

邓如莹,崔兆杰,殷永泉,等. 石油胁迫对盐渍土壤微生物呼吸作用强度和酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):326-329.

石油胁迫对盐渍土壤微生物呼吸作用强度和酶活性的影响

邓如莹, 崔兆杰, 殷永泉, 傅晓文, 王登阁

(山东大学环境科学与工程学院, 山东济南 250100)

摘要:参照东营市孤岛地区土壤石油、盐渍化污染现状,通过人工模拟污染土样的方法分别研究了盐渍土壤中不同浓度石油对土壤微生物呼吸作用强度、过氧化氢酶活性、脲酶活性的影响。结果表明:培养第 15、30、45 天时,土壤微生物呼吸作用强度随着石油浓度的不断增大而增大,与土壤中石油的浓度呈现出明显的正相关,相关系数分别为 0.889 ($P < 0.05$)、0.998 ($P < 0.1$)、0.964 ($P < 0.1$);通过对土壤酶活性的分析表明,随着石油浓度的不断增大,土壤过氧化氢酶活性呈现出先增大后减小的变化规律,当石油浓度在 1 000、2 000 mg/kg 之间时,此时过氧化氢酶活性最高,没有明显相关性;培养第 1、15、30、45 天时,土壤微生物脲酶活性随着石油浓度的不断增大而减小,与土壤中石油的浓度呈现出明显的负相关,相关系数分别为 -0.933 ($P < 0.05$)、-0.890 ($P < 0.05$)、-0.898 ($P < 0.05$)、-0.951 ($P < 0.05$)。土壤呼吸作用强度和土壤脲酶活性可以作为表征东营孤岛盐渍土壤石油污染程度的敏感生物学和生化指标。

关键词:石油;盐渍化土壤;土壤微生物;土壤呼吸作用强度;土壤酶活性

中图分类号: S154.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0326-03

近年,土壤石油污染是环境污染研究的重要内容,通过土壤微生物相关生理指标来表征石油污染水平的方法已经成为一个研究的热点^[1],但是关于盐渍化土壤石油污染的研究和报道相对不多。基于现状,本研究初步探讨了石油污染对盐渍土壤微生物酶活性和呼吸作用强度的影响,为以后该领域的后续科研活动提供一些建议和理论支撑。

石油污染物进入盐渍土壤后,会对土壤的生态环境产生多方面影响,如对土壤微生物的影响^[2]。土壤微生物是土壤中物质转化的媒介体以及生物圈能量流动和物质循环的主要参与者,它们对地球生境的持续和人类的生存起到决定性作用^[3],开展盐渍土壤石油污染条件下土壤微生物的生态毒理效应研究,建立一套切实可行的生物诊断指标,对于完善和补充土壤微生物生态学具有非常重要的意义。石油及其产品进入土壤能够导致土壤微生物呼吸作用强度、种群数量、群落、结构及微生物量和相关酶活性的变化^[4]。石油长期污染盐渍土壤,会使土壤中形成土著嗜油微生物区系,其中微生物类群以细菌为主,致使细菌的生物总量占绝对优势^[5]。国内外许多学者应用传统的微生物培养技术和前沿的分子生物学技术对石油烃污染土壤中微生物的生态过程进行了大量的研究^[6]。这些研究的大多数结论表明,石油污染能够导致土壤中微生物多样性的降低,同时对土壤微生物的呼吸作用、微生物量碳、相关酶活性也会产生明显的影响^[7]。在研究土壤石

油烃污染对微生物影响的同时,也扩展了对石油降解微生物的认识,发现了许多以前没有发现的降解菌种^[8]。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

H₂SO₄、H₂O₂、高锰酸钾、Na₂HPO₄、K₂HPO₄、甲苯、NaOH、HCl、酚酞、10% 尿素、柠檬酸盐缓冲液(pH 值 6.7)、次氯酸钠、溶液氮的标准溶液、苯酚钠溶液(1.35 mol/L)、恒温培养箱、分光光度计。

1.2 土壤采集预处理及其理化性质

供试土壤采自山东省东营市孤岛地区表层土,采样深度 0~20 cm^[9]。土壤样品经风干,磨碎后通过 3 mm 筛,保存备用,经测定土壤基本理化性质列于表 1。

表 1 东营孤岛地区土壤理化性质

土样编号	pH 值	含水量 (%)	含盐量 (%)	土壤有机质 (g/kg)
1	7.56	1.57	1.10	16.277 7
2	7.72	1.60	1.42	19.817 8
3	7.91	1.42	1.14	18.909 0

