

doi:10.11835/j.issn.2096-6717.2019.180

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



# 石油烃混合降解菌对汽油污染土的降解条件优化试验研究

曹小方<sup>1a</sup>, 方祥位<sup>1a,1b</sup>, 刘汉龙<sup>1a,1b</sup>, 张楠<sup>2</sup>, 张娟<sup>1c</sup>

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

**摘要:**为测定实验室提取的 5 种石油烃降解菌的混合菌悬液对汽油污染土的降解效果, 利用气相色谱-质谱联用仪对经过降解菌降解的汽油污染土化合物进行定性分析, 以鉴定此混合菌悬液对汽油污染土是否有降解能力; 考虑 pH 值、温度、土壤含水率及降解菌接种量等因素, 采用单因素试验和多因素正交试验进行降解率测定, 以优化此混合菌悬液对汽油污染土的降解条件。试验结果表明, 单因素试验条件下, 经过试验前后化合物组分比较发现, 实验室提取的 5 种混合降解菌对汽油污染土有良好的降解能力; 由相对峰面积比图发现, 温度和降解菌接种量相对于含水率和 pH 值这两个因素来说, 对混合降解菌降解效果的影响更为显著; 当 pH 值在 6~8、降解温度在 30~35 °C、含水率在 15%~25%、降解菌接种量在 1~2.5 mL 范围时, 混合菌悬液的降解效果相对明显。多因素正交试验条件下, 混合菌悬液的最佳降解条件是: 温度为 32 °C, pH 值为 7, 降解菌接种量为 1 mL, 含水率为 25%。

**关键词:**汽油污染土; 降解菌; 混合菌悬液; 生物降解; 正交试验

中图分类号: X53; X172 文献标志码: A 文章编号: 2096-6717(2020)02-0195-08

## Optimization of degradation conditions of gasoline-contaminated soil by petroleum hydrocarbon-degrading bacteria

Cao Xiaofang<sup>1a</sup>, Fang Xiangwei<sup>1a,1b</sup>, Liu Hanlong<sup>1a,1b</sup>, Zhang nan<sup>2</sup>, Zhang Juan<sup>1c</sup>

(1a. School of Civil Engineering; 1b. Key Laboratory of New Technology for Construction of Cities in Mountain Area, Ministry of Education; 1c. Industrial Technology Research Institute, 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 determine the degradation of mixed bacterial suspension of five petroleum hydrocarbon

收稿日期: 2019-10-08

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

作者简介: 曹小方(1991-), 女, 主要从事环境岩土工程微生物修复技术研究, E-mail: cxf120368881@163.com。

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

Received: 2019-10-08

**Foundation items:** 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:** Cao Xiaofang (1991-), main research interest: microbial remediation technology in environmental geotechnical engineering, E-mail: cxf120368881@163.com.

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

degrading bacteria extracted in the laboratory on gasoline-contaminated soil, we had made use of gas chromatography-mass spectrometry to implement qualitative analysis on gasoline-contaminated soil compounds degraded by degrading bacteria in order to assess whether such mixed bacterial suspension has the ability to degrade the gasoline-contaminated soil. Moreover, considering the factors of pH value, temperature, soil moisture content and inoculation amount of degrading bacteria, single factor test and multi-factor orthogonal test were adopted to determine the degradation rate with the purpose of optimizing the degradation conditions of gasoline-contaminated soil by the mixed bacterial suspension. Under the single factor test, the compound components before and after the test were compared, it was found that these five degrading bacteria extracted in the laboratory have good ability to degrade the gasoline-contaminated soil. And from the relative peak area ratio chart, it is discovered that temperature and inoculation of degrading bacteria have more significant effects on the degradation of degrading bacteria than moisture content and pH. When the pH is between 6 and 8, the degradation temperature between 30 °C and 35 °C, the moisture content between 15% and 25% and the inoculation amount of degrading bacteria between 1 ml and 2.5 ml, the degradation effect of mixed bacterial suspension is relatively obvious. Under the condition of multi-factor orthogonal test, the optimum degradation conditions of mixed bacterial suspension are as follows: temperature is 32°C; pH value is 7; inoculation amount of degrading bacteria is 1 mL and water content is 25%.

