油污土壤修复微生物的筛选及其影响因素

慕庆峰[1]，于立红[1]，张 涛[2]，贾洪柏[3]，吴慧云[1]

(1. 黑龙江八一农垦大学 农学院 寒地作物栽培技术省级重点实验室，黑龙江 大庆 163319；
2. 中海油能源发展股份有限公司 工程技术分公司，天津 300452；3. 东北林业大学，生命科学学院，黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要：[目的] 探讨微生物原位修复的主要影响因素及水平(正交设计)之间的关系，为石油污染场地生物修复工程的参数设计提供一定理论依据。[方法] 选取 5 因素 4 水平的正交设计，考察污染强度、营养物、氧化剂、表活剂、接菌量等因素对土壤修复效果的影响。[结果] 以原油为唯一碳源经过初步筛选，获得 16 株石油烃降解优势菌，经过菌群复筛，获得 2 株偏利共生协同真菌 DPF_2，DPF_4，协同降解率最高，7 d 达 87.77%。选择其进行室内油污土壤的微生物修复模拟试验，60 d 石油污染强度为 10 的油污土壤降解率最高，可达 94.12%。污染强度为 25 的油污土壤降解率为 90.17%，SPSS 数据分析表明生物修复影响的最大影响因素是氧化剂、表活剂和营养物，其次是污染强度、接菌量。[结论] 初期添加表活剂、氧化剂、营养剂能对石油生物修复具有重要意义。污染强度仅在 35 d 前有一定影响，在修复后期影响最小。在整个修复过程，接菌量方差均值与其他因素比较都最小，因此其因素水平对石油降解能力的影响不显著。

关键词：石油污染土壤；生物修复；微生物筛选；多因素分析

文献标识码：B **文章编号**：1000-288X(2018)05-0330-06 **中图分类号**：X53

文献参数：慕庆峰，于立红，张涛，等. 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(5)：330-335. DOI：10.13961/j.cnki.stbctb.2018.05.052. Mu Qingfeng, Yu Lihong, Zhang Tao, et al. Screening of microorganisms for remediation of oil-contaminated soil and its influencing factors[J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2018, 38(5): 330-335.

Screening of Microorganisms for Remediation of Oil-contaminated Soil and Its Influencing Factors

MU Qingfeng[1], YU Lihong[1], ZHANG Tao[2], JIA Hongbai[3], WU Huiyun[1]

(1. *School of Agriculture, Laboratory of Cold Region Crop Cultivation, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang* 163319, *China*; 2. *China National of Oil Corporation Energy Development Limited by Share Ltd Engineering Technology Branch, Tianjin* 300452, *China*; 3. *College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Haerbin, Heilongjiang* 150040, *China*)

Abstract: [Objective] To reveal the relationship between the main influencing factors and the level (orthogonal design) of microbial in situ remediation in order to provide a theoretical basis for the parameter design of bio-remediation engineering in oil-contaminated sites. [Methods] The effects of pollution intensity, nutrition, oxidant, surface active agent and inoculation amount on soil remediation were investigated by orthogonal design with 5 factors and 4 levels in the experiment. [Results] After the preliminary screening of crude oil as the sole carbon source, 16 dominant bacteria strains for petroleum hydrocarbon degradation were obtained. By the bacterial rescreening, two symbiotic fungi DPF_2 and DPF_4 were obtained. The highest synergistic degradation rate was 87.77% after 7 days. The degradation rate of oil-contaminated soil was the highest when the oil pollution intensity was 10 after 60 days, and the degradation rate of oil-contaminated soil reached to 94.12%. The degradation rate of oil-contaminated soil with pollution intensity of 25 was 90.17%.

收稿日期：2018-03-30 **修回日期**：2018-05-03

资助项目：大庆油田企业合作项目“石油污染土壤生物原位修复技术应用研究”(DQYT-0508003-2013-JS-S7S)

第一作者：慕庆峰(1976—)，男(汉族)，吉林省东丰县人，硕士，讲师，主要研究方向为环境生物修复、石油生物技术。E-mail：muqingfeng1976@163.com。

通讯作者：于立红(1976—)，女(汉族)，吉林省榆树市人，硕士，从事环境科学研究。E-mail：ylh-303@163.com。

SPSS data analysis showed that oxidants, surfactant and nutrients were the most important factors affecting bio-remediation, followed by the intensity of contamination and the number of bacteria. [Conclusion] The initial addition of surfactant, oxidants, and nutrients could be of great significance to petroleum bio-remediation. The pollution intensity had a certain effect before 35 days, and had the least influence in the later stage of remediation. During the whole remediation process, the mean variance of inoculation amount was the smallest compared with other factors, so the factor level had no significant effect on the oil degradation ability.

