

doi: 10.3969/j.issn.1762-3678.2009.06.004

石油降解菌剂的研制及其在石油污染土壤修复中的应用

胥九兵, 迟建国, 邱维忠, 陈贯虹, 王加宁, 高永超

(山东省科学院 生物研究所, 济南 250014)

摘要:用液态和固态相结合的方式对包含 2 种细菌的石油降解菌剂进行培养, 牛肉膏、蛋白胨作为液态培养基培养初级种子, 然后接种到草炭和麸皮的固态培养基中培养。分析温度、接种量、料水比、草炭与麸皮的比例、培养时间对固态培养的影响。制备的 BC-E 和 BC-I 2 种菌剂的活菌量分别达到 2.47×10^{11} 个/g 和 3.6×10^{10} 个/g。采用研制的菌剂对石油污染土壤进行修复实验, 1 个月污染土壤中的石油降解率可达到 45%。

关键词:石油降解菌; 石油污染; 土壤修复

中图分类号: Q938.1⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3678(2009)06-0021-04

Application of bacterial agent capable of degrading petroleum for remediation of oil-contaminated soil

XU Jiu-bing, CHIJian-guo, QU Wei-zhong, CHEN Guan-hong,

WANG Jia-ning, GAO Yong-chao

(Biological Research Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract: A kind of bacterial agent capable of degrading petroleum was developed by combined liquid culture and solid culture of a mixture of two strains BC-E and BC-I. The primary seed was cultivated on the beef-protein medium, and then the seed was inoculated into the solid medium containing turf and wheat bran. Temperature, inoculation amount, ratio of material to water, ratio of turf and wheat bran, and culture time were tested during the process. The maximum density of strains of BC-E and BC-I was 2.47×10^{11} CFU/g and 3.6×10^{10} CFU/g, respectively. The petroleum degrading rate reached 45% in the contaminated soil after one month of remediation.

Key words: petroleum degrading bacteria; petroleum contamination; soil remediation

随着石油开采量的日益增大, 在开采、运输、储藏以及事故性泄露中, 石油大量进入环境, 严重污染了土壤、地下水、河流和海洋。采用微生物修复石油污染的土壤, 是一项清洁环境的低投资、高效益、便于应用、发展潜力大的新兴技术^[1-3]。

国内外学者的研究大部分集中在石油降解菌株的筛选、石油降解机理以及土壤修复工艺方面^[4-6], 这些研究逐步证实了石油污染土壤微生物修复的可行性, 但很少涉及菌剂生产的研究, 本文在前人研究的基础上, 对石油降解菌剂的生产

收稿日期: 2009-02-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA061201); 山东省科技发展计划资助项目 (2008GG10006004)

作者简介: 胥九兵 (1982—), 男, 山东莱芜人, 实习研究员, 硕士, 研究方向: 环境微生物, E-mail: xujb321@163.com

工艺展开研究,以从石油污染的盐碱地土壤中筛选的2株石油降解菌为基础,采用麸皮和草炭作为固态培养的营养源和载体,研制1种活菌数高、适合盐碱地土壤改良的微生物菌剂。其中麸皮是优良的固态发酵天然原料,含有丰富的易于微生物利用的碳氮源、维生素和金属离子;草炭中富含有机质和腐殖酸,保水通气,是优良的土壤改良产品^[7-9]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

从胜利油田采油井附近污染土壤中筛选获得2株细菌,其中菌株BC-E为铜绿假单胞菌,能分泌表面活性剂鼠李糖脂,使石油均匀分散到水相中;菌株BC-I为蜡样芽孢杆菌,具有高效的石油降解性能。两株菌复合使用,能显著增加石油与菌株的接触面,提高石油降解率。

1.1.2 培养基

种子培养基(质量分数):牛肉膏0.3%,蛋白胨0.5%,NaCl0.5%。pH7.0,121 灭菌15 min。

固态培养基:麸皮10g,草炭10g,加水20mL。pH自然,121 灭菌15 min。

1.1.3 土样

油田采油井附近的石油污染土壤,含油率2.2%。

1.1.4 仪器

pH计,索氏提取器,烘箱,培养箱,灭菌锅,摇床,超净台等。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种培养

将石油降解菌接入种子培养基,30 培养20 h后,取4 mL种子液加入16 mL无菌水中混匀,再倒入20 g固态培养基中,混匀,30 培养2~3 d。

1.2.2 石油降解实验

将菌剂BC-E和BC-I用草炭稀释到细菌数量相同的数量级,等质量混匀。向1 kg石油污染土壤中加入复合菌剂100 g, NH_4NO_3 和 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 混合(质量比5:1)的肥料30 g,混匀,保持20%的含水量,室温,每周测定1次石油含量,计算石油降解率^[4,10-11]。

