

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第38卷 第10期

Vol.38 No.10

2017

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社出版



ENVIRONMENTAL SCIENCE

第38卷 第10期 2017年10月15日

目 次

中国城市热岛时空特征及其影响因子的分析
□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□
□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□
岩溶关键带微量元素运移的时空变化:以豫西鸡冠洞为例 ··· 梁沙,杨琰,张娜,孙喆,张萍,田宁,凌新有,任小敏(4130) 龟石水库夏季富营养化状况与蓝藻水华暴发特征 ····································
阿哈水库叶绿素 a 时空分布特征及其与藻类、环境因子的关系 罗宜富,李磊,李秋华,焦树林,李红梅,陈峰峰(4151) 天目湖沙河水库浮游植物群落结构的时空异质性
程海沉积物重金属时空变化及人为污染与潜在生态风险 ······· 于真真, 刘恩峰, 张恩楼, 林琪, 沈吉, 王荣, 李艳玲(4169)自然降雨条件下红壤坡地磷素随径流垂向分层输出特征 ··········· 左继超, 郑海金, 奚同行, 王凌云, 聂小飞, 刘昭(4178)邻苯二甲酸酯在三峡库区消落带非淹水期土壤中污染特征及健康风险 ············ 杨婷, 何明靖, 杨志豪, 魏世强(4187)滦河干流水体多环芳烃与有机氯农药季节性分布、组成及源解析 ····································
董政, 马玉龙, 李珺琪, 袁浩东, 金军, 王英(4212) 道路灰尘中有机磷阻燃剂污染特征及人体暴露 ········李静, 王俊霞, 许婉婷, 尚荣双, 顾海东, 温耀进, 张丽君(4220) 居民经手口途径摄入含 PAHs 颗粒物的致癌风险评价 ····································
一個大學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學學
四段式曝气对好氧颗粒污泥脱氮性能的影响
基于总量及形态的土壤重金属生态风险评价对比:以龙岩市适中镇为例
猪粪堆肥过程中金霉素去除及重金属形态变化
機生物多样性对土壤碳代谢特征的影响 吴蔓莉,陈凯丽,叶茜琼,祁燕云,徐会宁,王卓,薛鹏飞,朱常琳(4412) 微生物多样性对土壤碳代谢特征的影响 安小麦田 O3 气孔与非气孔沉降及风险评估 徐静馨,郑有飞,赵辉,储仲芳,黄积庆,袁月(4427) 中国西南酸雨区降水化学特征研究进展 周晓得,徐志方,刘文景,武瑶,赵童,蒋浩(4438) 《环境科学》征稿简则(4261) 《环境科学》征订启事(4270) 信息(4186, 4404, 4446)

堆肥-生物强化对重度石油污染土壤的修复作用

吴蔓莉, 陈凯丽, 叶茜琼, 祁燕云, 徐会宁, 王卓, 薛鹏飞, 朱常琳

(西安建筑科技大学环境与市政工程学院,西北水资源与环境生态教育部重点实验室,西安 710055)

摘要:为解决微生物强化修复油污土壤过程中降解菌在低温环境下活性较低的问题,利用有机堆肥作为固体培养基对降解菌进行扩大培养,将获得的降解菌-堆肥制剂施入油污土壤中进行修复研究.利用重量法和 GC-MS 分析土壤中石油烃含量变化,利用 Illumina MiSeq 对土壤微生物群落结构进行分析.结果表明,利用堆肥作为固体基质可对降解菌进行扩大培养.低温环境下利用堆肥-降解菌制剂对油污土壤修复 30 d,土壤中石油烃、烷烃、多环芳烃去除率分别为 27.0%、19.6%、10.0%;自然放置的土壤中3 种烃去除率分别为 4.5%、9.5%、2.3%.加入降解菌-堆肥制剂进行修复的土壤香农指数和Ace 指数分别由 4.42 和 1718.5增加为 5.30 和 2170.5;土壤中变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)所占丰度由 53.4% 和 25.9% 分别降低至 48.9% 和 14.1%,拟杆菌门(Bacteroidetes)所占丰度由 5.0%增加至 24.5%。属水平上,不动细菌属(Acinetobacter)和假单胞菌属(Pseudomonas)所占丰度由 0.02% 和 3.4%分别提高至 15.2%和 4.6%。研究结果表明,在低温条件下向石油污染土壤中施入降解菌-堆肥制剂可提高土壤中的石油烃去除率,并使土壤微生物群落结构发生明显变化。

关键词:石油污染土壤;低温条件;扩大培养;降解菌-堆肥制剂;Illumina MiSeq 测序中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2017)10-4412-08 **DOI**: 10.13227/j. hjkx. 201702056

Remediation of Petroleum-Contaminated Soil Using a Bioaugmented Compost Technique

WU Man-li, CHEN Kai-li, YE Xi-qiong, QI Yan-yun, XU Hui-ning, WANG Zhuo, XUE Peng-fei, ZHU Chang-lin

(Key Laboratory of Northwest Water Resources, Environment and Ecology, Ministry of Education, School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 7,10055, China)

Abstract: Bioaugmented compost was created by inoculating petroleum-degrading bacteria into mature compost. The petroleum hydrocarbon degradation efficiencies were investigated by applying this enhanced compost to petroleum-contaminated soil under low temperatures. The results showed that the degrading bacteria can be enriched in the mature compost. After 30 d of remediation, the removal efficiency of TPH, alkanes, and PAHs in the soil was 27.0%, 19.6%, and 10.0%, compared to natural attenuation (CK), which was 4.5%, 9.5%, and 2.3%, respectively. In response to remediation, the relative abundance of Proteobacteria and Actinobacteria phyla decreased from 53.4% and 25.9% to 48.9% and 14.1%, respectively, and Bacteroidetes phylum increased from 5.0% to 24.5%. At the genus level, the relative abundance of *Acinetobacter* and *Pseudomonas* increased from 0.02% and 3.4% to 15.2% and 4.6%, respectively. The results indicated that the bioaugmented compost may efficiently facilitate and speed up the bioremediation of petroleum-contaminated soil under low-temperature conditions. Soil microbial diversity and structure of microbial communities are sensitive to the remediation.