1.3 盆栽试验设计与实施

1.3.1 盆栽方案的设计 为研究不同石油污染水平对土壤微生物的影响,以土壤微生物呼吸作用强度、过氧化氢酶活性、脲酶活性为监测评价指标,通过室内盆栽试验开展工作。

根据东营市孤岛地区土壤石油、盐渍化污染实际情况并结合前人的研究成果,设计了 5 个不同浓度梯度的石油污染水平,分别为 0、1 000、2 000、3 000、4 000 mg/kg。

收稿日期:2013-03-18

基金项目:国家环境保护公益性行业科研专项(编号:201109022)。

作者简介:邓如莹(1988—),男,山东济宁人,硕士研究生,主要研究方向为环境监测。E-mail: dengruying@163.com。

通信作者:崔兆杰,博士,研究方向为环境监测。Tel: (0531) 88361176; E-mail: cuizj@sdu.edu.cn。

1.3.2 盆栽方案实施方法 按预先设计好的污染水平称取适量的石油,将其与土样充分混匀;土样分装于普通市售花盆中,每盆装土 500 g;然后置盆于 25 °C 恒温光照培养箱中进行培养。每个水平平行设置 3 个样盆。整个试验过程中土壤湿度保持在最大持水量的 50% ~ 60%。于培养后 1、15、30、45 d 分别取样分析测定。

1.3.3 土壤微生物呼吸作用强度、过氧化氢酶活性、脲酶活性的测定方法 土壤微生物呼吸作用强度的测定采用碱吸收滴定法(密闭法),按每消耗 0.1 mol/L NaOH 1 mL 相当于 2.2 mg 二氧化碳,计算出二氧化碳释放量;过氧化氢酶活性的测量采用高锰酸钾滴定法,用不加土壤的基质作对照测定,并根据对照和式样 0.1 mol/L 高锰酸钾的滴定差,求出相当分解的过氧化氢的量的 0.1 mol/L 高锰酸钾消耗值(设消耗 0.1 mol/L 高锰酸钾为 1 个单位 U,土壤过氧化氢酶活性以 U/g 表示);脲酶活性的测定采用苯酚钠-次氯酸钠比色法,脲酶活性以 24 h 后 5 g 土壤中 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 的数量(mg)表示土壤脲酶活性(Ure)^[10]。

2 结果与分析

2.1 不同浓度石油胁迫下土壤微生物呼吸作用强度的变化

不同浓度石油对土壤微生物呼吸作用强度的影响如图 1 所示。从图 1 看出,当石油污染梯度在 0 ~ 4 000 mg/kg 之间变化时,土壤微生物呼吸作用强度与石油浓度在该范围内呈显著正相关。具体分析如下:培养 1 d 时,石油浓度与呼吸作用强度相关性不明显。5 个处理组呼吸作用强度变化不大,唯有石油浓度为 2 000 mg/kg 的处理组所得呼吸作用强度值稍高一些,这可能是由于土壤微生物尚未完全适应新的污染环境,而适量的土壤石油含量还是为土壤微生物的呼吸作用提供了适宜所需的碳、氮源所致^[11]。培养 15 d 时,石油浓度与呼吸作用强度有明显相关性,相关系数 0.889 ($P < 0.05$)。各处理组土壤微生物呼吸作用强度逐渐呈现出一定的差异和区别,含石油的 4 个处理组微生物呼吸作用强度值皆高于对照组,这说明石油的存在为微生物呼吸作用的相关酶提供了所需的能源和营养物质,从而促使其呼吸作用强度的提高^[12],但是石油含量为 4 000 mg/kg 的处理组所得呼吸作用强度值低于 3 000 mg/kg 处理组的结果,这在一定程度表明,土壤微生物尚未完全耐受高石油含量的污染环境,从而表现出一种抑制的状态。培养时间为 30 d 时,石油浓度与呼吸作用强度有明显相关性,相关系数 0.998 ($P < 0.1$)。各处理组呼吸作用强度变化趋势相当明显,呈现出明显递增的规律,具体来说,随着石油含量的升高,土壤微生物呼吸作用强度逐渐增强,这是由于随培养时间的延长土壤微生物群落中的优势菌群数量和耐受性不断增强的缘故,使得残存于土壤中的石油被优势微生物高效降解,这类似与高效石油降解菌的筛选过程。培养 45 d 时,石油浓度与呼吸作用强度有明显相关性,相关系数 0.964 ($P < 0.1$)。各处理组呼吸作用强度呈现出的规律和第 30 天培养结果基本一致,这说明土壤中优势菌群已经很好地适应了高石油含量的土壤环境,其呼吸作用强度基本趋于稳定。由于缺乏足够的呼吸作用所需的碳、氮源,对照组呼吸作用强度逐渐降低。综上所述,随着石油浓度的不断增加,土壤微生物呼吸作用强度呈现出强烈的

