

高效石油降解菌的筛选及其降解特性

杨雪莲¹, 李凤梅², 刘婉婷², 李 刚²

(1. 沈阳大学环境工程重点实验室, 辽宁 沈阳 110044; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 从辽河油田和大庆油田石油污染土壤中分离筛选出两株高效石油降解菌 L₁₀ 和 D₆ 菌株, 经形态观察、生理生化反应, 确定此两株菌分别为芽孢杆菌属中的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。采用室内盆栽培养方法, 研究了石油烃的浓度和性质对两菌株降解活性的影响。结果发现, 土壤中石油烃的含量和处理时间均影响微生物的降解效果, 在处理 10 d 时, 石油烃的去除率随着污染强度的增加而降低; 随着处理时间的延长, 微生物适应环境后, 在石油烃含量为 0.5%~2.0% 时, 石油烃的去除率随着浓度的增加而升高, 在石油烃含量为 2.0%~10.0% 时, 石油烃的去除率随着浓度的增加而降低; 石油烃的性质影响菌株的生物活性, L₁₀ 和 D₆ 两菌株对稀油的去除效果明显高于对稠油的去除效果, 各组分的去除率依次为烷烃>芳烃>胶质沥青质, 两菌株对不同性质的石油烃中的烷烃、芳烃和胶质沥青质的去除率不同。

关键词: 石油降解菌; 筛选; 降解特性; 去除率

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)01-0230-04

Isolation of Petroleum-degrading Strains and Their Degrading Characteristics

YANG Xue-lian¹, LI Feng-mei², LIU Wan-ting², LI Gang²

(1. Shenyang Key Laboratory of Environmental Engineering, Shenyang University, Shenyang 110044, China; 2. Institute of Applied Ecology, CAS, Shenyang 110016, China)

Abstract: Petroleum-degrading strains L₁₀ and D₆ were obtained by selective enrichment culture from eight contaminated soil samples collected from Liaohe and Daqing Oil Fields. The tests in shaking flasks showed that they could degrade petroleum hydrocarbon well and the removal rates could reach 39.5% and 47.9% at 30 d. According to morphologic observation, physiological and biochemical characteristics, they were identified as *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* respectively. Their removal abilities to petroleum were affected by petroleum's concentrations and properties. At 10 d, the removal rates reduced with increasing concentrations of petroleum. With the treatment time prolonged, the removal rates increased at concentrations 0.5%~2.0% and reduced when the concentrations were 2.0%~10.0%, implying that appropriate petroleum concentration stimulated the activities of microbes, but higher petroleum concentration restrained their activities. The degradation rates of thin-oil by L₁₀ and D₆ were higher than those of viscous-oil under the same conditions. The removal rates of aromatics, pectin and asphalt by L₁₀ and D₆ were different due to the petroleum properties. The order of removal rate for each component was alkanes>aromatics>pectin and asphalt, with the removal rates being 62.96%~78.67%, 16.76%~33.92% and 3.78%~15.22%, respectively. So, it is very important that petroleum properties and microbes characteristics are considered in bioremediation of contaminated soil.

Keywords: petroleum-degrading strains; isolation; degrading characteristics; removal rate

在我国, 油田和石油工业区内大面积土地和邻近水系受到石油烃类的严重污染。石油烃的主要化学成

分是烷烃、苯、甲苯、二甲苯和复杂芳香烃等, 有些成分有致癌、致突变、致畸的作用, 并能通过食物链在动植物及人体内富集, 被列为重点污染物^[1]。进入环境中的石油, 由于生物学的和某些非生物学(化学氧化)的机制而逐步降解。大量研究表明, 在自然界净化石油烃类污染的综合因素中, 微生物降解起着重要的作用, 目前已报道有多个种属具有分解和转化石油组分的能力^[2-8]。这些微生物广泛分布于土壤和水体中, 尤