Key words: petroleum-contaminated soil; low temperature; scale up; bioaugmented compost; Illumina MiSeq sequencing

利用微生物法修复石油污染土壤具有成本低、效果好以及对环境的二次污染小等优点,被认为是最有前景的修复技术^[1,2]. 常用的微生物修复技术包括 生 物 刺 激 (biostimulation) 和 生 物 强 化 (bioaugmentation) 等^[3-6]. 目前许多文献报道了利用生物刺激^[7~12]或者生物强化技术^[13,14]修复石油污染土壤的研究工作.

尽管利用微生物强化技术修复石油污染土壤取得了一系列进展,但在实际应用过程中仍存在许多问题.一些筛选出的降解菌在适宜的环境条件下可以有效降解石油烃,但在进行实际场地修复时,外

源微生物容易受到污染体系温度、水含量、pH、营养物质供给因素的不规律波动以及土著微生物的竞争作用而失去降解能力.另一方面,当地的气候环境也会影响外源微生物在石油污染地的生长^[15,16].这些因素制约着生物强化技术的应用,致使许多微

收稿日期: 2017-02-14; 修订日期: 2017-05-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(21577109); 陕西省自然科学基础研究基金项目(2015JM5163, 2015JM5226); 陕西省教育厅重点实验室科学研究计划项目(13JS048)

作者简介: 吴蔓莉(1974~), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为污染土壤的生物修复技术研究, E-mail: wumanli1974@hotmail.com

生物强化修复技术仍处于实验室研究阶段[17~19].

为解决低温条件下利用微生物强化技术修复油污土壤时投加的降解菌活性较低等问题,本研究利用腐熟期的有机堆肥作为固体培养基对石油烃降解菌进行扩大培养,将获得的降解菌-堆肥制剂施入石油污染土壤中进行修复处理,通过利用堆肥对土壤的保水、保温及透气能力,解决外源微生物在低温环境下的不规律波动及难以存活问题,以期为低温条件下提高微生物强化修复效果提供方法和理论依据.

1 材料及方法

1.1 降解菌和堆肥

研究中所用到的 5 株降解菌是前期工作中从西北地区石油污染土壤中分离获得的,包括 1 株铜绿假单胞菌、2 株施氏假单胞菌、1 株假单胞菌和1 株不动细菌^[20]. 菌株的详细情况见表 1.

所用腐熟堆肥取自西北农林科技大学, 其基本 性质如表 2 所示.

表 1 实验中用到的 5 株石油烃降解菌

Table 1 Identity of the 16S rRNA gene sequences of TPH-degrading bacteria

编号	序列号	种属	序列相近的微生物	相似度/%
MBS-1	KF453952	铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)	GU377209. 1	99
MBS-2	KF453953	施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)	DQ224384. 1	99
MBS-3	KF453954	施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)	EU603456. 1	99
MBS-4	KF453956	假单胞菌(Pseudomonas sp.)	EU180220. 1	99
MBS-5	KF453955	不动细菌(Acinetobacter sp.)	FJ791167. 1	99

表 2 堆肥的基本性质/mg·kg-1

Table 2 Selected chemical characteristics of the compost/mg·kg

指标	С	N	P	K	Na	Ca	Mg	Al	s/	Cu	Fe	Mn	Mo Zn
数值	185 600	20 400	6 500	36 200	3 810	21 300	2 420	1 330	1 575	400	1 615	284	4. 46 140

1.2 利用堆肥扩大培养降解菌

混合菌悬液的制备:用接种针挑取保存在斜面上的 5 株降解菌分别置于 150 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 25℃、150 r·min⁻¹条件下振荡培养 48 h, 5 000 r·min⁻¹离心分离并利用 PBS 缓冲液洗涤菌株 3 次,用 PBS 缓冲液调节每株菌悬液的 D 值为 1.0(600 nm 条件下测定),取等量的 5 株降解菌悬液混匀,即得到混合菌悬液.

实验室条件下对堆肥分别进行如下所示的处理. C-1:不作任何处理的 150 g 堆肥(作为控制实验); C-2:向 150 g 堆肥中加入 6 mL 原油(原油含量为 3.5%,对堆肥中的土著微生物进行驯化); C-3:向 150g 堆肥中加入 1 mL D_{600} = 1.0 的混合降解菌悬液(利用堆肥作为固体基质培养降解菌); C-4:向 150 g 堆肥中同时加入 6 mL 原油和 1 mL D_{600} = 1.0 的混合降解菌悬液(利用原油驯化堆肥中的土著微生物,同时以堆肥作为固体基质培养降解菌).

将处理过的堆肥放在实验室内,在室温为20℃条件下进行培养,利用菌落计数法对不同处理堆肥中的微生物数量进行连续7 d 测定.每个处理做3个平行.

