

油田石油污染土壤微生物修复实验研究

刘小二,张春生,来亚芳,郭东升,杨鲁玉,王红振

(河南省地质矿产勘查开发局 第一地质勘查院,河南 郑州 450001)

摘要:为了有效预防和治理某油田因石油开发而造成的土壤污染,通过实验室选择性富集培养,从该油田石油污染土壤中筛选出了一组降解石油污染的优势菌群,开展石油污染土壤的微生物修复实验.在实验室条件下考察 4 种方法分别对高、中、低 3 种污染浓度的土壤样品的石油降解率的影响,确定出 3 种土壤样品的最佳处理方法.实验结果显示,3 种土壤样品在最佳处理方法下,经过 33 d 降解,其石油烃降解率可达 37.93% ~ 75.70%,说明本实验培养出的优势菌群能够对该油田的油污土壤进行修复,探索了该油田微生物修复技术应用的可行性.

关键词:微生物修复;石油污染;土壤;降解率

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9102(2014)04-0075-06

Laboratory microbial remediation study of oil - contaminated soil in an oil field

LIU Xiao'er, ZHANG Chunsheng, LAI Yafang, GUO Dongsheng, YANG Luyu, WANG Hongzhen

(The No. 1 Geological Exploration Institute of Henan Province, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: In order to prevent and deal with the soil pollution caused by oil exploitation in an oil field, the effective degradation microbial communities, which were lab selective enrichment cultured from oil - contaminated soil of this oil field, was employed for microbial remediation experiments of oil - contaminated soil. Four methods affecting the degradation rate of oil for three soil samples of high, medium, low pollution concentration were observed under laboratory conditions, and the optimum processing methods for three soil samples were determined. The experimental results showed that the degradation rate of petroleum hydrocarbon for three soil samples in the optimal treatment method could reach 37.93% ~ 75.70% after 33 d bioremediation, indicating that the effective degradation microbial communities, cultivated in this experiment, can remediate the oil - contaminated soil of this oil field. This paper has discussed the feasibility of application of microbial remediation technique in this oil field.

Key words: microbial remediation; oil contaminated; soil; degradation rate

自某油田开采石油以来,在取得经济效益的同时,也产生了石油污染土壤等环境问题.在石油的勘探、石油的开采、石油的运输、石油的储存及使用过程中,引起了石油对土壤的污染^[1].石油污染物可使土壤理化性质发生改变,植物的生长发育受到影响,粮食大幅减产,并且食用该污染土地上的植

物产品会损害人类的健康^[2].随着国家对环保工作的日益重视,油污土壤的治理工作已经成为热点问题.

该油田的石油成分主要属于烷烃、环烷烃、芳香烃 3 类,降解速度基本规律是:正构烷烃 > 支链烷烃 > 芳香烃 > 环烷烃 > 支链芳香烃.石油污染物

中毒性较强、降解难度较大的为苯、庚烷、异丁烯、异戊烷、多环芳烃中的苯并 a 芘、苯并 a 蒽等^[3]。

石油污染土壤的修复方法主要有物理修复、化学修复及生物修复 3 种,其中最有生命力,最具代表性的技术为生物修复技术^[4]。由于微生物修复技术较前 2 种修复方式更加有效,所以这里采用的实验方法是微生物修复。陈立等^[5]开展的油污土壤原位修复实验(纯微生物修复方法),在陕北地区获得了较好的效果。笔者结合某油田石油污染土壤的实际情况,采用 4 种处理方法分别对该油田不同污染浓度的表层原污土开展了生物修复实验研

究,探索了生物修复技术在该油田进行应用的有效性、可行性,以期为生物修复技术在后续现场实地处理中,能较好处理该油田油污土壤提供科学依据。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

土壤样品采自该油田被石油污染的土壤,均为表层原污土,经测试分析对比后,最终选择 J1, J6, J7 这 3 个不同污染浓度的典型污染点土壤为本次实验用样品(表 1)。

