

# 石油污染土壤生物修复的强化技术

王丽娟, 张翼龙, 王 哲, 侯新伟, 周晓妮

(中国地质科学院 水文地质环境地质研究所, 河北 石家庄 050061)

**摘要:** 为探索石油污染土壤的高效修复方法, 从实验室保存的优势菌中筛选得到 4 株降油效果最佳菌, 采用摇床和恒温培养箱培养, 对含油量为 5% 的石油污染土壤进行微生物菌剂强化处理和环境强化实验。微生物菌剂强化结果表明: 4 种菌和除油效果最好的 A、C、D 混合菌 3 d 可将石油烃依次降解 24%、19.81%、22.55%、26.46%、39.67%; 并对该菌群的最佳投加配比进行确定, A、C、D 菌群数量的最佳配比为  $N_A : N_C : N_D = 1 : 2 : 0.5$ , 3 d 内菌群 A、C、D 在最佳接种配比情况下可将石油烃降解 44.2%。环境强化实验结果表明: A、C、D 菌群在最佳修复条件营养物质 C : N : P 为 75 : 8 : 3、表面活性剂为 0.5%、通气条件为 6 层纱布、电子受体  $H_2O_2$  的加入量为 1.5% 下, 3 d 内石油烃降解 61.46%, 比自然条件下修复的除油率 4.7% 提高了 56.76%, 较只进行菌种强化时最高除油率 44.2% 提高了约 17%。

**关键词:** 石油污染; 细菌菌群; 生物强化; 降解

**中图分类号:** X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6561(2009)04-0427-05

## Study on Enhanced Technology of Oil-contaminated Soil Bioremediation

WANG Li-juan, ZHANG Yi-long, WANG Zhe, HOU Xin-wei, ZHOU Xiao-ni

(Institute of Hydrogeology and Environmental Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Shijiazhuang 050061, Hebei, China)

**Abstract:** In order to explore better treatment process of oil-contaminated soil, four optimized bacteria that can degrade petroleum efficiently are selected from the predominant bacteria which are stored by our laboratory. Their environmental strengthening test and microbial agent strengthening processing were conducted using shaking cultivation and incubator in the oil-contaminated soil containing 5% oil. The results of microbial agent strengthening indicate that the reduction of petroleum hydrocarbons of four strains and a mixed strain are 24%, 19.81%, 22.55%, 26.46% and 39.67% respectively. A test performed to determine the best ratio of the flora ACD shows that the best number ratio of the flora A, C and D is  $N_A : N_C : N_D = 1 : 2 : 0.5$  within 3 d, and the flora A, C and D in the best circumstances can degrade 44.2% oil. The results of environmental strengthening test indicate that the flora A, C and D in the best conditions for the ratio of nutrients C : N : P is 75 : 8 : 3 and the content of surfactant is 0.5%. In the ventilation conditions for the six gauze and E-receptor  $H_2O_2$  is 1.5%, the degradation of petroleum hydrocarbons is 61.46% within 3 d, and the degradation rate increase 56.76% compared with that under natural conditions which is only 4.7%, and increase 17% compared with the degradation rate of 44.2% when only strengthening the bacteria.

**Key words:** oil-contamination; bacterial consortium; bioaugmentation; degradation

## 0 引言

近年来, 西北黄土地区在提高石油及其产品产

量的同时, 对周围地区土壤造成严重污染。这不仅破坏了土壤的结构, 使其功能下降, 还对土壤生态系统产生严重的危害。因此, 随着国民经济迅速发

收稿日期: 2009-01-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(G1999043606)

作者简介: 王丽娟(1981-), 女, 吉林长春人, 实习研究员, 从事地下水开发利用研究。E-mail: wanglijuan0486@163.com

展和环保要求的提高,石油污染土壤的治理是面临的一大挑战。

对石油污染土壤的治理,传统的物理化学处理方法会造成二次污染,同时处理成本高,不符合中国国情。生物修复克服了这些缺点,近年来已经成为国内外环境治理技术的研究热点。而生物强化技术是以提高生物降解效果为目的的一种方法,也日益受到关注<sup>[1-4]</sup>。现阶段的生物强化技术通常是指在生物处理系统中投加具有特定功能的微生物、营养物或基质类似物来改善和优化原有系统的处理效果,促进目标物质的去除效果<sup>[5-7]</sup>。