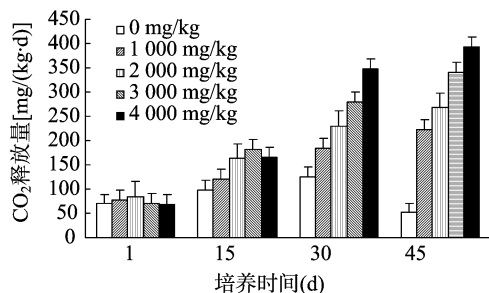


图1 不同浓度石油处理土壤呼吸作用强度的变化

递增规律,这说明两者之间存在显著的正相关。

2.2 不同浓度石油胁迫下土壤微生物过氧化氢酶活性的变化

不同浓度石油对土壤微生物过氧化氢酶活性的影响如图 2 所示。从图 2 看出,当石油浓度在 0 ~ 4 000 mg/kg 范围内变化时,随着石油浓度的增大,过氧化氢酶活性呈现出先增大后减小的变化规律,并没有显示出很明显的递增或减小的单一变化规律,没有呈现出相关性。培养 1 d 时,各处理组的过氧化氢酶活性变化不大,这可能是由于土壤中微生物尚未适应石油所形成的新的污染环境^[13],而表现出一种暂时的迟缓性;石油浓度为 1 000、2 000、3 000 mg/kg 的处理组过氧化氢酶活性皆高于对照组,这说明适量浓度的石油可以在一定程度上促进土壤微生物过氧化氢酶活性的提高;但是石油浓度为 4 000 mg/kg 的处理组的过氧化氢酶活性要低于其他 4 个处理组,这是由于土壤微生物面对高浓度的石油污染物过氧化氢酶活性呈现出的一种抑制作用^[14];培养 15 d 时,各处理组的过氧化氢酶活性差异性开始出现,具体表现为石油浓度为 4 000 mg/kg 的处理组过氧化氢酶活性明显小于其他 4 个处理组,石油浓度为 2 000 mg/kg 的处理组土壤过氧化氢酶活性最高,这是由于适量低浓度的石油促进了土壤中优势菌群的生长,从而使得其过氧化氢酶活性得到提高^[15];其他 2 组与对照相差不大但皆小于对照组,这可能是由于高浓度的石油在一定的培养期间内对微生物的生长产生了抑制作用;培养 30 d 时,石油浓度为 1 000、2 000、3 000 mg/kg 的处理组皆高于对照组,石油浓度为 4 000 mg/kg 的处理组过氧化氢酶活性与对照组基本相等;培养 45 d 时,土壤过氧化氢酶活性所呈现的变化规律与培养 30 d 时的规律基本一致,这就说明培养 30 d 后土壤微生物过氧化氢酶活性变化趋势基本稳定。

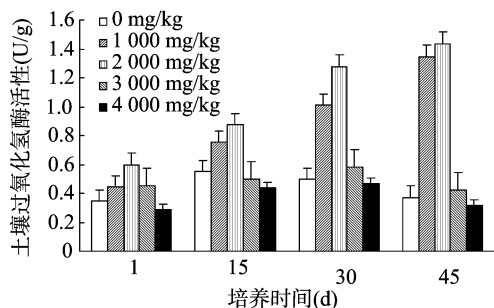


图2 不同浓度石油处理土壤过氧化氢酶活性的变化

上述讨论表明:盐渍化土壤条件下,当石油浓度在 0 ~ 4 000 mg/kg 之间变化时,土壤过氧化氢酶活性大致呈现出先增加后减小的趋势。具体表现为:当石油浓度在 1 000 ~

2 000 mg/kg 之间时,此刻土壤微生物过氧化氢酶活性最高,表现出跳跃式的增长;当石油浓度从 3 000 ~ 4 000 mg/kg 之间变化时,相比对照组,虽然过氧化氢酶的激活效应仍有提高,但土壤过氧化氢酶活性增大的幅度却开始减少,这说明更高的石油污染量将会导致土壤过氧化氢酶活性的降低。综上所述,土壤过氧化氢酶活性与石油浓度相关性不明显。

