

矿物油污染土壤中芳烃组分的生物降解与微生物生长动态

宋雪英^{1,2}, 宋玉芳¹, 孙铁珩¹, 周启星¹

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所 陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:以石油污染土壤中分离的细菌和真菌为供试微生物, 研究不同微生物组合对矿物油芳烃组分降解及降解率与微生物生长间的关系. 将不同组合的微生物接种到加有柴油浓度为 1 000 mg/L 的液体培养基中, 25 ~ 30 °C 经摇床连续培养 100 d. 于 0 ~ 60 h 内连续取样, 进行微生物生长动态检测; 于 5 ~ 100 d 定期取样, 研究微生物生长状况与矿物油降解率动态变化. 同时, 以草甸棕壤(0 ~ 20 cm) 制备的土壤悬浮液为土壤微生物对照, 以灭菌培养基为非生物降解对照. 结果表明, 试验前期(约 20 d) 外源菌的降解效果优于土壤微生物, 试验中、后期, 土壤微生物降解优势增大且保持持续. 试验结束时, 土壤微生物处理的液体培养基中芳烃降解率最高达 79.24%, 显著高于其它 3 组处理.

关键词:土壤; 芳烃; 矿物油; 细菌; 真菌; 降解率

中图分类号: X703 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)03-0115-05

Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons and Dynamics of Microbe Growth in Soils Contaminated with Mineral Oil

SONG Xue-ying, SONG Yu-fang, SUN Tie-heng, ZHOU Qi-xing

(Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Graduated School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Some bacteria and fungi selected from brown soil contaminated with petroleum were taken as test microbes. Degradation of mineral oil, by different combinations of microbes and the correlation between the degradation rate and microbial growth were studied. The bacteria and fungi were inoculated to a liquid substrate spiked with 1000 milligrams diesel oil per liter. The temperature of rocking-bed was controlled at 25 to 30 centigrade and the experiment continued for 100 days. From 0 to 60 hours it was sampled continuously to monitor the dynamic of microbial growth, and sampled termly from 5 to 100 days to study the growth of microbes and the dynamic of degradation rate. At the same time, the suspension of 0 to 20 centimeters of topsoil of the meadow umber was taken as soil microbial control, and the culture without microbes as blank control. Results showed that degradation effect of the introduced microbes were superior to that of the indigenous microbes in short term (about 20 days), while the advantage of indigenous microbes got stronger and stronger, and the predominance maintained until the experiment was stopped. At the end of the experiment the degradation rate in the treatment of indigenous microbes reached 79.24%, which was above the results of other 3 treatments, and the difference was significant.

Key words: mineral oil; aromatic hydrocarbon; microbial degradation; degradation rate; soil

土壤污染是目前公认的世界性环境问题之一. 土壤环境承担着越来越多来自不同污染源的污染负荷^[1]. 其中, 矿物油是一类重要的土壤有机污染物. 随着经济的发展, 矿物油的生产与消耗量不断增加, 1992 年资料显示, 全球每年矿物油的消耗量超过 3 亿 t^[2]. 生产、运输和使用等过程中的不慎操作或事故泄漏而进入土壤环境中的矿物油, 常会造成严重的土壤污染. 因此, 污染土壤的修复与治理是一项十分重要而艰巨的任务^[3-5].

有关矿物油污染土壤的生物修复已有报道^[6-10]. 研究表明, 石油污染生物修复过程中芳烃组分的降解是生物修复技术开发的关键问题之一, 也是目前石油污染土壤生物修复技术尚未完全解决

的问题, 主要是因为芳烃组分的难降解性, 以及降解过程中可能的中间产物对土壤的毒性等^[11-12]. 为此, 本文以柴油为供试化学品, 通过模拟实验手段研究在不同的微生物组合条件下, 芳烃组分的生物降解情况及微生物与芳烃降解率间的相关关系, 研究矿物油中芳烃组分的生物降解, 为难降解组分的生物修复提供理论依据.

