



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150040

石油降解菌群的构建及室内修复石油污染土壤的研究

李贞景, 武淑芬, 杨鑫, 李鹏程, 王昌禄

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 为生物修复石油污染的土壤, 采用排列组合法以石油降解率为指标筛选出高效石油降解菌群, 制备游离及固定化菌剂, 室内模拟石油污染的土壤并进行生物修复实验, 采用气相-质谱联用(GC-MS)技术分析降解前后石油成分的变化. 结果表明: 摇瓶培养条件下, 由菌株 10-1、10-2 和 10-3 的种子浓缩液按体积比 1:1:1 的比例组成的 10[#] 菌群石油降解率最高(73.34%), 且降解后除 C18 组分外, 其他烷烃成分未被检出; 在 10% 的投菌量下, 60 d 后, 10[#] 菌群固定化菌剂组对室内石油污染土壤的石油降解率(32.5%)高于游离菌剂组(24.9%), 且降解后其短链烷烃含量(11.42%)也高于游离菌剂组(7.91%)和空白组(5.12%). 本文研究结果为 10[#] 菌群应用于野外石油污染土壤的修复奠定了基础.

关键词: 微生物; 石油; 降解率; 固定化菌剂; 生物修复

中图分类号: Q939.96

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2016)01-0022-05

Construction of Petroleum Degradation Bacterium and Remediation of Contaminated Soil in Laboratory

LI Zhenjing, WU Shufen, YANG Xin, LI Pengcheng, WANG Changlu

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Efficient oil biodegradation bacteria have been screened out using permutation and combination methods. Then preparations for free and immobilized agents, bioremediation tests of simulated petroleum-contaminated soils in lab, and GC-MS analysis of petroleum components before and after degradation were carried out, respectively. The results showed that combination 10[#], mixed with a volume ratio of seed concentrate of 10-1 to 10-2 and 10-3 as 1:1:1 in shake-flask cultures, had the highest degradation rate of 73.34% and no paraffin component was detection except for C18. At a low dosage(10%) indoors for 60 d, immobilized agents of 10[#] showed a higher degradation rate(32.5%) than that of the free agents(24.9%), and its short-paraffin content(11.42%) was also higher than that of both the free agents(7.91%) and the control group(5.12%). This study provides foundations for the application of immobilized 10[#] agents to petroleum-contaminated soils.

Key words: microorganisms; petroleum; degradation rate; encapsulated agent; bioremediation

石油在开采、运输及加工过程中难免会发生泄漏^[1], 从而对环境和人体健康造成严重威胁, 因此, 亟需提高石油污染的生态修复技术. 从长期受石油污染的土壤中筛选出具有高效降解石油的微生物, 越来越受到科研工作者的关注^[2-3]. 该类微生物能以石油或石油衍生物为自身新陈代谢所需的碳源, 并最终转化为无毒无害的 CO₂ 和 H₂O. 目前, 单一菌株进行石

油污染环境修复难以达到理想的效果, 采用投加高效石油降解菌群的方式, 修复效果较为理想^[4]. 固定化微生物技术是利用物理、化学的方法将游离态微生物限制在某一特定空间范围内, 以保留菌剂原有的高催化活性^[5]. 为筛选得到高效降解石油的微生物菌群并探究其降解石油的特性, 本文通过排列组合方式筛选出高效降解石油的微生物菌群, 将其制备成游离态和

收稿日期: 2015-03-30; 修回日期: 2015-07-21

基金项目: 天津市科技兴海资助项目(KJXH2011-06)

作者简介: 李贞景(1980—), 男, 河南南阳人, 助理研究员; 通信作者: 王昌禄, 教授, clw123@tust.edu.cn.

