

假单胞菌 Nwu1-mu 对陕北石油污染土壤的生物修复作用研究

陆 昕, 陈 立, 李 娟, 陈五岭

(西北大学生命科学学院, 西安 710069)

摘 要: 选用假单胞菌 Nwu1-mu 对陕北地区石油污染土壤进行生物修复。通过检测修复过程中土壤样品的菌体生长数量、脱氢酶活性、表面张力和石油烃及其组分降解率综合考察了菌株对石油烃类物质的降解作用。结果表明, 在不添加营养物质的前提下假单胞菌 Nwu1-mu 在 60 d 内对石油污染土壤中的石油烃类物质降解率达到了 86.5%, 尤其对石油烃中的 $C_{24}\sim C_{28}$ 和 $>C_{28}$ 组分有突出的降解效果; 菌株产脱氢酶和表面活性剂显示出了良好的性能, 在石油烃类物质的降解过程中均起着关键的促进作用。假单胞菌 Nwu1-mu 显示出的强大的生物修复潜力及其不依赖于外来营养源的特性, 为黄土高原的土壤生态环境修复提供了新的解决思路。

关键词: 假单胞菌; 石油烃降解; 脱氢酶; 表面活性剂; 生物修复

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2010)05-0910-08

Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil in Northwest of China by *Pseudomonas* sp. Nwu1-mu

LU Xin, CHEN Li, LI Juan, CHEN Wu-ling

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: To study characteristics and mechanism of petroleum hydrocarbons degradation during the bioremediation course, *Pseudomonas* sp. Nwu1-mu was used on bioremediation to the petroleum-contaminated soil (PCS) from the northern of Shaanxi Province, China. The degradation effect of petroleum hydrocarbons in PCS was investigated through detecting quantity of strains, dehydrogenase activity, surface tension, degradation rate of total petroleum hydrocarbons (TPH) and its constituents in bioremediation course. Degradative efficiency of Nwu1-mu to TPH finally reached 86.5% within 60 days without additional nutrients, while significant degradation was made to the petroleum hydrocarbons constituents of $C_{24}\sim C_{28}$ and $>C_{28}$. Dehydrogenase and biosurfactant produced by Nwu1-mu played important roles in petroleum hydrocarbon degradation, both of them showed effective acceleration during the remediation course. The *Pseudomonas* sp. Nwu1-mu shows remarkably petroleum hydrocarbons degradation characteristics while using PCS as the only nutrient source. A great potential for bioremediation on petroleum-contaminated soil of loess plateau can be expected by Nwu1-mu.

Keywords: *Pseudomonas*; petroleum hydrocarbon degradation; dehydrogenase; surfactant; bioremediation

微生物降解是自然界石油烃类有机污染物去除的主要机制,也是目前石油污染土壤最重要的修复方法之一^[1]。研究表明微生物降解石油烃的机制中脱氢酶是主要起作用的因素之一,降解过程中,石油烃通过脱氢酶活化氢原子并传递给特定的受氢体,实现石油烃的氧化和转化^[2]。Marin J A 等研究发现,脱氢酶

活性与石油污染物中石油烃衰减量有良好的相关性,并且可以作为微生物对底物适应性的指标^[3]。另外微生物分泌的表面活性剂对石油烃具有增溶和分散作用,使得石油烃类的可利用表面积增大,有利于微生物的直接接触和利用,从而使其对石油烃类物质的降解利用速率大大提高,这是微生物对石油烃类物质的降解利用的另一主要机制^[4-5]。Bento 等从柴油污染的土壤中分离到 12 株产表面活性剂的菌株,产生的表面活性剂可使柴油的平均表面张力降低 $41\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1[6]}$ 。Harvey 等用 *P.aeruginosa* SB30 产生的糖脂类生物表面活性剂进行去除阿拉斯加砾石表面石油污染物的

收稿日期:2009-09-17

基金项目:陕西省重大科技创新项目(2009ZKC04-16)

作者简介:陆 昕(1984—),女,江苏宜兴人,在读硕士,主要研究方向为污染环境的生物修复。E-mail:luxin1130sky@163.com

通讯作者:陈五岭 E-mail:wuling.chen@263.com

试验,在 40 ℃接触时间为 1 min 的情况下,用 1% 的生物表面活性剂溶液能够比只用水的条件下使用细菌对石油的降解率提高 3 倍^[7]。目前已有报道的研究工作主要集中在脱氢酶或表面活性剂对石油烃降解行为的独立机制研究,但对石油烃降解转化与微生物生长行为以及脱氢酶与表面活性剂作用的系统机制还有待进一步研究。

陕西省北部是我国重要的石化能源基地,大量的石油勘探、开采活动相应带来了频繁的污染泄漏事故,对当地的土壤生态环境造成了严重的威胁。本研究从陕北长庆油田的石油污染土壤中分离筛选到一株高效石油烃降解菌 Nwul-mu,对菌株本身的脱氢酶和表面活性剂的分泌行为与石油烃类组分的降解转化机制进行了综合研究,讨论了菌株对石油污染土壤的生物修复潜力,为黄土高原的土壤生态环境修复提供了可行的解决思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用菌株分离于陕西省吴起县长庆油田井场周边的石油污染土壤中。在实验室对菌种采集样品进行富集、分离、纯化后,对其进行生理生化及 16sRNA 分子鉴定。该菌的个体形态:菌株为革兰氏阴性短杆菌,大小(0.5~1.0 μm)×(1.5~5.0 μm),极生鞭毛,不产芽孢。经 LB 琼脂培养基培养,菌落为圆形,边缘不完整、不透明,表面光滑,菌体为革兰氏阴性无芽孢杆菌,极生鞭毛,外观尺寸约为(0.3~0.5 μm)×(0.4~1.0 μm),见图 1。根据菌株的生理生化试验及 16sRNA 分子鉴定的结果,依照《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)^[8]鉴定该菌归属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),命名为 Nwul-mu。

