

Doi: 10.11835/j.issn.2096-6717.2019.165

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



石油污染土中微生物的分离鉴定及降解特性

张娟^{1a}, 方祥位^{1b,1c}, 刘汉龙^{1b,1c}, 肖杨^{1b,1c}, 张楠², 曹小方^{1b}

(1.重庆大学 a.产业技术研究院;b.土木工程学院;c.山地城镇建设与新技术教育部重点实验室,重庆 400045;
2.重庆工商大学 通识学院,重庆 400020)

摘要:为了为汽油污染土的微生物修复提供优良菌种,以 LB 培养基为基质,从石油污染土中对汽油降解菌进行了分离鉴定,以降油培养基为基质对分离得到的菌株进行汽油降解率的测定,以培养温度、培养基 pH 值及培养时间为参数对 5 种具有优良汽油降解性能的菌株进行单因素试验,基于单因素试验结果进行三因素三水平的正交试验后,以汽油降解率为响应值对试验结果进行响应面分析,筛选出具有优良降解性能的菌株,并确定了菌株降解汽油的最佳条件。结果表明:从石油污染土中分离出了 9 种具有汽油降解性能的菌株,其中,铜绿假单胞菌、假单胞菌属、苍白杆菌属、博得特氏菌属以及戈登氏菌属具有优良降解性能,这 5 种菌降解汽油的最优条件为:铜绿假单胞菌、假单胞菌属、苍白杆菌属、博得特氏菌以及戈登氏菌的最佳培养温度均为 32 ℃,培养基 pH 值均为 7.0,培养时间均为 20 h,降油培养基中的汽油降解率分别为 70.12%、76.42%、75.66%、77.50%和 73.22%。

关键词:石油污染土;汽油降解率;微生物;正交试验;污染土修复

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**2096-6717(2020)01-0144-09

Isolation, identification and degradation characteristics of microorganisms in petroleum contaminated soil

Zhang Juan^{1a}, Fang Xiangwei^{1b,1c}, Liu Hanlong^{1b,1c}, Xiao Yang^{1b,1c}, Zhang Nan², Cao Xiaofang^{1b}

(1a. Industrial Technology Research Institute; 1b. School of Civil Engineering; 1c. Key Laboratory of New Technology for Construction of Cities in Mountain Area, Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China;
2. School of General Education, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400020, P. R. China)

Abstract: In order to provide excellent strains for microbial remediation of gasoline-contaminated soil, the gasoline-degrading bacteria were isolated and identified from petroleum-contaminated soil using LB medium as the substrate, and the gasoline degradation rate was determined by using the oil-reducing medium as the

收稿日期:2019-08-24

基金项目:重庆社会事业与民生保障科技创新专项重点研发项目(cstc2017shms-zdyfX0073);国家自然科学基金(51978103,41831282)

作者简介:张娟(1994-),女,主要从事微生物分离鉴定研究,E-mail:m15086771612@163.com。

方祥位(通信作者),男,教授,博士生导师,E-mail:fangxiangwei1975@163.com。

Received:2019-08-24

Foundation items: Key Projects of Scientific and Technological Innovation for Social Undertaking and Peoples Livelihood Guarantee in Chongqing (No. cstc2017shms-zdyfX0073); National Natural Science Foundation of China (No. 51978103, 41831282)

Author brief: Zhang Juan (1994-), main research interests: microbial isolation and identification, E-mail: m15086771612@163.com.

Fang Xiangwei (corresponding author), professor, doctoral supervisor, E-mail: fangxiangwei1975@163.com.

substrate. Single factor test was carried out on five strains with excellent gasoline degradation performance at culture temperature, medium pH and culture time. Based on the single factor test results, three factors and three levels of orthogonal test were carried out to degrade with gasoline. Response surface analysis of test results with gasoline degradation rate response, screening of strains with excellent degradation performance and determining the optimal conditions for the degradation of gasoline by the strain. The results showed that nine strains with gasoline degradation properties were isolated from petroleum contaminated soil. Among which *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas*, *Pleurobacter*, *Bordetella* and *Goldenella* had excellent degradation performance. The optimal conditions for determining the degradation of gasoline by these five kinds of bacteria as follows: The optimum culture temperature for *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas*, *Pleurobacter*, *Bordetella* and *Gordonia* is 32°C, the pH of the medium is 7.0 and the culture time is 20 h. The degradation rates of gasoline in the oil-reducing medium are 70.12%, 76.42%, 75.66%, 77.50% and 73.22%, respectively.

Keywords: petroleum contaminated soil; gasoline degradation rate; microorganisms; orthogonal test; remediation of contaminated soil

石油是一种重要的能源,对经济和人民的生活水平都有很大的推动作用,但在石油的开采、加工以及运输过程中会发生石油泄漏等问题,资料表明,中国目前直接进入环境中的石油约有 6×10^5 t,对土壤以及地下水造成严重污染。而汽油是用量最大的轻质石油产品之一,汽油物质进入土壤后,主要从两个方面对土壤的理化性质造成影响:一是会影响土壤的通透性,使得土壤的结构遭到破坏^[1];二是汽油中的反应基能够与土壤中的无机氮和磷结合并限制土壤的硝化作用和脱磷酸作用,导致土壤中有机的碳氮比和碳磷比增大^[2-4]。此外,汽油中的某些烃类具有致病变、致癌甚至致畸形的作用,通过污染土进入人体后,大量积累会严重危害到人体的健康^[5]。因此,汽油污染土的治理和修复一直受到高度重视。