Keywords: oil-contaminated soil; bio-remediation; microbial screening; multivariate analysis

石油作为重要的化石能源为社会的发展提供了巨大的动力,但是,自 20 世纪以来,石油污染带来的问题日益突出[1],石油进入土壤后,会对土壤、植物、微生物、水体等产生直接或间接危害,如堵塞土壤孔隙,使土壤透水、透气性降低,改变土壤有机质的碳氮比和碳磷比,引起土壤板结[2];进入土壤的石油会附着在植物根系表面,影响根系的呼吸和吸收作用,抑制植物生长,并且大多数石油污染物具有致癌、致畸和致突变作用[3],危害人类的身体健康。传统处理油污土壤多采用的是热解析、化学洗涤方法[4],因费用昂贵,产生二次污染,处理后土壤不能复垦等不足,难以规模化应用。而微生物原位修复技术因其良好的修复效果,低廉的价格,无二次污染等特点越来越成为全世界有机污染修复的主流技术[5]。该技术通过优化环境因素来加速自然生物降解进程,是一种高效、经济和生态可承受的绿色清洁修复技术[6]。其技术核心是获得高效微生物及其影响因素之间的作用关系,寻找到最佳的组合方式,提高土壤中石油污染物的降解[7]。微生物作为环境修复的主体,其降解效率决定修复水平。提高降解率的第一要务是获得高效石油降解菌[8]。因此筛选高效降解菌成为国内外行业、学术界研究热点。不同种属微生物都有自己底物谱系,单一微生物很难独立完成修复任务,特别是面对石油这种超级复杂有机物复合体,更需要偏利共生的高效微生物种群协同降解。因此开展高效协同菌种的筛选及其修复影响因素研究具有重要意义。本文针对大庆地区石油污染的土壤筛选驯化高效石油降解协同微生物菌群,并在室内开展模拟试验,研究微生物原位修复的主要影响因素及水平(正交设计)之间的关系,以期为石油污染场地生物修复工程的参数设计提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　菌 源

在大庆油田不同类型的油污地采集油污土壤,均匀混合,转入塑料袋中,密封,4 ℃低温保藏,用于菌种的筛选,石油样品来自大庆油田采油一厂。

1.2　培养基

(1) 固体筛选培养基。石油 20 g/L; NH_4Cl 6 g/L; K_2HPO_4 5 g/L;微量元素液 8 ml; KH_2PO_4 5 g/L;琼脂 20 g/L;蒸馏水 1 L;调整 pH 值至 7.0～7.2。

(2) 增殖培养基。NH_4Cl 6 g/L; K_2HPO_4 5 g/L;KH_2PO_4 5 g/L;葡萄糖 20 g/L;微量元素液 8 ml;蒸馏水 1 L。

(3) 石油降解培养基。NH_4Cl 6 g/L; K_2HPO_4 5 g/L;微量元素液 8 ml,KH_2PO_4 5 g/L,蒸馏水1 L,石油 1 g/L,pH=7.0～7.2。

(4) 微量元素液。$MgSO_4$ 4 g/L; $MnSO_4$ 10 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 g/L; $CaCl_2$ 10 g/L; $ZnSO_4$ 10 g/L;去离子水 1 L。

1.3　菌株筛选

1.3.1　*菌株初筛*　称取 10 g 油污土壤样品,放入 250 ml 锥形瓶中,用生理盐水定容至 100 ml,放入 10 个玻璃珠,170 r/min 振摇,待土壤分布均匀,取 1 ml 泥水混合液用无菌生理盐水梯度稀释后,分别移取 10^{-6},10^{-5},10^{-4}倍的混合稀释液 0.5 ml 至相应编号的固体筛选培养基平板内,用三角刮刀均匀涂布,倒置放入 30 ℃恒温培养箱中进行培养。观察菌种生长情况,挑取长势良好的菌落再次梯度稀释,并接入到石油筛选培养基中进行培养。重复上述步骤,直到得到纯培养的石油烃降解菌。纯培养菌种 4 ℃冰箱保藏备用。