收稿日期: 2003-07-01; 修订日期: 2003-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(20277041, 20077029); 国家杰出青年基金项目(20225722)

作者简介: 宋雪英(1978~), 女, 博士研究生, 主要从事污染生态化学和生态毒理学研究.

1 材料和方法

1.1 试验材料

(1) 供试化学品 20 号重柴油,采自抚顺石油二厂;正己烷、无水硫酸钠、氯化钠、浓硫酸等化学试剂,均为分析纯,购自天津市康科德科技有限公司。

(2) 供试微生物 外源细菌:5 株,即醋酸细菌 (*Acetobacter* sp.)、产碱细菌 (*Alcaligenes* sp.)、微球菌 (*Micrococcus* sp.)、节细菌 (*Arthrobacter* sp.) 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)。

外源真菌:5 株,即头孢霉 I (*Cephalosporium* sp.)、头孢霉 II (*Cephalosporium* sp.)、曲霉 I (*Aspergillus* sp.)、曲霉 II (*Aspergillus* sp.) 和镰刀菌 (*Fusarium* sp.)。外源细菌和外源真菌均为本实验室从石油污染土壤中富集筛选的优势保存菌种。

土壤微生物悬浮液的制备:土壤采自中国科学院沈阳生态站 0~20cm 表层鲜土(草甸棕壤),取 50g 鲜土于 250 mL 三角瓶中,加入 100 mL 经灭菌的液体培养基,于摇床上振荡 30 min,取下静置 15 min。用 1 mL 移液管吸取上清液各 1 mL 分别加到经灭菌的液体培养基中。

(3) 基本培养基 为液体培养基,各组分分配比如下:蒸馏水 1 000 mL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20g, $CaCl_2$ 0.01g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g, KH_2PO_4 0.40g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.02g, NH_4NO_3 1.00g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.6g, 葡萄糖 2.00g, 酵母膏 0.50g, pH 值 7.0。将培养液分装于 150 mL 三角瓶中,每瓶 50 mL。置于高压锅中,于 1kPa 灭菌 0.5h。

1.2 试验方法与设计

(1) 绘制柴油标准曲线 向 50 mL 容量瓶中分别加入 0.2、4、6、8、12、16、20 和 25 mL 标准油储备液(即柴油浓度为 100 mg/L 的储备液),用正己烷定容至刻度线。以正己烷为参比,经空白校正后在 254nm 处检测吸光值。以浓度(mg/L)为 x 轴,吸光值为 y 轴绘制标准曲线。

(2) 实验设计 向经高压蒸汽灭菌(1kPa, 0.5h)冷却后的基本培养基中各加 50.0 mg 柴油(即柴油浓度为 1000 mg/L)。分别用 5 组不同组合的微生物种液进行接种:外源混合细菌(I),外源混合真菌(II),外源混合细菌与真菌(III)、土壤微生物悬浮液(IV)和不接菌对照(V)。接种量均为:1/50 (V/V)。将上述各组处理随机地摆放到温控摇床上,在 25℃~30℃,150r/min 条件下恒温培养。

实验分 2 个阶段:0~60h 和 60h 后。细菌计数,

0~60h 取样频率为 4h;60h 后,取样频率减少,分别于 5、10、20、30、40、55、75 和 100d 取样。真菌计数,0~16h 取样频率为 2h,16~60h 为 4h;60h 后,取样频率同细菌。微生物计数采用稀释平板法。细菌用牛肉膏蛋白胨培养基,真菌用马铃薯葡萄糖培养基^[13]。以 \log_{10} 活细胞数目对培养时间作图,绘制微生物对数生长曲线,及矿物油降解率动态。每个处理设 3 个重复,实验周期为 100d。