表 1 土壤样品来源及含油量

样品编号	样品来源	总石油烃/(mg/kg)	含油量/%	污染浓度
J1	采油垃圾堆放点表层原污土	172 263.5	17.20	高浓度
J6	采油废水污染点表层原污土	6 686.0	0.67	低浓度
J7	输油管线破裂点表层原污土	40 569.0	4.06	中浓度

菌种的筛选和优势菌群的构建:取典型污染点的混合污染土样 10 g,加 100 mL 蒸馏水及 1 mL 原油,30 ℃ 摇床培养 5 ~ 7 d,摇床转速 100 r/min。之后接种到以石油为唯一碳源的选择培养基平板上,选择生长良好的菌株在平板上分离和纯化,获取石油降解菌。放线菌和真菌分别用不同的选择性培养基进行培养,并用石油为碳源进行筛选。将筛选得到的细菌、放线菌、真菌等石油降解菌进行初步石油降解实验,即先向无机盐培养基中按 1% 的比例添加原油,再按 1% 的比例接种经过 24 h 培养的菌悬液,摇床培养。5 d 后取出,用三氯甲烷萃取分析。从分析结果判断菌群对石油的降解情况,从而构建出优势降解菌群。

本项实验选择了修复区大部分土样所培养的嗜油微生物细菌和培养的放线菌、真菌类进行了强化、驯化、组合优化实验多达 20 余组次,进行了大量的实验,选出了一组降解石油污染的优势菌群。通过室内筛选培养放大认为,适宜于降解该油田土壤中石油污染物的优势菌群包括:细菌类(主要为假单胞菌属、微球菌属、放线菌属)、真菌类(毛霉、青霉、曲霉)等菌群。

其中优势细菌类均可利用(降解)($nC_8 \sim nC_{16}$)之间的烷烃,及部分芳烃(主要为萘、苯)。优势真菌类利用(降解)烷烃的种类各异,每株真菌

利用烷烃的专一性强,一旦一株真菌利用专一烷烃则生长旺盛,产生的生物量比细菌多。真菌利用的芳烃主要为苯、二甲苯。

本次实验所用化学试剂及主要仪器设备:

化学试剂: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NH_4NO_3 , $CaCl_2$, $FeCl_3$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KCl , $(NH_4)_2SO_4$, $CaCO_3$, $NaCl$, 可溶性淀粉、蔗糖、乳酸、盐酸、酵母膏、牛肉膏、乙酸钠、琼脂、液体石蜡、石油醚、三氯甲烷等均为分析纯。添加的锯末经高温消毒并经紫外灯照射。

玻璃器皿: 150, 250 mL 具塞三角瓶, 250 mL 烧杯、125 和 1 000 mL 磨口细口试剂瓶, 各种不同类型的细菌培养试管、培养皿、橡胶塞等等。

主要仪器设备: QZD-1 型电磁振荡器、KQ218 超声波清洗器、生物恒温培养箱、高速离心机、高压蒸汽灭菌器、无菌实验室、生化培养箱、HZ150L 恒温摇床培养箱、奥林巴斯生物显微镜、岛津 uv-2550 紫外分光光度计、电热干燥箱及各种化学分析用玻璃仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 分析测试方法

本次实验中所采用的分析测试方法:

石油烃含量的测定: 采用紫外分光光度法。

细菌的培养优选: 采用文献[6-9]介绍的方法。

细菌的初步鉴定:采用文献[10]中的方法.

1.2.2 实验条件的选择

根据该油田所在地区的历年来天气情况的相关资料,统计出6~8月份3个月的平均温度为26.7℃,故实验温度选择为27℃.

