

# 石油污染土壤现场 生物修复研究

**(In situ Bioremediation of the Soil  
Contaminated by Petroleum Hydrocarbons)**



---

籍国东

# 前言

当今世界,石油已成为人类最主要的能源之一,大量的石油及其加工品进入土壤,造成土壤的石油污染,给人类乃至整个生物圈带来危害,从而成为世界性的环境问题。在对石油污染治理的研究中,生物修复作为一项潜在的高效、低成本的清洁技术正日益受到重视。近十余年来,国际上对生物修复的研究更加活跃,有些国家已将此技术用于污染土壤的实际修复,并取得了显著的成果。

# 1.土壤的石油污染

是指原油和石油产品在开采、运输、储存以及使用过程中，进入到土壤环境，其数量和速度超过土壤的自净作用的速度，打破了它在土壤环境中的自然动态平衡，使其累积过程占据优势，导致土壤环境正常功能的失调和土壤质量的下降，并通过食物链，最终影响到人类健康的现象。

# 1.1 土壤石油污染源主要包括

- 溢油和泄漏；
- 污水灌溉；
- 油页岩矿渣堆放；
- 大气沉降；
- 药剂等的施用。



## 1.2石油污染土壤的影响危害

- 对土壤理化性质的影响；
- 对土壤微生物的影响；
- 对土壤酶的影响；
- 对农作物的影响。





## 2 生物修复

国际上对生物修复的研究十分活跃，有些国家已将此技术用于污染土壤的实际修复，其中生物修复在治理有机污染土壤方面发展很快，其关注的焦点是污染的现场，而该类技术都以生物修复(**bioremediation**，也称为生物补救)这一术语为核心展开。

## 2.1 生物修复的概念

生物修复(Bioremediation), Madsen E.L(1991)将其解释为: 生物特别是微生物催化降解有机污染物, 从而修复被污染环境或消除环境中的污染物的一个受控或自发进行的过程。

相同的表达有: 生物再生(Bioreclamation)、  
生物恢复(Biorestoration)、  
生物消除(Bioelimination)。

## 2.2 生物修复的主要类型

- 原位生物修复 (In Situ Bioremediation)

指受污染的土壤不做搬运或输送而在原位污染地进行的生物修复处理，其恢复过程主要依赖于被污染地自身微生物的自然降解能力和人为创造的合适降解条件。

- 异位生物修复 (Ex-situ Bioremediation)

指将受污染的土壤，搬动或输送到它处进行的生物修复处理，这里的搬动和输送是有一定限度的，而且更强调人为控制和创造更加优化的降解环境。

## 2.2.1 处理工艺



### 原位处理工艺:

1. 泵处理**P/T**工艺  
(**Pump/Treatment**) ;
2. 生物通气工艺 (Bioventing) ;
3. 渗滤工艺 (Percolation) ;
4. 空气扩散工艺 (diffusing)



## 异位处理工艺:

1. 土地耕作工艺  
(land-farming);
2. 预制床工艺;  
(Prepared bed)
3. 堆腐修复 (composting) 工艺;
4. 反应器处理工艺 (Bioreactor) 。

# 原位修复与异位修复的差别

在处理位置上：

原位修复强调污染物存在的初始空间分布；

异位修复则稍作迁移。

在处理过程中：

异位修复比原位修复有更多的人为调控和优化处理

### 3.石油污染土壤的原位生物修复（ISB）

原位处理简单，经济，但处理时间长。在长期的处理过程中，污染物可能会扩散到深层土壤和地下水中，因而该技术适用的对象为被污染时间较长且情况已经基本稳定的土壤或面积广阔的区域。

## 3.1 原位生物修复(ISB)的特点是:

- (1)工艺路线和处理过程相对简单，不需要复杂的设备；
- (2)处理费用较低；
- (3) 被处理土壤不需要搬运，对周围环境影响小，生态风险小。

## 3.2 ISB的前提条件

- (1) 存在具有代谢活性的微生物;
- (2) 有较大的降解速率, 并能将污染物浓度降低到符合环保标准;
- (3) 过程中生成的中间产物必须没有毒性;
- (4) 污染场地必须不含对降解菌种有抑制作用的物质, 否则需要先行稀释或将该抑制剂无害化;
- (5) 污染物必须能够被微生物利用;
- (6) 污染场地的条件必须有利于微生物生长并保持活性, 例如, 适宜的温度、湿度等;
- (7) 技术费用必须尽可能低。

