

# 高效海洋溢油降解菌降解海洋溢油条件的优化研究\*

姜 珊 王永强 朱 虎 尚琼琼 张秀霞 李 慧

(中国石油大学(华东)化学工程学院)

**摘 要** 针对海洋溢油污染问题,采用实验室筛选的海洋溢油降解菌 HJ01 和 HJ02 开展海洋溢油微生物降解优化研究,采用单因素实验和多因素正交实验进行降解率测定。结果表明,单因素实验条件下,当 pH 值为 7、培养温度 35 ℃、石油初始浓度 7 500 mg/L、NaCl 含量 20 000 mg/L 时,HJ01 和 HJ02 对海洋溢油的降解效果最佳。正交实验条件下,HJ01 在 pH 值为 7、培养温度 35 ℃、石油初始浓度 7 500 mg/L、NaCl 含量 10 000 mg/L 时降解效果最佳;HJ02 在 pH 值为 7、培养温度 30 ℃、石油初始浓度 11 000 mg/L、NaCl 含量 10 000 mg/L 时降解效果最佳。

**关键词** 海洋溢油; 生物修复; 正交实验; 条件优化

DOI:10.3969/j.issn.1005-3158.2018.01.005

文章编号:1005-3158(2018)01-0017-04

## 0 引 言

近年来,由于海上石油工业的迅猛发展,在石油开采、储运过程中海洋溢油事故频频发生。海洋溢油污染对海洋生态环境造成严重的威胁,同时对人类的生产生活产生巨大的影响。石油烃的某些成分有“三致”作用,并能通过食物链在动植物及人体内富集,被列为重点污染物<sup>[1-3]</sup>。石油进入水体后,可导致水生生物死亡,给水资源、生物资源和养殖、旅游业带来巨大损失<sup>[4-6]</sup>。海洋溢油污染对生态环境和人体健康的危害引起了越来越多的关注,治理海洋溢油污染的工作也迫在眉睫<sup>[7-9]</sup>。治理溢油污染常用的处理方法为物理法、化学法和生物法,传统的物理法和化学法不能有效根除溢油污染,且处理费用较昂贵<sup>[10-12]</sup>。微生物降解石油烃的主要机理是通过其产生的特定酶的催化、矿化作用将石油降解为 CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O 和自身生物量<sup>[13-15]</sup>。生物法相比于物理法和化学法具有处理效率高、不产生二次污染、价格低廉等优点<sup>[16-17]</sup>。针对海洋溢油污染问题,本文对从海洋溢油中筛选出的两种海洋溢油降解菌进行了降解特性研究,通过单因素和多因素正交实验对降解条件进行了优化。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

①实验所用油样为东营胜利油田原油。

②实验所用培养基配方及条件如下:

牛肉膏蛋白胨液体培养基:牛肉膏 0.5 g,蛋白胨 1.0 g,NaCl 0.5 g,蒸馏水 100 mL,pH=7,高压蒸汽灭菌,121 ℃灭菌 21 min。

无机盐培养基:NaCl 0.5 g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 g,MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0.025 g,NaNO<sub>3</sub> 0.2 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3 H<sub>2</sub>O 1.0 g,蒸馏水 100 mL,pH=7,高压蒸汽灭菌,121 ℃灭菌 21 min。

含油培养基:在无机盐培养基基础上分别加入 0.5,1.0,1.5 g 原油制作不同初始浓度的含油培养基。

牛肉膏蛋白胨固体培养基:在牛肉膏蛋白胨液体培养基基础上加入 1.5 g 琼脂。

③实验采用菌种为实验室从海洋溢油中筛选出的高效海洋溢油降解菌 HJ01 和 HJ02。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 单因素实验

以含油培养基为基础,分别改变 pH 值、培养温度、石油初始浓度及 NaCl 含量 4 个因素,在恒温生物摇床上振荡培养 7 d 后进行石油降解率的测定与分析。

#### 1.2.2 多因素正交实验

选择 pH 值、培养温度、石油初始浓度、NaCl 含量 4 个因素,自单因素实验结果中各取 3 个较优水平,设计多因素正交实验,在恒温生物摇床上振荡培养 7 d 后进行石油降解率的测定与分析。

### 1.3 降解性能实验

石油烃浓度的测定采用分光光度法。取 10 mL

\*基金项目:山东省自然科学基金(ZR2014EEM011);资助项目:山东省典型海岸带生物资源与生态环境保护修复研究项目。

姜珊,中国石油大学(华东)环境科学与工程专业 2016 级在读硕士,研究方向:水污染控制技术。通信地址:山东省青岛市黄岛区长江西路 66 号中国石油大学(华东),266580

石油醚加入到培养一段时间后的含油培养基中,摇床振荡 10 min,倒入 250 mL 分液漏斗中,静置分层后,将下层液体放回三角瓶中。重复 3 次后,用加入 1 cm 厚无水硫酸钠的漏斗过滤石油萃取液,用石油醚定容至 50 mL,取 0.2 mL 至另一 50 mL 容量瓶,用石油醚定容至 50 mL,在紫外分光光度计 225 nm 处,以石油醚为参比测定吸光度<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素优化实验