(3) 矿物油的提取与测定 矿物油的提取与测定采用紫外分光光度法,参照文献[14]。254nm 为芳烃组分在紫外区的特征吸收波长,测得结果主要代表柴油中芳烃组分的矿物油含量。因此,可通过标准曲线计算不同处理中矿物油组分的浓度,进而求出矿物油中芳烃组分的降解率。

$$\text{芳烃降解率} = (c_0 - c_t) / c_0 \times 100\%$$

其中, c_0 为 0 时柴油浓度; c_t 为 t 时柴油浓度。

2 结果与讨论

2.1 微生物生长动态

2.1.1 细菌的对数生长曲线

图 1(上)为 0~60h 内处理 I (外源细菌)、III (外源细菌+真菌)和 IV(土壤混合菌)中细菌的对数生长曲线。与处理 I 和 II 相比,处理 IV 中细菌的对数生长曲线具有明显的延迟期、对数增长期和稳定期:其中,0~8h 为延迟期;8~24h 为对数增长期;24~48h 出现一段稳定期,48h~60h 细菌生长呈轻度上升,进入一个新的增长阶段。这可能是由于细菌由消耗基础培养基中的碳源,转为以柴油中较易利用的烃类为碳源的结果。对数生长曲线说明本实验所提供的营养和环境条件对土壤细菌的生长繁殖十分适宜^[12]。

由图 1(上)可见,处理 I、III 的细菌对数生长曲线在 0~60h 内体现的生长特征基本一致,这与 2 组处理初始接种量和接种菌株类型有关。2 组处理菌株为相同的细菌菌株,接种量相同。与处理 IV 相比,本实验对 I、II 处理的初始接种量相对较大,基数较高,这些细菌生长的延迟期很可能在营养液培养期就已经提前发生,结果导致试验开始的初期细菌总数较大,延迟期特征不明显,对数增长期和稳定期的阶段特征也不明显的现象。由图 1 可见,0~60h 内处理 III 中细菌数量始终略高于处理 I (但两者间差异不显著),其原因可能是在营养条件充分时,由于真菌与细菌间的共生关系,从而促进了细菌的生长,混合菌种间的这种协同作用在生物降解中所起到重

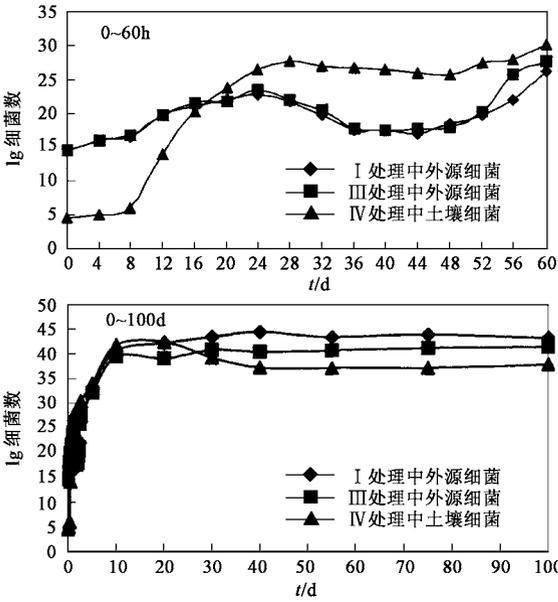


图1 培养期 I、III和 IV 处理中细菌的对数生长曲线
 Fig.1 Logarithmic growth curve of bacteria based on sample I, III and IV

要的作用^[15].

图1(下)为 0~100d 处理 I、III和 IV 的细菌对数生长曲线,可见,60h~10d 各组处理中细菌数量继续增长,在大约 20d 时处理 IV 中细菌数量达到最高值,此后略有回落,40d 后在较高数量级上保持稳定至实验结束.处理 I、III 的细菌数量达到最高值的时间迟于处理 IV,分别为 40d 和 30d,此后在这一数量级上保持稳定生长至实验结束.3 组处理细菌数量最高点出现时间的不同与各处理中细菌生长的微环境条件及起始阶段生长状况有关.处理 IV 中细菌在试验前期生长旺盛,又因为提供给微生物生长的营养是一定的,因此,其最高点出现的最早.