传统的污染土治理方法有物理法和化学法,物理修复法主要有挖掘填埋法、电解法、洗涤法和气体吹脱法等,但物理法所用的设备价格昂贵且可能破坏土壤的结构和组分。化学法主包括氧化剂氧化法、萃取法、热分解法和光化学氧化法等,主要技术是利用化学浸出进行除油,但此方法有可能对土体造成二次污染^[6]。

生物修复法是一种绿色节能的方法,主要利用微生物及其他生物,将土壤中的有毒烃类污染物降解为二氧化碳和水等无毒无害物质,从而达到修复土壤的目的^[7]。研究发现,有大量微生物能够以石油中的烃类作为唯一碳源进行繁殖生长,微生物繁殖较快且比表面积大,因此,微生物修复污染土成为研究热点^[8]。目前,关于原油生物降解的研究主要集中在降解菌的筛选与鉴定^[9-10]和生物降解机理^[11-12]。闫志宇等^[13]分离筛选出的菌株 *Bacillus subtilis* L3 能高效降解乙草胺。Guo 等^[14]从柴油污染的土壤中分离出两种耐寒的石油烃降解菌株 CHD1 和 CHD2。而汽油作为用量最大的石油提取

物,对土壤造成的污染也最多。

已有研究表明,多种微生物都能对汽油烃类物质进行降解,但降解能力存在较大差异,因此,筛选降解汽油烃能力较强的菌种将会大大提高污染土的修复效率^[15]。笔者通过从石油污染土中的微生物进行分离鉴定以及通过正交试验和响应面分析对其降解汽油性能进行测定和优化,从而为汽油污染土的生物修复法提供优良菌种。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

石油污染土来源于甘肃省成县油气管道转换站,图1所示为采集的土样。主要取自表层以下2~15 cm处的污染土。



图1 汽油污染土

Fig.1 Gasoline contaminated soil

1.2 培养基

LB培养基:酵母浸出粉 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂 15 g/L,配制 200 mL,pH 值调节为 7.0,121 °C 灭菌 20 min。

降油培养基: NaCl 10 g, NH₄Cl 0.50 g, KH₂PO₄ 0.50 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.50 g, CaCl₂ 0.1 g, KCl 0.10 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g,蒸馏水 1 000 mL,95 号汽油 4 g,pH 值 7.2,121 °C 灭菌 20 min。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的分离与鉴定 称取石油污染土 1.0 g 放入到装有 9.0 mL 的无菌生理盐水的试管内,在漩涡混合器中充分混匀,此时,溶液的稀释度为 10^{-1} 。利用梯度稀释法对其继续进行稀释,稀释的梯度分别为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 。用移液器从 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 这 3 个梯度中吸取 20 μ L 的稀释液,然后在超净工作台内将其接种到灭菌过的 LB 培养基中进行涂布,涂布均匀后,将培养基放入 32 $^{\circ}$ C 的培养箱内倒置培养 24 h^[16-17]。培养完成后,观察并记录菌落形态,挑取不同形态的单菌落接种到固体培养基中,重复多次。对菌种进行纯化后,分别进行生理生化实验,然后将纯化后的菌株接种于相应的培养基斜面,在培养箱内培养 24 h 后,保存于 4 $^{\circ}$ C 的冰箱内。对每个菌种的 DNA 进行提取^[4,18-19],利用细菌的通用引物进行 PCR 扩增,得到约 1 500 bp 条带后,通过 Sanger 法进行测序(擎科兴业生物有限公司完成),将得到的序列利用 BLAST 软件与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比对,从而确定菌株的类别。

1.3.2 优良降解菌株的筛选 将纯化后的菌种在超净工作台内接种到 200 mL 的 LB 液体培养基中,然后置于 32 $^{\circ}$ C、180 r/min 的摇床内进行扩大培养,培养 24 h 后,测定菌液在 600 nm 处的吸光度。吸取 2 mL 菌液,接种到 200 mL 的降油培养基内,同样在 32 $^{\circ}$ C、180 r/min 的摇床内进行培养,在培养 2、4、6 d 后,分别对培养基内的汽油含量进行测定,并计算最终的汽油降解率。每个菌种做 3 组平行试验,结果取平均值,从而对具有高效汽油降解能力的菌种进行筛选。

1.3.3 汽油降解率的测定方法 将降解后的培养液放入离心机内离心(转速为 100 r/min),20 min 后提取上清液到新的灭菌过的锥形瓶内,每 1 L 上清液加入 5 mL 硫酸进行酸化,然后加入 40 mL 的石油醚,将培养基内残余的汽油提取后对其质量进行测定,汽油降解率的计算式为^[20]

$$\text{汽油降解率} = (m_0 - m_1) / m_0 \times 100\%$$

式中: m_0 为初始汽油的质量; m_1 为培养基中残余的汽油质量。

1.3.4 菌种降解性能的测定

1) 单因素试验 以 LB 培养基作为基质,按照表 1 的 3 组实验方案进行菌种的培养,培养 20 h 后,吸取 20 μ L 菌液加入到降油培养基内培养 6 d 后,对培养基中残余汽油含量进行测定,计算并记录汽油降解率。

