

真菌-细菌修复石油污染土壤的协同作用机制研究

韩慧龙, 汤晶, 江皓, 张敏莲, 刘铮*

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要:提出并研究了真菌和细菌协同强化原位修复石油污染土壤. 从原油田石油污染土壤中筛选出刺孢小克银汉霉菌 (*Cunninghamella echinulata*) 和阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*), 在泥浆体系中考察了 *Cun. echinulata* 和 *E. cloacae* 的生长及其对石油烃的降解过程. 结果表明, 混合培养体系中细菌和真菌的数量最高分别为其纯培养体系的 3 倍和 20 倍, 细胞衰亡则被明显推迟; 混合培养体系中石油烃的去除率高于真菌和细菌纯培养体系石油烃去除率的总和; 采用多次接种新鲜菌种的培养方式能够强化混合培养体系对石油烃的降解. 在石油烃污染土壤中接入由 *Cun. echinulata* 和 *E. Cloacae* 所组成的真菌-细菌微生物制剂实施原位修复, 结果表明, *Cun. echinulata* 和 *E. Cloacae* 的生长及其对石油烃的降解不受土著微生物的抑制, 最适工艺条件为: 水和木屑含量分别为 25% 和 6% (质量分数), *Cun. echinulata* 和 *E. cloacae* 接种量分别为 2.5×10^4 和 2.5×10^7 CFU/g. 接种上述真菌-细菌 40 d 后石油烃去除率可达约 65%, 而土著微生物对石油烃去除率为 16.0%.

关键词:生物强化; 生物修复; 石油污染土壤; 刺孢小克银汉霉菌; 阴沟肠杆菌; 协同降解

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)01-0189-07

Synergy Between Fungi and Bacteria in Fungi-Bacteria Augmented Remediation of Petroleum-Contaminated Soil

HAN Hui-long, TANG Jing, JIANG Hao, ZHANG Min-lian, LIU Zheng

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A new bioaugmentation technique for petroleum contaminated soil utilizing the synergistic function between bacteria and fungi in both growth and metabolism of petroleum was proposed and investigated using *E. cloacae* and *Cun. echinulata*, both of which were isolated from Zhongyuan Oil Field, Henan, China. The maximum biomass of *E. cloacae* and *Cun. echinulata* obtained in the mixed slurry culture were 3- and 20-fold as much as their respective counterpart obtained in the pure cultures. The decrease of cell activity was considerably postponed, as compared to the pure cultures. The removal of total petroleum hydrocarbon (TPH) by the mixture was higher than the sum of the individual removal obtained in the pure culture, which could be further enhanced by repeated inoculation of fresh fungal and bacterial inocula. The optimal parameters of the *in situ* bioremediation of crude oil-contaminated soil sampled in Zhongyuan Oil Field were determined as follows: 25% (*m/m*) soil humidity, 6% (*m/m*) of wood scraps, 2.5×10^4 CFU/g of *E. cloacae* and 2.5×10^7 CFU/g dry soil of *Cun. echinulata*. It was demonstrated that the growth behavior of the inocula and the degradation of TPH were not inhibited by the indigenous microorganisms. The *in situ* remediation via inoculating the fungal-bacterial consortia removed 65% of TPH in 40 days while the control experiment with the indigenous microorganisms removed 16%.

Key words: bioaugmentation; bioremediation; petroleum contaminated soil; *Cun. echinulata*; *E. cloacae*; synergistic biodegradation

石油勘探、开采、加工及运输过程等生产过程和意外事故导致的耕地污染是土壤修复领域的挑战性课题. 由于石油组成的复杂性及难降解性, 单一菌种无法完全降解石油烃类污染物, 必须有多种微生物参与其生物修复过程. 生物强化技术是指为提高污染物生物治理能力, 向污染治理体系中投加菌种或菌群从而实现对目标污染物高效去除的方法^[1~7]. 该技术在实际应用中, 外源微生物受污染体系温度、水含量、pH、营养物质供给等因素的不规律剧烈波动, 以及土著微生物竞争作用的影响而无法生存, 这是制约该技术推广应用的根本原因^[1,8]. 因此, 筛选具有协同作用并能够抵抗土著微生物竞争作用的微生物制剂是实施高效生物强化修复的技术核心. 此外, 土壤的密实结构和空间不均一性制约营养物及