固定化菌剂,通过降解率的测定考察两种菌剂的修复效果,并采用气相-质谱联用(GC-MS)分析降解前后的石油成分的变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

石油:天津市大港油田惠赠。

石油降解菌:从大港油田长期受石油污染的土壤中筛选出 4 株具有石油降解能力的菌株(10-1、10-2、10-3 和 10-4),实验室保存。

土壤样品采集及前处理:于天津塘沽北塘口未受石油污染的滩涂,采用梅花状取样法采取距土壤表层 2~10 cm 的土壤,实验室内混匀,平铺摊开,自然风干,去除石块、残根等杂物,研碎,过 20 目筛,储藏备用^[6]。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制

LB 液体培养基^[7]:该培养基用于菌株的增殖活化培养,加 2% 琼脂粉可制成 LB 固体培养基,用于菌株的纯化或斜面保藏。

无机盐培养基^[8]: KH_2PO_4 3.0 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8.5 g, NH_4Cl 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 g, NaCl 0.5 g, 微量元素(CuSO_4 0.4 mg, KI 1.0 mg, MnSO_4 4.0 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.0 mg, H_3BO_3 5.0 mg, $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.0 mg), 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

石油降解培养基:无机盐培养基中分别加入 10.0 g 石油、6.0 mL 吐温 80 和 0.1 g 酵母粉,121 °C 灭菌 20 min。

1.2.2 菌落及个体形态观察

将测试菌株在 LB 固体培养基上划线分离,30 °C 条件下静置培养 48 h,观察菌落形态特征。

取斜面保藏的菌株,30 °C 静置活化 14 h,用蒸馏水制备成菌悬液;取 0.5 mL 于 1.5 mL 离心管中,加入 0.5 mL 戊二醛(2.5%)溶液静置 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 0.2 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤 1 次,12 000 r/min 离心 10 min;沉淀依次用 30%、50%、70% 和 90% 的乙醇梯度洗涤,再用无水乙醇洗涤 2 次。将固定脱水后的菌体均匀涂布在盖玻片上,自然晾干后进行真空镀膜,扫描电镜下观察菌株个体形态特征。

1.2.3 菌株生长曲线的测定^[9]

挑取 1 环菌株接种于 100 mL LB 液体培养基

中,在 30 °C、180 r/min 条件下培养,每隔 2 h 取样,以无菌同批次培养液作参比,利用紫外分光光度计测定 A_{600} 值,绘制生长曲线。

1.2.4 菌株摇瓶培养降解实验

取斜面保藏的菌株,30 °C 静置活化 14 h,用蒸馏水制备成菌悬液。装有 100 mL 石油降解培养基的 250 mL 三角瓶灭菌后接入 3.0 mL 菌悬液,30 °C、180 r/min 振荡培养 7 d。

1.2.5 菌剂的制备及活菌数的测定

游离态菌剂的制备:将种子液按 1% 接种量接种于 1 000 mL 石油降解培养基中,30 °C、180 r/min 条件下振荡培养 72 h,8 000 r/min、4 °C 离心 10 min,收集菌体。用无机盐培养基洗涤 2 次,重新悬浮菌体制成浓缩菌液。将浓缩菌液和无菌水按 1:9 的比例混匀制成游离态菌剂,4 °C 冰箱保藏备用。

固定化菌剂的制备:将菌株 10-1、10-2 和 10-3 的种子浓缩液按体积比 1:1:1 的比例混合制成浓缩菌液,海藻酸钠、玉米淀粉和浓缩菌液按 1:1:5 的比例混合均匀,用 5 mL 移液枪逐滴滴加到 0.1 mol/L 的无菌 CaCl_2 溶液中,室温静置 1 h,3 500 r/min 离心 10 min,洗涤后 4 °C 保藏备用。

菌剂有效活菌数的测定:取固定化菌剂 1.0 g 或游离态菌剂 1 mL 于 9 mL 无菌的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)中,涡旋,混合均匀(固体菌剂颗粒需溶解完全),梯度稀释,选择适宜浓度梯度在 LB 固体培养基上均匀涂布,30 °C 静置培养 48 h,统计菌落数,实验平行 3 次。

1.2.6 石油污染土壤室内修复模拟实验

石油脱水处理:取一定量的石油充分溶解于石油醚(30~60 °C)中,用铺有足量无水 Na_2SO_4 的漏斗缓慢过滤,收集滤出液,摇匀并分装到若干已称质量(m_1)的 250 mL 三角瓶中,65 °C 水浴加热去除石油醚后再称质量(m_2), m_2 与 m_1 的差值即为石油的质量。

