

石油污染土壤生物修复菌Z₁a-B的分离 鉴定与调控效应研究*

司美茹 江翠翠 李桂芝 赵云峰
(曲阜师范大学生命科学学院, 山东 曲阜 273165)

摘要 从山东东营胜利油田附近的石油污染土壤中分离筛选得到一株高效石油降解菌Z₁a-B,通过菌落形态及显微镜个体形态观察对其初步鉴定到属,并采用气相色谱/质谱(GC/MS)法分析了Z₁a-B的石油降解性能,采用投加石油降解菌、调节土壤N、P含量和优化环境因素等措施,进行了为期60 d的石油污染土壤室外自然堆制生物修复实验。结果表明,Z₁a-B为链霉菌属白孢类群,其摇瓶培养的石油降解率为66.4%;Z₁a-B有着很宽的烷烃降解谱;N、P最佳的添加量组合为KNO₃ 2.50 g/kg、K₂HPO₄ 0.35 g/kg,即N/P(质量比)为5.57:1.00,此时的石油降解率达63.5%,土壤脱氢酶活性达最高值,为2.99 μL/g;石油降解的最佳环境条件为:将石油质量分数为3.3%的100 g土样调节pH至8.5后,装入容积为300 mL的锥形瓶中灭菌,再接种孢子密度为2.7×10⁸个/mL的菌剂5.5 mL,于28℃下进行生物降解,在此条件下的石油降解率可达76.5%;土壤脱氢酶活性的测定结果可以作为检验石油污染土壤生物修复效果的重要指示指标之一;室外自然堆制生物修复实验中,添加菌剂、锯末、秸秆以及N、P后,石油降解率可达69.9%。总体来说,室外自然堆制生物修复是一种投资少、见效快、治理效果较好的石油污染土壤治理方法。

关键词 石油降解 筛选 生物修复 降解条件

Isolation, identification of oil degrading strain Z₁a-B and its application in oil-polluted soil bioremediation Si Meiru, Jiang Cuicui, Li Guizhi, Zhao Yunfeng. (College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu Shandong 273165)

Abstract: High-efficient oil-degrading Z₁a-B strain was isolated from the oil-contaminated soil which collected from Shengli oil field in Dongying Shandong. The strain was identified as Albosporus in Streptomyces based on its morphology and cultural characteristics, and the oil degrading capacity of Z₁a-B was analyzed by GC/MS. The 60 days of indoor bioremediation experiment were conducted on oil polluted soil to investigate the effect of experiment conditions on oil degradation efficiency. The results showed that Z₁a-B presented perfect alkane degrading capacity with oil degradation ratio of 66.4% in flask cultivation. The optimum nutrient addition was KNO₃ of 2.50 g/kg and K₂HPO₄ of 0.35 g/kg, correspond to N/P weight ratio of 5.57:1.00. under this condition, oil degradation ratio could reach 63.5% and dehydrogenase activity reached to 2.99. the highest oil degradation rate of 76.5% was found when inoculating 5.5 mL suspension (2.7×10⁸ entries spores per milliliter) into 100 g oil-contaminated soil sample (oil mass ratio of 3.3%, pH=8.5) at 28℃. Dehydrogenase activity could selected as test index for evaluation the bioremediation performance. In the outdoor natural bioremediation experiment, composting the oil-contaminated soil with adding microbial agent, sawdust stalk and nutrient, the oil degradation rate could reach 69.9%.

Keywords: oil degradation; screening; bioremediation; degrading condition

石油是由上千种性质不同的化合物组成的混合物,一旦进入环境就难以去除,长时间的残留会对土壤微生物和植物生态系统,甚至是地下水产生危害^[1]。在石油的生产与输送过程中,因井喷、泄漏及沉降排放等引起的土壤石油污染很难治理^[2],土壤石油污染治理一直是当今的环境保护难题之一。20世纪80年代发展起来的微生物修复技术由于节约能源、投资少、运行费用低、操作简单、无二次污染等优点已成为土壤石油污染治理的主要方向之一。但