## 3.3 ISB的方法

- 微生物修复
- 植物修复
- 植物—微生物联合修复

## 微生物法

这种方法研究的最多，一般根据土壤污染状况，富集、驯化土著微生物，或人工接种培养代表性的土壤微生物，以研究土壤微生物受土壤污染的影响变化，及土壤的污染物含量变化。

目前在大多数实际的生物修复中应用的都是土著微生物，而外来的微生物在环境中难以保持较高的活性，工程菌的应用受到较严格的限制。

研究表明，有种类繁多的细菌、真菌及它们的纯化酶可以代谢石油烃类，但是由于吸附动力学、可降解性微生物群落、电子受体竞争能力等方面的限制，土壤中的石油烃降解非常缓慢。

# 植物修复

➡ 原理:

一、植物直接吸收并在组织中积累非植物毒性的代谢物;

二、植物促进生物化学反应的酶。

## 品种选择:

常选用受污染区内代表性较强的粮食作物和经济作物，如：水稻、小麦、玉米、花生、棉花、油菜、茶树及各种果树等。

## 植物—微生物联合修复

- 利用植物及其根际微生物共存体系净化土壤中有机污染物。大部分植物根上都有菌根菌生长，菌根菌和植物共生具有独特的代谢途径，可代谢自生菌不能降解的有机物。

## 3.4 ISB的国内外研究现状

目前这一领域的研究工作主要集中于以下三方面：

- 1 微生物的活性
- 2 石油烃生物可降解性研究
- 3 具有高效降解力的生物选择

# 微生物的活性

这方面工作主要是围绕如何给微生物提供一个更合适的环境，包括温度、湿度、酸度、营养和供氧等方面。

**Williaw(1995)**取样考察土著微生物最佳的环境条件，认为一般来说应保持在 $\text{PH}=6.5\text{—}8.5$ ，温度 $27\text{—}35^{\circ}\text{C}$ ，营养元素比例（ $\text{C}:\text{N}:\text{P}$ ）约为 $300:15:1$ 的范围内。



寻找最佳营养组合，研究表明N、P的配比以5: 1~10: 1比较合适，但需结合实际处理的污染土壤确定。

Audrew(1992)探索用有机N源（如尿素、谷氨酸等）代替无机N源。污染物氧化分解的最终电子受体的种类和浓度也影响着生物降解的速度和程度。



最终电子受体的种类和浓度影响着生物降解的速度和程度。

**Begona等（2001）**研究生物通气，证明氧气是微生物降解的主要刺激因素。

**魏德洲（1997）**在石油污染的处理中，采用添加过氧化氢的方法使去除率增加了近三倍。



**Hairn(1996)**在美国密执安州的一个污染地区进行了硝酸盐的内生电子受体的验证，表明**BTEX**（苯、乙苯、甲苯、二甲苯）能够被显著降解。但是在实验设计中无法将以氧气和硝酸盐为电子受体的降解效果区分开来。

**Romantschuk（2000）**提出利用植物的根区可以为微生物降解创造最佳条件。

# 石油烃生物可降解性研究

一方面研究各种化合物在各种微生物作用下的降解机理和途径，另一方面从化合物本身的化学组成和结构上研究其影响生物降解的内在原因，总结不同类型化合物生物降解难易的规律性，以便开发出更有效的生物降解技术。