1.3.2　*菌株的石油降解能力测定*　将保藏菌株接入到增殖培养基中,30 ℃,140 r/min 振荡培养 48 h,7 000 r/min离心,菌体以 2 质量数接入到 250 ml 三角瓶中,每瓶含液体石油降解培养基(1.2.3)50 ml,30 ℃,140 r/min 震荡培养 7 d 后,加入 20 ml 石油醚(馏分 30～60 ℃)萃取(重复 3 次),合并有机相,并将水相 7 000 r/min 离心 10 min,取上清液至分液漏斗,加入 10 ml 石油醚振荡 100 次,静置,待分层后收集合并总有机相,68 ℃蒸干,置干燥器中冷却至恒重,称重。不接菌的培养液为对照,按照下列公式计算石油降解率(μ)(3 次重复)。

$$\mu=(W_0-W_x)/W_0\times100\% \quad (1)$$

式中：W_0——对照液中残余石油含量(%)；W_x——菌培养液中残余石油含量(%)。

1.3.3 菌群的复配研究 石油是一种复杂的混合物，每种微生物只能降解特定的组分，优势微生物只能在特定时期在油污土壤环境中占据顶端优势，为提高石油降解率，研究复合菌群降解石油的协同能力至关重要[9]。试验选择石油降解率高，在土壤扩散能力强的菌株进行复配，测定 7 d 石油降解率。真菌生长环境偏酸、细菌偏碱，因此本次试验按照真菌间互作，细菌间互作，真菌细菌混作原则，等比例接入菌量，每个试验真菌按总湿菌量 1 g 接入，细菌则接入 1 ml 发酵液(提前调到 1 012 cfm)。测定方法参照菌株的石油降解能力测定法，初始石油浓度 1 g/L，(7 000 r/min 离心发酵液获得)，3 次重复。

1.4 复合微生物菌群正交试验设计

土壤的营养条件、含水率、pH 值、石油的组分及浓度决定着土壤中微生物组成和数量的变化，后者直接关系到油污土壤的修复效果，为明晰其关系，试验选取 5 个因素：土壤石油污染强度；营养物(NH_4NO_3，K_2HPO_4)[10]；氧化剂(H_2O_2 溶液)[11]；表面活性剂[12]和接菌量[13]，每个因素设 4 个水平，比较不同因素影响下油污土壤的微生物修复效果，探求修复效果最好的外源补给方案，试验选在室内进行，温度 25 ℃，适当补充水分，两次重复。各因素及其水平列表 $L16(4^5)$见表 1。

培养条件：10 kg 土壤放入 50 cm×40 cm×35 cm 的塑料箱中，土壤深度 35 cm，用黑色塑料布封好表面，定期翻整土壤。试验中，分别于第 7，14，21，28，35，42，49 d 对土壤进行检测，测定石油降解率。根据预试验中获得的菌种在土壤不同深度的生长状态，将土壤分为上中下 3 层，每次取样分别在上(0—10 cm)、中(11—25 cm)、下层(26—35 cm)随机用土壤环刀等比例取土，样品烘干、粉碎、混匀后通过 4 分法取土 10 g，用石油醚萃取，然后测定和计算石油降解率。

表 1 研究区正交设计试验因素及水平

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	100/8/1	1	1	20
4	25	100/8/3	1.5	3	30

注：表 1 中各因素不同水平划分的标准为：A 为原油占原土重的质量百分比；B 为原油/N/P 的比例，其中 N 源为 NH_4NO_3，P 源为 K_2HPO_4；C 为 H_2O_2 占原土重的质量比(g/kg)；D 为表面活性剂占原土重的质量百分比；E 为接菌量(发酵液)占土重的百分比。下同。

2 结果与分析

2.1 石油降解菌株的初筛

经筛选驯化，共获得 16 株原油降解效果好的菌株，3 株真菌(DPF_1，DPF_2，DPF_4)和 13 株细菌(DPB_{001}-DPB_{013})，其中 DPB_{009}为含油废水中分离得到的菌株。参照 1.3.2 方法对所得菌株进行石油降解率的测定，菌株形态特征及石油降解情况如表 2 所示。

