土壤中石油烃微生物降解动力学*

申圆圆[1,2] 王文科[2] 李 菁[1] 李春荣[2] 姬 雨[2] 李肖肖[1]

(1. 西安文理学院生物与环境工程学院;2. 陕西省地下水与生态环境工程研究中心)

摘 要 以长安大学渭水校区未被污染的粉质壤土为研究对象,通过土壤灭菌、添加由石油污染土壤红三叶草(*Trifolium Repens Linn*)根际修复区分离筛选得到的 4 株以原油作为惟一碳源和能源的高效石油烃降解菌(动性杆菌、藤黄微球菌、蜡状芽孢杆菌和短小芽孢杆菌),调控反应温度与石油烃初始浓度,研究在土壤中添加优势石油烃降解菌后石油烃降解动力学及其影响因子。结果表明:优势石油烃降解菌对土壤中石油烃降解起主导作用,在 40 d 内,在 2 000 mg/kg 石油烃浓度下添加石油烃降解菌其石油烃降解率是灭菌条件下的 2 倍左右,土壤中石油烃降解菌降解量为 36～271 mg/kg,非灭菌处理半衰期时间短于灭菌处理;在设定的实验温度范围内,石油烃降解速率随着温度增加逐渐加快,在(38±1) ℃时残留量最小为 1 662 mg/kg,半衰期最短;土壤中的石油烃在浓度为 2 000 mg/kg 时降解最快,随着初始浓度的增加,石油烃降解速率呈递减趋势,半衰期逐渐增长。

关键词 土壤; 石油烃; 微生物降解; 动力学

DOI:10.3969/j.issn.1005-3158.2017.04.003 **文章编号**: 1005-3158(2017)04-0011-04

0 引 言

烃类污染物积聚在动物和植物组织会使动物和植物死亡或发生突变。通常用于土壤修复的技术包括物理修复法(如焚烧法、隔离法、换土法、超声清洗法等)[1-2],利用豆科、禾本科或观赏植物修复法[3],微生物修复法[4],植物和微生物联合修复法[5]等。前人的研究表明利用土著微生物降解土壤中的石油烃效率低,因土著微生物适应石油烃需要一个长期过程,而在植物修复过程中,能给微生物提供良好的微生态环境[6]。土著微生物在修复过程中成活困难、活性难提高,致使治理过程延续时间较长成为微生物修复技术的一个突出缺点。植物修复过程中植物的根际区为微生物提供了良好的生存环境,微生物数量在石油烃污染植被区较未种植被区多[7]。在处理石油烃污染土壤过程中,仅靠土壤中的土著微生物无论从处理效果还是处理时间都远远不够,往往需要接入高效降解菌剂。根际区菌种较直接从土壤中提取的菌种具有较好适应性,因此,寻找能够在植物根际区较好生长的高效石油烃降解菌是推进石油烃污染土壤植物和微生物联合修复技术发展的一个重要举措。关于石油烃在自然条件下添加根际外源菌降解研究较少。本文研究在土壤中添加根际外源微生物石油烃降解的动态规律及影响因素,旨在为植物和微生物联合修复石油烃污染土壤提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验试剂与仪器