供试土壤采自陕西省靖边县油田井场周围的石油污染土壤表层以下 20 cm 处,属砂质黄土,土中含有少量 3~12 mm 的小砾石,土壤湿重为 1.936 g·cm⁻³;自然含水量为 12.69%;含油量高达 28.3 g·kg⁻¹,总有机碳含量为 19.26 g·kg⁻¹,总氮含量为 1.43 g·kg⁻¹,总磷含量为 0.68 g·kg⁻¹,总钾含量为 15.63 g·kg⁻¹,pH 值为 7.6。

营养培养基:葡萄糖 5 g,蛋白胨 2 g,酵母粉 1 g,水 1 000 mL,pH=7.5。培养条件:将斜面保存的菌株接种至营养培养基中,30 ℃、165 r·min⁻¹ 下振荡培养。

色谱标准物:C₁₀,C₁₂,C₁₄,C₁₆,C₂₄,C₂₈,C₃₂ 和 C₃₆ 色谱标准物质购自百灵威化学技术有限公司,纯度 500

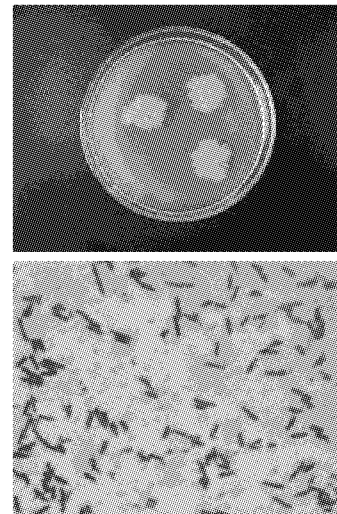


图 1 假单胞菌菌落及显微形态

Figure 1 *Pseudomonas migula* colony and microscopic morphology

μL·mL⁻¹ in Hexane,供应商 Accustandard。

1.2 实验方法

为研究所筛选的这株菌降解石油污染土壤的性能,设定了 12 个生物反应器,分别为:生物反应器 A、B、C、D、E、A'、B'、C'、D'、E'、F、G。设定的实验条件见表 1。

表 1 实验设计

Table 1 Experiment design

组别	菌 Nwul-mu 接种量	接种前是否灭菌	备注
生物反应器 A	1%	+	灭菌试验组
生物反应器 B	1.5%	+	
生物反应器 C	2%	+	
生物反应器 D	2.5%	+	
生物反应器 E	3%	+	
生物反应器 A'	1%	-	未灭菌试验组
生物反应器 B'	1.5%	-	
生物反应器 C'	2%	-	
生物反应器 D'	2.5%	-	
生物反应器 E'	3%	-	
生物反应器 F	0	-	土著微生物对照
生物反应器 G	0	+	空白对照

量取 2.5 kg 实验用石油污染土壤分装于 12 个容积为 1 000 mL 的生物反应器中,接种前对盛有土壤的生物反应器 A、B、C、D、E、G 灭菌(1×10⁵ Pa 灭菌 30 min),其余生物反应器均不灭菌。将筛选得到的实验菌用液体培养基进行富集培养并制成菌悬液(1.1~1.3)×10⁸ CFU·mL⁻¹,向生物反应器 A、B、C、D、E、A'、B'、C'、D'、E'中按设定接种量接入菌龄适中的菌悬液,搅拌均匀。12 个生物反应器同时进行实验,实验

温度为室温 (25~30 ℃), 土壤含水率保持在 20% 左右, 处理时间为 60 d, 每 3~6 d 取一次样, 测定各个反应器中土壤的 TPH 含量 (Total petroleum hydrocarbon 石油烃总量, TPH)、菌体量、脱氢酶活性、表面活性剂含量等, 并进行对比分析。

生物反应器 F 为未接入实验菌株的未灭菌石油污染土壤样品, 主要考察样品中土著微生物对石油污染物的单独降解效果; 生物反应器 G 为未接入实验菌株的已灭菌石油污染土壤样品, 反映自然过程中非生物因素所造成的石油减少量。

1.3 实验分析方法

1.3.1 微生物数量的测定及生长曲线

用 0.2% 焦磷酸钠溶液浸泡土壤样品, 经超声、振荡后将欲测土壤样品配制成水样, 将欲测水样用无菌注射器逐级注入装有石油烃降解菌培养液的市售细菌瓶中, 逐级稀释后在 30 ℃ 培养 14 d, 直到最后一个细菌瓶无菌生长为止, 根据生长指示和稀释倍数计算出细菌的数目^[9]。

1.3.2 生物表面活性剂的分离、纯化与分析

粗提: 将培养液在 12 500 r·min⁻¹ 下离心 30 min 去除菌体, 上清液用 6 mol·L⁻¹ 的盐酸调节 pH 为 2.0, 加入等体积乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 用无水 Na₂SO₄ 干燥, 40 ℃ 下旋转蒸发浓缩得到浆状物, 为表面活性剂粗产品。精提: 将粗品溶于 0.05 mol·L⁻¹ 的 NaHCO₃ 溶液, 过滤后, 用盐酸调 pH 为 2.0, 4 ℃ 下放置 24 h, 再在 12 500 r·min⁻¹ 下离心 15 min, 去掉上清液, 干燥后得表面活性剂精提品, 并称重^[10]。

