

石油烃微生物降解的营养平衡及降解机理

何良菊^{1,2}, 李培杰¹, 魏德洲², 王淀佐³

(1. 清华大学 机械工程系, 北京 100084; 2. 东北大学资源环境系, 沈阳 110006; 3. 中国工程院, 北京 100038)

摘要: 利用从辽河油田分离出的石油烃降解菌, 采用生物泥浆法, 研究了土壤中石油烃污染物生物降解过程中营养物质供给的平衡关系及其影响降解的机理。试验结果表明: 本试验条件下土壤中石油烃降解所需营养物质氮磷的配比为 5.67:1, 这一比例与细胞中氮磷元素比例接近; 对含油 1.4% ~ 1.5% 的土壤, 摇瓶试验处理 16d 后除油率可达 30% 以上。考察了 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 NaNO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 分别作为氮源的影响, 试验结果表明, 4 种氮源对石油烃的微生物降解均有明显的促进作用, 而且无机氮源比有机氮源更好, 硝酸盐形式的氮比铵态氮更有利, 营养盐的作用主要是促进了微生物的生长繁殖, 同时改变体系 pH 值, 使之有利于降解过程。

关键词: 土壤; 石油污染; 生物降解; 营养平衡

中图分类号: X131; X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)01-0091-04

Nutrient Balance and Mechanism of Biological Degradation of Oil

HE Liang-ju¹, LI Pei-jie¹, WEI De-zhou², WANG Dian-zuo³

(1. Department of Mechanical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. School of Resources and Civil Engineering, NEU, Shenyang 110006, China; 3. Chinese Academy of Engineering, Beijing 100038, China)

Abstract: This paper studied the nutrient balance and mechanism for enhancing the bioremediation of petroleum contaminated soils by the bioslurry method. Oil degrading strains isolated and screened from Liaohe oil field was used. The results show that the suitable weight ratio of N and P element in the nutrient is 5.67:1, which is similar to their proportion in the microbial cells. It was found that the degradation of oil was significantly enhanced by adding nutrient and about 30% oil was decreased in the 14000 mg/kg ~ 15000 mg/kg samples during 16 days. Using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ as the nitrogen source respectively, it shows that the inorganic nitrogen is better than the organic one, and the nitrogen in nitrate is more effective than that in ammonia. Adding nutrient salt can change the system's pH and promote the growing of the microbes.

Key words: soil; oil pollution; biodegradation; nutrient balance

土壤中氧、氮、磷的缺乏最可能成为微生物降解石油的限制因素^[1~6]。此外, 从元素种类来看, 各类微生物对营养物质的需求基本相同, 但从化合物的种类来看, 各类微生物在其漫长的进化过程中已有显著的分化, 特别是反应在对碳源、能源和氮源的需求上。虽然一般经验都说明施肥能促进土壤中石油的生物降解, 但有些研究者的研究表明, 有时加入氮磷等营养物质并不能促进有机污染物的生物降解; 在有的情况下, 有机营养的加入反而抑制了微生物对有机污染物的生物降解, 这可能是由于添加的有机营养物比有机污染物更容易被微生物利用或者同时加入不同的氮源使结果难以解释^[7~10]。对于土壤中石油污染物的降解过程, 营养物质的利用及平衡关系方面的研究较少, 本文选取几种典型的无机氮源(包括铵盐和硝酸盐)和有机氮源, 考查了其使用效果, 氮磷元素的平衡关系和对降解过程的影响机理。

1 实验材料和方法

1.1 试验用土壤样品及石油污染物含量的测定

石油污染土样采自辽河油田茨榆坨采油厂废弃的油井附近, 取土壤表面约 20cm 厚的土层, 经粉碎、除杂、混匀、密封储存。样品中烃类污染物含量由辽宁省环境检测中心站采用重量法分析。经分析, 土壤样品中石油污染物的质量分数为 1.1% ~ 1.50%, 土壤 pH 值 8.2。

1.2 试验用微生物的来源与种类

针对辽河油田石油污染的土样进行了细菌的分离、鉴定研究, 经辽宁大学生物系鉴定, 石油降解菌主要是微球菌(*Micrococcus* sp.)、黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) 和无色杆菌(*Achromobacter* sp.), 研究表明该混合菌降解能力比单菌株好^[4], 本实验中采用经驯化的混合菌。