被石油污染的土壤具有强烈的疏水性,N、P元素严重缺乏,这些微生态环境非生物因子都会严重影响生物修复系统的微生物活性,成为微生物降解石油的限制因素^[3]。因此,如何调控石油污染土壤的微生态环境非生物因子,成为提高土壤石油污染生物修复效率的关键问题。

近年来,国内外一些学者的研究结果表明^[4-6],通过添加N、P营养物和对微生态环境非生物因子进行优化均可提高石油的降解率,但对土壤石油污

第一作者:司美茹,女,1977年生,硕士,讲师,主要从事放线菌资源的应用研究。

* 山东省自然科学基金资助项目(No. Y2008D05)。

染降解环境的优化研究还较少。笔者从山东东营胜利油田附近的石油污染土壤中分离筛选得到一株高效石油降解菌,采用气相色谱/质谱(GC/MS)法分析了其石油降解性能;采用投加石油降解菌、调节土壤N、P含量和优化环境因素等措施,进行了为期60 d的石油污染土壤室内强化生物修复实验,以便为石油污染土壤生物修复实际应用工作的开展提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样

实验土样采自山东东营胜利油田附近长期受石油污染的土壤。土样的基本性质见表1。

表1 土样的基本性质
Table 1 Basic characteristics of the test soil

项目	pH	速效 N 质量浓度 (mg·kg ⁻¹)	速效 P 质量浓度 (mg·kg ⁻¹)	石油质 量分数/%
数值	6.5	63.5	3.6	3.3

1.1.2 培养基

石油/无机盐液体培养基: NH₄NO₃ 2.0 g, K₂HPO₄·3H₂O 1.97 g, KH₂PO₄ 3.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, 无水 CaCl₂ 0.01 g, 乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA·2H₂O) 0.01 g, 石油(胜利油田原油) 0.2~1.0 g, H₂O 1 000 mL, pH未调节。

油平板: 往石油/无机盐液体培养基中加入1.6%(质量分数)的琼脂, 制成油平板。

高氏一号琼脂培养基: 可溶性淀粉 20.0 g, KNO₃ 1 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 琼脂 16 g, H₂O 1 000 mL。

以上均按文献[9]配置。

1.2 实验方法

1.2.1 石油降解菌的富集培养

以无菌方式称取供试土样 5.0 g, 接入 45 mL 石油/无机盐液体培养基中, 置于 28 ℃、180 r/min 恒温摇床富集培养 7 d。此后按 5%(体积分数, 下同)的接种量取前一次富集液接入新鲜的石油/无机盐液体培养基中, 再进行 3 次富集、驯化, 每次 7 d。3 次富集培养所用的石油/无机盐液体培养基中的石油质量浓度逐步提高, 分别为 1.5、2.0、2.5 g/L。

1.2.2 石油降解菌的分离筛选

采用稀释平板法^[10]分离石油降解菌。将最后一次所得富集培养液按十倍稀释法稀释, 取 10⁻⁴、

10⁻⁵、10⁻⁶ 3 个稀释度液各 0.1 mL 涂布于油平板上, 置于 28 ℃恒温培养箱内培养, 每隔 12 h 观察石油降解菌的生长情况, 每个稀释度液设 2 个重复实验。待油平板上长出菌落时, 选取不同颜色及形态的优势单菌落, 在油平板上进行多次划线分离, 以纯化得到形态一致的纯化菌株; 将此纯化菌株保存于高氏一号琼脂培养基上进行进一步筛选、活化, 得到菌株, 待用。

1.2.3 石油降解菌的培养及石油降解率测定

将筛选并活化的菌株制成孢子悬液, 按十倍稀释法将孢子悬液稀释后, 得到菌剂, 通过血球计数板确定菌剂的孢子密度; 取 3 mL 菌剂接入装有 50 mL 石油/无机盐液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 28 ℃、180 r/min 培养 14 d, 制得培养发酵液 1, 进行石油降解率测定^[11]。以未接种菌剂、接入 3 mL 无菌水的石油/无机盐液体培养基为空白对照(CK1)。

