

生物菌剂对石油污染土壤生物修复作用的研究

黄廷林,徐金兰,唐智新,肖洲强

(西安建筑科技大学环境与市政工程学院,西安 710055)

摘要:在实验室条件下,研究了生物菌剂的投加量、投加方式及环境温度对石油污染土壤的修复作用.结果表明,土壤中石油烃的降解效果与生物菌剂的投加量呈正相关,当生物菌剂投加量为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,修复 48 d 后,石油烃的降解率为 87%. GC-MS 分析结果表明,石油污染原土中烷烃的含量最高为 82.1%,其次为烯烃,含量为 16%,还含有少量的胡萝卜烷、烷基萘、甾烷和藿烷.添加生物菌剂修复 40 d 后,峰的数量由 32 个减少为 14 个,表明异构烷烃、烯烃、胡萝卜烷全部被降解,残留的物质为较难降解的正构烷烃、藿烷和甾烷,呈现前高后低的峰形,即接种细菌优先降解高碳组分,将长链的烷烃降解为短链的烷烃.随着生物菌剂投加量的增加,土壤中残留石油烃的含量逐渐降低.一次加入生物菌剂修复 48 d 后的峰高明显低于分 2 次加入的相应值,故一次性全部加入生物菌剂是最佳的投加方式.温度是限制石油污染土壤生物修复的重要环境因素,当温度为 30°C ,第 48 d 的降解率可达 80%,当温度为 20°C ,第 48 d 的降解率可达 60%,温度高有利于土壤中石油烃的降解,加快修复速率.

关键词:石油污染土壤;生物菌剂;GC-MS 分析;投加方式;温度

中图分类号:X53 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2009)06--

Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil by Bioaugmentation Products

HUANG Ting-lin, XU Jin-lan, TANG Zhi-xin, XIAO Zhou-qiang

(School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: In an experimental investigation of bioaugmentation products affected on the petroleum contaminated soil. The influence of the bioaugmentation products dose, injections and temperature on bioremediation were studied. The results showed that the degradation rate was related positively to the amount of inoculation, when the dose was increased to $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, total petroleum hydrocarbon (TPH) degradation rate was 87% in 48 days. The results of GC-MS indicated that the dominant petroleum constituents in oil-contaminated raw soil were 82.1% *n*-alkane, 16% alkene and little of others hydrocarbons, such as carotane, alkyl naphthalenes, hopanes, and steranes. The peaks amount of GC profile decreased from 32 to 14 after 40 days of bioremediation, this result indicated that branched alkanes, alkene and alkyl naphthalenes were thoroughly degraded, then line alkanes, hopanes and steranes were left in soil. In addition, the longer part of *n*-alkane were degraded with rate relatively higher, while the residual fraction at the end of the test is shorter part of *n*-alkane because bacteria degraded the longer *n*-alkane to shorter. The shorter *n*-alkane concentration decreased with increasing inoculation. Onetime injection of bioaugmentation products into soil clearly improved the biodegradation efficiency higher than injection of bioaugmentation products in turn. Soil temperature also affected TPH degradation rate, when it was 30°C , TPH rate reached 80%, where as when it was 20°C , the TPH rate was lower to 60%, which indicated higher temperature improved TPH degradation and accelerated bioremediation.

Key words: petroleum contaminated soil; bioaugmentation products; GC-MS analysis; injection methods; temperature

随着我国石油工业的发展,受石油污染土地的面积不断扩大,污染程度也日益严重.由于石油的主要成分有烷烃、苯、甲苯、二甲苯等多种复杂芳香烃,这些物质毒性大,有的有致癌致突变作用,进入土壤后难以去除,而且会随着径流进入周围的流域和地下水^[1],从而给油田及周围的生态环境带来了严重的环境问题.石油污染的生物修复技术由于生产费用低、不产生二次污染而被视为一项具有广阔前景的高新技术,近十几年来,在国外得到较大发展.目前大多数研究是通过添加 N、P 等营养物质刺激土壤中土著微生物的活性,来实现污染土壤的生物修复^[2],但由于土著微生物的生长缓慢、数量有限,往