1.2.3 pH与细菌数量测定

称取10 g菌剂加到90 mL蒸馏水中,用pH计测定混合液的pH,再稀释到合适的质量浓度,用平板计数法测定活菌数量。

1.2.4 石油降解率测定

将土样放入75 烘箱中干燥12 h至恒质量,粉碎过筛。称取一定质量的土样,用定性滤纸包好置于带塞磨口的索氏提取器中,准确称取50 mL圆底烧瓶质量(精确到0.0001 g),倒入约1/2体积的氯仿,90 的水浴中热浸,直至虹吸管内氯仿颜色为无色。再将平底烧瓶中浸有石油的氯仿90 蒸馏,之后将烧瓶置于100 烘箱中烘干,称总质量,增加的质量即为土样中剩余石油质量^[5-6]。石油降解率的计算公式

$$Y = \frac{m_2 - m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:Y为石油降解率,%; m_1 为土样中剩余石油质量,g; m_2 为土样中原有石油质量,g。

2 结果与讨论

2.1 菌剂的研制

微生物都有适合自身生存、生长的pH范围,pH的稳定对于保持菌剂中的活菌数量至关重要。在石油降解菌剂研制过程中,考察不同因素对菌剂pH和细菌数量的影响。

2.1.1 温度对菌剂的影响

把BC-E和BC-I按10%的接种量分别接入麸皮和草炭质量比为1:1的培养基中,置于不同温度中,培养2 d,结果见图1。

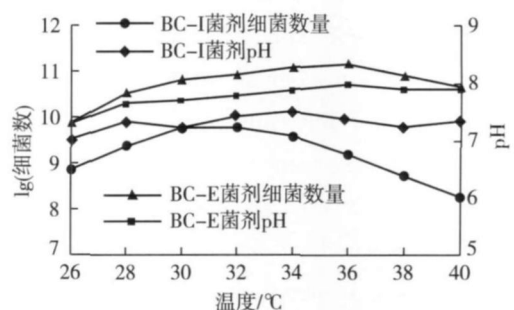


图1 温度对BC-E和BC-I菌剂的影响

Fig 1 Effects of temperature on BC-E and BC-I bacterial agents

由图1可知,随温度升高,2种菌剂的pH都略有升高,其中BC-E菌剂的pH稳定在7.5~7.9之间,BC-I菌剂的pH稳定在7.2~7.5之间。BC-E菌剂中细菌数量在36 时最高,达到了 1.45×10^{11} 个/g,菌株BC-E的最佳培养温度为36 ;BC-I菌剂中细菌数量在32 时最高,达到了 6.3×10^9 个/g,菌株

BC-I的最佳培养温度为 32 。

2.1.2 接种量对菌剂的影响

把 BC-E和 BC-I分别按 5%、10%、15%、20% 的接种量接入麸皮和草炭质量比为 1 1的培养基中,培养 2 d,结果见图 2。

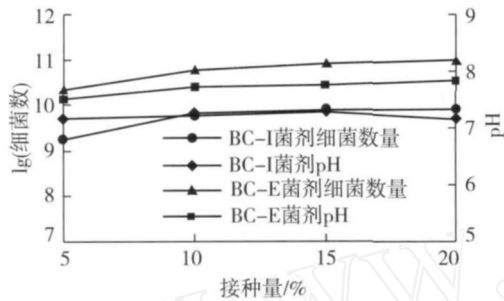


图 2 接种量对 BC-E和 BC-I菌剂的影响

Fig 2 Effects of inoculation amount on BC-E and BC-I bacterial agents

由图 2可知,不同接种量对菌剂的 pH基本上没有影响,而对细菌生长的延滞期影响较大,接种量的加大,能够缩短菌种生长的延滞期,从而缩短菌种培养时间。当细菌接种量为 5%时,培养 2 d的菌体数量比接种大于 10%时少很多;当接种量大于 10%时,BC-E菌剂中细菌数量由 7.1×10^{10} 个/g 增加到 9.6×10^{10} 个/g,BC-I菌剂中细菌数量由 7.3×10^9 个/g 增加到 9.2×10^9 个/g,均增长缓慢,因此可以确定最佳接种量为 10%。