1.3 利用降解菌-堆肥制剂修复石油污染土壤 石油污染土壤取自陕北地区某油井附近,土壤 基本理化性质测定方法:pH值:电位计法;有机质:重铬酸钾氧化-滴定法;总有机碳:非色散红外吸收法;总盐含量:电导法;阳离子交换容量:EDTA-乙酸铵盐交换法.基本理化性质测定结果为:pH8.1,有机质13.0%,总有机碳11.2%,总盐含量2585 mg·kg⁻¹,阳离子交换容量4.87 cmol·kg⁻¹.土壤中总石油烃、烷烃和多环芳烃的含量分别为88400、68800和9120 mg·kg⁻¹.

土壤经碎散、除杂、混匀后过 2 mm 筛. 称取 15 份油污土壤,每份质量为 1 kg,分装于 15 个花盆中,以在自然条件下放置不作修复处理的油污土壤作为控制实验(S-1),对土壤分别进行表 3 所示的修复处理. 每个处理 3 个平行.

将 15 盆土壤置于室外进行模拟自然条件下的 修复,放置时间为 2016 年 2 月 4 日至 2016 年 3 月 4 日. 当月最低气温为 -5°、月平均温度为 2°、降水量为 10 mm.

修复1个月后取样进行测定.将每盆土充分混合均匀,利用梅花形布点采样法从每盆土中取5g土样,利用超声波萃取法提取土壤中的总石油烃并利用重量法进行测定^[21].利用中性氧化铝柱(10×150 mm, Agilent Technologies)对提取的总石油烃进行层析分离,获得烷烃和多环芳烃组分.利用气相

色谱-质谱分析仪(7000B型,美国安捷伦公司)测定烷烃和多环芳烃含量[22].

表 3 石油污染土壤的修复方案

Table 3 Remediation of petroleum-polluted soil with different treatments

编号 修复方案设计

- S-1 1 kg 石油污染土壤
- S-2 1 kg 石油污染土壤 + 3 mL 降解菌混菌悬液 (D_{600} = 1.00)
- S-3 1 kg 石油污染土壤 +150 g 堆肥
- S-4 1 kg 石油污染土壤 + 150 g 原油-堆肥制剂(C-2, 培养 4 d)
- S-5 1 kg 石油污染土壤 + 150 g 降解菌-堆肥制剂(C-3, 培养 3 d)

1.4 土壤微生物群落结构研究

利用 OMEGA 试剂盒(D5625-01 Soil DNA Kit, USA)提取土壤中总 DNA, 利用琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 的完整性.

利用 341F/805R (341F 引物:5'-CCCTACACGA CGCTCTTCCGATCTG-3'; 805R 引物:5'-GACTGGA GTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA-3') 对提取的总DNA 进行 PCR 扩增. 扩增步骤:94 ∞ 变性 30 s, 45 ∞ 退火 20 s, 65 ∞ 延伸 30 s, 重复5 个循环; 94 ∞ 变性 20 s, 55 ∞ 退火 20 s, 72 ∞ 延伸 30 s, 重复20 个循环; 引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物, 95 ∞ 预变性 30 s, 95 ∞ 变性 20 s, 55 ∞ 退火

15 s, 72℃延伸 30 s, 重复 5 个循环.

纯化回收所需的 PCR 产物,利用 Qubit 2.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量.利用 Illumina MiSeq 平台进行高通量分析测定,最终上机测序的量为 20 pmol.

1.5 数据统计与分析

利用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析和计算,利用 Usearch 软件校正测序结果并将所有样本按照序列间的距离进行聚类分析,利用 RDP classifier 和 Mothur 软件进行物种分类和 Alpha 多样分析.

2 结果与讨论

2.1 降解菌在堆肥中的扩大培养

降解菌在堆肥中的扩大培养结果如图 1 所示. 堆肥中土著微生物数量约为 2.4 × 10⁵ CFU·g⁻¹ (C-1),并且在连续 7 d 的测定中基本保持不变. 向堆肥中加入原油对土著微生物进行驯化时(C-2),与同期的控制实验(C-1)相比,驯化第 1 d 的堆肥中总菌数量降低了 1 个数量级,驯化第 2 d 总菌量增加,并在随后的几天内基本保持不变,但总体上菌量相对 C-1 减少. 说明在 150 g 堆肥中加入 6 mL 原

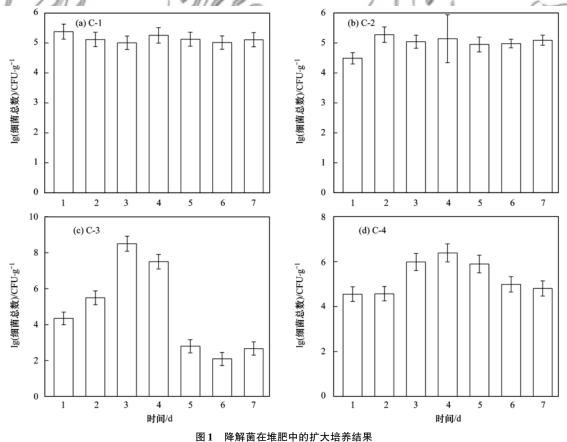


Fig. 1 Total microbial counts in differently treated composts

油后, 初始阶段原油对堆肥中的土著微生物有毒性 作用,经过适应期后,堆肥中的大部分微生物可以 适应石油的刺激作用继续生长. 利用堆肥作为固体 基质扩大培养石油烃降解菌(C-3),与同期的C-1 相比, 堆肥中的微生物数量在初期略有降低, 在培 养的第3d数量急剧增加,第4d后开始减少.说 明在培养初期, 堆肥中的土著微生物和加入的降解 菌之间存在竞争和拮抗作用, 经过适应期后, 堆肥 中丰富的养分为降解菌的生长提供了有利条件, 使 得降解菌在堆肥中迅速生长,在第3d时数量达到 最大,到第4d时开始凋亡,第5d时凋亡达到最 大. 向堆肥中同时加入原油和降解菌的处理中(C-4), 总菌量在培养的第4d时达到最大, 但是微生 物数量远小于不加原油的 C-3 处理, 说明在堆肥中 同时加入原油和降解菌,初期阶段不利于降解菌在 堆肥中的生长, 但在后期(5~7d), 原油的刺激作 用可以使得降解菌在堆肥中的凋亡速度变缓.

