

微生物强化对石油污染土壤的修复特性研究

王娣, 马闯, 高欢, 刘恒, 徐会宁, 吴蔓莉

引用本文:

王娣, 马闯, 高欢, 等. 微生物强化对石油污染土壤的修复特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(12): 2798–2805.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0534>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

石油降解菌群的构建及其对混合烃的降解特性

范瑞娟, 郭书海, 李凤梅

农业环境科学学报. 2017, 36(3): 522–530 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1266>

生物修复对黄土壤中石油烃的去除作用及影响因素

吴蔓莉, 张晨, 祁燕云, 叶茜琼, 祝长成

农业环境科学学报. 2018, 37(6): 1159–1165 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1549>

固定化混合菌修复冻融土壤PAHs污染的研究

普聿, 苏丹, 王鑫, 王天杰, 刘伟

农业环境科学学报. 2019, 38(10): 2362–2370 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0034>

施用生物菌剂对油水淹地污染土壤的修复研究

王铁媛, 窦森, 胡永哲, 王呈玉, 刘录军, 林琛茗

农业环境科学学报. 2015(2): 288–296 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.02.012>

鼠李糖脂-混合降解菌强化三角梅去除土壤中对硫磷

辛鑫, 刘家女

农业环境科学学报. 2017, 36(5): 943–949 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1459>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王娣, 马闯, 高欢, 等. 微生物强化对石油污染土壤的修复特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(12): 2798–2805.

WANG Di, MA Chuang, GAO Huan, et al. Study of survival conditions and growth of petroleum hydrocarbon-degrading bacteria in petroleum-contaminated soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(12): 2798–2805.



开放科学 OSID

微生物强化对石油污染土壤的修复特性研究

王娣, 马闯, 高欢, 刘恒, 徐会宁, 吴蔓莉*

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

摘要:通过实验室模拟修复研究了接种量为 $10^3 \sim 10^8$ cfu·g⁻¹ 的降解菌群在土壤中生长的湿度条件和存活状况、对土著菌群的影响作用以及对石油烃的去除效果。结果表明,从石油污染土壤中筛选出的石油烃降解菌群主要由变形菌门(Proteobacteria, 99.75%)–γ-变形菌纲(Gamma-proteobacteria, 99.49%)–假单胞菌目(Pseudomonadales, 99.36%)–莫拉氏菌科(Moraxellaceae, 87.33%)–不动杆菌属(*Acinetobacter*, 87.32%)和假单胞菌科(Pseudomonadaceae, 12.04%)–假单胞菌属(*Pseudomonas*, 12.00%)组成。利用筛选的降解菌群在土壤湿度为 5.4%、接种量为 10^8 cfu·g⁻¹ 土的条件下对污染土壤修复 60 d, 石油烃去除率为 10.61%; 在土壤湿度为 15.0%、接种量为 10^7 cfu·g⁻¹ 土时对石油烃去除率为 18.67%。在 5.4% 和 15.0% 湿度下接种 7 d, 土壤中变形菌门相对丰度由 28.22% 增加至 57.98%~66.35%, 不动杆菌属相对丰度由 0.04% 增加至 25.86%~30.25%, 假单胞菌属由初始时的 0.26% 增加至 5.03%~30.87%, 说明在不同湿度条件下, 接种的降解菌均能迅速生长为土壤中的优势菌; 接种 60 d 时, 其仍保持存活状态。研究表明, 降解菌群的接种改变了土壤菌群结构, 使土壤菌群的 alpha 多样性明显降低。土壤污染物的去除不仅依靠某种优势菌的特定降解功能, 还需要土壤菌群的协同代谢作用。

关键词:烃降解菌; 石油污染土壤; 生物强化; 菌群结构; 接种量; 湿度

中图分类号: X53; X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672–2043(2020)12–2798–08 **doi:** 10.11654/jaes.2020–0534

Study of survival conditions and growth of petroleum hydrocarbon-degrading bacteria in petroleum-contaminated soil

WANG Di, MA Chuang, GAO Huan, LIU Heng, XU Hui-ning, WU Man-li*

(Shaanxi Key Laboratory of Environmental Engineering, Key Laboratory of Northwest Water Resources, Environment and Ecology, School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: Bioremediation of petroleum-contaminated soil by inoculating hydrocarbon-degrading microorganisms is widely applied presently. However, there are few studies on the growth and survival of hydrocarbon-degrading microorganisms and their effects on petroleum hydrocarbon degradation. In this study, the proliferation and survival conditions of inoculating strains, as well as their effects on petroleum degradation, were determined by laboratory simulation of remediation. The results showed that the compositions of petroleum-degrading bacterial flora mainly included the Proteobacteria phylum (99.75%), Gamma-proteobacteria class (99.49%), Pseudomonadales order (99.36%), Moraxellaceae family (87.33%) *Acinetobacter* sp. (87.32%), and Pseudomonadaceae family (12.04%) *Pseudomonas* sp. (12.00%). When the soil moisture content and the inoculation amount of degrading strains were 5.4% and 10^8 cfu·g⁻¹ respectively, the removal efficiency of total petroleum hydrocarbons was 10.61%; the removal efficiency increased to 18.67% when the soil moisture content

收稿日期: 2020–05–13 录用日期: 2020–07–31

作者简介: 王娣(1996—), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 主要从事石油污染土壤的生物修复技术及机制研究。E-mail: 651256271@qq.com