**Keywords:** gasoline contaminated soil; degrading bacteria; mixed bacterial suspension; biodegradable; orthogonal test

石油作为重要的能源之一,在开采、运输、加工和产品的使用过程中由于操作不慎或偶然事故容易造成相当量的石油进入自然界,这已经成为世界性环境问题,土壤汽油污染是石油在生产过程中造成的污染之一<sup>[1]</sup>。

近年来,随着人们环保意识的不断增强,加强土壤生态环境的保护,进行石油污染土壤修复的研究已经成为决策层和科研工作者的共识<sup>[2]</sup>。通常用于石油污染土壤的修复技术包括物理修复法(如焚烧法、隔离法、换土法、超声清洗法等),化学修复法(如化学淋洗技术、化学钝化技术等),利用豆科、禾本科或观赏植物修复法,微生物修复法,植物和微生物联合修复法等<sup>[3-7]</sup>。微生物修复法即利用微生物的代谢活动来降解污染物,减少或最终消除污染的过程<sup>[8-9]</sup>。与物理、化学方法相比,生物修复对人和环境造成的影响小,且修复费用仅为传统物理、化学修复的30%~50%,是一种高效、经济和环境友好的修复技术<sup>[10]</sup>。已有研究表明,利用土著微生物降解土壤中的汽油效率低且时间长,在处理汽油污染土的过程中,仅靠土壤中的土著微生物无论是修复效果还是修复时间都不够理想,往往需要人为投入高效降解菌剂或者人为投放改性表面活性剂。微生物修复法是目前最有前途的方法之一,通过这种有效

和环保的方式来减少污染,既能降低石油烃在生产、运输、消费过程中对公众健康和自然资源产生的危害,且成本低,又能减少二次污染<sup>[11]</sup>。

卞立红等<sup>[12]</sup>利用石油污染土中提取的D和H两种菌,研究了两种菌的混合菌对油田采出水中聚丙烯酰胺和石油烃的降低效果,试验结果表明,当复合菌接种量体积分数为5%时,合成培养基的降解效果最好。杨洋等<sup>[13]</sup>通过对西南印度洋中脊与印度洋中部深海沉积物中石油降解菌的富集培养和分离鉴定,发现有很多细菌对石油烃都有降解效果。宜慧等<sup>[14]</sup>通过单因素试验和多因素正交试验得出各因素对TPH降解率影响程度的大小次序和最适处理条件下菌株SC-6的TPH降解率,并且通过原油污染土壤生物修复试验得出,高效石油烃降解菌的投加有利于土壤TPH降解率和酶活性的提高。彭怀丽等<sup>[15]</sup>以正十六烷作为唯一碳源从石油污染土中筛选出一株能够很好地降解正十六烷的菌株TZSX2,菌株的最适生长和降解温度在28~36 °C之间,在低温15 °C以下和高温45 °C时对正十六烷的降解率仍在10%以上。

以上研究表明,土著微生物对石油烃污染有降解能力,经过人为提纯、改性和诱变等手段使土著微生物成为专性降解菌更有利于污染物的降解。但仅

靠微生物自身的降解能力有时很难满足修复中所要达到的降解效果,往往需要人为投加生物表面活性剂(BS)。将表面活性剂(SAA)技术应用用于修复石油污染土壤的微生物治理技术是近些年兴起的一种工程技术。表面活性剂强化土壤洗涤是一种快速有效的 PAHs 污染土壤修复方法<sup>[16-18]</sup>。Pourfadakeri 等<sup>[19]</sup>、孙霞等<sup>[20]</sup>、荣璐阁<sup>[21]</sup>、吴雪茜<sup>[22]</sup>均通过降解试验证实,通过人为加入表面活性剂,降解菌的降解效果得到了较大提升。

无论以石油污染土、润滑油污染土、矿物油污染土还是柴油污染土为试验对象,已有的试验结果表明,通过人为投入高效降解菌剂和人为投放改性表面活性剂这两种方式均有利于污染土的降解。在石油烃污染土微生物技术修复方面已有较多研究成果,但关于汽油污染土混合降解菌的降解试验却鲜有报道。笔者以人为拌制的汽油污染土为研究对象,通过向其中加入实验室自行提取的 5 种石油烃降解菌的混合菌悬液,研究 pH 值、温度、土壤含水率及降解菌接种量等对混合降解菌降解汽油污染土能力的影响,得到降解的优化环境条件,为汽油污染土的微生物修复技术提供科学依据。

## 1 试验概况

### 1.1 菌种的提取与鉴定

用于菌种提取的石油污染土取自甘肃省成县油气管道转换站地表层以下 2~15 cm 处。菌种提取所用培养基配方如下:

1) LB 培养基:胰蛋白胨 1.00 g, 酵母粉 0.50 g, NaCl 1.00 g, 蒸馏水定容至 100 mL, 用 2 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCL 调节 pH 值为 7, 高温蒸汽灭菌 20 min(固态培养基需加琼脂粉 2.00 g)。

2) 无机盐培养基: NaCl 0.1 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.05 g, KCl 0.01 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05 g, CaCl<sub>2</sub> 和 FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 痕量, 蒸馏水定容到 100 mL, 高温蒸汽灭菌 30 min。

3) 降油培养基: NaCl 10 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.50 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.50 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub> 0.50 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, KCl 0.10 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 95 号汽油 4 g, pH 值 7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

石油污染土中菌种提取的步骤为:称取石油污染土 1.0 g 放入装有 9.0 mL 无菌生理盐水的试管

内,利用梯度稀释法对其进行稀释,从 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 和 10<sup>-5</sup> 这 3 个梯度中用移液器吸取 20 μL 的稀释液,经接种、灭菌、涂布、培养等步骤后,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 °C 的冰箱内。

从石油污染土中共分离出 9 株菌株,对每株菌株的 DNA 进行提取,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。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(*Phytophthora*),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*),以上提取的 9 种降解菌均为石油污染土中原有的细菌,均不是致病菌,对环境无危害。

根据单一降解菌在降油培养基内降解汽油污染土 6 d 的试验结果,菌 1、2、3、4 和 5 的汽油降解率均超过 69%。证明菌 1、2、3、4 和 5 降解汽油的能力较好,选取前 5 种降解菌配制试验所需混合菌悬液。

### 1.2 试验材料

试验土样取自重庆大学 B 区操场地下车库基坑,将取得的土样去除碎石、树枝、树叶等杂质,自然风干、碾碎,依次通过 30 目标准筛,将处理后的土壤人工加入 95 号汽油,配制成 5% 的汽油污染土,在阴凉通风处放置一周,期间定时、定量喷洒蒸馏水,以保证污染土 20% 的特定含水率,且每天定时翻土。将处理后的土壤放入烘干箱内,105 °C 烘干 3 d,待土壤温度降到室温,将土壤样品封装,放入干燥器保存待用。

试验采用 10% 混合菌悬液,采用湿重法配制,具体方法为:取出保存的纯菌种复活于 LB 平板,挑取单菌落培养于 LB 液体培养基,在 32 °C、200 r/min 的摇床内振荡培养 24 h(菌 5 振荡培养 48 h),4 000 r/min 离心 15 min,去上清液,称菌体湿重,用

质量浓度为 0.85% 的无菌生理盐水配制质量分数为 10% 的菌悬液。5 种降解菌的菌悬液组成混合菌悬液, 每种菌均占混合菌悬液体积的 1/5。

### 1.3 试验方案

**单因素试验:** 以自制 5% 的汽油污染土为对象, 以 pH 值为 7、温度为 32 °C、含水率为 20%、降解菌接种量为 1 mL 为基础, 分别改变 pH 值、温度、土壤含水率及降解菌接种量 4 个因素, 在恒湿恒温培养箱中降解 11 d 后, 进行汽油污染土降解率的测定与分析, 为排除汽油的挥发性对试验结果的影响, 试验中设置空白对照组。

**多因素正交试验:** 以自制 5% 的汽油污染土为对象, 选择 pH 值、温度、土壤含水率及降解菌接种量 4 个因素, 根据单因素试验结果各取 3 个较优水平, 设计四因素三水平正交试验, 在恒湿恒温培养箱中降解 11 d 后, 进行汽油污染土降解率的测定与分析, 为排除汽油的挥发性对试验结果的影响, 试验中设置空白对照组。

### 1.4 测试方法

**定性试验测试方法:** 采用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 进行测试, GC-MS 是由气相色谱 (GC) 和质谱检测器 (MS) 两部分结合起来所组成的。GC-MS 主要用于分析极性小、易挥发、分子量较小 (质荷比 1 000 以内) 的有机化合物。用于试验的污染土样为汽油污染土, 汽油的主要成分为 C5~C12 的脂肪烃和环烷烃类, 以及一定量的芳香烃, 均为小分子量的有机物, 满足气相色谱-质谱联用仪的测试条件。