2.2 降解菌-堆肥制剂对油污土壤中石油烃的去除效果

根据 2.1 节的研究结果可知, 石油烃降解菌可以在腐熟有机堆肥中扩大培养. 将获得的降解菌-堆肥制剂(C-3, 培养 3 d)低温条件下施入重度石油 污染土壤中进行修复处理(表 3), 所得结果如图 2、图 3 所示.

根据图 2、图 3 可知,原土壤(0 d)中总石油 烃、烷烃和多环芳烃的含量分别为88 400、68 800 9 120 mg·kg-1. 将土壤在自然条件下放置 30 d(S-1),土壤中石油烃、烷烃、多环芳烃含量分别为 84 400、62 300、8 910 mg·kg⁻¹,与原土壤相比,土 壤中石油烃、烷烃、多环芳烃去除率分别为4.5%、 9.5%、2.3%;向土壤中直接投加降解菌进行强化 修复30 d(S-2), 土壤中的石油烃、烷烃、多环芳烃 含量分别为86 000、66 300、8 810 mg·kg⁻¹, 去除率 分别为 2.7%、3.6%、3.4%;加入 150 g 堆肥进行 修复处理(S-3)的土壤中的石油烃、烷烃、多环芳 烃含量为75 300、60 100、8 280 mg·kg⁻¹, 去除率分 别为 14.8%、12.6%、9.2%;加入降解菌-堆肥制 剂进行修复处理(S-5)的土壤中石油烃、烷烃、多 环芳烃含量分别为64 500、55 300、8 210 mg·kg⁻¹, 去除率分别为 27.0%、19.6%、10.0%. 结果表明 自然衰减(S-1)和直接投菌法(S-2)对土壤中石油 烃的去除效果较差,而利用降解菌-堆肥复合制剂 对土壤中的石油烃有较好的去除效果.

笔者以前的研究工作发现,在室温条件下(20

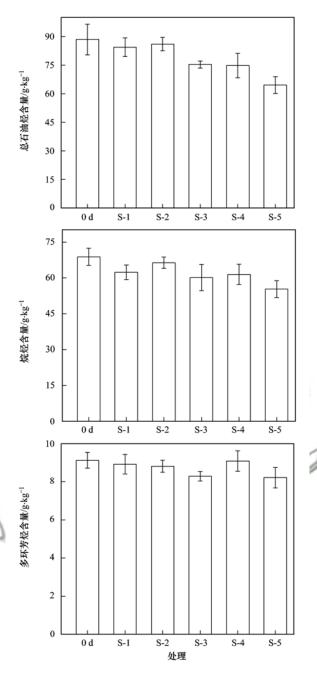


图 2 不同处理土壤中的石油烃、烷烃、多环芳烃含量 Fig. 2 Concentrations of TPH, total alkanes, and PAHs in different treatments

~35℃)利用直接投菌法对西北地区油污土壤进行修复处理,对土壤中石油烃可起到较好的去除作用. 吴蔓莉等对陕北子长地区石油污染土壤进行生物强化修复 8 周,土壤中总石油烃的去除率为33.0%~58.0%^[22~24];叶茜琼等^[25]在实验室条件下利用生物强化合并生物刺激对甘肃庆阳石油污染土壤进行 18 周的修复研究,土壤中烷烃和多环芳烃去除率分别为50.8%和45.2%.本研究中,将石油污染土壤置于室外低温条件下(月最低气温为

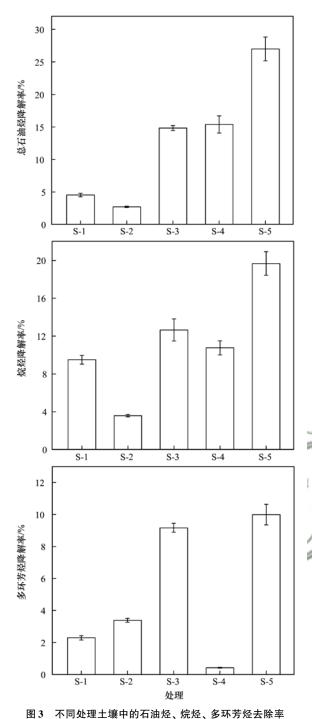


Fig. 3 Degradation efficiencies of TPH, total alkanes, and PAHs in different treatments

-5℃, 月平均温度为2℃)修复30 d时, 直接投加降解菌的土壤中(S-2)总石油烃、烷烃、多环芳烃的去除率分别为2.7%、3.6%、3.4%, 利用降解菌-堆肥制剂对土壤进行处理(S-5)30 d, 土壤中石油烃、烷烃、多环芳烃去除率分别为27.0%、19.6%、10.0%. 结果说明利用堆肥的保水保温能力可以提高降解菌在低温条件下对土壤中石油烃的去除效果.

