

研究报告

石油污水灌区的微生物生态 及其降解石油的研究

刘期松 齐恩山 张春桂 杨桂芬 许立新 姜晴楠

(中国科学院林业土壤研究所)

近半世纪以来,随着石油工业的迅速发展,石油废弃物和石油对农田、河流、湖泊、港口、海湾及海洋的污染增加了。这严重地影响着工农业、水产和环境质量。在消除这种污染的综合因素方面,微生物起着重要作用。

Senez, Konovaltshch-Mazoyer (1958)^[2] 和 Zobell (1964)^[2] 对油污染和海洋生态,特别是细菌自然净化方面做了大量工作。

Kincannon 和 Huddleston (1971)^[7] 采用土壤耕作法使土壤中微生物经过十八个月之后降解了石油中的烷烃、芳烃 80—82%。他们认为该法可用来处理地表的石油废弃物。

Raymond (1976)^[11] 和 A. Jobson^[3] 研究土壤中油的降解,选择美国东部、中部和西南部三个不同地区,施入六种油,栽培大头菜和蚕豆,一年内平均各地区各类油品的浓度大大减少,减少了 48.5—90%。

我国灌区较多。沈(阳)抚(顺)灌区主要以炼油厂含油废水灌溉为主,灌溉二十万亩水稻田,历时四十余年尚未发现石油的显著积累和经常性的损害^[1]。因此,要弄清灌区微生物生态和净化能力,为改进污灌设施提供数据。

我们研究了石油污染区微生物类群的组成,分布和降解石油的能力,测定降解石油的

解脂酶以及利用石油形成的生物量,为进一步净化污水探求出途径。

材料和方法

一、材料

采样地点

(一)重污染区:采自污灌三十年以上的重污染区,抚顺三宝屯四队场院水稻田,砂质土,含芳烃 144.7ppm,烷烃 81.6ppm。

(二)中污染区:采自污灌 15—20 年的中污染区,深井子公社韩家壕兴隆三队,壤土,含芳烃 65.7ppm,烷烃 120ppm。

(三)轻污染区:采自汪家公社大甸子大道东,为轻质壤土,含芳烃 19.6ppm,烷烃 520ppm。

采样时间

第一次为五月初,插秧前;第二次为七、八、九月;第三次为十月中旬,收割后。第一、三次为表土,第二次为稻田的水和土。

二、方法

(一)微生物分离:采用 Raymond^[11] 介绍的石油微生物分离法,计数用平板稀释法。

培养基:细菌采用 Raymond 修改的无机盐培养基(MM);真菌酵母用 Chapak 培养基;固氮菌用 Burk 培养基。以上均加页

岩油 0.5% 作碳源。

与此同时,为了获得污染区微生物类群组成,采用了五种培养基进行比较。细菌用肉膏蛋白胨培养基和酪素培养基;真菌用马丁培养基和萨氏 (Sabouroub) 培养基;固氮菌用 Ashbys 培养基。

(二) 浊度法:采用 Stanley W. Watson 法(1977)^[42]以浊度为降解的间接指标。培养基为: KH_2PO_4 (0.5 克)、 K_2HPO_4 (0.5 克)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 克)、 CaCl_2 (0.1 克)、 NaCl (0.2 克)、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (微量)、 FeCl_3 (10% 1 滴)、 NH_4NO_3 (1 克)、自来水 (1 升)、pH 7.5。真菌 pH 6.0,固氮菌不加 NH_4NO_3 。每一份 (25 毫升) 灭菌后分别加大庆原油约 0.5—1 毫升,轻质柴油 0.5—1 毫升,接种分离的单一菌株。振荡(往复振荡 78 次/分)培养, 25℃ 7 天,最后观察微生物利用石油形成的混浊度(即生物量)。

(三) 微生物降解石油的测定方法:培养细菌和真菌采用上述浊度法的液体培养基,培养固氮菌采用费多罗夫 (Федоров) 培养基。取液体培养基 25 毫升置 125 毫升三角瓶中,加 10—15 毫克油,约占 0.04—0.06 的基质,振荡培养, 28℃, 7 天。

