

黄土地区石油污染土壤生物修复室内模拟试验研究

黄廷林, 唐智新, 徐金兰, 肖洲强

(西安建筑科技大学, 西北水资源与环境生态教育部重点实验室, 陕西 西安 710055)

摘要:利用实验室筛选的邻单胞菌属 SY₂₃ 菌株, 在实验室模拟条件下, 对黄土地区石油污染土壤进行了石油污染土壤在加生物菌剂翻耕、加生物菌剂不翻耕、不加生物菌剂翻耕、不加生物菌剂不翻耕 4 种不同条件下的强化修复试验。结果表明, 生物菌剂对石油污染土壤有着良好的降解效果, 翻耕对于提高生物制剂对石油的分解能力有很大的促进作用。加生物菌剂翻耕试验组的石油去除率为 84.8%, 而不加生物菌剂不翻耕试验的石油去除率仅为 24.0%。

关键词:生物修复; 石油污染土壤; 生物菌剂

中图分类号:X53 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)06-2206-05

Laboratory Study on Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil in Loess Region of China

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

(Xi'an University of Architecture and Technology, Key Laboratory of Northwest Water Resource, Environment and Ecology of Ministry of Education, Xi'an 710055, China)

Abstract: The bioremediation effect of four different methods on petroleum-contaminated soil, by using of strain *Acinetobacter* sp. SY₂₃ isolated in laboratory, was studied under laboratory simulative conditions. All these methods were implemented by certain treatment on the contaminated soil, including: ①bacteria strain inoculums and ploughing②only bacteria strain inoculums③only ploughing④natural condition (without strain inoculums as well as ploughing). The results showed that prominent degradation effects were available when microorganisms agent were used to treat the contaminated soil, and ploughing has a great contribution to improve the petroleum-degradation capability of bacteria agent. The removing efficiency of the method using strain inoculums and plough was 84.8%, while that of natural condition was only 24.0%.

Keywords: bioremediation; petroleum contaminated soil; microorganisms agent

在石油勘探、开采、运输以及储存过程中落地石油会造成土壤的污染, 油田周围大面积的土壤一般都受到严重的污染。石油对土壤的污染多集中在 20 cm 左右的表层。当土壤颗粒吸附石油类物质后, 不容易被水润湿, 不能形成有效的导水通路, 透水性降低, 透水量下降。另一方面能聚集在土壤中的石油大部分是高分子组分, 它们黏着在植物根系上形成一层黏膜, 阻碍根系的呼吸和吸收功能, 甚至引起根系腐烂, 使土壤不能耕种。石油中的芳香烃类物质对人及动物的毒性极

大, 尤其是双环和三环为代表的多环芳烃毒性更大, 且为致癌物质。同时, 土壤吸附的石油会随着雨水、灌溉用水慢慢下渗到地下含水层中, 从而污染地下水, 进而构成对人类生存环境多个层面上的不良胁迫^[1-3]。

20 世纪 80 年代以来, 污染土壤的生物修复技术越来越引起人们的关注。生物修复是利用生物的生命代谢活动减少土壤环境中有毒有害物的浓度, 使污染土壤恢复到健康状态的过程。生物修复可通过环境因素的最优化而加速自然生物降解速率, 是一种高效、经济和生态可承受的清洁技术。在被石油污染的土壤上, 通过施肥、灌溉和加石灰等管理措施, 保持水分和 pH 的最合适值, 并进行翻耕作以改善土壤的通气状况, 确保土壤中石油污染物的降解。降解过程所用的微生物多为土著微生物, 但是要提高效果还需要引入

收稿日期: 2008-01-24

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20050703005); 国家自然科学基金资助项目 (50378077)

作者简介: 黄廷林 (1962—), 男, 山东昌邑人, 博士, 教授, 主要研究方向为水资源保护与水质控制, 水处理技术, 水环境修复。

E-mail: huangtinglin@xauat.edu.cn

驯化的高效石油降解菌。在已有的试验基础上^[4],本试验进一步对生物制剂的现场应用条件进行研究,研究 4 种不同处理措施对石油污染土壤生物修复的影响,以为石油污染土壤的生物修复提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤

采用油田采油井附近表层原油污染原土。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,以原油为惟一碳源进行筛选分离,得到高效石油降解菌^[5],将文献[5]中斜面培养的邻单胞菌属 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缓冲溶液后放在摇床上,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 24 h 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(GC-MS)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:载气为氦气,0.8 mL·min⁻¹;进样口温度为 280 ℃;检测器温度为 280 ℃;升温程序为 100 ℃开始每分钟上升 10~200 ℃,再以 5 ℃·min⁻¹ 上升到 280 ℃,保留 10 min,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

为研究石油污染土壤生物降解效应,采用模拟试验。试验在花瓷盆(直径为 15 cm,高 15 cm)中进行,共设 4 组试验,每组试验用土 1 000 g。各组试验的具体处理措施见表 1。

4 组试验均在自然温度下,每天加水使土壤水分保持 15%~25%,每天加水 20 mL,同时为了避免土壤

表 1 各组试验处理措施			
Table 1 Different laboratory treatments			
编号	石油含量/g·kg ⁻¹	处理措施	
A	1.297	加生物菌剂	翻耕
B		加生物菌剂	不翻耕
C	1.865	不加生物菌剂	翻耕
D		不加生物菌剂	不翻耕

表面干化,用空气加湿器加湿。其中 A、C 组试验翻耕频率为 1 次·d⁻¹。开始时每隔 2~4 d 采样,随着土壤中石油去除率的降低,采样间隔逐渐增大。采样的同时测定土壤中石油含量、电导率、含水率及 pH 值。

2 结果与讨论

2.1 修复过程中石油含量的变化规律

经过 55 d 的试验后,各组试验中石油含量随时间的变化规律如图 1。从图上可以看出,在前 35 d 内,D 组中的石油含量基本保持不变,其他组中的石油含量迅速下降,尤其是在前 22 d 内,A、B、C 组中的石油含量由原来的 1.297、1.297、1.865 g·kg⁻¹(以干土计)土壤实际含水率的数值为 15%~20%,分别下降到 0.497、0.818、0.978 g·kg⁻¹。35 d 后 D 组中石油含量开始下降,下降的主要原因是土壤中的土著微生物在石油污染物的诱导下产生分解石油污染物的酶系,将石油污染物降解转化。试验结束时,A、B、C、D 组试验中的石油去除率分别为 84.8%、47.2%、69.0%、24.0%,加生物菌剂并翻耕的 A 组处理效果最好。

由图 2 可以看出,A、B、C 3 组试验石油去除率的变化规律基本一致,去除率曲线都是在试验开始阶段迅速上升,随后趋于平缓,试验最后阶段又略有上升。D 组试验石油的去除率在试验初期几乎没有变化,在试验后期略微增大。最终 A、B、C、D 4 组试验去除率的大小关系为 A>C>B>D,分别为 84.8%、69.0%、

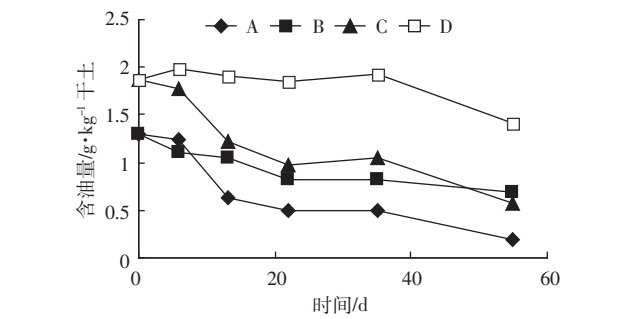


图 1 石油含量随时间的变化
Figure 1 Change of oil content in soil with time

47.2%、24.0%。

2.1.1 加菌剂对石油去除率的影响

土壤中石油污染物的生物降解与土壤中可降解石油的微生物数量有密切的关系。在生物降解过程中,仅靠土壤中的土著微生物无论是从处理时间还是处理效果都远远不够,往往需要接入高效菌剂。张旭等^[6]研究表明,加入富集高效菌剂可使土壤中石油降解菌的数量从 3.0×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 提高到 2.6×10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,土壤中石油的半衰期比自然土壤(不加菌剂)缩短了近 3 倍。从图 2 可以看出无论翻耕还是不翻耕,加菌剂土样的石油去除率都大于不加菌剂土样,A 组的石油去除率比 C 组提高了 15.8%,B 组的石油去除率比 D 组提高了 23.2%。