**定量试验测试方法:** 采用紫外分光光度法测定汽油污染土降解率。土壤中汽油含量测定: 取降解后污染土于离心管中, 加入石油醚, 进行超声萃取, 100 W 萃取 30 min, 萃取后进行离心, 4 000 r/min 离心 10 min, 用 1 mol/L 盐酸进行酸化, 提取上清液保存、待测。

## 2 结果与分析

### 2.1 定性试验结果

峰面积比是指在色谱图中, 背景线以上部分的总面积, 一般表示待测物的含量, 面积越大, 含量越高。选取单因素试验条件下相对分子质量分别为 56.1、57.1、71.7 和 191.1 的 4 种化合物为分析对象, 由 GC-MS 所得数据, 提取相对分子质量为

56.1、57.1、71.7 和 191.1 的 4 种化合物的峰积分面积比并计算其相对峰积分面积比。不同条件、同一时间下, 4 种化合物的相对峰积分面积比如图 1 所示。图中试验编号 19 为汽油污染土的空白样 (CK), 试验编号 1~6 为以 pH 值为唯一变量试验组的柱状图, 试验编号 7~11 为以含水率为唯一变量试验组的柱状图, 试验编号 12~13 为以温度为唯一变量试验组的柱状图, 试验编号 14~18 为以降解菌接种量为唯一变量试验组的柱状图。

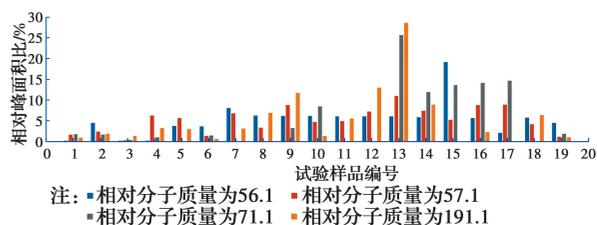


图 1 不同条件同一时间下四种化合物的相对峰积分面积比  
Fig. 1 Relative peak integral area ratio of four compounds at the same time under different conditions

由图 1 可以发现, 试验组 4 种不同化合物的含量与空白组 (CK) 相对应 4 种不同化合物的含量之间有显著差异。编号 13 的试验组相对于编号 19 的空白组, 4 种不同化合物的含量均有大幅度增长。不同化合物含量的显著变化侧面反映了降解菌在编号为 13 所对应的降解条件下, 可以通过降解汽油污染土中某种化合物合成这 4 种不同化合物。编号 13、14、15、16 和 17 的 5 个试验组的柱状图与空白组的柱状图相比, 4 种不同化合物含量变化比其他试验组更加显著, 说明温度与降解菌接种量相对于含水率和 pH 值这两个因素对汽油污染土的降解效果影响更为显著。

### 2.2 定量试验结果

#### 2.2.1 单因素优化试验

1) pH 值 pH 值大小对微生物代谢过程影响显著。石油烃降解菌与大多数微生物一样, 一般情况下, 适宜生长的 pH 值范围为 6~8。极端 pH 值环境不利于微生物的生长, 易影响生物修复效果, pH 值过低会影响 N 的转化, 略高于中性时, 对硝化作用有利。pH 值对汽油污染土降解效果的影响如图 2 所示。

由图 2 可知, 混合菌悬液在 pH 值为 7 时, 汽油污染土的降解率最高, 为 44.78%。当 pH 值低于或高于 7 时, 混合菌悬液对汽油污染土的降解率均呈

下降趋势,强酸情况下,降解率下降更为明显。由此可见,此混合菌悬液更适合在中性或者弱碱性环境中生存,强碱和强酸均会影响其降解能力。这是由于 pH 值除了与微生物的生命活动有关外,还能对环境中的有机物(如营养物质和有机污染物)的离子化程度产生影响,进而间接影响微生物对汽油污染土的降解。酸性条件下, $H^+$ 会影响微生物膜的结构,pH 值越低,微生物的膜结构越不稳定。碱性条件下,过多的  $OH^-$  会引起细胞膜上的电荷变化,阻碍细胞膜对营养物质的运输过程。此外,由于微生物对污染物的降解依赖于其产生的活性物质(酶),过多的  $H^+$  和  $OH^-$  均会对酶活性产生影响,阻碍其正常代谢。因此,所研究混合菌悬液的最适 pH 值范围为 7~8,适宜在中性以及弱碱的土壤环境中生长。

