

# 土壤残油生物降解性与微生物活性

李广贺, 张旭, 卢晓霞

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

**摘要:** 利用色谱—质谱联机(GC/MS)、柱层析分析方法、浊度法和微生物脱氢酶法, 确定土壤残油污染物的构成、油污土壤优势降解菌、残油降解过程中微生物活性及其动态变化。研究结果表明, 长期残留在淄河滩土层中的石油烃类主要由沥青质、胶质构成, 占总烃类的 60%~80%。经过 90 d 生物降解试验, 残油降解率仅为 20%。污染土层中的主要优势菌为球菌和杆菌, 菌群鉴定为黄假单胞菌(*Xanthomonas*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)等。据微生物脱氢酶动态变化的初步研究结果, 微生物脱氢酶活性变化可作为衡量微生物活性变化的重要指标。

**关键词:** 残油; 生物降解; 脱氢酶。

中图分类号: P641; X74 文献标识码: A

文章编号: 1000-2383(2002)02-0181-05

**作者简介:** 李广贺(1958—)男, 教授, 博士生导师, 1992 年在中国地质大学(北京)获得博士学位。研究方向为水体污染控制理论与修复工程。E-mail: ligh@tsinghua.edu.cn

油田区、石油化工区土壤石油烃类由于量大面广, 危害主要表现在: (1) 影响植物及农作物的生长, 降低土质, 甚至造成土壤荒废。特别是沸点在 150~275 °C 范围内的烃类, 如汽油和煤油对植物的毒害最大, 它能渗透到植物的组织内部, 破坏植物的正常生理机能。高分子烃不能渗透到植物组织内部, 但它能够形成一层薄膜, 阻碍植物的蒸腾、呼吸和光合作用。对其他生物的危害, 主要是使生物营养与输导系统产生混乱。另外, 石油进入土壤后, 影响土壤的通透性, 阻碍植物根部的呼吸和营养元素的吸收, 引起根部腐烂; (2) 通过食物链, 危害人类健康。多环芳烃(PAHs), 如强致癌物苯并(a)芘具有致癌性; (3) 影响水色、水味和溶解氧<sup>[1]</sup>; (4) 污染地下水, 威胁安全供水。

据对污染土壤的油含量调查, 英国 20 世纪 60~70 年代关闭的炼油厂、储油罐区等发现多处石油烃污染的土壤, 在调查区内一处仅 20 000 m<sup>2</sup> 的面积上, 土壤中多环芳烃(PAHs) 最高质量分数达 29 700×10<sup>-6</sup>, 残留在土壤中的 PAHs 高达 202 286 kg。美国约有 3 000 000 个地下储存罐存放石油类产

品, 其中 500 000 个地下储油罐可能正在向地下泄漏石油。德国、荷兰和澳大利亚等有大量的污染土层等待治理。我国石油污染土层状况并不乐观, 尤其是全国各地地下储油罐星罗棋布, 油品泄漏所造成的土壤与环境污染时有发生。值得注意的是, 我国过去对污染土壤的环境问题关注不够, 缺乏必要的监测信息而无法准确统计。据目前所掌握的资料显示, 我国部分石油化工区土壤残油质量分数高达 50 274×10<sup>-6</sup>~94 049×10<sup>-6</sup>, 油田区质量分数一般为 80×10<sup>-6</sup>~120×10<sup>-6</sup>, 油田重污染区土壤石油类质量分数可高达 10 000×10<sup>-6</sup> 以上(背景值为 28.4×10<sup>-6</sup>)。土壤污染构成了地下水的主要污染源, 造成局部地区地下水石油化有机污染, 威胁饮水安全, 降低地下水的使用功能, 造成极大的经济损失、生态灾害、农业生产与饮水安全保障的破坏, 成为困扰环境领域重要的社会与环境问题<sup>[2~10]</sup>。

## 1 土壤残油构成

土壤残油的成分构成时空上变化明显。归纳起来主要原因包括: (1) 易溶和易挥发组分所占的比例。亨利常数高的石油烃类在环境中易挥发扩散到大气中, 而辛醇—水系数( $K_{ow}$ ) 较低的石油烃类, 则随水分运移进入地下水。另外, 植物吸收、化学和生

收稿日期: 2001-11-12

基金项目: 国家“973”项目“区域环境污染控制与修复原理”(G1999045711); 清华大学基础研究基金(Jc1999010); 国家教育部留学回国人员基金。