往使生物修复过程受到限制.向石油污染土壤中投加环境适应强、降解效能高的菌种或菌群是提高石油污染土壤生物修复效率的主要手段.在这方面已取得一定的研究成果,例如美国 BGI 公司的一项专利技术就是利用混合菌群来促进石油烃的降解^[3],Wilson 等^[4]也报道了几种对 PAHs 发挥高效降解能力的菌株.魏小芳等^[5]在采用外源微生物修复石油

收稿日期:2008-07-17;修订日期:2008-08-29

基金项目:国家自然科学基金项目(50778147);教育部博士点基金项目(20050703005)

作者简介:黄廷林(1962~),男,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为水环境修复、水资源保护与水质控制, E-mail: huangtinglin@xauat.edu.cn

污染土壤时发现 ,外源微生物加速了土壤中石油污染物的降解 ,胡晓芳等^[6]研究表明 ,在含油量为 5% ~ 45% 的原油污染土壤中喷撒菌液 ,修复 150 d 后 ,降解率高达 90% 以上 .向石油污染土壤中投加高效菌种或生物菌剂是一种切实可行的原位修复技术 ,该技术在国外起步较早 ,已开发出多种商品生物菌剂 ,并应用于实际的修复工程中 ,取得良好的修复效果^[7] .生物菌剂在我国处于研发阶段 ,相关报道较少 ,本研究分析了生物菌剂的投加量、投加方式及环境温度对石油污染土壤生物修复的影响 ,以期为后期的现场修复试验提供理论 .

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤

采用陕北某油田采油井附近表层的原油污染原土 .试验前经过碎散、除杂、过筛及混匀处理 .

1.1.2 生物菌剂

以油田附近的含油土壤为菌源 ,以原油为唯一碳源进行筛选分离 ,得到的高效石油降解菌^[8] ,将文献 [8] 中斜面培养的 SY23 菌株进行活化 ,在无菌条件下 ,高速离心后 ,弃去上清液 ,离心管内的菌体在无菌室内 37℃ 干燥 48 h 制成固体生物菌剂备用 .

1.2 试验方法

1.2.1 处理方法

取一定量固体生物菌剂加入到无菌缓冲溶液 ,使固体菌剂全部溶解制成菌悬液 ,把富集培养基按一定比例加入到膨松剂锯末后湿热灭菌 ,然后把菌悬液加入灭菌后的培养基和锯末中并在培养箱中培养 24h 制成扩大菌剂 ,最后将配制好的菌剂接种到被石油污染的土壤中 .

1.2.2 分析方法

石油烃 (TPH) 含量采用 OCMA-350 非分散红外石油分析仪测定 .石油组分采用气相色谱-质谱联用仪测定 ,气相色谱 (GC) 为 Trace2000 型 ,质谱 (Ms) 为 Voyager 柱子 DB-5 ,长 30 m ,固定相为 0.25 μm 厚 ,测试相对分子质量范围为 30 ~ 450 ,前 6.10 min 为溶剂峰 .分析条件为 :100℃ 开始每 min 上升 10℃ 至 200℃ ,再以 5℃/min 上升到 280℃ ,保留 10℃ ,质谱与气相色谱连接温度为 250℃ .电导率采用电导率仪测定 ;pH 值采用精密 pH 试纸测定 ;含水率采用恒重法测定 .

1.3 试验设计

为研究生物菌剂对石油污染土壤生物修复的作

用 ,进行不同接种量、不同接种方式及不同温度条件下的生物修复模拟试验 .试验在盆钵 (直径为 15 cm ,高 15 cm) 中进行 ,每组试验用土 1 000 g ,各组试验的具体处理措施见表 1 ,每一组做 2 个平行样 .在前期研究的基础上^[9] ,所有土样均采用每天翻耕 1 次 ,每天加水 20 mL ,同时为了避免土壤表面干化 ,用空气加湿器加湿 ,使土壤水分保持 15% 左右 .间隔一段时间采样 ,并测定土壤中石油含量、电导率、含水率及 pH 值 ,随着土壤中石油去除率的降低 ,采样间隔逐渐增大 .