本次实验的条件选择为采用J1,J6,J7这3个不同污染浓度的土壤样品,经风干后,磨土机磨碎并过297 μm筛,充分混合均匀.实验温度为27℃.分别采用以下4种方法进行实验:(1)污染土样+无机盐溶液,模拟原位微生物修复;(2)污染土样+无机盐+优势菌群菌液修复;(3)污染土样+无机盐+优势菌群菌液+锯末,锯末的作用是使菌种获得更多的空间和附着物,利于氧气进入;(4)污染土样+无机盐+优势菌群菌液+锯末+曝气,曝气法可为菌种提供更多氧气.这4种方法中(1)和(2)方法用于对比原位修复和投加优势菌群修复的效果;(2)~(4)方法可对比不同供氧条件下的微生物修复微环境,便于对比分析何种处理手段适合何种浓度的油污土壤,为后续的实际处理打下坚实基础.

1.2.3 实验步骤

1)将分离筛选的土著石油污染优势降解菌群在培养基中27℃下放大培养5d(培养基为液体:

K_2HPO_4 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, NH_4NO_3 1.0 g, $CaCl_2$ 0.02 g, $FeCl_3$ 微量、石油1%~5%,水1000 mL, pH 7.0, 121℃灭菌30 min备用).

2)用12个250 ml烧杯,每个烧杯中加入100 g风干过297 μm筛的J1,J6,J7土壤样品.每个土壤样品4个烧杯,分别是土+无机盐、土+无机盐+优势菌液、土+无机盐+优势菌液+锯末、土+无机盐+优势菌液+锯末+曝气(2 h/d).锯末的添加量为5%,培养好的菌液加10 ml,加入15 ml液体培养基.

3)每2 d保持含水量25%,补加一半菌液一半无机盐培养液并用玻璃棒搅拌,每天对每组的曝气样品进行曝气2 h.

4)27℃温箱内培养,在0,2,4,6,8,12,15,20,25,33 d分别取出约1 g左右样品,50~60℃烘干研碎,紫外分光光度法测定其中的石油含量.

2 结果与讨论

2.1 J1样品(高浓度)不同处理方法的降解率

J1样品为高油污含量的土壤,使用不同处理方法的降解率见表2,不同处理方法分别贡献的降解率见表3.

表2 J1样品不同运行天数下的降解率

处理方法	降解率/%									
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	12 d	15 d	20 d	25 d	33 d
土+无机盐	0	1.23	1.95	2.80	3.03	3.07	3.46	5.13	6.96	8.09
土+无机盐+优势菌液	0	3.34	6.95	9.88	11.96	13.99	17.65	20.49	21.27	21.63
土+无机盐+优势菌液+锯末	0	5.64	13.31	17.72	21.22	27.84	28.31	29.64	31.06	31.27
土+无机盐+优势菌液+锯末+曝气	0	6.68	15.49	16.79	17.53	24.44	30.90	33.41	37.74	37.93

表3 J1样品不同运行天数下分别贡献的降解率

处理方法	降解率/%										平均贡献/%
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	12 d	15 d	20 d	25 d	33 d	
菌液作用	0	2.11	5.00	7.08	8.93	10.92	14.19	15.36	14.31	13.54	10.16
锯末作用	0	2.3	6.36	7.84	9.26	13.85	10.66	9.15	9.79	9.64	8.76
曝气作用	0	1.04	2.18	-0.93	-3.69	-3.40	2.59	3.77	6.68	6.66	1.66

由表2和表3可知:

1)J1样品的土+无机盐的原位微生物降解率在33 d的降解实验中一直较低,最终为8.09%,可见在原位微生物修复条件下,含油污量高的污染土

壤很难降解.

