

# 外源菌群及与植物联合修复华北中度石油污染土壤效果研究

孙 婧<sup>1</sup>, 蔡典雄<sup>1, 2\*</sup>, 蒋广勇<sup>1</sup>, 任会战<sup>1</sup>, 吴会军<sup>2</sup>

(1. 清华大学天津高端装备研究院应用生物技术与装备研究所, 天津 300300;

2. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

**摘 要:** 为探讨不同微生物菌群对华北地区中度石油污染土壤的修复效果, 在实验室模拟条件下分别进行优势外源石油降解菌群的筛选和优势菌群与植物联合修复试验。结果显示: 4 种外源石油降解菌群中, PDC-3 菌群对中度石油污染土壤总石油烃 (TPH, total petroleum hydrocarbons) 去除率为 84.07%, 在各菌群中效果最优; 该优势菌群与植物联合修复中度石油污染土壤比单独使用优势菌群修复可获得更好的效果, 优势菌群与黑麦草联用及优势菌群与紫花苜蓿联用 120 d TPH 的去除率分别为 91.58% 和 89.30%, 修复后土壤中 TPH 含量均小于 500 mg/kg; 同时优势菌群与黑麦草联合修复在 90 d 即可去除 89.32% 的土壤 TPH, 相比选用紫花苜蓿可有效缩短修复周期; 优势菌群对土壤 TPH 的去除起主要作用, 其贡献率远高于土著微生物菌群或植物的贡献率; 植物对土壤 TPH 去除的贡献率为 4.09% ~ 6.48%, 且其作用主要发生在修复过程的中后期; 优势菌群单独使用或与植物联合修复中度石油污染土壤 120 d 均可有效去除 C10 ~ C12 及 C22 ~ C40 石油烃组分, 去除率为 85.14% ~ 100.00%; 然而, C13 ~ C21 石油烃组分含量表现出阶段性的积累效应; 除对土壤石油烃的去除作用外, 使用优势菌群进行生物修复存在一定的调节土壤 pH、增加土壤肥力, 且有利于恢复修复后的土壤功能。

**关键词:** 华北地区; 外源石油降解菌群; 微生物植物联合修复; 中度石油污染土壤; 修复效果

伴随现代石油工业的高速发展, 石油勘探、开采、炼化、储运等环节对油区及周边生态环境造成的污染问题已不容忽视。统计资料表明, 每生产 1 t 石油就有约 2 kg 石油污染物进入环境, 油区工作范围 20 km<sup>2</sup> 的土壤均会不同程度受到石油污染<sup>[1]</sup>。《2014 年全国土壤污染状况调查公报》显示, 在调查的 13 个采油区 494 个土壤点位中, 超标点位达 23.6%。刘五星等<sup>[2]</sup> 对大庆、胜利油田土壤污染分布的调查发现, 油井周边 100 m 范围内土壤中含油量绝大多数高于临界值 (500 mg/kg), 距油井 100 m 土壤含油量平均值在 1037 ~ 2092 mg/kg 之间, 而距油井 5 m 该指标为 6644 ~ 12762 mg/kg, 呈现以污染源为中心向外递减扩散的特征<sup>[3]</sup>。重度石油污染土壤通常集中在污染源周边且面积相对较小, 而其外较大范围的土壤往往存在轻度到中度石油污染。中度石油污染土壤中除含有具有生物毒性的石油污染物外, 土壤结构与功能也受到严重破

坏, 进而危害生态环境安全、农产品质量及人类健康。在当今人们高度重视生态环境质量和食品安全的时代, 修复和治理占据较大面积的中度石油污染土壤无疑是人们重点关注的内容之一。