表 1 油污土壤石油烃 Soxhlet 抽提、柱层析分析结果

Table 1 Components of residual petroleum in polluted soil by Soxhlet extraction and column-chromatography

取样点	I	II	III	IV
石油烃总量*/mg	141.0	88.8	77.5	138.7
烷烃含量/mg	21.6	17.6	9.4	21.6
芳烃含量/mg	15.4	10.5	9.9	16.0
胶质含量/mg	38.0	26.5	22.8	41.5
沥青含量/mg	38.0	24.6	26.6	42.4
回收率/%	80.1	89.2	88.6	87.6

\* 为 2 g 土中的含量。

物化学作用会对石油烃的迁移和转化产生重要影响；(2)人为因素的干扰加速了残油的挥发、淋滤、化学和土层生物化学作用；(3)残留时间与来源。一般残留时间短的石油化工裂解区、成品油罐区(汽油、航空燃油、柴油)泄漏污染的土壤中的石油烃类大多由低碳烃类构成，如 BTEX, PAHs, 饱和和非饱和烷烃。含碳 22 以上的烃类所占的比例相对较低。油田原油污染区长期残留在土壤中的残油主要由高碳烃类构成。

上述自然的、人为的因素造成残留在土壤中的石油烃类中轻、重质组分所占的比例具有较大的差异。总体上，残留时间长、挥发、淋滤作用强烈的土层，以高碳烃类为主。由于其低溶解度、难降解性而成为污染土壤修复的重点研究内容。为此，本次选择具有近 20 年污染历史的淄河滩油污土壤，研究残油的基本构成、生物利用性、优势微生物、微生物活性，为富含残油的土层修复奠定理论与技术基础。

利用 Soxhlet 抽提、柱层析分析方法<sup>[2]</sup>对淄河滩残油进行分析，结果表明(表 1)，污染土层含油率最低在 3% 以上，最高可达 7.5%。根据我国石油天然气行业标准，将正常原油和重质原油区分为烷烃、芳烃、胶质和沥青。分析表明，残留在土层中的污染物大部分为大分子、高沸点物质，胶质组分和沥青组分的比例占 56% 以上，而分子量相对较低的烷烃组分和芳烃组分最多仅占 30%。色质联机检测到烃类物质的样品中，石油污染物的沸点都很高，胶质和沥青的比例较大，基本属于难降解污染物，理论上大大降低了其生物可利用性。

## 2 油污土壤生物特性

土壤是微生物生活和繁殖的良好生态环境，每克土中微生物总数一般达到 1~10 亿个(以干土

计)。在肥沃土壤中细菌生物量可占土壤质量的 0.015%~0.5%，真菌生物量可达 0.05%~0.5%。由于土壤中存在的微生物种类多样，大多数未污染土壤的复杂微生物群落都含有天然存在的石油烃降解种属。已知的能够降解石油烃的微生物有 28 属细菌，30 属丝状真菌，和 12 属酵母，共计 70 属 200 多个种。

应该注意到，微生物生存的环境生态对于优势菌群筛选具有决定性作用。大量的研究表明，土壤中的微生物总数随烃质量分数的增加而增加，但微生物的多样性却下降了。表明微生物适应石油污染的环境的能力的差别。造成差异的主要原因在于微生物体内有组成酶和诱导酶二种酶。组成酶经常存在于细胞内，不论底物存在与否。而诱导酶的合成依赖于底物或底物结构类似物，它只有诱导剂存在时才被微生物合成。土壤被石油烃污染以后，烃类污染物能引导具备降解能力的微生物产生诱导酶，正是通过这种自然选择以及基因突变作用，能够适应新的微生物生态环境的微生物种属，在降解烃类物质的过程中被逐渐富聚成为优势菌群。

目前，测定降解微生物的方法主要有：平板计数法<sup>[5]</sup>、最或然数(MPN)法、浊度法、菌丝长度测量法<sup>[3]</sup>、显微镜直接计数法、FDA(荧光素双醋酸酯)水解活性分析法<sup>[6,7]</sup>、磷脂分析法、ATP 分析法、DNA 探真技术。

浊度法主要是通过测定微生物在降解石油过程中的浊度来确定微生物的生长。该方法由于简便快速而得到较为广泛的应用。本文选择浊度法评价所分离的污染土壤中优势菌种对于石油烃类污染物的分散与利用状况。图 1 是利用浊度法对 16 种污染土层中的优势菌种对液蜡和萘的利用与生物生长状态。

