

勿色杆菌和假单胞菌对原油降解特征对比*

徐荣德^{1,2} 万云洋^{1,2,3} 陈践发^{1,2} 王晓梅⁴ 苏劲⁴

(1. 中国石油大学(北京)地球科学学院; 2. 油气资源与探测国家重点实验室;

3. 油气污染防治北京市重点实验室; 4. 中国石油勘探开发研究院)

摘 要 为对比勿色杆菌属菌种(*Achromobacter* sp) SLTHX114 株和黄色假单胞菌(*Pseudomonas flavescens*) SLTHX214 株对原油降解特征的差异性,在 40℃ 恒温有氧实验室条件下,使用两株原油降解菌对塔里木油田原油进行了生物降解模拟实验,分析了生物降解气组分、生物降解原油的族组分及生物标志化合物变化特征。实验结果表明,革兰氏阴性 SLTHX214 株对原油降解能力强于革兰氏阳性 SLTHX114 株,SLTHX114 株对原油中的饱和烃具有明显的降解作用,而 SLTHX214 株更倾向于降解原油中的芳烃。对土壤石油污染修复和菌种选择具有一定的指示意义。

关键词 生物降解; 勿色杆菌; 黄色假单胞菌; 原油; 土壤修复

DOI:10.3969/j.issn.1005-3158.2019.05.006

文章编号:1005-3158(2019)05-0022-04

0 引 言

在原油的开采、储运过程中,油品的泄漏通常会造土壤污染,石油烃类污染已成为石油石化行业土壤污染的主要形式之一。在众多石油烃污染土壤的修复方法中,微生物修复法具有效率高成本低、无二次污染、应用范围广泛及不破坏生态环境等优点,已成为土壤修复的主流技术之一^[1-2]。

已报道原油降解菌共约 100 余属 200 多种,尚缺针对革兰氏阴性菌(G-)和革兰氏阳性菌(G+)石油烃降解的系统对比研究。其中 G-假单胞菌属(*Pseudomonas*)和 G+勿色杆菌属(*Achromobacter*)^[3]均为较常见的原油降解菌^[4-6]。以往的部分报道认为,假单胞菌属对原油降解效率更高^[7-8],且对苯、萘及蒽等高分子量多环芳烃有较强的降解能力^[9-11],而勿色杆菌属对原油的降解效率相对偏弱,但有较宽的烷烃降解谱^[12]。

本文通过从胜利油田油污土壤中分离筛培出的纯菌黄色假单胞菌(*Pseudomonas flavescens*)和勿色杆菌属菌种(*Achromobacter* sp)在实验室条件下模拟土壤环境中原油微生物降解。首次分析原油降解气组分变化特征并结合降解油族组分及饱和烃生物标记化合物特征,对比分析 G+和 G-的降解特征,为原油烃类污染土壤的微生物修复提供理论依据与技术参考。

1 材 料 与 方 法

1.1 原油样品及菌种来源

原油样品取自塔里木油田 TH13-C 井未遭受生物降解的海相原油,饱和烃组分含量约为 69%,芳烃含量 25.8%。菌种来自胜利油田现场油浸土壤,以原油为唯一碳源,经富集和选择性培养获得的原油降解菌。降解菌经分离获得两株纯菌,经鉴定分别为革兰氏阳性勿色杆菌属菌种(*Achromobacter* sp) SLTHX114 株和典型原油降解耗氧革兰氏阴性黄色假单胞菌(*Pseudomonas flavescens*) SLTHX214 株。培养基配置及菌种富集如下^[13]:

1)配制液体培养基。取酵母膏 0.5 g、胰酰胺 1.0 g、NaCl 0.5 g 置于 200 mL 锥形瓶中,加入 100 mL 蒸馏水配得液体培养基。平均分配到两个 100 mL 锥形瓶中后封口并高温高压灭菌 30 min 左右。

2)石油降解菌摇菌。待培养基灭菌完毕冷却至室温,然后分别向两个锥形瓶中接入 SLTHX114 株和 SLTHX214 株两种石油降解菌。使菌浓达到 10⁹ 个/mL,于 4℃ 下保存。