1. 萃取培养液中的油:用处理过的二氯甲烷或四氯化碳萃取未被降解的残油。

2. 萃取油的测定:用 5—10 毫升四氯化碳洗烧杯中上述残渣,将溶液置石英槽中,以四氯化碳作参比。于 IR-27G 红外分光光度计上在 $3200—2800\text{cm}^{-1}$ ($3.43\mu\text{m}$) 扫描,测定各点 2941cm^{-1} ($3.43\mu\text{m}$) 的吸光强度。

(四) 生物量的测定法:将含有原油或柴油的液体培养液经二氯甲烷萃取后,剩余之培养液作生物量测定,用凯氏法定氮,计算出蛋白质的含量。

(五) 解脂酶的测定:根据 Stanley (1977)^[42]和 Gonzalo Sierra (1975)^[40]测定脂酶活性方法,采用着色脂肪法和 Tween 去垢剂 Sierra 法。

(六) 固氮活性的测定:乙炔气相层析法和凯氏定氮法。

(七) 菌株鉴定:细菌按《伯捷氏细菌鉴定手册》(第 8 版),真菌按《常见与常用真菌》一书鉴定。

实验结果和讨论

一、不同程度石油污染区微生物的计数与类群

表 1 重污染区水稻田中的微生物计数(数/1 克土或 1 毫升水)

采样次数 地 点	第 一 次 采 样	第 二 次 采 样		第 三 次 采 样
		水	土	
细 菌				
A. 重污染区(三宝屯)	1.3×10^5	2.5×10^4	3.9×10^4	1.8×10^5
B. 中污染区(韩家壕)	1.9×10^5	9.3×10^2	2.8×10^4	1.3×10^5
C. 轻污染区(汪家公社)	2.6×10^5	4.5×10^3	1.0×10^4	1.2×10^5
真 菌				
A. 重污染区	2.3×10^4	2.5×10^3	1.8×10^3	1.6×10^3
B. 中污染区	1.8×10^4	7.4×10^2	3.0×10^4	3.0×10^5
C. 轻污染区	1.4×10^4	1.5×10^2	3.0×10^3	2.1×10^3
固 氮 菌				
A. 重污染区	1.3×10^5	1.6×10^4	2.6×10^4	9.5×10^5
B. 中污染区	1.0×10^5	1.1×10^3	9.2×10^4	1.8×10^5
C. 轻污染区	1.7×10^5	1.9×10^3	1.1×10^4	1.9×10^5

(一) 石油灌区不同污染程度水稻田中的微生物计数结果如表 1。

从表 1 的结果可以看出,第一、三次采样分析不同程度的石油污染区中的细菌、真菌、固氮菌的计数都在同一数量级,不表明污染程度的差别。但在 7 月灌溉期间,第二次所采水样中的细菌、真菌、固氮菌的计数显示了重污染区、中污染区和轻污染区的差别。A 区大于 B 区和 C 区。从土壤中的微生物数量来看,土著嗜油微生物区系已在长期灌溉中形成,其原因主要是由于利用石油污水长期泡田、串灌、搬运的结果,构成了比较系统的污灌区微生物生态,使微生物数量在重、中、轻灌区分布一致。污水中油分和养分(氮、磷)在灌溉过程中的自净和土壤、植物的吸收附着等变化,引起微生物数量的波动。这种波动是随污水水质而转移,污水浓度(油分、养分)高的含菌数多,低的则少。

(二) 为了反映重污染区微生物的数量,类群状况,我们选用了五种营养丰富的不加油的培养基进行微生物的培养。结果见表 2。

五种培养基经过五次计数分析,证明重污染区在高温灌水时期除真菌外,细菌、固氮菌数均比同期在无机盐油培养基上的高。

(三) 优势微生物类群

将三次采样分离出的优势微生物类群和特殊类群(如放线菌或形态特殊的微生物菌落)进行鉴定,结果如表 3。

二、解脂酶的反应

微生物降解脂肪族,解脂酶具有专一的

催化作用。根据 A. L. Mill (1978)^[5] 的资料指出解脂酶的菌株有的降解石油,有的降解力弱,经过我们分析也得到相同的结果。

用 Tween 法测定 126 株细菌,具有解脂酶的 67 株。测定 71 株真菌,具有解脂酶的 63 株。固氮菌中则没有解脂酶。用脂肪染色法测定,126 株细菌中有 74 株具有解脂酶,71 株真菌中有 58 株具有解脂酶。58 株固氮菌中有 15 株具有解脂酶。它们在分解油时起着催化作用。

