

放线菌对稠油污染土壤中胶质沥青质的降解研究

牛之欣^{1,3}, 郭书海¹, 李凤梅¹, 牛明芬², 冷延惠¹, 张春桂¹

(1.中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016; 2.沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110000; 3.中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用辽河油田石油污染土壤中分离出的 5 株土著放线菌对石油污染土壤中的胶质沥青质进行了室温培养降解试验,研究了表面活性剂(吐温-80)对放线菌除油效率的影响。结果表明,菌株 A2016 对胶质沥青质的降解率最高,为 54.98%;表面活性剂吐温-80 对放线菌 A2004、A2012、A2017 去除土壤中胶质沥青质有促进作用,而对放线菌 A2016 处理则有一定的抑制作用。

关键词:放线菌; 胶质沥青质; 表面活性剂(吐温-80); 石油污染土壤; 降解率

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)04-0771-04

Bio-Degradation of Resin and Asphalt in Viscous-Oil Contaminated Soil by Actinomycetes

NIU Zhi-Xin¹, GUO Shu-Hai¹, LI Feng-Mei¹, NIU Ming-Fen², LENG Yan-Hui¹, ZHANG Chun-gui¹

(1. Institute of Applied Ecology, CAS, Shenyang 110016, China; 2. Agriculture University of Shenyang, Shenyang 110000, China; 3. Graduate School of CAS, 100039, China)

Abstract: Bioremediation has been popularly used to deal with soils polluted by oil. However, it is very difficult if the soil is contaminated by thick oil, as there is much pectin and asphalt in thick oil, which is complex and hardly degraded by microorganism easily. In order to bioremediate the soil polluted by thick oil, 5 strains of actinomycetes, which were selected from indigenous microorganism in Liaohe oil field, were used to biodegrade the pectin and asphalt at lab level. In consideration of surfactants have the ability of dissolving petroleum hydrocarbon, the effect of surfactant and actinomycetes (Tween-80) on the degrading of pectin and asphalt was also studied. As a result, firstly, actinomycetes could reduce pectin and asphalt in soil as do bacteria and fungi both, but actinomycetes had different ability of biodegrading, 42 d later, the highest rate of A2016 exhibited 54.98%. Secondly, the surfactant (Tween-80) could improve the remediation of pectin and asphalt by A2004, A2012 and A2017; on the contrary, it had inhibitory effect when A2016 was used. Therefore, actinomycetes should be selected properly to combine with some surfactant if necessary. Thirdly, the degrading rates increased rapidly during 0d~28d from the experimental start, while the increase of biodegradation was not clearly after 28d. The probable reason of different biodegrading rate was that the quantity of actinomycetes, nutrition and carbon in soil decreased after 4 weeks.

Keywords: actinomycetes, pectin and asphalt, surfactant (Tween-80)

稠油污染土壤中存在大量的高分子烃类,其中胶质沥青质的复杂结构,组成使稠油污染土壤修复成为难点。目前,石油污染土壤多采用微生物处理技术方

法,这种方法以其操作简单、费用低、无二次污染而倍受欢迎。迄今为止,能够降解烃类的微生物有 70 多个属、200 余种,其中细菌和真菌占绝大多数,有关放线菌降解石油污染土壤鲜有研究^[1];另外,关于土壤中放线菌对土壤中石油污染修复及有关表面活性剂对放线菌的除油率的影响,国内也很少有报道。表面活性剂具有增溶、分散等特点,能溶解那些难溶石油烃类化合物和其它有机化合物,从而可提高有机污染物的脱附率^[2],进而影响降解率。

本文采用辽河油田石油污染土壤中分离出的放线菌结合表面活性剂(吐温-80)对稠油污染土壤中

收稿日期:2004-11-09

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(973 项目2004CB418500);
国家高技术研究发展计划(863)前沿探索课题(2004AA
649060);中国科学院应用生态研究所知识创新项目
(SLYQY0401)