1.2 原油生物降解模拟实验

将油气运聚地球化学示踪物理模拟子系统的管线转换成并联模式,清洗高压管并干燥,微生物降解模拟实验示意图 1。用蒸馏水将已经过酸碱处理

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No. 41373086);国家重大科技专项(No. 2016ZX05050011, 2016ZX05040002);北京市青年英才计划(No. YETP0670);科技新星与领军人才培养计划(No. Z161100004916033)。

徐荣德,中国石油大学(北京)地球科学学院 2014 级在读博士生,研究方向:微生物地质学。通信地址:北京昌平府学路 18 号,102249。E-mail: wanyunyang@cup.edu.cn。

过的石英砂反复冲洗后置于马弗炉内干燥。取适量石英砂和 40 mL 原油充分搅拌混合后平均装于 4 个高压管中并编号 M_1 、 M_2 、 M_3 和 M_4 号。向 M_1 和 M_2 号高压管中各加入 20 mL 石油降解菌 SLTHX114 株, 向 M_3 和 M_4 号高压管中各加入 20 mL 石油降解菌 SLTHX214 株。最后在 M_1 号和 M_3 号高压管中各加入 20 mL 微生物营养液^[14]。密封高压管, 常压、温度调节至 40℃。每隔 1 周通空气并在第 4 周和第 8 周分别收集原油降解气及中间降解原油样品, 对气体组分、油样族组分、饱和烃色质进行定量分析。同时设置 M_0 作为空白对照样。接种 SLTHX114 株并加入营养液的高压管发生泄漏导致 M_2 号实验数据无效。

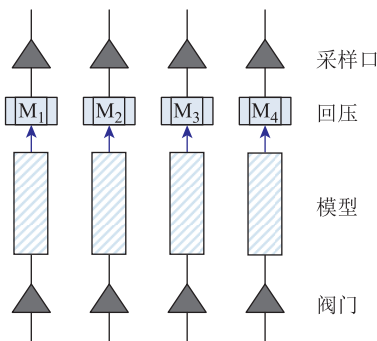


图 1 微生物降解模拟实验示意

1.3 GC-MS、GC-FID 分析

气体组分分析使用美国 Vasson 公司的 US10917013-7890A 型微量气相色谱仪, 每次进样 2 mL。检测条件: 进样温度为 200℃, 检测器(FID)温度 310℃, 气体分析温度为 50℃, 运行时间 20 min; 以氦气为载气, 流速 1 mL/min^[15]。

降解的油水混合物进行油水分离, 用正己烷沉淀沥青质, 然后用硅胶-氧化铝柱层分离出饱和烃、芳烃和非烃。

饱和烃色质分析用 TRACE GC ULTRA 色谱仪, 连接 Thermo DSQII 质谱仪, 使用 30 m 长、HP-5 型、直径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm 的毛细管柱。He 作为载气, 1 cm³/min 恒流。程序升温: 50℃ 恒温 5 min; 50~220℃, 4℃/min; 220~320℃, 2.0℃/min; 320℃ 恒温 25 min, 气化室温度 300℃。

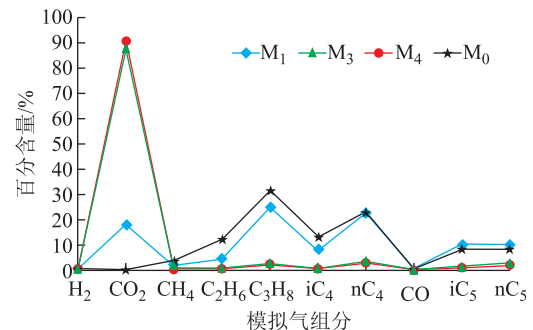
2 结果与讨论

对空白对照样 M_0 接种 SLTHX114 株的 M_1 、接种 SLTHX214 株, 并加入微生物营养液的 M_3 以及接种 SLTHX214 株的 M_4 模拟样品进行第 4 周降解气组分、第 4 周及第 8 周原油族组分以及相关生标化

