

麦秸强化微生物降解石油烃及场地试验

张坤¹, 徐圆圆², 花秀夫¹, 苗长春³, 韩慧龙¹, 杨健民⁴, 张鸿⁴, 黄振栋⁴, 刘永民², 金文标³, 王君¹, 刘铮^{1*}

(1. 清华大学化学工程系, 北京 100084; 2. 辽宁石油化工大学化学工程系, 抚顺 113001; 3. 哈尔滨工业大学深圳研究生院, 深圳 518055; 4. 中国石油化工股份有限公司中原油田分公司采油五厂, 濮阳 475001)

摘要: 在油-盐混合污染耕地的耕作层中施加麦秸以强化水浸洗盐和促进微生物对石油烃的降解. 通过实验考察了麦秸添加量对降解石油烃所用的阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)和刺孢小克银汉霉菌(*Cunninghamella echinulata*)的生长及其对于石油烃降解行为的影响. 结果发现, 在土壤中添加5%(质量分数)麦秸可使土壤中的细菌和真菌生物量提高至对照样品的25和3倍; 19 d时总石油烃降解率从29.2%提高到48.0%, 其中饱和烃、芳烃的降解率分别从31.5%和39.1%提高到55.7%和55.9%. 在中原油田污染耕地现场试验结果表明, 石油烃降解菌添加25 d后, 添加麦秸的修复土壤中的细菌和真菌生物量为对照土壤的158和9倍; 45 d后试验地块中的总石油烃质量分数降至0.3%以下, 石油烃降解率最高达到75%. 上述结果显示添加麦秸与真菌-细菌协同修复方法相结合在治理油-盐混合污染耕地中具有很好的应用前景.

关键词: 生物降解; 石油污染土壤; 刺孢小克银汉霉菌; 阴沟肠杆菌; 麦秸

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)01-0237-05

Process Fundamentals and Field Demonstration of Wheat Straw Enhanced Biodegradation of Petroleum

ZHANG Kun¹, XU Yuan-yuan², HUA Xiu-fu¹, MIAO Chang-chun³, Han Hui-long¹, YANG Jian-min⁴, ZHANG Hong⁴, HUANG Zhen-dong⁴, LIU Yong-min², JIN Wen-biao³, WANG Jun¹, LIU Zheng¹

(1. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Department of Chemical Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun 113001, China; 3. Research Institute in Shenzhen, Harbin Institute of Technology, Shenzhen 518055, China; 4. The 5th Oil Production Factory, Zhongyuan Oilfield Company, China Petroleum & Chemical Corporation, Puyang 457001, China)

Abstract: A new bioaugmentation method utilizing wheat straw to enhance salt leaching and the subsequent petroleum biodegradation by consortia of bacteria and fungi was proposed. The present study aimed at the effects of wheat straw on the growth and the degradation behavior of *E. cloacae* and *Cun. echinulata*, the two species of the consortia. In the laboratory experiments, it was shown that the addition of 5% (mass fraction) straw led to an increase of biomass by 25- and 3-fold to the bacteria and fungi, respectively. The biodegradation ratio of total petroleum hydrocarbon (TPH) was elevated from 29.2% to 48.0% after 468 h treatment. The biodegradation ratio of alkane and aromatic hydrocarbons in petroleum were increased from 31.5% and 39.1%, to 55.7% and 55.9%, respectively. The field demonstration was carried in an area of 6 400 m², in which the bacteria and fungi were inoculated after salt leaching in the presence of wheat straw. The addition of wheat straw in the contaminated soil led to an increase by 158- and 9-fold to the bacteria and fungi, as compared to their counterpart in the control land without wheat straw, at 25 days after the inoculation. The content of TPH was down to below 0.3% while the maximum biodegradation ratio of TPH reached 75% after 45 days treatment. These results demonstrated the effectiveness and high potential of the wheat straw enhanced bioaugmentation of petroleum-salt contaminated soil.

