

# 绿肥植物绿豆去除土壤中芘的实验研究

陈强培<sup>1</sup>, 郭楚玲<sup>1,2</sup>, 廖长君<sup>1</sup>, 徐稳定<sup>1</sup>, 杨琛<sup>1,2</sup>, 党志<sup>1,2\*</sup>

(1.华南理工大学环境与能源学院, 广州 510006; 2.工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广州 510006)

**摘要:**探讨了绿豆植株、绿豆-根瘤菌体系以及绿豆生物质还田对土壤中芘去除效果的影响。60 d 的盆栽实验结果表明,添加与未添加根瘤菌剂的绿豆植株对芘的去除率分别为 76.8%~89.2%和 85.6%~90.4%, 无植株灭菌与未灭菌的土壤中去除率分别为 11.5%~24.6%和 35.1%~63.9%。土壤中芘降解菌的数量与芘浓度正相关,而是否种植绿豆对其无显著影响,绿豆可能是通过为其代谢微生物提供底物以促进芘的去除。而 25 d 的生物质还田模拟实验中,芘的去除率相对于空白可达 13.84%。研究发现添加根瘤菌后种植绿豆并将绿豆收获后的生物质还田可作为加强污染土壤芘去除的有效措施。

**关键词:**绿豆;根瘤菌;芘;生物质

**中图分类号:**X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2013)06-1172-06 **doi:**10.11654/jaes.2013.06.013

## Removal of Pyrene in Soil by Leguminous Green Manure Plant Mung Bean

CHEN Qiang-pei<sup>1</sup>, GUO Chu-ling<sup>1,2</sup>, LIAO Chang-jun<sup>1</sup>, XU Wen-ding<sup>1</sup>, YANG Chen<sup>1,2</sup>, DANG Zhi<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006; 2.The Key Lab of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** This work investigated the removal capacity of pyrene in soil by mung bean, mung bean-rhizobium association and raw mung bean return. The pot experiments were conducted in 60 days, and the results showed that the removal capacities of pyrene (the range of concentration is 10~100 mg·kg<sup>-1</sup>) by mung bean with or without rhizobium were 76.8%~89.2% and 85.6%~90.4%, while those in unsterile and sterile soil without mung bean were 35.1%~63.9% and 11.5%~24.6%, respectively. The number of pyrene-degrading microbes positively associated with the concentration of pyrene, but it showed no correlation with mung bean. These results indicated that the removal of pyrene seems to be promoted by mung bean by providing the substrate for symbiotic organisms. Furthermore, during the simulation experiment of raw mung bean return, the removal rate of pyrene increased by 13.84% compared to control in 25 days. This paper finds that mung bean-rhizobium association can effectively remove pyrene in soil, and the application of raw mung bean return can also improve the removal efficiency of pyrene.

**Keywords:** mung bean; rhizobium; pyrene; raw mung bean return

PAHs 是一类致畸、致癌、致突变的难降解有机污染物,并且具有疏水性、生物富集性等特点,难以被土壤微生物利用<sup>[1]</sup>。据报道,在我国主要地区(1999—2008 年)表层土壤中 16 种 PAHs 浓度总和最高可达

151 600 μg·kg<sup>-1</sup>,平均值为 3 654.97 μg·kg<sup>-1</sup><sup>[2]</sup>,已经对人类健康和生态环境构成潜在危害。

污染土壤的修复技术包括生物修复、化学修复、物理修复及其联合修复技术<sup>[3]</sup>。在这些修复方法中,植物修复因成本低且无二次污染的特点,被广泛采用<sup>[4-5]</sup>。其研究主要集中在两方面,一是修复植物的筛选,一是植物修复机理的研究。对于修复植物的筛选,国内外的研究通常采用苜蓿、黑麦草等牧草来修复 PAHs 污染土壤<sup>[6]</sup>。高彦征等<sup>[7]</sup>研究发现,种植黑麦草可使土壤中芘的去除率达到 44.32%~89.21%,显著高于无植物对照。Xu 等<sup>[8]</sup>通过对比实验发现玉米对芘和菲的修复