本实验以石油为典型污染物,从实验前期<sup>[8-9]</sup>筛选并保藏的众多石油降解细菌中选取4株,将它们分别编号为A、B、C、D,并随机混合构建优势菌群,探索其最佳接种配比,对影响菌群降解性能的通气条件、表面活性剂、营养物质、电子受体添加进行正交实验研究,以确定菌群的最适生长条件及其最佳营养条件,系统探讨各影响因子、环境条件及强化技术等对微生物降解的影响,为以后的菌群构建积累经验。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

石油、土壤和油土的制备:原油取自延安炼油厂,土样采自陕北当地未受污染的表层黄土,进行风干、碾压、过筛处理后,按原油与土壤质量比为5:100人工均匀混合,风干3 d,待石油醚挥发干净后备用。

菌种来源:实验所用菌种A、B、C、D为研究室筛选并保藏的众多石油降解细菌中降解能力和生长状况最好的4株细菌。

本实验应用两种原油培养基:

(1)固体原油培养基:自制油土10 g,锯末0.67 g,稻壳0.16 g,尿素0.26 g,过磷酸钙0.14 g(水量保持在污染土壤质量的50%),pH调至6。

(2)液体原油培养基:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>为0.3 g,NaHPO<sub>4</sub>为0.15 g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>为0.4 g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O为0.02 g,酵母粉为0.001 g,原油为2.0 g,pH为7.2。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 确定单菌降解性能

对4株菌A、B、C、D分别以5%接种量接入100 mL液体原油培养基,同时做不接种的对照样,

28℃140 rpm摇床振荡培养72 h后,用重量法测定石油的质量分数。

#### 1.2.2 对比最佳优势菌株与土著生物除油效果

将400 g自制5%的石油污染土壤平均分成40份,每份10 g装入40个250 mL的锥形瓶中,把装有土样的锥形瓶分成两组,每组20个,定期向锥形瓶中添加蒸馏水保持土样湿度,然后向其中一组投加降解菌D的菌悬液后,两组三角瓶放入28℃恒温箱中,投加菌D的样分别在5、10、15、20、25、30、35 d取样测定,而不加优势菌的对照样分别在10、20、30、40 d取样重量法测定石油的质量分数。

#### 1.2.3 构建优势菌群

对4种菌进行2种菌、3种菌和4种菌的随机组合投加,每组的总投加量相等。分别将所得混合菌组以5%接种量接入100 mL原油培养中(250 mL锥形瓶),28℃140 rpm摇床振荡培养72 h后,用重量法测定石油的质量分数。

#### 1.2.4 确定混合菌群的最佳投加配比

确定最优混合菌群后,对该菌群的投资量进行优化,取0.5、1、2 mL等3个水平,采用三因素三水平的正交实验,接种原油培养基(250 mL锥形瓶),28℃140 rpm摇床振荡培养72 h后,采用重量法测含油质量分数。

#### 1.2.5 条件强化实验

选取4个影响石油降解的代表性因素:营养物质、通气条件、氧化剂(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)以及表面活性剂(十二烷基苯磺酸钠),并将其控制在不同的水平,采取四因素三水平的正交实验方案设计实验。其他条件为:温度28℃,pH值7,含水率50%,接种量5 mL,依据确定的最佳接种配比接种于固体原油培养基中,72 h后重量法测含油质量分数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 4株单菌的降解性能