2) 在单因素试验的结果之上,对具有高效汽油降解能力的菌种进行三因素三水平的正交实验,然后按照实验方案所列的培养条件进行培养^[3,21]。利用 Design-expert 软件对实验结果进行分析以及最优求解从而确定菌种降解汽油的最佳培养条件。

表 1 单因素试验方案

| 组别 | 定量 | 变量 |
|--------------------|------------------------------------|---------------------|
| 改变温度/ $^{\circ}$ C | 培养基 pH 值为 7, 培养 20 h | 26、29、32、35、38 |
| 改变培养基 pH 值 | 温度为 32 $^{\circ}$ C, 培养 20 h | 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 |
| 改变培养时间/h | 温度为 32 $^{\circ}$ C, 培养基 pH 值为 7.0 | 12、16、20、24、28 |

2 结果与分析

2.1 汽油降解菌的分离与鉴定

从汽油污染土中共分离出 9 株菌株,除了菌 1 和菌 5 形态特征较为明显之外,其余在平板上的特征较为相似。将这 9 种菌株进行编号为菌 1~菌 9,并对其进行了形态学观察,这 9 种菌上的特点见图 2。

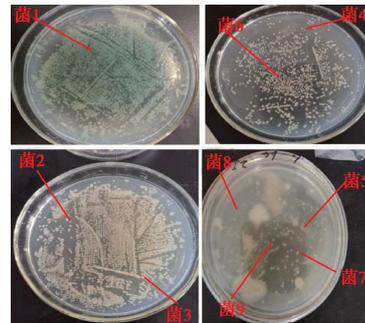


图 2 菌落在平板上的形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of colonies on flat plates

对每种菌进行分离纯化后进行生理生化实验,结果如表 2 所示。

利用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中的 Blast 对测序结果和已知序列进行比对,分析其相似度,具体的鉴定结果为:菌 1 为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),菌 2 为假单胞菌属(*Pseudomonas*),菌 3 为苍白杆菌属(*Pleurobacter*),菌 4 为博得特氏菌属(*Bordetella*),菌 5 为戈登氏菌属(*Gordonia*),菌 6 为同温层芽孢杆菌(*Bacillus*),菌 7 为洛菲不动杆菌(*Acinetobacter*),菌 8 为琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*),菌 9 为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),且相似率均大于 99.9%。

表 2 菌株的生理生化反应特点
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strains

| 菌株 | 菌落形态 | 革兰氏染色 | 芽孢染色 | 好氧程度 | 过氧化氢酶 | 氧化酶 | 淀粉水解 | 吲哚实验 | 果聚糖形成 | 运动性 | 精氨酸双水解酶 |
|-----|----------|-------|------|-------|-------|-----|------|------|-------|-----|---------|
| 菌 1 | 青色光滑不透明 | — | — | 专性需氧 | + | + | — | — | — | + | + |
| 菌 2 | 白色不透明 | — | — | 专性需氧 | + | + | — | — | — | + | + |
| 菌 3 | 白色光滑不透明 | — | — | 专性好氧 | — | — | + | + | — | + | — |
| 菌 4 | 米色光滑不透明 | — | — | 专性需氧 | + | + | + | + | — | — | — |
| 菌 5 | 淡橙色光滑不透明 | + | — | 好氧 | + | — | — | — | — | — | + |
| 菌 6 | 白色光滑不透明 | + | + | 兼性厌氧 | + | + | — | — | — | + | — |
| 菌 7 | 灰白光滑 | — | — | 专性需氧 | + | — | + | + | — | — | — |
| 菌 8 | 淡黄湿润不透明 | — | — | 专性需氧+ | + | — | + | + | — | — | — |
| 菌 9 | 乳白不透明 | + | + | 兼性厌氧 | + | + | — | — | — | — | — |

注：“+”表示阳性；“—”表示阴性。

2.2 优良降解菌的筛选

对 9 株菌在降油培养基内培养 6 d 后的汽油降解率进行测定,结果见表 3。

根据表 3 可知,菌 1、2、3、4、5 的汽油降解率均超过 60%,证明菌 1、2、3、4、5 降解汽油的能力较好,即铜绿假单胞菌、假单胞菌菌属、苍白杆菌属、博得特氏菌属以及戈登氏菌属对汽油有着较好的降解能力,且这 5 种菌无致病性,对环境无污染性。

表 3 9 株菌株的汽油降解率

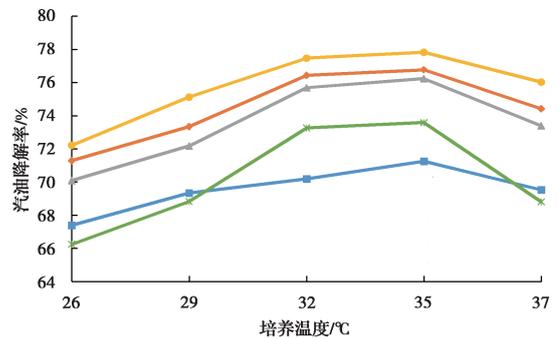
Table 3 Gasoline degradation rate of nine strains