2.3 修复处理对土壤菌群微生态的影响

2.3.1 高通量测序结果的质量控制

利用 PCR 技术扩增细菌的 16S rRNA 基因,并进行高通量测序分析. 对测序结果进行优化序列统计及测序质量评价,所得结果如表 4 所示. S-1~S-5处理中所测得的原始序列总数分别为31 693、32 622、29 906、28 909 和30 104. 利用 Rear 软件和Prinseq 软件对原始序列进行结构、质量剪切等处理后,得到质控后剩余序列数目分别为31 666、32 587、29 871、28 884 和30 070. 利用 usearch 软件去除预处理后序列中的嵌合体与靶区域外序列后,最终得到的有效序列数分别为31 349、30 774、26 802、26 911 和27 407. 序列优化率在 89%以上,说明本次序列优化步骤合理.

根据 97% 相似度对处理后剩余序列进行 OTU 分类, 利用 Mothur 软件进行 rarefaction 分析, 并利用 R 语言工具绘制稀疏性曲线. 所得结果如图 4 所示. 当序列数目大于25 000时, 曲线趋于平坦, 本次测序数据量为30 000 左右, 说明本次测序深度足够.

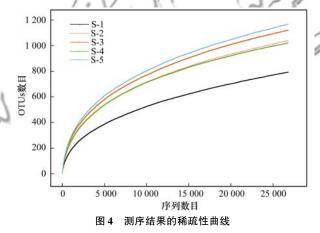


Fig. 4 Rarefaction curves of high throughput sequencing

2.3.2 微生物群落多样性

土壤微生物群落多样性测定结果如表 5 所示. S-1~S-5 处理中微生物的 OTUs 数量分别为 842、1092、1121、1023和1177. 分别归属于 31、33、29,27、30个门,门水平上多数为 5 种处理样品所共有,而在属水平上多数为不同处理样品独有.

根据表 5,向土壤中加入降解菌-堆肥制剂进行修复处理的土壤(S-5)Ace 指数和 Chaol 指数值均为最大,其次为加入堆肥(S-3)和加入降解菌处理(S-2)的油污土壤;自然放置(S-1)和加入原油-堆肥处理的土壤(S-4),Ace 指数和 Chaol 指数值较小.比较不同修复处理土壤的香农指数和辛普森多

表 4 优化序列统计及测序质量评价

Table 4 Sequence statistic and quality estimation of five soil san	Table 4	Sequence	statistic	and	quality	estimation	of	five	soil	samı	$d\epsilon$
--------------------------------------------------------------------	---------	----------	-----------	-----	---------	------------	----	------	------	------	-------------

不同处理	优化前序列总数	质控后剩余序列数	非靶区序数	嵌合体数	有效序列	优化率/%
S-1	31 693	31 666	1	316	31 349	98. 9
S-2	32 622	32 587	0	1 813	30 774	94. 3
S-3	29 906	29 871	4	3 065	26 802	89. 6
S-4	28 909	28 884	11	1 962	26 911	93. 1
S-5	30 104	30 070	1	2 662	27 407	91.0

表 5 不同处理土壤的微生物群落多样性1)

Table 5 Biodiversity of petroleum-polluted soil remediated by different treatments

		7 1 1			
项目	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5
测序分析					
OTUs 数量	842(560)	1 092 (637)	1 121 (706)	1 023 (600)	1 177 (758)
门	31(4)	33(1)	29(0)	27(0)	30(0)
纲	58(4)	53(1)	53(2)	48(0)	48(0)
目	74(3)	80(2)	77(3)	75(1)	78(2)
科	149(10)	170(6)	161(6)	161(9)	169(6)
属	842(560)	1 092 (637)	1 121 (706)	1 023 (600)	1 177 (758)
多样性指数					~~~
香农指数	4. 42	4. 85	5. 20	4. 94	5. 31
Ace 指数	1 718. 5	1 844. 2	1 939. 2	1 653. 3	2 170. 5
Chao1 指数	1 337. 5	1 655. 5	1 660. 1	1 497. 2	1 857, 1
辛普森指数	0. 030 2	0. 030 4	0. 014 2	0. 020 7	0. 012 6

¹⁾括号内表示在不同处理土壤样品中观察到的独有的分类单元数目

样性指数可知,与未经处理的土壤(S-1)相比,向土壤中加入降解菌-堆肥制剂(S-5)可提高土壤的微生物多样性.

多样性指数是用于评价土壤微生物丰富度和群落均匀度的综合指标. Ace 指数和 Chaol 指数用来评价土壤微生物丰富度, Ace 指数和 Chaol 指数值越大, 土壤微生物丰富度越大. 香农指数值越大, 辛普森指数值越小, 土壤微生物均匀度越高^[26,27]. 根据测定结果可知,向油污土壤中施入降解菌-堆肥制剂可同时提高土壤微生物群落的丰富度和均匀度.

2.3.3 土壤微生物群落结构变化

对不同处理土壤前 20 种优势菌门的相对丰度进行了分析,所得结果如图 5 所示,在未经修复处理的油污土壤中(S-1),所占丰度最大的菌门是变形菌门(Proteobacteria),其次为放线菌门(Actinobacteria),其他一些所占丰度较大的菌门包括拟杆菌门(Bacteroidetes)和酸杆菌门(Acidobacteria)等.

与未经修复处理的油污土壤相比,经过修复处理的土壤(S-2~S-5)中不同微生物所占丰度在门水平上均发生了较大变化.变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)所占丰度明显减小,拟

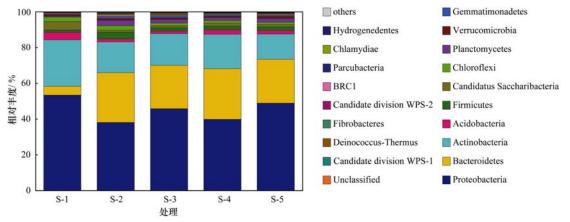


图 5 不同处理土壤中微生物在门水平上的相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of the 20 most abundant phyla in different treatments

杆菌门(Bacteroidetes) 所占丰度在经过处理的土壤中显著提高.