*通信作者: 吴蔓莉 E-mail: 447005853@qq.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(52070154, 21577109); 陕西省自然科学基金基础研究基金项目(2015JM5163)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(52070154, 21577109); The Natural Science Foundation of Shaanxi Province, China (2015JM5163)

and the bacteria inoculation amount were 15.0% and 10^7 cfu·g⁻¹, respectively. After 7 days of inoculation, the relative abundance of the Proteobacteria phylum increased from 28.22% to 57.98%~66.35%; *Acinetobacter* genus increased from 0.04% to 25.86%~30.25%; and *Pseudomonas* genus increased from 0.26% to 5.03%~30.87%. The results indicated that the strains proliferated rapidly after 7 days of inoculation under various soil moisture contents. Inoculation of exogenous bacteria changed the soil bacterial community structures and reduced the alpha diversity significantly. The removal of the contaminants not only depends on the specific function of some dominant bacteria but also requires the synergetic metabolism of soil flora.

Keywords: hydrocarbon-degrading bacteria; petroleum-contaminated soil; bioaugmentation; community structure; inoculation amount; moisture content

生物强化(Bioaugmentation)是指向污染环境中接种外源微生物以对污染物进行去除的方法^[1-2]。由于接种的降解菌可对目标污染物进行直接降解,因此具有针对性强、对污染物去除速度快等优点,已成为广为采用的石油污染土壤修复技术^[3-6]。已有大量文献研究对石油烃降解菌的筛选和鉴定进行了详细报道。筛选出的可降解石油烃的菌属包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*)等多种菌属^[7-12]。此外,对降解菌群的构建和外源菌群接种对石油烃去除效果的影响也有较为详细的研究报道^[13-15]。

生物强化中接种的降解菌生长和代谢活性受土壤湿度、土壤养分和pH等土壤环境条件的影响较大^[16-17]。Pacwa-Płociniczak等^[18]向初始含油量为11 980 mg·kg⁻¹的土壤中接种红球菌属进行生物强化修复,接种量为 10^8 cfu·g⁻¹、保持土壤湿度为50%的田间持水量修复182 d时,石油烃去除率达到38.4%。Wu等^[19]向黄土壤中接种由*Pseudomonas stutzeri* GQ-4 strain KF453954、*Pseudomonas* SZ-2 strain KF453956和*Bacillus* SQ-2 strain KF453961构成的降解菌群,接种量为 10^8 cfu·g⁻¹、土壤湿度为20%修复8周,石油烃去除率达到58%。目前的研究工作多是对最佳湿度和接种量条件下的石油烃去除效果进行研究,但对于不同接种量的降解菌群在土壤自然湿度条件下的生长存活状况研究相对较少。

本文利用富集培养法从石油污染土壤中筛选出石油烃降解菌群,在两种不同土壤湿度条件下(5.4%和15.0%)向污染土壤中接种降解菌群进行生物强化修复处理,研究接种量和湿度对降解菌群生长和存活的影响以及对石油烃的去除效果,研究可为深入理解降解菌群接种生物强化修复提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 降解菌群的筛选

以采自陕北延长某油井周围的石油污染土壤为石油烃降解菌菌源。土壤的基本理化性质为:pH 7.68、总氮1 170 mg·kg⁻¹、有效磷15.92 mg·kg⁻¹、铵态氮14.70 mg·kg⁻¹、硝态氮0.38 mg·kg⁻¹,土壤含油量为15 233 mg·kg⁻¹。

富集筛选培养基——L9培养基:Na₂HPO₄·12H₂O 17.689 g·L⁻¹,KH₂PO₄ 3.0 g·L⁻¹,NH₄Cl 1.0 g·L⁻¹,NaCl 0.5 g·L⁻¹,1 mL·L⁻¹ 1 mol·L⁻¹ MgSO₄,2.5 mL·L⁻¹ 微量元素。微量元素组成:MnCl₂·2H₂O 23 mg·L⁻¹,MnCl₄·H₂O 30 mg·L⁻¹,H₃BO₃ 31 mg·L⁻¹,CoCl₂·6H₂O 36 mg·L⁻¹,CuCl₂·2H₂O 10 mg·L⁻¹,NiCl₂·6H₂O 20 mg·L⁻¹,Na₂MoO₄·2H₂O 30 mg·L⁻¹,ZnCl₂ 50 mg·L⁻¹。

富集筛选方法:称取5.0 g石油污染土壤,无菌条件下加入50.0 mL灭菌的L9培养基,30℃、150 r·min⁻¹条件下振荡培养2 h以提取土壤中的总微生物。将提取物静置30 min后,移取5 mL提取液转接至含1%原油(取自长庆油田采油六厂)的100.0 mL L9培养基中,相同条件下连续培养7 d,如此转接5次后,将最后一次获得的培养液在10 000 r·min⁻¹条件下离心分离获得混合菌,利用PBS无机盐缓冲液洗涤混合菌5次。将混菌悬液OD值调节为1.0,600 nm处测定,相当于 1×10^8 cfu·mL⁻¹的菌量。获得的混菌悬液用MC表示。利用高通量测序分析降解菌群MC的组成,并将获得的菌群用于后续生物强化修复方案中。