薄层层析 (TLC) 分析: 取表面活性剂粗品, 以氯仿/甲醇/水 (V:V:V=65:15:20) 为展开剂展开, 用不同的显色剂显色: (1) 苯酚-硫酸试剂: 糖脂显棕色斑点; (2) 茚三酮显色剂: 脂肽显红色; (3) 蒽酮硫酸显色剂: 糖脂显黄色^[11]。

1.3.3 实验土壤浸提液的表面张力测定

取经充分研磨的土样 5 g, 加入氯仿和甲醇的混和提取剂 (V:V=2:1) 20 mL, 振荡 1 h, 内容物移入布氏漏斗, 用真空泵将提取剂抽滤入烧瓶, 然后用混和提取剂清洗土壤 3 次, 提取液移入蒸发皿, 水浴蒸发后, 用蒸馏水将残余物洗入容量瓶, 冷却后定容。

用 JYW-200A 自动界面张力仪于室温下测定浸提液的表面张力^[12]。

1.3.4 土壤脱氢酶酶活测定

称取约 1 g 的土壤研磨后置于带塞试管中, 依次加入 Tris-HCl 缓冲液、0.1 mol·L⁻¹ 葡萄糖液、0.5%

TTC 液各 2 mL, 于 (37 ± 1) ℃ 恒温培养箱中培养 10~20 min, 溶液与沉淀土壤交界面处颜色变为红色。取出试管, 加入 2 滴浓硫酸终止反应, 准确加入 5 mL 甲苯振荡, 在 4 000 r·min⁻¹ 转速下离心 5 min, 取有机溶剂层比色^[13]。在上述条件下, 将 1 h 产生 1 mgTF 的量作为一个酶活力单位 (mgTF·g⁻¹·h⁻¹)。

1.3.5 TPH 降解率的测定

采用 EPA 3546 (US EPA 3546 Microwave Extraction[S]) 推荐方法测定土壤中石油烃含量。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 (V:V=2:1) 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, 放入通风橱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^[14]。

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。

1.3.6 石油烃类物质各组分降解效果检测

对处理前后的石油污染土壤浸提液进行石油烃类物质组分含量变化检测。使用日本岛津 Shimazu GC-MS-QP2010 型气相色谱-质谱联用仪对石油污染土壤中石油烃组分进行定性分析, 使用气相色谱 Shimazu GC-2010 进行定量分析。气相色谱谱仪条件: 气相色谱柱为 DB21 (30 m, 0.25 μm, 0.32 mm), FID 检测器, 程序升温 (100 ℃ → 8 ℃·min⁻¹ → 295 ℃ - 16 min)。气相-质谱联用仪条件: 采用程序升温 (100 ℃ → 8 ℃·min⁻¹ → 295 ℃ - 16 min), Scan 扫描方式, 扫描范围为 m/z (33—650)。

2 结果与分析

2.1 不同接菌量 TPH 降解效果研究

灭菌与未灭菌组不同接菌量下随时间变化的 TPH 降解率结果如图 2、图 3 所示。两组实验 TPH 降解率随时间变化的趋势大致相似, 接入菌株是 TPH 降解行为的主要影响因素。污染土壤中土著微生物在无外来菌的情况下对石油污染物有一定程度的降解作用, 但接入实验菌株后土著微生物的降解作用受到一定程度抑制。另外非生物因素如自然风化和光解等因素也造成约 10% 的 TPH 损失率^[15]。

对比图 2、图 3 可知, 灭菌实验组中与最佳 TPH 降解效果对应的接菌量为 3%, 而未灭菌组最佳的 TPH 降解效果对应的接菌量为 2%。推测原因可能为实验

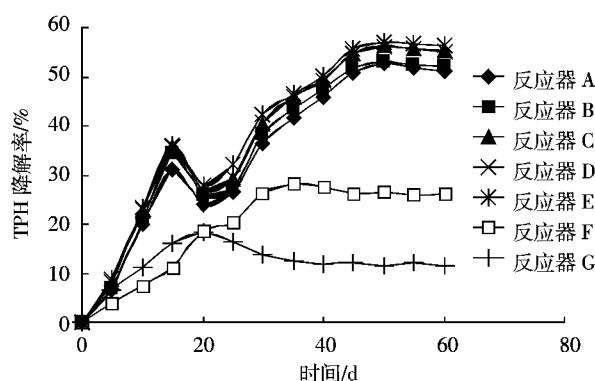


图2 灭菌组不同接菌量的实验土壤 TPH 降解率

Figure 2 The different TPH degradation rates of the experimental soil sterilized

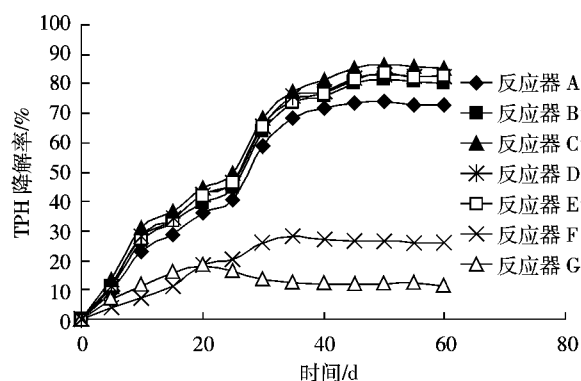


图3 未灭菌组不同接菌量的实验土壤 TPH 降解率

Figure 3 The different TPH degradation rates of the experimental soil without sterilized