氧气在土壤中的传递过程, 土壤的吸附性能限制微生物和石油烃的迁移和接触. 因此, 强化土壤中微生物与石油污染物的接触就成为强化生物修复的工程关键. 真菌与细菌在土壤体系中广泛存在, 两类微生物之间的生态共生作用为筛选和建立以特定真菌和细菌之间的相互作用为基础的生物强化技术提供了生态依据^[9, 10]. 细菌对石油烃的降解主要通过胞内的加氧酶及一系列脱氢酶的作用完成主要的降解途径^[11], 真菌则通过 P450 酶系首先完成对烃类的氧

收稿日期: 2007-01-30; 修订日期: 2007-03-13

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 (303060)

作者简介: 韩慧龙 (1979~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为石油污染土壤的生物修复, E-mail: han_hui98@mails.thu.edu.cn

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

化,而后通过一系列胞外酶及胞内酶的作用,完成对石油烃的降解^[12, 13].这表明细菌与真菌在代谢酶系方面具有互补性.真菌以产生菌丝体和孢子的方式进行生长,在非流体介质(如土壤)中形成伸展的网状结构.经计算,菌丝体/干土壤为 0.2~0.4 mg/g可对应 100 m 长的菌丝.真菌特有的生长方式决定了在土壤中真菌具有更好的迁移特性, Kohlmeier 等^[14, 15]的研究表明,真菌的菌丝体可作为细菌迁移的通道,解决了细菌在土壤中迁移困难的问题.根据上述事实,本研究提出筛选适宜的真菌和细菌来组成微生物复合制剂,利用其代谢酶系的互补性及真菌菌丝体对细菌迁移的促进作用来强化土壤中石油污染物的生物降解.

本研究以中原油田开采的原油为污染物,以未污染的中原油田耕地为土壤样本,重点考察石油污染土壤泥浆体系中刺孢小克银汉霉菌 *Cun. echinulata* 和阴沟肠杆菌 *E. cloacae* 的生长行为及对石油烃的协同降解行为,考察土壤含水量、木屑添加

量以及微生物制剂接种量对原位修复效率的影响,通过模拟原位生物修复实验考察土著微生物存在下微生物制剂的应用效果,以期为该技术的工业应用提供参考.

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,采用氧化铝层析分离的方法^[16]测定该原油样品中饱和烃、芳香烃、沥青胶质及其他非烃化合物,质量分数分别为 46.6%、18.8%、15.0%和 19.6%.

土壤:采自河南濮阳中原油田未受石油污染的正常耕地土壤,采样深度为 2~15 cm.供试土壤样品经北京市农林科学院植物营养与资源研究所检测,土壤主要理化性质指标如表 1 所示.采用孔径为 1 mm 的筛子对土壤进行过筛预处理.

表 1 供试土壤主要理化性质指标
Table 1 Characteristics of experimental soil

理化指标	土壤质地			全盐/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	全氮/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	有效磷/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	有效钾/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	土壤 pH (水土质量比 5:1)
	砂粒/%	粉粒/%	粘粒/%					
数值	18.7	70.7	10.6	2.56	0.940	36.7	154	7.43

木屑:采用木材加工厂生产过程中产生的松木木屑,颗粒度为 1~3 mm.

LB 培养基:蛋白胨 10.0 g,酵母粉 5.0 g, NaCl 10.0 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 121℃灭菌 15 min,保存备用.孟加拉红琼脂培养基: KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,蛋白胨 5.0 g,葡萄糖 10.0 g,孟加拉红 0.033 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 6.8, 121℃灭菌 15 min,冷却至约 45℃时,加入链霉素 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.无机盐培养基(MSM): KH_2PO_4 1.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, NH_4NO_3 1.0 g, MgSO_4 0.5 g, CaCl_2 0.01 g, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 121℃灭菌 15 min,保存备用.

1.1.2 菌种来源

从河南濮阳中原油田石油污染土壤中筛选得到石油烃降解微生物阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)和刺孢小克银汉霉菌(*Cun. echinulata*),2 株菌均可在以石油烃为唯一碳源的培养液中生长.2 株菌的形态如图 1 所示.*E. cloacae* 的主要生理生化特性为:革兰氏阴性小杆菌,不溶血,氧化酶阴性,动力阳性,兼性厌氧,发酵多种糖、醇类.*Cun. echinulata* 的主要生理

生化特性为:菌丝幼时无隔,老时有少量隔膜,常在分枝处形成.气生菌丝和孢囊梗上下等粗(5~10 μm),有时有假根和匍伏菌丝.孢囊梗直立向上,简单分枝.孢囊形态规律,多呈球形或亚球形,顶生孢囊直径(10~15)~(30~40) μm ;边生孢囊直径(7~10.5)~(20~28) μm ,光滑,通常无色.单孢孢子囊无色或暗色,具长刺且浓密;无色孢子囊球形,宽卵形或卵圆形,直径 9~13 μm ;暗色孢子囊均为球形或亚球形,成熟时呈暗褐色,直径 9~13 μm .