三、石油污灌区微生物降解石油的能力

(一) 混浊度试验的结果

微生物利用原油和轻质柴油中碳源和培养液中的氮源繁殖,形成一定的生物量,使液体混浊。利用混浊试验作为微生物降解石油的生物指标结果如表 4。

J. D. Walker 和 B. Austin 等 (1974, 1976, 1977)^[6,13,14] 进行了类似的工作。从表 4 看出在两种不同培养基上分离出的微生物只有一部分对石油具有降解力,但是真正能大量降解石油的微生物还不多,其原因主要是培养的时间太短(7 天)。根据 A. L. Mills 等(1978)^[5] 的报道并非所有生长在油油菜培养基上的微生物都能降解油。

(二) 对原油和轻柴油的降解试验

D. E. Hughe (1975)、David (1975)^[8,9] 进行了油的降解。我们从分离的微生物总数 522 株中选出 135 株细菌,78 株真菌,65 株固氮菌进行了对原油和轻质柴油的降解试验。经过液体培养恒温振荡,7 天后用二氯

表 2 重污染区水稻田中微生物在不加油培养基上的计数(数/毫升)

日 期 \ 培养基	细 菌		真 菌		固氮菌
	I	II	III	IV	V
8 月 22 日	6.4×10^9	1.2×10^{10}	3×10	0	1.4×10^6
8 月 31 日	8.6×10^{10}	2.1×10^{10}	6×10	0	2.7×10^6
9 月 9 日	1.4×10^{11}	2×10^{10}	1.1×10^3	3.5×10^4	2.7×10^6
9 月 13 日	6×10^{10}	1.1×10^{11}	2.2×10^3	1.0×10^3	1.2×10^6
9 月 27 日	6×10^8	5.7×10^8	5.5×10	1.5×10	1.2×10^6

注: I——肉膏蛋白胨 II——酪素 III——马丁培养基 IV——Sabouroud 培养基 V——Ashby's 培养基

表 3 在不同程度的污染区中微生物的类群

污染区样品	微 生 物 类 群
	细 菌
重污染区土样	假单胞菌属(202), 醋酸细菌属(237, 244), 乳酸杆菌属(444), 芽孢杆菌属(6), 分枝杆菌属(24, 50), 黄杆菌属(25Y)
水 样	产碱菌属(178, 183, 207), 假单胞菌属(218, 273), 不动细菌属(208, 210), 醋酸细菌属(331)
中污染区 土样	无色细菌属(255), 芽孢杆菌属(91), 产碱菌属(459W), 节细菌属(459R), 不动细菌属(247), 假单胞菌属(248, 348, 356), 芽孢杆菌属(350)
轻污染区土样水样	假单胞杆菌属(264), 黄单胞菌属(480, 483, 378), 气单胞菌属(380)
	真 菌
	放 线 菌
重污染区	烟曲霉(76), 黄绿青霉(271, 201), 白边青霉(339), 产黄青霉(202), 宛氏拟青霉(203, 208)
中污染区	常现青霉(79, 88), 宛氏拟青霉(283), 桔青霉(285), 黄柄曲霉(399W 399G)
轻污染区	宛氏拟青霉(99, 107, 114, 415), 牵连青霉(294)
	微 嗜 氮 菌
重污染区	柠檬色诺卡氏菌属(29), 未定菌属(13)
	欧文菌属(437), 不动菌属(502), 无色细菌属(104), 邻单胞菌属(496), 节细菌属(433), 固氮菌属(414)