菌株与石油污染土壤中土著微生物存在一定比例的互利共生关系。接菌量为2%时,两者的比例最佳,利于菌体互利生长和对石油烃的协同降解作用。考虑到本研究以石油污染土壤的原位修复为目的,因此选取接菌量为2%的未灭菌生物反应器C'为实验反应器,以下的实验结果及讨论部分均以反应器C'为研究对象。

2.2 菌株生长曲线与 TPH 降解行为研究

采用细菌瓶绝迹法检测实验反应器中微生物数量,并绘制60 d之内菌株生长曲线。对比菌株生长情况与TPH降解率的相关关系,并加入反应器F和G中TPH降解率作为对照,实验结果如图4所示。

由图可知,菌株Nwu1-mu刚接入时有一段生长延滞期,微生物处于适应阶段,前5 d的采样结果显示菌Nwu1-mu数量增长缓慢,降解率很低。随着培养时间的增长,菌体数增加,TPH降解率逐渐增加;第15 d菌数出现一个小高峰,之后下降,第20 d时达到低谷。推测在此期间菌体利用被污染土壤中易于利用降解的一部分石油烃生长,随着溶解的少量烃类物质

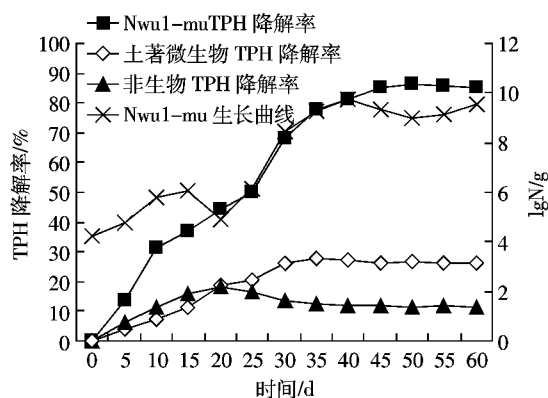


图4 Nwu1-mu 菌体生长及 TPH 降解率的变化

Figure 4 The growth of bacteria Nwu1-mu and changes of TPH degradation rate

被完全利用,造成碳源的暂时性短缺。经过环境适应阶段之后菌体脱氢酶等代谢产物产出增加,改善了菌株对石油污染物的利用状态,因此在20 d后菌数与TPH降解率迅速增加,50 d时TPH降解率为86.5%,达到峰值。50 d后菌体进入平缓期,降解逐渐趋于平缓。经过60 d的降解处理,石油污染土壤中TPH含量由2.83%下降至0.382%,降解率达到86.5%。

实验反应器中TPH含量的减少是实验菌株和土壤中土著微生物的生物降解及非生物理化作用的总和,因此研究土著微生物和非生物作用对石油污染物的单独降解作用对于生物修复研究有相当重要的意义。反应器F中土著微生物在35 d时达到最大TPH降解率28.1%,35 d后稳定于25%左右。反应器G中非生物因素造成的TPH降解在20 d时达到最大18.2%,之后TPH损失率基本稳定在12%左右。两者的TPH减少量均远低于实验反应器,由此可见,接入菌株Nwu1-mu是石油污染土壤样品中TPH降解行为的主导因素。

实验所用菌株Nwu1-mu降解性能优于土著微生物,且降解作用持续时间长;由于预先经过污染环境驯化,实验菌株对污染环境有更强的适应性,对污染物有更强的氧化能力。实验表明,实验菌株和土著微生物分别作用的TPH降解率加和小于两者共同作用时的降解率($C+F < C'$)。说明适量接入的菌株Nwu1-mu能和土壤固有的土著微生物互利共生,并互相促进、共同协作使得TPH降解率明显增加。推测原因是菌株之间能够互相利用各自合成的酶类和代谢产物,促进彼此生长,在整体上提高对石油烃的利用降解能力。

2.3 菌株产出表面活性剂性能与 TPH 降解行为研究

由于TPH在水中的溶解度非常小,且部分TPH

强烈地吸附在土壤沉积物颗粒表面,很难直接被微生物利用,从而难以提供足够的量来维持微生物的生长繁殖,限制了微生物对 TPH 的降解。研究资料表明液态的石油烃类物质在水中会形成水油界面,石油降解微生物正是在这一水油界面上降解烃类的,降解速率与水油界面的面积密切相关^[6]。表面活性剂对石油烃具有一定的增溶和分散作用,部分微生物能够释放出表面活性剂类代谢产物使石油烃类在水油界面上乳化形成许多细小颗粒,以增大石油烃类可利用的表面积,有利于微生物的直接接触和利用,从而使其对石油烃类物质的降解利用速率大大提高。

采用萃取浓缩的方法对 Nwul-mu 培养液进行分步骤提取,通过粗提和精提得到生物表面活性剂精提品经称量产量为 $1.98 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经薄层层析实验,苯酚-硫酸显棕色斑点,初步判定表面活性剂粗品为糖脂类物质。微生物在生长过程中产生糖脂、脂肽和磷脂等类型的生物表面活性剂是很普遍的,其中糖脂在烃的微生物摄取过程中起到重要作用^[17]。