| 菌株编号 | 汽油含量/(g·L ⁻¹) | | | | 汽油降解率/% |
|------|---------------------------|-------|-------|-------|---------|
| | 0 d | 2 d | 4 d | 6 d | |
| 菌 1 | 4 | 3.294 | 1.52 | 1.190 | 70.25 |
| 菌 2 | 4 | 2.893 | 1.28 | 1.025 | 74.37 |
| 菌 3 | 4 | 3.41 | 1.362 | 1.112 | 72.20 |
| 菌 4 | 4 | 2.78 | 1.185 | 0.995 | 75.13 |
| 菌 5 | 4 | 3.325 | 1.48 | 1.201 | 69.98 |
| 菌 6 | 4 | 3.452 | 1.982 | 1.420 | 64.50 |
| 菌 7 | 4 | 3.78 | 2.031 | 1.980 | 50.50 |
| 菌 8 | 4 | 3.82 | 2.122 | 1.857 | 53.57 |
| 菌 9 | 4 | 3.95 | 2.095 | 1.880 | 53.00 |

2.3 菌株降解性能的测定

2.3.1 单因素试验结果 培养温度对 5 种菌的汽油降解率的影响如图 3 所示。由图 3 可知,培养温度对 5 种菌的汽油降解率的影响趋势大致相同,当温度小于 35 °C 时,随着培养温度的升高,汽油降解率呈现上升趋势,当温度大于 35 °C,汽油降解开始下降,对于这 5 种菌来说,35 °C 是较为合适的培养温度。

培养基的 pH 值对 5 种菌的汽油降解率的影响

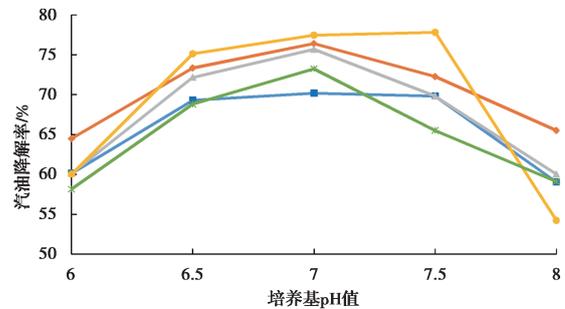


注: —菌1 —菌2 —菌3 —菌4 —菌5

图 3 培养温度对 5 种菌汽油降解率的影响

Fig.3 Effect of culture temperature on the degradation rate of five kinds of bacteria

如图 4 所示。由图 4 可知,培养基 pH 值对 5 种菌的汽油降解率的影响趋势大致相同,除了菌 4 在培养基 pH 为 7.5 时汽油降解率达到最大值,其余 4 种菌均在培养基 pH 为 7 时,汽油降解率达到最大值。



注: —菌1 —菌2 —菌3 —菌4 —菌5

图 4 培养基 pH 值对汽油降解率的影响

Fig.4 Effect of medium pH on gasoline degradation rate

培养时间对 5 种菌汽油降解率的影响如图 5 所示。由图 5 可知,菌 1 在培养 24 h 时汽油降解率达到最大值,超过 24 h 后开始下降,菌 1 在 20、24 h 的汽油降解率较为稳定,但超过 24 h 后开始下降,其余 3 种菌的汽油降解率均在培养 20 h 时达到最大值。

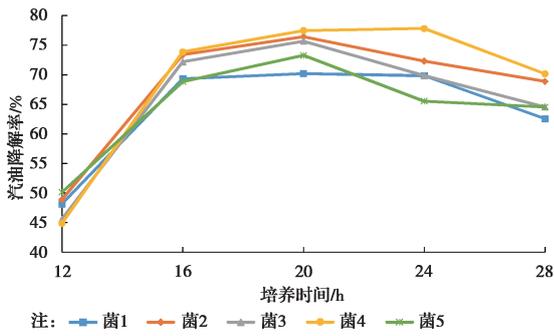


图 5 培养时间对 5 种菌汽油降解率的影响

Fig.5 Effect of culture time on the degradation rate of five kinds of bacteria

2.3.2 正交实验结果 基于单因素试验结果确定的正交实验的因素和水平如表 4 所示。

表 4 实验因素和水平

Table 4 Experimental factors and level

| 水平 | A 培养温度/°C | B 培养基 pH 值 | C 培养时间/h |
|----|--------------|---------------|-------------|
| -1 | 29 | 6.5 | 16 |
| 0 | 32 | 7.0 | 20 |
| 1 | 35 | 7.5 | 24 |