收稿日期: 2007-03-22

基金项目: 沈阳环境工程重点实验室资助项目(2004010); 国家重点基础研究发展计划项目(973)(2004CB418501)

作者简介: 杨雪莲(1962—), 女, 辽宁沈阳人, 副教授, 主要从事环境微生物和石油污染土壤治理研究。

E-mail: yangxuelian62@163.com

通讯作者: 李凤梅 E-mail: fml@iae.ac.cn

其是受石油污染的环境中。分离筛选对石油具有降解能力的菌株,是研究微生物降解石油的机理及对污染水域或土壤进行生物修复的基础。

本文针对辽河油田和大庆油田的重污染区石油污染土壤,进行了除油细菌的分离、鉴定及其降解特性研究,为微生物在石油污染土壤治理中的应用提供菌种资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源及石油降解细菌的富集、分离和纯化

样品采自辽河油田和大庆油田不同程度石油污染土壤,土壤编号从 L1 到 L4 和 D1 到 D4,污染程度依次增大,L 代表辽河油田土样,D 代表大庆油田土样。将 10 g 土样加入 100 mL 无机盐 (MM) 培养基中,30 ℃,180 r·min⁻¹ 摇床培养 3~5 d 后,吸取 1 mL 转接至新鲜培养基中,连续富集,转接多次后,用接种环蘸取少许富集培养液,在加富培养基平板上直接划线分离^[9]。在平板上选择不同形态特征的菌落,重新转接至以石油为惟一碳源的 MM 培养基中,摇床培养以验证是否具有石油降解能力,培养液变浑后,重新分离、纯化。

无机盐 (MM) 培养基 (g·L⁻¹):MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCl₂ 0.02, KH₂PO₄ 1.0, NH₄NO₃ 1.0, FeCl₃ 0.05, 原油 (大庆油田) 10, 用 4 mol·L⁻¹ NaOH 调节 pH 至 7。

加富 MM 培养基: 在 MM 培养基中分别加 0.1% 酵母膏和 0.1% 蛋白胨, 用于菌株的平板培养和斜面保存。

1.2 石油降解菌的筛选

将纯化后的菌株在斜面培养基上培养,用无菌水制成菌悬液,取 1 mL 接种至装有 50 mL 无机盐 (MM) 培养基的 150 mL 三角瓶中,在旋转摇床上培养,转速为 180 r·min⁻¹,温度 30 ℃。培养 30 d 后,按文献^[10]测定培养液中的原油残留量,每一处理重复 3 次,对照为不接菌的无机盐 (MM) 培养基,计算平均降解率。

表 2 分离细菌对石油的去除率

Table 2 The removal rates of petroleum by the isolates

菌株	土壤编号	平均去除率/%	菌株	土壤编号	平均去除率/%
L ₂	L1	23.4h	D ₁	D4	33.5c
L ₅	L1	20.2j	D ₃	D3	27.3e
L ₆	D2	25.8g	D ₆	D4	47.9a
L ₁₀	L4	39.5b	D ₁₂	L3	31.6d
L ₁₃	L3	26.9f	D ₂₁	L1	22.5i

注:表中不同小写字母表示在 P<0.05 时,各菌株之间降解率差异显著

1.3 石油降解菌的鉴定

微生物菌株形态观察和生理生化反应参照文献^[11,12]进行。

1.4 降解菌株除油能力实验

1.4.1 不同含油量对除油效果的影响

实验所用土壤,取自辽河油田未污染土壤,土壤风干后,研磨,过孔径为 40 目筛。将石油(大庆油田)与土壤逐步混匀,土壤中石油烃含量 (质量比) 分别为 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、6.0%、8.0% 和 10.0%,菌的接种量为 1.0%,以未接菌的土壤作为对照。实验在花盆中进行,每盆装土 500 g,通过定时称重土壤加水,维持含水率为 25%。室温下 (20~25 ℃) 下培养,在 10、20、30 d 后分别采样,用红外分光测油仪测定土壤中残留的石油烃含量,所有处理重复 3 次。菌株对土壤中石油烃的去除率 = (CK 含油率 - 不同处理含油率) / CK 含油率 × 100%^[13]。