作者简介:牛之欣(1976—),男,辽宁沈阳人,硕士研究生,主要从事
石油污染土壤生物修复的研究工作。
E-mail: jesonniu@hotmail.com, jesonniu2003@yahoo.com.cn

的胶质沥青进行除油效果试验,研究放线菌及表面活性剂对其除油效率的影响。

1 材料与方法

1.1 供试材料

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the tested soi

样品	pH	TN/%	TP/%	CEC/mmol·kg ⁻¹	有机质/%	TPH/%
未污染土壤	9.0	0.18	0.051	8.46	1.8	0
污染土壤	7.4	0.14	0.047	12.4	3.3	1.0

从辽河油田附近石油污染土壤筛选出放线菌 5 株,分别为 A2004、A2012、A2013、A2016 和 A2017。

1.1.3 培养基

放线菌液体培养基采用高氏一号培养基:硝酸钾 1 g,氯化钠 0.5 g,硫酸镁 0.5 g,可溶性淀粉 20 g,硫酸铁 0.01 g,磷酸氢二钾 0.5 g,水 1 000 mL,pH 7.2~7.4。试验前 121℃灭菌 30 min。

1.1.4 表面活性剂

吐温-80,市售。

1.2 研究方法

1.2.1 污染土壤的配置

从辽河油田取稠油,加入石油醚,浸泡 12 h 后,取沉淀,即为胶质沥青质,将其加入到土壤中,混匀,浓度为 1%,取 500 g 分别装入到塑料盆中,每一处理重复 3 次。

1.2.2 菌株的投加

放线菌斜面培养 4~7 d 后,转接入高氏一号液体培养基中,28℃、72 h 摇瓶培养后,每盆污染土壤分别加入 30 mL 菌液,混匀。

1.2.3 处理

试验在花盆中进行,每盆装土 500 g,通过不断给花盆称重加水,维持土壤含水率约为 20%~25%。在室温(20℃~25℃)下培养,每一处理重复 3 次。

1.2.4 土壤中石油烃的提取及测定

采用重量法及分光光度法测定石油烃含量^[9]。

土壤的含油率=(测定的石油组分重量/土壤干重)×100%。

菌株对土壤中胶质沥青质的去除率=[(CK 含油率-不同处理含油率)/CK 含油率]×100%

2 结果与讨论

2.1 放线菌对胶质沥青质的去除效果

2.1.1 放线菌在液体培养条件下对胶质沥青质的降解

1.1.1 供试土壤

供试土壤取自辽河油田附近污染与未污染的盐化草甸土,土样经过碎散、除杂、过筛(40 和 60 目),其理化性质见表 1。

1.1.2 供试菌株

以胶质沥青为唯一碳源,在含 50 mL 无机盐液体培养基中,加入供试放线菌菌液,接种量为 1%(V/V),200 r·min⁻¹,25℃在摇床中振荡培养,14 d 后测定培养液中胶质沥青的含量,测定结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出,培养 14 d 后,放线菌 A2016 对胶质沥青质的去除率最高,为 17.37%;其次为菌株 A2012、A2013,去除率分别为 16.17%、11.43%;效果最差的菌株为 A2017,去除率仅为 6.12%。可见,在液体培养中,放线菌 A2016、A2012 为降解胶质沥青质的优势菌株。

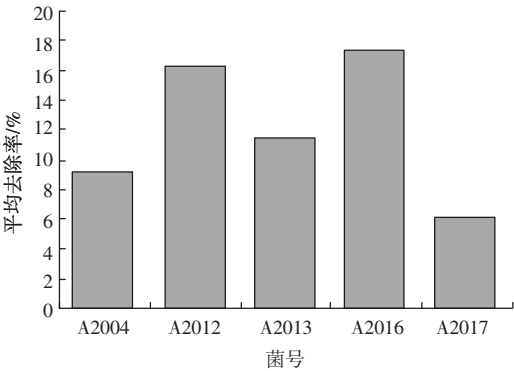


图 1 摇瓶试验中放线菌对胶质沥青质的去除率比较

Figure 1 The comparison of biodegrading rates of pectin and asphalt using actonomyces in shaking flask test