石油污染土壤样品的制备:称取一定量的石油充分溶解于石油醚(30~60 °C)后,与已称质量的土壤样品混合均匀,置通风口处 24 h,使石油醚完全挥发。

污染土壤室内修复实验:将石油污染土壤样品分装到直径为 15 cm 的花盆中,每个花盆盛土 1 kg。实验分为固定化菌剂组(接种量 10%)、游离态菌剂组(接种量 10%)和空白对照组。实验期间,各组样品每天浇水使土壤含水率维持在 15%~20%,每 2 d 翻耕 1 次,以增加土壤透气。

1.2.7 石油降解率的测定

以二氯甲烷萃取石油,绘制石油-二氯甲烷标准

曲线,在 10~110 mg/L 石油质量浓度范围内,线性方程 $y = 0.0151x + 0.0417$, 相关系数 $R^2 = 0.9994$, 具有良好的相关性. 采用紫外分光光度法测定石油降解率^[10-11].

1.2.8 石油降解前后组分分析

GC-MS 检测条件^[12]: 进样口温度 320 ℃, 进样量 1 μL, 分流比 20, 载气 He 99.999%; 程序升温, 初始温度 80 ℃, 以 8 ℃/min 升到 320 ℃, 保留时间 10 min; 柱流量 1 mL/min, 色谱柱为 VF-5 ms (30 m × 0.25 mm × 0.15 μm), 4 000 MS, 质谱扫描范围 (m/z) 为 50~500, 电子轰击 (EI) 离子源, 质量分析器为离子阱, 电离能量 70 eV, 传输线温度 280 ℃, 离子阱温度 220 ℃, 延迟时间 3 min. 采用选择离子扫描模式进行物质分析, 检索谱库: NIST05.

2 结果与讨论

2.1 菌落形态特征

扫描电镜下各菌株的个体形态特征如图 1 所示. 表 1 描述了各菌株的菌落和个体形态特征, 从中可以看出 4 株石油降解菌的菌落形态各异.

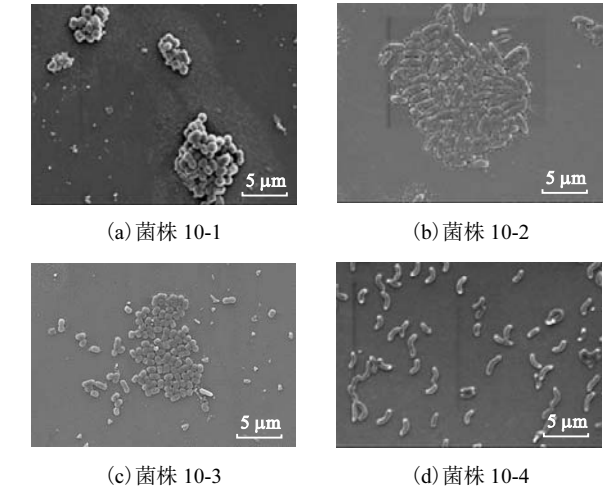


图 1 菌株电镜扫描图

Fig. 1 Strains under scanning electron microscope

表 1 各菌株菌落及个体形态特征

Tab. 1 Basic morphological characteristics of the strains

菌株	菌落形态	个体形态
10-1	圆形扁平, 边缘完整, 灰白色有光泽, 湿润有气味	短杆状
10-2	圆形隆起, 边缘整齐, 橙黄色有金属光泽, 湿润有气味	梭状
10-3	点状隆起, 边缘整齐, 白色稍有光泽, 湿润有气味	短杆状
10-4	圆形隆起, 边缘整齐, 淡黄色有光泽, 湿润无气味	月牙状

2.2 菌株生长曲线

4 株菌株的生长曲线如图 2 所示. 由图 2 可以看出, 在对数生长期 (2~14 h), 菌株均能快速生长繁殖. 因此, 种子液的最佳培养时间约为 14 h.