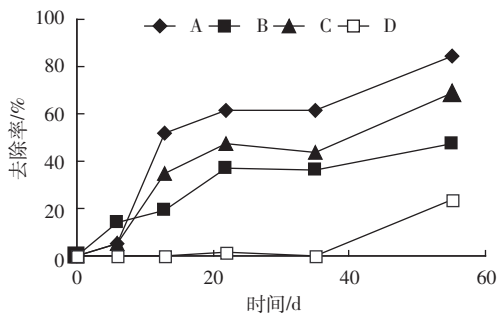


图 2 石油去除率随时间的变化

Figure 2 Change of oil removal rate with time

2.1.2 翻耕对石油去除率的影响

土壤中可降解石油污染物的微生物基本上是好氧细菌^[7],1 mg 烃完全被微生物氧化为 CO_2 和 H_2O 需要 3~4 mg O_2 ,而土壤中的氧气通常是有限的,因此土壤中氧的浓度是否充足对石油降解效率有很大影响。改善土壤中氧的含量一般有 2 种方法:一是加供氧剂,如 H_2O_2 ;二是翻耕。加供氧剂法成本高,技术复杂,难以大面积实施,而翻耕是简单方便、费用低廉的供氧措施。

从图 2 可以看出 $A>B$,同时 $C>D$,这说明翻耕组的石油去除率大于不翻耕组。因为翻耕土壤改善了土壤的通风透气条件,为微生物提供了足够的氧气。翻耕供氧提高石油污染土壤微生物处理效果机制可能包括 3 个方面:一是物理作用,翻耕可以使土壤中残留的小分子油类和微生物的代谢产物迅速挥发;二是直接氧化作用,进入土壤中的氧气可以直接氧化一部分污染土壤的烃类化合物;三是对降解烃类物质微生物的促进作用,进入到土壤的氧气为微生物的繁殖及

对烃类物质的降解过程提供了充足的电子受体。

经过 55 d 的试验后,A 组石油去除率比 D 组提高了 60.8%,这说明加菌剂翻耕技术治理石油污染土壤具有很大的潜力。

2.2 电导率的变化

由图 3 可以看出,在整个试验过程中加菌剂的 A 和 B 组的电导率始终大于不加菌剂 C 和 D 组的电导率,在试验初期 C 和 D 组的电导率基本维持在 $200\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 左右,而 A 和 B 组的电导率最高达到 $750\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。由于细菌通常带负电,而电导率主要反映土壤中电荷的多少,故电导率的大小在一定程度上反映了细菌的数量,与图 4 的试验结果一致。土壤中电荷的多少除了与细菌数量有关,还与土壤中的营养物质、石油的分解产物等有关。在试验初期,A 和 B 组的电导率远远大于 C 和 D 组,表明细菌产生的电导率占优势,A 和 B 组中的细菌数量很多,说明初期投菌对污染系统的生物修复具有快速启动作用。随后 A 和 B 组的电导率迅速下降,表明土壤中的营养物质迅速减少。由于受到营养条件的限制,细菌之间产生竞争,从而导致大量的细菌死亡,电导率迅速下降。这与 Murygina 等^[8]的试验一致,在进行一段时间的降解