表 1 各组试验处理措施

Table 1 Different laboratory treatment					
项目	生物菌剂的 投量/mg·kg ⁻¹	温度 /℃	水分 /%	接种方式	处理 措施
接种量试验	(CK)	20	18		翻动
	0.01	20	18	1 次全部加入	翻动
	0.2	20	18	1 次全部加入	翻动
	0.4	20	18	1 次全部加入	翻动
	0.6	20	18	1 次全部加入	翻动
接种方式试验	0.2	20	18	分 2 次加入	翻动
	0.4	20	18	分 2 次加入	翻动
	0.6	20	18	分 2 次加入	翻动
温度影响试验	0.2	20	18	1 次全部加入	翻动
	0.2	37	18	1 次全部加入	翻动

2 结果与分析

2.1 生物菌剂的投加量对土壤中石油烃降解的影响

由图 1 和图 2 可知 ,石油污染浓度为 4.3 g·kg⁻¹ 的土壤 ,控制生物菌剂的投加量分别为 0.01、0.2、0.4、0.6 mg·kg⁻¹ 干土 ,降解 8d 后的石油烃去除率分别为 2%、10%、25%、40% ,而不加菌的控制土样 CK 的石油烃的去除率仅为 3% ,第 48 d 的降解率分别为 47%、68%、79%、87% ,远高于不加菌的 CK (16%) .大量研究表明^[10] ,引进外源菌实现修复的关键是解决外源菌和土著菌之间的竞争问题 ,从本试验结果可以看出接种微生物与土著菌种可以稳定共存 ,而且土壤中石油烃的降解效果与生物菌剂的投加量呈正相关 ,生物菌剂投加量为 0.6 mg·kg⁻¹ 时 ,降解效果最好 ,投加量为 0.01 mg·kg⁻¹ 时 ,初期降解效果微弱 ,20 d 后可能由于接种细菌进一步繁殖 ,效果明显提高 .

根据美国环境保护局以及其他研究者的报告^[11] ,土壤微生物对石油类污染物的降解遵循一级反应 ,即 : $\ln c = \ln c_0 - K_T \cdot t$

式中 , c 为土壤中石油含量 (mg·kg⁻¹) ; K_T 为基质去除常数 (d⁻¹) .

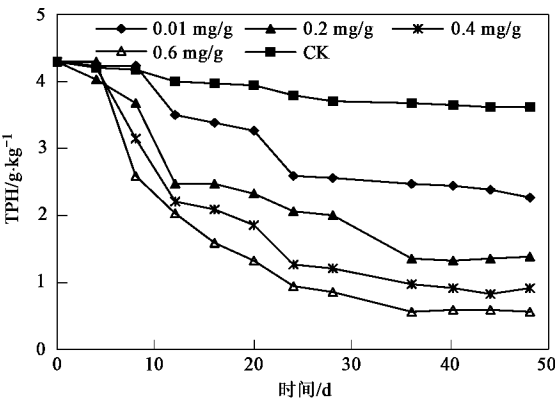


图 1 不同投加量的条件下土壤中残留石油烃浓度曲线

Fig.1 Curve of remaining TPH concentration in soil on different bacteria dose condition

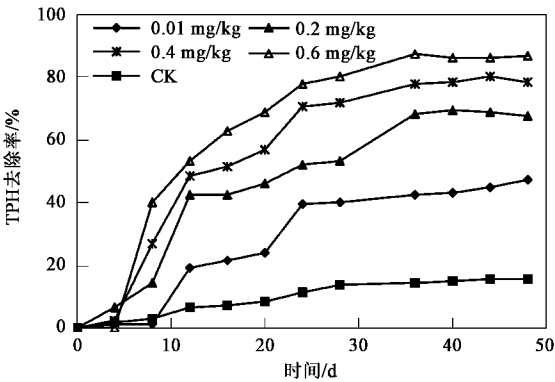


图 2 不同投加量的条件下石油烃去除率

Fig.2 Curve of TPH degradation rate on different bacteria dose condition

以时间为横坐标， $\ln c$ 为纵坐标，对试验点作线性回归，则直线的截距为 $\ln c_0$ ，斜率为 K_T ，可以得到表 2 给出的动力学方程和油的半衰期（油半衰期的计算公式： $t_{1/2} = \ln 2 / K_T$ ）。从表 2 可以看出，接种生物菌剂后土壤中石油烃修复周期与不加菌剂的 CK 相比，缩短 300 d 左右，而且随着生物菌剂投加量的增大，基质去除速率 K_T 值逐渐增加，半衰期逐渐减少，最佳的接种量为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