由图1(下)还可看出,在 100d 的试验期内,处理 I、III和 IV 中细菌始终保持在较高的数量级下稳定生长,直到试验结束时仍未见衰亡期出现.这表明随着时间的延长,微生物对污染环境的适应性普遍增强,并能够利用矿物油作为能源维持生长.虽然处理 IV 中细菌总数在实验初期明显低于其它处理,但这些细菌很强的生长适应性使得它们最终与外源细菌在数量上达到了同一水平.这充分表现了土壤细菌较强的适应性特征.

2.1.2 真菌的对数生长曲线

图2(上)为 0~60h 处理 II、III和 IV 中真菌的对数生长曲线.0~20h 内,处理 IV 未稀释的原液中真菌菌落数检出值均 <10 个,20h 至实验结束均为 0

检出.这可能是由于土壤真菌群的初始基数过低,以及土壤细菌的竞争等原因导致真菌种群无法维持增长.一般说来,真菌的生长和适应性不及细菌,生长延迟期较长. II、III 处理中真菌的生长状况为:0~12h 内维持初始水平,12~16h 出现下降,16h 后逐渐回升,此后维持波动性缓慢上升状态. II 中外源真菌的数量总体高于 III,说明在污染状态下真菌和细菌混合培养对真菌生长有抑制作用.这可能与外源细菌的营养竞争有关.这与上述细菌生长情况不同,由此可知,外源细菌与真菌间是一种偏利共生的关系.

由图2(下)可见, III 中真菌的数量经过实验初

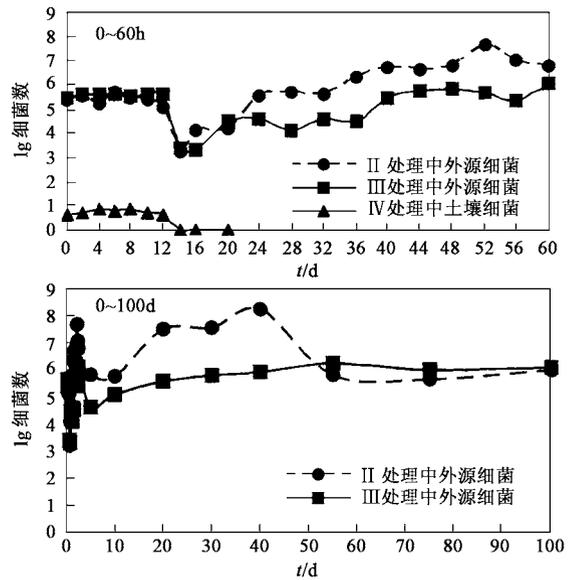


图2 培养期处理 II、III和 IV 中真菌的对数生长曲线
 Fig.2 Logarithmic growth curve of fungi based on sample II, III and IV

期的增长上下波动后,20d~55d 逐渐回升,此后再次出现波动,但始终保持在同一数量级水平直至实验结束. II 中真菌数量经过实验初期较快的增长和短期下降后,从 10d 起大幅增长,至 40d 出现最高值,在数量上明显高于处理 III.40d 后处理 II 中真菌数量开始下降直至 60d 时停止,并在这一数量级上保持至实验结束. II 中真菌数量在 40d 的明显下降很可能与营养的转型有关,由于处理 II 中为单一真菌,无外来食物竞争者,真菌首先利用营养液中的可溶性营养成分,当这些组分被逐渐耗尽时,加入的矿物油组分成为替代碳源,但其对污染物的利用需要一个适应过程,这个过程可能对真菌整体的生长产生一些影响,并在真菌数量上有所体现.而处理 III—

开始就与共存的细菌产生营养竞争,这一过程很可能使它们较早地去利用其它物质维持自身的生长.这两种情况在真菌的生长曲线上得到反映.

2.2 矿物油芳烃组分的降解作用

2.2.1 非生物降解

表1为对照处理(V)5d~40d芳烃组分降解率结果.试验至5d时的芳烃降解率为25.12%,此后,降解率缓慢增加并于20d后趋于平稳,测得10、20、40d降解率分别为26.20%、26.65%和26.67%.在此期间中,同步取样进行处理V原液微生物计数,结果均为0.这表明样品中矿物油芳烃组分的减少属于非生物降解作用,其中包括挥发作用、光解作用,很可能还存在吸附损失.实验进行到40d后,由于多次采样的空气暴露,导致样品染菌,实验终止.