1.2.4 石油组分分析

在 250 mL 培养瓶中放入 50 mL 石油/无机盐液体培养基(石油质量浓度为 1.0 g/L), 接种菌剂 5%(体积分数, 下同), 于 28 ℃、180 r/min 摇床培养 14 d, 制得培养发酵液 2。

采用 HP5890SERIES II 气相色谱仪和 HP5972 质谱仪进行降解前后的石油组分分析。培养发酵液 2 用 20 mL 石油醚萃取后进行 GC/MS 分析。GC/MS 条件: HP-5 石英毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), He 载气, 进样口温度 290 ℃, 检测器温度 300 ℃; 升温顺序: 初始 80 ℃, 恒温 5 min 后以 3 ℃/min 升至 290 ℃, 并保留 10 min。

1.2.5 石油降解菌的鉴定

对筛选出的菌株参照文献[12, 13]进行菌落形态及显微镜个体形态观察, 初步鉴定到属。

1.2.6 石油污染土壤的生物修复模拟实验

(1) N、P 的供给与平衡

选择 KNO₃ 和 K₂HPO₄ 作为初始的 N 源和 P 源, 进行无重复双因素实验, 以确定石油降解的最佳 N、P 添加比例, 实验设计见表 2。以不添加 N、P, 不接种菌剂作为空白对照(CK2)。其他条件: 菌剂接种量为 5%, 温度为 25 ℃, 锥形瓶容积 250 mL, N、P 均一次添加。

(2) 最佳石油降解环境因素的确定

在确定最佳 N、P 添加比例的基础上, 选择温度、pH、菌剂接种量及通气量为因素, 设计 4 因素 3 水平正交实验, 实验设计见表 3。

表2 无重复双因素实验设计方案
Table 2 Factors and levels of no repeated two-factor experimental

编号	因素	
	KNO ₃ 添加量 (g · kg ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ 添加量 (g · kg ⁻¹)
1	0	0
2	0.85	0.20
3	1.25	0.35
4	2.50	0.50
5	3.75	0.65
6	5.00	0.80

表3 L₉(3⁴)因素水平设计方案
Table 3 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	温度 (A)/℃	pH (B)	菌剂接种量 (C)/%	通气量 (D)/mL
1	28	7.5	3.5	150
2	30	8.5	4.5	300
3	35	9.5	5.5	500

(3) 室内生物修复模拟实验

准确称取供试土样 100 g 置于锥形瓶中,在 121℃ 灭菌 1 h,冷却后按表 2 及表 3 进行处理。处理后,用无菌水将土样含水率调至 20%(质量分数,下同),每天加无菌水 2 次,使含水率保持在 20%,每次均进行搅拌,并在土壤中形成直径为 2 cm 的通气孔。接种菌剂的孢子密度为 2.7×10^8 个/mL。以不添加 N、P,不接种菌剂,不调节 pH 和温度作为空白对照(CK3)。于第 60 天提取土样,测定石油降解率和土壤脱氢酶活性。

(4) 石油降解率测定

石油降解率参照文献[2]方法测定。

(5) 脱氢酶活性测定

土壤脱氢酶活性采用改进的 TTC 脱氢酶活性测定法测定^[14]。

1.2.7 石油污染土壤的室外自然堆制生物修复实验

表4 石油污染土壤的室外自然堆制生物修复实验设计方案

Table 4 Experiment conditions of composting test

编号	土样 含水率/%	土样用量 /kg	菌剂用量 /mL	锯末用量 /g	秸秆用量 /g	KNO ₃ 添加量 (g · kg ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ 用量 (g · kg ⁻¹)
1(CK4)	20	2					
2	20	2	110				
3	20	2	110			2.50	0.35
4	20	2	110	120	30	2.50	0.35

表5 Z₁a-B菌株的石油降解情况

Table 5 The degradation ratio of oil by Z₁a-B strain

菌株	生长情况	初始石油质量/g	残留石油质量/g	石油降解率/%
Z ₁ a-B	培养液中的石油逐渐乳化,石油分散效果较好;培养液出现浑浊、变为白色,几乎看不见油膜;晃动时培养液不挂壁	0.912	0.306	66.4
CK1	培养液中石油未乳化,呈油膜状	0.245	0.200	18.4