1.4.2 石油烃的性质对除油效果的影响

土壤处理方法及含油量测定同 1.4.1, 土壤中石油烃分别为辽河油田 (稠油) 和大庆油田 (稀油) 原油,原油性质见表 1。土壤中石油烃的含量 (质量比) 为 2.0%,菌的接种量为 1.0%,分 6 个处理,分别为处理 1 (稠油 + L₁₀)、处理 2 (稠油 + D₆)、处理 3 (稀油 + L₁₀) 和处理 4 (稀油 + D₆),同时设定只加辽河和大庆石油烃的处理作为对照,30 d 时测定各处理石油烃的去除率并进行族组分分析。

2 结果与分析

2.1 石油降解菌的降解能力比较

通过富集培养,分离得到 10 株在无机盐 (MM)

表 1 原油性质分析

Table 1 The characters of the crude oil

来源	烷烃/%	芳烃/%	胶质和沥青质/%
大庆油田	56.32	20.61	6.84
辽河油田	38.64	16.58	19.76

固体培养基中长势良好的菌株,分别命名为: L_2 、 L_5 、 L_6 、 L_{10} 、 L_{13} 、 D_1 、 D_3 、 D_6 、 D_{12} 和 D_{21} 。利用摇瓶实验对此10株菌进行进一步降解能力比较,各菌株的去除效果见表2。由表2可以看出,去除率较高的菌株 L_{10} 、 D_1 和 D_6 均分离自污染程度较重的土壤样品,30 d后此3株菌的去除率分别达到39.5%、33.5%和47.9%;去除率较低的菌株 L_2 、 L_5 和 D_{21} 分离自污染程度较轻的土壤样品,去除率仅为23.4%、20.2%和22.5%。不同去除率的降解菌在不同样品中的这种分布规律,与石油污染物对高效石油降解菌的选择性富集作用有关,污染物的浓度越高,则这种富集作用就越强,此结论与任随周^[14]等报道的结论一致。

2.2 高效石油降解菌的鉴定结果

分别采用形态学观察和生理生化实验对2株降解率较高的菌株 L_{10} 和 D_6 进行鉴定。其形态特征为:均为革兰氏染色阳性,有芽孢; L_{10} 菌体细胞大小为 $(0.7\sim 0.8)\mu\text{m} \times (2.0\sim 3.0)\mu\text{m}$,单个或短链排列,周生鞭毛,芽孢椭圆形,中生; D_6 菌体细胞大小为 $(0.5\sim 0.8)\mu\text{m} \times (1.3\sim 2.0)\mu\text{m}$,单个或短链排列,周生鞭毛,芽孢柱形,中生。生理生化反应实验结果如表3所示。

鉴定结果与《伯杰氏细菌鉴定手册》《常见细菌系统鉴定手册》比较,初步确定 L_{10} 和 D_6 菌株分别为芽孢杆菌属中的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

2.3 降解菌株在土壤中的除油能力

2.3.1 不同含油量对除油效果的影响

表3 2株石油降解菌株的生理生化特性
Table 3 Physio-chemical characteristics of the two isolates

特征	结果	特征	结果
	L_{10} D_6		L_{10} D_6
好氧生长	+	最适生长温度	25 °C~35 °C 28 °C~40 °C
厌氧生长	-	最适 pH	6.7~7.5 6.8~7.3
接触酶活性	+	生长: NaCl	
		2%	+
V-P 反应	+	5%	+
吡啶反应	-	7%	+
水解酪胺	+	利用糖产酸:	+
液化明胶	+	D-葡萄糖	+
水解淀粉	+	L-阿拉伯糖	+
硝酸盐还原	+	D-木糖	+
水解酪氨酸	-	D-甘露糖	+
葡萄糖产气实验	-	D-甘露醇	+
利用: 柠檬酸盐	+	蔗糖	+
丙酸盐	-	纤维二糖	+