**Riis等（1996）** 研究表明，链烷烃、单环烷烃及苯能被有效的降解，而环烷烃和芳烃常常滞留于土壤中，对这类物质的强化性降解目前尚未取得明显效果。

**Krishna（1999）** 用微分数值模拟生物降解率，说明仅在初始高浓度状态下有线性相关。



表面活性剂可以将污染物从土壤颗粒上洗脱下来，有利于细菌的降解。

Luthy等（1996）研究得出非离子表面活性剂(Triton X-100)对PAHs（多环芳烃）的溶解最有效。

宋玉芳等（1999）研究了TW-80对土壤PAHs的降解率可提高约30%。

# 具有高效降解力的生物选择

具有协同降解作用的同生菌群(**consortia**)。但目前对于具有协同关系的菌株的筛选和组合还是一个随机的过程，其协同作用的机制有待进一步研究。

**Line** 等 ( **1996** ) 用以黄杆菌(**Flavbacterium**)为主的共生菌作为强化菌剂，成功地处理了**PCP**（五氯酚钠）污染的土壤。

基因工程(genetic engineering microorganism, GEM) 的开发。

Chakrabarty (1998) 发现能降解芳烃的细菌，其降解基因位于质粒上。他利用基因工程的手段将多种质粒嫁接到一种菌体内，构成一菌多基因，可以同时降解四种石油组分，能把原油中约2/3的烃类消耗，突出特点是比自然菌降解速度快。

## 3.5 ISB的局限性

- (1) 要对污染地点和存在的污染物进行详细的具体考察，一些土壤中可能不宜使用；
- (2) 受各种环境因素的影响大；
- (3) 特定的微生物只降解特定类型的化合物物质，状态稍有变化的化合物就可能不会被同一微生物酶所破坏；
- (4) 修复的时间相对较长；
- (5) 当污染物浓度太低，不足以维持降解细菌的群落时，残余的污染物就会留在土壤中。

## 3.6 研究工作方向:

- (1) 实行有效的生物修复计划时需要采取的步骤;
- (2) 确定生物修复技术彻底降解污染物所需要的运行周期;
- (3) 监测生物修复计划的进展和污染物降解的过程;
- (4) 如何通过大量的现场试验获得可信的实际应用数据跟踪和记录;
- (5) 土壤的生物修复计划是否会造成新的污染或导致污染物的扩散。

# 石油污染土壤菌剂修复实验报告

## 概况：

沈抚灌区土壤以石油烃类污染为主，污灌年限长，流量大，面积广，难降解有机污染物(**PAHs**)含量高，这在国内外都非常少见，迫切需要经济、有效、易于操作的土壤原位生物修复综合技术。

## 研究意义:

本部分研究以微生物实验为基础，筛选污灌土壤中解脂酶活性强的优势微生物，人工接种培养，配制成固体菌剂，分别接种在田间和网室布置的微区和盆栽，以不同经济作物进行试验。本文是2001年的实验布置和研究进程，主要探讨菌剂施加的方法与条件，实现研究成果产业化，这在治理大面积污灌土壤上具有重要意义。

# 实验内容

- 田间试验

在污染现场设置试验微区，以观测不同处理的生物修复在自然条件下情况变化。

- 网室盆栽实验

- 正交实验
- 油浓度实验
- 菌剂实验

# 实验准备

## 固体菌剂

从灌区土壤中筛选出优势的土著微生物，包括细菌，真菌，共17株菌种，选择降解能力强的微生物，经过三级培养制成固体菌剂。

细菌菌剂：①芽孢杆菌②动胶菌属③C<sub>2</sub>④C<sub>4</sub>⑤白色未鉴定

数量：  $9.51 \times 10^{14}$  (个/g)

真菌菌剂：①小克银汉②棕曲霉③毛霉④B5⑤B6⑥B10⑦山大提供的黄孢原毛平革菌

数量：  $4.39 \times 10^9$  (个/g)