合物变化特征分析。

2.1 降解气组分变化特征

微生物在对原油降解过程中常伴随着 CO₂ 的产生^[16]。本模拟实验中, 随着降解时间的增加, 第 4 周取得模拟气样组分特征如图 2 所示。接种两种原油降解菌 SLTHX114 株和 SLTHX214 株的模拟实验过程中所产生的降解气 CO₂ 含量均较高(18.26%~90.51%)。对比两种原油降解菌模拟实验降解气组分差异, 发现接种 SLTHX214 株的 M_3 和 M_4 降解气中 CO₂ 表现出高异常现象(分别为 87.36% 和 90.51%), 而烃类组分相对较低。而接种 SLTHX114 株的 M_1 中 CO₂ 含量(18.26%)远低于接种 SLTHX214 株的气样, 而烃类组分(C₂~C₅)含量相对较高, 表明菌株 SLTHX214 对原油的降解能力相对更强。



注: M_1 为接种勿色杆菌并加入微生物营养液; M_3 为接种黄色假单胞菌并加入微生物营养液; M_4 为接种黄色假单胞菌; M_0 为空白对照样。

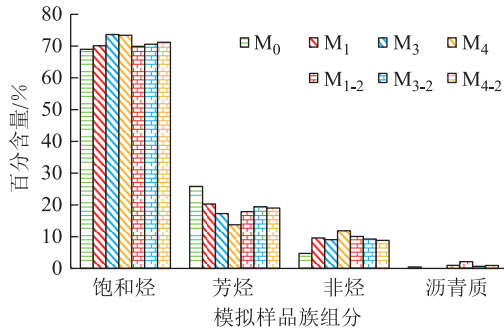
图 2 两种原油降解菌模拟实验降解气组分对比

2.2 原油族组分变化特征

微生物降解原油各组分的难易程度一般为: 饱和烃 > 芳烃 > 胶质和沥青质, 其中芳烃具有数量庞大、结构独特、机理复杂等特征^[17-18], 且其溶解性强, 迁移能力高, 会对土壤及地下水造成较大危害^[19]。

通过模拟实验第 4 周和第 8 周降解原油与原始油样族组分对比分析见图 3, 降解原油中芳烃组分明显降低, 饱和烃、非烃和沥青质含量相对增加, 其中饱和烃含量变化较非烃和沥青质小, 表明两种原油降解菌对原油中饱和烃和芳烃均有降解, 但芳烃组分降解具有相对优势。对比两种降解菌在模拟第 4 周降解原油的族组分含量差异, M_3 和 M_4 样品中芳烃组分含量(分别为 17.8% 和 13.8%)低于 M_1 (20.3%), 而饱和烃含量较高, 表明菌株 SLTHX214 对芳烃的降解强度和速率可能高于菌株 SLTHX114, 体现出不同菌株对原油的降解作用具有速度效应。随着降解时间的增加, 第 8 周测得的 3 个模拟油样的各族组分

含量趋于稳定,菌株 SLTHX114 对原油的降解程度达到与菌株 SLTHX214 相同的效果。对比不同降解时间 M₃ 和 M₄ 原油族组分的变化特征,第 4 周 M₄ 样品中芳烃组分含量明显低于 M₃,至第 8 周两者各组分趋于相同,表明营养液对微生物降解原油启动有协助作用,随着降解时间的增加,降解速率趋于稳定。



注: M₀ 为原始油样; M₁ 为接种勿色杆菌加入微生物营养液; M₃ 为接种黄色假单胞菌并加入微生物营养液; M₄ 为接种黄色假单胞菌; M₁₋₂、M₃₋₂ 和 M₄₋₂ 为降解第 8 周原油。

图 3 两种原油降解菌模拟实验第 4 周和第 8 周降解油族组分对比

2.3 生物标志化合物评价原油降解程度

生物标志化合物是原油中相对较难被微生物降解的一类化合物,因不同化合物对微生物降解的敏感性存在差异,因此常被用来评价原油微生物降解程度。本文对饱和烃主要生物标志物——正构烷烃、类异戊二烯烃和萘类化合物进行了对比分析。