评价表面活性剂性能的方法包括测定表面张力、排油活性、油水乳化稳定性、油水界面张力、临界胶束浓度^[18],且通常以系统的表面张力或界面张力来表征微生物产表面活性剂的能力^[19]。本研究通过检测土壤样品浸提液的表面张力来对菌株所产生生物表面活性剂进行评价,并对其与该菌降解石油烃的关系进行了研究,结果如图 5 所示。

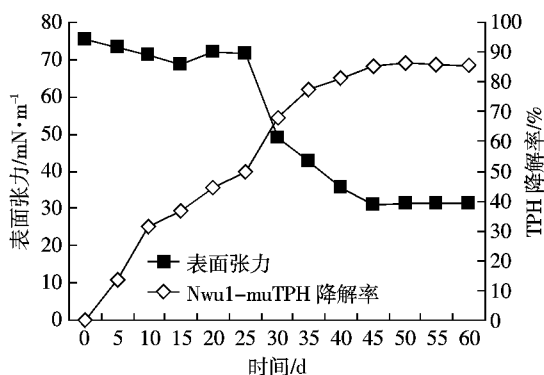


图 5 表面张力和 Nwul-mu 菌体生长的变化

Figure 5 The changes of the surface tension and the growth of bacteria Nwul-mu

由图可知,在石油污染土壤中菌 Nwul-mu 在生长对数期开始产表面活性剂,在实验前期,TPH 降解率随时间逐渐增加,在 10 d 之后 TPH 降解率趋缓,这段时间表面张力的减少也不明显。在处理 20 d 时,表面张力出现明显降低,推测原因为溶解的少量烃类物

质被完全利用,造成碳源的暂缺,参考图 4 可知菌体生长数量在此时出现一个低谷,因缺乏充足碳源所以表面活性剂的产出减少。菌 Nwul-mu 的生长对数期为产表面活性剂的高峰期,第 25 d 后,表面张力明显减小,TPH 降解率迅速增加,由图可知这段时间菌体大量产生并分泌表面活性剂,在反应器中达到一定浓度,使石油大量乳化形成水包油乳化状,促进了菌体与油滴充分接触,提高了 TPH 降解率。在第 40 d 后菌进入生长稳定期,由于碳源的消耗,表面活性剂产量基本不再增加,表面张力的大小稳定在 $31 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 左右,TPH 降解率趋于平缓。

因此可以推断:(1)菌 Nwul-mu 的表面活性剂生产方式为生长相关型;(2)在有充足的碳源时,菌会利用碳源和氮源合成表面活性剂;(3)菌 Nwul-mu 产出的表面活性剂的性能与 TPH 降解率呈正比例关系,表面活性剂的存在有利于菌降解利用石油烃。

2.4 菌株脱氢酶活性与 TPH 降解行为研究

研究资料表明,TPH 在微生物细胞内的降解主要是在细胞内相关降解酶的催化作用发生的酶促反应,微生物体内含有各种各样的酶,能够催化石油烃进行氧化反应,其中脱氢酶类是关键酶^[20]。在石油烃类污染物的微生物修复过程中脱氢酶活性已作为总氧化能力标志用于检测微生物活性^[21]。

本研究通过检测土壤样品中总脱氢酶活性来对菌株的石油污染物氧化能力进行表征,并对其与 TPH 降解行为的关系进行了研究,结果如图 6 所示。

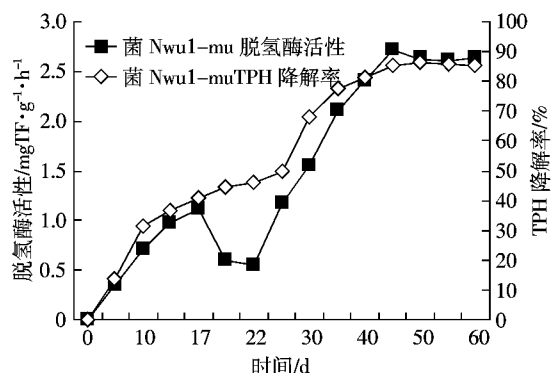


图 6 脱氢酶活性和 TPH 降解率的变化

Figure 6 The changes of the dehydrogenase enzymatic activity and TPH degradation rate

如图所示,前 5 d 的结果显示,菌 Nwul-mu 处在适应阶段,生长缓慢,脱氢酶活性较低。第 5 d 后,菌株以石油污染土壤中易利用的烃类物质为碳源,菌体生长速率逐渐增加,脱氢酶活性随着菌体数量的变化

而变化,但变化相对滞后。在 20~40 d 期间,菌数迅速增加,参考图 5 可知同时段菌株产出表面活性剂浓度提高,增溶效果逐渐增强,脱氢酶活性也同时大幅增强,TPH 降解率迅速增加。第 45 d 酶活达最大值 $2.71 \text{ mgTF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,50 d 时 TPH 降解率为 86.5%,达到峰值。50 d 后,由于碳源逐渐减少和菌体量的降低,脱氢酶活性略有减弱,趋于平缓。在菌体减少的同时脱氢酶活性能够维持暂时相对稳定,这种滞后效应主要是由酶的诱导作用造成的。综上可知,在 60 d 的降解处理过程中,脱氢酶活性和 TPH 降解率呈现较好的相关性。

2.5 石油烃类物质各组分降解效果研究

为了更深入地研究菌 Nwul-mu 的石油烃降解特性,还对未处理和处理中的石油污染土壤中石油烃组分做了定性和定量分析,进一步研究菌 Nwul-mu 对石油烃的利用降解情况。实验结果如图 7 所示。