近年来全球范围内石油污染场地修复案例中, 生物修复技术因其相对传统物理、化学修复方法的多种优势, 已获得愈加广泛的应用, 其中微生物原位修复因对土壤扰动小、工程量小, 适合较大规模中度石油污染土壤的修复<sup>[4]</sup>。近年多项研究显示, 修复石油污染土壤使用外源石油降解菌群可产生较好的修复效果, 例如 Napp 等<sup>[5]</sup> 对自然衰减、生物刺激和生物强化 3 种不同方法修复石油污染土壤效果的比较研究表明, 石油烃初始浓度为 6703 mg/kg 的石油污染土壤使用假单胞菌及芽孢杆菌组成的外源石油降解菌群修复 60 d 后降解率高达 85%, 显著优于相同条件下不添加外源石油降解菌群的其他两种修复方法。同时, 植物修复常与微生物原位修复技术联用, 通过发挥植物与微生物的协同作用, 强化对土壤中石油污染物的降解和吸收。李春荣<sup>[6]</sup> 在陕北地区使用芽孢杆菌、假单胞菌、节杆菌和微杆菌组成的外源强化混合菌与苜蓿、大豆构建的联合原位修复体处理石油烃初始浓度 10000 mg/kg 的

收稿日期: 2022-03-03; 录用日期: 2022-03-17

基金项目: 河北省重点研发计划项目资源与环境专项 (20373804D)。

作者简介: 孙婧 (1986-), 副研究员, 博士, 主要从事环境及农业微生物研究。E-mail: sunjing@tsinghua-tj.org。

通讯作者: 蔡典雄, E-mail: caidianxiong@caas.cn。

土壤,石油烃去除率在150 d时分别达到63.5%和51.7%,500 d时分别达到98.8%和92.7%。然而,何云馨<sup>[7]</sup>在天津港复合石油烃降解菌筛选试验时发现,使用不恰当的外源复合菌剂,会出现与土著微生物之间的拮抗作用,导致饱和烷烃和芳香烃降解率分别仅为25.22%和50.70%,显著低于不添加菌剂时的自然降解率,修复效果下降。因此,因地制宜选择高效外源石油降解菌群是保证生物修复效果和效率的关键。

然而,目前针对华北地区中度石油污染土壤生物修复过程中各石油烃组分降解演变及其对土壤理化性质影响的研究文献资料甚少,特别是外源石油降解菌群与植物联合应用过程中各自对土壤中总石油烃(TPH, total petroleum hydrocarbons)去除作用贡献率的研究尤为少见。为深度探索可应用于华北地区中度石油污染土壤的修复技术,本研究除采用传统模拟试验筛选优势外源石油降解菌群外,还进一步探讨了使用优势菌群与植物联合修复

(Phyto-microbial remediation)方法对中度石油污染土壤的修复效果,包括对土壤中TPH和C10~C40石油烃组分的去除效果,并估算优势菌群及植物对TPH去除作用的贡献率,以及初步研究其对土壤理化性质的改良效果,为未来大面积应用原位生物修复治理中度石油污染土壤提供可行技术及应用依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

依据《建设用地土壤环境调查评估技术指南》相关要求布点采样,中度石油污染土壤样品由中国石油工程建设有限公司华北分公司提供,采自华北油田雄安新区境内生产作业区。同时以没有直接受到污染源污染的地块作为背景土壤进行对比。土壤样品分别经自然风干、除杂、破碎、过筛(2 mm)、混匀后密封储存在4℃冰箱备用。土壤样品基本理化性质及TPH含量见表1。

表1 土壤样品基本理化性质及总石油烃含量

| 土样       | 质地  | pH   | 总石油烃<br>(mg/kg) | 有机质<br>(g/kg) | 全氮<br>(g/kg) | 有效磷<br>(mg/kg) | 速效钾<br>(mg/kg) |
|----------|-----|------|-----------------|---------------|--------------|----------------|----------------|
| 背景土壤     | 中壤土 | 8.11 | 19              | 4.27          | 0.35         | 13.45          | 90.20          |
| 中度石油污染土壤 | 中壤土 | 8.09 | 3900            | 9.34          | 0.44         | 9.68           | 73.52          |

1.2 供试土壤调理剂

由于本研究区域土壤养分条件较差,不利于生物修复的进行,综合考虑土壤养分、pH等条件的

改良需求,使用了土壤调理剂(由清华大学天津高端装备研究院应用生物技术与装备研究所提供)作为添加物,其基本理化性质见表2。

表2 添加物基本理化性质

| 添加物   | pH  | 有机质(g/kg) | 全氮(g/kg) | 有效磷(mg/kg) | 速效钾(mg/kg) |
|-------|-----|-----------|----------|------------|------------|
| 土壤调理剂 | 7.0 | 920.74    | 20.56    | 11274.40   | 19731.77   |