收稿日期:2012-12-26

基金项目:国家 863 现代农业技术领域项目子课题(2012AA101403);广州市环保局科技成果应用示范项目,广州市科技计划应用基础研究专项(12C62081569);广东省自然科学基金研究团队项目(9351064101000001)

作者简介:陈强培(1986—),男,硕士研究生,主要研究方向为污染土壤的植物修复。E-mail:13570529607@163.com

\* 通信作者:党志 E-mail:chzdang@scut.edu.cn

效果优于黑麦草和三叶草。可能的修复机理有:植物组织吸收积累 PAHs; 植物根部释放分泌物和酶促进 PAHs 降解;植物强化根际微生物的降解作用。研究表明植物通过吸收积累对 PAHs 污染土壤的修复贡献率很小<sup>[9-10]</sup>,植物的强化作用则被认为是植物促进土壤芘修复的主要途径<sup>[11]</sup>。因此,利用植物微生物联合修复的方法成了生物修复 PAHs 污染土壤的一个研究热点<sup>[12-13]</sup>。生物修复一般是从污染土壤中分离专性微生物,经筛选和驯化后再接种到土壤中,以提高修复效率。在实际处理中,这些专性菌易受到环境的影响,很难成为优势菌种<sup>[14]</sup>。近年来,人们通过接种能够和植物共生的微生物来促进植物修复效果的研究取得了不少进展<sup>[15-16]</sup>,沈源源等<sup>[17]</sup>研究发现不同品种紫花苜蓿与根瘤菌联合修复后,紫花苜蓿-根瘤菌能显著促进土壤中各组分 PAHs 的去除,比单种植物提高了大约 20% 的去除率。但目前的研究很少涉及植物修复后的植株生物质的处理。

我国很多土壤受到 PAHs 污染的同时还面临着土壤退化的问题,因地制宜地使用绿肥可使退化土壤土质得到改善<sup>[18]</sup>。绿豆是一种被广泛种植的传统绿肥植物,因其能和固氮菌共生,栽种后就地填埋可以增加土壤肥力,常被用于土壤的改良<sup>[19]</sup>。本研究选择绿豆作为修复植物,以芘为 PAHs 典型污染物代表,考察绿豆及根瘤菌对芘污染土壤的修复,并将绿豆生物质添加到污染土中研究其修复效果,以期获得最佳修复方案,为实际的原地修复提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

供试土壤采自广东增城水稻土,采样深度为 0~20 cm,采集的土壤经风干后过 2 mm 的筛,放在干燥处密封保存<sup>[20]</sup>。其基本理化性质如表 1。

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Physical and chemical characteristics of tested soil

| pH   | 有机质   | 总氮     | 总磷     | 总钾     | 总有效磷                   | 速效钾                    |
|------|-------|--------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| 5.23 | 1.63% | 0.086% | 0.052% | 0.448% | 35 mg·kg <sup>-1</sup> | 26 mg·kg <sup>-1</sup> |

供试绿豆种子购自驻马店泌阳鑫丰科技有限公司。根瘤菌购自宁夏诺德曼生物技术有限公司。芘购自 Sigma 公司,纯度>98%;二氯甲烷、正己烷为分析纯(重蒸),无水硫酸钠为优级纯,层析用硅胶(200~300 目)为分析纯;甲醇为色谱纯。

主要仪器:KQ-300DE 医用数控超声波清洗器,RE-2000 旋转蒸发器,Agilent-1200 高效液相色谱仪(HPLC)。液相色谱的条件:紫外检测器,Φ4.6×150 mm C18 反相色谱柱,柱温 30 ℃;流动相为甲醇-水 83:17,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。