2.1.2 放线菌对土壤中胶质沥青质的降解

将放线菌菌液投加入胶质沥青污染土壤,在 14、28 和 42 d 采用重量法测定土壤中胶质沥青的含量,计算每一时期的去除率,试验结果如图 2 所示。土壤中的胶质沥青质在经过 14、28、42 d 处理,A2016 的去除率最高,分别为 33.01%、53.69%、54.98%,与液体培养试验相一致;42 d 后,菌株 A2004 去除率最低,为 24.48%。比较 3 个时期的去除率,放线菌对土壤中胶质沥青质的去除能力为 A2016> A2013 >A2012 > A2004> A2017。

在3个时期处理的比较中,除了菌株 A2004 和 A2017 去除率呈现波动,其他放线菌去除率都随处理时间有不同程度增长,这可能由于在处理中的环境因素影响了菌株对胶质沥青的降解。试验中所有放线菌在 0~14 d 期间去除率增长最大,可能是由于在处理污染土壤初期,环境中的营养、可利用碳源及菌株数量等因素使放线菌对污染物的降解活动处于活跃期;14~28 d 期间,去除率增长减小;28~42 d 期间,除了 A2017 外,其他放线菌对胶质沥青质去除率的增长不是很明显,基本趋于稳定,可能是因为土壤中的放线菌数量、营养物质含量减少,或污染物中简单组分或者说是容易被菌株利用的碳消耗殆尽引起放线菌对胶质沥青质的去除率趋于稳定。

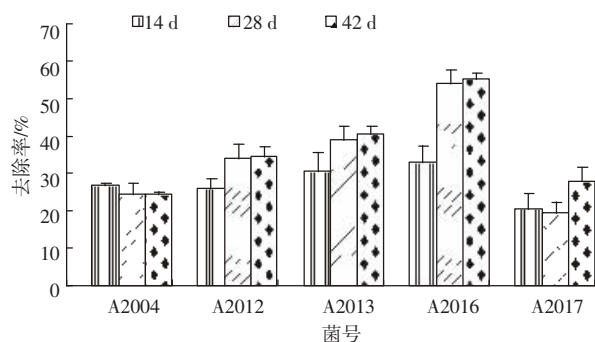


图2 放线菌对土壤中胶质沥青质的去除率比较

Figure 2 The comparison of biodegrading rates of pectin and asphalt using actinomycetes in soil

2.2 表面活性剂对放线菌降解率的影响

表面活性剂具有分散、增溶、乳化作用,在油污土壤的治理等领域具有良好的发展前景^[4]。本试验在放

线菌处理的污染土壤中加入表面活性剂(吐温-80),测定每一时期胶质沥青的去除率,并对放线菌与吐温-80 结合与仅加入放线菌对胶质沥青质的降解进行了比较,结果如图3、图4所示。

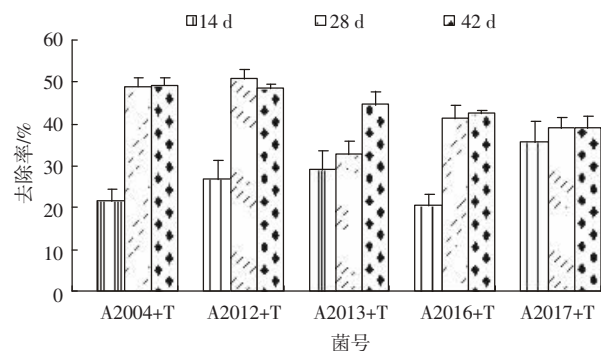


图3 放线菌结合表面活性剂(吐温-80)对土壤中胶质沥青质的去除率比较

Figure 3 The comparison of biodegrading rates of pectin and asphalt by actinomycetes and surfactant (Tween-80) added in soil