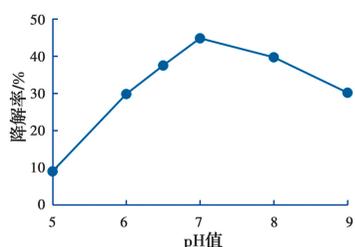


图 2 pH 值对汽油污染土降解效果的影响  
Fig. 2 Effect of pH value on degradation of gasoline contaminated soil

2) 温度 温度不仅影响石油烃的物理状态,还对微生物的活性以及汽油污染土的挥发性有着直接的影响。适宜的温度是混合菌悬液降解土壤汽油的重要条件。温度主要通过影响汽油的物性和微生物自身活性来影响降解过程<sup>[23]</sup>。由单因素试验得知,温度是影响所用混合降解菌降解效果的重要因素。温度对汽油污染土降解率的影响如图 3 所示。

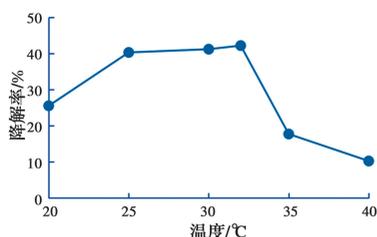


图 3 温度对汽油污染土降解率的影响  
Fig. 3 Effect of temperature on degradation rate of gasoline contaminated soil

由图 3 可以看出,温度对汽油污染土降解率的影响较大。在所研究温度范围(20~40 °C)内,随着

温度的不断升高,混合菌悬液对汽油污染土的降解率整体呈先增大后减小的规律,但在温度范围为 25~32 °C 内,降解率增加速率较缓慢,原因可能是在降解温度接近 30 °C 时,虽然混合降解菌的降解速率很高,但由于在此温度范围内汽油的挥发量也很大,因此,此温度范围内,汽油的降解率增长缓慢。在 32 °C 左右,混合菌悬液对汽油污染土的降解率达到最大,为 42.24%。当温度低于 25 °C 时,混合菌悬液对汽油污染土的降解率普遍不高。这是因为较低温度往往容易导致微生物酶活性的降低,进而抑制了微生物的生长。此外,低温使汽油黏度增大,难以挥发和被微生物充分利用。当温度高于 32 °C 时,混合菌悬液对汽油污染土的降解率快速降低。这是因为较高温度条件下,由于汽油的大量挥发,使得污染土中容易被混合菌悬液降解的小分子烃类几乎全部挥发。另外,细菌蛋白质、核酸、细胞壁和细胞膜及酶类因热力作用发生变性或凝固,活性消失,代谢发生障碍,导致细菌死亡,且当外界温度明显高于细菌的最适生长温度,细菌可能更易被杀死。因此,当温度过高时,混合降解菌降解的汽油量远远低于汽油挥发的量。由此可知,温度过高或者过低均会导致混合菌悬液对汽油污染土的降解率下降。

3) 含水率 土壤湿度是影响微生物降解石油烃的主要环境因素之一。微生物的新陈代谢均需要水分来维持,但湿度过高又会导致土壤空隙变小,通透性和氧气供给不足。此外,土壤中的水分会在土壤颗粒表面形成水膜,降低污染物在土壤颗粒上的吸附,增加微生物与污染物的接触几率,提高降解效率。土壤含水率对汽油污染土降解率的影响如图 4 所示。

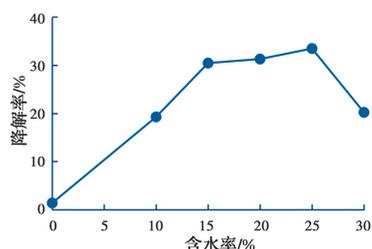


图 4 土壤含水率对汽油污染土降解率的影响  
Fig. 4 Effect of soil water content on degradation rate of gasoline contaminated soil

由图 4 可以发现,当土壤含水率由 0 升高到 15% 时,降解菌的降解率增长速率较快,由此可知,

水分是降解菌降解不可或缺的因素。随着土壤含水率的不断升高,降解率曲线增长逐渐趋于平缓,当含水率为25%时,降解率曲线出现一个快速下降的转折点,分析原因可能是土壤含水率超过土壤液限,含水率过高导致土壤空隙变小,通透性和氧气供给不足。由图中含水率为0%的试验组与后面含水率不为0试验组汽油污染土的降解率比较可知,含水率对降解效果影响较大。