2.1.3 料水比对菌剂的影响

控制培养基的料水比为 0.6 1、0.8 1、1 1、1.2 1、1.4 1,分别接入 BC-E和 BC-I培养 3 d,结果见图 3。

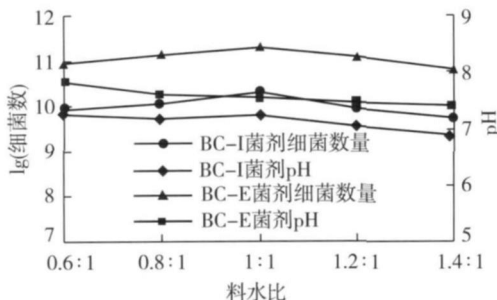


图 3 料水比对 BC-E和 BC-I菌剂的影响

Fig 3 Effects of ratio of material to water on BC-E and BC-I bacterial agents

由图 3可知,不同的料水比对菌剂的 pH影响不大。随着料水比的增加,细菌数量逐渐增大,在

料水比为 1 1时,2种菌剂的细菌密度都达到最大值,而继续增加料水比时,过多水分限制了培养基中空气的流通,对菌体生长不利。因此培养基的料水比采用 1 1。

2.1.4 草炭和麸皮的不同比例对菌剂的影响

调整草炭与麸皮之间的比例为 0 4、1 3、2 2、3 1、4 0,分别接入 BC-E和 BC-I培养 3 d,结果见图 4。

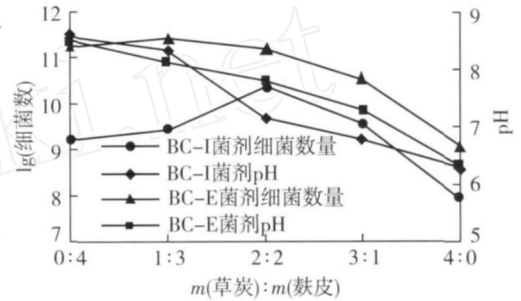


图 4 草炭与麸皮比例对 BC-E和 BC-I菌剂的影响

Fig 4 Effects of ratios of turf and wheat bran on BC-E and BC-I bacterial agents

由图 4可知,培养基中全为草炭时,菌剂的 pH低于 7.0,细菌数量分别只有 1.2×10^9 个/g 和 9×10^7 个/g,说明草炭中的有机质营养不能满足 BC-E和 BC-I的生长要求。培养基中全为麸皮时,2种菌剂的 pH都大于 8.0,散发出氨气的味道,说明培养基中能被微生物利用的 C源不足,影响了微生物在培养基中的生长,细菌数量略有减少。考虑到在石油降解中要限制易于利用的 C源含量,在种子培养时,不再考虑额外添加 C源。在草炭与麸皮的比例为 1 3时,BC-E数量最多,达到了 2.35×10^{11} 个/g;在草炭与麸皮的比例为 2 2时,BC-I细菌数量最多,达到了 2.5×10^{10} 个/g。

2.1.5 培养时间对菌剂的影响

以 10%的接种量将 BC-E接入草炭与麸皮比例为 1 3的培养基中,将 BC-I接入草炭与麸皮比例为 2 2的培养基中,进行培养,每隔 0.5 d测 1次菌落数和 pH变化,实验结果见图 5。

由图 5可知,随着培养时间的延长,细菌数量逐渐增多,培养基的 pH逐步增大。BC-E在第 3 d时能达到 2.47×10^{11} 个/g,第 4 d以后,pH 超过 8.0 时,对细菌抑制较大,数量开始减少。BC-I在第 2.5 d时能达到 3.6×10^{10} 个/g,此后细菌几乎不再增长。因此分别可以在第 3 d和第 2.5 d终止 BC-E 和 BC-I的培养。

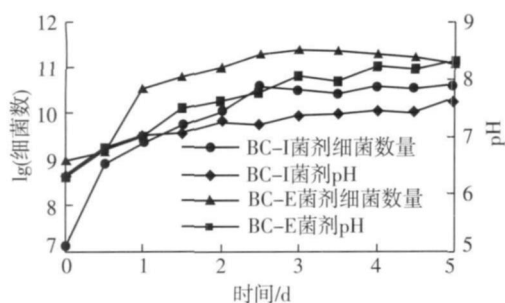


图5 培养时间对 BC-E和 BC-I菌剂的影响

Fig 5 Effects of time on BC-E and BC-I bacterial agents

2.2 菌剂应用

由上面实验可以得到,BC-E菌剂中细菌数量较多,达到了 10^{11} 数量级;BC-I菌剂中细菌数量相对较少,达到了 10^{10} 数量级。可将这2种菌剂分别用草炭稀释100倍和10倍(保持 10^9 个/g左右的菌种数),以质量比1:1混合,以10%的接种量添加到石油污染土壤中,测得土壤中石油和细菌含量变化见图6。