不同处理土壤中微生物在属水平上的相对丰度测定结果如图 6 所示. 未经处理的石油污染土壤(S-1)中,粒杆黏细菌属(Chondromyces)、交替赤细菌(Altererythrobacter)、Saccharibacteria、诺卡氏菌属(Nocardioides)、假黄单胞菌属(Pseudoxanthomonas)、原小单孢菌属(Promicromonospora)、Rheniheimera、Alkanibacter、Alkanindiges、根瘤菌属(Rhizobium)、假单胞菌属(Pseudomonas)等所占丰度相对较大. 经过修复处理后,土壤微生物在属水平上所占丰度发生明显变化.

向土壤中加入降解菌-堆肥制剂修复 30 d 后 (S-5),土壤中的不动细菌属(Acinetobacter)和假单胞菌属(Pseudomonas)与不经修复处理的土壤(S-1)相比,所占丰度分别由 0.02% 和 3.39% 提高至

15.2%和4.57%.

学

笔者以前的研究发现,西北地区石油污染土壤中主要的石油烃降解菌为假单胞菌属(Pseudomonas)和不动细菌属(Acinetobacter)^[20,24].本次研究中使用的石油烃降解菌包括了4株假单胞菌和1株不动细菌(表1).在向油污土壤直接投加这些降解菌时(S-2),不动细菌属与假单胞菌属所占丰度分别为0.9%和4.54%,与未经处理的土壤(S-1)比,略有增加;在加入降解菌-堆肥制剂的土壤中(S-5),不动细菌属和假单胞菌属所占丰度增加为15.2%和4.57%,不动细菌属所占丰度增加明显.说明在气温较低的环境条件下向油污土壤中直接投加降解菌进行修复时,降解菌在土壤中较难存活或者活性较差;将降解菌在腐熟堆肥中扩大培养制成降解菌-堆肥制剂后施入油污土壤,不动细菌 KF453955 的存活率显著提高.

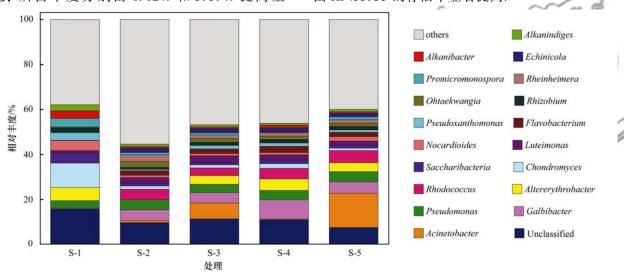


图 6 不同处理土壤中微生物在属水平上的相对丰度

Fig. 6 Frequency of the 20 most abundant genera in different treatments

3 结论

- (1)利用堆肥作为固体基质扩大培养石油烃降解菌,堆肥中的微生物总量在培养初期降低,培养一定时间后迅速增加.降解菌可以利用腐熟堆肥作为培养基质生长.
- (2)低温条件下直接投加降解菌对油污土壤进行生物强化修复30d,土壤中石油烃、烷烃、多环芳烃去除率分别为2.7%、3.6%、3.4%,施加降解菌-堆肥制剂进行修复处理的土壤中3种烃的去除率分别为27.0%、19.6%、10.0%.利用降解菌-堆肥制剂可对土壤中石油烃起到较好去除作用.
 - (3)向油污土壤中施入降解菌-堆肥制剂可改变

土壤的微生物群落结构,提高土壤微生物群落的丰富度和均匀度,土壤中石油烃的去除效率与石油烃降解菌所占丰度有关.

参考文献:

- [1] 姜昌亮. 石油污染土壤的物理化学处理-生物修复工艺与技术研究[D]. 沈阳: 中国科学院沈阳应用生态研究所, 2001.
- [2] Leahy J.G., Colwell R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment [J]. Microbiological and Molecular Biology Reviews, 1990, 54(3): 305-315.
- [3] Abed R M M, Al-Sabahi J, Al-Maqrashi F, et al. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 89: 58-66.

- [4] Taccari M, Milanovic V, Comitini F, et al. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012, 66(1): 39-46.
- [5] Kuyukina M S, Ivshina I B, Kamenskikh T N, et al. Survival of cryogel-immobilized Rhodococcus strains in crude oil-contaminated soil and their impact on biodegradation efficiency [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 84: 118-125.
- [6] Tahhan R A, Ammari T G, Goussous S J, et al. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(1): 130-134.
- [7] Lladó S, Solanas A M, de Lapuente J, et al. A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil [J]. Science of the Total Environment, 2012, 435-436; 262-269.
- [8] Zhang X S, Xu D J, Zhu C Y, et al. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas* aeruginosa strains [J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 209: 138-146.
- [9] 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.