1.2 生物强化修复方案

将石油污染土壤经碎散、除杂、过0.85 mm筛后混匀。称取36份100.0 g的石油污染土壤分装于36个烧杯中,具体修复方案见表1。表1中,CK、A、B、C、D、E为土壤自然湿度(5.4%)实验组;CK'、A'、B'、C'、D'、E'为15.0%湿度实验组(修复过程中定期向土壤中加灭菌纯水,使土壤湿度为15%)。将1.1中获

表1 石油污染土壤的修复方案设计
Table 1 Experiment design for bioremediation of petroleum-polluted soil

组1 Group 1	样品编号 Sample ID	菌群MC接种量 Inoculation amounts of flora MC/(cfu·g ⁻¹ 土)	组2 Group 2	样品编号 Sample ID	菌群MC接种量 Inoculation amounts of flora MC/(cfu·g ⁻¹ 土)
5.4% 土壤湿度 (自然湿度)	CK	0	15.0% 土壤湿度	CK'	0
	A	10 ³		A'	10 ³
	B	10 ⁴		B'	10 ⁴
	C	10 ⁵		C'	10 ⁵
	D	10 ⁷		D'	10 ⁷
	E	10 ⁸		E'	10 ⁸

得的降解菌悬液MC按表1设定的接种量分别接种于石油污染土壤中,CK和CK'为不进行接种处理的控制组。每个处理设置3个平行。

所有样品均放置在实验室内,每隔3~4 d用灭菌玻棒翻动土壤以保证充氧量,在修复的第7、15、30、45、60 d时取样测定土壤中总石油烃含量。

1.3 石油烃测定方法

采用超声波萃取法提取土壤中的总石油烃并利用质量法进行测定^[20]。详细步骤为:准确称取风干土样3.000 g置于离心管中,加入正己烷和二氯甲烷1:1混合萃取剂15.0 mL,利用超声细胞破碎仪(SONICS, JY92-II, 美国)超声萃取10 min(萃取功率为170 W),4℃、8 000 r·min⁻¹条件下离心15 min,利用定量滤纸过滤提取液于已称质量的称量瓶中,重复萃取3次。将称量瓶放于通风橱,使其中的提取剂挥发,待完全挥发至恒质量后称取质量。

1.4 高通量测序分析

在修复第7 d和第60 d时,从接种量为10⁸ cfu·g⁻¹、自然湿度的土壤(标号为E7、E60)和接种量为10⁷ cfu·g⁻¹、湿度为15.0%的土壤(编号为D'7、D'60),以及修复60 d时的控制组土壤(编号为CK60、CK'60)的各3个重复样品中,选择石油烃测定结果最接近的2个平行样品,送上海生工(<https://www.sangon.com/>)进行高通量测序分析。

使用Prinseq软件对高通量测序结果进行质量控制,将所测序列与RDP数据库进行序列比对,使用Usearch软件去嵌合后归类为同种可操作分类单元(OTU),利用Mothur公式计算多样性指数,利用RDP classifier对测序结果进行物种分类^[21]。细菌门水平和属水平的相对丰度计算方法见公式(1):

$$\lambda = \frac{S_i}{S} \times 100\%$$
 (1)

式中:λ为第*i*种细菌门水平(属水平)的相对丰度;*S_i*

为第*i*种细菌门水平(属水平)的有效序列数;*S*为该土样中微生物的总有效序列数。

1.5 数据处理

使用SPSS 19.0软件对总石油烃去除率进行One-way-ANOVA方差分析,显著性水平取0.05。采用Origin 9.0软件作图。

高通量测序结果显示,每个处理的2个平行样品测定结果的重复性较好,从中随机选取1个样品的测定结果进行后续分析。

2 结果与讨论

2.1 石油烃降解菌群组成

利用富集培养方法从陕北地区石油污染土壤中筛选出以石油烃为唯一碳源和能源生长的菌群MC。经高通量测序从MC中获得的有效序列数为94 919, OTUs数目为278个,归属于19个门。降解菌群主要由变形菌门(Proteobacteria, 99.75%)组成,其余的几种菌门包括放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)的总丰度不高,为0.25%。降解菌群的优势菌属为不动杆菌属(*Acinetobacter*, 87.32%)和假单胞菌属(*Pseudomonas*, 12.00%)(图1)。

不动杆菌属和假单胞菌属是文献报道的常见石油烃降解菌^[22-27]。本课题组在前期的研究中,利用Bush-hass培养基从陕北石油污染土壤中筛选出的降解菌组成均为假单胞菌属和不动杆菌属^[28]。说明这两种菌属是陕北地区石油污染土壤中普遍存在的可降解石油烃的菌属。

2.2 接种降解菌对土壤中石油烃去除效果的影响

自然湿度(5.4%,图2)条件下修复60 d, A、B、C、D、E土壤样品中总石油烃含量分别从15 233 mg·kg⁻¹降低至14 767、15 167、14 867、14 683 mg·kg⁻¹及13 617 mg·kg⁻¹,石油烃去除率分别为3.06%、0.44%、2.41%、