根据设计的正交实验方案进行实验后,对每组的残余汽油量进行测定后对汽油降解率进行计算,得到的正交实验结果如表 5 所示。

将实验数据录入软件进行分析,菌 1~菌 5 的正交实验结果的方差分析如表 6~表 10 所示。

表 5 5 种菌降解率研究的正交实验结果

Table 5 Orthogonal experimental results of five bacterial degradation rates

| 序号 | A | B | C | 汽油降解率/% | | | | |
|----|----|----|----|---------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | 菌 1 | 菌 2 | 菌 3 | 菌 4 | 菌 5 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 70.18 | 76.42 | 75.68 | 77.46 | 73.25 |
| 2 | -1 | 1 | 0 | 69.02 | 73.19 | 72.15 | 75.13 | 68.81 |
| 3 | -1 | 0 | 1 | 69.33 | 73.36 | 72.23 | 75.12 | 68.85 |
| 4 | -1 | 0 | -1 | 69.31 | 73.21 | 72.11 | 75.03 | 68.72 |
| 5 | 0 | 1 | 1 | 69.43 | 73.40 | 72.24 | 74.47 | 68.92 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 69.29 | 73.29 | 72.17 | 75.11 | 68.79 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 70.12 | 76.38 | 75.67 | 77.50 | 73.26 |
| 8 | 1 | -1 | 0 | 69.24 | 73.30 | 72.15 | 75.08 | 68.84 |
| 9 | 1 | 1 | 0 | 69.36 | 73.38 | 72.26 | 74.48 | 68.87 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 70.18 | 76.45 | 75.66 | 77.61 | 73.25 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 70.2 | 76.43 | 75.68 | 77.52 | 73.25 |
| 12 | 0 | -1 | -1 | 69.34 | 73.25 | 72.20 | 75.02 | 68.74 |
| 13 | 0 | 1 | -1 | 69.39 | 73.38 | 72.16 | 75.03 | 68.79 |
| 14 | -1 | -1 | 0 | 69.24 | 73.33 | 72.11 | 75.10 | 68.80 |
| 15 | 1 | 0 | 1 | 69.38 | 73.39 | 72.28 | 74.49 | 68.91 |
| 16 | 0 | -1 | 1 | 69.35 | 73.36 | 72.20 | 75.14 | 68.88 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 70.15 | 76.42 | 75.67 | 77.61 | 73.24 |

表 6 菌 1 正交实验结果的方差分析

Table 6 Analysis of variance of orthogonal experiment results of bacteria 1

| 项目 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----|------------------------|-----|------------------------|----------|----------|-----|
| 模型 | 2.71 | 9 | 0.30 | 91.75 | <0.000 1 | ** |
| A | 0.017 | 1 | 0.017 | 5.21 | 0.056 4 | |
| B | 1.125×10 ⁻⁴ | 1 | 1.125×10 ⁻⁴ | 0.034 | 0.858 4 | |
| C | 0.003 2 | 1 | 0.003 2 | 0.97 | 0.356 5 | |
| AB | 0.029 | 1 | 0.029 | 0.001 53 | 0.020 9 | * |
| AC | 1.225×10 ⁻³ | 1 | 1.225×10 ⁻³ | 0.37 | 0.560 7 | |
| BC | 2.250×10 ⁻⁴ | 1 | 2.250×10 ⁻⁴ | 0.068 | 0.801 1 | |

续表 6

| 项目 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|-----------------------|-----|------------------------|--------|----------|-----|
| A ² | 1.05 | 1 | 1.05 | 321.08 | <0.000 1 | ** |
| B ² | 0.85 | 1 | 0.85 | 260.13 | <0.000 1 | ** |
| C ² | 0.48 | 1 | 0.48 | 146.43 | <0.000 1 | ** |
| 残差 | 0.023 | 7 | 3.285×10 ⁻³ | | | |
| 失拟项 | 0.019 | 3 | 6.358×10 ⁻³ | 6.49 | 0.051 3 | nc |
| 纯误差 | 3.92×10 ⁻³ | 4 | 9.8×10 ⁻⁴ | | | |

注:“*”表示显著;“**”表示极显著;“nc”表示不显著。

表 7 菌 2 正交实验结果的方差分析

Table 7 Analysis of variance of orthogonal experiment results of bacteria 2

| 项目 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|------------------------|-----|------------------------|----------|----------|-----|
| 模型 | 34.52 | 9 | 3.84 | 2 042.52 | <0.000 1 | ** |
| A | 1.125×10 ⁻⁴ | 1 | 1.125×10 ⁻⁴ | 0.060 | 0.813 7 | |
| B | 0.021 | 1 | 0.021 | 11.19 | 0.012 3 | * |
| C | 0.018 | 1 | 0.018 | 9.61 | 0.017 3 | * |
| AB | 0.068 | 1 | 0.068 | 36.00 | 0.000 5 | ** |
| AC | 6.25×10 ⁻⁴ | 1 | 6.25×10 ⁻⁴ | 0.33 | 0.582 1 | |
| BC | 2.025×10 ⁻³ | 1 | 2.025×10 ⁻³ | 1.08 | 0.333 6 | |
| A ² | 10.95 | 1 | 10.95 | 5 833.68 | <0.000 1 | ** |
| B ² | 10.48 | 1 | 10.48 | 5 583.26 | <0.000 1 | ** |
| C ² | 9.35 | 1 | 9.35 | 4 981.24 | <0.000 1 | ** |
| 残差 | 0.013 | 7 | 1.878×10 ⁻³ | | | |
| 失拟项 | 0.010 | 3 | 3.408×10 ⁻³ | 4.67 | 0.085 4 | nc |
| 纯误差 | 2.92×10 ⁻⁴ | 4 | 7.3×10 ⁻³ | | | |