2)J1样品的土+无机盐+优势菌液处理方法下,33 d的降解实验中降解率均高于土+无机盐的原位微生物降解率,其石油烃降解率最终为

21.63%。加入优势菌液后,最终降解率提高了13.54%,平均贡献的降解率达10.16%,证明培养的优势降解菌群对高油污土壤具有较好的修复效果。

3) J1样品的土+无机盐+优势菌液+锯末处理方法下,33 d的降解实验中降解率均高于土+无机盐+优势菌液处理方法的降解率,其石油烃降解率最终为31.27%。加入锯末后,最终降解率提高了9.64%,平均贡献的降解率达8.76%,证明加入锯末对提高高油污土壤的降解率作用较大。这是因为锯末等支撑物的加入可达到疏松土壤的目的,为微生物提供生长空间和氧气,有利于微生物降解。

4) J1样品的土+无机盐+优势菌液+锯末+曝气(2 h/d)处理方法下,总体上在前期(0~12 d)降解效果比不曝气的方法差,后期的降解效果则远高于不曝气的方法。这是因为非常高浓度的石油污染物对微生物是有毒的,可以阻碍微生物的生长和复制,导致降解实验前期参与降解的微生物数量较少,需要的氧气浓度较低,曝气方法导致氧气浓度过高,对石油降解菌有抑制作用,所以前期降解效果比不曝气的方法差。后期微生物经过一段驯化能

产生代谢污染物的能力,使原本不能够转化或转化非常慢的污染物被代谢降解,微生物的这种适应性促使嗜油菌数量增加,需要的氧气浓度较高,曝气方法提供的充足的氧气可加快微生物的降解进程,所以后期的降解效果则远高于不曝气的方法。由表5可知曝气作用平均贡献的降解率仅为1.66%,证明曝气对提高高油污土壤的降解率作用较小。

5) 可见,对于高油污土壤 J1,最佳处理为土+无机盐+优势菌液+锯末+曝气方法,在33 d的降解实验中最佳降解率为37.93%。土著优势降解菌群的贡献是主要的,锯末的贡献较大,曝气的贡献较小,对于高油污土壤的处理也可以考虑只采用土+无机盐+优势菌液+锯末的方法。

但总体上37.93%的降解率偏低,说明大量的石油污染物还附着于土壤颗粒中,所以对于高浓度的油污土壤 J1,应首先采用焚烧或热脱附等手段,使其浓度降低后,再采用微生物等其他手段处理。

2.2 J6样品(低浓度)不同处理方法的降解率

J6样品为低油污含量的土壤,使用不同处理方法的降解率见表4,不同处理方法分别贡献的降解率见表5。

表4 J6样品不同运行天数下的降解率

处理方法	降解率/%									
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	12 d	15 d	20 d	25 d	33 d
土+无机盐	0	3.29	4.32	9.71	15.66	20.97	26.79	28.81	29.18	35.55
土+无机盐+优势菌液	0	21.72	27.04	38.79	41.07	45.31	58.47	65.90	66.30	67.57
土+无机盐+优势菌液+锯末	0	11.89	19.45	44.93	50.10	54.99	61.09	66.64	68.18	73.30
土+无机盐+优势菌液+锯末+曝气	0	10.66	14.02	54.66	67.49	71.79	72.73	75.11	75.15	75.70

表5 J6样品不同运行天数下分别贡献的降解率

处理方法	降解率/%										平均贡献/%
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	12 d	15 d	20 d	25 d	33 d	
菌液作用	0	18.43	22.72	29.08	25.41	24.34	31.68	37.09	37.12	32.02	28.65
锯末作用	0	-9.83	-7.59	6.14	9.03	9.68	2.62	0.74	1.88	5.73	2.04
曝气作用	0	-1.23	-5.43	9.73	17.39	16.80	11.64	8.47	6.97	2.40	7.42

由表4和表5可知:

1) J6样品的土+无机盐的原位微生物降解率在33 d的降解实验中有较高的降解率,在后期为30%以上,可见原位微生物修复条件下,含油量小的污染土壤中油污容易被分解。

2) J6样品的土+无机盐+优势菌液处理方法

下,33 d的降解实验中降解率均高于土+无机盐的原位微生物降解率,其石油烃降解率最终为67.57%。加入优势菌液后,最终降解率提高了32.02%,平均贡献的降解率达28.65%,证明培养的优势降解菌群对低油污土壤具有非常好的修复效果。