#### ①pH 值

用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 或 NaOH 调节无机盐培养基的 pH 值分别为 5,6,7,8,9,各加入相同浓度的菌悬液 1 mL、石油 0.75 g 于 100 mL 调节好 pH 值的无机盐培养基中,于 30 ℃、150 r/min 生物摇床培养 7 d 后进行石油降解率测定。结果见图 1。

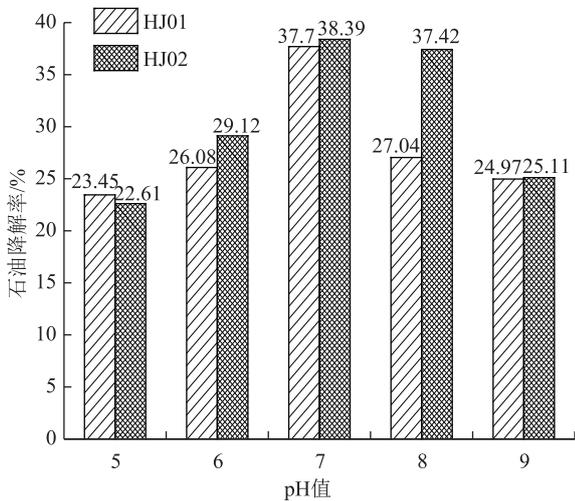


图 1 pH 值对石油降解率的影响

由图 1 可看出,两个菌种在 pH 值为 7 时,对石油的降解率达到最高,当 pH 值低于或高于 7 时,菌种对石油的降解率明显下降,且两菌种受 pH 值影响的变化趋势基本一致。相比于 HJ01,pH 值对 HJ02 的影响更为明显。当 pH 值为 5 时,HJ02 的降解率为 22.61%,当 pH 值为 7 时,降解率为 38.39%,为前者的 1.7 倍。研究结果表明,在中性环境中,HJ01 和 HJ02 对石油的降解率较酸性和碱性环境好,随着环境偏酸或偏碱,菌种对石油的降解效果变差。

#### ②培养温度

用 NaOH 调节无机盐培养基的 pH 值至 7,各加入菌悬液 1 mL、石油 0.75 g 于 100 mL 无机盐培养基中,分别在 25,30,35,40 ℃ 的恒温摇床上,采用 150 r/min 的转速振荡培养 7 d 后进行石油降解率测定。

结果见图 2。

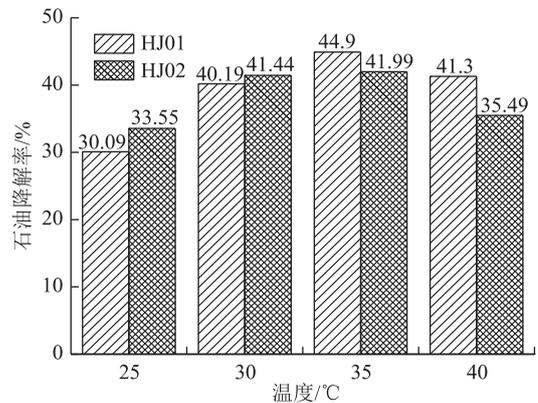


图 2 培养温度对石油降解率的影响

由图 2 可看出,培养温度对两菌种石油降解率的影响较大。在 35 ℃ 左右,两菌种对石油的降解率达到最大,分别为 44.90% 和 41.99%,因此最佳培养温度为 35 ℃。

#### ③石油初始浓度

用 NaOH 调节无机盐培养基的 pH 值至 7,在 100 mL 无机盐培养基中加入石油,使石油初始浓度分别为 3 500,7 500,11 000,14 000 mg/L,分别加入菌悬液 1 mL,于 30 ℃、150 r/min 生物摇床培养 7 d 后测定石油降解率。结果见图 3。

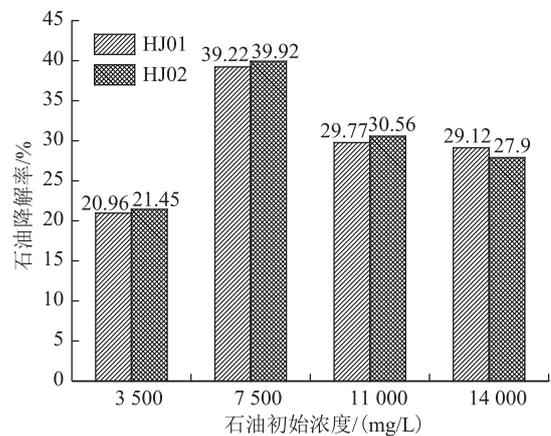


图 3 石油初始浓度对石油降解率的影响

由图 3 可看出,石油初始浓度小于 7 500 mg/L 时,两菌种的降解率随石油浓度的增加而提高,大于 7 500 mg/L 时,两菌种的降解率开始降低。这是由于当石油初始浓度较低时,基数过低导致降解效果不显著;而当石油初始浓度过高时,抑制了微生物的活性,影响了菌体生长<sup>[19]</sup>。研究结果表明,两菌种的耐油范围大致相同。因此,将被处理的石油初始物质浓度控制在一定范围,有利于石油的生物降解。