表 2 不同投加量条件下土壤石油污染物半衰期

Table 2 Half-life of the petroleum contaminant in soil on different dose condition

编号	投加量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	动力学方程式	R^2	K_T 值	半衰期 /d
1	CK	$c = 424.6e^{-0.00225t}$	0.96	0.002 25	308
2	0.01	$c = 402.3e^{-0.0302t}$	0.96	0.030 2	23
3	0.2	$c = 431.8e^{-0.0373t}$	0.96	0.037 3	19
4	0.4	$c = 4203e^{-0.0454t}$	0.96	0.045 4	15
5	0.6	$c = 4299e^{-0.0604t}$	0.97	0.060 4	11

为了进一步验证投加生物菌剂的作用，对不同投加量条件下，降解 48 d 后土样进行萃取，萃取液通过 GC-MS 分析其组分分布，谱图见图 3。可以看出，与 CK 图谱相比，添加生物菌剂降解 48 d 后，所有谱图的出峰数量明显减少，说明土壤中大部分的石油组分被接种生物降解，而且在 35 min 后出峰的高碳石油污染物基本完全被降解，只是投加量较低时，土壤中会残留高浓度的低碳石油烃，随着菌剂投加量的增加，出峰早的低碳石油污染物的含量减少，当菌剂投加量达到 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时，峰形基本与基线相平，进一步说明提高生物菌剂的投加量，可以提高修复效率，降低土壤中残留石油烃的含量。

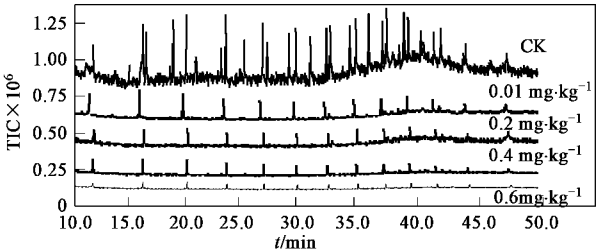


图 3 不同投加量的条件下降解 48 d 后土壤中残留石油烃总离子图

Fig.3 TIC of remaining TPH concentration in soil under different dose conditions

污染土壤中石油烃的组分非常复杂，GC-MS 分析结果表明石油污染原土中烷烃的含量最高为 82.1%，其次为烯烃，含量为 16%，还含有少量的胡萝卜烷、烷基萘、甾烷和藿烷，但未检测到单环苯系物。魏小芳等^[5]研究的石油污染原土中也未检测到单环苯系物，与本试验测定结果一致。表 3 给出了不同投加量条件下降解 48 d 后，土壤中烷烃和烯烃的降解率。荷质比 (m/z) 可以用来表示不同化学结构的物质， m/z 为 57 时表示该物质存在 $[\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2]$ —的结构， m/z 为 97 时表

示该物质存在 $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 的结

构， m/z 为 55 时表示该物质存在 $[\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}]$ —的结构。从表 3 中可以看出，烯烃和异构烷烃比正构烷烃容易生物降解，只要添加生物菌剂，降解 48 d 后未检测到异构烷烃，去除率为 100%，但能检测到少量的烯烃，当菌剂投加量增加到 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时，烯烃才被完全降解。正构烷烃的含量随菌剂投加量的增加而降低，当投加量为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时，正构烷烃的去除率达到 97.4%，表