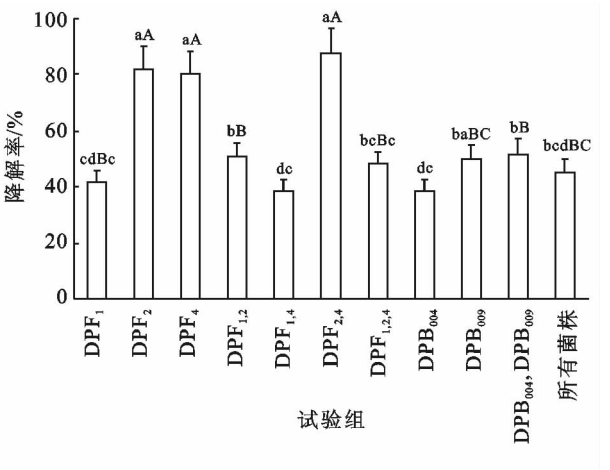
表 2 菌株形态特征及石油降解情况

菌株	形态特征	石油乳化情况	7 d 降解率/%
DPB_{003}	红褐色，表面粗糙，呈斑点状	石油乳化较好，液体呈红色	39.86
DPB_{012}	白色半透明，表面光滑平坦，边缘不整齐	石油乳化较好，培养液出现混浊	44.71
DPB_{010}	乳白色，表面光滑，呈圆形凸起，边缘不齐	石油多乳化，呈细粉粒状，颗粒大小不等，油膜较少	46.56
DPB_{007}	乳白色，表面光滑，呈圆形凸散点状生长	石油乳化不明显，成球状油滴，浮于培养液面上	47.98
DPB_{006}	乳白色，表面光滑平坦，生长缓慢，呈草帽状	石油乳化成球状油滴，浮于培养液面培养液浑浊，有絮状物	52.00
DPB_{002}	半透明，白色。边缘较整齐	石油乳化，培养液出现混浊，油膜较多	54.07
DPB_{001}	浅棕色，表面光滑，呈圆形凸起	石油乳化，培养液出现混浊，成絮状，残存油膜很少	55.84
DPB_{013}	浅黄色，半透明，边缘不整齐，生长缓慢	石油开始乳化，培养液出现混浊，残存油膜较少	57.01
DPB_{005}	灰色，有褶皱，性状不规则，生长缓慢	石油乳化不明显，有大量油膜	58.58
DPB_{008}	乳白色，表面光滑，边缘较整齐	石油乳化不明显，成球状油滴，浮于培养液面上	59.52
DPB_{011}	半透明，白色。边缘较整齐	石油开始乳化，培养液出现混浊，油膜较多	61.78
DPB_{004}	乳白色，表面光滑，呈圆形凸起	石油完全乳化，培养液浑浊，残存油膜多	66.57
DPB_{009}	表面光滑，呈淡黄色	石油完全乳化，培养液出现混浊，残存油膜较多	68.33
DPF_1	稻壳色，有土腥味，有孢子，短丝状菌丝，生长速度较快	石油大量乳化，呈油膜状，有大量油膜，液体中有细粉粒状，颗粒较大	41.52
DPF_4	浅黄色，有土腥味，短丝状菌丝，产孢子，生长速度快	石油多乳化，呈细粉粒状颗粒较小，呈中等程度的油膜。培养液变混浊	80.45
DPF_2	雪白色，绒毛状菌丝，产孢子，生长速度快	石油乳化成颗粒状油滴，颗粒较小，浮于培养液面上培养液出现混浊	81.89

2.2　降解菌群的复配

考虑到嗜油微生物在土壤中扩散能力,选择全部 3 株真菌(DPF_1,DPF_2 和 DPF_4)和降解率最高的两株细菌(DPB_{004} 和 DPB_{009})进行复合菌群协同试验,2 株真菌(DPF_2 和 DPF_4)混合菌群的 7 d 石油降解率达到 87.77%,远远高于普通降油菌对石油类的降解率(40.3%～57.6%)[14]和海洋细菌对石油类的降解率(40.89%～62.75%)[15]。

如图 1 所示,采用 LSD 法对各处理两两比较,真菌(DPF_2 和 DPF_4)比单一真菌 DPF_2 试验组高 5.88%,比真菌 DPF_4 试验组高 7.32%,说明真菌 DPF_2 和真菌 DPF_4 具有偏利共生,二者代谢底物有不重合域,不重合域越大,协同能力越强。细菌亦如此,对单一细菌 DPB_{004} 试验组和 DPB_{009} 试验组而言,两株细菌混合试验组降解率更高,但是在摇瓶培养条件下细菌和真菌混合后的降解率不高,说明此降解条件下细菌和真菌的协同效果不理想。考虑细菌在土壤中活动受限制,在接下来的试验中主要研究这 2 株真菌的复合菌群对油污土壤的修复。



注:不同小写字母表示在 $p<0.05$ 水平下差异显著,不同大写字母表示在 $p<0.01$ 水平下差异显著。

图 1　研究区微生物复配试验

2.3　复配菌系正交试验设计

如表 3 所示,试验设计采用 5 因素 4 水平正交设计,共 16 个试验组。按照 1.4 方法定期取样测定石油降解率,用 SPSS 软件 17.0 分析所得数据。结果显示对 7 d 各试验组石油绝对降解量进行分析如表 4 所示。