Key words: biodegradation; petroleum-contaminated soil; *Cun. echinulata*; *E. cloacae*; wheat straw

生物强化技术是修复石油污染耕地的有效措施^[1~8]. 但油盐混合污染耕地中的石油烃和高浓度盐离子严重制约石油烃降解菌的生长及其对于石油烃的代谢能力^[9~12]. 韩慧龙等^[13~15]提出了真菌-细菌协同修复技术用于石油污染土壤的原位修复取得了很好的效果. 针对油盐混合特性, 张坤等^[16~18]提出利用麦秸强化油盐混合污染土壤原位生物强化修复, 通过构建麦秸层强化水浸洗盐, 并利用麦秸在土壤中的转化产物为石油降解菌提供优质碳源以促进其生长和对石油烃的代谢.

本研究考察了在油-盐混合污染土壤中添加麦秸对石油烃降解菌的生长以及其降解石油烃行为的影响; 优化了土壤中 N、P 元素含量; 在河南中原油田进行了面积为 6 400 m² 的现场修复实验, 验证了添

收稿日期: 2008-01-07; 修订日期: 2008-03-31

基金项目: 中国石油化工股份有限公司科学技术研究开发项目 (306038)

作者简介: 张坤(1980~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为石油污染土壤的生物强化修复, E-mail: zhangkun03@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: liuzheng@mail.tsinghua.edu.cn

加麦秸对于水浸洗盐的强化作用^[17],在水浸洗盐结束后施加由阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)和刺孢小克银汉霉菌(*Cun. echinulata*)组成的液体菌剂进行石油烃降解,分析了麦秸对土壤中的生物量增长及其石油烃降解的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

试剂:实验中使用的试剂均为国产分析纯;原油样品采自中原油田;土壤采自河南濮阳中原油田未受石油污染的正常耕地;麦秸:来自河南濮阳中原油田正常耕地小麦种植收获后的麦秸。

所使用的 LB 培养基、孟加拉红琼脂培养基及无机盐培养基组成见文献[14]。

1.1.2 菌种来源

细菌为阴沟肠杆菌(*E. cloacae*),筛自河南濮阳中原油田石油污染土壤;真菌为刺孢小克银汉霉菌(*Cun. echinulata*),筛自河南濮阳中原油田石油污染土壤。

1.1.3 主要仪器

CEM MARS^x 微波化学工作站;惠普 6010 紫外分光光度计;HPLC(CLASS VP, SHIMADAZU)。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌、真菌的培养及接种

移取 100 μL 甘油保存的 *E. cloacae* 菌液到 100 mL LB 培养基中,经 30℃ 170 r/min 培养 20 h,将菌液在 4000 r/min 下离心 10 min,用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(0.2 mol/L pH 7.0)洗涤沉淀 2 遍,稀释至菌液浓度为 10⁹ CFU/mL,作为接种液放入 4℃ 冰箱保存。

将 *Cun. echinulata* 接种在孟加拉红琼脂培养基上,将接种后的平板放入培养箱中,在 28℃ 下培养 5 ~ 7 d 后放入 4℃ 冰箱保存。向土壤体系中接种时,用磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(0.2 mol/L pH 7.0)洗涤 *Cun. echinulata* 菌丝体上的孢子,将孢子液稀释至孢子浓度为 10⁷ CFU/mL,作为接种液放入 4℃ 冰箱保存。

场地实验细菌采用高密度发酵技术发酵^[19],真菌采用气升式发酵罐发酵。发酵液中加入 20% 甘油,4℃ 下保存备用。

1.2.2 石油污染土壤样品制备

按质量比 1:5 将石油溶于沸程为 30 ~ 60℃ 石油醚中,与土壤混合均匀后,置于通风橱中待石油醚完

全挥发后,密封放入冰箱 4℃ 下保存。

1.2.3 实验室污染土壤的生物降解

在实验前,将污染土壤、麦秸、无机盐培养基以及实验容器分别在 121℃ 下灭菌 15 min,然后在超净台中取污染土壤样品 200 g 放入实验容器中,添加给定量的 1 cm 长的麦秸并混匀,加入无机盐培养基,使 1 kg 土壤中含:KH₂PO₄ 50 mg, K₂HPO₄ 50 mg, NH₄NO₃ 50 mg, MgSO₄ 25 mg, CaCl₂ 0.5 mg, FeSO₄ · 7H₂O 5 mg。细菌接种量为 10⁷ CFU/g,真菌孢子接种量为 10⁴ CFU/g。