### 1.2 盆栽实验

取所需土量的十分之一,均匀加入芘的二氯甲烷溶液,在通风橱中放置 24 h<sup>[21]</sup>,待二氯甲烷挥发后,用剩余的未污染土不断稀释,多次搅拌、混匀,制得不同浓度(表 2)的污染土样。分别称取 2 kg 于具底盖的塑料花盆中。设置四个处理:P,种植物不加菌剂;PB,种植物添加菌剂;CW,添加 0.1%叠氮化钠(用以抑制土壤微生物活动);CK,不添加叠氮化钠。每个处理设置三个平行样。加蒸馏水至 60%田间持水量,稳定 10 d 后采样,测其芘浓度作为本底值。筛选饱满大小一致的绿豆种子,清洗后用 3%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 20 min,捞出后用去离子水清洗三次,放在通风处,等其表面干后 P 组的直接播种,PB 组的按菌剂说明进行接种。每盆播 20 个种子,播种一周后间苗留下 8 棵长势一致的。实验过程中使用重量法使土壤保持 60%的田间持水量,每隔两天随机改变花盆位置一次。实验周期为 60 d,将土整盆倒出,小心分离根和土壤,统计每盆绿豆根系上的根瘤个数;土样采集后充分混匀,过 20 目筛;植物地上部分用去离子水充分淋洗,地下部分先用超声波清洗器清洗再用去离子水淋洗,用滤纸蘸干表面水分后放入密封袋。将所有样品放入-20 ℃的冰箱中,分析前对所有样品进行冷冻干燥处理。

表 2 供试土样中芘的起始浓度(mg·kg<sup>-1</sup>,陈化后)

Table 2 Concentration of pyrene in treated soils  
(mg·kg<sup>-1</sup>, after ageing)

| 样号  | 0  | 1         | 2          | 3          | 4          | 5          |
|-----|----|-----------|------------|------------|------------|------------|
| 芘浓度 | ND | 8.09±0.50 | 16.81±0.65 | 36.21±1.72 | 70.78±3.44 | 90.32±6.20 |

注:0 为未添加污染物土;ND 表示没有检出。

### 1.3 绿豆生物质的去除作用

种子灭菌后,用蛭石育苗,长至一个星期改成半强度 Hoagland 培养液<sup>[22]</sup>,一个月后分别收集绿豆的地上部分(包含茎叶)和地下部分,用去离子水冲洗干净并用滤纸吸干表面水分,经冷冻干燥后进行粉碎。在三角瓶中加入 50 g 污染土(芘浓度 90.32±6.20 mg·kg<sup>-1</sup>),再分别加入 0.01、0.05、0.1、0.3、0.6 g 上述制备的植物样品粉末,盖上锡箔纸,反复多次摇匀。并设置

三个对照组:C1 不添加绿豆生物质的空白对照组;C2 添加叠氮化钠;C3 添加叠氮化钠和 0.6 g 生物质。每一个处理设置三个平行。每个瓶中加入无菌去离子水 15 mL,放在人工气候箱中于 25 ℃避光培养 25 d。

#### 1.4 土壤中茈的分析<sup>[10,23]</sup>

取 2 g 土样于 30 mL 玻璃离心管中,加入 10 mL 二氯甲烷,盖紧后超声萃取(添加冰块使水温不超过 40 ℃)1 h 后于 4000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 20 min;取 3 mL 上清液过 2 g 硅胶柱;用 1:1 的二氯甲烷和正己烷溶液洗脱,鸡心瓶收集洗脱液后在 40 ℃下浓缩近干;用甲醇定容,过 0.22 μm 有机相滤膜后,HPLC/UV 分析。

#### 1.5 土壤中茈降解菌数量<sup>[24-25]</sup>

采用最大或然值(MPN)计数法分析盆栽实验土壤中茈降解菌的数量。从 96 孔板第 2 排到第 10 排的第 2 至第 6 个孔中依次加入 100 μL 茈的正己烷溶液(5 g·L<sup>-1</sup>)。待正己烷挥发完后加入 270 μL 灭菌后的 MSM 培养基(没有添加茈的孔也要加入培养基或无菌水,以维持一定的湿度);在加了茈的孔中加入 30 μL 不同稀释浓度的土壤悬浮液(例如,在第 2 排的第 5 个平板中加入稀释了 10 倍的悬浮液),以此类推;将接种好的平板放入人工气候箱,于 25 ℃、80%空气湿度的条件下培养 21 d;加入 30 μL 经 0.22 μm 的滤膜过滤灭菌的碘硝基四唑紫(INT);重新放回培养箱,第 2 d 计数观察,若变成红色或粉红色,说明含有茈降解菌,记下其个数。根据 MPN 计数表计算每一个样品中的茈降解菌浓度。