### 3 结 论

采用实验室从海洋溢油中筛选出的高效海洋溢油降解菌进行海洋溢油降解条件的优化研究,结论如下:

①单因素实验条件下,当 pH 值为 7、培养温度 35 ℃、石油初始浓度 7 500 mg/L、NaCl 含量 20 000 mg/L 时,两菌种对海洋溢油的降解效果最佳。

②多因素正交实验条件下,HJ01 较优培养条件为:pH 值为 7、培养温度 35 ℃、石油初始浓度 7 500 mg/L、NaCl 含量 10 000 mg/L;HJ02 较优培养条件为:pH 值为 7、培养温度 30 ℃、石油初始浓度 11 000 mg/L、NaCl 含量 10 000 mg/L。

#### 参 考 文 献

- [1] 杨雪莲,李凤梅,刘婉婷,等. 高效石油降解菌的筛选及其降解特性[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(1): 230-233.
- [2] ZHANG ZHENGZHI, GAI LIXUE, HOU ZHAOWEI, et al. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils[J]. Bioresource technology, 2010, 101(21): 8452-8456.
- [3] 顾贵洲,王战勇,于泳,等. 石油降解菌株的筛选及鉴定[J]. 辽宁石油化工大学学报, 2007, 27(1): 24-26.
- [4] C J CAMPHUYSEN, M HEUBECK. Marine oil pollution and beached bird surveys: the development of a sensitive monitoring instrument[J]. Environmental pollution, 2001, 112(3): 443-461.
- [5] HASSANSHAHIAN M, AHMADINEJAD M, TEBYANIAN H, et al. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances) [J]. Marine pollution bulletin, 2013, 73(1): 300-305.
- [6] 贾燕,尹华,彭辉,等. 石油降解菌株的筛选、初步鉴定及其特性[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2007, 28(3): 296-301.
- [7] 刘怡辰,曹娟,高国庆,等. 萘降解菌 N19-3 的分离、鉴定和萘双加氧酶基因的检测[J]. 环境科学研究, 2008, 21(5): 27-31.
- [8] REUNAMO A, RIEMANN L, LESKINEN P, et al. Dominant petroleum hydrocarbon-degrading bacteria in the Archipelago Sea in South-West Finland (Baltic Sea) belong to different taxonomic groups than hydrocarbon degraders in the oceans [J]. Marine pollution bulletin, 2013, 72(1): 174-180.
- [9] 杨茜,吴蔓莉,曹碧霄,等. 石油降解菌的筛选、降解特性及其与基因的相关性研究[J]. 安全与环境学报, 2014, 14(1): 187-192.
- [10] WU MANLI, CHEN LIMING, TIAN YONGQIANG, et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media [J]. Environmental pollution, 2013, 178(1): 152-158.
- [11] ERDOGAN E E. Determination of petroleum-degrading bacteria isolated from crude oil-contaminated soil in Turkey [J]. African journal of biotechnology, 2012, 11(21): 4853-4859.
- [12] 塔娜. 海洋石油降解菌的筛选与降解性能研究[D]. 大连: 大连海事大学, 2015: 1-76.
- [13] LEIFER I, LEHR W J, SIMECEK-BEATTY D, et al. State of the art satellite and airborne marine oil spill remote sensing: application to the BP deepwater horizon oil spill [J]. Remote sensing of environment, 2012, 124(9): 185-209.
- [14] YAKIMOV M M, TIMMIS K N, GOLYSKIN P N. Obligate oil-degrading marine bacteria [J]. Current opinion in biotechnology, 2007, 18(3): 257-266.
- [15] 陈梅梅,钱文,田生,等. 耐盐石油降解菌性能及降解条件优化[J]. 油气田环境保护, 2012, 22(3): 7-9.
- [16] ZHANG QIUZHUO, WANG DUANCHAO, LI MENG-MENG, et al. Isolation and characterization of diesel degrading bacteria, sphingomonas sp. and acinetobacter junii from petroleum contaminated soil [J]. Frontiers of earth science, 2014, 8(1): 58-63.
- [17] 高祥兴,高伟,崔志松,等. 海洋石油降解菌群的固定化及石油降解特性[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 732-740.
- [18] 詹亚斌,张桥,陈凯伦,等. 石油降解菌群的筛选、构建及其降解特性研究[J]. 环境污染与防治, 2017, 39(8): 860-864.
- [19] 张丽芳,姜承志,李东辉. 表面活性剂对不同石油降解菌除油影响的研究[J]. 沈阳工业学院学报, 2001, 20(4): 79-83.

(收稿日期 2017-11-06)

(编辑 郎延红)