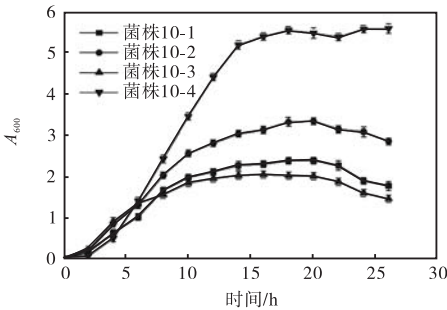


图 2 菌株在 LB 培养基中的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of the strains in LB medium

2.3 高效石油降解菌群的构建

2.3.1 菌株对石油降解性的测定

将 4 株石油降解菌株进行排列组合, 共得出 15 个实验组. 每组另设 2 个平行, 采用分光光度法测定石油的降解率, 结果如图 3 所示.

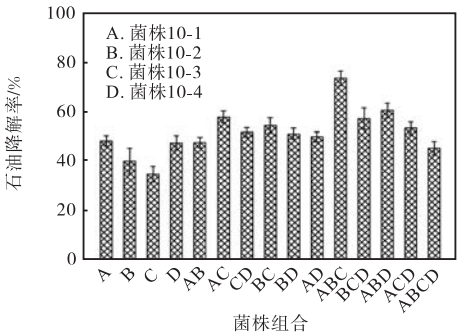


图 3 菌株及组合菌株石油降解率

Fig. 3 Degradation rates of oil with single or mixed strains

从图 3 可以看出: 单菌株中, 菌株 10-1 的降解率最高 (48.16%); 混合菌群中, 实验组 ABC 降解率最高, 达到了 73.34%, 远远高于各单菌株石油降解率, 菌株间表现出良好的协同作用, 致使石油组分得到大部分的降解. 将由 10-1、10-2 和 10-3 菌株组合的混合菌群命名为 10[#].

生理生化特性研究表明: 10-1 菌株为革兰氏阴性短杆菌, 10-2 菌株为革兰氏阳性梭状菌, 10-3 菌株为革兰氏阴性短杆菌; 且在该菌群中起主要降解作用的 10-1 菌株经 16S rDNA 鉴定为大肠埃希菌属^[13]. 虽然已有利用人工构建的大肠埃希菌属基因工程菌降解有机物的报道^[14], 但利用自然存在的大肠埃希菌属对石油降解的报道还未见到.

2.3.2 固定化菌剂的制备及其有效活菌数的测定

按照 1.2.5 方法, 分别制备游离态及固定化石油降解菌剂, 固定化菌剂形态如图 4 所示. 由图 4 可以看出, 菌剂形态呈凝胶球状颗粒, 乳白色, 大小均一. 直径约为 0.5 cm, 每颗质量约为 0.05 g.



图 4 固定化石油降解菌剂

Fig. 4 Immobilization of oil degradation bacteria

分别测定游离态和固定化菌剂的初始有效活菌数, 结果如图 5 所示. 由图 5 可看出, 两种菌剂初始有效活菌数目均在 10^7 以上, 且相差不大.

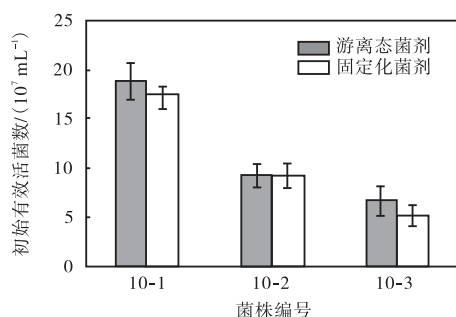


图 5 菌剂有效活菌数

Fig. 5 The number of efficient live-bacteria

2.4 石油污染土壤的生物修复

分别投加固定化菌剂和游离态菌剂对石油污染土壤进行生物修复, 采用紫外分光光度法测定各实验组土壤的石油降解率, 结果如图 6 所示.