考察 N、P 元素对石油烃生物降解的影响时,除添加的 KH₂PO₄ 或(NH₄)₂SO₄ 外,不添加其他无机盐营养物质,其他方法同上。

1.2.4 细菌和真菌生物量的检测

细菌生物量的检测采用稀释平板计数法^[20]。

真菌生物量以麦角固醇含量来表征^[21]。其检测方法根据文献[22,23],取 2 g 土壤与 2 g KOH、20 mL 甲醇和 5 mL 乙醇混合,70℃ 保温 30 min,加入 5 mL 去离子水,收集上清液;再用 20 mL 甲醇冲洗 2 次固体残余物,洗液与上一步骤得到的上清液合并后加入 30 mL 正己烷振荡 1 min 后在 40℃ 旋转蒸发。用 2 mL 甲醇溶解蒸发所得的固体物质,然后采用 HPLC 分析,色谱柱为 C-18 柱,流动相为 95% 甲醇水溶液,流速为 1.5 mL/min,检测波长为 282 nm。

1.2.5 土壤中总石油烃(TPH)的测定方法

采用 EPA 3546 规范的微波萃取法测定土壤中石油烃含量^[24]。具体方法见文献[14]。

1.2.6 石油中饱和烃、芳烃、沥青胶质的测定

采用氧化铝层析柱分离石油中的饱和烃、芳烃和沥青胶质,具体方法见文献[14]。

1.2.7 场地试验方法

场地实验位于中原油田,石油污染土壤由管道穿孔所致,已弃耕 18 a。试验地块面积为 6400 m² (80 m × 80 m),对照地块面积 400 m²。污染场地局部油含量为 0.5% ~ 1.0% (质量分数)。场地水浸洗盐至土壤电导率下降到 10 mS·cm⁻¹ 后,施加氮肥(750 kg·hm⁻²)和磷肥(450 kg·hm⁻²)后,按照文献[18]所述的方法将由阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)和刺孢小克银汉霉菌(*Cun. echinulata*)组成的液体菌剂稀释一定倍数后,施洒到污染土壤表面进行石油烃降解,其中阴沟肠杆菌接种量为 10⁸ CFU/m²,刺孢小克银汉霉菌接种量为 70 mg/m²。场地采用“S”形取样,取样深度 0 ~ 25 cm,检测总石油烃浓度、细菌和真菌的生物量。

2 结果与讨论

2.1 麦秸对石油烃降解菌生长的影响

取 200 g 含油 3.8% (质量分数) 的污染土壤与不同质量麦秸混合, 土层厚度 3 cm. 细菌接种量为 10^7 CFU/g, 真菌孢子接种量为 10^4 CFU/g. 温度和湿度根据文献[13]确定为 30℃ 和 30% (质量分数). 土壤中细菌生长如图 1 所示.

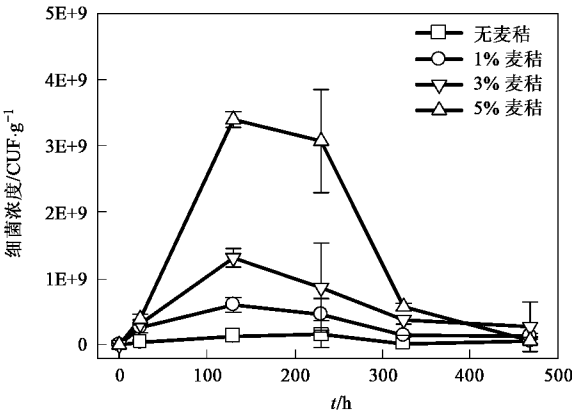


图 1 麦秸对阴沟肠杆菌生长的影响

Fig.1 Effect of wheat straw on *E. cloacae* growth behavior in petroleum-contaminated soil

