

# 关于油污土壤修复微生物的筛选及其影响因素分析

蒋定坤 (湖南省国际工程咨询中心有限公司, 湖南 长沙 410000)

**摘要:** 研究目的: 对影响油污土壤中微生物原位修复的因素进行分析, 为我国石油污染土壤微生物修复技术的发展提供理论基础。方法: 以 5 因素 4 水平来构建正交设计, 然后将相应的变化数值进行计算归类分析。试验结果: 初步筛选后, 发现 18 株石油烃降解优势菌, 复选后, 最终选择 DPF2 和 DPF4 两株偏利共生协同真菌, 并将这两株优势菌进行油污土壤微生物修复模拟试验。得出微生物修复石油污染地区油污土壤的最大影响因素为氧化剂、营养物, 其次是污染强度以及接菌量。得出结论: 氧化剂、营养物、污染强度以及表面活性剂对于修复影响较大, 而接菌量对于油污土壤的修复影响并不显著。

**关键词:** 油污土壤; 微生物; 微生物筛选; 影响因素

## 0 引言

我国是能源资源的消耗大国, 石油作为我国极为重要的化石能源和工业血液, 对于保障我国工业生产, 促进经济增长具有着重要的意义。但是, 石油的开采会伴随着严重的土壤污染, 经研究发现, 石油原油进入土壤之后, 会对土壤及土壤中的微生物造成直接的影响, 会造成土壤孔隙的堵塞, 使得土壤的透气性以及透水性能不断下降, 土壤也无法保持住肥力, 甚至造成了土壤的板结。针对石油污染地区的油污土壤, 石油污染土地的修复技术就已经成为当下研究的重点, 而传统热解析以及化学洗涤方法等治理石油污染的方法需要花费大量的人力物力, 且取得的效果也相对一般, 长期效果的稳定性及性价比不尽人意, 然而微生物原位修复技术就不一样, 其修复效果好, 价格低廉, 修复效果稳定性好, 值得被推广使用, 这一技术逐渐成为现代治理油污土壤的主流技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌源

利用微生物对油污土壤进行修复, 首先就需要筛选合理的菌种。此次研究选取某油田地区不同类型的油污土壤, 并将这些土壤均匀的混合, 密封于塑料袋中, 进行 4℃ 的低温保存, 这些油污土壤将用于菌种的筛选<sup>[1]</sup>。首先取出 10g 油污土壤样品, 将其放置于锥形瓶中, 加入适量的生理盐水, 将土壤搅拌均匀以作备用, 在土壤搅拌的过程中, 为了加速让生理盐水和土壤充分混合, 可以适当的放入玻璃球来进行搅拌辅助。待其搅拌均匀之后, 选取 1mL 的泥水来进行试验, 并且还需要用无菌化处理后的生理盐水来进行稀释。稀释之后, 研究人员需要移取  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  倍的混合稀释液各 0.5mL, 将其进行有效培养和相应处理, 培养箱的温度应保持在 30℃ 左右的恒温中, 适宜的温度能够有效帮助菌种生长, 且研究人员能够更好的观察菌种生长情况, 而这一过程需要一直重复, 需要研究人员耐心、细心及认真对待每时每刻的菌种生长变化情况。最终培养出适合于本次石油污染土壤修复的石油烃降解优质真菌。

在得到需要的石油烃降解优质真菌之后, 还要进行

该真菌的石油降解能力测定, 将菌株接入到增殖培养基中, 培养的环境需要温度保持在 30℃, 140r/min, 环境中振荡 48h。之后需要将培养的菌体以 2 质量数进行接入, 接入到 250mL 的三角瓶中, 为了保障菌种在之后的能降解能力测定中能够准确的测定出结果, 需要在三角瓶中放入含有液体的石油降解培养基 (1.2.3) 50mL, 再次以同样的方法来进行培养, 培养时间为 7 天<sup>[2]</sup>。

此外, 还要进行菌群的复配研究。因为石油作为一种生物沉积变油, 不同油田产生的石油成分也不尽相同, 菌群中有负责将复杂、难降解的石油高分子有机物降解为低分子有机物优质菌种, 随后由菌群中适应分解低分子有机物的菌种高效分解剩余污染物, 由此达到降低石油对于土壤的污染性质, 提高处理能力的效果。

### 1.2 试验设计

为准确测定出菌群对于油污土壤的降解能力, 就需要对影响菌群油污降解能力的因素进行分析。本次研究选择土壤营养条件、含水率、pH 值、石油的组分、土壤污染的浓度为要素进行分析。将油污土壤的浓度、营养物质、氧化剂、表面活性剂、接菌量等 5 个因素来作为研究中的影响因素<sup>[3]</sup>。将油污土壤污染强度指标设置为 A, 代表原油所占土壤的百分比, 将营养物质含量设置为 B, 氧化剂占据土壤质量的比例设置为 C, 将活性剂所占土壤质量比例设立为 D, 将接菌量 (发酵液) 占据土壤重量的比例设立为 E, 进而完成正交设计试验的初步构建框架。本次试验的各个因素以及水平影响的变化结果详见表 1。

## 2 结果

首先需要石油降解菌株进行初步的筛选, 以质量更好, 效果更为优质的菌株来作为研究对象, 参与到具体的试验中来。将之前所培养得来的菌体进行总的一个筛选, 初步筛选出 18 株降解效果较好的菌体, 然后将其进行编号, 在 18 株菌体中选择效果最优的 4 株。将其编号为 DPF<sub>1</sub>, DPF<sub>2</sub>, DPF<sub>3</sub>, DPF<sub>4</sub>, 然后将剩余的 14 株菌体编号为 DPB<sub>1-14</sub>, 试验过程中按照菌株的石油降解能力来进行排序, 分析这些菌群在 7d 后的降解率。