从图3中可以看到,14d时测定各处理的去除率中,A2017+T最高(35.74%),最低的为A2016+T(20.41%);0~14 d是放线菌对胶质沥青降解率增长最大的时期。A2004+T、A2012+T、A2016+T在14 d~28 d期间对土壤中胶质沥青质的去除率明显增高;28 d时A2012+T去除率最高,为50.70%。28~42 d期间,A2004+T、A2016+T去除率没有很明显的增加。A2012+T处理中,42 d时的去除率反而低于28d时的去除率,可能是因为0~28 d时A2012+T处理中菌数和营养等因素使其在此期间的去除率增长较快,而吐温-80的抑制作用不明显,但是随着时间的推移,

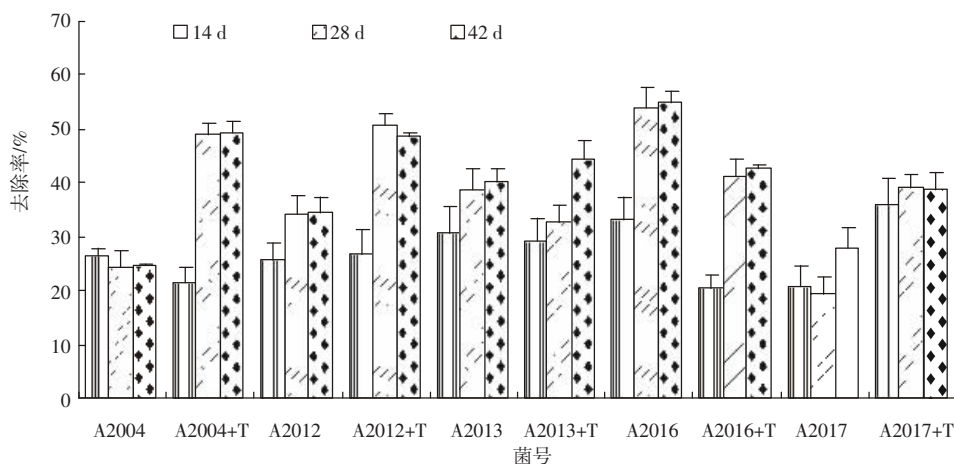


图4 放线菌与放线菌加表面活性剂对土壤中胶质沥青质的去除率比较

Figure 4 The comparison of biodegrading rates of pectin and asphalt between using actinomycetes and actinomycetes with surfactant (Tween-80) added in soil

A2012 菌数减少,土壤中营养消耗,使 A2012 对胶质沥青质的去除率变化不大,这时吐温-80 的抑制作用则表现得比较明显。

图 4 比较了 0 d~42 d 期间放线菌与放线菌+吐温-80 处理土壤中胶质沥青质的去除率。总体上看,放线菌 A2004、A2012、A2017 中投加吐温-80 处理胶质沥青质比不投加吐温-80 处理效果好,平均去除率分别高 14.71%、10.48%、15.25%;而 A2013、A2016 处理中加吐温-80 使平均去除率分别降低 1.08%、12.54%。说明表面活性剂在降解土壤中胶质沥青质时对不同放线菌有不同的影响。

0~14 d 期间,放线菌 A2004、A2013、A2016 处理中加吐温-80 没有使去除率增加;放线菌 A2012 处理中加吐温-80 和不加吐温-80 比较,去除率没有明显区别,而 A2017 处理中投加表面活性剂使胶质沥青的去除率提高 15.07%,说明表面活性剂对 A2017 去除土壤中胶质沥青有促进作用。

14~28 d 期间,不同的放线菌处理中其去除率发生变化,放线菌 A2004、A2012、A2017 处理中投加吐温-80 比不投加的去除率分别高 24.53%、16.73%、19.59%,而表面活性剂没有使 A2013、A2016 处理中对胶质沥青的去除率提高。