由图 1 可知, 各样品中细菌即阴沟肠杆菌的菌浓度均呈现先增后降的趋势, 在 130 h 时达到最高, 230 h 后开始凋亡. 添加麦秸量越大, 对细菌生长的促进效果越好. 以添加 5% 的麦秸的样品为例, 培养 130 h 后细菌数达 $(3.40 \pm 0.08) \times 10^9$ CFU·g⁻¹, 而空白样品中的细菌数仅为 $(1.38 \pm 0.04) \times 10^8$ CFU·g⁻¹, 前者是后者的 25 倍.

同样考察了麦秸对于真菌即刺孢小克银汉霉菌 (*Cun. echinulata*) 的影响, 结果如图 2 所示.

图 2 显示, 添加麦秸的土壤样品中的真菌生长在 36 h 内达到平台期, 而空白样品则推延到 130 h 时才达到平台期. 麦秸用量越多, 真菌生长效果越好. 以麦角固醇含量作为真菌生物量的度量, 添加 5% (质量分数) 麦秸使土壤中麦角固醇的含量最高达到 $(33.94 \pm 1.06) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 而空白样品仅为 $(9.06 \pm 2.56) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 前者较后者高 3 倍以上.

添加麦秸改善了土壤通透性, 这也是促进细菌和真菌生长的重要原因. 而麦秸所含的纤维素、半纤维素以及木质素还可在土壤中转化为微生物生长的优质碳源^[25], 这些也会促进石油烃降解菌的生长.

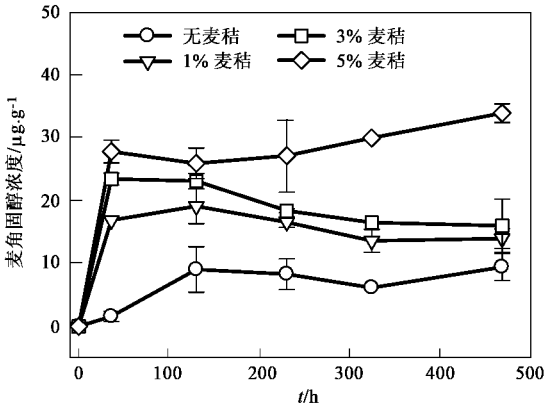


图 2 麦秸添加对刺孢小克银汉霉菌生长的影响

Fig.2 Effect of wheat straw on *Cun. echinulata* growth behavior in petroleum-contaminated soil

2.2 麦秸对石油烃生物降解的影响

分别测定上述土壤样品中的总石油烃浓度变化, 结果如图 3 所示.

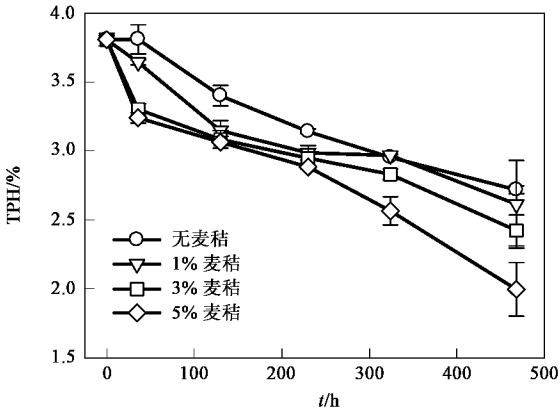


图 3 不同麦秸量对 TPH 质量分数的影响

Fig.3 Effects of wheat straw content on TPH content

图 3 显示添加麦秸的污染土壤中的石油烃含量在 36 h 时即有明显下降, 而对照土壤样品中的总石油烃含量则没有变化. 经过 480 h 的培养后, 添加 5% 的麦秸的污染土壤样品中的总石油烃质量分数从 3.8% 下降到 2.0%, 降解率达 48.0%; 而不含麦秸样品中的总石油烃质量分数为 2.7%, 降解率为 29.2%.