注:“*”表示显著;“**”表示极显著;“nc”表示不显著。

表 8 菌 3 正交实验结果的方差分析

Table 8 Analysis of variance of orthogonal experiment results of bacteria 3

| 项目 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|------------------------|-----|------------------------|-----------|----------|-----|
| 模型 | 43.11 | 9 | 4.79 | 14 452.75 | <0.000 1 | ** |
| A | 8.45×10 ⁻³ | 1 | 8.45×10 ⁻³ | 25.50 | 0.001 5 | ** |
| B | 6.05×10 ⁻³ | 1 | 6.05×10 ⁻³ | 18.25 | 0.003 7 | ** |
| C | 0.018 | 1 | 0.018 | 54.46 | 0.000 2 | ** |
| AB | 1.225×10 ⁻³ | 1 | 1.225×10 ⁻³ | 3.70 | 0.096 0 | |
| AC | 2.5×10 ⁻⁵ | 1 | 2.5×10 ⁻⁵ | 0.075 | 0.791 5 | |
| BC | 2.5×10 ⁻⁵ | 1 | 2.5×10 ⁻⁵ | 0.075 | 0.791 5 | |
| A ² | 12.85 | 1 | 12.85 | 38 762.16 | <0.000 1 | ** |
| B ² | 13.07 | 1 | 13.07 | 39 430.75 | <0.000 1 | ** |
| C ² | 12.63 | 1 | 12.63 | 38 099.29 | <0.000 1 | ** |
| 残差 | 2.32×10 ⁻³ | 7 | 3.314×10 ⁻⁴ | | | |
| 失拟项 | 1.8×10 ⁻³ | 3 | 6×10 ⁻⁴ | 4.62 | 0.086 8 | nc |
| 纯误差 | 5.2×10 ⁻⁴ | 4 | 1.3×10 ⁻⁴ | | | |

注:“*”表示显著;“**”表示极显著;“nc”表示不显著。

表 9 菌 4 正交实验结果的方差分析
Table 9 Analysis of variance of orthogonal experiment results of bacteria 4

| 项目 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|------------------------|-----|------------------------|----------|----------|-----|
| 模型 | 24.34 | 9 | 2.70 | 1 091.50 | <0.000 1 | ** |
| A | 0.19 | 1 | 0.19 | 75.09 | <0.000 1 | ** |
| B | 0.19 | 1 | 0.19 | 76.32 | <0.000 1 | ** |
| C | 0.12 | 1 | 0.12 | 47.47 | 0.000 2 | ** |
| AB | 0.099 | 1 | 0.099 | 40.04 | 0.000 4 | ** |
| AC | 0.13 | 1 | 0.13 | 50.86 | 0.000 2 | ** |
| BC | 0.12 | 1 | 0.12 | 46.65 | 0.000 2 | ** |
| A ² | 6.81 | 1 | 6.81 | 2 749.38 | <0.000 1 | ** |
| B ² | 7.06 | 1 | 7.06 | 2 847.50 | <0.000 1 | ** |
| C ² | 7.17 | 1 | 7.17 | 2 891.67 | <0.000 1 | ** |
| 残差 | 0.017 | 7 | 2.478×10 ⁻³ | | | |
| 失拟项 | 3.825×10 ⁻³ | 3 | 1.275×10 ⁻³ | 0.38 | 0.775 4 | nc |
| 纯误差 | 0.014 | 4 | 3.38×10 ⁻³ | | | |

注：“*”表示显著；“**”表示极显著；“nc”表示不显著。

表 10 菌 5 正交实验结果的方差分析
Table 10 Analysis of variance of orthogonal experiment results of bacteria 5

| 项目 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|------------------------|-----|------------------------|-----------------------|----------|-----|
| 模型 | 69.10 | 9 | 7.68 | 79 620.51 | <0.000 1 | ** |
| A | 6.613×10 ⁻³ | 1 | 6.613×10 ⁻³ | 68.57 | <0.000 1 | ** |
| B | 2.112×10 ⁻³ | 1 | 2.112×10 ⁻³ | 21.91 | 0.002 3 | ** |
| C | 0.034 | 1 | 0.034 | 350.52 | <0.000 1 | ** |
| AB | 1×10 ⁻⁴ | 1 | 1×10 ⁻⁴ | 1.04 | 0.342 4 | |
| AC | 2.5×10 ⁻⁵ | 1 | 2.5×10 ⁻⁵ | 0.26 | 0.626 3 | |
| BC | 2.5×10 ⁻⁵ | 1 | 2.5×10 ⁻⁵ | 0.26 | 0.626 3 | |
| A ² | 20.70 | 1 | 20.70 | 2.147×10 ⁵ | <0.000 1 | ** |
| B ² | 20.43 | 1 | 20.43 | 2.11×10 ⁵ | <0.000 1 | ** |
| C ² | 20.66 | 1 | 20.66 | 2.142×10 ⁵ | <0.000 1 | ** |
| 残差 | 6.75×10 ⁻⁴ | 7 | 9.643×10 ⁻⁵ | | | |
| 失拟项 | 4.75×10 ⁻⁵ | 3 | 1.583×10 ⁻⁴ | 3.17 | 0.147 3 | nc |
| 纯误差 | 2×10 ⁻⁴ | 4 | 5×10 ⁻⁵ | | | |

注：“*”表示显著；“**”表示极显著；“nc”表示不显著。

由表 6~表 10 可知,这 5 个模型的 F 值分别为 91.75、2 042.52、14 452.75、1 091.50 以及 79 620.51,且 P 值都小于 0.000 1,说明这 5 个模型的回归方程极显著,且这 5 个模型的失拟项都不显著,说明这 5 个模型都具有较好的模拟性,因此,这 5 个模型可以对石油降解率进行分析和预测。