表1 对照样品中柴油芳烃组分的降解率

Table 1 Degradation rates of aromatic hydrocarbons in control

取样时间/d	5	10	20	40
芳烃降解率/%	25.12	26.20	26.65	26.67

2.2.2 微生物降解

实验进行至5d时,采样测得处理I、II、III、IV(简记为I~IV)芳烃组分的降解率分别为32.99%、25.74%、31.06%和25.01%.其中,II和IV处理的降解率与空白对照(25.12%)相当,这说明此时处理II、IV中芳烃组分的去除基本上为非生物作用的结果,微生物对此几乎没有贡献.而处理I和II的降解率明显高于对照,说明投加的微生物已经参与了芳烃的降解过程,这部分降解率中包括非生物降解和生物降解2部分.

实验进行至10d时,处理中芳烃组分的降解率分别增至34.33%、35.15%、34.54%和32.46%,处理IV的芳烃降解率低于其它3组外源微生物处理.这一结果证明了预先经过污染环境驯化的微生物,因对污染环境较强的适应性,从而具有较强的氧化能力,这与Heitkamp和Spain等人描述的适应性现象十分相似.微生物的适应性对分解环境中的污染物十分重要,它决定污染物最初的降解速率^[16~17].

试验进行至20d时,处理IV(土壤微生物)中芳烃组分的降解率增强,比较I~IV处理芳烃组分降解率值依次为36.54%、39.32%、38.70%和37.62%.30d时,IV中芳烃组分的降解率达到最高值,I~IV芳烃降解率依次为37.08%、40.71%、40.43%和47.04%,之后,处理IV的这种降解优势一直持续至100d试验终止(见图3),100d时,处理

I~IV的降解率平均值依次为67.41%、66.48%、56.76%和79.24%.对最终实验结果进行最小差异显著性检验法(LSD)检验,结果表明I、III、I、IV、II、III、II、IV及III、IV间均存在显著性差异($p=0.05$),仅I、II间差异不显著.可见,在较长时间的生物修复过程中,土壤微生物的优势要大于外源微生物.这与Jorgensen利用堆肥法进行石油烃污染土壤的生物修复中所得结论相似^[8].

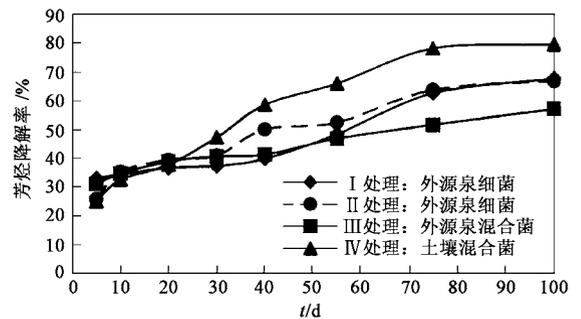


图3 微生物处理中柴油芳烃组分的降解曲线

Fig. 1 Degradation curve of aromatic hydrocarbons in diesel oil by microbial treatment

2.2.3 芳烃组分降解率与微生物生长状况的相关性

将降解率结果与各组微生物处理联系起来比较发现,实验结束(100d)时外源混合菌(III)的降解率最低,无降解优势,其降解效果不及单独细菌(I)或单独真菌(II)处理,相反表现出一定的拮抗效应.由图3可见,前40d内各处理中芳烃降解速率较快,40d后,降解速率逐渐减慢.除去非生物作用对矿物油的降解(按26.67%计算)后,处理I~IV中纯生物作用产生的降解率分别为40.74%、39.81%、30.09%和52.57%.可见,生物降解对矿物油芳烃组分的去除起主导作用.