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;岛津 10A 气相色谱.

1.2 实验方法

1.2.1 细菌保存及接种培养

将 *E. cloacae* 接种于装有 100 mL LB 液体培养基的 300 mL 三角瓶中,在 30℃ 170 r/min 培养 20 h,将菌液与 50% 的无菌甘油水溶液混合,放入 -20℃ 冰箱保存.

接种时,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

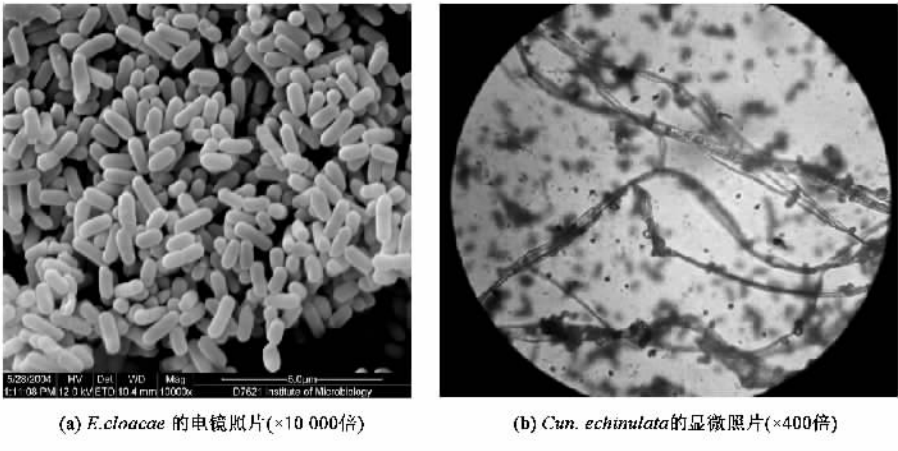


图 1 2 株石油降解菌的形态

Fig. 1 Morphology of two petroleum-degrading microorganisms

20 h,将菌液在4 000 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 10^9 CFU/mL,作为接种液放入 4℃冰箱保存.

1.2.2 真菌保存及接种培养

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.

向土壤泥浆体系中接种时,在保存 *Cun. echinulata* 的孟加拉红琼脂培养基上切下 1 cm $\times$ 1 cm 大小的菌丝体作为接种体.

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 10^6 CFU/ml,作为接种液放入 4℃冰箱保存.

1.2.3 石油污染土壤样品制备

称取一定重量的石油于烧杯中,按质量比1:5加入沸程为 30 ~ 60℃石油醚充分溶解.将溶有石油的石油醚倒入土壤中混合均匀,置于通风橱中待石油醚完全挥发后,密封放入冰箱中,在 4℃下保存.进行实验前,按照 C:N:P:K 比例为 100:10:1:2 调节土壤中 N、P、K 的含量.

1.2.4 细菌和真菌的计数

细菌和真菌的计数采用稀释平板计数法.用 0.2%焦磷酸钠溶液浸泡土壤样品,经超声、振荡后进行平板计数.

1.2.5 土壤中总石油烃(TPH)的测定方法

采用 EPA 3546 推荐方法测定土中石油烃含量^[17].称取 2 g 干土样放入 CEM 萃取罐中,加入 25 mL 正己烷和丙酮的混合液(1:1, 体积比)后拧紧罐

体.设定 CEM 操作参数为功率1 200 W,升温 5 min 至 120℃,保温 30 min.待冷却到 40℃后,取出罐体.将萃取液过滤,置于已称重的烘干三角瓶中,放入通风厨中蒸干萃取液至恒重,称重后按重量法计算土壤中的 TPH 含量.

所述实验在采样时均取 3 个平行样品进行分析检测,文中结果为平行样品检测的平均值,结果的相对偏差均在 5% 以内.