采用 Excel 2007 和 Origin 8.0 对实验所得数据进行统计分析。

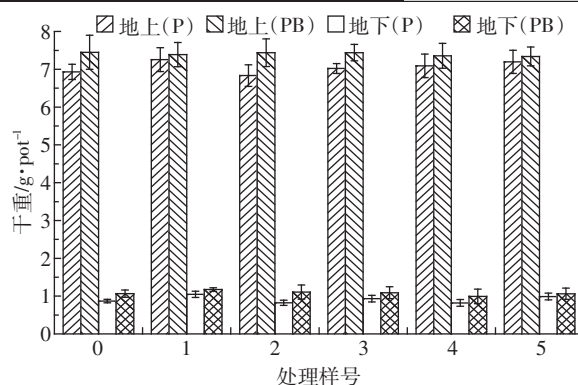
## 2 结果与讨论

### 2.1 植物的生物量

图 1 给出的是在不同茈污染浓度下生长 60 d 后收获到的绿豆地上部分和地下部分生物量。同个实验组的植物生物量在不同的茈处理浓度范围内并无明显差别,PB 组(添加根瘤菌剂)的绿豆生物量大于 P 组(没有添加根瘤菌剂),但差别并不显著。实验过程中两组植物生长良好,无明显胁迫或毒害效应。说明在实验的污染范围内,绿豆对土壤中的茈有一定的耐受性,且添加根瘤菌有助于绿豆的生长。

### 2.2 根瘤菌对茈的耐受性

栽种 60 d 后,接种根瘤菌和没接种根瘤菌绿豆根系中根瘤的数量如图 2 所示。P 和 PB 组各浓度处



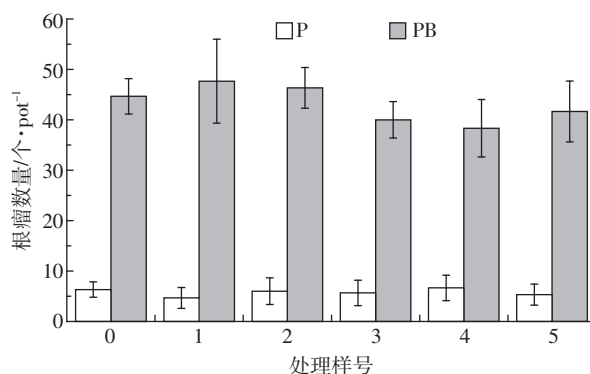
0~5 分别为表 2 所示茈的浓度

0~5 are pyrene concentrations as denoted in Table 2

图 1 不同茈处理组土壤中绿豆的生物量

Figure 1 Dry biomass of mung bean in different treatments

理间并无显著差异;未经处理土壤中含有一定的土著根瘤菌,但数量较少,接种根瘤菌可以大大提高绿豆根系上根瘤的数量。在 0~100 mg·kg<sup>-1</sup> 的茈污染土壤浓度范围内,PB 组的根瘤数量呈递减的趋势,说明茈对这种根瘤菌具有一定的胁迫作用。但即使如此,高浓度的时候根瘤的数量还是明显高于对照组(P),说明该根瘤菌剂所含根瘤菌对土壤中茈污染具有一定的耐受性。



0~5 分别为表 2 所示茈的浓度

0~5 are pyrene concentrations as denoted in Table 2

图 2 不同茈浓度下绿豆根系上根瘤数量

Figure 2 Root nodule numbers of mung bean in different treatments

### 2.3 绿豆对茈的去除作用

图 3 为 60 d 后种植绿豆 P、PB 组和无植物 CK、CW 对照组土壤中茈的去除效果。虽然无论种植植物与否,土壤中茈的含量都会随着时间的推移而减少,且低浓度的去除率要大于高浓度的,但减少的规律却有着很大的差异。