结合图 1 和图 2 所示结果可知, 添加麦秸促进了降解菌生物量的积累, 加速启动了石油烃的降解, 此外, 真菌和细菌在生长行为和周期上的差异显示在实际修复操作中应根据其各自的生长特性来施加菌剂.

2.3 麦秸对石油烃组分降解的影响

取接种菌剂 480 h 后的土壤样品,利用活化氧化铝柱对微波萃取得到的总石油烃进行组分分离,结果如表 1 所示.

表 1 不同麦秸用量对 TPH 以及石油各组分降解率的影响(480 h)

Table 1 Effect of wheat straw content on biodegradation ratio of TPH and petroleum components (480 h)				
麦秸含量 /%	降解率/%			
	TPH	饱和烃	芳烃	沥青胶质及非烃化合物
0	29.2	31.5	39.1	11.8
1	31.9	32.9	37.6	23.5
3	36.8	41.5	50.7	16.7
5	48.0	55.7	55.9	22.6

由表 1 可以看出,相对于无麦秸的对照样品,添加麦秸质量分数为 5% 后饱和烃、芳烃的降解率分别从 31.5% 和 39.1% 提高到 55.7% 和 55.9%, 沥青胶质及非烃化合物的降解率也从 11.8% 提高到 22.6%, 增长近 1 倍. 这再次证实了文献 [13, 14, 26] 所述的真菌-细菌复合生物制剂具有很强的石油降解能力; 而麦秸的添加促进了石油烃降解菌的生长, 并使其对污染物的降解得到强化^[18].

2.4 N、P 元素含量对石油烃降解的影响

分别考察了营养物质 N、P 对石油烃生物降解的影响, 试验周期为 15 d, 试验中除含有所添加的 (NH₄)₂SO₄ 或 KH₂PO₄ 外, 无其他无机盐营养物质加入, 结果如图 4 所示.

由图 4 可知, 随着 (NH₄)₂SO₄ 使用量的增加, 石油烃降解率均先升高后下降, 在 (NH₄)₂SO₄ 使用量

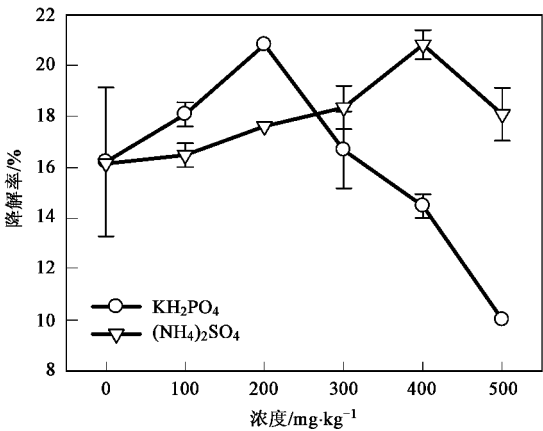


图 4 5% 麦秸添加下 N、P 元素含量对 TPH 降解速率的影响
Fig.4 Effects of N, P nutrient on the biodegradation rate with 5% wheat straw

为 400 mg·kg⁻¹ 时, 石油烃降解率最大; KH₂PO₄ 对石油烃降解率的影响也呈现类似的趋势, KH₂PO₄ 使用量为 200 mg·kg⁻¹ 时, 石油烃降解率最大. 对添加 5% 麦秸的油污土壤而言, 修复时土壤中的最适宜总石油烃、(NH₄)₂SO₄ 和 KH₂PO₄ 的质量比为 190:2:1. 场地实验中, 参考此结果、土壤实际 N、P 含量及当地正常耕地用肥量确定最终施肥用量.