2 结果与讨论

2.1 真菌和细菌的生长特性

在 4 个 500 mL 三角瓶中分别加入 50 g 原始石油含量为 1.5% 的石油污染土壤样品,200 mL 无机盐培养基及玻璃珠若干,于 121℃下湿热灭菌 15 min.经测定,灭菌过程引起 5% 的石油烃含量损失.按照表 2 所示在各三角瓶中分别接种 *E. cloacae* 和 *Cun. echinulata*,细菌接种量为 1.25 mL,真菌接种量为 1 cm $\times$ 1 cm 大小的菌丝体,其中对照组不接种任何微生物.将各三角瓶置于 30℃,160 r/min 恒温摇床中培养 12 d,定时取样,测定各培养体系中细菌和真菌的数量.培养结束后测定了 4 个体系中 TPH 的含量.

表 2 各泥浆体系中的接种物

Table 2 Inoculum in different slurry cultures				
实验体系	对照	细菌纯培养	真菌纯培养	真菌和细菌混合培养
接种物	无	<i>E. cloacae</i>	<i>Cun. echinulata</i>	<i>E. cloacae</i> 和 <i>Cun. echinulata</i>

有研究表明,在土壤根际圈中,真菌和细菌的相互作用多为拮抗作用^[18].如土壤中的假单胞菌分泌

藤黄绿脓菌素和吩嗪等物质抑制土壤中真菌的生长^[19, 20].为验证真菌-细菌协同生长的可行性,本研究首先考察了真菌和细菌在混合培养过程中的生长特性.图 2 给出了细菌纯培养体系和真菌-细菌混合培养体系中, *E. cloacae* 的生长曲线.

图 2 显示,细菌纯培养体系中的菌体浓度在 25 h 后开始下降,即细菌进入衰亡期,第 12 d 体系中的细菌浓度已降至 3.0×10^6 CFU/mL.而在细菌-真菌混合培养体系中 48 h 内细菌浓度持续上升,细菌生长得到促进; 48 h 后细菌浓度开始下降,到 72 h 降至 3.1×10^8 CFU/mL,第 12 d 降至 6.4×10^7 CFU/mL,仍高于细菌培养体系,即细菌衰亡在真菌存在的情况下被推迟,细菌的活性在各生长阶段均高于细菌培养体系.细菌培养体系和混合培养体系中, *E. cloacae* 的最高浓度分别为 4.1×10^8 和 1.3×10^9 CFU/mL,换言之,真菌的存在使混合培养体系中细菌的浓度最高为纯培养体系的 3 倍.

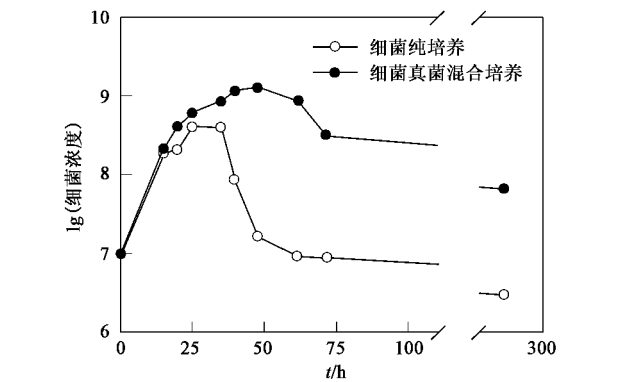


图 2 *E. cloacae* 在细菌纯培养体系和混合培养体系中的生长行为

Fig.2 Growth behavior of *E. cloacae* in bacterial pure culture and mixed culture

图 3 为真菌-细菌混合培养以及真菌纯培养体系中 *Cun. echinulata* 的生长行为.从图 3 中可看出,在 48 h 内 2 体系中真菌菌落数均随时间而缓慢上升,混合培养体系中菌落数略低于真菌纯培养体系.此后真菌纯培养体系中的孢子浓度不断降低,第 9 d 时采用平板计数法进行检测,平板上无真菌生长;混合培养体系中真菌菌落数则不断上升,12 d 时体系中真菌菌落数已达到 7 300 CFU/mL.在混合培养体系中真菌最高浓度高出真菌纯培养体系中最高浓度(48 h, 400 CFU/mL)近 20 倍.此外,混合培养体系中出现大量直径为 1 ~ 2 mm 的菌丝球,在真菌纯培养体系中无菌丝球产生.而采用稀释平板计数法无法

对菌丝球中的真菌生物量进行测定,换言之,混合培养体系中真菌的真实生物量高于图 2 所给出的结果.