4) 降解菌接种量 当初始接种少量的微生物时,初始的降解效果可能不太明显,但随着后期微生物的生长繁殖,微生物的降解效果会逐渐明显,由于试验设计的降解环境为一个总营养物质为定量的土壤环境,总的降解效果可能很理想。当初始接种大量的微生物时,则初始降解效果会很明显,但随着后期菌体的过度繁殖,菌体对土壤中营养物质的相互竞争将导致营养物质短缺,致使微生物的新陈代谢和生长速率减缓,影响了混合菌悬液对石油烃的吸收降解,可能导致总的降解效果不是很理想。因此,对于降解菌总的降解效果还需对最佳降解菌接种量进行测定。降解菌接种量对汽油污染土降解率的影响如图5所示。

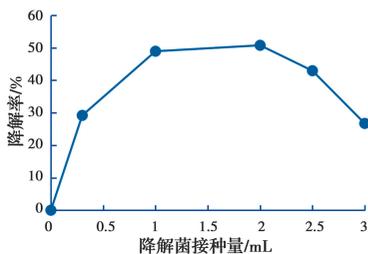


图5 降解菌接种量对汽油污染土降解率的影响

Fig. 5 Effect of inoculation amount of degrading bacteria on degradation rate of gasoline contaminated soil

由图5可以发现,当混合降解菌接种量为0时,汽油污染土的降解率为0,这与已有的研究结果不符,原因可能是在对未受污染的土壤进行预处理时,将土壤放于温度为105℃的烘干箱中烘干时,汽油污染土中的土著微生物均被高温杀死。当混合降解菌接种量为0.3 mL时,汽油污染土的降解率为29.2%,并且在混合降解菌接种量达到2 mL前,随混合降解菌接种量的不断增加,汽油污染土的降解曲线呈上升趋势。因此,若想通过微生物修复方式取得相对明显的降解效果则需要人为投放高效降解菌。当降解菌接种量在0~1 mL范围内时,随降解菌接种量逐渐增大,混合菌悬液对汽油污染土的降

解率增长速率较快。但在降解菌接种量大于2 mL后,随降解菌接种量不断增大,降解率开始逐渐减小。

2.2.2 多因素正交试验 根据单因素试验结果,当pH值在6~8、降解温度在30~35℃、含水率在15%~25%和降解菌接种量在1~2.5 mL范围内时,混合菌悬液的降解效果相对明显。因此,选取6.5、7、8这3个pH值水平,30、32、35℃这3个培养温度水平,1、2、2.5 mL这3个降解菌接种量水平和15%、20%、25%这3个含水率水平作为四因素三水平正交试验的试验条件,采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验方案。表1为四因素三水平正交表及试验结果。

表1 多因素正交表及试验结果

Table 1 Multivariate orthogonal table

试验	因素				降解率/%
	菌量/ mL(A)	PH值 (B)	温度/ ℃(C)	含水率/ %(D)	
1	1(1)	1	1(30)	1	42.16
2	1	2	2(32)	2	63.12
3	1	3	3(35)	3	58.20
4	2(2)	1	2	3	56.48
5	2	2	3	1	54.83
6	2	3	1	2	40.38
7	3(2.5)	1	3	2	49.95
8	3	2	1	3	60.28
9	3	3	2	1	47.32
K1	163.48	148.59	142.82	144.31	
K2	151.69	178.23	166.92	153.45	
K3	157.55	145.90	162.98	174.96	
R(极差)	3.93	10.78	8.03	10.22	

为了进一步分析多因素正交试验中不同条件下混合降解菌对汽油污染土降解率的变化趋势,图6给出了多因素正交试验降解率的折线图。

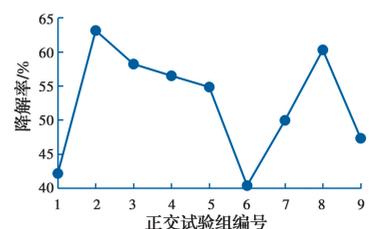


图6 正交试验降解率分析

Fig. 6 Analysis of degradation rate by orthogonal test

由图 6 可以发现,正交试验组编号为 2 和 8 两组的降解率相对较高,均超过 60%。正交试验组编号为 2 的降解条件为降解菌接种量为 1 mL、pH 值为 7、降解温度为 32 ℃、土壤含水率为 20%,混合菌悬液对汽油污染土的降解率为 63.12%;正交试验组编号为 8 的降解条件为降解菌接种量为 2.5 mL、pH 值为 7、降解温度为 30 ℃、土壤含水率为 25%,降解率最高可达 60.28%。由图 6 可知,无论是温度因素还是混合降解菌接种量因素均未表现出对汽油污染土的降解率有明显的影响。因此,为了进一步比较各因素水平对汽油污染土降解率的影响水平,图 7 给出了混合菌悬液对汽油污染土的降解率的极差分析图(纵坐标为降解率极差的平均值,横坐标为各个因素水平)。