试剂、材料:牛肉膏、蛋白胨、$(NH_4)_2SO_4$、$CaCl_2$、CCl_4、KH_2PO_4、无水 Na_2SO_4、麸皮。

仪器:HZS-H 恒温水浴振荡器、TDL80-2B 离心机、UV-2450 紫外可见分光光度计、电导率仪、pH 计、氧化还原电位仪。

1.1.2 供试土壤的采集与性质

实验选用长安大学渭水校区未被污染 0～20 cm 粉质壤土作为供试土壤。采集土壤经去除碎石、败叶等杂物、自然风干、研碎、1 mm 筛筛分,自然风干后,储存于广口瓶中备用。按常规分析方法测定各供试土样的有机质含量(重铬酸钾氧化外加热法)、土壤粒级分布(比重计法)、pH 值(水土质量比为 5∶1,电位法)、电导率(水土质量比为 5∶1,电导率仪测定法)、氧化还原电位(水土质量比为 5∶1,氧化还原电位计测定法)、有效钾(四苯硼钠比浊法)、有效氮(碱解扩散法)、有效磷(碳酸氢钠法)[8]。供试土壤基本物理化学性质如下:粉粒(90.8%)、黏粒(9.2%)、有机质(2.3%)、pH 值(7.24)、氧化还原电位(202 mV)、电

* 基金项目:中央高校基础研究计划项目(310829161127)、西安市科技计划项目(CXY1531WL16)。

申圆圆,2012 年毕业于长安大学环境工程专业,现在西安文理学院生物与环境工程学院从事水土污染修复方面的研究及教学工作。通信地址:陕西省西安市科技六路 1 号,710065

导率(128 μS/cm)、有效钾(14.3 mg/g)、有效氮(24.47 mg/g)、有效磷(0.39 mg/g)。

1.2 实验方法

1.2.1 几个实验

①外源微生物对石油烃降解实验

共有18个处理,将样品分成两组,其中一组在高温灭菌器中进行温度115 ℃、压力100 kPa、时间为30 min湿热灭菌;另一组在100 g消毒土样中添加混合菌群5 mL(利用筛选自红三叶草石油污染修复区根际土壤中的优势石油烃降解菌动性杆菌(*Planomicrobium Chinense*(T))、藤黄微球菌(*Micrococcus Luteus*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus Cereus*)和短小芽孢杆菌(*Bacillus Pumilus*)),后三种菌株已经保藏并分别申请了专利,上述菌种按照种子液混合体积比例为1∶1∶2∶1,细菌数量为4.8×10^7个/mL)。称取处理过的土样,按2 000 mg/kg石油烃浓度称取延长炼油厂的脱水原油与上述土样进行混匀处理,每个处理均按照5%质量分数拌入灭菌麸皮,按照C、N、P比例为100∶5∶1比例拌入$(NH_4)_2SO_4$和KH_2PO_4作为N源和P源。实验前把各组土壤含水量均调节为饱和含水量的60%,土壤颗粒处理均匀,培养温度为(27±1)℃,实验过程中利用称重法进行补水,保持含水量基本恒定。

②温度对土壤中石油烃微生物降解影响实验

共有27个处理,按照控制温度分为三组:(27±1)℃、(33±1)℃、(38±1)℃;石油烃浓度均为5 000 mg/kg,土壤含水量同上,添加营养物质和麸皮量同上实验。

③初始污染物浓度对土壤中微生物降解影响实验

共有36个处理,土壤含水量同上,添加营养物质和麸皮量同上,石油烃初加入量为2 000,5 000,7 000,10 000 mg/kg,充分混匀放置于90 mm培养皿中,在(27±1)℃恒温培养箱内进行培养。

以上3个实验中每个处理均重复3次,在添加污染物后0,5,10,15,20,25,30,35,40 d分别取一个处理的样品测定土壤中的石油烃残留量。

1.2.2 实验测定

于三角瓶25 g土样中加50 mL CCl_4,上回流热浸1 h,浸提液经无水Na_2SO_4干燥后过滤至100 mL容量瓶中。继续用2×20 mL CCl_4热浸两次,每次0.5 h,滤液经干燥后合并倒入50 mL容量瓶,用CCl_4定容后,用紫外可见分光光度计测定吸光度值,根据测定的吸光度与浓度关系计算土壤的石油烃含量。利用紫外分光光度法在260 nm波长测定石油烃含量。土壤中石油烃平均回收率分别为82%~105%,标准偏差分别为3%~10%。