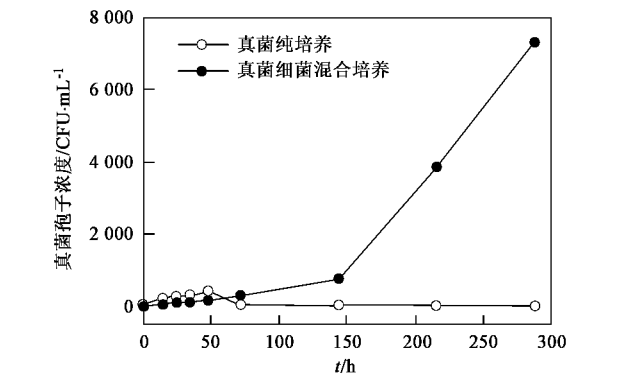


图 3 *Cun. echinulata* 在真菌纯培养体系和混合培养体系中的生长行为

Fig.3 Growth behavior of *Cun. echinulata* in fungal pure culture and mixed culture

泥浆体系实验在摇床中进行,高转速培养可保证微生物对石油烃降解过程中的氧气供应,因此可排除氧气供应不足造成微生物衰亡的可能性.由于供试土壤经过灭菌处理,实验体系中无土著微生物存在,平板计数得到的实验结果可认为能够反映接种菌株的实际生长情况.综合图 2 和图 3 的结果可知,在泥浆体系中真菌-细菌生长有明显的相互促进作用,真菌的存在可强化细菌的生长,使细菌达到更高的浓度;此外还可提高细菌的细胞活力,推迟细菌的衰亡期.细菌的存在对真菌的生长也具有促进作用,提高了真菌产量并显著地延长真菌的生长时间.

已有的研究表明,细菌对石油烃中 $C_4 \sim C_{20}$ 的直链烷烃利用速度较快,对碳数更高、结构更为复杂的石油烃类的降解较为困难^[21].而真菌属于真核生物,能够分泌多种胞外氧化还原酶和水解酶^[22],以白腐真菌为例,它能够分泌多种胞外酶以降解染料、农药、多环芳烃以及石油烃中的难降解污染物,并且可将不溶性污染物部分氧化为可溶性物质,从而进一步被微生物代谢^[22, 23].对比图 2 和图 3 所示的混合培养体系中细菌和真菌的生长行为可以发现,在前 48 h 内,细菌浓度的增长趋势明显快于真菌孢子浓度的增长趋势,48 h 后,细菌浓度开始下降,真菌生物量的增长开始加快.细菌和真菌对不同石油烃组分的代谢难易程度依次为直链烷烃 > 环烷烃 > 芳香烃 > 沥青胶质、短链烷烃 > 长链烷烃,细菌在对简单烃类的降解过程中产生生物表面活性剂乳化石油烃,可提高石油烃的生物可利用度^[24];真菌在代谢

石油烃过程中产生大量胞外酶促进其对石油烃中难降解物质以及细菌降解所产生的高分子量、结构复杂代谢中间产物的降解^[25],细菌和真菌共同利用各自代谢过程中的极性中间产物,消除中间产物积累对微生物细胞的毒性,使细胞的生长得到促进,达到高效降解石油烃的目的.另外,细菌和真菌的物理接触、共生作用以及代谢酶系的协同作用也可能导致真菌和细菌在混合培养过程中对各自生长的促进.

2.2 泥浆体系中细菌和真菌对石油烃的降解

对 2.1 所述实验的石油烃降解情况进行考察,结果如表 3 所示.

由表 3 可知,在泥浆体系中连续培养 12 d 后混合培养体系中总石油烃(TPH)的去除率为 25.7%,是细菌纯培养和真菌纯培养体系中石油烃降解率总和的 2 倍.换言之,真菌和细菌的协同作用不仅体现在图 2 和图 3 所示的生长方面,也体现在对石油烃的降解方面.

表 3 泥浆体系中 TPH 含量

Table 3 TPH content in different slurry cultures

实验体系	TPH 质量分数/%		TPH 降解率 /%
	0 d	12 d	
对 照	1.13	1.04	8.4
细菌 <i>E. cloacae</i> 纯培养	1.13	1.02	9.7
真菌 <i>Cun. echinulata</i> 纯培养	1.13	1.10	3.1
<i>E. cloacae</i> 和 <i>Cun. echinulata</i> 混合培养	1.13	0.84	25.7

考虑到混合培养体系中细菌在 3 d 后进入衰亡期,真菌在 48 h 后进入快速生长期的,本研究设计了多次接种培养的方式,考察培养方式对协同降解石油烃的影响.具体操作为,每隔 4 d 将各实验体系灭菌后重新接种菌种,在 30℃,160 r/min 恒温摇床中仍培养 12 d,测定各体系中 TPH 含量的变化,结果如表 4 所示.由表 4 可知,真菌-细菌混合培养体系的对 TPH 降解率为 36.0%,高于一次接种的结果,同时也高于细菌纯培养和真菌纯培养体系的总和.