表 3　研究区各采样时间石油降解率　　%

分组	不同采样时间石油降解率							
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d
1	55.74	62.36	70.21	70.54	72.46	75.65	79.61	81.9
2	46.63	82.60	83.44	84.67	86.24	88.52	89.13	89.28
3	60.48	65.50	74.15	83.87	86.43	89.91	90.06	90.34
4	81.47	86.41	86.49	86.84	88.36	90.49	91.21	94.12
5	69.49	71.30	72.75	75.77	82.33	87.02	87.31	87.54
6	61.54	67.17	73.85	85.75	87.93	88.65	89.43	92.34
7	65.52	67.55	69.6	86.95	87.65	87.93	88.57	92.22
8	53.75	57.29	59.01	71.07	75.67	83.47	81.07	85.47
9	77.43	81.11	81.64	89.75	89.78	89.87	89.94	91.26
10	60.51	77.07	78.47	81.86	84.89	89.3	90.14	92.61
11	49.64	57.31	63.12	72.43	78.85	83.99	85.27	89.43
12	52.16	54.71	58.15	60.96	73.12	78.19	80.81	85.18
13	62.09	68.58	78.23	80.04	85.93	88.22	88.39	89.26
14	56.60	57.62	60.92	70.79	82.84	84.74	88.02	90.17
15	58.98	67.74	68.08	68.73	77.02	81.07	83.18	84.22
16	50.11	57.98	63.56	65.99	69.75	75.81	78.85	81.95

注:石油降解率=石油绝对降解量/初始油污土壤含油量×100%。

表 4　研究区石油的 7 d 降解率 SPSS 分析

	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 4	56.945	水平 2	56.320[a]	水平 1	54.258[a]	水平 2	53.028[a]	水平 1	57.245[a]
	水平 3	59.935	水平 3	58.655[a]	水平 2	56.815[ab]	水平 1	57.505[a]	水平 3	59.068[a]
	水平 1	61.080	水平 4	59.373[a]	水平 3	62.065[ab]	水平 3	60.148[ab]	水平 2	59.923[a]
	水平 2	62.575	水平 1	66.188[a]	水平 4	67.398[b]	水平 4	69.855[b]	水平 4	64.300[a]
极差	5.63		9.867 5		13.14		16.827 5		7.055	

从表 4 结果方差分析，均值大的因素水平影响效果强，各因素水平对结果影响的强弱顺序为：$A_2>A_1>A_2>A_3$，$B_1>B_4>B_3>B_2$，$C_4>C_3>C_2>C_1$，$D_4>D_3>D_1>D_2$，$E_4>E_2>E_3>E_1$。方差分析给出因素水平比较，在本次统计中，A，B，C，D，E 5 个因素都当成了处理因素，这种试验设计实际上没有考虑试验误差，即表中 Error 为 0。在正交设计中，如果没有重复试验，又无空白项时，常取因素离均差平方和（Ⅲ 型平方和）最小项作为误差估计[16]。从表 5 中可以看出，A 的Ⅲ 型平方和 SSC＝68.251 最小，它对整个试验结果影响最小，因而把它作为误差估计，用以检验其他因素作用的显著性。这样重新进行统计，方法同上，只是不要将变量 A 添加参与到计算即可[17]，结果见表 4。

极差分析可知，因素的 F 值越大，其影响权重越高，各因素对试验结果的重要次序为：$D>C>B>E>A$，氧化剂（C）对石油降解率影响水平极显著性，$p<0.05$ 水平，氧化剂（C）对石油降解率 C_1 和 C_4 影响水平极显著，表面活性剂（D）在 $p<0.05$ 水平，水平 1 水平 2 和水平 4 差异显著，污染强度（A）、营养物（B）、接菌量（E）在 7 d 内对石油降解率影响非常小，综合各种因素，确定石油降解因素组合为 D_4 C_4 B_1 E_4 A_2。同理可得 14，21，28，35，42，49，56 d 的各因素重要次序和最佳工艺，见表 5。