将供试土样与菌剂、锯末、秸秆以及 N、P 进行 4 组搭配组合(见表 4)后,堆放于 20 cm×15 cm×10 cm 花盆中进行室外自然堆制生物修复实验。以不接种菌剂,不添加锯末、秸秆以及 N、P 作为空白对照(CK4)。

实验条件:pH 为 8.5;每天加无菌水 2 次,使土样含水率保持在 20%,每次均进行搅拌,并在土壤中形成 5 个和花盆出水孔相通的通气孔;接种菌剂的孢子密度为 2.9×10^8 个/mL。实验时间为 2009 年 5 月 15 日至 7 月 15 日。

2 结果与分析

2.1 石油降解菌的分离筛选

经过富集、驯化及纯化后,筛选得到一株高效石油降解菌,命名为 Z₁a-B。Z₁a-B 的生长情况及石油降解性能见表 5。由表 5 可见,Z₁a-B 摇瓶下培养的石油降解率为 66.4%,是 CK1(18.4%)的近 3.6 倍。在石油降解菌的培养过程中,发现培养到第 10 天时,Z₁a-B 菌株的菌丝会与石油聚集成团,而水相中几乎看不到分散的油膜。Z₁a-B 菌株的这一特征使得其在石油的生物降解中具有优越性,在降解过程中,可通过机械方法将菌株和石油同时去除。

2.2 Z₁a-B 的鉴定

对 Z₁a-B 分别采用菌落形态和显微镜个体形态观察进行初步鉴定。观察高氏一号琼脂培养基上的菌落形态(见图 1):孢子堆呈白色、粉状,营养菌丝为浅褐色,无色素,菌落较小,直径为 0.5 cm。观察显微镜下个体形态(见图 2):营养菌丝均匀、发达、分枝,气生菌丝均匀、发达,孢子丝丰茂且为螺旋状、分化形成长的孢子链,孢子数目>18 个,孢子呈球状。按一般分类方法,参照《放线菌鉴定手册》和《链霉菌鉴定手册》,初步鉴定 Z₁a-B 菌株为链霉菌属白孢类群。



图 1 Z₁a-B在高氏一号琼脂培养基上的菌落形态
Fig. 1 Cultural characteristics of Z₁a-B on gauze No. 1 agar

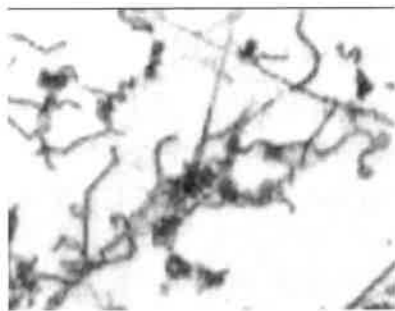


图 2 Z₁a-B的显微镜个体形态
Fig. 2 Monomorph of Z₁a-B in microscope

2.3 Z₁a-B降解前后的石油组分分析

Z₁a-B降解前后的石油组分分析见图 3。由图 3 可见,Z₁a-B降解前后,石油中烃类组分的丰度差别较大。降解前,烃类组分分布广,n-C₁₂~n-C₃₁的含量相对较高;经Z₁a-B降解后,n-C₁₂~n-C₁₈、n-C₂₁~n-C₃₄烃类组分含量显著降低,几乎彻底被降解,只有 n-C₁₉、n-C₂₀含量变化不大,表明Z₁a-B有着很宽的烷烃降解谱。

2.4 N、P 供给与平衡的无重复双因素实验

2.4.1 N、P 添加量对石油降解率的影响

微生物细胞的化学组成和营养类型决定了细胞的营养要求。对石油污染土壤进行处理时,石油成为石油降解菌可利用的生长元素来源,但石油主要提供的为C、H元素,其他元素(特别是N、P)的缺

