

石油污染物的微生物降解

李春荣¹, 王文科¹, 曹玉清², 王丽娟¹

(1. 长安大学 环境科学与工程学院, 陕西 西安 710054; 2. 吉林大学 资源与环境工程学院, 吉林 长春 130026)

摘要: 从炼油厂污水池底泥中富集、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。结果表明: 4种菌和混合菌20 d可将初始质量浓度为10 000 mg/L的石油烃依次降解90.8%、88.9%、57.8%、49.8%、91.2%; 培养液中石油烃的半衰期依次为5.5、6、15、19.5 d。初步鉴定4种菌分别属: 节杆菌(*Arthrobacter* sp.)、芽胞杆菌(*Bacillus* sp.)、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)。

关键词: 石油污染物; 嗜油菌; 筛选; 微生物降解

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6561(2007)02-0214-03

Petroleum Pollutions Degraded by Microorganisms

LI Chun-rong¹, WANG Wen-ke¹, CAO Yu-qing², WANG Li-juan¹

(1. School of Environmental Sciences and Engineering, Chang'an University, Xi'an 710054, Shaanxi, China;

2. School of Resource and Environment Engineering, Jilin University, Changchun 130026, Jilin, China)

Abstract The four predominant bacteria that can degrade petroleum efficiently are obtained from the sludge in the sewage of Yan'an Oil Refinery by enriching, adapting, purifying and screening. Their degradation rate is studied with shaking cultivation. The results indicate that petroleum hydrocarbons reduction of 4 strains and mixed strains were 90.8%, 88.9%, 57.8%, 49.8%, 91.2% respectively with initial concentration of 10 000 mg/L after 20 days. The half-life of the petroleum hydrocarbons are 5.5 d, 6 d, 15 d, 19.5 d in cultivation medium. Four petroleum-degraded strains are identified as *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter* sp.

Key words: petroleum pollutants; Oil-degraded microorganism; screening; bioremediation

0 引言

石油工业的飞速发展, 为人类文明和社会进步做出了巨大的贡献。然而, 在石油的开采、运输、储藏、加工过程中, 由于意外事故或管理不当等原因使相当量的石油进入环境, 给人类生存带来极大的危害。据报道^[1], 每年全世界原油进入环境有 8×10^6 t, 中国有 6×10^5 t, 对土壤、地下水、地表水和海洋产生了严重污染。因此, 石油工业发展所带来的环境问题日益受到重视^[2-3]。

针对大面积污染的水体、土壤, 专家们提出了

物理、化学和生物治理技术, 其中微生物治理技术以其操作简单、费用低廉、场地适应性强等特点备受关注^[4-5]。

近十几年来, 该项技术得到了较快发展。然而在石油污染物微生物原位治理中, 土著微生物降解速度较慢, 治理过程耗时较长, 成为该方法难于广泛推广的限制因素^[6]。笔者以某炼油厂污水池底泥为研究对象, 通过驯化、分离得到4株优势菌, 经过降解性能及脱氢酶活性分析测试优筛出2株高效石油降解菌, 为石油污染物的生物修复提供了科学依据。

收稿日期: 2006-12-30

基金项目: 国家重大基础研究计划项目(G1999043606)

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

1 试验材料与方法

1.1 样品来源

底泥取自延安炼油厂污水池;原油取自延安炼油厂 G-7 号原油罐,原油经蒸馏除去了 220 °C 以前轻质组分。

1.2 培养基及所用药品

细菌培养基为牛肉膏-蛋白胨培养基;真菌培养基为察氏培养基;放线菌培养基为高氏合成一号培养基;液体石蜡-无机培养基,成分为: K_2HPO_4 1 g、 KH_2PO_4 3 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、 NH_4NO_3 0.1 g、 $CaCl_2$ 0.002 g、 $FeCl_3$ 适量,蒸馏水 1000 mL,液体石蜡体积分数为 1% 或 3% 或 5%;含油培养基是将上述培养基中碳源替换为 10 000 mg/L 的原油⁷。

1.3 试验方法

1.3.1 微生物分布实验

取 10 g 底泥于含 100 mL 无菌水的三角瓶中,充分振摇后静置,取 1 mL 上清液制成不同质量浓度的稀释液,取 3 个浓度的菌悬液分别接种到普通培养基和含油培养基,于 $(29 \pm 1)^\circ C$ 恒温培养箱培养 2 d,采用稀释平板法计数。