1.3 试验方法

在 250 mL 三角瓶中加入 15g 土样, 然后加水至 150 mL, 对于不同条件均作平行样并有空白对照, 每

收稿日期: 2003-04-14; 修订日期: 2003-06-19

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(编号: 962161); 清华大学“985”资金项目

作者简介: 何良菊(1972~), 女, 汉族, 博士后, 研究方向为资源环境微生物技术和环境材料评价。

个样品按 1: 50 接种,氮、磷营养物以相应的化合物溶液加入,在 25℃~28℃下恒温振荡培养.在试验过程中,每天用蒸馏水补充因蒸发损失的水量.

2 结果与讨论

2.1 氮、磷的供给与平衡

微生物细胞的化学组成和营养类型决定了细胞的营养需求,石油降解菌主要是化能异养菌,对石油污染土壤进行微生物处理时,石油烃成为系统中微生物可利用的大量碳底物,但石油烃提供的主要是碳、氢元素,其它元素的缺乏可能使土壤中石油烃的降解难以进行.微生物细胞的化学组成主要是碳、氧、氢、氮和各种矿质(灰分)元素,其大致成分如表 1 所示^[11].从表 1 可以看出,土壤中氧、氮、磷的缺

乏最可能成为微生物降解石油烃的限制因素.通过试验考察了氮磷的添加量、添加比例对降解过程的影响,土壤原样中石油污染物的质量分数为 1.40%,试验中氮磷营养物质是一次性加入,处理 16d 后分析含油量.试验结果如图 1、图 2 所示.

表 1 微生物细胞的主要元素成分

Table 1 Approximately element content of microbial cell			
元素	占干物质百分数/ %	元素	占干物质百分数/ %
碳	50	钠	1
氧	20	钙	0.5
氮	14	镁	0.5
氢	8	氯	0.5
磷	3	铁	0.2
硫	1	其它	0.3
钾	1		

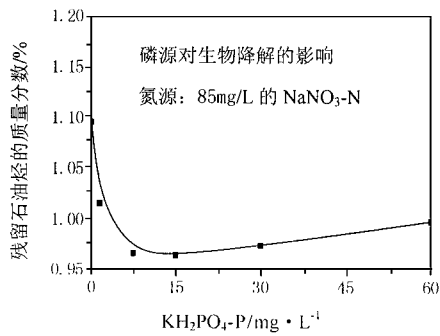
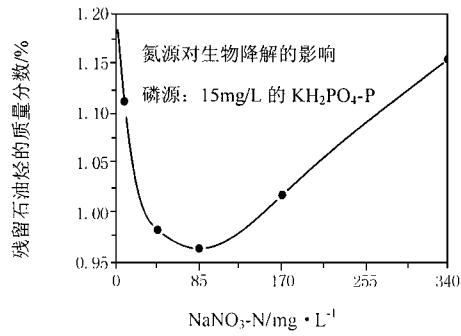


图 1 土壤中 P 元素和 N 元素限制因子作用的比较

Fig.1 Comparison of the limiting effects of phosphorus and nitrogen

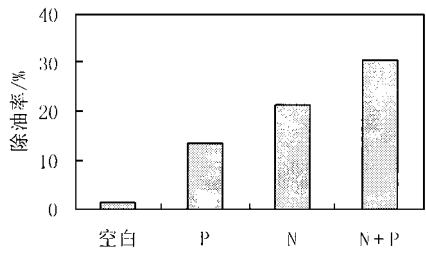


图 2 营养物质对除油率的影响

Fig.2 Effect of nutriments for enhancing the biodegradation of oil contaminated soils

试验结果表明氮、磷营养物质的缺乏直接限制了石油烃的微生物降解,但添加过量反而有抑制作用,因而存在一个经济合理的添加量及添加比例.图 2 表明 N、P 源同时添加效果是最好的,N、P 元素合适的浓度分别为 85 mg/L、15 mg/L.按质量计算的 N、P 元素的添加比例 N:P 为 5.67:1.相比之下,微生物对 N 源的供给更敏感,考虑氮元素过量的抑制作用,氮磷比在 5:1~6:1 比较适宜.