对照组 CW 中含有叠氮化钠(作为无菌对照组),可以认为其茈的消失主要是由于非生物的因素,包括



光解、吸附、挥发等原因,其去除率仅有 11.5%~24.6%。CK 组土中芘的去除率为 35.1%~63.9%,去除率比无菌组提高了 23.6%~39.3%,说明在无植物的条件下,微生物的生物降解作用对芘的去除起到积极的作用。P 组的去除率为 76.8%~89.2%,分别比对照组 CW 和对照组 CK 高出 63.3%~69.7%和 25.3%~41.7%,说明种植绿豆可以提高土壤中芘的去除率,此时土壤芘的去除可以看成是在土壤土著微生物和植物及非生物作用三者共同作用的结果。由 P 组和 CK 组可以看出,植物促进芘的降解作用随着土壤中芘的浓度的升高而更加明显。植物可以通过直接作用——直接吸收与代谢、挥发与吸附、根系释放的酶和根系分泌物的催化降解来促进 PAHs 的修复,但从目前的研究来看这一作用的贡献率相对较低<sup>[3]</sup>。绿豆植株的存在促进了土壤中微生物的降解作用可能是芘去除率升高的主要原因。绿豆根系为土壤提供了丰富的有机质,这些有机质可能成为芘降解的共代谢底物。

PB 组的土壤中芘的去除率为 85.6%~90.4%,比 P 组高出 1.2%~9.5%(图 3),其去除率的差异随着土壤芘浓度的提高而增加。这可能是以下两方面的原因导致的:一方面根瘤菌能促进宿主根的伸长,增加污染物与根的接触面积,同时也能促进宿主根释放更多的分泌物到根际微环境中,调节根际微生物的生存环境<sup>[26]</sup>;另一方面添加根瘤菌可能改变根际土壤的微生物活性,提高了根际土壤微生物群落的功能多样性<sup>[27]</sup>,从而加强土壤中有机污染物的生物降解。

上述的实验结果说明运用绿豆-根瘤菌联合修复芘污染土壤的方法是可行,虽然在低浓度时添加根瘤菌对促进植物修复芘的效果不显著,但对高浓度芘污染土壤,种植绿豆并添加根瘤菌剂能明显地促进芘的

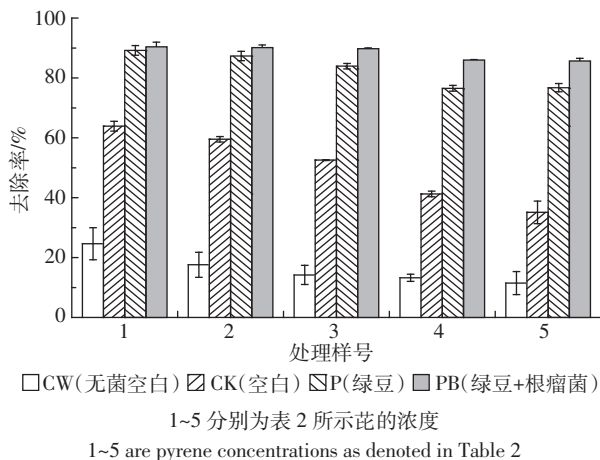


图 3 不同处理下芘的去除率  
Figure 3 Removal rate of pyrene in different treatments

去除。

## 2.4 土壤中芘降解菌的数量

利用 MPN 的方法,对土壤中能以芘为唯一的碳源和能源的芘降解菌的数量进行了测量,结果如图 4 所示。土壤中芘降解菌的数量随着土壤中芘的含量的升高而增加,说明芘可以刺激芘降解菌,使其数量增加。Thompson Oriana<sup>[21]</sup>等的实验结果也证实了这一点。

Bouchez 等<sup>[28]</sup>发现了一菌株 *Pseudomonas* sp.,该细菌不能以芘为唯一碳源生长,但却能在非存在时共代谢芘的。这说明土壤存在着这样两类微生物:一类细菌能以芘为唯一的碳源和能源,而另外一类只能在存在共代谢底物的情况下通过共代谢途径对芘进行降解<sup>[3]</sup>。很多研究表明,植物根系分泌物会影响土壤尤其是根际土壤微生物<sup>[29]</sup>,但并不明确是哪一种降解菌。本实验在孔板中只添加了芘作为唯一的碳源和能源,所以事实上得到的只是前面一种降解菌。图 4 显示,种植绿豆与否对于土壤中这种芘降解菌的数量并没有太大影响,尤其在高浓度的时候,但正是在高浓度的时候绿豆显著促进了土壤中芘的降解,由此可推测绿豆可能主要是通过提供共代谢底物促进共代谢菌的生长从而促进芘的降解<sup>[30]</sup>。