2.5 麦秸强化生物修复油盐混合污染耕地的场地实验

通过洗盐使得污染现场的土壤电导率降至 10 mS·cm⁻¹ 后, 施加由阴沟肠杆菌和刺孢小克银汉霉菌构成的真菌-细菌复合菌剂^[18, 26], 施加 25 d 后, 检测修复土壤、空白对照以及正常耕地土壤中的细菌和真菌生物量, 结果如表 2 所示.

表 2 场地实验中修复土壤、正常耕地以及空白对照土壤中的细菌和真菌生物量

Table 2 Biomass of bacteria and fungi in remediated soil, normal farmland and control land			
项目	修复土壤	正常耕地	空白对照土壤
细菌生物量/CFU·g ⁻¹	(1.08 ± 0.06) × 10 ⁶	(5.12 ± 0.18) × 10 ⁵	(6.86 ± 1.04) × 10 ³
真菌生物量(ergosterol) / μg·g ⁻¹	2.91 ± 0.23	0.57 ± 0.08	0.32 ± 0.06

由表 2 可知, 修复土壤中细菌生物量为正常耕地和空白对照土壤的 2 和 158 倍; 而修复土壤中真菌生物量为正常耕地和空白对照土壤的 5 和 9 倍. 修复土壤相比正常耕地细菌和真菌生物量的增加, 说明场地试验中麦秸对微生物的生长有很好的促进作用.

考察了场地生物强化修复前后总石油烃含量的变化, 如图 5 所示. 从中可知, “S” 形取样点的石油烃含量随着石油烃降解菌的加入在 45 d 内得到了不

同程度的降解. 实验结束后, 各取样点土壤中的总石油烃质量分数均下降至 0.3% 以下, 起始石油烃含量最高的取样点(采样点 2) 的总石油烃降解率达到 75%.

场地实验结果表明, 通过施加麦秸不仅可提高水浸洗盐效率^[17], 而且可促进微生物的生长及其对于石油烃的代谢, 因此特别适宜于油区油-盐混合污染耕地的修复.

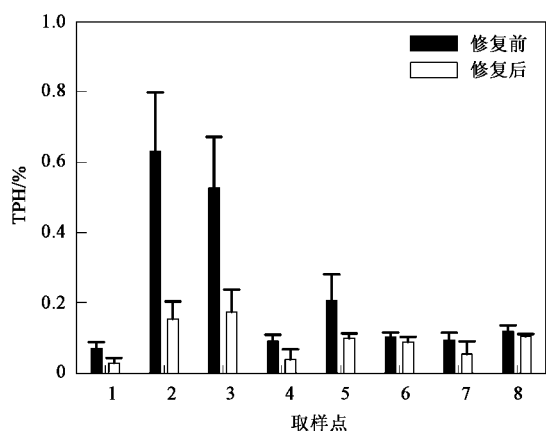


图 5 场地实验前后土壤中 TPH 含量变化

Fig.5 TPH content of contaminated soil before and after field study

3 结论

本研究考察了麦秸对石油烃生物降解的影响. 实验室研究表明, 添加麦秸能够促进石油烃降解菌的生物积累及其对于石油烃的生物降解. 在中原石油田污染耕地现场进行的修复实验进一步证实了添加麦秸与真菌-细菌耦合修复油-盐混合物污染土壤的可行性. 此外, 添加麦秸的方法操作简便易行并适合机械化作业, 在油田区域的石油污染土壤的原位生物修复中具有很好的应用前景.