表 4 泥浆体系中 TPH 含量(多次接种培养)

Table 4 TPH content in different slurry cultures (repeated inoculation)

实验体系	TPH 质量分数/%		TPH 降解率 /%
	0 d	12 d	
对 照	1.36	1.34	1.3
细菌 <i>E. cloacae</i> 纯培养	1.36	1.25	7.8
真菌 <i>Cun. echinulata</i> 纯培养	1.36	1.20	12.1
<i>E. cloacae</i> 和 <i>Cun. echinulata</i> 混合培养	1.36	0.87	36.0

2.3 原位生物修复工艺参数

在实验室模拟原位生物修复过程,对土壤含水

量、木屑添加量以及真菌-细菌微生物制剂的接种量这 3 个重要的工艺参数进行了考察,在工艺参数考察实验中,土壤的初始 TPH 含量均为 2.1% (质量分数),实验均在 30℃ 的恒温培养箱中进行.

2.3.1 土壤含水量

对比了 15%、25% 和 35% (质量分数) 3 种不同含水量对 TPH 降解率的影响.实验中观察到含水量为 25% 的实验体系中真菌的生长情况最佳,而含水量分别为 15% 和 35% 的实验体系中真菌的生长情况较差.表 5 给出了经过 50 d 的降解,3 个实验体系中总石油烃的去除率.从表 5 可以看出,含水量为 25% 的实验体系中总石油烃的去除率最高,可达 34.9%.微生物对石油烃的降解通常为好氧反应,且发生在油水界面.水含量过低,会使油水界面的面积减小,不利于微生物对石油烃的利用;水含量过高,会限制氧气在土壤中的传递,也不利于石油烃的生物降解.合适的含水量可保证微生物对石油烃的高效利用.

表 5 含水量对总石油烃去除率的影响/%

Table 5 Influence of humidity on the removal of TPH/%

土壤含水量(质量分数)	TPH 降解率
15	27.4
25	34.9
35	28.1

2.3.2 木屑添加量

木屑的主要组成为木质素和纤维素,一方面可作为碳源促进真菌的生长,另一方面也可诱导真菌胞外酶的分泌^[26],提高生物修复的效率.为此考察了不同的木屑添加量对总石油烃去除率的影响,结果如表 6 所示.从表 6 可知,添加木屑能够显著提高石油烃的生物降解.木屑添加量为 6% 时,总石油烃的去除率最高,经过 50 d 的修复可达 50.1%.

表 6 木屑添加量对总石油烃去除率的影响/%

Table 6 Influence of wood scraps on the removal of TPH/%

木屑添加量(质量分数)	总石油烃降解率
0	33.6
3	45.3
6	50.1
12	44.2

2.3.3 微生物接种量

将孢子浓度为 10⁶ CFU/mL 的 *Cun. echinulata* 接种液和细菌浓度为 10⁹ CFU/mL 的 *E. cloacae* 接种液按照 1:1 的体积比混合后接种到原位生物修复实验体系中,接种量分别为 0.01、0.05、0.1 和 0.2 mL/g.表 7 给出了在 30℃ 下,经过 50 d 的降解后,各体系中 TPH 的

去除率.从表 7 可以看出,接种量越大,石油烃的去除率越高;当接种量大于 0.05 mL/g 时,石油烃降解率的增加幅度不明显.考虑微生物制剂的成本,工业应用时微生物制剂的接种量可定为 0.05 mL/g.

表 7 微生物制剂接种量对总石油烃去除率的影响	
Table 7 Influence of loading of the inocula on the removal of TPH	
微生物制剂接种量/mL·g ⁻¹	总石油烃降解率/%
0.01	20.5
0.05	37.5
0.1	40.9
0.2	41.3

2.4 实验室模拟原位生物修复实验

本研究以模拟石油污染土壤为处理对象,以真菌、细菌在土壤中的数量和土壤中 TPH 含量为指标,考察了真菌-细菌微生物制剂及上述工艺在石油污染土壤中的应用效果.实验中土壤的初始石油含量为 1.92%.3 个实验体系分别为:自然降解体系、灭菌后接种微生物制剂的生物强化体系和土著微生物

物存在下接种微生物制剂的生物强化体系.实验条件为:30℃ 恒温,土壤含水量为 25% (质量分数),木屑添加量为 6% (质量分数),微生物制剂接种量为 0.05 mL/g.上述各实验体系中细菌和真菌的生长行为如图 4 所示.