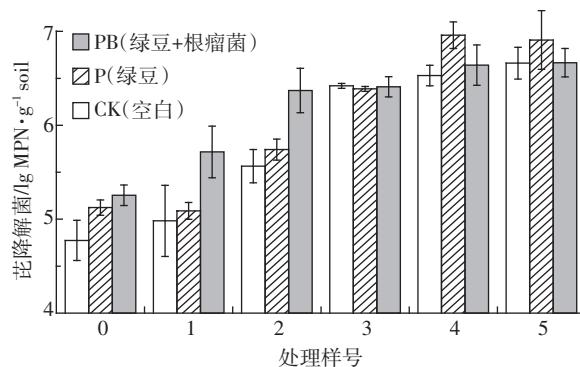


图 4 不同处理下芘降解菌的数量  
Figure 4 pyrene-degrading microbe numbers in different treatments

## 2.5 利用绿豆生物质修复芘污染土壤的效果

上述实验及很多前人的实验已经证明了在无植物存在的条件下,土壤中芘的降解主要靠微生物的生物降解作用。在其他碳源和能源存在的条件下,微生物酶活性增强,降解非生长基质的效果提高,也称为共代谢作用。在没有共代谢底物提供碳源和能源的情况下,芘在土壤中很难被降解<sup>[31]</sup>。

对照组 C2(叠氮化钠)、C3(叠氮化钠+0.6 g 生物质的去除率并无差异,说明地上和地下部分的生物质对芘的吸附作用基本可以排除。图 5 给出了将无污染的绿豆地上部分和地下部分生物质添加到污染土壤中培养 25 d 所得到的实验结果。该结果显示,无论是添加地上部分还是地下部分,芘的去除率都随着添加的生物质的增加而增加,当添加量为 0.1 g 时去除率达到最大,而后随着添加量的增加去除率随之下降,与 Xie 等<sup>[32]</sup>的实验结果相符;当添加量达到 0.6 g 时地上部分和地下部分相应的去除率仅为 15.56% 和 14.0%,比空白实验(即生物质添加量为 0 g 时)的去除率还要低。这可能是在低浓度时绿豆的这些生物质能够提供微生物生长所需碳源、氮源,激发微生物的活性,而超过一定浓度时,这些相对于芘而言更容易被微生物利用的物质成为芘的竞争性碳源<sup>[33]</sup>,微生物会优先选择利用这些物质。Olson 等<sup>[34]</sup>的实验也证明了向土壤中添加肥料使土壤中微生物生物量增加的同时 PAHs 的去除率反而降低。说明利用绿豆的生物质来修复芘污染的土壤有一个适度的量,不是量越大效果越好。

从图中可以看出添加量一样时,地上部分的生物质具有更好的效果,但这种差异并不明显。

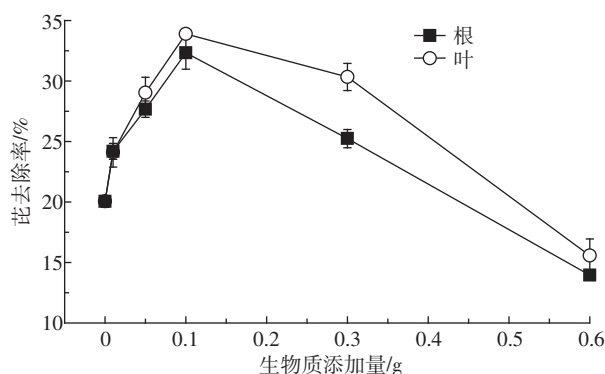


图 5 绿豆生物质添加量对芘去除率的影响

Figure 5 Effect of addition of raw mung bean on removal rate of pyrene

### 3 结论

(1) 在本实验的土壤污染浓度范围内,通过 60 d 的实验,种植绿豆土壤中芘的去除率为 76.8%~89.2%,而种绿豆且添加根瘤菌剂实验组的达到了 85.6%~90.4%。说明种绿豆且添加根瘤菌剂可以有效提高土壤中芘的降解率。