从图1中看出,在污染土壤中投加4株降解菌均较对照样的除油率提高了约15%。其中降解效果最好的D菌株3 d除油率达到了26.46%;其他3株菌降解能力要弱些,菌A为24%,菌B为19.81%,菌C为22.55%,且优势降解菌石油污染物的去除效果均高于林凤翱等<sup>[10]</sup>关于降油菌对胜利油田的石油类7 d的降解率(25.8%~32.8%)的结果。这表明通过筛选所得优势降解菌株可以提高生物处理石油污染土壤的效果。

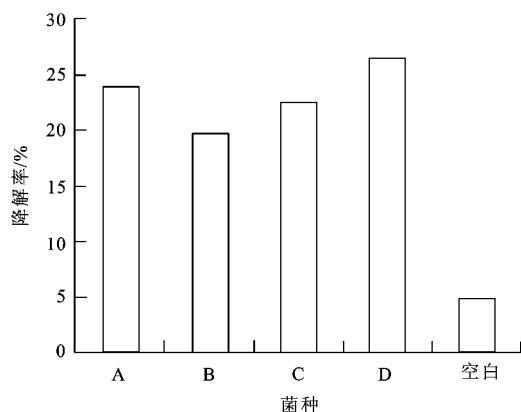


图 1 各单菌降解效果实验

Fig. 1 Degradation Effects of the Single Bacteria

2.2 最佳优势菌株与土著生物除油效果

图 2 表明, 两种菌都可以降解土壤中的石油污染物, 但优势菌 D 对石油的降解起到了关键的作用, 经过 35 d 的培养, 降解效率达到了 56% 以上, 而土著生物在 40 d 的时间里石油的降解率却仅为 30.2%。在整个测试的时间段里, 菌 D 的除油效果一直高于土著生物, 表明在此培养条件下, 添加优势降解菌 D 可以提高土壤中石油污染物的去除效果。

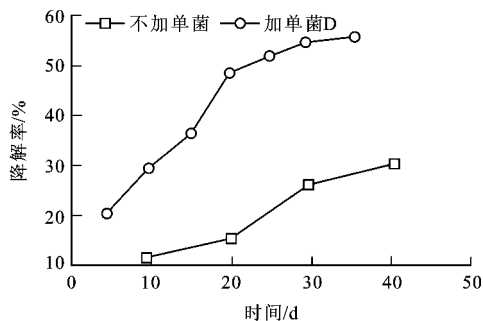


图 2 投加单菌与不投加对照实验

Fig. 2 Comparison Test of the Single Bacteria and Blank Samples

图 2 表明, 菌 D 在 5 d 时已经表现出一定的降解能力。在 5~25 d 时, 降解速率几乎成直线状态增长, 而在 25~35 d 时, 降解速率增大趋势明显减缓。造成这种现象的原因可能是: ①随着培养时间的延长, 土壤中营养物质的含量降低, 降解菌的生长速率减缓; ②土样中实验菌株的某些代谢产物的积累会抑制其自身细胞的生长繁殖; ③土样中实验菌株容易降解的石油成分减少, 剩余的是较难降解的成分。

土著生物在整个修复过程中, 虽然石油去除效

果相对较低, 但在整个监测时间里, 还是有一定的降解效果。在 10~20 d 时, 降解速率比较缓慢, 在 20~30 d 时降解速率迅速提高。其原因可能是由于污染土样是现场配制的, 土壤中原来含有降解石油的微生物数量应该很少, 当加入石油后, 环境改变了, 在前 20 d, 土壤中的石油以及 N、P 等营养为除油生物生长提供了合适的条件, 对土壤中的土著石油降解微生物起到了富集作用, 所以修复后期对照土壤中的石油降解微生物数量有所增加, 使石油降解效率提高, 在 40 d 时的石油降解效率也达到 30.2%。

因此, 在石油污染土壤中投加单一优势降解菌可以增进石油污染物微生物修复降解效果。

2.3 优势菌群的构建

由于石油是一种复杂的混合物, 一种菌只能对其中的一种或几种组分具有去除作用, 只有各种菌在协同作用下才能达到较好的除油效果。因此, 有必要对优势菌株 A、B、C、D 进行复配优化以得到更高效的降解菌群。表 1 是复配方案及除油效果, 第 9 号复配方案除油效果最佳, 达到 39.67%, 即 A、C、D 菌群除油效果最好。

