

石油污染土壤的生物修复技术研究^①

李春荣, 王文科, 柴丽红

(长安大学环境科学与工程学院, 西安 710054)

摘要: 从炼油厂污水池底泥中驯化、分离、筛选, 得到 4 种优势石油降解菌。采用摇床培养, 研究了各优势菌和混合菌对石油烃的降解性能; 采用黄豆、苜蓿和混合菌对石油污染土壤进行了植物-微生物联合修复试验。结果表明, 4 种菌和混合菌 25 天可将初始质量浓度为 10000 mg/L 的石油烃依次降解 74.36%、54.36%、78.19%、62.17% 和 83.73%; 运行 120 天, 苜蓿、黄豆试验田污染土壤中的石油烃减少 46.83% 和 41.27%; 外源混合菌的施加使两种植物的降解率分别提高到 67.14% 和 56.92%。苜蓿或黄豆-土著微生物-外源混合菌联合修复石油污染土壤效果显著。

关键词: 土壤; 石油污染; 黄豆; 苜蓿; 生物修复

中图分类号: X53

在原油生产、储运、加工和使用等过程中, 都会有一些原油洒落地面, 使土地受到污染, 对环境产生严重影响^[1]。因此, 石油污染土壤的治理研究受到国内外专家学者的普遍重视^[2-4]。目前, 国内外采用的治理方法主要有物理处理、化学处理和生物处理技术, 其中, 石油污染土壤的生物修复以其操作简单、费用低廉、场地适应性强、无二次污染等特点而倍受关注^[5-11]。国内有关石油污染土壤的生物修复大多还限于实验室研究阶段^[12-15], 利用植物与微生物联合修复的田间试验研究报道甚少^[16]。本文以黄豆、苜蓿为供试植物, 以自主分离的 4 株高效石油降解菌为外源菌, 通过田间模拟试验研究了植物-微生物对石油污染土壤的联合修复作用, 为石油污染土壤的原位修复提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 供试种子和土壤 黄豆 (*Glycine max*) 品种陕豆 125, 苜蓿 (*Medicago sativa* Linn) 品种为金王后, 均购于陕西洛川县种子分公司。试验场地设在陕北黄土高原洛川塬。土壤类型为粉质黏土, 肥力适中, 前茬作物为蔬菜, 土壤 pH 值为 7.2, 总有机 C 18.2 g/kg, 总 N 含量为 1.5 g/kg, 总 P 含量为 1.3 g/kg, Na₂O 16.6 g/kg, K₂O 23.1 g/kg, 阳离子交换量 (CEC) 3.42 cmol/kg, 土壤中嗜油菌背景值为 2.7×10^3 cfu/g。

1.1.2 试验用石油及底泥 原油由延安炼油厂提

供, 相对密度 0.852 ~ 0.893, 属于石蜡基原油。底泥取自延安炼油厂污水池。

1.1.3 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 水 1000 ml; 液体石蜡-无机培养基: K₂HPO₄ 1 g, KH₂PO₄ 3 g, HgSO₄·7H₂O 0.5 g, NH₄NO₃ 0.1 g, CaCl₂ 0.002 g, FeCl₃ 适量, 蒸馏水 1000 ml, 液体石蜡体积分数 1% 或 3% 或 5%; 含油培养基是将上述培养基中 C 源替换为 10000 mg/L 的原油^[17]。正十六烷、异辛烷和苯标准品购自 Aldrich Chemical。

1.1.4 主要仪器 Oil-460 型红外分光测油仪 (北京华夏科创仪器技术有限公司), 752 型紫外分光光度计 (上海光谱仪器有限公司), AL 204-IC 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司), TOC-VCPH 总有机 C 测定仪 (日本岛津公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 石油降解菌的驯化与分离 将经破碎处理的底泥上清液 1 ml 接种到含 1% 液体石蜡-无机培养基, (29 ± 1) °C、120 r/min 摇床培养至培养液变浑浊, 取其中 1 ml 接种于含 3% 液体石蜡-无机培养基中, 继续摇床培养至培养液浑浊, 同样的方法可得到 5% 液体石蜡-无机培养基培养液。取含 5% 液体石蜡-无机培养基培养液 1 ml, 经稀释后, 接种于牛肉膏蛋白胨培养基, (29 ± 1) °C 恒温箱培养 72 h, 用环针挑取不同菌落特征的菌株进行反复分离纯化, 纯化后的菌株保存于牛肉膏蛋白胨培养基斜面, 4 °C 冰箱保藏。