(2) 绿豆生物质可作为芘降解的共代谢底物,促

进芘的降解。

### 参考文献:

- [1] Gondek K, Kopec M, Chmiel M, et al. Response of *Zea mays* and microorganisms to soil pollution with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2008, 17(6):875-880.
- [2] 曹云者, 柳晓娟, 谢云峰, 等. 我国主要地区表层土壤中多环芳烃组成及含量特征分析[J]. *环境科学学报*, 2012, 32(1):197-203.  
Cao Y Z, Liu X J, Xie Y F, et al. Patterns of PAHs concentration and components in surface soils of main areas in China[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, 32(1):197-203.
- [3] 范淑秀, 李培军, 何娜, 等. 多环芳烃污染土壤的植物修复研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 26(6):2007-2013.  
FAN Shu-xiu, LI Pei-jun, HE Na, et al. Research of phytoremediation on contaminated soil with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 26(6):2007-2013.
- [4] Sun M, Fu D, Teng Y, et al. In situ phytoremediation of PAH-contaminated soil by intercropping alfalfa (*Medicago sativa* L.) with tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and associated soil microbial activity[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(6):980-989.
- [5] Meng L, Qiao M, Arp H P H. Phytoremediation efficiency of a PAH-contaminated industrial soil using ryegrass, white clover, and celery as mono- and mixed cultures[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2011, 11(3):482-490.
- [6] 张慧, 党志, 易筱筠, 等. 玉米修复芘污染土壤的初步研究[J]. *环境化学*, 2010, 29(1):29-34.  
ZHANG Hui, DANG Zhi, YI Xiao-yun, et al. Phytoremediation of soil contaminated with pyrene by maize CT38 (*Zea mays* L.) [J]. *Environmental Chemistry*, 2010, 29(1):29-34.
- [7] 高彦征, 凌婉婷, 朱利中, 等. 黑麦草对多环芳烃污染土壤的修复作用及机制[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(3):498-502.  
GAO Yan-zheng, LING Wan-ting, ZHU Li-zhong, et al. Ryegrass-Accelerating degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(3):498-502.
- [8] Xu S Y, Chen Y X, Wu W X, et al. Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation[J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 363(1):206-215.
- [9] 沈源源, 滕应, 骆永明, 等. 几种豆科、禾本科植物对多环芳烃复合污染土壤的修复[J]. *土壤*, 2011, 43(2):253-257.  
SHEN Yuan-yuan, TENG Ying, LUO Yong-ming, et al. Remediation efficiency of several legumes and grasses in PAH-contaminated soils[J]. *Soils*, 2011, 43(2):253-257.
- [10] Gao Y, Zhu L. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils[J]. *Chemosphere*, 2004, 55(9):1169-1178.
- [11] Huesemann M H, Hausmann T S, Fortman T J, et al. In situ phytoremediation of PAH- and PCB-contaminated marine sediments with eelgrass (*Zostera marina*) [J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35(10):1395-1404.
- [12] Johnson D L, Anderson D R, McGrath S P. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil[J]. *Soil Biology*