从图 4 中可以看出,自然降解体系中土著微生物的生物量增长缓慢,且在 9 d 以后保持稳定,细菌的生物量最高仅达到 10⁶ CFU/mL,真菌孢子浓度最高仅达到 300 CFU/mL.在接种真菌-细菌微生物制剂的 2 个体系中,土著微生物的存在与否对细菌和真菌的生长行为影响不大,接种后的微生物数量远远高于土著微生物的数量;细菌和真菌的生物量增长较快,细菌生物量在 15 d 后停止增长,细菌生物量最高可达 3.9 × 10⁸ CFU/mL,25 d 后出现缓慢下降,在 40 d 后降至约 1.0 × 10⁸ CFU/mL;真菌的生物量在前 30 d 内保持持续增长,最高可达约 2.7 × 10⁵ CFU/mL,30 d 后保持稳定,在实验周期内没有下降趋势.以上结果从宏观上可定性反映接种菌株的效果,表明真菌-细菌微生物制剂活力高,可抵抗土著

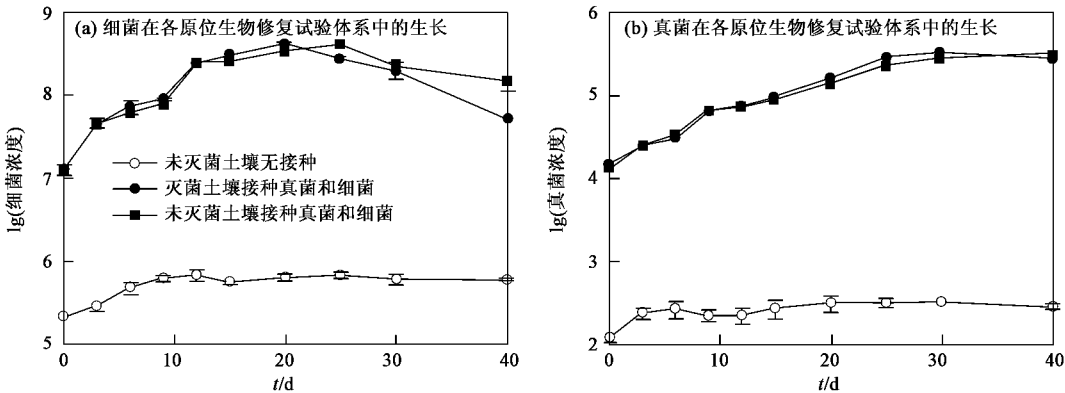


图 4 细菌和真菌在各原位生物修复实验体系中的生长行为
Fig. 4 Growth of bacteria and fungi in *in situ* bioremediation experiments

微生物的竞争作用.

图 5 给出了各实验体系中 TPH 降解率的变化.从图 5 可以看出,自然降解体系中土著微生物对石油烃的降解效率较低,15 d 后基本保持不变,40 d 后仅有 16.0% 的 TPH 被降解.在接种真菌-细菌微生物制剂的 2 个体系中,TPH 的降解速率较快,40 d 后约 65% 的 TPH 被降解,其中有土著微生物存在的生物强化实验体系中 TPH 的去除率为 66.9%,略高于灭菌后的生物强化实验体系的 62.8%.结果表明真菌-细菌微生物制剂在生物强化过程中不受土著微生物的竞争作用影响,能够保持较高的石油烃代谢活性,促进石油烃的生物降解.