表 5 研究区正交设计试验各因素重要性

时间/d	各因素重要性	各因素重要性修订	最佳工艺组合
7	$D>C>B>E>A$	$D>C>B>E>A$	D_4 C_4 B_1 E_4 A_2
14	$D>C>A>E>B$	$D>C>A>E>B$	D_1 C_2 A_4 E_4 B_2
21	$D>A\geqslant C>E>B$	$D>C\geqslant A>E>B$	D_1 C_4 A_1 E_4 B_2
28	$C>D>A>B>E$	$C>D>A>B>E$	C_1 D_2 A_4 B_4 E_2
35	$C>B>D>E>A$	$C>B>D>E>A$	C_1 B_2 D_4 E_4 A_2
42	$C>D\geqslant B>A\geqslant E$	$C>B\geqslant D>E\geqslant A$	C_2 B_4 D_2 E_4 A_4
49	$C>B>E>D>A$	$C>B>E>D>A$	C_4 B_2 E_4 D_4 A_4
56	$C>B>E>A>D$	$C>B>E>A>D$	C_3 B_2 E_4 A_4 D_4

对表 5 数据进行分析，为了清楚整个修复过程因素动态变化，现对数据进行图形化处理，以时间为横坐标，因素重要性为纵坐标。例如把因素的重要性分为 5 级，与排序相反，以 7 d 因素 A 为例，A 重要级别为纵坐标，即为 1 同理因素 D 为 5，画折线图。考虑折线的平滑性以及因素的均值大小对表 5 因素重要性进行校正，数据如图 2。

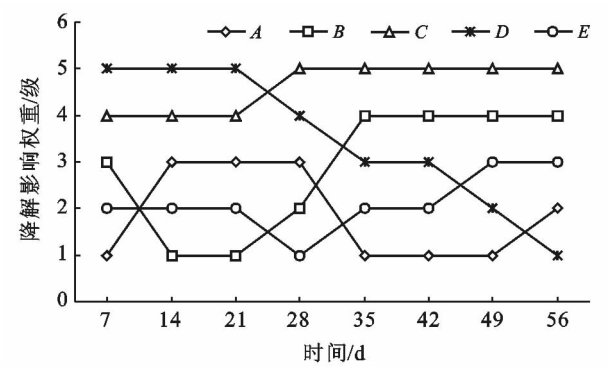


图 2 研究区各因素对生物修复的重要性

从图 2 可知：因素 A 污染强度在 0～7 d 内权重为 1 级，即对生物修复影响最小，8～28 d 权重为 3 级，35～49 d 权重最低降至 1 级。分析原因，微生物进入土壤后，有一个生物延迟期，微生物调整底物代谢的酶系统。污染强度在 0～28 d 内对降解率有影响。可见在一定条件内，微生物可利用的石油组分越多，石油绝对降解量越大，但对整个修复期间降解率的影响不显著。因素 B 营养物：在 0～7 d 内权重 3 级，微生物处于生理延迟期，细胞需要紧急启动新底物代谢酶系统，因此对氮磷过量积累。而 14～28 d，权重降为 1 级，可能跟土壤固有营养供给和前期过量吸收短时间需求量不大有关；土壤固有营养消耗殆尽后，外加补给作用更加明显，因此 35 d 后权重升为 4 级。如图 2 在整个修复过程，因素 B 水平 2 出现 5/6 次（扣掉微生物迟缓期第一星期），所以因素 B_2 为最佳比例。

氧化剂 C 在前 21 d 内响应指数一直为 4 级，28 d 后权重升为 5 级，说明氧化剂 C 在整个修复过程中都具有重要影响，添加氧化剂在整个修复期内都具有重要意义。考虑 H_2O_2 是一次添加，7 d 内全部消耗掉了，因此只要不产生微生物生理毒性，氧化剂浓度大有好处，因此因素 C_4 为最佳比例。

表面活性剂 D 在 0～21 d 权重为 5 级，影响最大，可见生物修复初期石油乳化效果对生物降解至关

重要。28 d 后权重降为 1 级,分析原因:初期外加表面活性剂促进了微生物的增殖,后期大量生物表面活性剂的产生,降低了外源表活剂的权重。因此表面活性剂 D_4 为最佳配比。

接菌量 E 在前 42 d 为 2 级,后期升级为 3 级,在整个修复期因素 E 水平均值差异不显著,因此接菌量的多寡决定不了降解效果,即对降解率影响不显著,因此 E_2 比较适合。