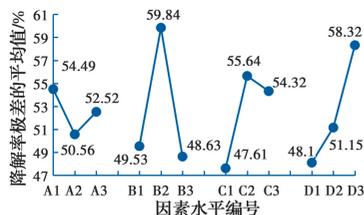


图 7 基于降解率的极差分析

Fig. 7 Range analysis based on degradation rate

从图 7 可知,降解菌接种量为 A1、pH 值为 B2、温度为 C2、含水率为 D3 分别为各因素的最优降解水平。综上所述,混合菌悬液对汽油污染土降解的最优条件是 A1B2C2D3,即当降解菌接种量为 1 mL、pH 值为 7、降解温度为 32 ℃和含水率为 25%时,混合菌悬液对汽油污染土的降解效果达到最佳状态。

### 3 结论

1) 利用实验室提取的 5 种降解菌对汽油污染土进行降解试验,通过对比试验前后有机物组分发现,5 种降解菌的混合菌悬液对汽油污染土有良好的降解能力。

2) 单因素试验条件下,当 pH 值在 6~8、降解温度在 30~35 ℃、含水率在 15%~25%和降解菌接种量在 1~2.5 mL 范围内时,混合菌悬液对汽油污染土的降解效果相对明显。

3) 多因素正交试验条件下,当温度为 32 ℃、pH 值为 7、降解菌接种量为 1 mL 和含水率为 25%时,混合菌悬液对汽油污染土的降解效果最佳。

由于实验室环境下筛选驯化的高效优势微生物

菌株在实际污染的土壤环境中可能不能完全发挥其有效活性。因此,为了得到本文石油烃混合降解菌对于实际汽油污染土壤的降解效果,需要进行田间的修复试验并优化,以用于实际工程。

### 参考文献:

- [1] 刘文超, 李晓森, 刘永民, 等. 石油污染土壤修复技术应用现状[J]. 油田化学, 2015, 32(2):307-312, 316.  
LIU W C, LI X S, LIU Y M, et al. The application status in remediation of petroleum contaminated soil [J]. Oilfield Chemistry, 2015, 32(2):307-312, 316. (in Chinese)
- [2] PRENDERGAST D P, GSCHWEND P M. Assessing the performance and cost of oil spill remediation technologies [J]. Journal of Cleaner Production, 2014, 78:233-242.
- [3] LI Y T, LI D, LAI L J, et al. Remediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by using activated persulfate with ultrasound and ultrasound/Fe [J]. Chemosphere, 2020, 238:124657.
- [4] RADZIEMSKA M, WYSZKOWSKI M, BĘŚA, et al. The applicability of compost, zeolite and calcium oxide in assisted remediation of acidic soil contaminated with Cr(III) and Cr(VI) [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(21):21351-21362.
- [5] AL-MAILEM D M, SORKHOH N A, MARAFIE M, et al. Oil phytoremediation potential of hypersaline coasts of the Arabian Gulf using rhizosphere technology [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(15): 5786-5792.
- [6] 徐丽萍. 石油污染土壤的微生物修复技术研究进展 [J]. 生物学教学, 2016(6):6-9.  
XU L P. Research progress on microbial remediation technology of petroleum-contaminated soil [J]. Biology Teaching, 2016(6):6-9. (in Chinese)
- [7] MOHSENZADE F, NASSERI S, MESDAGHINIA A, et al. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils: Pre-screening for suitable plants and rhizospheral fungi [J]. Toxicological & Environmental Chemistry, 2009, 91(8):1443-1453.
- [8] PHAM V H T, CHAUDHARY D K, JEONG S W, et al. Oil-degrading properties of a psychrotolerant bacterial strain, Rhodococcus sp. Y2-2, in liquid and soil media [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(2):33.
- [9] 赵海乐, 温钢. 柴油降解菌的筛选鉴定和降解特性研究 [J]. 吉林化工学院学报, 2016, 33(7):70-77.