2.3 不同浓度石油胁迫下土壤微生物脲酶活性的变化

不同浓度石油对土壤微生物脲酶活性的影响如图 3 所示。当石油浓度不断增大,土壤微生物脲酶活性呈现出明显递减的变化态势。培养 1 d 时,已呈现出较为明显的递减规律,此时石油浓度和脲酶活性显著相关,相关系数为 $-0.933 (P < 0.05)$ 。对照组和石油浓度为 1 000、2 000 mg/kg 处理组的土壤脲酶活性相差不大,但两者还是略小于对照组,石油浓度为 3 000、4 000 mg/kg 处理组的脲酶活性皆明显小于对照组,这是由于土壤中石油的存在抑制了微生物脲酶活性的提高。培养 15 d 时,石油浓度和脲酶活性显著相关,相关系数为 $-0.890 (P < 0.05)$ 。对照组脲酶活性增长趋势明显,这是由于土壤微生物逐渐适应了新的生存环境,新陈代谢功能逐渐恢复提升^[16]。其余 4 个石油处理组与培养 1 d 时比较,土壤脲酶活性变化不大,这可能是由于土壤中降解石油的优势菌群尚未形成一定的生长规模,降解石油中氮氧化合物的能力还没有得到强化,也可能是土壤脲酶活性已经被石油污染物明显地抑制了^[17]。培养 30 d 时,石油浓度和脲酶活性显著相关,相关系数为 $-0.898 (P < 0.05)$ 。此时已经明显地呈现出了逐次递减的规律,并且各石油处理组的脲酶活性相比对照组小得多,此时对照组脲酶活性较之前一个监测期也有所下降。培养 45 d 时,此时相关系数为 $-0.951 (P < 0.05)$ 。土壤微生物脲酶的活性变化规律已趋于稳定,这有力地说明了石油浓度的大小与土壤微生物脲酶活性之间存在着明显的负相关,对照组的脲酶活性较之前 2 个监测期,也呈现出了较为明显的下降趋势,这是由于土壤中营养物质的逐渐消耗和有毒有害代谢物的积累,使得对照组脲酶活性呈现出下降的态势^[18]。综上所述,土壤微生物脲酶活性与石油浓度的大小呈现出明显的负相关^[19]。土壤微生物脲酶活性可以作为评价东营孤岛地区盐渍土壤石油污染程度的敏感性生化指标。

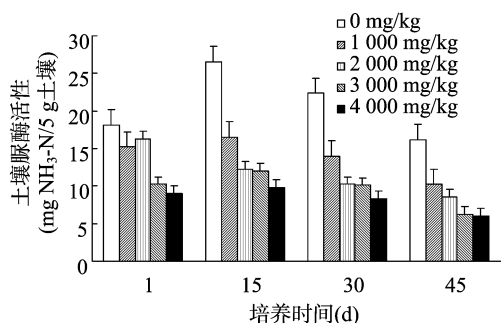


图3 不同浓度石油处理土壤脲酶活性的变化

3 结论和讨论

石油浓度对土壤微生物呼吸作用强度有着明显影响:当石油浓度在 0 ~ 4 000 mg/kg 范围内变化时,培养后 15、30、45 d,土壤微生物呼吸作用强度随着石油浓度的不断增大而

增大,与土壤中石油的浓度呈现出明显的正相关,相关系数分别为 $0.889 (P < 0.05)$ 、 $0.998 (P < 0.1)$ 、 $0.964 (P < 0.1)$ 。但是本研究只是在石油浓度 0 ~ 4 000 mg/kg 范围内进行讨论,更高浓度石油对微生物呼吸作用强度的影响是否还是正相关,尚难以确定。

当石油浓度在 0 ~ 4 000 mg/kg 范围内变化时,土壤微生物过氧化氢酶的活性整体上处于激活的状态,但是酶活性增长的幅度越来越小;当石油浓度在 1 000 ~ 2 000 mg/kg 之间时,土壤酶活性达到最高点,此时酶活性最高;当石油浓度为 4 000 mg/kg 时,土壤酶活性出现降低,这说明过高浓度的石油会抑制过氧化氢酶的活性。由此表明,石油浓度与土壤微生物过氧化氢酶的活性并不存在一定的相关性,这与蔺听等关于石油对土壤酶活性的相关研究结论^[7,9]基本一致。