图 7 中 8,17,22,26,36,38,47,55,57,59,63,72 为正构烷烃 ($\text{C}_{12}, \text{C}_{14}, \text{C}_{16}, \text{C}_{17}, \text{C}_{21}, \text{C}_{22}, \text{C}_{23}, \text{C}_{24}, \text{C}_{34}$ 等),相对含量为 24.82%;5,9,10,11,12,13,61,4,15,16,18,25,30,33,34,35,37,41,43,64,66,67,68,69,70,71,1,20,53,23,56,27,28,49,52,54,62 为异构烷烃、环烷烃 ($\text{C}_{12}, \text{C}_{14}, \text{C}_{16}, \text{C}_{17}, \text{C}_{21}, \text{C}_{22}, \text{C}_{23}, \text{C}_{24}, \text{C}_{34}$ 等),相对含量为 45.46%;2,6,7,19,29,40,44,51,60 为芳香烃(苯系物、萘、苯醚、多环芳烃),相对含量为 11.52%;3,4,65,48,46,21,50,45,42,39,32,31,24,58 为邻苯二甲酸酯、羧酸、少量醛和酮、少量含硫和含氮有机物等,相对含量为 18.20%。相对含量根据质谱总离子流图面积积分得到。

由图 7 分析可得,未处理的石油污染土壤中石油烃含量比例大的组分在 C_{10} 与 C_{36} 之间,因而选取 $\text{C}_{10}, \text{C}_{12}, \text{C}_{14}, \text{C}_{16}, \text{C}_{24}, \text{C}_{28}, \text{C}_{32}$ 和 C_{36} 色谱混标,对未经处理、已处理 15 d 和 45 d 的石油污染土壤进行气相色谱分析,对比降解过程中相应的石油烃类组分含量的变化。实验结果如图 8 所示。

将图 7、图 8 和表 2 结果对比分析,结果表明菌 Nwul-mu 对 $\text{C}_{16} \sim \text{C}_{24}, \text{C}_{24} \sim \text{C}_{28}$ 和 $> \text{C}_{28}$ 石油烃组分的有明显降解效果。在接菌后的前 10 d, $\text{C}_{16} \sim \text{C}_{24}, \text{C}_{24} \sim \text{C}_{28}$ 和 $> \text{C}_{28}$ 组分减少明显, $< \text{C}_{14}$ 组分的去除率呈负值,这是因为石油烃中长链组分降解所产生的短链组分的量超过了原有短链组分的降解量^[22]。因此,在实验初期石油烃组分中中长链烃的去除率较高,表现出了菌株优先利用石油污染物中的中长链烃的特性;在接菌后的 10~30 d 中, $\text{C}_{16} \sim \text{C}_{24}, \text{C}_{24} \sim \text{C}_{28}$ 和 $> \text{C}_{28}$ 组分的减少量减缓,而 $< \text{C}_{14}$ 组分有减少,参考之前图 4、图 5、图 6 中的 TPH 降解率、脱氢酶活性及表面活性剂浓度在这期间数据,说明这段时间菌体利用从环境中获取的营养物质调整自身分泌代谢情况,改善对污染物的利用状态以适应环境;接菌后的 30~40 d,各石油烃组分明显减少,结合上文中此期间脱氢酶活性及表面活性剂浓度表现出的较大增幅,进一步说明这两种物质与石油烃组分降解行为的关键物质;接菌后的 40~50 d,土壤样品中石油烃组分的降解率明显减低,菌株的生长状态也进入平稳期。

综上所述,石油烃组分降解效果检测结果验证了菌株对于石油污染土壤样品中石油污染物的降解作

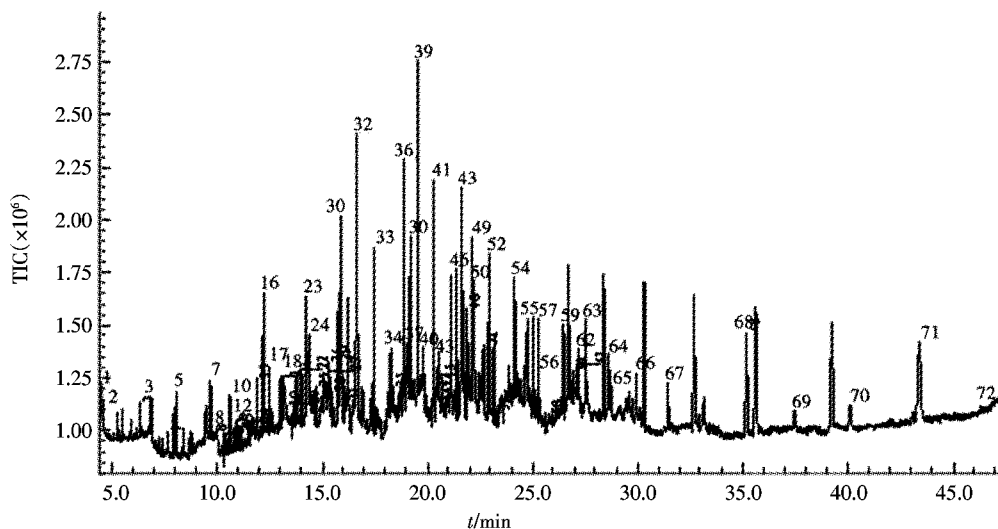
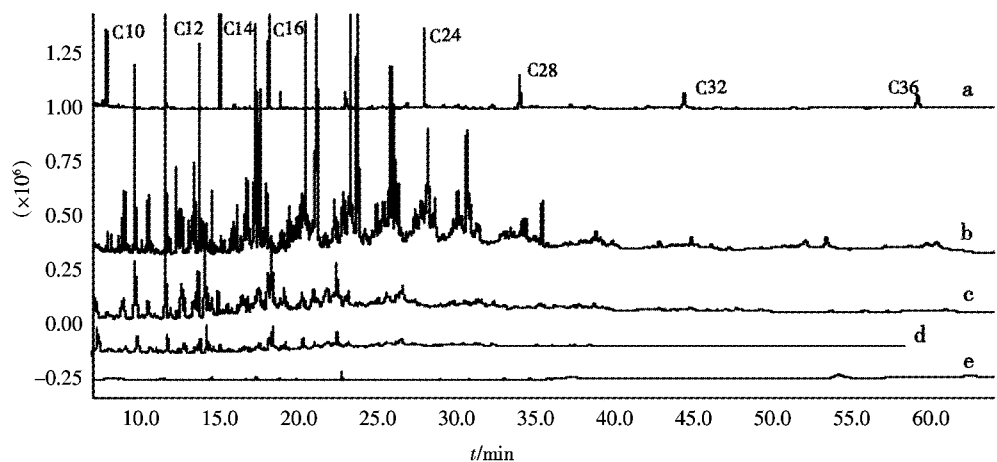