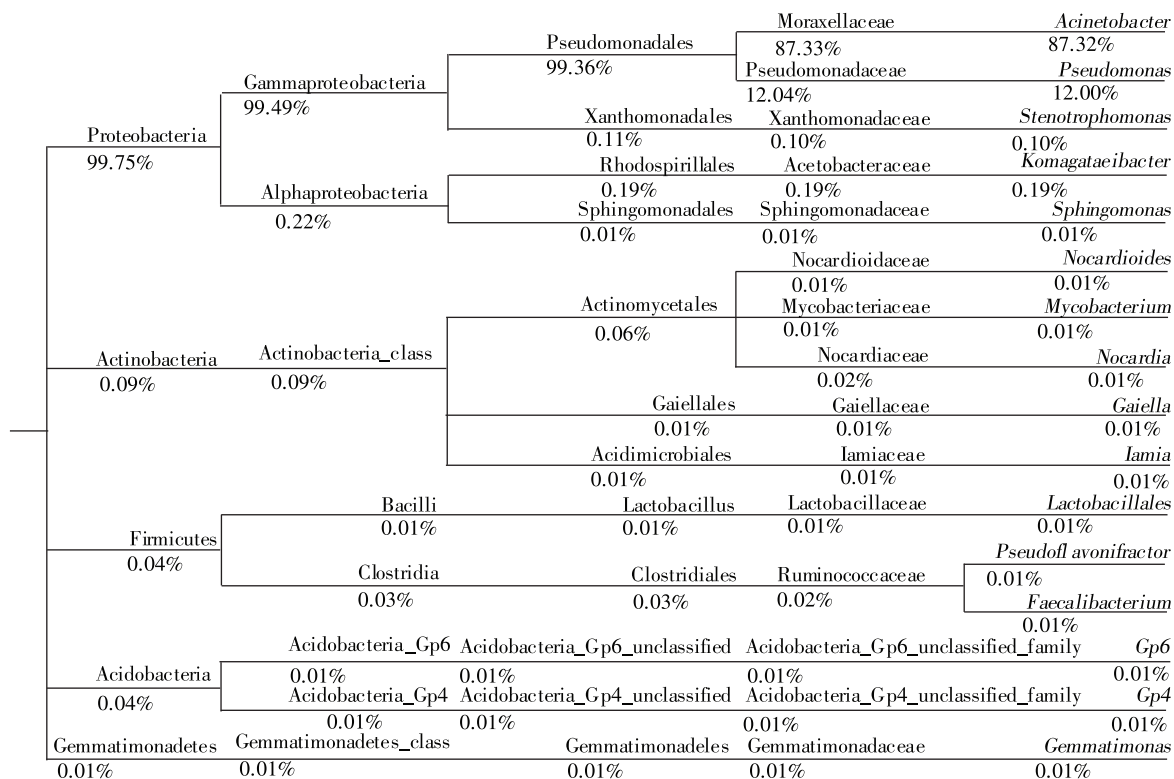


图 1 石油烃降解菌群 MC 组成

Figure 1 The compositions of petroleum-degrading flora MC

3.61%、10.61%。不接菌的CK土壤中含油量降至14 422 mg·kg⁻¹,总石油烃去除率为5.32%。自然湿度条件下,当降解菌群接种量为10⁸ cfu·g⁻¹时,接入的降解菌群对土壤中石油烃起到一定的去除作用。接种量低于10⁸ cfu·g⁻¹时的石油烃去除率低于CK组,可能是由于接种菌群数量少,没有生长为优势菌,接种后反而抑制了原有降解菌的生长和活性。

15.0% 湿度条件下,A'、B'、C'、D'、E'处理中,总

石油烃含量由15 233 mg·kg⁻¹分别降低至12 867、13 400、14 200、12 389、12 511 mg·kg⁻¹,石油烃去除率分别为15.54%、12.04%、6.78%、18.67%、17.87%。未接菌的CK'土壤中总石油烃含量降低至13 833 mg·kg⁻¹,石油烃去除率为9.19%(图3)。因此,当保持土壤湿度为15%时,除接种量为10⁵ cfu·g⁻¹的土样外,经过60 d的生物强化,土壤中总石油烃残留量均低于CK'。接种量为10⁵ cfu·g⁻¹时的石油烃去除率最低,可能是由于此时降解菌在土壤中虽然有一定的生长,但是没有生长为优势菌,而且此时的生长量抑制了土著降解菌的活性,因此使得石油烃去除率最低。

对不同湿度土壤中石油烃的去除效果进行比较分析,见图4。土壤湿度为15.0%时对石油烃的去除效果总体上好于自然湿度下的修复处理。

湿度是影响微生物生长和活性的重要条件。水分过高或过低均可使土壤微生物活性降低^[29]。一些研究表明,土壤湿度为12%~20%时,微生物活性最强,有利于对石油烃的降解。湿度过高会使土壤透气性变差,影响降解菌对石油烃的代谢功能^[30]。本文的研究结果表明,与自然湿度下接种相比,在保持土壤湿度15%条件下进行接种修复,对土壤微生物多

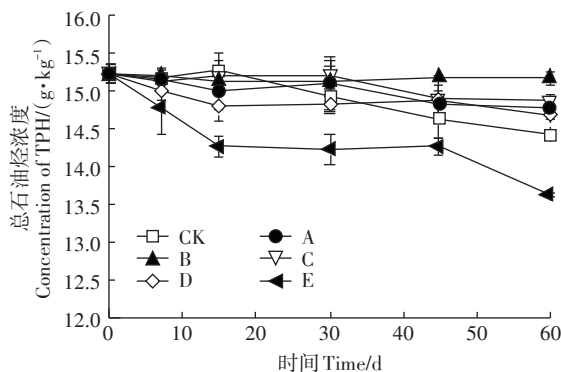


图 2 自然湿度(5.4%)条件下接种量对石油烃去除的影响

Figure 2 The effects of MC inoculation amount on petroleum hydrocarbon removal under 5.4% natural moisture