培养 1、15、30、45 d 时,土壤微生物脲酶活性随着石油浓度的不断增大而减小,与土壤中石油的浓度呈现出明显的负相关,相关系数分别为 $-0.933 (P < 0.05)$ 、 $-0.890 (P < 0.05)$ 、 $-0.898 (P < 0.05)$ 、 $-0.951 (P < 0.05)$ 。

综上所述,在一定石油浓度下土壤微生物呼吸作用强度与石油含量呈显著正相关性;土壤微生物脲酶活性与石油含量呈显著负相关性,两者可作为表征东营孤岛地区盐渍土壤石油污染水平的敏感生物学和生化指标。但本研究未考虑到东营孤岛地区气候变化,石油污染物在土壤中迁移转化的规律等因素,因此科学规范地评价石油对东营盐渍土壤微生物的相关影响还有待进一步全面论证。

致谢:本研究得到了山东省科学院生物研究所的大力帮助,在此表示感谢。

参考文献:

- [1]何良菊,魏德洲,张维庆. 土壤微生物处理石油污染的研究[J]. 环境科学进展,1999,7(3):111-116.
- [2]陆秀君,郭书海,孙清,等. 石油污染土壤的修复技术研究现状及展望[J]. 沈阳农业大学学报,2003,34(1):63-67.
- [3]丁克强,孙铁珩,李培军. 石油污染土壤的生物修复技术[J]. 生态学杂志,2000,19(2):50-55.
- [4]蔡燕飞,廖宗文. 土壤微生物生态学研究方法进展[J]. 土壤与环境,2002,11(2):167-171.
- [5]常志州,何加骏,Weaver R W. 两种土壤上接种微生物对提高石油降解率的影响[J]. 农业环境保护,1998,17(1):16-18,34,48.
- [6]车雄伟,易绍金. 油污土壤的生物处理技术及其影响因素分析[J]. 油气田环境保护,2003,13(2):31-34.
- [7]蔺听,李培军,台培东,等. 石油污染土壤植物-微生物修复研究进展[J]. 生态学杂志,2006(1):93-100.
- [8]孙铁珩,周启星,李培军. 污染生态学[M]. 北京:科学出版社,2001:298-308.
- [9]陈新才. 石油污染土壤生物修复的生态条件研究[D]. 武汉:武汉理工大学,2002:65.
- [10]许光辉,郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京:农业出版社,1986:226-287.
- [11]陈玉成. 土壤污染的生物修复[J]. 环境科学动态,1999,12(2):8-12.
- [12]张晶,张惠文,张勤,等. 长期石油污水灌溉对东北旱田土壤微生物生物量及土壤酶活性的影响[J]. 中国生态农业学报,2008,16(1):67-70.

邓 惠,陈 森,刁晓平,等. 蚯蚓处理甘蔗渣和牛粪混合废弃物的初步研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):329-331.

蚯蚓处理甘蔗渣和牛粪混合废弃物的初步研究

邓 惠^{1,3}, 陈 森^{1,2}, 刁晓平¹, 俞花美⁴, 葛成军^{1,3}, 陈 键^{1,3}

[1. 海南大学/海南省海口市环境毒理学重点实验室, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南海口 571101; 3. 海南大学环境与植物保护学院, 海南海口 570228; 4. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083]

摘要:采用室内模拟培养的方法,利用蚯蚓堆制处理甘蔗渣和牛粪的混合废弃物,研究堆制处理过程中蚯蚓生长繁殖及处理前后混合废弃物的理化性质。结果表明,热带农业废弃物甘蔗渣和牛粪的不同配比基质中赤子爱胜蚓的生长繁殖良好,赤子爱胜蚓的平均体重由初始的 140 mg/条左右增加到 250 mg/条左右,其在 80% 牛粪 + 20% 甘蔗渣处理中繁殖情况最好,产茧数量最多。同时,赤子爱胜蚓对此类热带农业废弃物也具有较好的处理效果,不同配比基质经蚯蚓处理后速效氮和速效磷的含量明显增加。