3　讨 论

根据图 2 可知:在整个 56 d 降解期间内,C 因素氧化剂均占较大的权重,其对降解率影响最大。原因是化学氧化使大分子底物分解为小分子,提高了生物可降解率。但也有研究表明,氧化剂浓度过高会对微生物产生毒害作用[18],因此氧化剂添加要有合适浓度,在本试验确定 C_4 为适合氧化剂浓度。D 因素表面活性剂具有增溶作用,石油为非极性物质,具有疏水性,而微生物表面具有亲水特性,添加的表面活性剂能增加石油与微生物之间的接触机会,提高石油污染物质的可利用性,缩短土壤修复时间;而本试验因素 C 在 0～21 d 内权重最大,证明了上述观点。随着外加的表面活性剂被微生物降解[19],其权重逐渐降低。到 56 d 时,D 因素的权重已降至最小,证明表面活性剂大量被微生物消耗(表面活性剂一次性投入,不在不加);另一方面到了降解后期微生物自身能够大量产生生物表面活性剂,所以到了后期 D 因素对降解的影响权重自然变小。相比之下,E 因素接菌量在整个修复期权重最小(除 0～7 d 延迟期),推测其原因是微生物超强的自我繁殖能力,微生物数量的大量增殖,降低了因素 E 接菌量的影响,导致本试验微生物接菌浓度水平对于石油降解率影响很大,试验数据处理方差均值不显著也证明了此观点。

4　结 论

(1) 本试验从石油污染样品中,以石油为唯一碳源进行筛选、分离得到石油降解菌株 16 株,选取 5 株高效降解菌作进一步协同试验。其中包含 3 株真菌(DPF_1,DPF_2,DPF_4)和 2 株细菌(DPB_{004},DPB_{009}),这些株菌均能使石油乳化。经复配研究,真菌(DPF_2,DPF_4)协同效果较好,7 d 石油降解率可达 87.77。

(2) 采用真菌(DPF_2,DPF_4)的复合菌群,设计 5 因素 4 水平的正交试验室内模拟微生物修复油污土壤的试验。结果表明,在 56 d 内,石油污染强度为 10 的油污土壤降解率最高,达 94.12%,石油污染强度为 25 的油污土壤,降解率为 90.17%。

(3) 采用 SPSS 统计软件 17.0 对降解过程进行分析,发现在 21 d 内,表活剂影响权重第一,氧化剂权重第 2。21 d 后氧化剂权重上升为第 1,表活剂权重逐渐降低,营养剂则在 28 d 后上升至第 2 位置。石油烃污染强度仅在 35 d 前有一定权重(影响),在修复后期影响最小。在整个修复过程,接菌量在所有因素中方差均值都最小,对降解率权重(影响)不大。

[参 考 文 献]

[1] 张宝良. 油田土壤石油污染与原位生物修复技术研究[D]. 黑龙江 大庆:大庆石油学院,2007:57-74.

[2] 陆秀君,郭书海,孙清,等. 石油污染土壤的修复技术研究现状及展望[J]. 沈阳农业大学学报,2003,34(1):63-67.

[3] Propst L T, Lochmiller L R, Qualls J C W, et al. In situ(mesocosm) assessment of immunotoxicity risks to small mammals inhabiting pet-rochemical waste sites[J]. Chemosphere, 1999,38(5):1049-1067.

[4] 刁潘. 化学热洗—生物降解联合处理含油污泥[D]. 重庆:西南石油大学,2014:8-33.

[5] Atlas R M. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills[J]. Journal of Chemical Technology and Bio-technology, 1991,52(2):149-156.

[6] 李春荣,王文科,曹玉清,等. 石油污染土壤的生物修复研究[J]. 农业环境科学学报 2009,28(2):234-238.

[7] 张秀霞,白雪晶,徐娜娜,等. 固定化微生物修复石油污染土壤影响因素研究[J]. 环境工程学报,2013,7(3):1156-1162.

[8] 黄廷林,唐智新,徐金兰,等. 黄土地区石油污染土壤生物修复室内模拟试验研究[J]. 农业环境科学学报,2008,27(6):2206-2210.

[9] Ijah U J J, Antai S P. Removal of nigerian light crude oil in soil over a 12-month period[J]. International Biodeterioration & Biodegradation. 2003,51(2):93-99.

[10] Margesin R, Hmmerle M, Tscherko D. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: Effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time [J]. Microbial Ecology, 2007,53(2):259-269.

[11] 张秀霞,滕芝,吴佳东,等. 激活剂对石油污染土壤修复的强化作用及修复条件的优化[J]. 石油学报:石油加工,2013,29(2):353-358.

[12] 王冬梅,陈丽华,周立辉,等. 鼠李糖脂对微生物菌剂降解石油的影响[J]. 环境工程学报,2013,10(7):4121-4126.

[13] 李燕妮. 细菌菌群降解石油的影响因素及应用研究[D]. 天津:天津理工大学,2013:54-61.

(下转第 346 页)

[4] 王琳,吴业,杨桂山,等.基于STIRPAT模型的耕地面积变化及其影响因素[J].农业工程学报,2008,24(12):196-200.