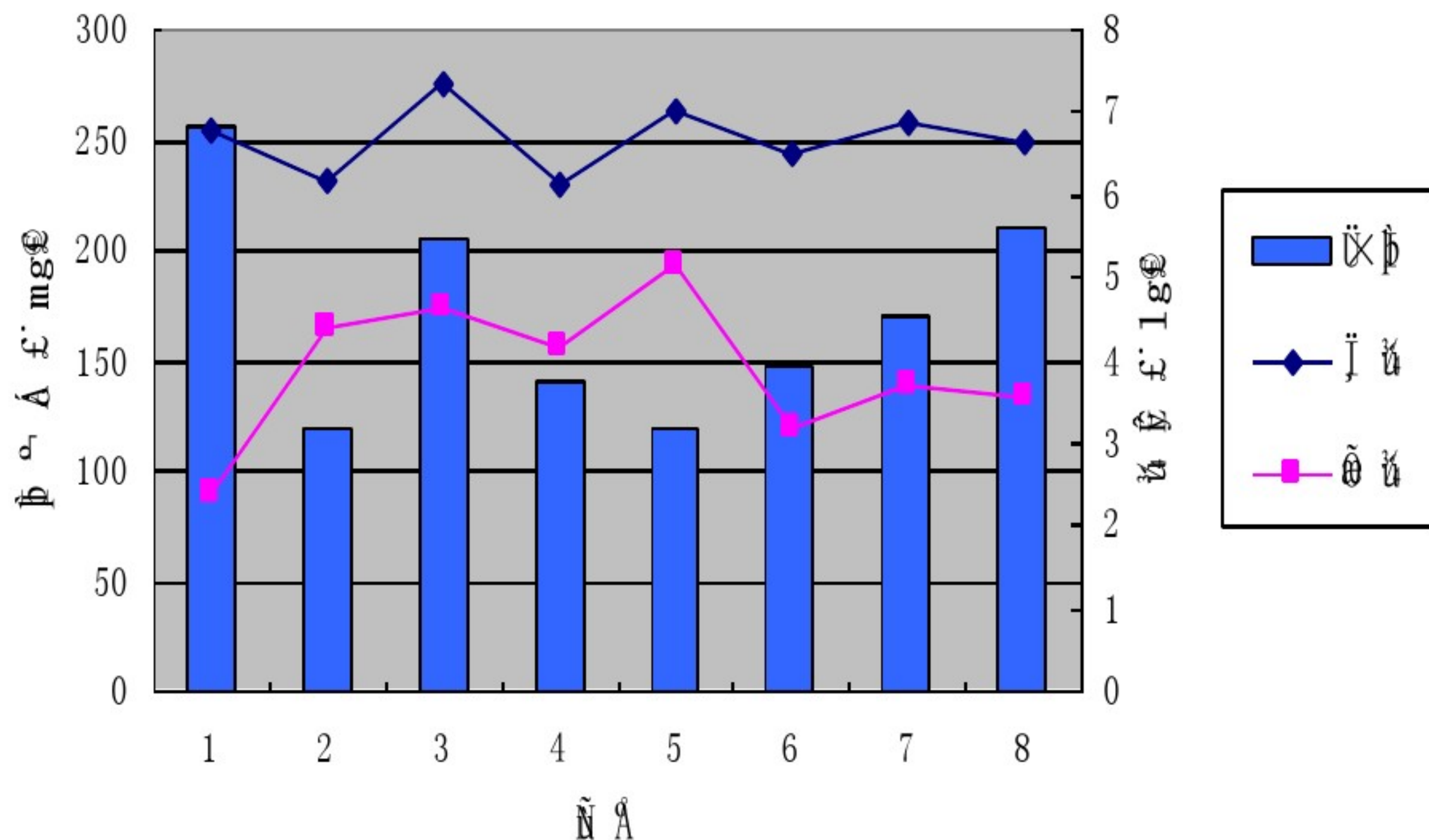
# 联合修复方式

目的：考察不同经济作物（黄豆、玉米、蓖麻、沙打旺）的修复情况。

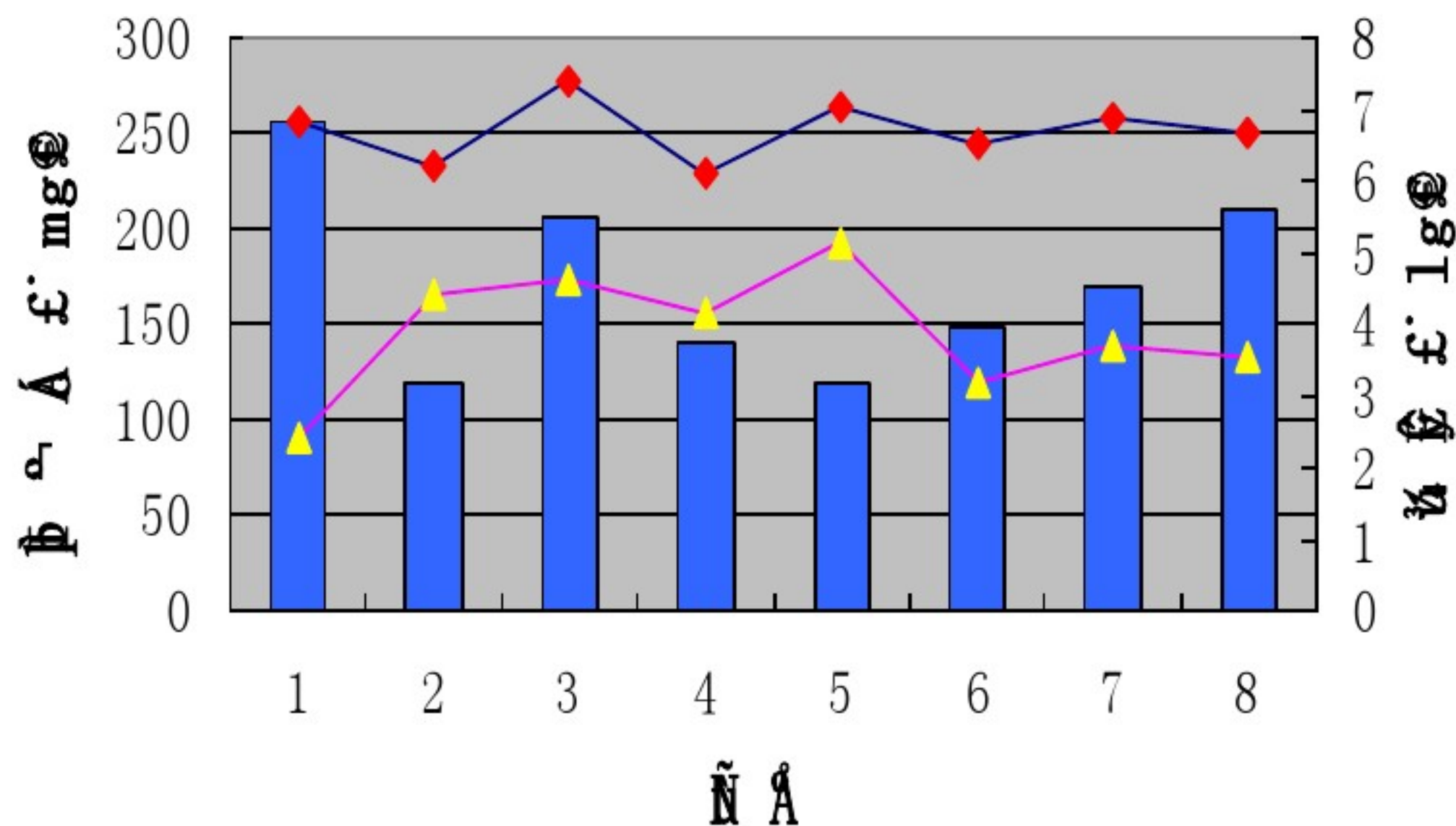
处理方法：均投加有机颗粒复合肥**1.43kg（0.167%）**+细菌菌剂**0.72kg（0.08%）**+真菌菌剂**0.72kg（0.08%）**

测定方法：微生物数量采用平板计数法，有机物含量用重量法。

Ö î ù ð á ï ð , û ë á à ö ä ç é î ÿ á ä »