表 1 中细胞元素组成中氮磷比约 4.67:1,与上述试验得到的结果 5.67:1 相近;在矿冶领域应用最

多的工业菌种氧化亚铁硫杆菌的培养基(Silverman 培养基)中,氮磷元素的比例为 7.67:1^[12],采用不同的细菌种类或培养方式可能会得到不同的结果,但从物质基本组成的角度分析,对于同一菌种该比例是合理的.

2.2 营养物质对降解过程的强化作用

为了考查提供营养物质和接种驯化的细菌二者对石油烃的生物降解贡献的大小,进行了一系列对比试验,土样中石油污染物的质量分数为 1.48%,泥浆浓度为 10%,分为 4 种条件并作平行试验:①不添加营养盐,不接种,主要依靠土壤中自然存在的微生物(土著菌)发生作用且缺乏营养;②接种,但不添加营养盐,在此条件下,土著菌和外来菌共同起作用,同样是缺乏营养;③添加营养盐,但不接种,即不引入外来菌,只依靠土著菌在营养物质充足的条件下生长繁殖并进行降解作用;④添加营养盐同时接种.在此条件下,土著菌和外来菌都可以得到生长繁殖并共同起作用.营养盐是指氮源和磷源,以 (NH₄)₂SO₄ 为氮源, KH₂PO₄ 为磷源,由于

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为生理酸性盐,伴随石油烃的降解 pH 越来越低,pH 值的变化虽然对石油烃的降解没有益处,但可以作为降解过程进行情况的一个标志^[13,14],在土样处理过程中对 pH 值进行监测,以指示微生物的生长及降解效果.试验持续 16 d 后,用重量法分析各土壤样品中残余石油污染物的质量分数,其试验结果如图 3、图 4 所示.

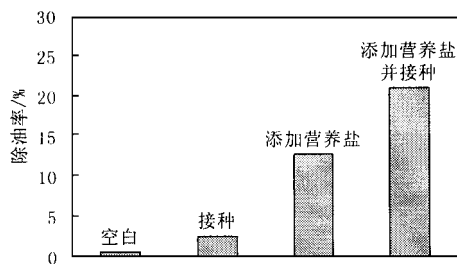


图 3 不同条件下的除油率

Fig. 3 Effect of nutrients and microbe for enhancing the biodegradation of oil contaminated soils

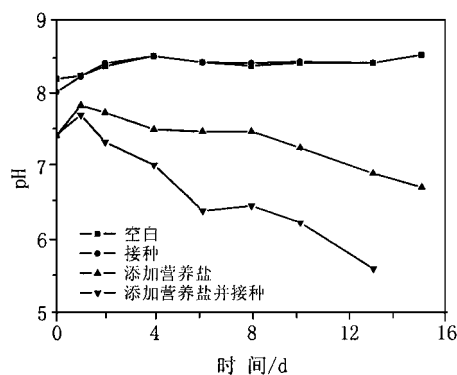


图 4 生物降解过程中体系 pH 值的变化

Fig. 4 Variation of pH during biodegradation procedures

图 3 表明,添加营养盐对土壤中石油污染物的生物降解是必需的,在诸因素中起着主要作用,仅仅接种而不添加营养盐对生物降解几乎不能起到强化作用;在添加营养盐的基础上,接种驯化培养的高效微生物也具有较大的促进作用.

图 4 表明,体系 pH 的变化体现了生物降解过程进行的程度. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源被微生物利用后使体系 pH 值下降,实质上氮源的消耗必然伴随着碳源被利用即石油烃被微生物氧化降解,而且石油烃类生物降解的中间产物往往是脂肪酸,脂肪酸的积累也会使体系 pH 值下降,在本试验条件下,pH 值越低,说明石油烃生物降解越显著.图 2 所表示的对降解过程 pH 的跟踪检测结果,进一步印证了图 1 的结论.