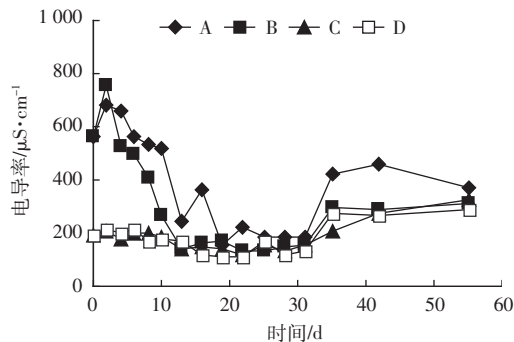


图 3 电导率随时间的变化

Figure 3 Change of conductivity in soil samples

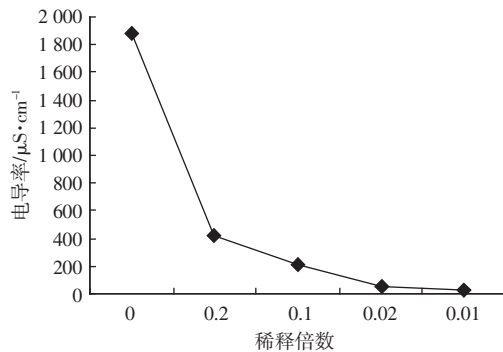


图 4 菌液浓度对电导率的影响

Figure 4 Effect of concentration of bacterium on conductivity

后,系统中的微生物的活性开始下降,数量开始减少,可以考虑通过追加生物菌剂和营养来增加去除率。在 13~31 d 电导率基本上维持在一定水平,表明细菌之间由于竞争而维持在一定的数量。而在 31~55 d 电导率又开始上升,说明细菌分解石油产生的产物逐渐积累。此时的电导率主要是非烃类分解产物引起的^[9]。

2.3 pH 值的变化

微生物在修复过程中将大分子物质分解为小分子物质,会产生二氧化碳和水等,产生的物质可以影响土壤的 pH 值^[10]。分析图 5 可见,在试验初始阶段 pH 略微下降,这是由于微生物在降解石油烃的过程中会产生一些小分子脂肪酸,脂肪酸的积累导致土壤 pH 值下降。随后 pH 值开始上升,主要原因是采油企业为了方便现场处理投加到石油污染物中的石灰由于日常维护逐渐溶解,而降解过程中的酸性物质不足以抵消溶解的石灰,使得 pH 值上升。

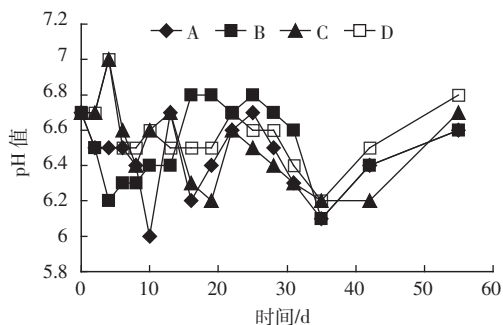


图 5 pH 值随时间的变化

Figure 5 Change of pH in soil samples

2.4 石油组分的变化

石油是一种含有多种烃类(烷烃、芳烃及非烃类)及少量其他有机物(硫化物、氮化物、环烷酸类等)的复杂混合物。有的石油样品可含 200~300 种烃类,分子量从 16~1 000 左右,其物理状态包括气体、挥发性液体、高沸点液体以及固体^[1]。大量研究表明,石油类物质的可降解性是由其化学组成决定的,支链烃类相对直链烃类难降解,高分子芳香烃物质相对低分子芳香烃物质难降解,沥青和胶质最难降解^[11-12]。为确定各试验组的降解效果,试验进行至 30 d 时,采用 GC-MS 对处理前后的组分进行分析。

从图 6、7 中可以明显看出加菌处理后,峰高大幅度降低,与基线相平;而不加菌处理的峰形与未处理前相似,各组分含量均较高。将经过处理前后的石油组分 GC-MS 图谱对比分析:A 组处理后土壤中的石

油组分基本上被完全降解;B 组处理后土壤中石油组分还有少量(见图中小峰);C 组处理后大部分组分还存在,只是峰值有所降低;D 组处理前后相比峰形相似,说明大部分石油类物质还残留在土壤中未被去除。试验结果再一次表明加菌翻耕技术治理石油污染土壤是非常有效的。

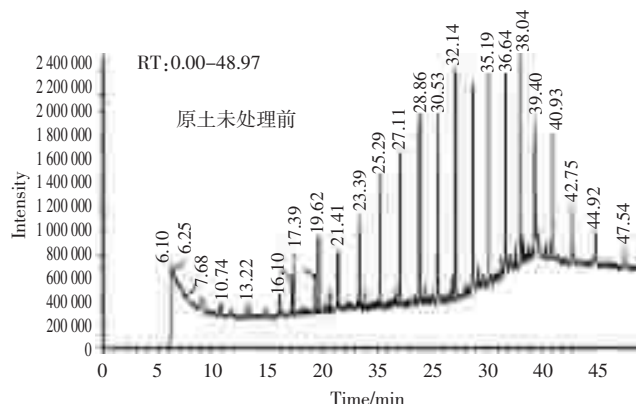


图 6 处理前 GC-MS 图谱

Figure 6 GC-MS of oil before degradation

3 结论

(1)经过 55 d 的试验,A、B、C 和 D 组中的石油含量分别由原来的 1.297、1.297、1.865 和 1.865 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 下降到 0.197、0.685、0.579 和 1.417 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,降解率分别为 84.8%、47.2%、69.0%和 24.0%。