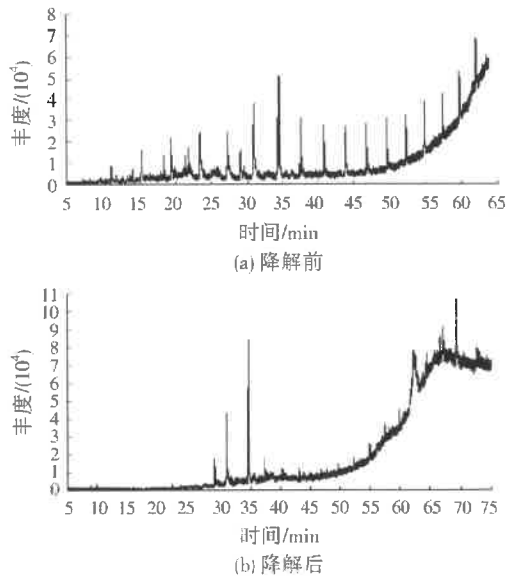


图 3 Z₁a-B降解前后石油的 GC/MS 谱图
Fig. 3 GC/MS spectra of oil before and after degradation by strain

乏可能导致石油难以被降解。由表 1 可见,土样中的速效 N、速效 P 含量较低,这可能成为石油降解菌降解石油的限制因子。N、P 添加量与石油降解率的无重复双因素实验结果见表 6。经测定,CK2 的石油降解率为 3.7%。

由表 6 可见,N、P 的缺乏直接限制了Z₁a-B对石油的降解,当不添加 N、P 时,石油降解率仅为 17.8%;而单添加适量 N 或 P 和同时添加 N、P 后,石油降解率明显升高,且 N、P 同时适量添加的石油降解效果要比单添加 N 或 P 的好;但 N、P 添加过量又会抑制Z₁a-B对石油的降解,即 N、P 的添加量与石油降解率之间不呈简单的正比例关系,而是存在一个经济合理的最佳添加比例。本研究中,N、P 最佳的添加组合为 KNO₃ 2.50 g/kg、K₂HPO₄ 0.35 g/kg,即 N/P(质量比,下同)为 5.57 : 1.00,这与微生物细胞元素组成中N/P(4.67 : 1.00)很

表 6 关于 N、P 添加量与石油降解率的无重复双因素实验结果
Table 6 Effect of N, P addition on oil degradation

项目	KNO ₃ 添加量/(g · kg ⁻¹)						K3	K4	R2
	0	0.85	1.25	2.50	3.75	5.00			
K ₂ HPO ₄ 添加量 (g · kg ⁻¹)	0	17.8	33.4	41.6	56.7	36.5	31.6	2.176	0.055
	0.20	31.7	36.6	47.8	57.3	37.2	32.3	2.429	0.405
	0.35	35.5	35.8	44.5	63.5	38.6	33.1	2.510	0.418
	0.50	31.9	34.5	42.7	59.2	41.3	34.5	2.441	0.407
	0.65	29.6	32.3	41.1	57.4	38.9	36.7	2.360	0.393
	0.80	27.7	30.9	38.9	55.5	37.6	35.8	2.264	0.377
K1		1.742	2.035	2.566	3.496	2.301	2.040		
K2		0.290	0.339	0.428	0.583	0.384	0.340		
R1		0.293							

相近,此时的石油降解率达63.5%。有关资料表明,当环境中N/P为5.00:1.00~6.00:1.00时,比较适宜微生物的生长。但本研究中还发现,当N/P在5.00:1.00~6.00:1.00时,石油的降解率也会很低,如N、P的添加组合为KNO₃ 5.00 g/kg、K₂HPO₄ 0.65 g/kg(即N/P为5.86:1.00)时,石油降解率仅为36.7%。这可能是由于N、P添加过量,反而使石油降解菌可利用的有效碳源缺乏,不利于其对石油的生物降解。因此,在进行石油污染土壤生物修复时,N、P的添加要根据环境中石油污染物的浓度确定,使C/N(质量比)、C/P(质量比)及N/P接近微生物的需要。