- ZHAO H L, WEN G. Screening of diesel oil degradable microorganisms and characterization of the diesel oil degradation [J]. Journal of Jilin Institute of Chemical Technology, 2016, 33(7):70-77. (in Chinese)
- [10] HICKS B N, CAPLAN J A. Bioremediation: A natural solution [J]. Pollution Engineering, 1993, 25(2): 30-33
- [11] MOGHIMI H, HEIDARY TABAR R, HAMED J. Assessing the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and laccase production by new fungus *Trematophoma* sp. UTMC 5003 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(7):136.
- [12] 卞立红, 任国领, 何雯, 等. 基于两株菌的复合菌处理油田采出水效果评价 [J]. 大庆石油地质与开发, 2019, 38(4):105-109.
- BIAN L H, REN G L, HE W, et al. Evaluation of the treated effect of oilfield produced water by the compound bacterium based on two bacteria [J]. Petroleum Geology & Oilfield Development in Daqing, 2019, 38(4):105-109. (in Chinese)
- [13] 杨洋, 邵宗泽. 印度洋深海沉积物石油烃降解菌分离、鉴定与多样性分析 [J]. 生物资源, 2017, 39(6): 423-433.
- YANG Y, SHAO Z Z. Isolation characterization and diversity of hydrocarbon-degrading bacteria in deep-sea sediments of Indian Ocean [J]. Biotic Resources, 2017, 39(6):423-433. (in Chinese)
- [14] 宜慧, 常波, 杨玲引, 等. 高效石油烃降解菌的筛选及其对原油污染土壤的修复 [J]. 化工环保, 2018, 38(4):461-465.
- YI H, CHANG B, YANG L Y, et al. Screening of high-efficiency petroleum hydrocarbon degrading strains and remediation of crude oil contaminated soil [J]. Environmental Protection of Chemical Industry, 2018, 38(4):461-465. (in Chinese)
- [15] 彭怀丽, 李红娜, 张丽, 等. 石油污染土壤中正十六烷降解菌的效果研究 [J]. 农业资源与环境学报, 2017, 34(3):257-265.
- PENG H L, LI H N, ZHANG L, et al. Degradation capability of n-hexadecane degrading bacteria from petroleum contaminated soils [J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2017, 34(3):257-265. (in Chinese)
- [16] TRELLO C, MOUSSET E, PECHAUD Y, et al. Removal of hydrophobic organic pollutants from soilwashing/Flushing solutions: A critical review [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 306:149-174.
- [17] LAU E V, GAN S Y, NG H K, et al. Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies [J]. Environmental Pollution, 2014, 184: 640-649.
- [18] MOUSSET E, OTURAN M A, VAN HULLEBUSCH E D, et al. Soil washing/Flushing treatments of organic pollutants enhanced by cyclodextrins and integrated treatments: State of the art [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2014, 44(7): 705-795.
- [19] POURFADAKARI S, AHMADI M, JAAFARZADEH N, et al. Remediation of PAHs contaminated soil using a sequence of soil washing with biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain PF<sub>2</sub> and electrokinetic oxidation of desorbed solution, effect of electrode modification with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 379:120839.
- [20] 孙霞, 陈波水, 谢学兵, 等. N-月桂酰基丙氨酸添加剂的合成及对润滑油生物降解性能影响 [J]. 化工技术与开发, 2007, 36(8):1-3, 46.
- SUN X, CHEN B S, XIE X B, et al. Synthesis of N-lauroyl alanine and its effect on biodegradation of lubricant [J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2007, 36(8):1-3, 46. (in Chinese)
- [21] 荣璐阁. 表面活性剂强化微生物修复柴油污染土壤研究 [D]. 沈阳:沈阳大学, 2019.
- RONG L G. Study on remediation of diesel contaminated soil by microorganism enhanced by surfactant [D]. Shenyang:Shenyang University, 2019. (in Chinese)
- [22] 吴雪茜. 表面活性剂强化生物修复石油污染土壤 [D]. 江苏 徐州:中国矿业大学, 2016.
- WU X Q. Surfactant enhanced bioremediation of petroleum contaminated soil [D]. Xuzhou, Jiangsu: China University of Mining and Technology, 2016. (in Chinese)
- [23] 张晓娟. 石油污染土壤中微生物对温度变化的响应研究 [D]. 北京:中国地质大学(北京), 2016.
- ZHANG X J. Response of microorganisms to temperature changes in oil contaminated soil [D]. Beijing: China University of Geosciences (Beijing), 2016. (in Chinese)