1.2.3 数据处理

前人研究表明,微生物的降解动力学过程可以用零级、一级反应模型、Logarithmic模型、Logistic模型、Monod无生长模型等多种模型描述,但当有微生物存在、初始污染物浓度较高的条件下,微生物降解动力学过程应用一级反应模型可以较好模拟。

石油烃在土壤中微生物降解的一级降解动力学方程表达式如下:

$$C_t = C_0\exp(-kt) \tag{1}$$

式中:C_t为t时刻污染物的浓度,mg/g;C_0为初始浓度,mg/g;k为一级反应速率常数,d^{-1};t为时间,d。

其半衰期公式如下:

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{k} \tag{2}$$

2 实验结果

2.1 微生物对土壤中石油烃的降解研究

(27±1)℃时微生物对石油烃的降解情况见表1。

表1 (27±1)℃时微生物对石油烃的降解

时间/d	灭菌土壤		灭菌加外源降解菌		外源微生物降解	
	残留量/(mg/kg)	降解率/%	残留量/(mg/kg)	降解率/%	降解量/(mg/kg)	降解率/%
0	1 940	0	1 940	0		
5	1 899	2.11	1 863	3.97	36	1.86
10	1 862	4.02	1 794	7.53	68	3.51
15	1 829	5.72	1 726	11.03	103	5.31
20	1 800	7.22	1 659	14.48	141	7.27
25	1 775	8.51	1 593	17.89	182	9.38
30	1 736	10.52	1 529	21.19	207	10.67
35	1 705	12.11	1 466	24.43	239	12.32
40	1 675	13.66	1 404	27.63	271	13.97

由表 1 可以看出,土壤中添加的石油烃降解菌有较强的降解石油烃的能力。在 40 d 内添加外源降解菌的土壤中石油烃降解率为灭菌条件下的 2 倍左右,土壤中微生物降解石油烃的含量为 36～271 mg/kg。

土壤中石油烃降解的动力学参数见表 2。

表 2　土壤中石油烃降解的动力学参数

项目	灭菌	添加外源降解菌
降解动力学方程	$y=1\ 940\exp(-0.003\ 6t)$	$y=1\ 940\exp(-0.008t)$
相关系数(R^2)	0.998 3	0.999 6
速率常数	0.003 6	0.008
半衰期/d	193.5	86.63

由表 2 中的降解动力学相关参数可以得到,石油污染土壤中添加外源降解菌处理的降解速率常数大于灭菌处理的,降解半衰期明显短于灭菌处理。从而证明,土壤中添加的 4 株优势石油烃降解菌对土壤中石油烃的处理有明显促进作用。

2.2 温度对土壤中石油烃降解的影响

温度对土壤中石油烃降解的影响见图 1。

不同温度土壤中石油烃降解动力学参数见表 3。

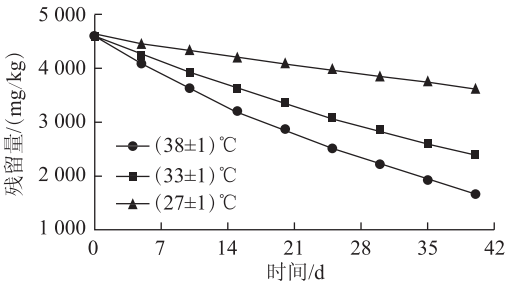


图 1　温度对土壤中石油烃降解的影响

由图 1 可看出,在(27±1)～(38±1)℃,土壤中石油烃的降解速率随着温度的升高而逐渐加快。初始石油烃浓度为 5 000 mg/kg,当温度为(38±1)℃时,土壤中石油烃降解速率最快,其土壤中石油烃的残留量明显低于低温时的残留量,残留量最小为 1 662 mg/kg。

表 3　不同温度土壤中石油烃降解动力学参数

温度/℃	降解动力学方程	相关系数(R^2)	速率常数	半衰期/d
27±1	$y=4\ 616\exp(-0.006t)$	0.999 9	0.006 0	115.50
33±1	$y=4\ 616\exp(-0.017t)$	0.999 6	0.016 5	42.00
38±1	$y=4\ 616\exp(-0.025t)$	0.998 7	0.025 4	27.28