1.3 供试外源石油降解菌群

1.3.1 菌群构成

供试外源石油降解菌群PDC-1、PDC-2、PDC-3、PDC-4由清华大学天津高端装备研究院应用生物技术与装备研究所提供,其主要构成见表3,包含不同比例的芽孢杆菌属(*Bacillus*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、木霉属(*Trichoderma*)的多个菌种菌株。上述菌群以具有不同组分石油烃降解功能的微生物为基础,加入能够产生生物表面活性剂类的物质和促进土壤养

分转化等功能的辅助微生物,以促进菌群中微生物之间的协同作用,提高其对多样化土壤环境的适应性和对土壤中石油污染物的去除效果。

1.3.2 菌群制备方法

细菌培养条件:LB液体培养基,35℃、180 r/min摇床培养;放线菌培养条件:高氏1号液体培养基,28℃、180 r/min摇床培养;霉菌培养条件:马铃薯葡萄糖液体培养基<sup>[8]</sup>,28℃、180 r/min摇床培养。

各菌种按上述培养条件分别培养24~48 h得到种子菌液,使用前按照相应比例混合制成液态菌剂,28℃、180 r/min摇床活化培养14 h后用于后续试验。

表 3 供试外源石油降解菌群主要构成

| 菌种菌株                                      | PDC-1    | PDC-2    | PDC-3             | PDC-4             |
|-------------------------------------------|----------|----------|-------------------|-------------------|
| 枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )       | TPH171-1 | TPH129-6 | TPH171-1、TPH129-6 | TPH171-1、TPH129-6 |
| 巨大芽孢杆菌 ( <i>Bacillus megaterium</i> )     | TPH29-3  | TPH29-3  | TPH29-3           | TPH29-3           |
| 玫瑰色红球菌 ( <i>Rhodococcus rhodochrous</i> ) | TPH32-1  | —        | TPH32-1           | TPH32-2           |
| 红城红球菌 ( <i>Rhodococcus erythropolis</i> ) | —        | TPH21-1  | TPH21-1           | TPH21-3           |
| 铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )  | TPH431   | TPH431   | TPH431            | TPH431            |
| 假单胞菌 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)            | —        | —        | TPH164-3          | —                 |
| 诺卡氏菌 ( <i>Nocardia</i> sp.)               | TPH20-6  | TPH20-6  | TPH20-5、TPH20-6   | TPH20-5、TPH20-6   |
| 白色链霉菌 ( <i>Streptomyces albus</i> )       | TPH22-4  | TPH22-4  | TPH22-4           | TPH22-4           |
| 里氏木霉 ( <i>Trichoderma reesei</i> )        | —        | —        | TPH97-2           | TPH97-2           |

## 1.4 试验方案设计

本研究设置了 2 个试验：优势外源石油降解菌群筛选和优势菌群与植物联合修复试验，具体试验

方案见表 4。为了便于统计，各处理至少设置了 3 个平行重复。

表 4 试验方案设计

| 试验            | 序号 | 处理                | 主要添加物        |           |                      |               |
|---------------|----|-------------------|--------------|-----------|----------------------|---------------|
|               |    |                   | 中度石油污染土壤 (g) | 土壤调理剂 (g) | 供试菌群 ( $10^8$ cfu/g) | 供试植物          |
| 优势外源石油降解菌群筛选  | 1  | CK                | 100          | 1.5       | 无                    | —             |
|               | 2  | PDC-1             | 100          | 1.5       | PDC-1                | —             |
|               | 3  | PDC-2             | 100          | 1.5       | PDC-2                | —             |
|               | 4  | PDC-3             | 100          | 1.5       | PDC-3                | —             |
|               | 5  | PDC-4             | 100          | 1.5       | PDC-4                | —             |
| 优势菌群与植物联合修复试验 | 1  | CK                | 3000         | 45        | 无                    | 无             |
|               | 2  | PDC-NP            | 3000         | 45        | PDC                  | 无             |
|               | 3  | PDC-黑麦草 (PDC-LP)  | 3000         | 45        | PDC                  | 黑麦草 (30 粒/盆)  |
|               | 4  | PDC-紫花苜蓿 (PDC-MS) | 3000         | 45        | PDC                  | 紫花苜蓿 (30 粒/盆) |