 Han H L, Chen Z, Yang J M, *et al.* Field scale demonstration of fungi-bacteria augmented remediation of petroleum-contaminated soil[J]. Environmental Science, 2008, **29**(2): 454-461.
- [10] 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. Han H L, Tang J, Jiang H, *et al.* Synergy between fungi and bacteria in fungi-bacteria augmented remediation of petroleum-contaminated soil[J]. Environmental Science, 2008, **29**(1): 189-195.
- [11] Zhao D F, Liu C S, Liu L H, et al. Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(8): 1244-1248.
- [12] Li G, Huang W, Lerner D N, et al. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil[J]. Water Research, 2000, 34(15): 3845-3853.
- [13] 王悦明,王继富,李鑫,等. 石油污染土壤微生物修复技术研究进展[J]. 环境工程, 2014, **32**(8): 157-161, 130. Wang Y M, Wang J F, Li X, et al. Research progress on microbial remediation of petroleum contaminated soil [J]. Environmental Engineering, 2014, **32**(8): 157-161, 130.
- [14] 吴彬彬,卢滇楠,刘铮. 石油污染土壤生物修复过程中氮循 环功能基因的动态检测[J]. 环境科学,2012,33(6):2068-2074.
 - Wu B B, Lu D N, Liu Z. Dynamic changes in functional genes for nitrogen cycle during bioremediation of petroleum-contaminated soil [J]. Environmental Science, 2012, 33(6): 2068-2074.
- [15] 张胜,陈立,崔晓梅,等. 西北黄土区石油污染土壤原位微生物生态修复试验研究[J]. 微生物学通报,2008,35(5):765-771.

 Zhang S, Chen L, Cui X M, et al. Experimental study of in-situ microbial ecological remediation for oil contaminated soil in Northwestern Loess region [J]. Microbiology, 2008, 35(5):765-771.
- [16] Steliga T, Jakubowicz P, Kapusta P. Changes in toxicity during

in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons $[\ J\]$. Bioresource Technology, 2012, 125; 1-10.

contaminated saline soil in microscal simulation study [J]. China

- [17] 郭婷, 张承东, 张清敏. 生物修复石油污染盐碱土壤小试模拟系统中土壤性质与微生物特性变化[J]. 中国环境科学, 2010, **30**(8): 1123-1129.

 Guo T, Zhang C D, Zhang Q M. Changes of soil properties and microorganism characteristic during bioremediation of petroleum-
- [18] Wang C Y, Wang F, Wang T, et al. PAHs biodegradation potential of indigenous consortia from agricultural soil and contaminated soil in two-liquid-phase bioreactor (TLPB) [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 176(1-3): 41-47.

Environmental Science, 2010, 30(8): 1123-1129.

- [19] Liu P W G, Chang T C, Chen C H, et al. Effects of soil organic matter and bacterial community shift on bioremediation of dieselcontaminated soil [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 85; 661-670.
- [20] 杨茜, 吴蔓莉, 曹碧霄, 等. 石油降解菌的筛选、降解特性及其与基因的相关性研究[J]. 安全与环境学报, 2014, 14 (1): 189-192.

 Yang Q, Wu M L, Gao B X, et al. Isolation of petroleum degrading strains and determination their degrading and gene characteristics[J]. Journal of Safety and Environment, 2014, 14 (1): 187-192.
- [21] Wu M L, Dick W A, Li W, et al. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 107: 158-164.
- [22] Wu M L, Li W, Dick W A, et al. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination [J]. Chemosphere, 2017, 169: 124-130.
- [23] 杨茜, 吴蔓莉, 聂麦茜, 等. 石油污染土壤的生物修复技术及微生物生态效应[J]. 环境科学, 2015, **36**(5): 1856-1863.
 - Yang Q, Wu M L, Nie M Q, et al. Effects and biological response on bioremediation of petroleum contaminated soil [J]. Environmental Science, 2015, 36(5): 1856-1863.
- [24] 曹文娟,吴蔓莉,张明辉,等.石油降解菌的筛选优化及其对油污土壤的修复特性[J].环境工程学报,2014,8(12):5493-5498.
 - Cao W J, Wu M L, Zhang M H, et al. Isolation and optimization of petroleum degrading bacteria and their bioremediation effects on petroleum-contaminated soil [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8(12): 5493-5498.
- [25] 叶茜琼, 吴蔓莉, 陈凯丽, 等. 微生物修复油污土壤过程中 氮素的变化及菌群生态效应[J]. 环境科学, 2017, **38**(2): 728-734.
 - Ye X Q, Wu M L, Chen K L, et al. Impacts of bioremediation on microbial communities and different forms of nitrogen in petroleum contaminated soil[J]. Environmental Science, 2017, 38(2): 728-734.
- [26] Li H, Ye D D, Wang X G, et al. Soil bacterial communities of different natural forest types in Northeast China [J]. Plant and Soil, 2014, 383(1-2): 203-216.
- [27] Sengupta A, Dick W A. Bacterial community diversity in soil under two tillage practices as determined by pyrosequencing[J]. Microbial Ecology, 2015, 70(3): 853-859.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 38 No. 10 Oct. 15, 2017