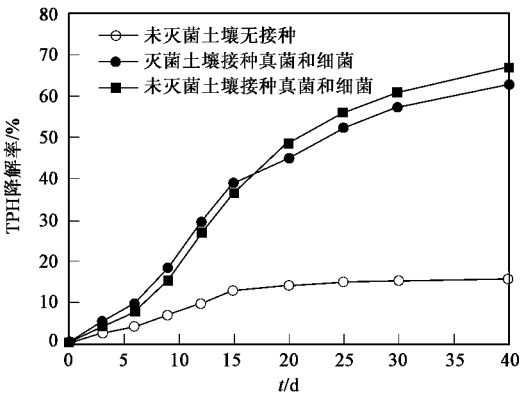


图 5 在各实验体系中 TPH 的变化
Fig. 5 Removal of TPH in *in situ* experiments

3 结论

本研究表明,真菌-细菌微生物制剂可协同降解石油烃,真菌和细菌能够互相促进生物量的生长,提高细胞活性;无论在泥浆反应体系还是在原位修复体系中,采用真菌-细菌微生物制剂对石油烃的去除率均高于其对应的纯培养体系的去除率之和.采用 *E. cloacae* 和 *Cun. echinulata* 制剂原位修复中原油田原油污染土壤的最佳工艺参数为:土壤含水量为土壤干重的 25%,木屑含量为土壤干重的 6%,*E. cloacae* 接种量为 2.5×10^7 CFU/g, *Cun. echinulata* 接种量为 2.5×10^4 CFU/g.在此条件下经过 40 d 的修复实验,石油烃的降解率可达到约 65%,而不添加上述微生物制剂的自然降解体系的石油烃降解率仅为 16.0%.本研究结果初步证实了真菌-细菌微生物制剂用于生物强化治理石油污染土壤过程的可行性,后续工作将着重于真菌和细菌相互作用的深入研究以及上述修复过程的工业实验,以推进对于真菌-细菌协同强化土壤生物修复过程的技术发展与工业应用.

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**: 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] 宋雪英,宋玉芳,孙铁珩,等. 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[J]. 环境科学, 2004, **25**(3): 115-119.
- [5] 韩力平,王建龙,施汉昌,等. 生物强化技术在难降解有机物处理中的应用[J]. 环境科学, 1999, **20**(6): 100-102.
- [6] 欧阳威,刘红,于勇勇,等. 微生物强化处理与堆制强化处理含油污染对比试验[J]. 环境科学, 2006, **27**(1): 160-164.
- [7] 李培军,台培东,郭书海,等. 辽河油田石油污染土壤的 2 阶段生物修复[J]. 环境科学, 2003, **24**(3): 74-78.
- [8] Bouchez T, Patureau D, Dabert P, et al. Ecological study of a bioaugmentation failure[J]. Environmental Microbiology, 2000, **2**: 179-190.
- [9] de Boer W, Folman L B, Summerbell R C, et al. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, **29**: 795-811.
- [10] Pennisi E. The secret life of fungi[J]. Science, 2004, **304**: 1620-1622.
- [11] van Beilen J B, Li Z, Duetz W A, et al. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment[J]. Oil & Gas Science and Technology-Rev IFP, 2003, **58**(4): 427-440.
- [12] Bezalel L, Hadar Y, Cerniglia C E. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**(7): 2495-2501.
- [13] Collins P J, Kotterman M J J, Field J A, et al. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor* [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, **62**(12): 4563-4567.
- [14] Kohlmeier S, Smits T H M, Ford R M, et al. Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi[J]. Environ Sci Technol, 2005, **39**(12): 4640-4646.
- [15] Wick L Y, Remer R, Würz B, et al. Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil[J]. Environ Sci Technol, 2007, **41**(2): 500-505.
- [16] 谢重阁. 环境中石油污染物的分析技术[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1987.
- [17] US EPA 3546 Microwave Extraction[S]. <http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/3546.pdf>.
- [18] Whipps J M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere [J]. J Exp Bot, 2001, **52**: 487-511.
- [19] Bender C, Rangaswamy V, Loper J. Polyketide production by plant-associated pseudomonads[J]. Annu Rev Phytopathol, 1999, **37**: 175-196.
- [20] Raaijmakers J M, Vlami M, de Souza J T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents[J]. Antonie Leeuwenhoek, 2002, **81**: 537-547.
- [21] Schink B. Synergistic interactions in the microbial world [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, **81**: 257-261.
- [22] Pointing S B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **57**: 20-32.
- [23] Bogan B W, Lamar R T. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, **62**: 1597-1603.
- [24] 马黠静,郝瑞霞,李瑞平,等. 芽孢杆菌 HBS-4 产生的表面活性剂及其与原油相互作用研究[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2006, **42**(6): 724-728.
- [25] Kotterman M J J, Vis E H, Field J A. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 and indigenous microflora [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, **64**(8): 2853-2858.
- [26] Čeněk Novotný, Pavla Erbanová, Václav Šásek, et al. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi [J]. Biodegradation, 1999, **10**: 159-168.