrokinetic remediation: Basics and technology status [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 1995, 40(2):117–137.
- [30] Acar Y B, Alshawabkeh A N. Electrokinetic remediation. I: Pilot-scale tests with lead-spiked kaolinite [J]. *Journal of geotechnical engineering*, 1996, 122(3):173–185.
- [31] 罗启仕,王慧,张锡辉,等.电动力学技术强化原位生物修复研究进展 [J]. *环境污染与防治*, 2004, 26(4):268–271.
- Luo Q S, Wang H, Zhang X H, et al. Enhancement of in situ bioremediation by electrokinetic technology [J]. *Environmental Pollution and Control*, 2004, 26(4):268–271.
- [32] Leahy J G, Colwell R R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment [J]. *Microbiological Reviews*, 1990, 54(3):305–315.
- [33] 罗启仕,张锡辉,王慧,等.非均匀电场对土壤中基因工程菌的迁移与机理 [J]. *中国环境科学*, 2004, 24(3):285–289.
- Luo Q S, Zhang X H, Wang H, et al. The movement and its mechanism of genetic engineering bacteria in soils by non-uniform electric field [J]. *China Environmental Science*, 2004, 24(3):285–289.
- [34] Aciego Pietri J C, Brookes P C. Substrate inputs and pH as factors controlling microbial biomass, activity and community structure in an arable soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(7):1396–1405.
- [35] Lear G, Harbottle M J, van der Gast C J, et al. The effect of electrokinetics on soil microbial communities [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(11):1751–1760.
- [36] Brockett B F T, Prescott C E, Grayston S J. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2012, 44(1):9–20.
- [37] Lauber C L, Hamady M, Knight R, et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(15):5111–5120.
- [38] Zhang D C, Mortelmaier C, Margesin R. Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil [J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 421–422:184–196.
- [39] Li X J, Wang X, Zhang Y Y, et al. Salinity and conductivity amendment of soil enhanced the bioelectrochemical degradation of petroleum hydrocarbons [J]. *Scientific Reports*, 2016, (6):32861.
- [40] Martin F, Torelli S, Paslier D L, et al. Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene [J]. *Environmental Pollution*, 2012, 162(162):345–353.
- [41] Zheng J, Feng J Q, Zhou L, et al. Characterization of bacterial composition and diversity in a long-term petroleum contaminated soil and isolation of high-efficiency alkane-degrading strains using an improved medium [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2018, 34(2):34–44.
- [42] Ichor T, Okerentugb P O, Okpokwasil G C. Biodegradation of total petroleum hydrocarbon by a consortium of Cyanobacteria isolated from crude oil polluted brackish waters of Bodo Creeks in Ogoniland, Rivers State [J]. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 2016, 10(1):16–27.
- [43] Sun Y, Luo H W. Homologous recombination in core genomes facilitates marine bacterial adaptation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(11):e02545–02517.
- [44] Zhang M X, Li A Z, Wu Q P, et al. *Marinobacter denitrificans* sp. nov., isolated from marine sediment of southern Scott Coast, Antarctica [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(4):2918–2924.
- [45] Borah D, Yadav R N S. Biodegradation of complex hydrocarbon by a novel *Bacillus cereus* strain [J]. *Journal of Environmental Science & Technology*, 2014, 7(7):176–184.
- [46] Akani N, Amaku E. Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) of effluents from Forcados Terminal in Delta State by some bacteria isolates [J]. *International Journal of Applied Science and Mathematical Theory*, 2016, 2(2):30–40.
- [47] Anyasi R O, Atagana H I, Sutherland R. Identification and characterization of PAH-degrading endophytes isolated from plants growing around a sludge dam [J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2019, 21(7):672–682.
- [48] Yi T, Lee E H, Ahn Y G, et al. Novel biodegradation pathways of cyclohexane by *Rhodococcus* sp. EC1 [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 191(1–3):393–396.
- [49] Kushwaha B, Jadhav I, Jadhav K. *Halomonas sambharensis* sp. nov., a moderately halophilic Bacterium isolated from the saltern crystallizer ponds of the Sambhar Salt Lake in India [J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(1):
- [50] 樊黎黎,徐兴健,韩雪容,等.莫莫格湿地石油污染土壤中耐盐碱石油烃降解细菌的降解特性研究 [J]. *土壤与作物*, 2019, 8(2):87–96.
- Fan L L, Xu X J, Han X R, et al. Characteristics of saline-alkali-tolerant and petroleum hydrocarbon-degrading bacteria isolated from petroleum oil-polluted soil in Momoge wetland [J]. *Soils and Crops*, 2019, 8(2):87–96.
- [51] Yoon J H, Lee C H, Oh T K. *Aeromicrobium alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil, and emended description of the genus *Aeromicrobium* [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(5):2171–2175.
- [52] 李岩,张小雪,冯煊,等.2种秸秆固定化M1对3环PAHs污染土壤修复效果研究 [J]. *河北农业大学学报*, 2019, 42(4):102–108.
- Li Y, Zhang X X, Feng X, et al. Study on remediation effect of immobilized M1 with two kinds of straw on 3-ring PAHs contaminated soil in coal mining area [J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2019, 42(4):102–108.

作者简介: 范瑞娟(1985–),女,宁夏隆德人,讲师,博士,主要从事污染防治与环境修复研究,发表论文9篇。