2.2 生物菌剂的投加方式对土壤中石油烃降解的影响

试验分为 A、B 两组 ,A 组是将生物菌剂在试验开始时一次加入 ,B 组是在试验开始时加入一半量的生物菌剂 ,在试验运行到 20 d 时加入剩下的一半 ,两组试验最终的生物菌剂投加量相同 ,分别对投加量为 0.2、0.4、0.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 系列进行了试验 ,降解 48 d 后 ,对土壤中残留的石油烃进行了 GC-MS 分析 ,结果见图 5.从图可以看出 ,一次加入的峰高明显低于分 2 次加入的峰高 ,组分分析结果表明土壤中主要残留正构烷烃及少量的藿烷没有被降解 ,以正构烷烃为例 ,投加 0.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时 ,A 方式的残留正构烷烃的峰面积为 170 000 ,而 B 方式相应的值为 261 000 ,投加 0.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时 ,A 方式的残留正构烷烃的峰面积为 81 000 ,而 B 方式相应的值为 175 000 ,投加 0.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时 ,A 方式的残留正构烷烃的峰面积为 61 000 ,而 B 方式相应的值为 142 000 ,可见一次性全部加入生物菌剂是最佳的投加方式 ,本试验结果与钟毅等的研究成果一致^[13] . 主要由于外投的生物菌剂能很快适应环境 ,迅速发挥石油降解活性 ,采用一次性加入生物菌剂 ,由于初期菌剂投量大 ,投加 20 d 后就能去除土壤中约 50% 的石油烃 ,一次投加 0.2、0.4、0.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 修复 48 d 后 ,石油烃的降解率分别为 68%、79%、87% ;而分 2 次投加 20 d 后仅 30% 左右的石油烃被降解 ,修复 20 d 时加入另一半生物菌剂后 ,此时土壤中微生物群落结构已达到平衡 ,不易改变 ,故石油烃降解率没有大幅度提高 ,修复 48 d 后 ,石油烃降解率分别为 54%、63%、74% ,低于一次接种的结果 .

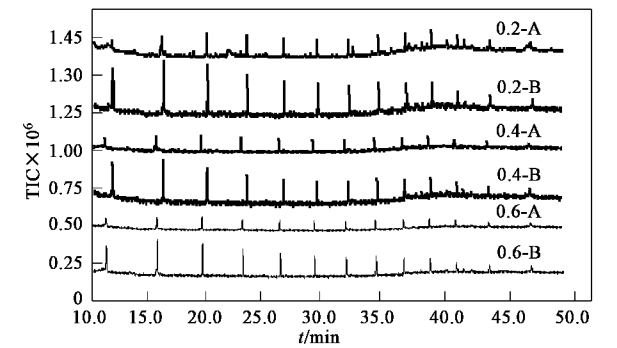


图 5 不同投加方式降解 48 d 后土壤中残留石油烃总离子图
Fig.5 TIC of remaining TPH concentration soil under different method conditions

2.3 温度对生物菌剂降解土壤中石油烃的影响

大量的研究表明^[14] ,温度是限制石油污染土壤生物修复的重要环境因素 ,设计 2 组试验 ,一组

试验在实验室内常温条件下进行 ,试验从 2006 年 5 月 1 日到 2006 年 6 月 27 日结束 ,室内平均温度为 20℃ ,另一组在恒温控制箱内进行 ,控制温度为 30℃ ,图 6 给出了不同温度条件下 ,石油烃降解试验结果 .结果表明温度对生物菌剂降解土壤中石油烃有较明显的影响 .当高温 (30℃) 修复 3 d 后 ,石油烃的降解率高达 29.8% ,而常温 (20℃) 修复 3 d 后 ,石油烃的降解率仅为 7% ,由于温度高 ,细菌生长繁殖速度快、代谢旺盛降解率高 ,高温修复 7 d 后 ,降解率达到 53% ,而常温条件下 ,细菌的生长繁殖速度减缓 ,降解率仅为 7.7% ,表明较高的温度有利于石油烃的降解 .这里需要说明的是修复 10 d 后 ,常温条件下 ,石油烃去除率迅速增加 ,表明接种细菌经过一段时间的驯化 ,可以适应较低的环境温度 ,修复 48 d 后 ,石油烃的降解率为 60% ,比高温条件的降解率低 20% .

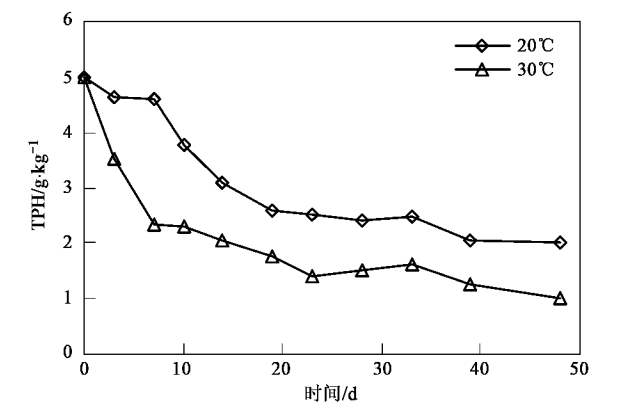


图 6 不同温度条件下石油含量的变化规律
Fig.6 Curve of remaining TPH concentration in soil under different temperature conditions

3 结论

(1) 接种微生物与土著菌种可以稳定共存 ,而且土壤中石油烃的降解效果与生物菌剂的投加量呈正相关 ,生物菌剂投加量为 0.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时 ,降解效果最好 .