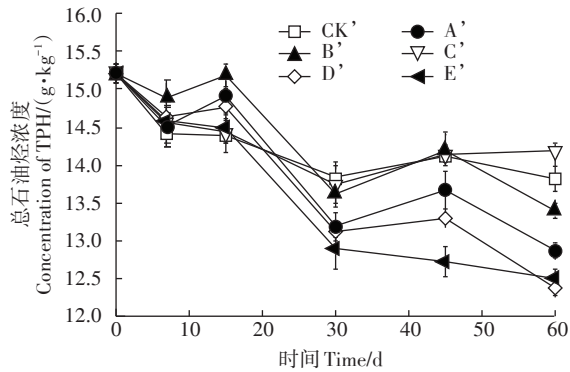
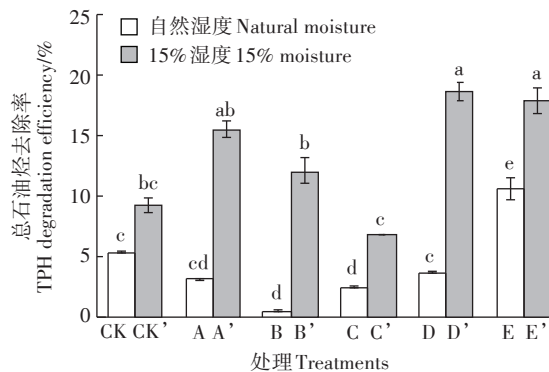


图3 15.0%湿度条件下接种量对石油烃去除的影响

Figure 3 The effects of MC inoculation amount on petroleum hydrocarbon removal under 15.0% moisture



不同字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters indicate significant differences among various of treatments ($P < 0.05$)

图4 不同湿度条件土壤修复60 d的总石油烃去除率

Figure 4 TPH degradation efficiency under different humidity conditions at 60 d of bioremediation

样性的影响较小,石油烃的去除率相对较高。因此,在对石油污染土壤进行生物强化修复时,适当的土壤含水率有利于石油烃的降解。

本研究筛选出MC降解菌群在水相中对原油具有很好的降解性能,摇瓶实验中,经过30 d的生物降解,MC菌群对水相中石油烃去除率达到89.28%,该结果未在本文中显示。当向石油污染土壤中接种MC菌群进行强化修复处理时,土壤石油烃最高去除率仅为18.67%。

在以前的研究中,向黄土壤中接种其他降解菌群修复8周,石油烃去除率达到58%^[19];接种单一石油烃降解菌 *Acinetobacter* SZ-1 strain KF453955 修复10周,对土壤中石油烃的去除率为34%^[20]。这些结果说明生物强化修复的石油烃去除效果可能受到多种因素的影响,外源菌与土著功能降解菌之间可能存在某种

特殊的平衡交互作用。

2.3 降解菌群在不同接种条件下的生长及对土著菌群的影响作用

在修复的第7 d和第60 d,采集两种湿度条件下对石油烃去除效果较好的土壤样品(E和D')和对照组(CK和CK'组)土壤样品,进行高通量测序分析,研究降解菌群在不同湿度条件下的生长存活情况及其对土壤土著菌群的影响作用。

2.3.1 菌群的alpha多样性

Ace和Chao1指数表征土壤微生物的丰富度,其值越大,土壤微生物的丰富度越大。Shannon指数和Simpson指数表征土壤菌群的均匀度,Shannon指数值越大,Simpson指数越小,土壤微生物的均匀度越高^[31-32]。

表2为不同处理土壤的微生物多样性测定结果。从土壤样品E7、E60、D'7、D'60、CK60及CK'60中测得的有效序列数分别为76 434、67 486、68 120、72 392、64 923、73 632。自然湿度条件下向土壤中接种降解菌群进行修复7 d(E7)和60 d(E60)时,土壤的Shannon指数为3.66和3.09,Simpson指数为0.13和0.19,ACE指数为9 653.19和7 842.22,Chao1指数为7 187.33和5 597.03。Shannon指数、Chao1指数和ACE指数在所测土壤样品中均最小,Simpson指数最大,说明在自然湿度条件下对污染土壤进行接种强化修复处理,可使土壤微生物群落多样性明显降低。

与CK'60相比,D'7和D'60土壤样品的Shannon指数和ACE指数有所降低,但降低程度小于自然湿度条件下的接种处理。

本研究中,接种降解菌群进行生物强化修复使土壤微生物的均匀度和丰富度降低,与我们前期研究所得结果基本一致^[21,33]。本研究结果表明,在提高土壤湿度的条件下进行接种修复,可以使土壤微生物多样性保持较为稳定的状态。

2.3.2 土壤微生物群落组成变化

2.3.2.1 降解菌在土壤中的生长情况和土壤中门水平微生物群落组成

图5为MC菌群和土壤中12种主要菌门的相对丰度,其余菌门相对丰度合并为Others。土样CK60、E7、E60、CK'60、D'7、D'60中的细菌门数量分别为28、28、23、28、26、26。CK60土壤中主要优势菌门为变形菌门(Proteobacteria, 28.22%)、放线菌门(Actinobacteria, 21.97%)、酸杆菌门(Acidobacteria, 14.88%)、浮霉菌门(Planctomycetes, 10.09%)。E7和E60土壤