表 1 混合菌复配实验

实验号	各菌的接种量/%				降解率/%
	A	B	C	D	
1	1.25	1.25	0.00	0.00	29.28
2	1.25	0.00	1.25	0.00	31.65
3	1.25	0.00	0.00	1.25	34.51
4	0.00	1.25	1.25	0.00	11.85
5	0.00	1.25	0.00	1.25	33.35
6	0.00	0.00	1.25	1.25	26.53
7	1.25	1.25	1.25	0.00	30.65
8	1.25	1.25	0.00	1.25	28.48
9	1.25	0.00	1.25	1.25	39.67
10	0.00	1.25	1.25	1.25	25.43
11	1.25	1.25	1.25	1.25	27.13

由表 1 和图 1 可知, 在投加单菌时虽对石油污染物均有较好降解效果, 菌 A、B、C、D 的降解率分别为 15.86%、22.55%、19.81% 和 26.43%。而在进行两种菌的混合投加时, 混合菌组的降解率大部分比单菌有所提高, 其中 A、D 混合菌组的降解率高达 34.51%, 而 B、C 混合菌组的降解率仅为 11.85%, 明显低于各种单菌对石油的降解效果, 这可能是各菌投加量的变化对混合菌株的降解率产

生了影响;也有学者认为可能是菌间存在竞争抑制作用。在 3 种菌的复配实验中发现, A、C、D 3 种菌混合后的降解率为 39.67%,是所有混合菌组中降解率最高的一组,比采用单菌降解率提高了 13.24%,其他的 3 种菌混和实验的降解率也均高于单菌。这与刘期松等<sup>[1]</sup>关于混合菌对地表水中石油类污染物降解率的研究结果一致,即在实验室里一般混合培养的降解率高于纯培养<sup>[12]</sup>。从整体看,3 种菌混合的平均降解效果较 2 种菌混合时平均降解效果好;而在 4 种菌共同投加的情况下,降解率并不是特别高,这可能也是因为各菌间的竞争作用而引起的。

上述结果表明:①将几种优势石油降解菌混合后,大多混合菌组的降解效果均较单一菌种有所提高,这是因为不同菌株降解不同石油烃组分,当把它们混合后各菌在相互适应之间形成一种协同作用的结果,因此,采用适当的混合菌株,充分利用它们之间的协同作用,有利于获得更好降解效果;②在各实验组也有降解效果明显低于单菌的降解效果的菌组,因此,在用混合菌组进行降解实验时,菌种之间的拮抗作用也是不可忽视的问题。

2.4 混合菌群的最佳投加配比确定

对选出的降解效果最好的 A、C、D 菌群进行三因素三水平正交实验,测定结果如表 2、3。

极差 R 的大小可以判断因素对指标影响的主次。从表 2 可知,菌 D 投加量的变化对混合菌组降解效果影响最大,其次是菌 C,最后是菌 D。

根据表 2 降解率最高的组合,可得到一个最佳的投加配比为  $N_A : N_C : N_D = 1 : 2 : 0.5$ 。菌 C 投加量占总接种比例的 4/7 而重要性仅排第二位,可能是由于菌群中各菌株在生长过程中既相互影响又相互制约,只有当各菌株的数量达到一定比例时才处于一种较好的平衡状态。即当菌 C 投加量大菌 A、D 投加量小时,混合菌组降解石油效果才达到最好。从这个结果可以得出,降解效果好的单菌投加量大不一定能提高混合菌组的降解效果,但降解效果好的单菌却是影响混合菌组降解效果的主要因素。

由表 1、2 中的 A、C、D 菌群最佳降解效果 39.67%对比可以看出,同样的 3 种菌在不同接种配比情况下降解效果却有着明显的差异,即从 44.2%到 27.8%,相差了 16.4%。可见,3 种菌混合后虽对石油类污染物有较好的降解效果,但彼此