由表 3 可知,温度影响石油烃降解的半衰期。当温度在(27±1)～(38±1)℃时,石油烃浓度在设定的研究范围内,石油烃生物降解常数与土壤中石油烃浓度呈负相关关系,与研究温度呈正相关关系。石油烃降解半衰期与初始石油烃浓度呈正相关关系,与温度呈负相关关系。在(38±1)℃时,初始石油烃浓度为 5 000 mg/kg 时,土壤中石油烃降解半衰期最短,为 27.28 d,(27±1)℃时土壤中的石油烃降解半衰期最长,为 115.50 d,增幅达 4.23 倍。

2.3 初始浓度对土壤中石油烃降解的影响

石油烃初始浓度对土壤中微生物降解的影响见图 2。

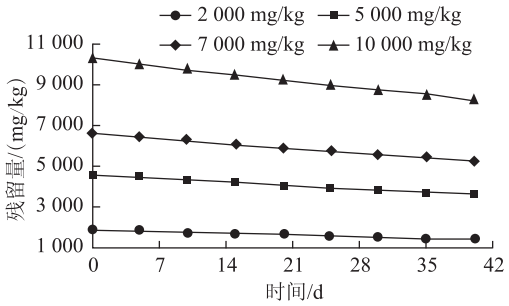


图 2　石油烃初始浓度对土壤中微生物降解的影响

不同初始浓度土壤中石油烃微生物降解动力学参数见表 4。

表 4　不同初始浓度土壤中石油烃降解动力学参数

石油烃浓度/(mg/kg)	降解动力学方程	相关系数(R^2)	速率常数	半衰期/d
2 000	$y=1\ 940\exp(-0.008t)$	0.999 6	0.008 0	86.63
5 000	$y=4\ 616\exp(-0.006t)$	0.999 9	0.006 0	115.50
7 000	$y=6\ 661\exp(-0.0058t)$	0.999 9	0.005 8	119.48
10 000	$y=10\ 340\exp(-0.0056t)$	0.999 9	0.005 6	123.75

由图 2 与表 4 可知,石油烃的初始浓度影响土壤中添加外源降解菌对石油烃的降解能力。在 2 000～10 000 mg/kg 石油烃浓度范围内,土壤中的石油烃为 2 000 mg/kg 时降解速率最快,随着初始浓度增加,石油烃降解速率减慢,通过动力学方程获得的半衰期发现:随着初始浓度的增大,石油烃降解半衰期逐渐增长。

3　讨　论

在本实验中,添加外源石油烃降解菌的土壤中,石油烃降解速率大于灭菌条件的降解速率,证明了添

加外源优势石油烃降解菌对土壤中石油烃的降解有促进作用[9]。

从表 1 可知，土壤在灭菌条件下，石油烃含量也出现减少，说明土壤中的石油烃除微生物降解外还存在其他降解途径，主要包括挥发、光解等，这与李涛等[10]的研究结果一致。通过本实验可以验证土壤温度是影响石油烃微生物降解的重要因素。在本实验设定的(27±1)～(38±1)℃温度范围内，土壤中石油烃的降解速率与温度呈正相关关系，半衰期与温度呈负相关关系。原因可能是温度升高后有利于土壤中石油烃降解菌的不断增殖，从而加快了微生物降解石油烃的速度[11]。温度主要通过两种方式影响有机物类污染物的生物降解速率：一是通过改变石油烃降解菌的生长速度来改变酶的活性；二是温度影响石油烃的理化性质。

本实验中土壤中的石油烃随初始浓度的增加，降解速率变小，半衰期变长，这与前人关于有机污染物初始浓度对其降解速率的影响研究一致[12]。原因可能是在相同数量石油烃降解菌存在下，高浓度的石油烃对微生物的毒害作用大、对微生物活性的抑制作用较低浓度大。