由图 1 可知，油污土层中 16 种优势菌具有利用

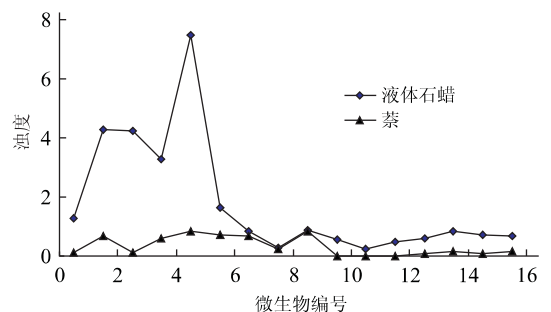


图 1 石油降解菌筛选

Fig. 1 Screening hydrocarbon-degrading bacteria  
OD460 nm, 培养 72 h

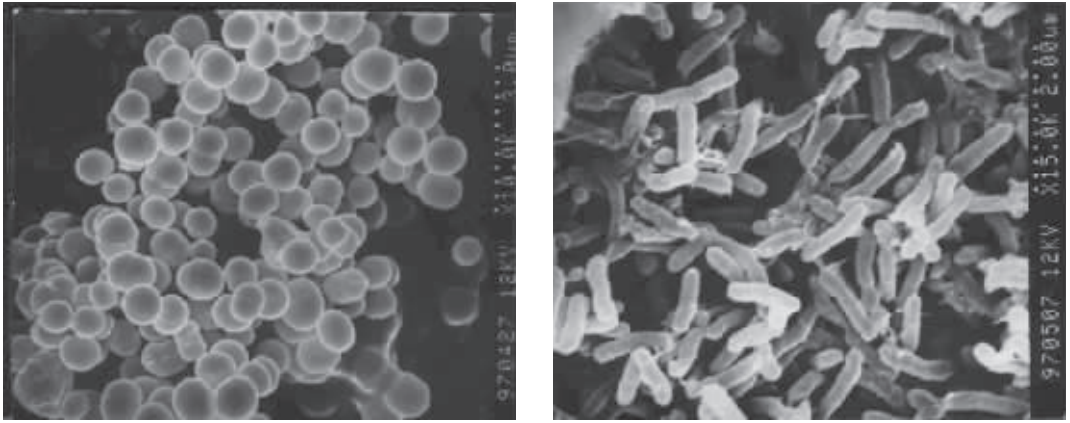


图 2 优势降解菌电镜扫描照片

Fig. 2 Electron microscope pictures of degrading bacteria in polluted soil

液蜡和萘作为碳源的能力. 试验结果表明, 编号为 2 和 5 的优势菌对液蜡和萘具有较高的分散性和利用性. 表明油污土壤中的优势菌群具有降解石油烃的能力.

通过对优势菌的电镜扫描(图 2), 油污土层中的主要优势菌为球菌、长杆菌和短杆菌. 菌群鉴定为黄假单胞菌(*Xanthomonas*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)等.

### 3 残油生物可降解性与微生物活性

#### 3.1 土壤残油生物降解性评价

土壤中石油污染物的微生物降解受其化学结构和性质制约, 尤其是烃类物质的溶解性. 对于石油烃, 除了低分子芳烃、萘能溶于水, 蒽和菲有中度溶解性外, 分子量高于 228 的芳烃很难溶于水, 而烷烃比芳烃的水溶性更小,  $C_8$  以下的烷烃微溶于水,  $C_8$  以上的烷烃几乎不溶于水. 由于低分子烃类易挥发, 能积聚在土壤中的石油烃, 绝大部分是高沸点、高分子量组分. 而且低水溶性的石油烃容易吸附在土壤固体颗粒上, 难于转移到油水界面, 直接影响其可生物利用性. 由此, 石油烃属于难生物降解污染物. 研究表明, 短链烷烃的生物可降解性较好, 碳原子数大于 24 的烷烃, 随着分子量的增加, 生物可降解性下降. 单环芳烃的生物可降解性较好, 多环芳烃很难降解; 胶质和沥青是极性较强的高碳化合物, 生物可降解性很差<sup>[9, 10]</sup>.

由于淄河滩包气带土层中的残油绝大部分为高沸点、大分子烃类, 生物可降解性较差. 在油污土层中, 石油污染物主要以非水溶相存在, 胶质和沥青裹

挟分子量较低的石油烃, 降低了它们的可利用性. 在实验室条件下, 经过 90 d, 石油污染物生物降解了  $13 \times 10^{-6}$ , 仅占总量的 20%, 充分表现初中致残油生物难降解性.