2.4.2 N、P添加量对土壤脱氢酶活性的影响

土壤脱氢酶活性的提高有利于石油的生物降解,脱氢酶活性可以用来表征石油降解菌的活性。关于N、P添加量对土壤脱氢酶活性影响的无重复双因素实验结果见表7。由表7可见,单添加N或P和同时添加N、P后,土壤脱氢酶活性明显高于未添加的,但N、P添加过量又会抑制土壤脱氢酶活性,可见N、P添加量是影响土壤脱氢酶活性的重要因素。当N、P的添加量组合为KNO₃ 2.50 g/kg、K₂HPO₄ 0.35 g/kg时,土壤脱氢酶活性达最高值,为2.99 μL/g(以H⁻计,下同)。

由表7还可见,N对脱氢酶活性的影响(R1为0.015)要高于P(R2为0.003)。此外,结合表5和表6进行土壤脱氢酶活性与石油降解率的相关性分析,得到相关系数为0.97。由此可见,土壤脱氢酶活性能较好地表征土壤石油污染生物降解过程中石油降解菌的活性状态,进而表征石油的降解性能。

2.5 最佳石油降解环境条件

最佳的石油降解环境条件正交实验结果见表8。经测定,CK3的石油降解率为61.3%,土壤脱氢酶活性为1.98 μL/g。由表8可见,根据极差分析结

果,影响石油降解效果的4个环境因素中,对石油降解率与土壤脱氢酶活性影响大小依次均为pH>通气量>菌剂接种量>温度。各环境因素对石油降解率与土壤脱氢酶活性的影响具有高度一致性,由此验证土壤脱氢酶活性完全可以反映Z₁a-B的石油降解性能,表明在石油降解过程中,土壤脱氢酶活性的测定结果可以作为检验石油污染土壤的生物修复效果的重要指示指标之一。

石油降解的最优环境因素组合为A₁B₂C₃D₂,即将石油质量分数为3.3%的100 g土样调节pH至8.5后,装入容积为300 mL的锥形瓶中灭菌,再接种孢子密度为2.7×10⁸个/mL的菌剂5.5 mL,于28℃下进行生物降解。采用最优的环境因素组合进行验证实验,测得的石油降解率高于正交实验中的最高降解率(71.7%,见表8),达到76.5%。

2.6 室外自然堆制生物修复的石油降解效果

石油污染土壤经室外自然堆制生物修复后的石油降解效果见图4。由图4可见,CK4中的含油量变化较小,经过60 d的处理后,石油质量分数基本稳定在2.8%,石油降解率仅为15.7%,石油的降解主要依靠的是土样中的土著微生物;添加菌剂后,石油降解率上升明显,经过60 d的处理后,土样中石油质量分数为1.8%左右,石油降解率为45.8%,说明添加的外源微生物发挥了较好的石油降解效果;在添加锯末、秸秆、菌剂及N、P后,石油降解率明显高于其他组,经过60 d的处理,土样中石油质量分数为1.0%左右,石油降解率为69.9%。

在堆制的初期阶段,在锯末、秸秆、菌剂及N、P的协同下,土样中石油含量明显下降,而其他组的石油含量下降较缓慢,表明在锯末、秸秆的作用下,石油降解菌能更快地适应环境。锯末、秸秆不仅有助于提高土壤的保水性,增加石油降解菌与石油的接触机会,还可增加一定的土壤通气性。锯末、秸秆还

表7 关于N、P添加量对土壤脱氢酶活性影响的无重复双因素实验结果

Table 7 Effect of N, P addition on dehydrogenase activity

μL/g

项目	KNO ₃ 添加量/(g·kg ⁻¹)						K3	K4	R2
	0	0.85	1.25	2.50	3.75	5.00			
0	0.96	1.42	1.97	2.61	1.86	1.34	0.101 6	0.017 0	0.003
K ₂ HPO ₄	0.20	1.36	1.71	2.18	2.83	1.89	0.113 8	0.019 0	
添加量	0.35	1.54	1.89	2.34	2.99	1.96	0.122 3	0.020 0	
/(g·kg ⁻¹)	0.50	1.38	1.52	2.05	2.92	1.91	0.112 1	0.019 0	
	0.65	1.19	1.39	1.95	2.84	1.90	0.106 5	0.018 0	
	0.80	1.07	1.32	1.91	2.47	1.89	0.100 1	0.017 0	
K1	0.075 0	0.092 5	0.124 0	0.166 6	0.114 1	0.084 2			
K2	0.013 0	0.015 0	0.021 0	0.028 0	0.019 0	0.014 0			
R1	0.015								