表 2 菌种的投加量正交实验结果  
Tab. 2 Results of the Orthogonal Test of the Optimum Dosing Amount of Bacteria

实验号	各菌投加量/mL			降解率/%
	A	C	D	
1	0.5	0.5	0.5	39.6
2	0.5	1	1	35.4
3	0.5	2	2	37.4
4	1	0.5	1	39.2
5	1	1	2	27.8
6	1	2	0.5	44.2
7	2	0.5	2	31.8
8	2	1	0.5	34.6
9	2	2	1	36.6
$K_1$	112.4	110.6	118.4	
$K_2$	111.2	97.8	111.3	
$K_3$	103	118.2	97	
$k_1$	37.47	36.87	39.47	
$k_2$	37.07	32.6	37.07	
$k_3$	34.33	39.4	32.33	
R	9.4	20.4	21.4	

注:  $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$  为各菌投加量水平降解率之和;  $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$  为对应  $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$  的平均值; R 为相同菌  $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$  值的极差

之间还有一定的相互作用,相互之间必须维持一定数量比才能达到理想的降解效果。

2.5 多因素正交实验

从表 2、3 的结果对比可看出,生物修复强化技术应用情况下效果明显提高,石油污染物最高去除率高达 61.46%,比只进行菌种强化时最高除油率 44.2%提高了约 17%,较未进行任何强化时单菌 D 的除油率 26.43%提高了 35.03%,即生物修复强化技术的应用显著提高了生物修复效果。

极差  $R_j$  的大小可以判断因素对指标影响的主次。由表 3 知主要因素为营养物质(C : N : P),其次为表面活性剂,随后为通气量,最后为电子受体  $H_2O_2$ 。

根据表 3 降解率最高水平,可得到一个最佳生态条件:营养物质 C : N : P 为 75 : 8 : 3、表面活性剂为 0.5%、通气条件为 6 层纱布、电子受体  $H_2O_2$  的加入量为 1.5%。

3 结语

(1)从研究室保藏石油降解细菌中选取 4 株细菌,均可以提高生物处理石油污染土壤的效果。单菌在 30 d 的修复过程中修复效果远远超出土著生

表 3 多因素正交实验结果

Tab. 3 Results of the Orthogonal Test of the Multifactor

实验号	营养物质	通气条件	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	表面活性剂投加量	$w_B/\%$
					降解率
1	75/5/1.7(1)	2 层棉布(2)	1(1)	0.1(1)	46.01
2	75/5/1.7(1)	6 层纱布(1)	1.5(2)	0.3(2)	42.67
3	75/5/1.7(1)	2 层塑料(3)	2(3)	0.5(3)	40.45
4	75/8.0/3(2)	2 层棉布(2)	1.5(2)	0.5(3)	61.46
5	75/8.0/3(2)	6 层纱布(1)	2(3)	0.1(1)	57.14
6	75/8.0/3(2)	2 层塑料(3)	1(1)	0.3(2)	46.33
7	75/24/9(3)	2 层棉布(2)	2(3)	0.3(2)	45.16
8	75/24/9(3)	6 层纱布(1)	1(1)	0.5(3)	53.43
9	75/24/9(3)	2 层塑料(3)	1.5(2)	0.1(1)	49.51
10	0	0		0	13.15
$K_1$	129.13	152.63	145.77	152.66	
$K_2$	164.95	153.24	153.64	144.16	
$K_3$	148.1	136.29	142.75	155.34	
$k_1$	43.04	50.88	48.59	47.28	
$k_2$	54.98	51.08	51.21	44.72	
$k_3$	49.37	45.43	47.58	51.78	
$R$	11.94	5.65	3.63	7.06	

注:  $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$  为各因素投加量水平降解率之和;  $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$  为对应  $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$  的平均值;  $R$  为相同菌  $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$  值的极差; 括弧内数字代表不同实验水平