28~42 d 期间,除了 A2016 外,表面活性剂对其他 4 株放线菌处理土壤中胶质沥青的去除都呈现出促进作用。最明显的是投加吐温-80 使 A2004 处理的去除率提高 24.71%。

试验结果表明,表面活性剂吐温-80 在不同放线菌降解土壤胶质沥青过程中表现出不同的效应,所体现的促进与抑制效应机理还不明确。其促进作用可能是由于石油类污染物绝大多数组分是亲油疏水物质,而微生物降解油类物质主要是通过分泌胞内酶来实现其降解能力,油的转移率是生物降解过程中的控速步骤,表面活性剂具有增溶、乳化、分配烃类化合物在不同相中的比例作用,提高油的转移率,必然大大提高生物降解率^[5]。

关于抑制作用,张丽芳等研究发现添加表面活性剂对微生物的除油效果没有明显的影响,当表面活性剂的浓度较高时会对微生物的除油能力有较强的抑制作用^[6]。有关表面活性剂的抑制或毒性作用可能有两种:(1)表面活性剂与细胞膜的脂质物质相互作用,而破坏了细胞膜。(2)表面活性剂与酶或其他影响细胞

基本功能的蛋白质发生了反应^[7]。另外,虽然添加表面活性剂能在一定程度上提高有机物的脱附率,但受污染土壤的粘性及有机质含量较高,能与石油中大分子有机物结合,影响表面活性剂对污染物的进一步脱附^[2],以及表面活性剂很有可能还作为微生物的碳源,影响石油中大分子的降解。由于这些因素的作用,都会使除油率下降。

3 结论

(1)放线菌能够降解稠油污染土壤中的胶质沥青质,降解率最高的为 54.98%。

(2)土壤试验中,放线菌对胶质沥青质的降解随时间的推移而变化,0~14 d 期间是放线菌降解胶质沥青质的活跃期,14~42 d 期间,放线菌在处理污染土壤时去除率变化不大,可能受土壤中的营养、放线菌数量或可被放线菌利用的碳含量减少的影响。

(3)表面活性剂对不同种类的放线菌降解土壤中胶质沥青质的影响不尽相同,其中投加吐温-80 对放线菌 A2004、A2012、A2017 去除胶质沥青质有促进作用,分别提高 14.71%、10.48%、15.25%;对放线菌 A2016 处理则有阻碍作用;A2013 处理中,吐温-80 作用不明显。这也可能是因为本试验选择的表面活性剂具有特殊性。

(4)利用放线菌对稠油污染土壤中的胶质沥青质进行生物降解时,选择适宜的菌株并结合表面活性剂可以使除油效率得到显著提高。

参考文献:

- [1] 金 樑,顾宗谦,谢思琴,等. 石油污染土壤及地下水的生物修复进展[J]. 应用与环境生物学报, 1995, 5(Suppl): 130-135.
- [2] 张丽芳,姜承志,李东辉. 表面活性剂对土壤石油污染物微生物降解的影响[J]. 沈阳工业学院学报, 2001, 20(4).
- [3] National EPA. Analyses Method for Environmental Monitoring [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1986. 328-332 (in Chinese).
- [4] 易绍金,梅 平. 生物表面活性剂及其在石油与环保中的应用[J]. 湖北化工, 2002, 1: 25-26.
- [5] 徐亚同,史家梁,张 明. 生物修复技术的作用机理和应用[J]. 上海化工, 2001, 19: 4-7.
- [6] 张丽芳,肖 红,魏德洲. 表面活性剂对土壤石油污染物微生物降解的影响[J]. 辽宁化工, 2002, 31(12): 509-513.
- [7] Shonall Laha, Richard G Luthy. Inhibition of pheonanthrene mineralization by nonionic surfactants in spoil-water systems[J]. *Environ Sci Technol*, 1997, 25(11): 1920-1929.