表 8 L₉(3⁴)正交实验结果与极差分析
Table 8 The result orthogonal experiment and range analysis

项目	因素				石油降解率 /%	土壤脱氢酶活性 /(μL·g ⁻¹)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	62.2	2.09
2	1	2	2	2	71.7	2.46
3	1	3	3	3	69.6	2.27
4	2	1	2	3	65.9	2.19
5	2	2	3	1	70.2	2.31
6	2	3	1	2	65.3	2.11
7	3	1	3	2	68.5	2.24
8	3	2	1	3	67.9	2.22
9	3	3	2	1	59.8	1.99
石油降解率与 各因素	k ₁	2.155	2.086	2.074	2.042	
	k ₂	2.134	2.218	2.089	2.175	
	k ₃	2.082	2.067	2.203	2.154	
	K ₁	0.718	0.695	0.691	0.681	
	K ₂	0.711	0.739	0.696	0.725	
	K ₃	0.694	0.689	0.731	0.718	
	R ₁	0.024	0.050	0.043	0.044	
土壤脱氢酶 活性与各因素	k ₁	6.82	6.52	6.42	6.27	
	k ₂	6.61	6.99	6.52	6.81	
	k ₃	6.45	6.25	6.82	6.68	
	K ₁	2.273	2.173	2.140	2.090	
	K ₂	2.203	2.330	2.173	2.270	
	K ₃	2.150	2.083	2.273	2.227	
	R ₂	0.123	0.247	0.133	0.180	

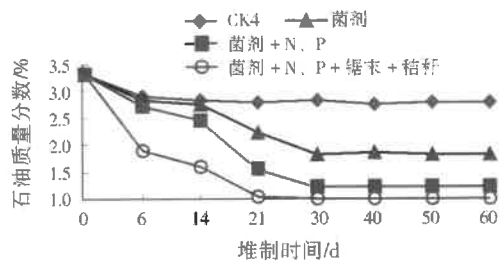


图 4 堆制处理结果

Fig. 4 Results of composting test

能与石油形成共代谢,强化石油降解菌的降解性能。

从图 4 还可见,实验进行 21 d 后,添加菌剂、锯末、秸秆以及 N、P 组土样中的石油含量基本不再发生变化,这可能由于堆制 21 d 后土样中剩余的石油降解菌数量较少,不足以对石油进行有效的降解,也有可能是石油降解菌先将易降解的石油成分进行了降解,剩余的石油成分多为难以降解的复杂物质,限制了其降解性能的进一步发挥。因此,实验中可以考虑每隔一定时间添加 1 次菌剂和易降解、廉价、废弃的有机物(如锯末、秸秆),以此来促进共降解。此外,添加菌剂和 N、P 组土样中经 60 d 的处理后,石

油质量分数为 1.2% 左右,石油降解率为 63.9%,其降解率低于采用最优的环境因素条件进行室内生物降解的效果(76.5%),这是由于室外的环境条件较难控制,特别是温度。但总体来说,室外自然堆制生物修复是一种投资少、见效快、治理效果较好的土壤石油污染治理方法。

3 结 论

(1) 以石油污染土壤为菌源,经过富集、驯化及纯化,筛选得到一株高效石油降解菌,命名为 Z₁a-B,其摇瓶培养的石油降解率为 66.4%;并通过菌落形态、显微镜个体形态初步鉴定为其为链霉菌属白孢类群。

(2) 经 Z₁a-B 降解后,石油中的 n-C₁₂ ~ n-C₁₈、n-C₂₁ ~ n-C₃₄ 烃类组分含量显著降低,几乎彻底被降解,只有 n-C₁₉、n-C₂₀ 含量变化不大,表明 Z₁a-B 有着很宽的烷烃降解谱。

(3) N、P 最佳的添加量组合为 KNO₃ 2.50
(下转第 39 页)