表2 石油烃降解菌群MC和不同修复处理的土壤微生物多样性指数

Table 2 Biodiversity index of petroleum-degrading microbial flora(MC) and soils with different treatments

编号 Sample ID	有效序列 Effective sequences	OTU 数目 OTU numbers	Shannon 指数 Shannon index	ACE 指数 ACE index	Chao1 指数 Chao1 index	Simpson 指数 Simpson index
MC	94 919	278	0.45	1 683.29	830.78	0.78
CK60	64 923	6 730	7.29	11 841.83	10 075.98	0.002 2
E7	76 434	4 117	3.66	9 653.19	7 187.33	0.13
E60	67 486	3 056	3.09	7 842.22	5 597.03	0.19
CK'60	73 632	6 227	6.62	12 059.35	9 713.64	0.01
D'7	68 120	5 403	5.31	11 285.36	9 059.38	0.10
D'60	72 392	5 502	5.77	11 234.11	8 810.58	0.05

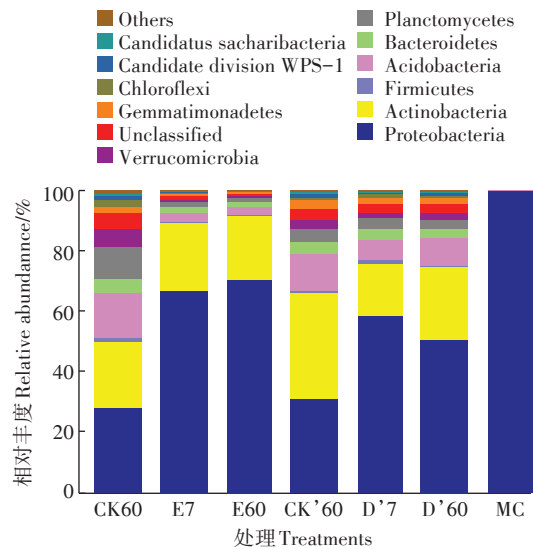


图5 MC菌群和不同处理土壤中优势细菌门水平的相对丰度
Figure 5 Relative abundance of the dominant phyla in the MC flora and different treated soils

中,变形菌门(Proteobacteria)相对丰度增加至66.35%和70.24%。放线菌门(Actinobacteria)相对丰度基本不变,酸杆菌门相对丰度降低为2.85%和2.94%。D'7和D'60土壤中变形菌门相对丰度增加为57.98%和50.22%,放线菌门相对丰度降低至17.96%和24.08%。

降解菌群MC中变形菌门(Proteobacteria)相对丰度为99.75%。在两种湿度条件下向土壤中接种MC 7 d时,土壤中变形菌门相对丰度明显增加(图5),说明在不同湿度下接种的降解菌群可在土壤中快速生长,并在较长时间内(60 d)仍然保持存活状态。

2.3.2.2 属水平微生物群落组成结构分析

图6为MC菌群和土壤中前20种优势菌属的相对丰度,其余菌属相对丰度合并为Others。降解菌群MC主要由不动杆菌属(*Acinetobacter*, 87.32%)和假单胞菌属(*Pseudomonas*, 12.00%)组成。CK60土壤中的

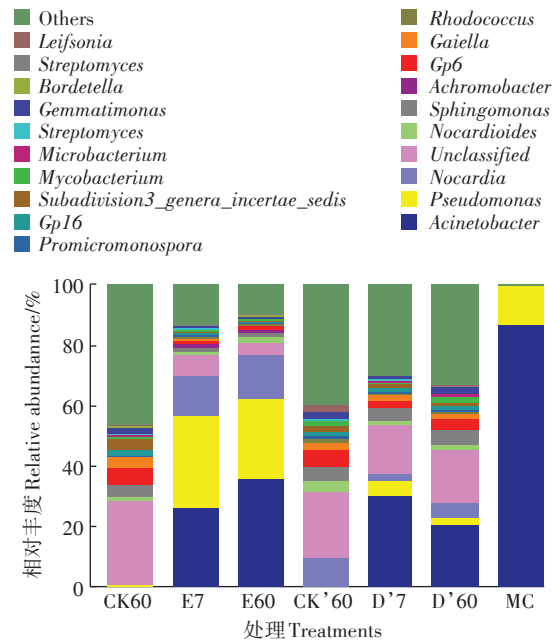


图6 MC菌群和不同处理土壤中优势细菌属水平的相对丰度
Figure 6 Relative abundance of the most abundant genera in the MC flora and soils with different treatments

优势菌属包括Gp6(5.49%)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 4.18%)、*Gaiella*(3.44%)和芽单胞菌属(*Gemmatimonas*, 2.32%)。

在自然湿度(5.4%)条件下接种MC菌群修复7 d时,假单胞菌属(*Pseudomonas*, 30.87%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 25.86%)和诺卡氏菌属(*Nocardia*, 13.27%)成为土壤中的优势菌属。修复60 d后,这3种菌属仍为优势菌。其中,不动杆菌属(*Acinetobacter*)相对丰度增加至35.74%,假单胞菌属(*Pseudomonas*)和诺卡氏菌属(*Nocardia*)相对丰度基本保持不变。