2.3 不同氮源的影响及降解机理

在石油污染土壤这一特定环境中,由于自然选择的作用石油降解菌生存下来,它们主要以石油烃为碳源和能源;而前述试验表明,土壤中由于缺乏氮、磷源而限制了这些微生物的生长繁殖及对石油烃的降解,需要从外部补充氮、磷源,而微生物对氮源的供给比较敏感,因此有必要作一些比较和筛选.

实验室和生产上常用的氮源有铵盐、硝酸盐等.本试验对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 NaNO_3 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 4 种比较有代表性的盐类进行了比较,每个土样 15 g,加水至 150 mL,按 1:50 接种,补加 P 源相同,9.87 g/L KH_2PO_4 各 2 mL,然后分 4 组补加不同的氮源,并作平行样和空白对照,土壤原样中石油污染物的质量分数为 1.45%,处理 20 d 后,分析残余油量,试验结果如图 5 所示.

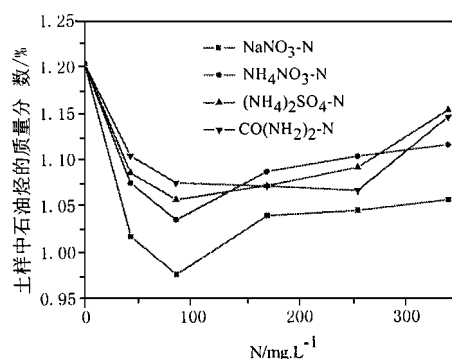


图 5 不同氮源对生物降解的影响

Fig. 5 Comparisons of results using various nitrogen source

从图 5 中可以看出,以 NaNO_3 为氮源,残余油量最低,降解效果最好,其次是 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$.最高与最低除油率之间相差约 7%,相当 1000 mg/kg 左右的石油烃.总地来看,在添加适量的情况下,4 种氮源对石油烃的微生物降解均有明显的促进作用,相对来说,无机氮源比有机氮源更好,这是因为有机氮源同时作为碳源,将优先于石油烃被利用,从而妨碍了石油烃的降解;另外硝酸盐形式的氮比铵态的氮更合适,其机理有待进一步探讨.但无论哪种氮源,添加过多,对降解均有不利的影响.

鉴于不同营养源对石油烃生物降解的不同影响,同时也将改变土壤 pH 值,分别对其降解过程中 pH 值的变化进行了跟踪测定,测定的各体系中氮、磷元素浓度分别为 170 mg/L、30 mg/L,结果如图 6 所示.

微生物的生命活动和物质代谢都与环境的 pH 值有着非常密切的关系,不同的微生物要求不同的

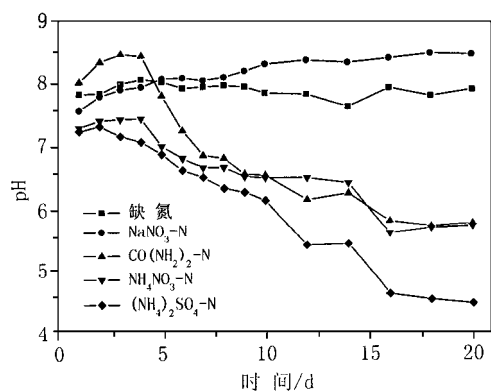


图6 氮源对降解过程中体系 pH 值的影响(P源:KH₂PO₄)

Fig. 6 Effect nitrogen source on pH during biodegradation procedures

环境 pH 值.经测定,取自辽河油田的土壤的 pH 值为 8.2 左右(1:10 水溶液测定).从图 6 可以看出,营养盐对体系 pH 值有着直接影响.图中的曲线表明,在只添加磷源不添加氮源的情况下,体系 pH 值一直稳定在 8.0 附近,这一方面是因为 KH₂PO₄ 本身有一定的缓冲作用,同时说明磷源的代谢对体系 pH 值无明显影响,体系 pH 值的变化主要来自氮源和石油烃代谢产物的影响^[11,15,16].