(2)在整个试验过程中,A 和 B 组的电导率始终大于 C 和 D 组;土壤的电导率在一定程度上反映了细菌的数量。

(3)A、B、C 和 D 组中石油组分 55 d 后都有不同程度的降解,其中 A 组降解效果最好,土壤中的石油组分基本上被完全降解,D 组中的石油类物质大部分还残留在土壤中。

参考文献:

- [1] 卢秀君,郭书海,孙清,等.石油污染土壤的修复技术研究现状及展望[J].沈阳农业大学学报,2003,34(1):63-37.
LU Xiu-jun, GUO Shu-hai, SUN Qing, et al. Current situation of remediating techniques of petroleum contaminated soil and its prospects [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2003, 34(1):63-37.
- [2] 李法云,田白苹,吴龙华.污染土壤生物修复理论基础及技术[M].北京:化学工业出版社,2006.
LI Fa-yun, TIAN Bai-ping, WU Long-hua. *Bioremediation techniques of contaminated soil*[M]. Beijing: Chemical Industry Press.
- [3] 孙铁珩,李培军,周启星.土壤污染形成机理与技术[M].北京:科学出版社,2005.

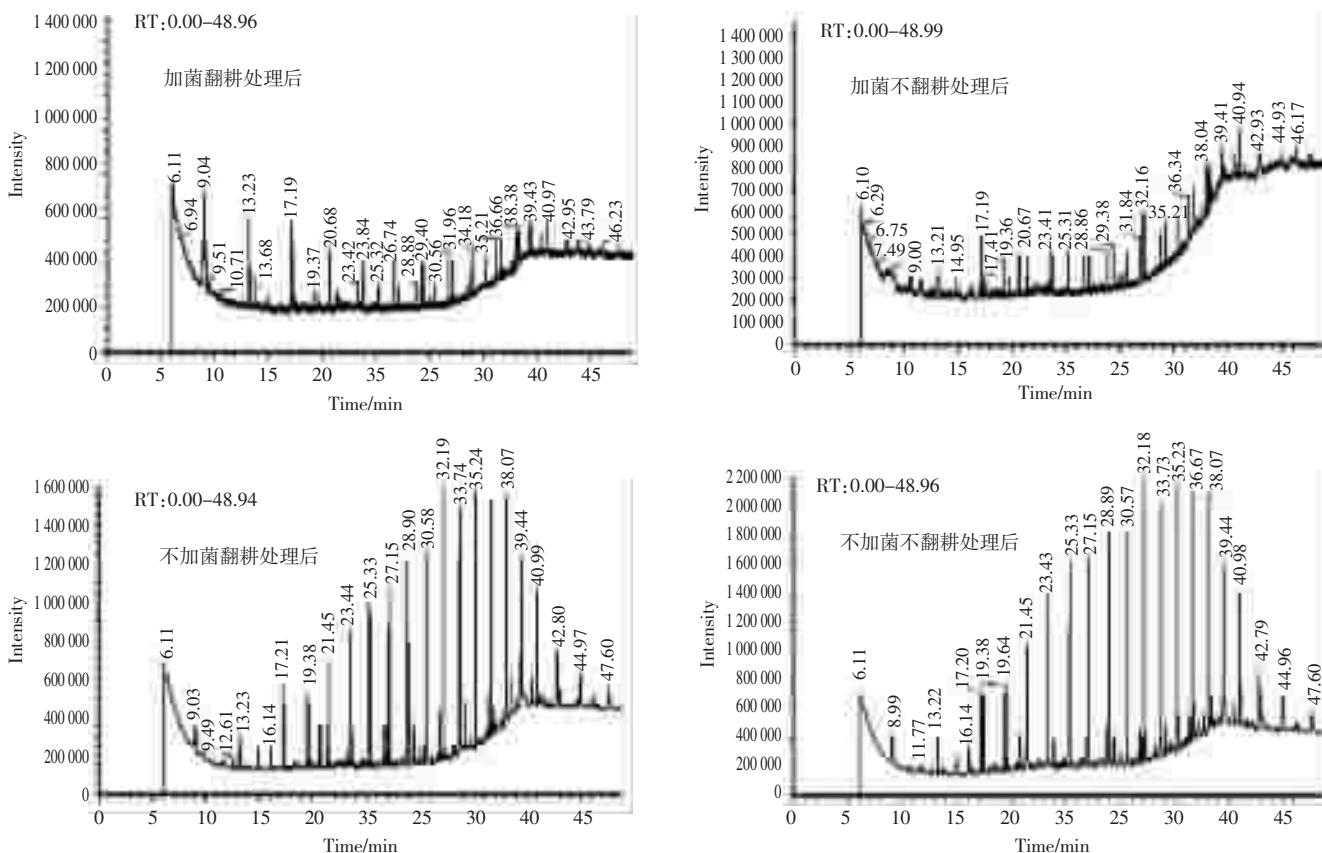


图 7 处理后 GC-MS 图谱

Figure 7 GC-MS of oil after degradation

SUN Tie-heng, LI Pei-jun, ZHOU Qi-xing. Principle & technology of contaminated soil forming[M]. Beijing: Science Press, 2005.

- [4] 黄廷林, 肖洲强, 徐金兰, 等. 生物菌剂修复陕北石油污染土壤实验研究[J]. 西安建筑科技大学学报, 2007, 39(1): 14–17.

HUANG Ting-lin, XIAO Zhou-qiang, XU Jin-lan, et al. Experiment on bioremediation of oil-contaminated soil in northern Shannxi province[J]. *Journal of Xi'an University of Architecture & Technology (Natural Science Edition)*, 2007, 39(1): 14–17.

- [5] 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.

XU Jin-lan, HUANG Ting-lin, TANG Zhi-xin, et al. Isolation of petroleum degradation bacteria and its application to bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(4): 622–628.

- [6] 张旭, 李广贺, 黄巍. 石油烃污染土层生物修复模拟试验研究[J]. 清华大学学报, 2000, 11(4): 106–108.