表 4 混 浊 度 试 验

菌 类	试验菌株数	大 庆 原 油		轻 质 柴 油	
		F	%	F	%
油 洋 菜 培 养 基 上 分 离 的 菌 株					
细 菌	275	53	19.3	70	25.4
真 菌	68	18	26.5	22	32.4
固氮菌	88	50	56.8	51	57.9
总计	431	121	28.1	153	35.5
肉 膏 蛋 白 胨 培 养 基 上 分 离 的 菌 株					
细 菌	51	12	23.5	32	62.74
真 菌	27	17	63.0	21	77.3
固 氮 菌	13	3	23.0	7	84.6
总 计	91	32	35.1	27	70.33

注: F 表示培养液混浊度与对照比较有大量细胞体和菌膜的观测

甲烷萃取, 采用红外分光光度计测定, 结果见表 5。

表 5 的数据说明微生物对原油的降解力比对轻质柴油的降解力要低。

四、微生物利用石油形成生物量的测定
我们测定残油量时, 同时测定培养液中

的菌体(蛋白质的测定), 作为微生物降解石油的一个指标, 结果如表 6。

从表 6 的结果看出, 细菌利用柴油在 100—400 $\mu\text{g/ml}$ 中有 16 株, 利用原油只有 2 株。而固氮菌利用原油和柴油形成生物量在 100—400 $\mu\text{g/ml}$ 中的有 10 株和 13 株, 多

表 5 石油污灌区微生物对石油的降解

菌 类	试验菌株数	大 庆 原 油		轻 质 柴 油	
		降解 20% 以上的菌株数	%	降解 50% 以上的菌株数	%
细 菌	135	56	41.4	61	45.1
真 菌	78	30	38.5	15	19.2
固 氮 菌	65	5	7.7	18*	27.6
合 计	278	91	33.6	94	33.8

* 固氮菌降解轻质柴油 20% 以上的菌株数

表 6 微生物利用石油形成生物量

供试菌株数	形成细胞较多的菌株数	百分比	利用原油形成生物量 $\mu\text{g/ml}$			利用柴油形成生物量 $\mu\text{g/ml}$		
			100—400	50—99	30—50	100—400	50—99	30—50
菌 株 数								
细 菌 141	83	58.9	2	28	28	16	27	23
固氮菌 63	42	66.7	10	16	12	13	15	4
真 菌 59	23	39.0	0	6	7	8	8	6

表 7 在不同浓度的原油和柴油培养液中混合细菌和真菌降解石油和生成生物量*

油类	项目	混合菌				
		含油的(%)	含油量 (mg)	利用油量 (mg)	利用率(%)	生物量 (mg)
轻 质 柴 油	混合细菌	0.06	40.50	28.68	70.82	—
	混合细菌	0.10	74.80	51.70	69.11	12.0
	混合细菌	0.50	225.00	82.00	36.44	16.52
	混合细菌	1.00	450.00	137.60	30.58	13.85
	混合真菌	0.06	40.50	23.93	59.07	12.40
原 油	混合细菌	0.06	19.50	5.75	29.49	—
	混合真菌	0.06	19.50	6.20	31.79	5.50

* 表 7 中,混合菌的接种,首先把几种单一菌制成悬浊液,将该液 1 毫升加于 50 毫升的培养液中,细菌培养 7 天,真菌培养 14 天,然后取出分析

于细菌数和真菌数,表明少数的固氮菌有降解原油的能力。

五、微生物利用石油形成生物量的调控因素

微生物利用石油形成新细胞,产生新的、具有活力的酶系统并继续降解石油。究竟这些微生物对石油的最大利用与什么因素关系最密切? 我们进行了细菌、真菌的纯培养(见表 5)和混合培养,结果见表 7。

表 7 的混合培养结果表明,混合菌比单一菌的降解力强,同 Abraban Reifeld 等

(1972)^[4]的工作近似。混合菌对柴油的利用力是随着油量的增加而增加,直到形成最大的生物量值(330.3 毫克)后才下降。它受环境中(培养液)氮源的限制。在本试验中加油量是 0.5%(V/V)。当加到 1.0% 的油量时,虽然降解油量的绝对值(137.6 毫克)增加了,但降解率(30.58%)下降,形成生物量(277 毫克/升)也下降。作为被微生物分解的石油基质,必须维持一个最适的碳源(油)和氮源。油量低了不能形成新细胞,降解力就弱。油量过高对微生物则产生抑制作用,寻求碳、氮