3) J6 样品的土 + 无机盐 + 优势菌液 + 锯末处理方法下,在初期(0~4 d)降解效果比不加锯末的方法差,中后期的降解效果则高于不加锯末的方法.整体上锯末等支撑物的加入可达到疏松土壤的目的,为微生物提供生长空间和氧气,有利于微生物降解.但因为低油污含量的土壤中参与降解的微生物数量很多,种类很多,突然增加氧气浓度后,不同种类的微生物对氧气浓度需求不同,甚至会因为氧气浓度的突然提高而对某些石油降解菌产生抑制作用,所以需要一定的适应期才能达到所有参与降解的微生物均能活力最强,本次实验中的适应期为4 d.过了适应期后,所有参与降解的微生物均达活力最强状态,所以中后期的降解效果高于不加锯末的方法.由表7可知锯末作用平均贡献的降解率为2.04%,证明加入锯末对提高低油污土壤的降解率作用较小.

4) J6 样品的土 + 无机盐 + 优势菌液 + 锯末 +

曝气(2 h/d)处理方法下,在初期(0~4 d)降解效果比不曝气的方法差,后期的降解效果则远高于不曝气的方法.其原因类似于加入锯末的方法在初期(0~4 d)降解率有所下降,而在中后期降解率大大提高的情况.由表7可知曝气作用平均贡献的降解率为7.42%,证明曝气对提高低油污土壤的降解率作用较大.

5) 可见,对于低油污土壤 J6,最佳处理为土 + 无机盐 + 优势菌液 + 锯末 + 曝气方法,在33 d的降解实验中最佳降解率为75.70%.土著优势降解菌群的贡献是主要的,锯末的贡献较小,曝气的贡献较大,对于低油污土壤的处理也可以考虑只采用土 + 无机盐 + 优势菌液 + 曝气的方法.

2.3 J7 样品(中浓度)不同处理方法的降解率

J7 样品为中等油污含量的土壤,使用不同处理方法的降解率见表6,不同处理方法分别贡献的降解率见表7.

表6 J7 样品不同运行天数下的降解率

处理方法	降解率/%									
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	12 d	15 d	20 d	25 d	33 d
土 + 无机盐	0	3.94	3.94	7.69	7.76	10.99	12.99	13.33	16.68	20.29
土 + 无机盐 + 优势菌液	0	4.08	4.86	21.61	31.56	35.37	39.95	41.76	53.49	59.78
土 + 无机盐 + 优势菌液 + 锯末	0	13.25	16.23	21.96	34.47	41.02	46.08	48.15	50.07	55.13
土 + 无机盐 + 优势菌液 + 锯末 + 曝气	0	6.94	12.27	21.25	29.33	40.43	48.31	49.12	49.23	54.56

表7 J7 样品不同运行天数下分别贡献的降解率

处理方法	降解率/%										平均贡献/%
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	12 d	15 d	20 d	25 d	33 d	
菌液作用	0	0.14	0.92	13.92	23.8	24.38	26.96	28.43	36.81	39.49	21.65
锯末作用	0	9.17	11.37	0.35	2.91	5.65	6.13	6.39	-3.42	-4.65	3.77
曝气作用	0	-6.31	-3.96	-0.71	-5.14	-0.59	2.23	0.97	-0.84	-0.57	-1.66

由表6和表7可知:

1) J7 样品的土 + 无机盐的原位微生物修复在33 d的降解实验中有较高的降解率,最终为20%以上,可见在原位微生物修复条件下,含油量中等的污染土壤中油污较易被分解.

2) J7 样品的土 + 无机盐 + 优势菌液处理方法下,33 d的降解实验中降解率均高于土 + 无机盐的原位微生物降解率,其石油烃降解率最终为59.78%.加入优势菌液后,最终降解率提高了39.49%,平均贡献的降解率达21.65%,证明培养

的优势降解菌群对中等油污土壤具有很好的修复效果.