ZHANG Xu, LI Guang-he, HUANG Wei. Bioremediation of petroleum hydrocarbons-polluted soil[J]. *Journal of Tsinghua University (Science and Technology)*, 2000, 11(4): 106–108.

- [7] 黄巍. 包气带中石油污染物的微生物降解研究[D]. 北京: 清华大学学位论文, 1998.

HUANG Wei. Bioremediation of petroleum hydrocarbons-polluted soil[D].

Beijing: Tsinghua University Thesis, 1998.

- [8] Murygina V, Arinbasarov M, Kalyuzhnyi S. Bioremediation of oil polluted aquatic systems and soils with novel preparation “Rhoder”[J]. *Bioremediatio*, 2000, 11(6): 385–389.

- [9] 刘可慧, 于方明, 彭少麟, 等. 鼎湖山不同演替阶段土壤酸性阳离子淋溶动态研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2008, 47(1): 73–77.

LIU Ke-hui, YU Fang-ming, PENG Shao-lin, et al. Release of acidic cations by simulated acid rain from different successional stage soils in Dinghushan[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2008, 47(1): 73–77.

- [10] I Lazar, S Dobrota A. Voicu. Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some romanian oil fields[J]. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 1999, 22(1–3): 151–160.

- [11] 李培军, 郭书海, 孙铁珩, 等. 不同类型原油污染土壤生物修复技术研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(11): 1455–1458.

LI Pei-jun, GUO Shu-hai, SUN Tie-heng. Bio-remediation techniques of crude oil contaminated soils[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(11): 1455–1458.

- [12] P U M Raghavan, M Vivekanandan. Bioremediation of oil-spilled sites through seeding of naturally adapted *Pseudomonas putida*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1999, 44(1): 29–32.