注:“+”表示 $\geq 90\%$ 菌株为阳性;“-”表示 $\geq 90\%$ 菌株为阴性。

图1和图2显示了 L_{10} 和 D_6 菌株在不同污染强度和不同处理时间下,菌株对石油烃去除率遵循不同的模式。从图1和图2中可以看出,在10 d时石油烃的去除率随着石油烃浓度的增加而降低;在20 d和30 d时石油烃的去除率在石油烃的含量为0.5%~2.0%时随着含量的升高而增大,在2.0%时达到最大值,随后仍表现出随着浓度的增加去除率降低的趋势。这说明污染强度的大小对微生物降解石油烃能力有很大的影响,当石油烃的浓度过高时,就会抑制微生物降解能力;同样处理时间也影响着石油烃的去除率,在处理10 d时,0.5%浓度下微生物对石油烃的去除效果最好,而在处理20 d和30 d时,石油烃的浓度为2.0%时微生物的作用效果最好,这是因为刚刚加入的微生物因不能适应新的环境所致,污染物浓度越高,越不利于微生物的生长,从而使参加降解活动的微生物

2.3.2 石油烃的性质对除油效果的影响

相同条件下,微生物对不同种类石油烃的降解能力是不同的,研究表明原油的特性及组成影响其生物可降解性,从图3中可以看出, L_{10} 和 D_6 菌株对稀油的降解效果明显高于稠油的降解效果,总烃的降解率平均高14.12%,土壤中石油烃各组分的去除率依次为烷烃>芳烃>胶质沥青质,其中烷烃的去除率达到62.96%~78.67%,芳烃的去除率为16.76%~33.92%,

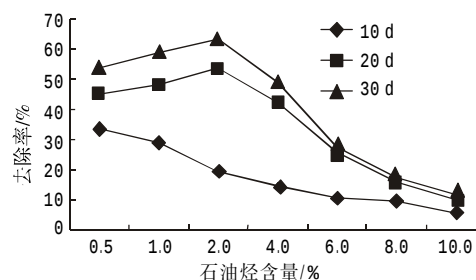


图1 石油烃浓度对 L_{10} 菌株去除率的影响
Figure 1 Effects of petroleum concentrations on its removal rates by strain L_{10}

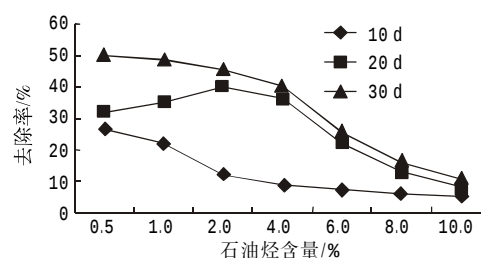


图2 石油烃浓度对 D_6 菌株去除率的影响
Figure 2 Effects of petroleum concentrations on its removal rates by strain D_6

胶质沥青质的去除率为3.78%~15.22%，这与齐永强等研究结果相同^[16]，碳数越多，降解越难进行。相同条件下，石油烃组分的比例变化影响微生物对单个烃组分的降解能力，在研究中发现，在稠油处理土壤中 D_6 菌株对芳烃和胶质沥青质的去除率均高于 L_{10} 菌株，而在稀油处理的土壤中 L_{10} 菌株对芳烃和胶质沥青质的去除率却高于 D_6 菌株的去除率，这可能是由于不同的原油，由于其烷烃、芳烃和胶质沥青质的含量以及成分的不同而导致微生物具有不同的去除率，也可能是由于不同微生物族组分的降解机制不同引起的，因此在石油污染土壤的治理中应考虑用混合微生物进行土壤修复。

3 结论

(1) 从石油污染土壤中筛选得到两株高效石油降解菌 L_{10} 和 D_6 ，经鉴定确定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