- and Biochemistry, 2005, 37(12):2334-2336.
- [13] 刘魏魏, 尹睿, 林先贵, 等. 生物表面活性剂-微生物强化紫花苜蓿修复多环芳烃污染土壤[J]. 环境科学, 2010, 31(4):1079-1084.
- LIU Wei-wei, YIN Rui, LIN Xian-gui, et al. Interaction of Biosurfactant-Microorganism to enhance phytoremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils with Alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. *Environmental Science*, 2010, 31(4):1079-1084.
- [14] Singh O V, Jain R K. Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63(2):128-135.
- [15] 杨婷, 林先贵, 胡君利, 等. 丛枝菌根真菌对紫花苜蓿与黑麦草修复多环芳烃污染土壤的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2009, 25(4):72-76.
- YANG Ting, LIN Xian-gui, HU Jun-li, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on phytoremediation of PAHs-contaminated soil by *Medicago sativa* and *Lolium multiflorum*[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2009, 25(4):72-76.
- [16] 李秋玲, 凌婉婷, 高彦征, 等. 丛枝菌根对土壤中多环芳烃降解的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5):1705-1710.
- LI Qiu-ling, LING Wan-ting, GAO Yan-zheng, et al. Effects of arbuscular mycorrhizae on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(5):1705-1710.
- [17] 沈源源. 多环芳烃污染土壤的植物-微生物联合修复效应[D]. 南京农业大学, 2010.
- SHEN Yuan-yuan. Combined remediation effect of plant with microorganisms in PAHs-contaminated soils[D]. Nanjing Agricultural University, 2010.
- [18] 陈义群, 董元华. 土壤改良剂的研究与应用进展[J]. 生态环境, 2008, 17(3):1282-1289.
- CHEN Yi-qun, DONG Yuan-hua. Progress of research and utilization of soil amendments[J]. *Ecology and Environment*, 2008, 17(3):1282-1289.
- [19] 王营营. 不同绿豆品种用作绿肥的筛选评价研究[D]. 中国农业科学院, 2011.
- WANG Ying-ying. Screenin and evaluation of different varieties of mung bean as green manure[D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2011.
- [20] Sun T R, Cang L, Wang Q Y, et al. Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 176(1):919-925.
- [21] Thompson O A, Wolf D C, Mattice J D, et al. Influence of nitrogen addition and plant root parameters on phytoremediation of pyrene-contaminated soil[J]. *Water Air & Soil Pollution*, 2008, 189(1):37-47.
- [22] XIE Ming-ji, YAN Chong-ling, YE Jing, et al. Impact of phenanthrene on organic acids secretion and accumulation by perennial ryegrass, *Lolium perenne* L., root [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2009, 83(1):75-80.
- [23] 宋玉芳, 区自清, 孙铁珩. 土壤、植物样品中多环芳烃(PAHs)分析方法研究[J]. 应用生态学报, 1995, 6(1):92-96.
- SONG Yu-fang, OU Zi-qing, SUN Tie-heng. Analytical method of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil and plant samples[J]. *Chin J Appl Ecol*, 1995, 6(1):92-96.
- [24] Wrenn B A, Venosa A D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1996, 42(3):252-258.
- [25] Stieber M, Haeseler F, Werner P, et al. A rapid screening method for micro-organisms degrading polycyclic aromatic hydrocarbons in microplates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 40(5):753-755.
- [26] Johnson D L, Maguire K L, Anderson D R, et al. Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: The impact of a rhizobial inoculum [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(1):33-38.
- [27] 滕应, 骆永明, 高军, 等. 多氯联苯污染土壤菌根真菌-紫花苜蓿-根瘤菌联合修复效应[J]. 环境科学, 2008, 29(10):2925-2930.
- TENG Ying, LUO Yong-ming, GAO Jun, et al. Combined remediation effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi-Legumes-Rhizobium symbiosis on PCBs contaminated soils[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(10):2925-2930.
- [28] Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele J P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 43(1):156-164.
- [29] 许超, 夏北成. 土壤多环芳烃污染根际修复研究进展[J]. 生态环境, 2007, 16(1):216-222.
- XU Chao, XIA Bei-cheng. Research progress in rhizoremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil[J]. *Ecology and Environment*, 2007, 16(1):216-222.
- [30] Rentz Jeremy A, Alvarez Pedro J J, Schnoor Jerald L. Benzo[a] pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 136(3):477-484.
- [31] 巩宗强, 李培军, 王新, 等. 芘在土壤中的共代谢降解研究[J]. 应用生态学报, 2001, 12(3):447-450.
- GONG Zong-qiang, LI Pei-jun, WANG Xin, et al. Co-metabolic degradation of pyrene in soil[J]. *Chin J Appl Ecol*, 2001, 12(3):447-450.
- [32] Xie X, Liao M, Yang J, et al. Influence of root-exudates concentration on pyrene degradation and soil microbial characteristics in pyrene contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2012, 88(10):1190-1195.
- [33] Ke L, Wong T W Y, Wong A H Y, et al. Negative effects of humic acid addition on phytoremediation of pyrene-contaminated sediments by mangrove seedlings[J]. *Chemosphere*, 2003, 52(9):1581-1591.
- [34] Olson P E, Castro A, Joern M, et al. Effects of agronomic practices on phytoremediation of an aged PAH-contaminated soil[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2008, 37(4):1439-1446.