在土壤湿度为15.0%条件下接种MC菌群修复7 d时,不动杆菌属(*Acinetobacter*, 30.25%)和假单胞菌属(*Pseudomonas*, 5.03%)成为优势菌属。修复60 d

时,不动杆菌属(*Acinetobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)仍为土壤中的优势菌属,但与修复7 d时相比,相对丰度降低。

降解菌群MC主要由不动杆菌属(*Acinetobacter*, 87.32%)和假单胞菌属(*Pseudomonas*, 12.00%)组成。在自然湿度和15.0%湿度条件下接种石油烃降解菌群修复7 d,不动杆菌属和假单胞菌属成为土壤中的优势菌属。说明接种的降解菌可在土壤中迅速生长,且其生长不受土壤湿度的影响。假单胞菌属在自然湿度土壤中的相对丰度较大,说明假单胞菌属适宜在湿度较低的土壤中生长。

3 结论

(1)从陕北延长某地区石油污染黄土壤中筛选出的石油烃降解菌门主要为变形菌门(*Proteobacteria*, 99.75%),主要菌属为不动杆菌属(*Acinetobacter*, 87.32%)和假单胞菌属(*Pseudomonas*, 12.00%)。

(2)自然湿度条件下(土壤湿度为5.4%)降解菌群接种量为 10^8 cfu·g⁻¹, 15.0%湿度条件下降解菌接种量为 10^7 cfu·g⁻¹时,修复60 d的土壤中石油烃去除率分别为10.61%和18.67%,对总石油烃的去除率高于未接种降解菌的控制组(石油烃去除率为5.32%和9.19%),15.0%湿度条件下对石油烃的去除效果好于自然湿度条件下的生物强化修复处理。

(3)不同湿度条件下接种7 d时,降解菌在土壤中生长并成为优势菌。自然湿度条件有利于假单胞菌属(*Pseudomonas*)的生长。接种60 d时,降解菌在土壤中仍然大量存活。接种降解菌群使土壤微生物多样性降低,在15.0%湿度条件下接种有利于维持土壤微生物多样性不发生明显变化。

参考文献:

- [1] Schaefer M, Juliane F. The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2007, 36(1):53-62.
- [2] 屠明明,王秋玉.石油污染土壤的生物刺激和生物强化修复[J].中国生物工程杂志,2009,29(8):129-134.
TU Ming-ming, WANG Qiu-yu. Biostimulation and bioaugmentation repair of oil contaminated soil[J]. *China Biotechnology*, 2009, 29(8):129-134.
- [3] 王国锋,王金成,井明博.黄土高原地区土壤石油污染状况及生物修复技术研究进展[J].安徽农业科学,2017,45(32):65-70.
WANG Guo-feng, WANG Jin-cheng, JING Ming-bo. Research progress on petroleum contaminated soil and bioremediation technology in the loess plateau[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2017, 45(32):65-70.
- [4] Ebadi A, Sima N A K, Olamaee M, et al. Remediation of saline soils contaminated with crude oil using the halophyte *Salicornia persica* in conjunction with hydrocarbon-degrading bacteria[J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 219:260-268.
- [5] Zeneli A, Kastanaki E, Simantiraki F, et al. Monitoring the biodegradation of TPH and PAHs in refinery solid waste by biostimulation and bioaugmentation[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2019, 7(3):1-7.
- [6] Wu M L, Wu J L, Zhang X H, et al. Effect of bioaugmentation and biostimulation on hydrocarbon degradation and microbial community composition in petroleum-contaminated loessal soil[J]. *Chemosphere*, 2019, 237:1-8.
- [7] Liu B Q, Ju M T, Liu J P, et al. Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 106(1/2):301-307.
- [8] 张恒,吴鹏飞,成娟丽,等.陕北地区高效石油降解菌的筛选及其对油污土壤的修复研究[J].延安大学学报(自然科学版),2018,37(3):86-91.
ZHANG Heng, WU Peng-fei, CHENG Juan-li, et al. The screening of efficient oil degradable bacteria in north of Shaanxi Province and the study of the restoration of oil pollution soil[J]. *Journal of Yan'an University(Natural Science Edition)*, 2018, 37(3):86-91.
- [9] 宜慧,常波,杨玲引,等.高效石油烃降解菌的筛选及其对原油污染土壤的修复[J].化工环保,2018,38(4):461-465.
YI Hui, CHANG Bo, YANG Ling-yin, et al. Screening of high-efficiency petroleum hydrocarbon degrading strains and remediation of crude oil contaminated soil[J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2018, 38(4):461-465.
- [10] 王丽萍,李丹,许锐伟,等.专性菌系对石油烃污染土壤的修复性能[J].中国环境科学,2018,38(4):1417-1423.
WANG Li-ping, LI Dan, XU Rui-wei, et al. Remediation performance of constructed specific bacteria on petroleum hydrocarbon contaminated soil[J]. *China Environmental Science*, 2018, 38(4):1417-1423.
- [11] 韩博.石油烃降解菌 *Acinetobacter venetianus* WB1 与 *Pseudomonas aeruginosa* WB2 的降解性能及最适降解条件的研究[D].天津:天津大学,2016.
HAN Bo. Study on degradation performance and optimum conditions of petroleum hydrocarbon degrading bacteria *Acinetobacter venetianus* WB1 and *Pseudomonas aeruginosa* WB2[D]. Tianjin: Tianjin University, 2016.
- [12] Innemanová P, Filipová A, Michalíková K, et al. Bioaugmentation of PAH-contaminated soils: A novel procedure for introduction of bacterial degraders into contaminated soil[J]. *Ecological Engineering*, 2018, 118:93-96.
- [13] 李贞景,武淑芬,杨鑫,等.石油降解菌群的构建及室内修复石油污染土壤的研究[J].天津科技大学学报,2016,31(1):22-26,45.
LI Zhen-jing, WU Shu-fen, YANG Xin, et al. Construction of petroleum degradation bacterium and remediation of contaminated soil in laboratory[J]. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*,