在有些情况下，污染物浓度相对高时，缩短了微生物适应时间，使微生物种群快速增加，从而加快了污染物的降解；另一方面，某些易降解的化合物在高浓度下其毒性会抑制微生物的活性。此外高浓度的石油烃通常会导致土壤颗粒表面聚集较厚的油层，致使营养物和氧缺乏而抑制油层内部石油烃的生物降解。在较高的石油烃浓度下，由于营养、氧的传递限制或挥发性烃产生的毒性而抑制了生物降解。即使降解同一种石油烃，降解方法或降解菌不同，最合适的石油烃浓度也会不同。K. S. M. Rahman 等也发现当 Bombay High 原油浓度由 1%升至 10%时，混合石油烃降解菌对原油的降解率由 78%降至 52%[13]。

4 结 论

①土壤中添加外源优势石油烃降解菌对石油烃的降解速率有促进作用，石油烃的降解半衰期减小；

②在设定的(27±1)～(38±1)℃温度范围内，随着温度的升高，土壤中石油烃的降解速率逐渐加快，半衰期逐渐减小；

③在设定的 2 000～10 000 mg/kg 石油烃浓度条件下，随着初始浓度增加，土壤中石油烃的降解速率减小，半衰期增大。

参 考 文 献

[1] K A KVENVOLDEN, C K COOPER. Natural seepage of crude oil into the marine environment[J]. Geo-Marine letters, 2003, 23(3-4): 140-146.

[2] 王贞国，梁伟，杨询昌，等. 曝气法对石油污染土壤的修复研讨[J]. 山东国土资源，2006，22(6)：107-110.

[3] D M Al-MAILEM, N A SORKHOH, M MARAFIE, et al. Oil phytoremediation potential of hypersaline coasts of the Arabian Gulf using rhizosphere technology[J]. Bioresource technology, 2010(101): 5786-5792.

[4] 李春荣，王文科，曹玉清，等. 石油污染土壤的生态效应与修复技术研究[J]. 环境科学与技术，2007，30(9)：4-6.

[5] F MOHSENZADE, S NASSERI, A MESDAGHINIA, et al. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils: Pre-screening for suitable plants and rhizospheral fungi [J]. Toxicological and environmental chemistry, 2009, 91(8): 1443-1453.

[6] WANG JING, ZHANG ZHIZHONG, SU YOUMING, et al. Phytoremediation of petroleum polluted soil[J]. Petrol. sci. 2008, 5(2): 167-171.

[7] BANKS M K, MALLEDE H, RATHBONE K. Rhizosphere microbial characterization in petroleum-contaminated soil [J]. Soil sediment. contam. 2003, 12(3): 371-385.

[8] 杜森，高祥照. 土壤分析技术规范[M]. 北京：中国农业出版社，2006：105-107.

[9] F CHAILLAN, A LE F LECHE, E BURY, et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms[J]. Research in microbiology, 2004, 155(7): 587-595.

[10] 李涛，石元亮，李学文，等. NBPT 在土壤中的降解及其影响因子[J]. 生态学杂志，2006，25(9)：1082-1086.

[11] LI TAO, SHI YUANLIANG, LI XUEWEN, et al. Degradation and its affecting factors of NBPT in soil [J]. Chinese journal of ecology, 2006, 25(9): 1082-1086.

[12] 苏荣国，牟伯中，王修林，等. 微生物对石油烃的降解机理及影响因素[J]. 化工环保，2001，21(4)：205-208.

[13] K S M RAHMAN, J THAHIRA-RAHMAN, RLAKSHMANPERUMAL SANLY, et al. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium [J]. Bioresource technology, 2002(85): 257-261.

（收稿日期 2017-05-23）

（编辑 王 薇）