经过初步的测定之后, 得出 DPF<sub>2</sub> 以及 DPF<sub>4</sub> 对于油污土壤的降解率高达 80% 以上, 而其余的菌株降解率最低的维持在 40.13%, 最高在 72.34%, 得出 DPF<sub>2</sub> 及 DPF<sub>4</sub> 7d 后的降解率最高。

由于石油本身属于一种极为复杂的混合物, 在对菌群进行降解能力测定时, 也要考虑到嗜油微生物在土壤中的扩散能力。为了保障研究数据的准确性, 也为了减小试验得来的数据之间的误差, 使试验结果更具有代表性, 需要将 DPF<sub>1</sub>、DPF<sub>2</sub>、DPF<sub>3</sub> 以及 DPF<sub>4</sub> 加上 DPB<sub>1-14</sub> 中效果最好的两株真菌来共同构建降解菌群的复配, 协同一起来助力于研究, 得出确切的研究数据。经研究后得出最终结果, DPF<sub>2</sub> 及 DPF<sub>4</sub> 混合菌群在 7 日后的石油降解率达到 87.71%, 比之于单一的降解菌的降解率是要高得多的, 在以上研究中已表明, 普通降解菌的油污土壤降解率为 (40.13%~72.34%), 由此, 证明适应性的菌种搭配而成的混合菌群能够对修复油污土壤产生极大的作用, 且不同的混合菌群对于不同种类的油污土壤的降解能力差别很大, 以下是根据 DPF<sub>2</sub> 以及 DPF<sub>4</sub> 不同时间石油降解率的分析所作出的试验表格, 详细将两株真菌在不同时间段的降解率进行简要说明。其中, 可以看出两株植株在 56 天之后, 分别得到了 94.11% 以及 90.11% 的降解度, 由此证明只要提供合适的条件, 混合菌群对于油污土壤便具有持续的修复能力, 这使得微生物修复技术相较于传统的治理石油污染技术有较大优势, 详细结果见表 2。

而表 3 是利用 5 因素 4 水平来开展的对研究石油污染土壤 7d 降解率的分析, 可以明显看出微生物修复的

最大影响因素为氧化剂、营养物, 其次才是污染强度以及接菌量、表面活性剂 (表 3)。

### 3 讨论

我国是能源消耗大国, 随着我国石油资源的持续开采, 意味着会造成油田区域土壤的持续污染, 传统的治理石油污染的方法费时费力, 取得的效果一般且不具备持续处理能力, 而利用微生物修复技术对油污土壤进行修复不但能够有效的降解石油污染土壤中的有害成分, 而且由于微生物在土壤中的扩散能力, 只要微生物菌群仍在土壤中存在, 只需提供合适的条件, 微生物修复能力就能够得到持续发挥。本次研究主要针对油污土壤微生物筛选及其影响因素进行分析, 得出生物修复的最大影响因素为氧化剂、营养物, 其次才是污染强度以及接菌量、表面活性剂的研究结果。

#### 参考文献:

- [1] 慕庆峰, 于立红, 张涛, 贾洪柏, 吴慧云. 油污土壤修复微生物的筛选及其影响因素 [J]. 水土保持通报, 2018, 38(05):330-335+346.
- [2] 叶茜琼, 吴蔓莉, 陈凯丽, 李炜, 袁婧. 微生物修复油污土壤过程中氮素的变化及菌群生态效应 [J]. 环境科学, 2017, 38(02):728-734.
- [3] 金芬, 孙先锋. 电场强化微生物修复油污土壤条件筛选及优化 [J]. 浙江农业学报, 2015, 27(09):1625-1630.

#### 作者简介:

蒋定坤 (1984-), 男, 湖南怀化人, 本科, 工程师, 主要从事环境影响评价工作。

表 1 正交设计的因素与水平

水平数	污染强度 (A) /%	营养物 (B)	氧化剂 (C) /%	表面活性剂 (D) /%	接菌量 (E) /%
1	10	100/0/0	0	0	0
2	15	100/6/1	0.5	0.5	10
3	20	100/9/1	1	1	20
4	25	100/8/3	1.5	3	30

表 2 DPF<sub>2</sub> 以及 DPF<sub>4</sub> 不同阶段的降解率比较

不同阶段的石油降解率								
项目	7d	14d	21d	28d	35d	42d	49d	56d
DPF <sub>2</sub>	81.42	86.24	86.33	86.83	88.32	90.41	91.11	94.11
DPF <sub>4</sub>	56.34	57.24	60.91	70.93	83.13	84.67	88.01	90.11

表 3 油污土壤 7d 降解率因素分析

因素	A 因素	均值	B 因素	均值	C 因素	均值	D 因素	均值	E 因素	均值
水平	水平 1	61.081	水平 1	66.187	水平 1	54.256	水平 1	57.504	水平 1	57.311
	水平 2	62.453	水平 2	56.321	水平 2	56.814	水平 2	53.025	水平 2	59.323
	水平 3	59.934	水平 3	58.654	水平 3	62.045	水平 3	60.135	水平 3	59.021
	水平 4	56.943	水平 4	59.372	水平 4	67.356	水平 4	69.856	水平 4	64.312
极差	5.63		9.867		13.14		16.821		7.051	