(2) GC-MS 分析结果表明石油污染原土中烷烃的含量最高为 82.1% ,其次为烯烃 ,含量为 16% ,还含有少量的胡萝卜烷、烷基萘、甾烷和藿烷 ,添加生物菌剂修复 40 d 后 ,峰的数量由 32 个减少为 14 个 ,表明异构烷烃、烯烃、胡萝卜烷全部被降解 ,残留的物质为较难降解的正构烷烃、藿烷和甾烷 ,呈现前高后低的峰形 ,即接种细菌优先降解高碳组分 ,将长链的烷烃降解为短链的烷烃 ,随着生物菌剂投加量的

增加 ,土壤中残留石油烃的含量逐渐降低.

(3)1 次加入生物菌剂修复 48 d 后的峰高明显低于分 2 次加入的相应值 ,故一次性全部加入生物菌剂是最佳的投加方式.

(4)温度是限制石油污染土壤生物修复的重要环境因素 ,温度高有利于土壤中石油烃的降解 ,加快修复速率 ;常温条件下 ,接种细菌经过 10 d 的驯化后 ,能适应较低的温度环境 ,修复 48 d 后 ,石油烃的降解率达到 60% ,比高温条件的降解率低 20% .

参考文献 :

[1] 黄廷林 ,任磊 .黄土地区油类污染物的径流污染模拟及模型预测[J].中国环境科学 ,2000 ,20(4) 345-348 .
[2] 何良菊 ,魏德州 ,张维庆 .土壤微生物处理石油的研究[J].环境科学进展 ,1999 ,17(3) :110-115 .
[3] Baltic General Investment Corporation .Method of decontamination of a hydrocarbon-polluted environment by the use of bacterial composition [P]. US patent ,1996 ,5494580 .
[4] Wilson S C ,Jones K C . Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons :a review [J]. Environmental pollution ,1993 ,81(3) 229-249 .
[5] 魏小芳 ,张忠智 ,郭绍辉 ,等 .外源微生物强化修复石油污染土

壤的研究[J].石油化工高等学校学报 ,2007 ,20(2) :1-4 .
[6] 胡晓芳 ,夏福军 ,朱南文 ,等 .原油污染土壤的生物法修复效果研究[J].环境化学 ,2006 ,25(6) 593-597 .
[7] Mark A S ,James S B ,Chery A P ,et al . Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland[J]. Ecological Engineering ,2004 ,22 263-27 .
[8] 徐金兰 ,黄廷林 ,唐智新 ,等 .高效石油降解菌的筛选及石油污染土壤生物修复特性的研究[J].环境科学学报 ,2007 ,27(4) : 622-628 .
[9] 唐智新 .西北黄土地区石油污染土壤生物修复研究[D].西安 :西安建筑科技大学 ,2007 .19-33 .
[10] Bouchez T ,Patureau D ,Dabert P ,et al . Ecological study of a bioaugmentation failure[J]. Environmental Microbiology ,2000 ,2 : 179-190 .
[11] Willumsen P A ,Arvin E . Kinetics of degradation of surfactant-solubilized fluoranthene by a Sphingomonas paucimobilis[J]. Environmental Science & Technology ,1999 ,33 2571-2578 .
[12] 林凤翱 ,于占国 ,李洪 ,等 .海洋丝状真菌降解原油研究[J].海洋学报 ,1997 ,10(5) 68-76 .
[13] 钟毅 ,李广贺 ,张旭 ,等 .污染土壤石油生物降解与调控效应研究[J].地学前缘 ,2006 ,13(1) :128-133 .
[14] Leahy J G ,Colwell R R . Microbia degradation of hydrocarbons in the environmen[J]. Microbiol Rev ,1990 ,54(3) 305-315 .