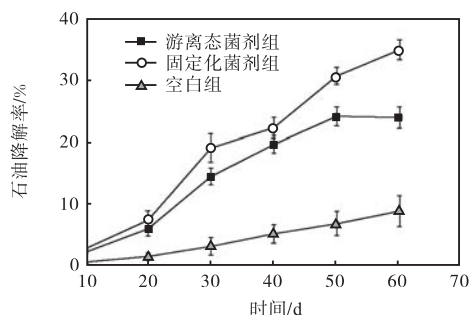


图 6 土壤中石油降解率受不同类型菌剂的影响

Fig. 6 Effect of different microbial agents on the degradation rate of oil in soil

由图 6 可以看出, 在 60 d 的生物修复过程中, 与空白组相比, 固定化菌剂组中的石油降解率达到了 32.5%, 高于游离态菌剂组的 24.9%, 而空白组中的石油降解率仅为 8.8%. 因此, 在修复石油污染土壤过程中, 固定化菌剂较游离态菌剂的修复效果更好.

微生物对石油污染的生物修复效果除了与微生物的种群、烃类状况 (物理状态、浓度、化学组成) 密切相关外, 还与温度、pH、氧气、营养物质、盐度等外界环境有关^[15-16], 这可能是造成游离态菌剂和固定化菌剂对石油污染土壤中石油的降解效果远低于实验室摇瓶培养时对石油的降解效果的主要原因.

2.5 石油降解前后组分的变化

分别利用 GC-MS 对高效混合菌群 10[#] 降解石油前后组分进行分析, 结果如图 7 和图 8 所示.

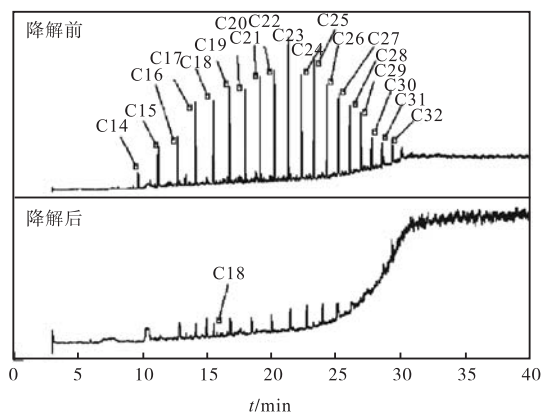


图 7 摇瓶实验中混合菌群 10[#] 降解石油前后气相-质谱图

Fig. 7 The gas chromatogram of oil degradation bacterium 10[#] with degradation of crude oil in flasks

图 7 为摇瓶培养液中石油组分的气相-质谱图. 从图 7 可以看出: 降解前的石油组分主要有 C14 ~ C32 共 19 种正构烷烃; 降解后石油各组分明显下降. 说明该 10[#] 降解菌群具有良好的降解性能, 在培养基中对石油的降解效果较为明显.

图 8 为室内模拟石油污染土壤修复 60 d 后, 各实验组土壤中石油残余组分的气相-质谱图. 从图 8 可以看出: 对照组中 C14 ~ C20 石油烃相对含量为 5.12%, C21 ~ C32 石油烃的相对含量达到了 94.88%; 固定化菌剂组中 C14 ~ C20 正构烷烃的相对含量为 11.42%, C21 ~ C32 烷烃的相对含量为 88.58%, 其中 C14、C15、C20、C21、C22 和 C32 未检出; 游离态菌剂组中 C14 ~ C20 正构烷烃的相对含量为 7.91%, C21 ~ C32 烷烃的相对含量为 92.09%, 其中 C15 未检出.