^①基金项目: 国家自然科学基金项目 (40472131) 资助。

作者简介: 李春荣 (1960—), 男, 陕西洛川人, 副教授, 博士研究生, 主要从事水、土污染生物治理研究。 E-mail: changanli@163.com

1.2.2 高效石油降解菌的筛选 各单菌株斜面于 $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱培养 72 h 活化后, 分别接种到 100 ml 牛肉膏蛋白胨培养基, 于 $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、120 r/min 摇床扩大培养 2 天。取 1#、2#、6#、8# 菌扩大培养菌悬液 (含菌量为 $10^{11} \sim 10^{13}$ cfu/ml) 2 ml 分别接种到 100 ml 石油烃初始质量浓度为 10000 mg/L 的含油无机盐培养基中; 取 4 种菌株扩大培养液各 2 ml 作为混合菌, 接种到上述含油无机盐培养基中, 摇床培养 25 天。不同时期取样, 用 15 ml 的石油醚 ($60 \sim 90^\circ\text{C}$, 256 nm 处透光率 $\geq 80\%$) 萃取 3 次, 萃取液经无水硫酸钠干燥后转入 50 ml 比色管中, 定容至刻度。以石油醚作为参比液, 用 752 紫外分光光度计测定不同时期培养液中石油烃质量浓度 (C, mg/L; $\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ nm}$, 1 cm 石英比色皿) [18-19]。实验另设不接种微生物空白对照组 (CK), 每一处理 3 次重复计算平均降解率。

1.2.3 田间试验 试验田分为黄豆试验区 (H01, HJ01), 苜蓿试验区 (M01, MJ01) 和无植被对照区 (K01)。“01”是指于 15 cm 深的耕作土层拌入质量分数为 1% 的原油。具体方法为: 利用环刀法测定供试土壤的体积质量, 通过含水率测定结果计算出供试土壤的平均密度, 进而计算出各试验区所需加入的原油质量。将计算量的原油均匀地喷洒在地面, 待原油大部分下渗后用锄头从不同方向反复锄动并用铁耙反复耙耱, 当日喷灌浇水一次, 次日早、晚各锄、耙一次,

第 3 日再次锄、耙、耱, 多点取样测定土壤中石油烃初始质量浓度, 然后下种。“J01”是指试验区土壤中除拌入质量分数为 1% 的原油外, 分别于下种后的 30、50、70、和 90 天各施上述分离筛选的外源混合菌一次, 施菌剂量为 1 L/m^2 , 菌悬液含菌量为 $10^{12} \sim 10^{14}$ cfu/ml。每块试验区面积 $4 \text{ m} \times 4 \text{ m}$, 黄豆的行距 40 cm, 株距 20 cm, 共 9 行, 每行 15 株; 苜蓿的行距 30 cm, 每行点种 400 粒。各试验区均设一组平行试验区。播种前, 生育季节和施菌后适时灌溉, 采用常规田间管理。于每次施菌后的第 10 天取样, 统计各试验区嗜油细菌的数量; 测定不同时期土壤中石油烃的质量浓度, 根据污染土壤中石油烃初始质量浓度计算石油烃降解率。