1.3.2 嗜油菌的富集、驯化及分离

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, $(29 \pm 1)^\circ C$ 、110 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, $(29 \pm 1)^\circ C$ 恒温箱培养 72 h,用环针挑取不同菌落特征的菌株于培养基斜面,冰箱 4 °C 冷藏。

1.3.3 嗜油菌降解能力测试

选取 9、7、4、3 号纯化单菌株及其混合菌株分别在石油初始质量浓度为 10 000 mg/L 的无机盐培养基中,于 $(29 \pm 1)^\circ C$ 、110 r/min 摇床培养,用 752 紫外分光光度计测定不同时期培养液中石油 $\rho(\text{烃})/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{max}} = 228 \text{ nm}$, 1 cm 石英比色皿) 及 20 d 脱氢酶活性^{8,9}。

2 结果与讨论

2.1 微生物分布

由表 1 可知,底泥中细菌总数高出真菌和放线

菌 3 个数量级,说明嗜油细菌的存在与石油污染更为密切,底泥中真菌、放线菌较少,可能与油泥所处的潮湿环境有关。底泥中细菌总数与嗜油细菌数量、真菌总数与嗜油真菌数量相差不大,说明底泥中的大部分细菌与真菌对石油均具有一定的降解能力,而其中的放线菌对石油没有降解能力。因而,选择优势细菌作为进一步研究的对象。

表 1 底泥中微生物数量分布

Tab. 1 Distribution of Microorganisms in Bed Mud

微生物类别	总数	嗜油菌
细菌/ 10^5 (个 \cdot g $^{-1}$)	1.6	1.1
真菌/ 10^2 (个 \cdot g $^{-1}$)	1.3	1.0
放线菌/ 10^2 (个 \cdot g $^{-1}$)	1.7	未检出

2.2 优势菌对石油烃降解实验

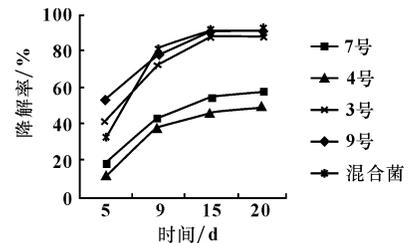


图 1 不同时期各菌株降解率变化

Fig. 1 Changes of Degrading Efficiency of Bacterial Strain as a Function of Time

从图 1 可见,在 $(29 \pm 1)^\circ C$ 摇床培养条件下,4 株菌对石油烃均有降解能力。9、3 号菌对石油烃具有很强的降解能力,在第 5 d 降解率达到 53.8%、41.9%,第 20 d 降解率为 90.8%、88.9%。7、4 号菌降解速度相对较慢,但在第 20 d 其降解率也分别达到了 57.8%、49.8%。混合菌在第 5 d 的降解率低于 9、3 号菌,而高于 7、4 号菌,随后降解速度加快,至第 9 d 混合菌的降解速度超过了 4 种单菌株,第 20 d 达到 91.2%。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,对石油这种复杂的混合物将具有不同酶活力的菌株进行混合培养降解效果应更好。9、3 号菌和混合菌第 15 d 后降解速度减慢,其原因可能是微生物对烷烃的氧化是从低碳到高碳,从正烷烃到支链烷烃,低分子量芳烃、环烃,高分子量芳烃和沥青质逐级进行¹⁰。试验初期到中期易降解的石油组分已被快速降解,剩余一些较难降解的组分微生物利用率低,故后期呈现相对稳定的平缓期。7、4 号菌的培养液中仍有较易降解的组分,只是其本身降解能力较差,所以

后期降解率仍随时间缓慢增长。

脱氢酶活性的高低反映了微生物的活性状态,该值越大表明微生物利用石油烃的能力越强,降解速度越快。为此,采用 TTC-脱氢酶活性常温萃取法测定了 4 株菌及混合菌培养液在培养 20 d 后的脱氢酶活性,结果依次为:326 132、319 306、185 817、168 571、329 698 $\mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$,可见,脱氢酶的活性大小与各菌株对石油烃降解效率变化一致。