最适比例对调节污灌负荷, 加速石油降解有一定意义。

灌负荷对油的净化将收到实际效益。

结 论

1. 通过石油污灌区的微生物类群和数量分析表明污灌区的土质对微生物不产生巨大影响。石油污水的水质浓度是影响微生物类群和数量的主要因素, 因此重污染区对微生物的数量和类群均多于其他污染区。优势菌属有假单胞杆菌属, 无色细菌属, 不动细菌属, 芽胞杆菌属, 醋酸细菌属, 分枝杆菌属等。真菌以青霉菌为优势类群。水样中的菌数反映一定的污染程度和污染范围, 类群反映石油污染区的微生物生态特征和生态组成。

2. 油污染区的微生物多数具有解脂酶的活性, 有的强, 有的弱。轻污染区活性较弱, 但仍能降解石油。

3. 混浊度是检验油降解的简易指标。

4. 从油污染区分离出的细菌、真菌、微嗜氮菌多能利用石油形成细胞体, 但是利用油量和形成细胞量还决定于碳源和氮源 的量。油作为基质少了不能形成细胞, 多了细胞受到抑制。根据油的多少, 增加氮源就可以起到加速油的降解, 反之根据土壤养分, 施肥多少, 就可提出降解油的负荷, 控制最适的碳(油)、氮比, 可获得较大的油降解率, 调节污

参 考 文 献

- [1] 中国科学院林业土壤研究所污水组, 沈阳石油工业污水灌区环境质量的调查报告, 科研报道, 第二期(环境生物专集), 第96页, 1977年。
- [2] A. Nelson-Smith, *Oil Pollution and Marine Ecology*, pp. 204—210, 1972.
- [3] A. Jobson, *Applied Microbial*, 27(1), 166 (1974).
- [4] A. Reisfeld, E. Rosenberg and D. Gutnick, *Appl. Microbiol.*, 24(3), 363—368 (1972).
- [5] A. L. Mills, C. Bredt and R. R. Colwell, *Canadian J. of Microbiology*, 24(5), 552—557 (1978).
- [6] B. Austin, J. J. Calomiris, J. D. Walker, *Appl. & Environ. Microb.*, pp. 60—68, July, 1977.
- [7] C. B. Kincannon, *Proceedings of Open Forum on Management of Petroleum Refinery Wastewater*, p. 257, 1977.
- [8] David T. Gibson, *Proceedings of The 3rd International Biodegradation Symposium*, pp. 57—66, 1975.
- [9] D. E. Hughes and P. McKenzie, *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 189: No. 1096, pp. 375—390 (1975).
- [10] Gonzalo Sierra, *J. Microb. and Serology*, 23 (1), 15—22 (1975).
- [11] R. L. Raymond, J. O. Hudson, V. W. Jamson, *Appl. & Environ. Microb.*, 31(4), 522 (1976).
- [12] Stanley W. Watson, *Appl. Microb.* 33(4), 940 (1977).
- [13] J. D. Walker and R. R. Colwell, *Appl. Microb.*, 27, 1053—1060 (1974).
- [14] J. D. Walker and R. R. Colwell, *Appl. Environ. Microb.* 31(2), 189—197 (1976).

农作物对镉的吸收累积规律

董克虞 陈家梅 邓小莹

(北京市农业科学院农业环境保护、气象研究所)

从食用含镉大米引起骨痛病以来, 世界各国对镉污染环境的问题极为重视, 有关环境中镉的研究也日益增多。镉来自地壳矿藏中, 由于人类的各种活动, 使它通过种种途径

进入土壤, 尔后又被植物吸收, 再随食物进入人体和动物体, 最后还会回到地壳中去。研究作物吸收和累积镉的规律, 对调整这一循环过程保护人类免受危害, 以及对作物污染