3) J7 样品的土 + 无机盐 + 优势菌液 + 锯末处理方法下,在前中期(0~20 d)降解效果高于不加锯末的方法,后期的降解效果则比不加锯末的方法差.这是因为锯末等支撑物的加入可达到疏松土壤的目的,为微生物提供生长空间和氧气,有利于微生物降解,所以在前中期降解效果高于不加锯末的方法.但随着降解的进行,可能是因为锯末已不能为微生物提供更多的有机质,微生物在降解后期不

能得到较为充足的营养,营养物质比例的失衡逐渐成为限制微生物降解的主要因素,使后期的降解效果比不加锯末的方法差.由表7可知锯末作用平均贡献的降解率为3.77%,证明加入锯末对提高中等油污土壤的降解率作用较小.

4) J7样品的土+无机盐+优势菌液+锯末+曝气(2 h/d)处理方法下,在33 d的降解实验中整体上降解效果比不曝气的方法差.这是因为中等浓度的油污土壤中参与降解的微生物数量和种类较适中,在不曝气的情况下就基本满足了石油降解菌的氧气需要,曝气反而因氧气浓度过高对石油降解菌产生抑制作用.由表9可知曝气作用平均贡献的降解率为-1.66%,证明曝气不能提高中等油污土壤的降解率,反而使降解率降低.

5)可见,对于中等油污土壤J7,最佳处理为土+无机盐+优势菌液方法,在33 d的降解实验中最佳降解率为59.78%.土著优势降解菌群的贡献是主要的,锯末和曝气并不能使降解率提高.

3 结论

1)适宜于降解该油田土壤中石油污染物的菌群包括:假单胞菌属、微球菌属、放线菌属、真菌类(毛霉、青霉、曲霉)等菌群.

2)在高、低、中3个浓度的油污土壤降解中,加入优势降解菌群可使降解率分别提高13.54%,32.02%,39.49%,说明本实验培养出的优势降解菌群对该油田的油污土壤具有较好的修复效果.

3)对不同浓度的油污土壤,优势降解菌群对提高降解率的贡献都是主要的;对高浓度油污土

壤,添加锯末对提高降解率的贡献较大,平均为8.76%;对低浓度油污土壤,增加曝气对提高降解率的贡献较大,平均为7.42%;对中浓度油污土壤,只需使用优势降解菌群修复,锯末和曝气并不能使降解率提高.

参考文献:

- [1] 刘国良,苏幼明,顾书敏,等.石油污染土壤生物修复研究新进展[J].化学与生物工程,2008,25(8):1-4.
- [2] 张子间,刘勇弟,孟庆梅,等.微生物降解石油烃污染物的研究进展[J].化工环保,2009,29(3):193-198.
- [3] Onwurah I N E, Ogugua V N, Onyike N B, et al. Crude oil spills in the environment, effects and some innovative clean-up biotechnologies [J]. International Journal of Environmental Research, 2007,1(4):307-320.
- [4] 孙清,陆秀君,梁成华.土壤的石油污染研究进展[J].沈阳农业大学学报,2002,33(5):390-393.
- [5] 郑昭贤,苏小四,王威.东北某油田污染场地土壤总石油烃背景值的确定及污染特征[J].水文地质工程地质,2011,38(6):118-124.
- [6] 中国科学院南京土壤研究所微生物室.土壤微生物研究法[M].北京:科学出版社,1985.
- [7] 林力,杨惠芳,贾省芬.石油污染土壤的生物整治研究[J].上海环境科学,2000,19(7):325-329.
- [8] 张海荣,李培军,孙铁珩,等.四种石油污染土壤生物修复技术研究[J].农业环境保护,2001,20(2):78-80.
- [9] 何翊,吴海,魏薇.石油污染土壤菌剂修复技术研究[J].土壤,2005,37(3):338-340.
- [10] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.