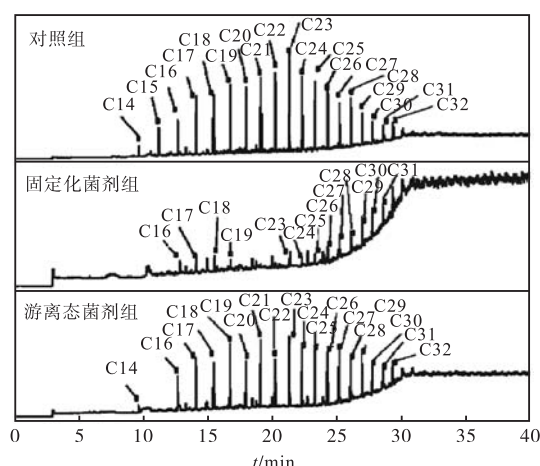


图8 土壤中混合菌群 $10^{\#}$ 降解石油前后气相-质谱图
Fig. 8 The gas chromatogram of Oil degradation bacterium $10^{\#}$ with degradation of crude oil in soil

石油烃类化合物可被微生物降解为低相对分子质量的化合物并能完全分解成二氧化碳和水等无机物。石油组分的降解性与石油组分种类和相对分子质量的大小有很大相关性^[17]。石油组分中的饱和烃部分,最易降解的是直链烷烃,特别是在C10~C22范围内的烷烃最易被微生物降解,同时毒性也最小^[18],而超过C22的烃水溶性极低,它们在生理温度下的固体状态使微生物转化非常缓慢^[19]。

综合以上分析可知, $10^{\#}$ 石油降解菌群对石油烃污染物具有较宽的降解谱,在石油污染土壤的修复过程中,与接种游离态菌剂相比,接种固定化菌剂更能发挥菌群对石油烃的降解性能。

3 结 语

通过排列组合方式构建出15个实验组,优选出1组由菌株10-1、10-2、10-3构成的高效石油降解菌群 $10^{\#}$,利用紫外分光光度法测得,在液体培养基中其对石油的降解率为73.34%,比最高单菌株10-1对石油的降解率48.16%,提高了25.18%。

室内模拟石油污染土壤生物修复结果显示,一次性投加固定化菌剂和游离态菌剂对含油土壤中的石油降解率分别达到了32.5%和24.9%,与游离态菌剂相比, $10^{\#}$ 菌群固定化菌剂对石油的降解性能更好,表明包埋处理后,有利于石油降解率的提高。

GC-MS分析结果表明,该 $10^{\#}$ 菌群对石油烃具有较宽的降解谱,具有一定的环境修复潜力,其对环境是否造成二次污染等安全性问题,尚需进一步实验

研究。

参考文献:

- [1] Deng M C, Li J, Liang F R, et al. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 83 (1): 79-86.
- [2] Tang J C, Wang R G, Niu X W, et al. Characterisation of the rhizoremediation of petroleum-contaminated soil: Effect of different influencing factors [J]. *Biogeosciences*, 2010, 7 (12): 3961-3969.
- [3] Ebrahimipour G, Gilavand F, Karkhane M, et al. Bioemulsification activity assessment of an indigenous strain of halotolerant *Planococcus* and partial characterization of produced biosurfactants [J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2014, 11 (5): 1379-1386.
- [4] 段春燕,王金成,井明博,等. 黄土高原长庆油田高效石油降解菌群的构建 [J]. *陇东学院学报*, 2013, 24 (5): 62-65.
- [5] 张秀霞,耿春香,房苗苗,等. 固定化微生物应用于生物修复石油污染土壤 [J]. *石油学报:石油加工*, 2008, 24 (4): 409-414.
- [6] 王旭辉,晁群芳,徐鑫,等. 石油污染土壤的生物修复室内模拟实验研究 [J]. *环境工程学报*, 2012 (5): 1663-1668.
- [7] 许光辉. 土壤微生物分析方法手册 [M]. 北京:中国农业出版社, 1986.
- [8] Karamalidis A K, Evangelou A C, Karabika E, et al. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonasaeruginosa* strain Spet [J]. *Biore-source Technology*, 2010, 101 (16): 6545-6552.
- [9] Hassanshahian M, Tebyanian H, Cappello S. Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64 (7): 1386-1391.
- [10] Khaitan S. Remediation of sites contaminated by oil refinery operations [J]. *Environmental Progress*, 2006, 25 (1): 20-31.
- [11] 程建安. 紫外分光法测定土壤中的石油污染物 [D]. 济南:山东大学, 2012.

(下转第45页)