对 4 种单菌株降解曲线进行回归分析(图 2、3)。可以看出,石油降解曲线符合一级反应动力学方程

$$\ln \rho(\text{烃}) = \ln \rho(\text{烃})_0 - kt \quad (1)$$

式中: $\rho(\text{烃})$ 为任意时刻石油烃质量浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\rho(\text{烃})_0$ 为初始石油烃质量浓度; k 为速度常数(即基质去除常数, d^{-1})。利用 k 值可以指示不同菌的降解速度^[11]。4 株菌的降解速度依次为:9 > 3 > 7 > 4 号。由式(1)可得石油降解的半衰期公式

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (2)$$

由式(2)计算可得 9、3、7、4 号菌株在摇瓶培养条件下降解石油的半衰期分别为:5.5、6、15、19 d。可见,9 号菌降解半衰期比 7、4 号菌大大缩短。

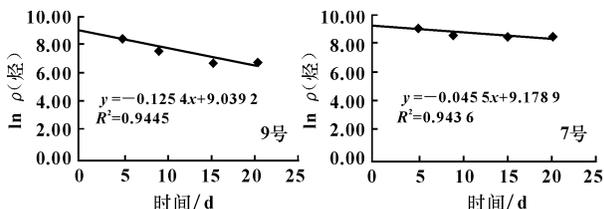


图 2 9、7 号菌培养液石油烃质量浓度随时间变化

Fig. 2 Changes of Petroleum Pollutant Concentration in Culture Medium of 9[#]、7[#] as a Function of Time

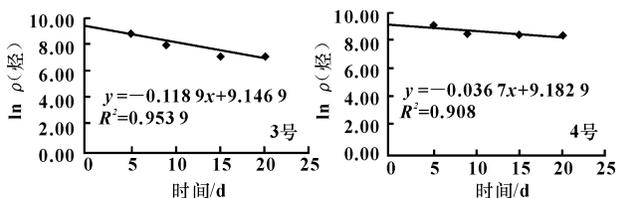


图 3 4、3 号菌培养液石油烃质量浓度随时间变化

Fig. 3 Changes of Petroleum Pollutant Concentration in Culture Medium of 4[#]、3[#] as a Function of Time

2.3 石油降解菌的鉴定

试验用 4 株菌委托西北大学生命科学院进行了鉴定。3、4、7、9 号菌分别属芽胞杆菌(*Bacillus*

sp.)、不动杆菌(*Acinetobacter sp.*)、不动杆菌(*Acinetobacter sp.*)、节细菌(*Arthrobacter sp.*)。

3 结论

(1)液体石蜡为唯一碳源,梯度浓度驯化可使嗜油菌降解能力大大提高,是一种实用有效的嗜油菌筛选方法。

(2)筛选到的 4 株(9、3、7、4 号)优势降解菌,在摇瓶培养 20 d,对石油烃的降解率分别达到 90.8%、88.9%、57.8%、49.8%;石油半衰期依次为 5.5、6、15、19 d。经鉴定 4 株菌分别属于:节细菌(*Arthrobacter sp.*)、芽胞杆菌(*Bacillus sp.*)、不动杆菌(*Acinetobacter sp.*)、不动杆菌(*Acinetobacter sp.*)。

(3)4 种菌株混合后的降解效果略好于 9、3 号菌,明显优于 7、4 号菌,20 d 对石油烃的降解率达 91.2%。

参考文献:

- [1] 许华夏,张春桂. 微生物降解石油污染土壤[J]. 辽宁城乡环境科技, 1998, 18(6): 22-24.
- [2] 陈国华. 水体油污染治理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [3] 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.
- [4] 陈燕,李寅,堵国成,等. 石油污染水体的生物修复[J]. 水处理技术, 2003, 29(5): 249-252.
- [5] Margesin R, Schinner F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel Fuel-contaminated Soil in an Alpine Glacier Sking Area[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7): 3127-3133.
- [6] 龚利萍,张陆耀,罗宇焯. 土壤微生物降解石油污染物[J]. 上海环境科学, 2001, 20(4): 201-202.
- [7] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [8] 谢重阁. 环境中石油污染物的分析技术[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1987.
- [9] 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[J]. 干旱环境监测, 1999, 13(3): 176-178.
- [10] Joseph G L, Colwell R R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment [J]. Microb Rev, 1990, 54(3): 305-315.
- [11] 张旭,李广贺,黄巍. 石油烃污染土层生物修复模拟实验研究[J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2000, 40(11): 106-108.