(2) 土壤中石油烃的含量和处理时间影响微生物的降解效果。在处理前期即处理 10 d 时，石油烃的去除率随着污染强度的增加而降低；随着处理时间的延长，在石油烃含量为 0.5%~2.0% 时，石油烃的去除率随着浓度的增加而升高，在石油烃含量为 2.0%~10.0% 时，石油烃的去除率随着浓度的增加而降低。

(3) 在相同的处理条件下， L_{10} 和 D_6 菌株对稀油的降解效果明显高于稠油的降解效果，各组分的去除率依次为烷烃 > 芳烃 > 胶质沥青质；在稠油处理土壤中 D_6 菌株对芳烃和胶质沥青质的去除率均高于 L_{10} 菌株，而在稀油处理的土壤中 L_{10} 菌株对芳烃和胶质沥青质的去除率却高于 D_6 菌株的去除率，所以在石油污染土壤治理中应充分考虑油品及微生物自身的特性。

参考文献:

- [1] 王景华, 魏从如, 刘凤奎. 油田开发环境影响评价文集[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 45-60.
- [2] Sorkhoh N A, Ghannoum M A, Ibrahim A S, et al. Crude oil and hydrocarbon degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait [J]. *Environ Pollut*, 1990, 65(1): 1-7.
- [3] Vecchioli G I, Del Panno M T, Paineira M T. Use of selected au-

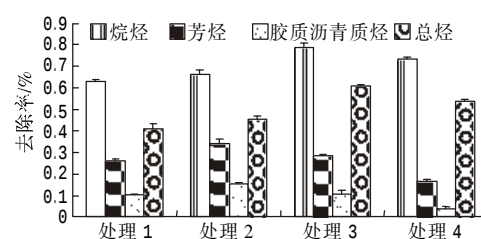


图3 石油烃的性质对去除率的影响

Figure 3 Effects of petroleum properties on removal rates

tochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil [J]. *Environ Pollut*, 1990, 67(3): 1249-1258.

- [4] Milekhina E I, Borzenkov I A, Zvyagintseva I S, et al. Characterization of a hydrocarbon-oxidizing *Rhodococcus erythropolis* strain isolated from an oil field [J]. *Microbiology New York*, 1998, 67(3): 271-274.
- [5] Surzhko L F, Finkel-shtein Z I, Baskunov B P, et al. Utilization of oil in soil and water by microbial cells [J]. *Microbiology New York*, 1995, 64(3): 330-334.
- [6] Sidorov D G, Borzenkov I A, Ibatullin R R, et al. A field experiment on decontamination of oil polluted soil employing hydrocarbon-oxidizing micro-organisms [J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol(Russ)*, 1997, 33(5): 497-502.
- [7] Susan C W, Kevin C J. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review [J]. *Environ Pollut*, 1993, 81(3): 229-250.
- [8] Guzev V S, Khalim ov E M, Volde M I, et al. Regulatory effect of glucose on hydrocarbons oxidizing microorganisms in soil [J]. *Microbiology New York*, 1997, 66(2): 124-128.
- [9] 周德平, 夏颖, 韩如场, 等. 三株非降解细菌的分离、鉴定及降解特性的研究 [J]. *环境科学学报*, 2003, 23(1): 124-128.
- [10] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会编. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1997. 372-374.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 43-66.
- [12] R E 布坎南, N E 吉本斯, 等. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 第八版, 北京: 科学出版社, 729-795.
- [13] 牛之欣, 郭书海, 李凤梅, 等. 放线菌对稠油污染土壤中胶质沥青质的降解研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(4): 771-774.
- [14] 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.
- [15] Dibble J T, Bartha R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1979(37): 729-739.
- [16] 齐永强, 王红旗, 刘敬奇, 等. 土壤中石油污染物微生物降解过程中各石油烃组分的演变规律 [J]. *环境科学学报*, 2003, 23(6): 834-836.