图 7 未处理石油污染土壤中石油烃组分的 GC/MS 色谱图

Figure 7 The GC/MS chromatogram of petroleum hydrocarbon constituents in the undisposed polluted soil



a.正构烷烃标样色谱图,b.未处理石油降解用液体培养基中石油烃各组分含量,c.处理 15 d 后油田钻井废弃泥浆中石油烃各组分含量,d.处理 45 d 后油田钻井废弃泥浆中石油烃各组分含量,e.溶剂空白

图 8 石油烃各组分含量随降解时间变化的气相色谱图
Figure 8 The gas chromatogram of Petroleum Hydrocarbon constituents content with time

表 2 石油污染土壤中石油烃各组分含量的气相色谱定量分析结果

Table 2 The quantitative analytic result of gas chromatogram of petroleum hydrocarbon constituents content in the contaminated soil									
烷烃	0 d	15 d		30 d		45 d		60 d	
	浓度/mg·kg ⁻¹	浓度/mg·kg ⁻¹	去除率/%	浓度/mg·kg ⁻¹	去除率/%	浓度/mg·kg ⁻¹	去除率/%	浓度/mg·kg ⁻¹	去除率/%
<C ₁₄	348	406	-16.5	371	-6.4	134	61.7	263	24.6
C ₁₄ ~C ₁₆	955	747	21.8	520	45.6	245	74.4	195	79.6
C ₁₆ ~C ₂₄	4 435	3 133	29.4	2 668	39.8	1 039	76.6	719	83.8
C ₂₄ ~C ₂₈	3 574	2 062	42.3	1 410	60.6	612	82.9	211	94.1
>C ₂₈	1 345	682	49.3	419	68.8	98	92.8	69	94.9

用,表明了菌株产出的脱氢酶和表面活性剂在石油烃降解过程中起到了关键作用。

3 结论

(1)利用假单胞菌 Nwul-mu 对陕北黄土地区石油污染土壤样品进行生物修复实验,结果表明在不添加营养物质的前提下经过 60 d 的处理时间,石油烃类物质总降解率可以达到 86.5%,显示了菌株在黄土高原土壤环境下的很强的生物修复潜力。

(2)菌株自身同时具有较高的产脱氢酶和表面活性剂的能力,两者的产出均为生长相关型。所产脱氢酶酶活性较高,对石油烃类物质降解起关键作用;所产表面活性剂增加了菌对石油烃的接触和利用,对石油烃降解率有着显著的促进作用。

(3)菌株与土壤样品中的土著微生物能够共同参与对土壤中石油烃类物质的降解行为,两者共同作用的降解率大于两者各自单独的降解率总和,表明两者可以在一定程度上互相促进,从整体上提高对石油烃

类物质的降解能力。

(4)菌株对石油烃类物质的降解行为优先从中长链烃组分开始,降解初期长链组分含量的迅速降解使得低链组分含量呈负增长,降解中后期低链组分的降解率随高链组分含量下降而逐渐回升。

参考文献:

[1] Drachuk S V, Koksharova N V, Firsov N N. Microflora of soils polluted with petroleum products[J]. *Russian Journal of Ecology*, 2002, 33(2): 135-137.

[2] 张子间,刘勇弟,孟庆梅,等.微生物降解石油烃污染物的研究进展[J]. *化工环保*, 2009, 29(3):193-197.

ZHANG Zi-jian, LIU Yong-di, MENG Qing-mei, et al. Research progresses on biodegradation of petroleum hydrocarbon pollutants[J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2009, 29(3):193-197.

[3] Marin J A, Hernandez T, Garcia C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions; Influence on soil microbial activity[J]. *Environmental Research*, 2005, 98:185-195.

[4] 钱欣平,阳永荣,孟琴.生物表面活性剂对微生物生长和代谢的影响[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(3):75-78.