[5] 王海鸿,马琼,付士波,等.西北干旱半干旱区耕地面积变化与人口、经济发展的相关关系研究:以甘肃省为例[J].干旱区资源与环境,2011,25(1):74-79.

[6] 吴美琼,陈秀贵.基于主成分分析法的钦州市耕地面积变化及其驱动力分析[J].地理科学,2014,34(1):54-59.

[7] 巴哈尔古丽·吾甫尔,瓦哈甫·哈力克.基于主成分分析的巴州耕地变化趋势与驱动力[J].干旱区资源与环境,2012,26(3):105-110.

[8] 周晓艳,宋祯利,宋亚男,等.基于地理加权回归模型的长江中游地区人均耕地面积变化影响因素分析[J],水土保持通报,2016,36(1):136-142.

[9] 肖思思,吴春笃,储金宇.近15 a中国耕地驱动因素的空间差异分析[J].中国土地科学,2013,27(7):55-61.

[10] 孙国军,刘普幸,孙涛.乌拉特前旗耕地变化的驱动力研究及预测[J].水土保持通报,2011,31(1):207-210.

[11] 赵永,刘旭华,孙腾达.基于空间自回归模型的中国耕地面积变化预测[J].干旱区资源与环境,2013,27(8):1-5.

[12] 程文仕,曹春,黄鑫.趋势移动平均法在耕地面积预测中的应用研究:基于1985—2010年甘肃省耕地面积分析[J].干旱区资源与环境,2015,29(8):185-189.

[13] 曹银贵,王静,刘爱霞.基于BP神经网络的三峡库区开县耕地面积预测研究[J].中国农业资源与区划,2007,28(4):30-34.

[14] 王霞,王占岐,金贵,等.基于核函数支持向量回归机的耕地面积预测[J].农业工程学报,2014,30(4):204-211.

[15] Breiman L. Random forests[J]. Machine Learning, 2001,45(1):5-32.

[16] 方匡南,吴见彬,朱建平,等.随机森林方法研究综述[J].统计与信息论坛,2012,26(3):32-38.

[17] 王盼,陆宝宏,张瀚文.基于随机森林模型的需水预测模型及其应用[J].水资源保护,2014,30(1):34-38.

[18] 余坤勇,姚雄,邱祈荣.基于随机森林模型的山体滑坡空间预测研究[J].农业机械学报,2016,47(10):338-345.

[19] 马玥,姜琦刚,孟治国,等.基于随机森林算法的农耕区土地利用分类研究[J].农业机械学报,2016,47(1):297-303.

[20] 陈元鹏,罗明,彭军还,等.基于网格搜索随机森林算法的工矿复垦区土地利用分类[J].农业工程学报,2017,33(14):250-257.

[21] 田义超,李晶,任志远.近300年来黄土高原耕地变化及时空格局分析[J].干旱区资源与环境,2012,26(2):94-101.

[22] 甄亿位,郝敏,陆宝宏,等.基于随机森林的中长期降水量预测模型研究[J].水电能源科学,2015,33(6):6-10.

[23] 王小川,史峰,郁磊,等.MATLAB神经网络43个案例分析[M].北京:北京航空航天大学出版社,2013.

[24] 车明亮,聂宜民,刘登民,等.区域耕地数量变化预测方法的对比研究[J].中国土地科学,2010,24(5):13-18.

[25] 卞德鹏,常庆瑞,柳艺博,等.黄土丘陵沟壑区耕地数量动态变化及其驱动力分析:以吴起为例[J].干旱地区农业研究,2009,27(3):245-248.

(上接第335页)

[14] Santisi S, Cappello S, Catalfamo M, et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2015,46(2):377-387.

[15] Jianliang Xue, Yang Yu, Yu Bai, et al. Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A review[J]. Curr Microbiol, 2015,71:220-228.

[16] 张春华,严云良.医药数理统计[M].北京:科学出版社出版,2001.

[17] 乔俊,陈威.添加不同营养助剂对石油污染土壤生物修复的影响[J].环境化学,2010,29(1):6-11.

[18] Jamgocian R P, Yapijakis C. Pilot-scale comparison of bioventing vs. hydrogen peroxide in maintaining effective aerobic in situ, bioremediation[J]. Studies in Environmental Science, 1997,66:365-377.

[19] Merkova M, Zalesak M, Ringlova E, et al. Degradation of the surfactant Cocamidopropyl betaine by two bacterial strains isolated from activated sludge[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018,127:236-240.