物的修复效果。

(2)利用生物强化技术中的菌种强化能有效提高土壤修复效率,3 d 内菌群降解率达到了 39.67%,比单菌降解率提高了 13.24%,比自然条件下的土著生物修复率提高了 34.97%。同时通过实验可看出,在一般情况下,混合菌的除油效果均较单菌好,所以在生物修复时,利用菌群修复将会有效地增强生物修复效果;通过确定菌群的投加配比使菌群的降解率由 39.67%提高到 44.2%,所以利用菌群进行生物修复时,投加配比也是需要注意的问题。

(3)影响土壤生物修复的因素有表面活性剂、氮磷浓度、通氧量、电子受体等,通过正交实验可得

出 A、C、D 菌群的最佳修复条件为:营养物质 C : N : P 为 75 : 8 : 3、表面活性剂为 0.5%、通气条件为 6 层纱布、电子受体 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的加入量为 1.5%。在最佳修复条件下,3 d 内原油的降解率达到了 61.46%,较只进行菌种强化时最高除油率 44.2%提高了约 17%,较未进行任何强化时单菌 D 的除油率 26.43%提高了 35.03%,即生物修复强化技术的应用显著提高了生物修复效果。

参考文献:

[ 1 ] 郑金秀, 彭 祺, 张甲耀, 等. 优势降解菌群生物强化修复石油污染土壤[ J ]. 农业环境科学学报, 2006, 25 ( 5 ): 1212-1216.

[ 2 ] Ruberto L, Vazquez S C, Maccormack W P. Effectiveness of the Natural Bacterial Flora Biostimulation and Bioaugmentation on the Bioremediation of a Hydrocarbon Contaminated Antarctic Soil[ J ]. Biodegradation and Biodegradation, 2003, 52 ( 2 ): 115-125.

[ 3 ] Wang J L, Zhao X, Wu W Z. Biodegradation of Phthalic Acid Esters(PA Es) in Soil Bioaugmented with Acclimated Activated Sludge[ J ]. Process Biochemistry, 2004, 39 ( 12 ): 1837-1841.

[ 4 ] Quan X C, Shi H C, Liu H, et al. Enhancement of 2, 4-Dichlorophenol Degradation in Conventional Activated Sludge Systems Bioaugmented with Mixed Special Culture[ J ]. Water Research, 2004, 38 ( 1 ): 245-253.

[ 5 ] 张宝良, 王宝辉, 张昌兴. 土壤石油污染的生物修复技术[ J ]. 油气田地地面工程, 2007, 26 ( 3 ): 9.

[ 6 ] 丁克强, 骆永明. 生物修复石油污染土壤[ J ]. 土壤, 2001, 33 ( 4 ): 179-184.

[ 7 ] 谢丹平. 石油污染生物修复技术研究[ J ]. 四川环境, 2006, 25 ( 4 ): 109-112.

[ 8 ] 李春荣, 王文科, 曹玉清, 等. 石油污染土壤对向日葵生长的影响[ J ]. 地球科学与环境学报, 2006, 28 ( 4 ): 97-99.

[ 9 ] 李春荣, 王文科, 曹玉清, 等. 石油污染物的微生物降解[ J ]. 地球科学与环境学报, 2007, 29 ( 2 ): 214-216.

[ 10 ] 林凤翔, 于占国, 李 洪, 等. 海洋丝状真菌降解原油研究 I : 石油烃降解的实验室模拟[ J ]. 海洋学报, 1997, 19 ( 6 ): 68-76.

[ 11 ] 刘期松, 张春桂, 杨桂芬, 等. 多级处理系统中的微生物生态结构和功能[ J ]. 环境科学学报, 1986, 6 ( 3 ): 253-262.

[ 12 ] 席淑琪, 刘 芳, 吴 迪. 微生物对地表水中石油类污染物的降解研究[ J ]. 南京理工大学学报, 1998, 22 ( 3 ): 232-235.