通过对原始油样及生物降解原油的生物标志化合物参数对比见表 1,接种两种菌株的降解原油生标参数 Pr/nC₁₇、Ph/nC₁₈ 和 (Pr+Ph)/(nC₁₇+nC₁₈) 较原始样品明显增大,表明正构烷烃已被微生物降解至一定阈值,并开始与类异戊二烯烃同时被消耗。降解原油中 Pr/Ph 比值远小于未降解油,表明姥鲛烷对生物降解作用较烷烃更敏感,降解速率更大,这与文献报道一致^[20]。两种菌株对原油降解的不同阶段,上述参数均未表现出明显差异。但通过比值参数 C₃₀αβH/(Pr+Ph)变化特征来看,随着降解时间增大,该参数表现出显著增大的特征,且在两种菌株之间也表现出较大的差异。接种菌株 SLTHX114 的降解油样该参数在降解不同阶段均相应的高于接种菌株 SLTHX214 的降解油样,表明菌株 SLTHX114 对饱和烃降解更具优势,且两种菌株对原油的降解等级已达到 4 级降解。

表 1 不同原油降解菌不同时间降解原油中主要生物标志参数对比

样品	降解时间/周	Pr/nC ₁₇	Ph/nC ₁₈	(Pr+Ph)/(nC ₁₇ +nC ₁₈)	Pr/Ph	C ₃₀ H/(Pr+Ph)	伽马蜡烷/C ₃₀ H	Ts/Tm
M ₀	0	0.12	0.01	0.10	1.82	0.05	0.25	1.37
M ₁	4	0.28	0.41	0.34	0.70	0.75	0.12	0.65
	8	0.28	0.38	0.33	0.75	3.74	0.06	0.64
M ₃	4	0.25	0.40	0.32	0.65	0.32	0.08	0.70
	8	0.25	0.39	0.31	0.70	2.99	0.08	0.63
M ₄	4	0.26	0.39	0.32	0.69	0.47	0.12	0.63
	8	0.26	0.40	0.33	0.68	1.62	0.08	0.69

另外,与前人研究成果相反的是,两种菌株降解原油的伽马蜡烷指数及 Ts/Tm 参数随生物降解而表现出降低的趋势。因此,在严重生物降解原油油源对比,沉积环境分析及成熟度评价时,上述参数均不可用。

3 结论

综上所述,革兰氏阴性的黄色假单胞菌(*Pseudomonas flavescens*)SLTHX214 对原油的降解能力和效率强于革兰氏阳性的勿色杆菌属菌种(*Achromobacter* sp)SLTHX114。两种原油降解菌均优先降解原油中芳烃组分,黄色假单胞菌(*Pseudomonas flavescens*)SLTHX214 对芳烃的降解能力相对高于勿色杆菌属菌种(*Achromobacter* sp)SLTHX114,而勿色杆菌属菌种(*Achromobacter* sp)SLTHX114 对原油中饱和烃组分的降解能力相对强于黄色假单胞菌(*Pseudomonas flavescens*)SLTHX214,不同菌种对原油不同组分具有选择性和互补性。自然生态环境中,G+和G-不是单独存在的,其合理菌群的构建,可为原油烃类污染土壤的微生物修复提供理论依据与技术参考。对上述两种原油降解菌的降解机理和土壤降解效率还在进一步研究中。

参考文献

- [1] 万云洋,杜卫东.土壤和沉积物石油类污染防治方法与技术[M].北京:石油工业出版社,2017:117-128.
- [2] 杜卫东,万云洋,钟宁宁,等.土壤和沉积物石油污染现状[J].武汉大学学报(理学版),2011,57(4):311-322.
- [3] 万云洋.原核微生物资源和分类学词典[M].北京:石油工业出版社,2016:9-745.
- [4] PETERS K E, WALTERS C C, MOLDOWAN J M. The biomarker guide [M]. Cambridge: Cambridge University