#### 3.2 微生物活性评价

油污土层生物修复是利用微生物将石油污染物转化为无害或毒性较小物质, 其转化过程中降解微生物量和活性的测定结果成为监控生物修复效率的重要指标.

测定微生物生物量和活性的方法多种多样, 目前还没有统一的、绝对可靠的方法. 用微生物的数量变化反映生物量的变化, 表明微生物对底物及微生物生态环境的适应能力, 且操作简单, 对于指导工程实践具有一定意义. 但微生物数量在一定程度上并非准确反映微生物活性状况. 利用直接的微生物活性指标反映降解生物活性是十分必要的. 注意到, 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, 参加生物氧化的重要酶为氧化酶和脱氢酶两大类, 其中脱氢酶类尤为重要. 脱氢酶使石油烃的氢原子活化并传递给特定的受氢体, 实现石油烃的氧化和转化. 在许多情况下, 微生物对石油污染物的降解或转化从脱氢开始, 因此可以利用脱氢酶的活性反映石油降解微生物的活性. 表 2 和图 3 分别为油污土壤修复试验过程中微生物数量和脱氢酶活性的动态变化状况.

降解过程中, 油污土层微生物数量具有较大的波动性. 分析主要原因是微生物环境生态具有较大的差异性所致. 试验 2 号样为模拟自然条件下石油降解微生物的生长状况, 3 号样为添加富集菌液, 4 号样增投半腐熟堆肥. 从微生物数量和脱氢酶活性

表 2 除油菌数量的动态变化

Table 2 Variations of degrading bacterium cells

	个/g 干土				
t/d	1	7	14	28	35
2 号样	$1.33 \times 10^5$	$1.00 \times 10^6$	$2.67 \times 10^5$	$7.33 \times 10^8$	$3.00 \times 10^7$
3 号样	$1.25 \times 10^9$	$1.50 \times 10^9$	$1.30 \times 10^8$	$1.30 \times 10^8$	$6.33 \times 10^6$
4 号样	$1.33 \times 10^5$	$1.00 \times 10^6$	$7.67 \times 10^6$	$4.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^6$

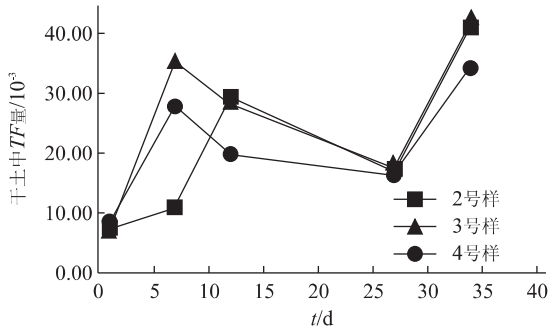


图 3 微生物脱氢酶的动态变化

Fig. 3 Variations of dehydrogenase activity of degrading bacteria

上分析,由于富集与油污土壤的微生物生态环境之间具有较大的差异,造成富集菌对油污土壤环境的适应性不强,使得 3 号样中增投的富集菌存活时间很短,没有发挥高效除油的作用. 4 号样中增投的半腐熟堆肥促进了真菌的生长,对细菌的繁殖形成竞争. 故此,4 号样除油菌数量较 2 号样、3 号样低,但脱氢酶的活性相比较并无明显降低,真菌在这个过程中发挥作用,增强了微生物的活性指标. 由此可见,微生物脱氢酶活性与微生物数量相比,更能反映污染土壤生物修复过程中微生物的活性状态. 需要指出的是,这一结论仅是初步的研究结果,有待今后进一步研究验证.

## 4 结论

柱层析分析结果表明,淄河滩残油绝大部分为高沸点、大分子物质,胶质和沥青的比例占 60%~70%以上,基本属于生物难降解. 在实验室条件下,经过 90 d 降解试验,土壤中的残油生物降解量仅占总量的 20%.

经过长期自然筛选,油污土层中优势菌具有降解残油的能力. 电镜扫描现实主要由球菌和杆菌构成,微生物种群鉴定结果为黄假单胞菌(*Xanthomonas*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)等.

根据油污土壤生物修复过程中的微生物数量和脱氢酶活性的动态变化的初步研究结果,微生物的数量和脱氢酶活性可以作为微生物对底物适应性的指标,它们与石油烃的衰减有良好的相关性. 但相比较而言,微生物脱氢酶活性比微生物数量更能反映污染土壤生物修复过程中微生物的活性状态.