CONTENTS

Correlation Analysis of the Urban Heat Island Effect and Its Impact Factors in China	
Application of Satellite Remote Sensing in NO x Emission Control	
Control Models and Effect Evaluation of Air Pollution in Jing-Jin-Ji Urban Agglomeration	
Pollution Characteristics of Aerosol Number Concentration in Winter and Spring in a Northern Suburb of Nanjing	
Source Apportionment and Size Distribution of Aerosols at Lin'an Atmosphere Regional Background Station During Winter	
Seasonal Variations in Particle Size Distribution and Water-soluble Ion Composition of Atmospheric Particles in Chengdu	
Seasonal Variation and Source Apportionment of Water-Soluble Ions in PM _{2,5} in Quanzhou City	
Chemical Characteristics and Sources of Heavy Metals in Fine Particles in Beijing in 2011-2012	
Pollution Assessment and Source Analysis of Metals in PM _{2,5} in Haicang District, Xiamen City, China	
Characteristics and Health Risk Assessment of Metallic Elements in PM _{2.5} Fraction of Road Dust	
Seasonal Variations in PM ₁₀ and Associated Chemical Species in Jiuxian Mountain in Fujian Province	
Characteristics of C2-C6 Hydrocarbons During the Winter Air Pollution Period in Beijing Urban Area	
Analysis of Atmospheric Particulate Matter Pollution Characteristics by LIDAR in Beijing During Spring Festival, 2016	
Influence Factors and Sensitivity of Ozone Formation in Langfang in the Summer	
Impact of Human Activities on Water-Rock Interactions in Surface Water of Lijiang River	
Distinguishing the Properties and Sources of the Dissolved Organic Matter in Karst Reservoir Water During Winter Using Three-Dim	
Study in Wulixia Reservoir of Guangxi Province	
Analysis of Temporal and Spatial Variations in Trace Element Migration in Karst Critical Zone; An Example of Jiguan Cave, Henan	
Eutrophication and Characteristics of Cyanobacteria Bloom in the Summer in Guishi Reservoir	
Spatial and Temporal Distribution of Chlorophyll a and Its Relationship to Algae and Environmental Factors in Aha Reservoir	
Spatial and reinporal Distribution of Chilotophyn a and its relationship to Algae and Edvironmental Pactors in Ana Reservoir Spatio-temporal Variations in Phytoplankton Community in Shahe Reservoir, Tianmuhu, China	
Spatio-temporal Variations, Contamination and Potential Ecological Risk of Heavy Metals in the Sediments of Chenghai Lake	
Characteristics of Phosphorus Output Through Runoff on a Red Soil Slope Under Natural Rainfall Conditions	
Occurrence, Distribution and Health Risk of the Phthalate Esters in Riparian Soil in the Fluctuating Zone of the Three Gorges Reservant	
Occurrence, Distribution and readiff rask of the Finnahate esters in Alparian Soil in the Finctuating Zone of the Three Gorges reserved.	VANC Ting HE Ming ling VANC 7h; her at al. (4197)
Seasonal Distribution, Composition, and Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Organochlorine Pesticides	
Seasonal Distribution, Composition, and Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Trydrocarroons and Organochionne Pesticides	WANG Visham ZHANG Shisha KONG Farming at al. (4104)
Occurrence and Human Exposure Risk Assessment of Organophosphate Esters in Drinking Water in the Weifang Binhai Economic-To-	DONG Zhang MA Vu lang LI lun gi et al. (4212)
Contamination Characteristics and Human Exposure to Organophosphate Flame Retardants in Road Dust from Suzhou City	
Cancer Risk of Human Intake of PAH-Contaminated Particles Based on Hand-to-Mouth Activities	
Spatio-temporal Evolution of Groundwater Vulnerability Based on Spatial Autocorrelation	
Preparation of Ag-AgI/CN/MA Composites and Their Visible-light Photocatalytic Performance	
Effect of Eichhornia crassipes on Ammoxidation and Denitrification Microorganisms in Eutrophic Freshwaters	
Utilization of Copper (II) Wastewater for Enhancing the Treatment of Chromium (VI) Wastewater in Microbial Fuel Cells	
Efficiency and Microecology of a Soil Infiltration System with High Hydraulic Loading for the Treatment of Swine Wastewater	
Effects of Bacteria on the Growth of and Lipid Accumulation in Chlorella pyrenoidosa Cultivated in Municipal Wastewater	• 1
Enhanced Antibiotic Resistant Bacteria Removal from Wastewater Treatment Plant by Different Disinfection Technologies	
Coking Wastewater Treatment Efficiency and Comparison of Acute Toxicity Characteristics of the AnMBR-A-MBR and A ² -MBR Proc Stability of the CANON Process Based on Real-Time Control Technologies	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
,	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •
Improving Nitrogen and Phosphorus Removal from Reclaimed Water Using a Novel Sulfur/Iron Composite Filler	
Start-up and Capacity Enhancement of a Partial Nitrification Pilot Reactor in Continuous Flow	
Quick Start-up Performance of Combined ANAMMOX Reactor Based on Different Inoculated Sludge Types	
Effect of Two-Stage Aeration on Nitrogen Removal Performance of Aerobic Granular Sludge	
Construction of a High Efficiency Anaerobic Digestion System for Vinegar Residue	
Comparision of Ecological Risk Assessment Based on the Total Amount and Speciation Distribution of Heavy Metals in Soil; A Case	Study for Longyan City, Fujian Province
Heavy Metal Contamination of Soils and Crops near a Zinc Smelter	
Characteristics and Influencing Factors of CH ₄ Emissions from the Drawdown Area of the Three Gorges Reservoir	
Effects of Plastic Film Mulching on Nitrous Oxide Emissions from a Vegetable Field	
Effects of Bamboo Biochar on Greenhouse Gas Emissions During the Municipal Sludge Composting Process	
Removal of Cd from Soil by Aspergillus fumigatus in a Semi-solid Culture	
Removal of Chlortetracycline and Morphological Changes in Heavy Metals in Swine Manure Using the Composting Process	
Remediation of Petroleum-Contaminated Soil Using a Bioaugmented Compost Technique	
Effects of Microbial Diversity on Soil Carbon Mineralization	
Ozone Deposition and Risk Assessment for a Winter Wheat Field; Partitioning Between Stomatal and Non-stomatal Pathways	
Progress in the Studies of Precipitation Chemistry in Acid Rain Areas of Southwest China	ZHOU Xiao-de, XU Zhi-tang, LIU Wen-jing, et al. (4438)