F 值的大小反映出因素对实验因变量的影响程度,F 值越大,表示因素对实验因变量的影响越显著。由表 6 可知,对菌 1 的汽油降解率影响大小的因素依次是:因素 A>因素 C>因素 B(培养温度>

培养时间>培养基 pH 值);由表 7 可知,对菌 2 的汽油降解率的影响大小的因素依次为:因素 B>因素 C>因素 A(培养基 pH 值>培养时间>培养温度);由表 8 可知,对菌 3 的汽油降解率影响大小的因素依次为:因素 C>因素 A>因素 B(培养时间>培养温度>培养基 pH 值);由表 9 可知,对菌 4 的汽油降解率影响大小的因素依次为:因素 B>因素 A>因素 C(培养基 pH 值>培养温度>培养时间);由表 10 可知,对菌 5 的汽油降解率影响大小的因素依次为:因素 C>因素 A>因素 B(培养时间>培养

温度>培养基 pH 值)。

利用 Design-Expert 8.0.6 软件联合求解这 5 个模型,得到结果为:菌 1 的最佳培养温度为 32.14 ℃,培养基的最佳 pH 值为 7.00,最佳培养时间为 20.12 h,在此条件下算出的石油降解率为 70.167 4%;菌 2 的最佳培养温度为 32.00 ℃,培养基的最佳 pH 值为 7.01,最佳的培养时间为 20.07 h,在此条件下算出的汽油降解率为 76.416 8%;菌 3 的最佳培养温度为 32.03 ℃,培养基的最佳 pH 值为 7.00,最佳培养时间为 20.05 h,在此条件下算出的汽油降解率为 75.676 6%;菌 4 的最佳培养温度为 31.84 ℃,培养基的最佳 pH 值为 6.97,最佳培养时间为 19.84 h,在此条件下算出的汽油降解率为 77.524 6%;菌 5 的最佳培养温度为 32.02 ℃,培养基的最佳 pH 值为 7.00,最佳的培养时间为 20.06 h,在此条件下算出的汽油降解率为 73.250 6%。

由于这些最佳条件的参数在实际操作水平中很难实现,考虑到因素对于结果的影响大小,做以下调整:将菌 1 的培养温度调整为 32.1 ℃,培养时间调整为 20 h,在此条件下再次进行实验得到的汽油降解率为 70.17%;将菌 2 的培养基 pH 值调整为 7,培养时间为 20 h,在此条件下进行实验得到的汽油降解率为 76.42%;将菌 3 的培养温度调整为 32.0 ℃,培养时间为 20 h,在此条件下进行实验得到的汽油降解率为 75.66%;将菌 4 的培养温度调整为 31.8 ℃,培养基 pH 值调整为 7.0,培养时间为 20 h,在此条件下进行实验得到的汽油降解率为 77.50%;将菌 5 的培养温度调整为 32 ℃,培养时间为 20 h,在此条件下进行实验得到的汽油降解率为 73.22%。

3 结论

1)从石油污染土中分离出的 9 种菌分别为:铜绿假单胞菌、假单胞菌属、苍白杆菌属、博得特氏菌属、戈登氏菌属、同温层芽孢杆菌、洛菲不动杆菌、琼氏不动杆菌以及暹罗芽孢杆菌,均对汽油具有一定的降解能力。

2)筛选出的高效汽油降解能力的 5 种菌为铜绿假单胞菌、假单胞菌属、苍白杆菌属、博得特氏菌属以及戈登氏菌属,5 种菌的汽油降解率均超过 60%。

3)5 种具有较高汽油降解能力的菌降解汽油的最佳培养条件分别为:假单胞菌属、苍白杆菌属、戈登氏菌属、铜绿假单胞菌以及博得特氏菌属的最佳培养温度均为 32 ℃;培养基 pH 值均为 7.0;培养时间均为 20 h。铜绿假单胞菌、假单胞菌属、苍白杆菌属、博得特氏菌以及戈登氏菌的汽油降解率分别为 70.12%、76.42%、75.66%、77.50% 和 73.22%,且这 5 种菌对人体没有致病性,也不会对环境造成污染,可为污染土的生物修复提供优良菌种。

参考文献:

- [1] MOHAMMAD A S, WAHBA S A, AL-KHATIEB S O. Physical properties of soils contaminated by oil lakes, Kuwait[J]. Journal of Environmental Science and Health Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology, 1996, 31(7): 1511-1528.
- [2] 何炜,陈鸿汉,刘菲,等.土壤气相抽提去除土壤中汽油烃污染物柱试验研究[J].环境污染与防治,2007,29(3):186-189.
HE W, CHEN H H, LIU F, et al. Soil vapor extraction for removing gasoline hydrocarbons in a soil column[J]. Environmental Pollution & Control, 2007, 29(3): 186-189.(in Chinese)
- [3] 郑金秀,张甲耀,赵晴,等.高效石油降解菌的选育及其降解特性研究[J].环境科学与技术,2006,29(3):1-2,40.
ZHENG J X, ZHANG J Y, ZHAO Q, et al. Bacteria strains for petroleum degrading: screening, culture and UV-induced mutation[J]. Environmental Science and Technology, 2006, 29(3): 1-2, 40.(in Chinese)
- [4] 崔丽虹,郭萍,李宝明,等.石油烃降解菌的筛选与鉴定[J].生物技术通报,2009(9):143-147.
CUI L H, GUO P, LI B M, et al. The screening and identification of total petroleum hydrocarbon degrading bacteria[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(9): 143-147.(in Chinese)
- [5] 王娜.我国土壤石油污染的文献计量分析[J].环境工程,2019,37(Sup):305-307.
WANG N. Bibliometric analysis of soil petroleum pollution in China [J]. Environmental Engineering, 2019, 37(Sup): 305-307.(in Chinese)
- [6] 郭晓方,卫泽斌,吴启堂.乙二胺四乙酸在重金属污染土壤修复过程的降解及残留[J].农业工程学报,2015,31(7):272-278.
GUO X F, WEI Z B, WU Q T. Degradation and residue of EDTA used for soil repair in heavy metal-contaminated soil [J]. Transactions of the CSAE, 2015, 31(7): 272-278.(in Chinese)
- [7] 蔺昕,李培军,台培东,等.石油污染土壤植物-微生物修复研究进展[J].生态学杂志,2006,25(1):93-100.
LIN X, LI P J, TAI P D, et al. Research progress in phyto-microbial remediation of petroleum-contaminated soil[J]. Chinese Journal of Ecology, 2006, 25(1): 93-100.(in Chinese)
- [8] LI C, BAI Y, JIAO Z J. Influence of pollution concentration on bioremediation of petroleum-contaminated soil [C]//2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, June 18-20, 2010. Chengdu, China, IEEE, 2010.
- [9] WANG J, SANDOVAL K, DING Y, et al. Biodegradation of dispersed Macondo crude oil by indigenous Gulf of

- Mexico microbial communities[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 557/558: 453-468.
- [10] VARJANI S J, RANA D P, JAIN A K, et al. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 103: 116-124.
- [11] PRINCE R C, NASH G W, HILL S J. The biodegradation of crude oil in the deep ocean [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 111(1/2): 354-357.
- [12] KRISTENSEN M, JOHNSEN A R, CHRISTENSEN J H. Marine biodegradation of crude oil in temperate and arctic water samples [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 300: 75-83.
- [13] 闫志宇, 翟蓓蓓, 张娟, 等. 乙草胺降解菌 *Bacillus subtilis* L3 的土壤修复效果研究[J]. *中国农业科技导报*, 2016, 18(2): 65-71.
YAN Z Y, ZHAI B B, ZHANG J, et al. Research on the soil restoration effect of an acetochlor-degrading strain *Bacillus subtilis* L3[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2016, 18(2): 65-71. (in Chinese)
- [14] GUO P, LIN J G, CAO B X, et al. Isolation of petroleum hydrocarbon degrading bacteria from the Liaohe estuary at cold climate[J]. *Advanced Materials Research*, 2015, 1092/1093: 878-881.
- [15] 徐金兰, 王慧芳, 王荣, 等. 温和预氧化提高后续生物修复石油污染土壤[J]. *环境科学*, DOI: 10.13227/j.hjkx.201904235.
XU J L, WANG H F, WANG R, et al. Improving bioremediation of crude oil-contaminated soil by mild pre-oxidation [J]. *Environmental Science*, DOI: 10.13227/j.hjkx.201904235.
- [16] 罗湘南, 罗人明, 陈天培, 等. 石油烃类降解菌分离筛选及其特性的实验[J]. *环境科学与技术*, 2003, 26(4): 15-17, 65.
LUO X N, LUO R M, CHEN T P, et al. Screening of lubricating oil-degrading strains and studies on their degradation ability [J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 26(4): 15-17, 65. (in Chinese)
- [17] 张楠, 陈波水, 杨致邦, 等. 润滑油降解菌的分离、鉴定及降解特性[J]. *环境科学研究*, 2010, 23(6): 748-753.
ZHANG N, CHEN B S, YANG Z B, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of bacterial strains for biodegradation of lubricating oil [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2010, 23(6): 748-753. (in Chinese)
- [18] 邸富荣, 宋东辉, 刘凤路, 等. 分离海洋不动杆菌及其对石油烃降解性能研究[J]. *海洋环境科学*, 2017, 36(6): 898-904.
DI F R, SONG D H, LIU F L, et al. Isolation of marine acinetobacter and its characteristics of petroleum hydrocarbon degradation [J]. *Marine Environmental Science*, 2017, 36(6): 898-904. (in Chinese)
- [19] 廖雪义, 刘秀红, 余海忠. 萘降解菌的分离与鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(5): 2248-2249, 2253.
LIAO X Y, LIU X H, YU H Z. Isolation and identification of naphthalene-degrading strains [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(5): 2248-2249, 2253. (in Chinese)
- [20] KHAN A A, ZYTNER R G. Degradation rates for petroleum hydrocarbons undergoing bioventing at the meso-scale[J]. *Bioremediation Journal*, 2013, 17(3): 159-172.
- [21] 郑学昊, 孙丽娜, 王晓旭, 等. 植物-微生物联合修复 PAHs 污染土壤的调控措施对比研究[J]. *生态环境学报*, 2017, 26(2): 323-327.
ZHENG X H, SUN L N, WANG X X, et al. Compared with different regulation on phytoremediation-microorganism combined remediation PAHs contaminated soil [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2017, 26(2): 323-327. (in Chinese)

(编辑 王秀玲)