- 2016, 31(1):22-26, 45.
- [14] 黄磊, 赵婷婷, 贺赞, 等. 两株绿脓杆菌对石油污染土壤的修复作用[J]. 生物工程学报, 2017, 33(6):957-967.
- HUANG Lei, ZHAO Ting-ting, HE Yun, et al. Bioremediation of oil-contaminated field by two *Pseudomonas aeruginosa* strains[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(6):957-967.
- [15] Bidja Abena M T, Li T, Shah M N, et al. Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation[J]. *Chemosphere*, 2019, 234: 864-874.
- [16] 宋雪英, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 石油污染土壤生物修复中外源微生物的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(7):1168-1173.
- SONG Xue-ying, SONG Yu-fang, SUN Tie-heng, et al. Limited effect of introduced microbial inoculants in the bioremediation of petroleum-contaminated soils[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(7):1168-1173.
- [17] 赵硕伟, 沈嘉澍, 沈标. 复合菌群的构建及其对石油污染土壤修复的研究[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(8):1567-1572.
- ZHAO Shuo-wei, SHEN Jia-shu, SHEN Biao. Construction of multiple bacterial consortium and its application in bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(8):1567-1572.
- [18] Pacwa-Płociniczak M, Czapla J, Płociniczak T, et al. The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 169:615-622.
- [19] 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.
- [20] 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 and Biodegradation*, 2016, 107:158-164.
- [21] 祁燕云, 吴蔓莉, 祝长成, 等. 基于高通量测序分析的生物修复石油污染土壤菌群结构变化[J]. 环境科学, 2019, 40(2):869-875.
- QI Yan-yun, WU Man-li, ZHU Chang-cheng, et al. Microbial community structure shift during bioremediation of petroleum contaminated soil using high throughput sequencing[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(2):869-875.
- [22] Acer Ö, Güven K, Bekler F M, et al. Isolation and characterization of long-chain alkane-degrading *Acinetobacter* sp. BT1A from oil-contaminated soil in Diyarbakir, in the southeast of Turkey[J]. *Bioremediation Journal*, 2016, 20(1):80-87.
- [23] Zhang Q Z, Wang D C, Li M M, et al. Isolation and characterization of diesel degrading bacteria, *Sphingomonas* sp. and *Acinetobacter junii* from petroleum contaminated soil[J]. *Frontiers of Earth Science*, 2014, 8(1):58-63.
- [24] 武海杰, 张秀霞, 白雪晶, 等. 用于石油污染土壤降解的高效降解菌的筛选及其降解条件优化[J]. 环境工程学报, 2014, 8(3):1229-1234.
- WU Hai-jie, ZHANG Xiu-xia, BAI Xue-jing, et al. Isolation and optimization degradation conditions of highly efficient degrading bacteria for oil-contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(3):1229-1234.
- [25] Pacwa-Płociniczak M, Płaza G A, Poliwoda A, et al. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(15):9385-9395.
- [26] 任随周, 郭俊, 邓穗儿, 等. 石油降解菌的分离鉴定及石油污染土壤的细菌多样性[J]. 生态学报, 2005, 25(12):3314-3322.
- REN Sui-zhou, GUO Jun, DENG Sui-er, et al. Isolation and identification of petroleum degrading strains and the diversity of microbes in petroleum-contaminated soils[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(12):3314-3322.
- [27] 曹冠楠, 陈鸿汉, 刘菲, 等. 油污土中降解柴油细菌的分离鉴定及降解能力研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(1):200-204.
- CAO Guan-nan, CHEN Hong-han, LIU Fei, et al. Isolation and identification of degrading bacteria in diesel contaminated soil and study on their degradation capability[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(1):200-204.
- [28] 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):187-192.
- YANG Qian, WU Man-li, CAO Bi-xiao, 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.
- [29] 孙馨宇, 张泉, 张鹏, 等. 温度、水分及有机物料对苹果园土壤有机碳转化和微生物群落多样性的影响[J]. 土壤通报, 2018, 49(4):72-83.
- SUN Xin-yu, ZHANG Xiao, ZHANG Peng, et al. Effects of temperature, moisture and organic material on organic carbon transformation and microbial community diversity of soil in apple orchard[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2018, 49(4):822-833.
- [30] Schjønning P, Thomsen I K, Petersen S O, et al. Relating soil microbial activity to water content and tillage-induced differences in soil structure[J]. *Geoderma*, 2011, 163(3/4):256-264.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] Wu M L, Ye X Q, Chen K L, et al. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 223:657-664.