- QIAN Xin-ping, YANG Yong-rong, MENG Qin. The effects of biosurfactant on microbes' growth and metabolism[J]. *Microbiology*, 2002, 29(3):75-78.
- [5] 傅海燕, 曾光明, 袁兴中, 等. 生物表面活性剂的分离提纯及其发展前景[J]. 生物学杂志, 2003, 20(6):1-3.
- FU Hai-yan, ZENG Guang-ming, YUAN Xing-zhong, et al. Isolation and purification of biosurfactant[J]. *Journal of Biology*, 2003, 20(6):1-3.
- [6] Bento FM, de Oliveira FA, Okeke BC, et al. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil[J]. *Microbiol Res*, 2005, 160(10):249-255.
- [7] Banat I M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review [J]. *Bioresource Technology*, 1995, 51:1-12.
- [8] 杨 革. 微生物学实验教程[M]. 北京:科学出版社, 2004:143-187.
- [9] 易绍金, 邓 勇. 细菌瓶法用于产表面活性剂菌菌数测定[J]. 油田化学, 2005, 22(3):262-264.
- YI Shao-jin, DENG Yong. Determination of bacterial cell population for surfactant producing bacteria by using flask test[J]. *Oilfield Chemistry*, 2005, 22(3):262-264.
- [10] 强 婧, 尹 华, 彭 辉, 等. 铜绿假单胞菌 S6 分泌的生物表面活性剂特性[J]. 环境科学学报, 2009, 29(1):102-110.
- QIANG J, YIN H, PENG H, et al. Characteristics of a biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 29(1):102-110.
- [11] 尹 华, 谢丹平, 彭 辉, 等. 石油降解菌 XD-1 产表面活性剂的性能[J]. 环境污染治理技术与设备, 2006, 7(6):39-42.
- YIN Hua, XIE Dan-ping, PENG Hui, et al. Characteristics of oil-degrading strain XD-1 releasing biosurfactants [J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2006, 7(6):39-42.
- [12] 张 璐, 赵硕伟, 李凤玲, 等. 石油烃降解菌 *Rhodococcus* sp. 15-3 的分离鉴定及特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5):1737-1741.
- ZHANG Lu, ZHAO Shuo-wei, LI Feng-ling, et al. The isolation and characterizations of a alkanes-degrading bacterium *Rhodococcus* sp. 15-3[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(5):1737-1741.
- [13] 尹 军, 谭学军, 张立国. 测定脱氢酶活性的萃取剂选择[J]. 中国给水排水, 2004, 20(7):96-98.
- YIN JUN, TAN Xue-jun, ZHANG Li-guo. Extractant selection in measuring activity of dehydrogenase[J]. *China Water & Wastewater*, 2004, 20(7):96-98.
- [14] 叶淑红, 丁 鸣, 马 达, 等. 微生物修复辽东湾油污污染湿地研究[J]. 环境科学, 2005, 26(5):143-146.
- YE Shu-hong, DING Ming, MA Da, et al. Research of microbio-remediation of oil-contaminated wetland in Liaodong Bay[J]. *Environmental Science*, 2005, 26(5):143-146.
- [15] 欧阳科, 张甲耀, 戚 琪, 等. 生物表面活性剂和化学表面活性剂对多环芳烃的生物降解作用研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(4):806-809.
- OUYANG Ke, ZHANG Jia-yao, QI Qi, et al. Difference of biodegradation processes of anthracene in the presence of biosurfactants and chemical surfactants [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(4):806-809.
- [16] 郑金秀, 彭 祺, 张甲耀, 等. 产表面活性剂的石油降解菌降解特性研究[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(1):5-8.
- ZHENG Jin-xiu, PENG Qi, ZHANG Jia-yao, et al. Petroleum biodegraded by use of bacterium with its biosurfactant production[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 30(1):5-8.
- [17] 刘 晔, 周卫民, 牟伯中, 等. 长链烷烃降解菌的降解特性 [J]. 微生物学杂志, 2005, 25(6):14-18.
- LIU Ye, ZHOU Wei-min, MU Bo-zhong. Degradation characteristics of long-chain aliphatic alkanedegrading bacteria [J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(6):14-18.
- [18] Grayna A Pyaza, Ireneusz Zjawiony, Ibrahim M Banat. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon contaminated and bioremediated soils[J]. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 2006, 50:71-77.
- [19] 马 强, 林爱军, 马 薇, 等. 土壤中总石油烃污染(TPH)的微生物降解与修复研究进展[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(1):1-7.
- MA Qiang, LIN Ai-jun, MA Emma, et al. A Review of micro-biological degradation and remediation of total petroleum hydrocarbon in soil[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(1):1-7.
- [20] Ayotamuno M J, Kogbara R B, Ogaji S O T, et al. Bioremediation of a crude-oil polluted agricultural-soil at PortHar-court, Nigeria [J]. *Appl Energy*, 2006, 83:1249-1257.
- [21] 马宏瑞, 赵 敏, 张景飞. 假单胞菌 DS-III 的脱氢酶活性与石油烃降解动力学特性[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2):559-562.
- MA Hong-rui, ZHAO Min, ZHANG Jing-fei. Dehydrogenase activity of pseudomonas DS-III and its degradation capability for Hydrocarbon[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2):559-562.
- [22] Garcia D O T, Grimalt J O. GC and GC-MS characterization of crude oil transformation in sediments and microbial mat samples after the 1991 oil spill in the Saudi Arabian Gulf coast[J]. *Environ Pollut*, 2006, 139:523-531.