正值沈照理教授 70 华诞暨从事教育工作 50 年之际,谨将此文献给恩师,以此感谢多年来对我的教诲、帮助和支持. 恩师敏锐的科学思路、严谨的科学作风使我终生受益.

## 参考文献:

- [1] 祁士华,盛国英,傅家谟,等. 鼎湖山自然保护区大气溶胶中的 PAHs[J]. 地球科学——中国地质大学学报, 2001, 26(1): 83—87.  
QI S H, SHENG G Y, FU J M, et al. PAHs in aerosols at Dinghushan natural protection zone [J]. Earth Science — Journal of China University of Geosciences, 2001, 26(1): 83—87.
- [2] 中华人民共和国石油天然气行业标准. 岩石可溶有机物和原油族组分柱层析分析方法, S/Y 5119 [S]. 中国石油天然气总公司, 1995.  
Standards of oil and gas industry of People's Republic of China. Analysis method of column chromatography of soluble organic compounds and crude oil family composition in rock. S/Y 5119 [S]. Chinese National Petroleum Cooperation, 1995.
- [3] 李东艳,钟佐燊,孔惠,等. 反硝化条件下苯生物降解的微环境研究[J]. 地球科学——中国地质大学学报, 2000, 25(5): 493—498.  
LI D Y, ZHONG Z S, KONG H, et al. Microcosm study of benzene degradation on nitrate reducing conditions [J]. Earth Science — Journal of China University of Geosciences, 2000, 25(5): 493—498.
- [4] 郭华明,王焰新,陈艳玲,等. 地下水有机污染的水文地球化学标志物探讨[J]. 地球科学——中国地质大学学报, 2001, 26(3): 304—308.  
GUO H M, WANG Y X, CHEN Y L, et al. Geochemical indicators of organic contamination in groundwater: a case study in Henan oilfield [J]. Earth Science — Journal of China University of Geosciences, 2001, 26(3): 304—308.
- [5] Randall J D, Hemmingsen R B. Evaluation of mineral Agar plates for the enumeration of hydrocarbon-degrading bacteria [J]. Journal of Microbiologica Methods, 1994, 20: 103—113.

- [6] Schnurer J, Rosswall T. Flourescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982. 1256—1261.
- [7] Federle T W, Dobbins D C, Thornton-Manning J T, et al. Activity and community structure in subsurface soils [J]. *Groundwater*, 1986, 24(3): 534—543.
- [8] 郑西来, 邱汉学, 荆静, 等. 沈抚灌区石油污染土壤恢复方案的数值模拟[J]. *地球科学——中国地质大学学报*, 2000, 25(5): 462—466.  
ZHENG X L, QIU H X, JING J, et al. Numerical modeling on elimination of oil-polluted soils in Shenyang-Fushun irrigation area[J]. *Earth Science — Journal of China University of Geosciences*, 2000, 25(5): 462—466.
- [9] McGugan B R, Lees Z M, Senior E. Bioremediation of an oil-contaminated soil by fungal intervention [A]. In: Hinchee R E, Vogal C M, Brockman F J, eds. *Microbial process for bioremediation*[C]. New York: Battelle Press, 1996. 149—156.
- [10] Mahro B, Schaefer S, Kastner M. Pathways of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil [A]. In: Hinchee R E, Vogal C M, Brockman F J, eds. *Bioremediation of chlorinated and PAH compound* [C]. New York: Battelle Press, 1996. 203—217.

## Biodegradation of Residual Petrochemicals and Microbial Activities in Polluted Soil

LI Guang-he, ZHANG Xu, LU Xiao-xia

(*Department of Environmental Science & Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

**Abstract:** The components of the residual petrochemicals, variation of the microbe dehydrogenase activities and screening hydrocarbon-degrading bacteria in the polluted soil of Zihe valley were measured by GC/MS, column-chromatography, turbidity and microbe dehydrogenase methods. The experimental results indicate that petroleum carbons in the soil are composed of colloid and pitchy compounds accounting for 60%~80% of total petroleum carbons, which may limit the biodegradation of petrochemicals. It was proved that after 90 days the biodegradation rate of the petrochemicals was only 20%. The major types of the degrading bacteria in the polluted soil are cocci, or short and long bacilli based on the degradation experiments of naphthalene and liquid paraffin. *Xanthomonas*, *Bacillus* and a species thought to be *Hyphomicrobium* are identified to have high activity in the experiments. The pilot studies present that the microbe dehydrogenase can be used as index of the microbe activities for the biodegradation of petrochemicals.

**Key words:** residual petrochemicals; biodegradation; microbial dehydrogenase.