- Press, 2005, 182-183.
- [5] 田燕, 万云洋, 孙午阳, 等. 高效石油降解菌的筛选及稳定性[J]. 中国石油大学学报(自然科学版), 2018, 4(5): 126-134.
- [6] NORMAN R S, FRONTERA S R, MORRIS P J. Variability in pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide expression during crude oil degradation [J]. Applied and environmental microbiology, 2002, 68(10): 5096-2130.
- [7] 赵姣, 屈撑圉, 鱼涛, 等. 高效原油降解菌的分离鉴定及降解特性分析[J]. 油田化学, 2017, 34(3): 532-537.
- [8] 刘虹, 杨元元, 刘娜, 等. 两种石油烃降解菌的鉴定及其对石油烃底物的降解[J]. 环境污染与防治, 2016, 38(6): 28-33.
- [9] 刘艳霞, 魏刚, 陈晓华. 一株降酚菌的分离鉴定及降解性能研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2012, 39(2): 58-62.
- [10] 路薇, 罗娜, 董文, 等. 一株降解荧蒽的铜绿假单胞菌的筛选鉴定及其特征[J]. 环境科学学报, 2015, 35(11): 3486-3492.
- [11] 廉景燕, 吕勃熠, 刘金彪, 等. 萘降解菌的分离鉴定及在污染土壤生物修复中的应用[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2015, 48(6): 92-98.
- [12] 司美茹, 赵云峰, 苏涛. 高效降解烷烃的无色杆菌 X_L 株的分离鉴定及其降解特性[J]. 土壤通报, 2011, 42(3): 562-567.
- [13] 王京秀, 张志勇, 万云洋, 等. 植物-微生物联合修复石油污染土壤的实验研究[J]. 环境工程学报, 2014, 8(8): 3454-3460.
- [14] 万云洋, 董海良. 环境地质学微生物学实验指导[M]. 北京: 石油工业出版社, 2014: 208-237.
- [15] 林军章, 冯云, 谭晓明, 等. 生物成因稠油与伴生气形成过程模拟研究[J]. 油气地质与采收率, 2017, 24(2): 85-89.
- [16] DU WEIDONG, WAN YUNYANG, ZHONG NINGNING, et al. Status quo of soil petroleum contamination and evolution of bioremediation [J]. Petroleum science, 2011, 8(4): 502-514.
- [17] 万云洋, 朱迎佳, 费佳佳, 等. 环境中多环芳烃结构及其危害[J]. 油气田环境保护, 2017, 27(6): 23-26.
- [18] 费佳佳, 万云洋, 杜卫东, 等. 环境中多环芳烃的分析[J]. 油气田环境保护, 2017, 27(3): 5-8.
- [19] 杜卫东, 万云洋, 钟宁宁, 等. 土壤和沉积物石油污染现状[J]. 武汉大学学报(理学版), 2011, 57(4): 311-322.
- [20] 郭利果, 梁生康, 陆金仁, 等. 2种原油中烃类生物标志化合物生物降解性评价[J]. 环境科学, 2010, 31(8): 1897-1903.

(收稿日期 2019-01-16)

(编辑 王蕊)

(上接第 21 页)

采用曝气生物滤池处理工艺, 最佳水力停留时间为 6.7 h (流量 23 L/h), 处理成本可降到 3 元/m³ 以下。

参 考 文 献

- [1] VANCE G F, KING L A, GANJEGUNTE G K. Soil and plant responses from land application of saline-sodic waters: Implication of management [J]. Journal of environmental quality, 2008, 37(5): 139-148.
- [2] JOHNSON C R, VANCE G F, GANJEGUNTE G K. Changes in soil physical and chemical properties of a cropland irrigated with CBNG co-produced water [C]. Proceedings of a Joint Conference of American Society of Mining and Reclamation 24th Annual National Conference, 2007(24): 350-372.
- [3] 惠熙祥, 巴玺立, 郭峰, 等. 澳大利亚煤层气地面工程技术对我国煤层气田开发的启示 [J]. 石油规划设计, 2013, 24(3): 11-14.
- [4] 毛建设, 綦晓东, 王予新. 煤层气采出水处理技术探讨 [J]. 中国煤层气, 2014, 11(6): 31-35.
- [5] 杜爽. 煤层气藏采出水对环境的影响及治理技术 [J]. 当代化工研究, 2016(2): 20-21.
- [6] 伦伟杰, 赵董艳, 邵强. 多效电催化氧化技术处理煤层气采出水 COD_{Cr} 的试验研究 [J]. 工业用水与废水, 2016, 47(3): 36-38, 48.
- [7] 刘萍, 管保山, 梁利, 等. 煤层气采出水在压裂液中的探索应用 [J]. 中国煤层气, 2017, 14(4): 25-28.
- [8] 接铭训. 鄂尔多斯盆地东缘煤层气勘探开发前景 [J]. 天然气工业, 2010, 30(6): 1-6.

(收稿日期 2019-05-07)

(编辑 李娟)