1.3 分析方法

微生物计数采用稀释平板计数法。土壤中石油烃含量采用非分散红外分光光度法测定 [20]。

1.4 菌株的鉴定

根据细菌分类手册的标准, 对分离到的菌株进行初步的形态观察和相关生理生化试验, 初步鉴定到属 [21]。

2 结果与讨论

2.1 高效石油降解菌的筛选与降解性能

实验选用的 8#、6#、2#、1# 4 株纯化单菌株及其混合菌株 (H#), 于 5、10、15、20 和 25 天时的石油烃降解率测定结果见表 1。

表 1 分离菌对石油烃的降解率

Table 1 Degradation ratio of petroleum by isolated microorganisms

菌株	5 天	10 天	15 天	20 天	25 天
1#	$32.79 \pm 1.21 \text{ c}$	$47.16 \pm 1.35 \text{ c}$	$58.31 \pm 1.57 \text{ c}$	$66.42 \pm 2.10 \text{ c}$	$74.36 \pm 2.56 \text{ c}$
2#	$27.67 \pm 1.07 \text{ d}$	$35.74 \pm 1.09 \text{ d}$	$42.63 \pm 1.15 \text{ e}$	$49.83 \pm 1.43 \text{ e}$	$54.36 \pm 1.66 \text{ e}$
6#	$38.51 \pm 1.34 \text{ b}$	$53.86 \pm 1.76 \text{ b}$	$62.79 \pm 2.12 \text{ b}$	$70.68 \pm 1.54 \text{ b}$	$78.19 \pm 2.49 \text{ b}$
8#	$28.38 \pm 0.88 \text{ d}$	$45.01 \pm 1.14 \text{ c}$	$51.23 \pm 1.43 \text{ d}$	$57.84 \pm 1.85 \text{ d}$	$62.17 \pm 2.04 \text{ d}$
H#	$40.42 \pm 1.89 \text{ a}$	$55.49 \pm 1.53 \text{ a}$	$66.82 \pm 2.14 \text{ a}$	$75.36 \pm 2.34 \text{ a}$	$83.73 \pm 2.08 \text{ a}$
CK	$12.03 \pm 0.46 \text{ e}$	$17.31 \pm 0.62 \text{ e}$	$20.21 \pm 0.53 \text{ f}$	$21.08 \pm 0.77 \text{ f}$	$21.16 \pm 0.74 \text{ f}$

注: 表中数据为平均值 $\pm$ 标准差 ($n=3$); 同列数据不同字母表示在 $p<0.05$ 水平上差异显著, 下表同。

由表 1 可见, 4 株菌对石油烃均有一定的降解能力。6# 和 1# 菌 10 天降解率达到 53.86% 和 47.16%, 25 天降解率为 78.19% 和 74.36%; 8# 和 2# 降解速度相对较慢, 但 25 天其降解率也分别达到了 62.17% 和 54.36%。混合菌降解速度高于 4 种单菌株, 25 天降解率达到 83.73%。这可能是因为单一菌株培养时只能代谢一定范围内不同种类的烃, 对石油这样一个复杂的混合物将具有不同酶活力的菌株进行

混合培养对石油烃降解会产生协同和共代谢作用。15 天后由于挥发等非生物降解趋于缓慢, 基本稳定在 21% 左右。第 25 天 6#、1#、8#、2# 单菌和混合菌生物降解率分别为 57.03%、53.20%、41.01%、33.20% 和 62.57%, 生物降解占主导地位。

2.2 田间试验石油烃降解

田间试验各处理单元土壤中嗜油细菌数统计结果及石油烃降解率测定结果见表 2 和表 3。可见, 运行

至 30 天各处理降解率与对照无显著差异,这是因为这一时期黄豆、苜蓿均处于幼苗期,根系纤细、弱小,根际增效作用不明显,石油烃的去除主要依靠自然挥发的非生物降解和少量适应性较强的土著微生物的生物降解。60 天 4 种处理的降解率明显高于对照,且 HJ01、MJ01 区降解率分别较 H01、M01 高出 15.48% 和 7.55%;90 天以后各处理石油烃降解速度明显加快,这与试验区嗜油菌数量的变化是一致的。至 120 天,M01 和 H01 处理的降解率分别高出对照 93.50% 和 70.61%。这是因为这一时期植物本身可以吸收、积累和降解部分石油烃,更重要的是植物根际圈已形成,为微生物提供了旺盛的最佳生长场所,根际区的微生物与植物形成共生作用并增加了生物酶的多样性或产生特种酶,降解不能被细菌或真菌单独转化的有机物(如芳香烃);植物根区分泌物(糖、蛋白质、氨基酸等低分子有机物)可刺激细菌的生长繁殖;植物的转移氧化作用,使根区的好氧代谢加快进行^[22]。100 天,HJ01、MJ01 区嗜油菌数量分别较 H01、M01 区增加了 33 倍和 34 倍;120 天,MJ01、HJ01 区的降解率较 M01、H01 提高了 43.37% 和 37.92%,分别达到 67.14% 和 56.92%。外源混合菌的投加对生物修复起到了强化作用。这是因为供试菌(芽孢杆菌、假单孢菌,节杆菌和微杆菌)是来自于微生物多样性的含油底泥,它们不仅对石油烃具有强的降解能力,而且对石油污染的环境有较强的适应性^[23]。其次,植物根际圈存在的丰富有机质营养物不仅为外源菌的生长、繁殖提供了充足营养源,而且外源菌在对根际圈中的某些有机质或石油烃代谢时,可能刺激某些原本不能转