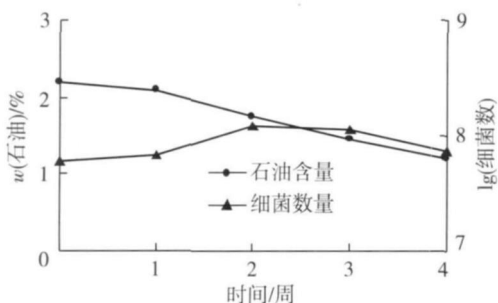


图6 土壤中石油和细菌含量变化

Fig 6 Changes of petroleum and bacterial concentration in soil

由图6可知,土壤中的细菌数量在第1周时变化不大,第2周开始升高,第3周以后减少。土壤中石油在微生物作用下得到逐步降解,含量从2.20%降低到1.21%,降解率为45%。随着时间的延长,石油降解可能会变得缓慢,一方面是由于易于被微生物利用的石油组分的减少,另一方面则是土壤中营养成分减少,细菌代谢的有害成分增加。具体情况还需要进一步的测定研究,改善修复工艺,发挥菌剂的最大效力。

3 结论

采用草炭和麸皮固态培养菌种,当培养温度36℃、接种量10%、料水比1:1、草炭与麸皮的质量

比为1:3,培养时间3d时,BC-E密度最大,达到 2.47×10^{11} 个/g;当培养温度32℃、接种量10%、料水比1:1、草炭与麸皮的质量比为2:2,培养时间2.5d时,BC-I密度最大,达到 3.6×10^{10} 个/g。在石油降解中,要使土壤中有效细菌数量达到 10^8 个/g,可将2种菌剂分别稀释100倍和10倍后混合使用。在石油污染土壤中添加菌剂为10%时,修复1个月,石油降解率达到45%。

石油降解菌剂的应用受外界因素影响很大,温度的四季昼夜变化,土壤湿度的高低,盐碱性的差异,阳光的照射,空气的流通,土壤中其他生物的存在都会不同程度地影响到菌剂对石油的降解能力。因此在实际应用时还需要研究菌剂的最佳使用方法,对发挥菌剂的最大效力至关重要。

参考文献:

- [1] Zappi M E, Rogers B A. Bio-slurry treatment of a soil contaminated with low concentrations of total petroleum hydrocarbon[J]. Journal of Hazardous Material, 1996, 46(1): 1-12.
- [2] James B R. Remediation-by-reduction strategies for chromate-contaminated soil[J]. Environ Geochem Health, 2001, 23: 175-179.
- [3] Rike A G. In situ biodegradation of petroleum hydrocarbons in frozen arctic soil[J]. Cold Regions Sci Tech, 2003, 37(2): 97-101.
- [4] 张宝良. 油田土壤石油污染与原位生物修复技术研究[D]. 大庆: 大庆石油学院, 2007.
- [5] 李超敏, 王加宁, 邱维忠, 等. 高效降解石油细菌的分离鉴定及降解能力的研究[J]. 生物技术, 2007, 8(4): 80-82.
Li Chaomin, Wang Jianing, Qiu Weizhong, et al. Isolation and identification of highly efficient oil-degrading bacteria and study of their degradation capability[J]. Biotech, 2007, 8(4): 80-82.
- [6] 李颖. 石油污染土壤的生物修复[D]. 北京: 北京化工大学, 2004.
- [7] 中国科学院沈阳应用生态研究所. 一种降解石油固体菌剂的制备方法: 中国, 1382758A [P]. 2002-12-04.
- [8] 中国科学院化工冶金研究所. 固态发酵生产蜡芽孢杆菌微生物生态制剂的方法: 中国, 1332014A [P]. 2002-01-23.
- [9] 山东科学院生物研究所. 降解石油污染物及石油产品的固态微生物菌剂及制备方法: 中国, 101050435A [P]. 2007-10-10.
- [10] 张玲, 李铁民, 马汐萍, 等. 复合微生物菌剂在剩余污泥堆肥中的作用研究[J]. 微生物杂志, 2007, 27(6): 48-50.
Zhang Ling, Li Tienmin, Ma Xiping, et al. Function of complex microbial community on surplus sludge composting process[J]. J Microbiol, 2007, 27(6): 48-50.
- [11] 于勇勇, 丁爱中, 欧阳威, 等. 微生物菌剂强化处理油砂[J]. 化工环保, 2006, 26(3): 218-223.
Yu Yongyong, Ding Aizhong, Ouyang Wei, et al. Enhanced treatment of oil sand by dominant bacteria[J]. Environ Protect Chem Ind, 2006, 26(3): 218-223.