4 种氮源相比较,添加 NaNO₃ 时体系 pH 值最稳定,而且图 5 所示的试验结果已表明 NaNO₃ 为氮源时微生物对石油污染物的脱除率最高,说明 NaNO₃ 不仅作为氮源被微生物利用,同时对稳定和调节降解过程的 pH 有着积极作用,因为 NaNO₃ 代谢得到的 NaOH 可以中和石油烃降解过程中产生的脂肪酸,使 pH 稳定在适宜石油烃降解菌生长的范围内.其它 3 种氮源无此作用,这也是它们作为氮源时,除油率偏低的原因之一.

3 小结

(1) 石油烃的降解过程即微生物的生长繁殖过程,营养物质的供给平衡应与细菌细胞的元素组成相对应.生物泥浆法处理石油污染的土壤,泥浆浓度 10%,按质量计算的 N、P 元素的适宜浓度分别为 85 mg/L 15 mg/L 左右,添加比例为 5.67:1,这一比例与细胞中氮磷元素比例接近.

(2) 氮、磷营养物质的缺乏是影响土壤中石油污染物生物降解的主要因素,仅仅接种细菌而不添加氮磷营养盐对降解过程几乎不能起到强化作用;对含油 1.4%~1.5% 的土壤,添加氮磷营养盐并接种驯化的微生物,摇瓶试验处理 16d,除油率可达 30% 以上.

(3) 以 (NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃、NaNO₃、CO(NH₂)₂ 分别作为无机氮源(包括铵盐和硝酸盐)和有机氮源的代表,考查了它们的使用效果.试验结果表明,4 种氮源对石油烃的微生物降解均有明显的促进作用,而且无机氮源比有机氮源更好,硝酸盐形式的氮比铵态氮更有利.

参考文献:

- [1] Atlas R M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective[J]. Microb., 1981, 45:180~209.
- [2] Balba M T, Al-Daher R, Al-Awadhi N, Chino H, Tsuji H. Bioremediation of oil-contaminated desert soil: the Kuwaiti experience[J]. Environment International, 1998, 24(1,2):163~173.
- [3] Loehr Raymond C, Webster Matthew T. Performance of long-term, field-scale bioremediation processes[J]. Journal of Hazardous Materials, 1996, 50(2,3):105~128.
- [4] Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies[J]. Bioresource Technol., 2000, 74:63~67.
- [5] Huesemann Michael H, Truex Michael J. The role of oxygen diffusion in passive bioremediation of petroleum contaminated soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 1996, 51(1~3):93~113.
- [6] Walworth James, Braddock Joan, Woolard Craig. Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soils[J]. Cold Regions Science and Technology, 2001, 32(2,3):85~91.
- [7] Audrew R Autry, Gary M Ellis. Bioremediation: An effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon contamination soil[J]. Environment Progress, 1992, 11(4):318~322.
- [8] Haiim A, El-Sayed M M, Mahmond W M, Davis E M, Conghlin R W. Growth of hydrocarbon-utilizing isolated in chemically defined media[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 1996, 37(1,2):61~68.
- [9] Liebeg Elizabeth Ward, Cutright Teresa J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 1999, 44(1):55~64.
- [10] Jorgensen K S, Puustinen J, Suortti AM. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles[J]. Environmental Pollution, 2000, 107(2):245~254.
- [11] 陈世和, 陈建华, 王士芬编著. 微生物生理学原理[M]. 上海: 同济大学出版社, 1992. 25~36.
- [12] 魏德洲. 资源微生物技术(第一版)[M]. 北京: 冶金工业出版社, 1996. 53~54.
- [13] Norkus Rebecca Guisto, Maurer Julie, Schultz Nancy A, Stuart James D, Robbins Gary A, et al. Field examination of ground water quality as an indicator of microbiological activity at gasoline contaminated sites[J]. Chemosphere, 1996, 33(3):421~436.
- [14] 魏德洲. H₂O₂ 在石油污染土壤微生物治理过程中的作用[M]. 中国环境科学, 1997, 17(5):429~431.
- [15] (德) H.G 施莱杰著, 陆卫平等译. 普通微生物学[M], 上海: 复旦大学出版社, 1990. 192~196.
- [16] Watson J S, Jones D M, Swannell R P J, van Duin A C T. Formation of carboxylic acids during aerobic biodegradation of crude oil and evidence of microbial oxidation of hopanes[J]. Organic Geochemistry, 2002, 33(10):1153~1169.