参考文献:

- [1] Fantroussi S E I, Agathos S N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, **8**(3): 268-275.
- [2] Singer A C, van der Gast C J, Thompson I P. Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation [J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, **23**(2): 74-77.
- [3] Thompson I P, van der Gast C J, Ciric L, *et al.* Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(7): 909-915.
- [4] Vogel T M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, **7**(3): 311-316.
- [5] Ellis D E, Lutz E J, Odom J M, *et al.* Bioaugmentation for accelerated in situ anaerobic bioremediation [J]. *Environ Sci Technol*, 2000, **34**(11): 2254-2260.
- [6] Salanitro J P, Johnson P C, Spinnler G E, *et al.* Field-scale demonstration of enhanced MTBE bioremediation through aquifer bioaugmentation and oxygenation [J]. *Environ Sci Technol*, 2000, **34**(19): 4152-4162.
- [7] Schwartz E, Scow K W. Repeated inoculation as a strategy for the remediation of low concentrations of phenanthrene in soil [J]. *Biodegradation*, 2001, **12**(3): 201-207.
- [8] Lendvay J M, Löffler F E, Dollhopf M, *et al.* Bioreactive barriers: a comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated

- solvent remediation [J]. *Environ Sci Technol*, 2003, **37**(7): 1422-1431.
- [9] Mendoza R E. Hydrocarbon leaching, microbial population, and plant growth in soil amended with petroleum [J]. *Biorem J*, 1998, **3**: 223-231.
- [10] Andreoni V, Cavalca L, Rao M A, *et al.* Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils [J]. *Chemosphere*, 2004, **57**(5): 401-412.
- [11] Labud V, Garcia C, Hernandez T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil [J]. *Chemosphere*, 2007, **66**(10): 1863-1871.
- [12] Bouchez T, Patureau D, Dabert P, *et al.* Ecological study of a bioaugmentation failure [J]. *Environmental Microbiology*, 2000, **2**(2): 179-190.
- [13] 韩慧龙, 汤晶, 江皓, 等. 真菌-细菌修复石油污染土壤的协同作用机制研究 [J]. *环境科学*, 2008, **29**(1): 189-195.
- [14] 韩慧龙, 陈镇, 杨健民, 等. 真菌-细菌协同修复石油污染土壤的场地试验 [J]. *环境科学*, 2008, **29**(2): 454-461.
- [15] 刘铮, 韩慧龙, 王福远, 等. 一种石油污染土壤的原位生物修复方法 [P]. 中国专利: ZL200510130674.4, 2006-06-14.
- [16] 刘铮, 张坤, 徐圆圆, 等. 一种生物质强化石油-盐混合污染土壤的原位生物修复方法 [P]. 中国专利申请: 200710119860.7, 2007-08-02.
- [17] 刘铮, 张坤, 花秀夫, 等. 一种生物质强化盐碱污染土壤的原位修复方法 [P]. 中国专利申请: 200710119859.4, 2007-08-01.
- [18] 刘铮, 张坤, 徐圆圆, 等. 一种生物质强化石油污染土壤的原位生物修复方法 [P]. 中国专利申请: 200710119860.7, 公开号: CN10110417A, 2007-08-01.
- [19] 花秀夫, 刘铮, 张坤, 等. 一种石油烃降解菌的高密度发酵方法 [P]. 中国专利: 200710119858. X, 公开号: CN101130754, 2007-08-01.
- [20] Widada J, Nojiri H, Yoshida T, *et al.* Enhanced degradation of carbazole and 2, 3-dichlorodibenzo-p-dioxin in soils by *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 [J]. *Chemosphere*, 2002, **49**(5): 485-491.
- [21] Mille-Lindblom C, von Wachenfeldt E, Tranvik L J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death [J]. *Journal Microbiological Methods*, 2004, **59**(2): 253-262.
- [22] Brodie E, Edwards S, Clipson N. Soil fungal community structure in a temperature upland grassland soil [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **45**(2): 105-114.
- [23] Barajas-Aceves M, Hassan M, Tinoco R. *et al.* Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, **50**(3): 227-236.
- [24] US EPA 3546 Microwave Extraction [EB/OL]. <http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/3546.pdf>.
- [25] Hofrichter M, Steinbüchel A. Biopolymers. Volume 1: Humic Substances and Coal [M]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2001.
- [26] 韩慧龙, 刘铮, 王福远, 等. 一种用于石油污染物降解的液体微生物制剂 [P]. 中国专利: 200510130676. 2006-07-12.