Ö Ì Ů Ů Á Ĩ Ð ; Ů Æ Á À Ö Ä Ç É Ĩ Æ  
 Á æ ¯



分析：

1. 对于四种作物，根际微生物数量之间存在数量级的差异。

细菌数量为：沙打旺=玉米>黄豆=蓖麻

真菌数量为：玉米 > 沙打旺 > 蓖麻 > 黄豆

四种作物根际土壤中依次相差一个数量级

## 2.同对照比较起来

蓖麻根际细菌数量相差不大，而真菌数相差了两个数量级；

黄豆根际细菌数量无差别，真菌数处理比对照低；

沙打旺根际真菌处于同一数量级，细菌则比对照高一个数量级。

玉米真菌和细菌都较对照高。

3.土壤中总烃含量的数值表明，玉米和沙打旺对石油降解的能力强。

还需要进一步测定PAHs的含量变化。？

又以灌区植物玉米为例，分为三种处理：

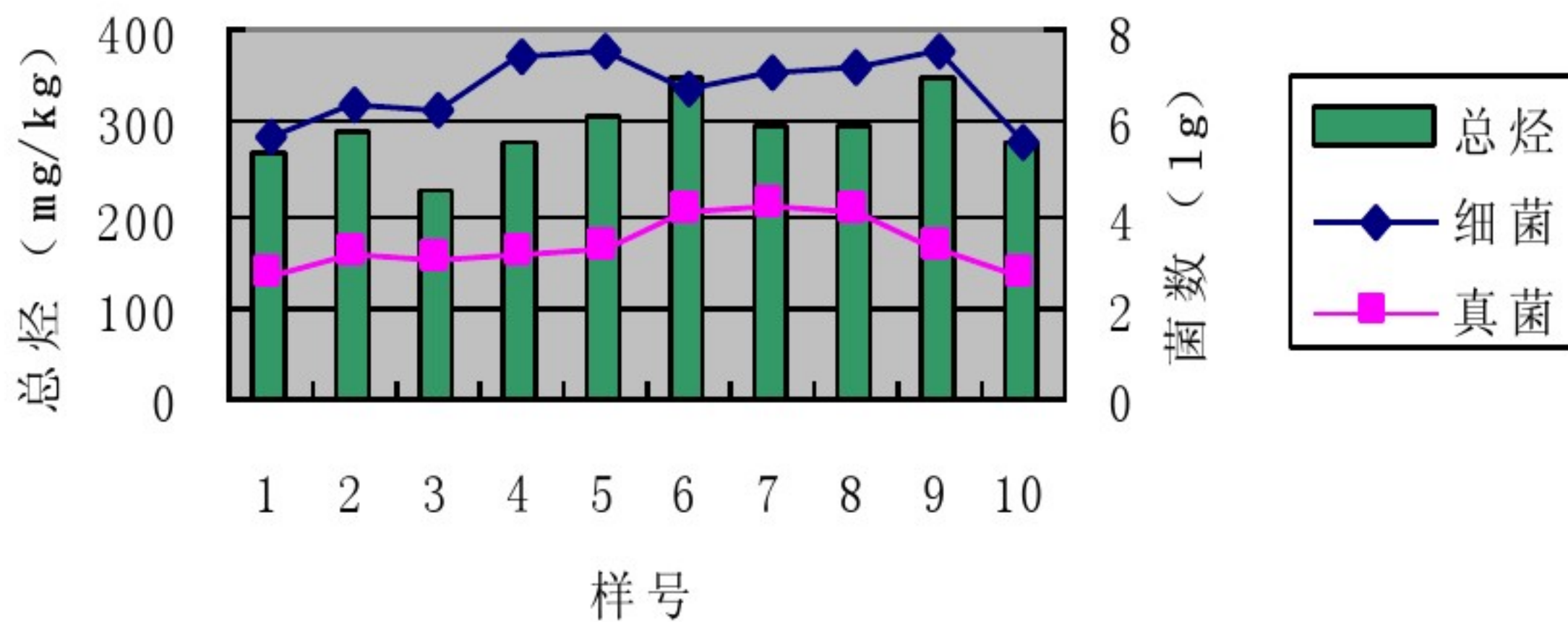
1.营养调节：

2.菌剂调节：在投加**0.5%**的肥料基础上，分别施加不同比例的细菌和真菌菌剂

3.联合修复：投加**0.5%**肥料+**0.25%**细菌菌剂+**0.25%**真菌菌剂

以空白土壤为对照

玉米不同处理的微生物数量变化



结果:

1 肥料的施加对微生物数量有提高作用，且随肥料的投加量增加而增加，但对石油的降解却存在一定的界限。

2 施加菌剂 真菌菌剂量少则细菌数量多，但真菌菌剂量多却抑制了细菌，且对石油降解效果不如其它处理；

细菌菌剂施加量不同对微生物数量都有促进作用且数量级较高。

3 联合修复中，细菌数量最大，真菌数量级不高，且总烃量残余较高。

## 不同处理对玉米植物量的影响

| 玉米 | 株高（cm） | 百粒重（g） | 产量（kg/株） |
|----|--------|--------|----------|
| 1  | 134.8  | 14.765 | 33.33    |
| 2  | 189.5  | 28.195 | 118.75   |
| 3  | 190.3  | 31.53  | 181.25   |
| 4  | 210.1  | 25.815 | 156.25   |
| 5  | 183.8  | 31.33  | 163.75   |
| 6  | 184.8  | 36.39  | 235.00   |
| 7  | 173.5  | 21.925 | 93.75    |
| 8  | 176.8  | 27.025 | 129.00   |
| 9  | 191.8  | 27.075 | 150.00   |

从生物量上看：

真菌菌剂施加的效果最明显，生物量最大；

细菌菌剂的施加对玉米的生物量作用不明显；，

菌剂的量大小对植物生物量影响不太明显；

联合修复可以提高生物量。

鉴定：真菌使用查氏培养基，用点植培养法和栽片培养法，鉴定出六种菌中的五种，分别如下：

| 真菌    | 菌株名称                                             |
|-------|--------------------------------------------------|
| SFF-1 | 宛 氏 拟 青 霉 (Paecilomyces vaiwti Bainier)          |
| SFF-2 | 拟青霉属(Paecilomyces Bainier)                       |
| SFF-3 | 互 隔 交 链 孢 霉 [Alternaria alternata(Fr.) Keissler] |
| SFF-5 | 拟青霉属(Paecilomyces Bainier)                       |
| SFF-6 | 青霉属                                              |

注：SFF-4因孢子着生位置未定有待进一步鉴定。

## 细菌:革兰氏染色法

既能观察到细菌的形态，还可根据细胞壁的成分和结构不同将所有细菌区分为两大类：染色呈红色为革兰氏染色阴性（G<sup>-</sup>），蓝紫色为革兰氏染色阳性(G<sup>+</sup>)。

分离出的十一株细菌菌株除SFB-9为G<sup>-</sup>外，其余十株均为G<sup>+</sup>，且大都为杆菌。

# 优势菌株的解脂酶活性

| 菌类 | 菌株名称  | 中性红法 | 菌类 | 菌株名称   | 中性红法 |
|----|-------|------|----|--------|------|
| 真菌 | SFF-1 | +    | 细菌 | SFB-1  | ++   |
|    | SFF-2 | ++   |    | SFB-2  | +    |
|    | SFF-3 | +++  |    | SFB-3  | ++   |
|    | SFF-5 | +++  |    | SFB-4  | —    |
|    | SFF-6 | +++  |    | SFB-5  | —    |
|    |       |      |    | SFB-6  | +    |
|    |       |      |    | SFB-7  | +    |
|    |       |      |    | SFB-8  | ++   |
|    |       |      |    | SFB-9  | +    |
|    |       |      |    | SFB-10 | +    |
|    |       |      |    | SFB-11 | ++   |

注：—无活性 +有活性 ++活性较强 +++活性强 SFF-4因其状态特殊较难断定

## 讨论：

在经过一年的污染场地原位修复后，  
土壤中微生物状况为：

优势真菌的解脂酶活性都较强，

细菌以革兰氏染色阳性为主。

谢谢！