关键词:蚯蚓;甘蔗渣;牛粪;堆制处理;农业废弃物

中图分类号: X705 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0329-03

我国是一个农业大国,随着我国现代农业集约化和规模化的发展,农业废弃物大量积累,同时由于农业生产水平和农民生活水平的不断提高,对传统农业中用作肥料和燃料的农业废弃物的循环利用逐渐减少,因此农业废弃物越来越多。据有关文献报道,我国产生农业废弃物 40 多亿 t/年,其中农作物秸秆 7.0 亿 t/年,畜禽粪便排放量 26.1 亿 t/年,废弃农膜等塑料 2.5 万 t/年,蔬菜废弃物 1 亿~1.5 亿 t/年,乡镇生活垃圾和人类便 2.5 亿 t/年,肉类加工厂废弃物 0.5 亿~0.65 亿 t/年,饼粕类 0.25 亿 t/年,林业废弃物约 3 700 万 m³/年^[1]。传统的焚烧、还田等处理方式已较难满足农业废弃物可持续利用的需要,而蚯蚓处理有机废弃物作为一种古老而又新生的生物技术应运而生。蚯蚓堆制处理具有处理效果高、可操作性强、成本低、不会产生二次污染等优点^[2-3]。蚯蚓消化吸收农业废弃物产生的蚯蚓粪,不仅是一种优质、高效的生物有机复合肥,同时还因其具有高孔隙率和比表面积

是各种臭气的高效吸附剂^[4]。产生的蚯蚓体本身富含蛋白质、氨基酸等营养物质,可作为动物性饲料,而蚯蚓液中含有丰富的矿物元素和维生素,此外蚯蚓及其制品中还含有丰富的抗菌肽,具有广谱抗菌作用、增强免疫力和抗肿瘤的特效^[5]。关于蚯蚓堆制处理有机废弃物虽然已有较多研究,但关于蚯蚓处理热带地区农业废弃物的研究鲜见报道。本研究探讨了蚯蚓在 2 种热带农业废弃物的物料组合中的生长繁殖情况,以及蚯蚓处理前后物料的理化性质变化情况,以期热带农业废弃物的资源化利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

蚯蚓赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)取自海南大学环境与植物保护学院蚯蚓养殖基地。牛粪和甘蔗渣,分别取自海南大学农学院秀英养殖场和海南省某糖厂,新鲜牛粪和甘蔗渣在试验前预先堆制 30 d,堆肥完成后风干,剔除杂物,破碎,过 5 mm 孔径尼龙筛。堆制后的牛粪和甘蔗渣的基本理化性质见表 1。

表 1 牛粪和甘蔗渣的理化性质

物料	含水率 (%)	pH 值	总有机碳含量 (g/kg)	速效氮含量 (mg/kg)	速效磷含量 (mg/kg)
牛粪	8.22	7.17	43.7	433.86	484.67
甘蔗渣	46.20	6.01	87.9	453.69	156.72

收稿日期:2013-06-06

基金项目:海南省海口市重点科技计划(编号:2009-47);海南省自然科学基金(编号:413123);海南大学本科生创新科研课题(编号:HDCX2012011);海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室开放基金(编号:2012hckled-5)。

作者简介:邓 惠(1988—),女,贵州贵阳人,硕士研究生,从事环境污染修复等方面的科研工作。E-mail: denghui88@sina.cn。

通信作者:葛成军,博士,副教授,从事环境污染控制与资源化等方面的科研工作。Tel: (0898)66162259; E-mail: gcj3007@163.com。

[13]王 梅,江丽华,刘兆辉,等. 石油污染物对山东省三种类型土壤微生物种群及土壤酶活性的影响[J]. 土壤学报,2010,47(2):154-167.

[14]李 慧,陈冠雄,杨 涛,等. 沈抚灌区含油污水灌溉对稻田土壤微生物种群及土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2005,16(7):1355-1359.

[15]陈晓东,常文越,邵春岩. 土壤污染生物修复技术研究进展[J]. 环境保护科学,2001,27(5):23-25.

[16]曹 慧,孙 辉,杨 浩,等. 土壤酶活性及其对土壤质量的指

示研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2003,9(1):105-109.

[17]Bekins, B A, Godsy E M, et al. Distribution of microbial physiologic types in an aquifer contaminated by crude oil[J]. Microbial Ecology, 1999, 37(4): 263-275.

[18]Li H, Zhang A Y. The significance of microorganisms to environment protection in mine engineering[J]. Mine Running in Femd Metal Mine, 1998, 35(4): 18-31.

[19]Atlas R M. Microbial hydrocarbon degradation and bio degradation of oils Pills[J]. Chem Tech, 1991, 529(8): 149-156.