化或转化石油烃非常慢的土著微生物利用石油烃^[24],加快石油烃的降解。

表 2 土壤中嗜油细菌数统计结果
Table 2 Statistical figures of oilophilic bacteria in soil

处理	细菌数 (cfu/g)			
	40 天	60 天	80 天	100 天
K01	1.9×10^4 e	6.3×10^4 e	2.7×10^5 e	7.8×10^4 e
H01	2.1×10^4 d	1.6×10^5 c	4.5×10^5 c	6.1×10^5 c
HJ01	2.3×10^5 b	3.4×10^6 a	9.5×10^6 a	2.1×10^7 a
M01	2.4×10^4 c	1.3×10^5 d	3.5×10^5 d	5.4×10^5 d
MJ01	2.6×10^5 a	3.1×10^6 b	8.1×10^6 b	1.9×10^7 b

表 3 各处理区石油烃的降解率
Table 3 Degradation ratio of petroleum in treatments

处理	细菌数 (cfu/g)			
	30 天	60 天	90 天	100 天
K01	20.21 ± 1.51 a	21.76 ± 1.78 d	23.62 ± 2.06 d	24.19 ± 2.11 e
H01	20.96 ± 1.41 a	24.61 ± 1.18 c	32.78 ± 2.17 c	41.27 ± 1.56 d
HJ01	21.07 ± 1.37 a	28.42 ± 1.23 a	42.89 ± 2.51 a	56.92 ± 2.28 b
M01	21.12 ± 1.56 a	23.97 ± 1.91 c	32.28 ± 2.20 c	46.83 ± 2.69 c
MJ01	21.17 ± 1.24 a	25.78 ± 1.32 b	37.64 ± 1.92 b	67.14 ± 3.51 a

2.3 降解菌株的鉴定

对实验选用的 4 株菌进行了菌体形态特征及生理生化试验,结果见表 4。根据常用细菌鉴定方法初步确定 1# 为芽孢杆菌属,2# 为假单孢菌属,6# 为节杆菌属,8# 为微杆菌属。

表 4 4 株试验菌株鉴定结果
Table 4 Identifying results of the four testing strains

菌株	颜色	形状	芽孢	革兰氏染色	需氧性	硝酸盐还原	氧化酶	接触酶	葡萄糖发酵
1#	乳白	杆状	+	+	兼性厌氧	+	+	+	+
2#	乳白	短杆状	-	-	好氧	+	+	+	-
6#	乳白	短杆状	-	+	好氧	+		+	-
8#	淡黄	短杆状	-	+	好氧	+	+	+	+

3 结论

(1) 通过梯度驯化分离筛选的 1#, 2#, 6# 和 8# 高效石油降解菌,25 天石油烃降解率分别达到 74.36%、54.36%、78.19% 和 62.17%。初步鉴定 4 株菌分别为:芽孢杆菌属(*Bacillus*),假单孢菌属(*Pseudomonas*),节杆菌属(*Arthrobacter*),微杆菌属(*Microbacterium*)。

(2) 选用 4 株菌的混合菌为外源菌与苜蓿、黄豆两种植物对石油污染土壤进行植物-微生物联合修复,处理 120 天石油烃的降解率分别达到 67.14% 和 56.92%,取得了较好的修复效果。

参考文献:

[1] Betts WB. Bioremediation: An alternative treatment for oil pollution. The Genetic Engineering and Biotechnology, 1993, 13:

- 49-59
- [2] 秦煜民, 隋智慧, 魏有权. 应用生物修复技术处理石油污染土壤. 石油与天然气化工, 2002, 31(6): 333-335
- [3] 黄廷林, 解岳, 王晓昌, 王志盈, 杨永哲, 任勇翔, 张荔. 延河沉积物的石油污染调查与分析. 环境工程, 2000, 18(4): 62-64
- [4] 孙庆峰, 余仁焕. 石油污染土壤处理技术研究的进展. 国外金属矿选矿, 2002, 32(12): 4-9
- [5] 陈燕, 李寅, 堵国成, 陈坚. 石油污染水体的生物修复. 水处理技术, 2003, 29(5): 249-252
- [6] 任磊, 黄廷林. 石油污染土壤的生物修复技术. 安全与环境学报, 2001, 1(2): 50-54
- [7] Margesin R, Schinner F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine Glacier Sking area. Appl. Environ. Microbio., 2001, 67(7): 3127-3133
- [8] Fan CY, Krishnamurthy S. Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils. Journal of the Air and Waste Management Association, 1995, 45(6): 453-460
- [9] Ding KQ, Luo YM, Sun TH, Li PJ. Bioremediation of soil contaminated with petroleum using forced-aeration composting. Pedosphere, 2002, 12(2): 145-150
- [10] 李春荣, 王文科, 曹玉清, 王丽娟. 石油污染土壤的生态效应及修复技术研究. 环境科学与技术, 2007, 143(30): 4-6
- [11] 邹德勋, 骆永明, 徐凤花, 滕应, 李振高. 土壤环境中多环芳烃的微生物降解及联合生物修复. 土壤, 2007, 39(3): 334-340
- [12] 任华峰, 单德臣, 李淑芹. 石油污染土壤生物修复技术的研究进展. 东北农业大学学报, 2004, 35(3): 373-376
- [13] 李春荣, 王文科, 曹玉清, 王丽娟. 石油污染物的微生物降解. 地球科学与环境学报, 2007, 29(2): 214-216
- [14] 邹德勋, 骆永明, 滕应, 平立凤, 刘五星, 李振高. 多环芳烃长期污染土壤的微生物强化修复初步研究. 土壤, 2006, 38(5): 652-656
- [15] 刘五星, 骆永明, 滕应, 李振高, 吴龙华. 石油污染土壤的生态风险评价和生物修复 I. 一株具有乳化石油能力的细菌分离鉴定. 土壤学报, 2006, 43(3): 461-466
- [16] 何翊, 吴海, 魏薇. 石油污染土壤菌剂修复技术研究. 土壤, 2005, 37(3): 338-340
- [17] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物实验. 北京: 高等教育出版社, 1999: 92-95
- [18] 谢重阁, 孙兰香, 吴钟珩. 油酚监测技术的研究. 中国环境科学丛刊, 1992, 13(6): 19-37
- [19] 潘腊青, 陈芳, 刘奕梅. 紫外分光光度法测定石油类的空白探讨. 干旱环境监测, 1999, 13(3): 176-178
- [20] 国家环境保护总局, 水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 491-497
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 343-378
- [22] 于秀艳, 丁永生. 多环芳烃的环境分布及其生物修复研究进展. 大连海事大学学报, 2004, 30(4): 55-59
- [23] 沈德中. 污染环境的生物修复. 北京: 化学工业出版社, 2002: 48-69
- [24] 周启星, 宋玉芳. 污染土壤修复原理与方法. 北京: 科学出版社, 2004: 167-170

On Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil

LI Chun-rong, WANG Wen-ke, CHAI Li-hong

(College of Environmental Science and Engineering, Chang'an University, Xi'an 710054, China)

Abstract: Four predominant bacteria that can degrade petroleum efficiently were obtained from the sludge in the sewage of Yan'an oil refinery by adapting, purifying and screening processes. The degradation efficiencies of petroleum hydrocarbon of four strains and their mixed strains were studied by the method of shaking cultivation. The bioremediation experiments of oil-contaminated soil were conducted by using soybean, alfalfa and the mixed strains. The results indicated that petroleum hydrocarbon of four strains and mixed strains reduced by 78.19%, 74.36%, 62.17%, 54.36% and 83.73% respectively with the initial concentration of 10000 mg/L after 25 days. The petroleum concentrations in the experimental fields of soybean and alfalfa reduced by 46.83% and 41.27% respectively after 120 days of bioremediation. The introduced mixed microbes increased the biodegradation rate of two plants by 67.14% and 56.92% respectively. Soybean or alfalfa - soil microorganism- introduced mixed bacteria showed the significant effect in the combined bioremediation of oil-contaminated soil.

Key words: Soil, Petroleum pollutants, Soybean, Alfalfa, Bioremediation