将芳烃降解率与微生物对数生长曲线相对比发现,降解率与土壤微生物的生长适应能力具有明显相关性.由细菌生长曲线(图1)可见,尽管试验初期各处理的细菌数量不等,尤其是土壤微生物的细菌数量在显著低于外源细菌的条件下,在20d后与其他各组细菌的数量达到基本趋同的水平,这说明,当给土壤微生物提供适宜的条件时,土壤微生物的生长适应能力将明显加强,从而其降解污染物的能力也大大增强.实际上,土壤混合培养物中微生物的种类远多于外源菌,其协同降解的能力必然大于外源菌,因此,在污染环境的生物修复中起重要作用.

3 结 论

(1) 微生物的对数生长特征受微生物的类型影响. 细菌的对数生长曲线特征与真菌完全不同, 细菌对数生长周期比真菌短. 此外, 生长环境及起始接种量影响微生物生长曲线形态、完整性及微生物记数达最高值的时间.

(2) 在矿物油芳烃组分的去除过程中, 同时存在非生物降解与生物降解两种作用, 非生物降解最少占芳烃降解率的 26.67%.

(3) 降解率与各微生物作用具有相关性, 实验后期, 外源混合菌的降解效果不及单独细菌或单独真菌, 混合菌未表现出协同降解作用. 实验结束(100d)时, 显著性(LSD)检验结果表明土壤微生物的降解优势显著大于外源微生物($p = 0.05$), 对矿物油芳烃组分的降解有明显优势.

(4) 实验扣除矿物油芳烃的非生物降解作用(按 26.67% 计算)后, 生物作用产生的降解率在 30.09% ~ 52.57%, 生物降解作用在矿物油芳烃组分的去除中占有主导地位.

参 考 文 献:

- [1] 孙铁珩, 周启星, 李培军. 污染生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 24 ~ 51.
- [2] 国家环境保护局有毒化学品管理办公室. 有毒化学品研究与管理技术[M]. 上海: 科学普及出版社, 1992. 84 ~ 87.
- [3] 郑远杨. 石油污染生化治理进展[J]. 国外环境科学技术, 1993, 3: 46 ~ 50.
- [4] 宋玉芳, 等. 土壤 PAHs 和矿物油植物修复调控研究[J]. 应用生态学报, 1999, 10(2): 225 ~ 229.
- [5] 周启星, 宋玉芳. 污染土壤修复原理与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2004. 12 ~ 28.

- [6] Volker Riis, *et al.* Analytical characterization of the persistent residues after microbial degradation of mineral oils[J]. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 356: 378 ~ 384.
- [7] 陈玉成. 土壤污染的生物修复[J]. 环境科学动态, 1999, 2: 7 ~ 11.
- [8] Jorgensen K S, Puustinen J, Suortti A M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by composting in biopiles[M]. *Environmental Pollution*, 2000, 107(2): 245 ~ 254.
- [9] Facundo J, Marquez-rocha, *et al.* Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium[J]. *Water, Air, and Soils Pollution*, 2001, 128: 313 ~ 320.
- [10] Wan Namkoong, *et al.* Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting[J]. *Environmental Pollution*, 2002, 119(1): 23 ~ 31.
- [11] Fredrickson J K. In situ and on situ bioremediation[J]. *Environmental Science and Technology*, 1993, 27(9): 1711 ~ 1716.
- [12] William C, *et al.* Bioremediation[M]. Alexandria: Water Environment Federation, 1995. 7 ~ 10.
- [13] 范秀容, 等. 微生物学实验[M]. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1998. 260 ~ 262.
- [14] 魏复盛. 水和废水检测分析方法[M]. 第三版. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 372 ~ 374.
- [15] 林明, 任南琪, 等. 混合菌种在发酵法生物产氢中的协同作用[J]. 环境科学, 2003, 24(3): 54 ~ 59.
- [16] Spain JC, *et al.* Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/ water cores from estuarine and freshwater environments[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1980, 40: 726 ~ 734.
- [17] Heitkamp M A, Cerniglia C E. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbon by a bacterium isolated from sediment below an oil field[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54: 1612 ~ 1614.