注：PDC 指经筛选获得的优势外源石油降解菌群。供试植物为黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 和紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.)，均购自中国农业科学院。

## 1.4.1 优势外源石油降解菌群筛选方法

4 种外源石油降解菌群分别按照  $10^8$  cfu/g 的接种量加入 100 g 中度石油污染土壤中，加入经高温灭菌处理的土壤调理剂 1.5 g，调节土壤湿度至 20%。试验在恒温 ( $25 \pm 1$ ) °C 下进行，每隔 2 d 翻动土壤，定期喷洒蒸馏水以保持土壤湿度。以相同条件下未接种菌群的处理作为控制试验 (CK)。每个处理设置 5 个平行重复。在第 30、60、90、120 d 时取样测定土壤石油烃含量。

## 1.4.2 优势菌群与植物联合修复试验方法

第一阶段：筛选出的优势外源石油降解菌群按照  $10^8$  cfu/g 的接种量加入 3 kg 中度石油污染土壤中，加入经高温灭菌处理的土壤调理剂 45 g，调节土壤湿度至 20%，充分混匀后置于培养盆中。试验在恒温 ( $25 \pm 1$ ) °C 下进行，每隔 2 d 翻动土壤，定期喷洒蒸馏水以保持土壤湿度。以相同条件下未接种优势菌群的空白处理作为控制实验 (CK)。上述处理进行 30 d。

第二阶段：30 d 后，对接种优势菌群的处理，

按 1.5 cm 播种深度分别均匀播种黑麦草 (PDC-LP) 和紫花苜蓿 (PDC-MS), 播种密度 30 粒/盆。试验在恒温 ( $25 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$  进行, 定期喷洒蒸馏水以保持土壤湿度。相同条件下未种植植物的为仅使用优势菌群修复的处理 (PDC-NP), 未接种优势菌群且未种植植物的空白处理为控制试验 (CK)。

每个处理设置 3 个平行重复。在第 40、50、60、70、90、120 d 时取样测定土壤石油烃含量, 并在第 120 d 时取样测定土壤基本理化性质。

## 1.5 测定与分析方法

### 1.5.1 土壤基本理化性质测定

土壤基本理化性质采用常规方法测定<sup>[9]</sup>。

### 1.5.2 土壤石油烃含量测定

土壤石油烃含量采用气相色谱法测定 [参照《土壤和沉积物石油烃 (C10-C40) 的测定气相色谱法》(HJ 1021-2019)]。

### 1.5.3 数据处理与分析

试验数据使用 Excel 2019 进行处理, 使用 SPSS 19.0 进行 One-way-ANOVA 分析和差异性检验 (LSD,  $P < 0.05$ ), 采用 Origin 9.0 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同外源石油降解菌群对中度石油污染土壤 TPH 去除效果的影响

中度石油污染土壤经 PDC-1、PDC-2、PDC-3、PDC-4 菌群处理 120 d 后土壤 TPH 含量由 3900 mg/kg 分别降低至 1391、2129、621、1085 mg/kg, TPH 去除率分别为 64.34%、45.40%、84.07%、72.16% (图 1), 而 CK 土壤 TPH 含量降低至 3660 mg/kg, TPH 去除率仅为 6.15%, 说明 4 种菌群对土壤 TPH 的去除都起到重要作用, 影响范围在 45.40% ~ 84.07% 之间, 其中 PDC-3 菌群对土壤 TPH 去除率最高, 达到 84.07%。各菌群对土壤 TPH 去除效果有差异的主要原因是外源石油降解菌群在实际应用中往往会受到土壤中污染物成分与含量、土壤理化性质、外源微生物与土著微生物之间相互作用等多种因素的影响, 从而影响其生长代谢和对污染物的降解<sup>[10-13]</sup>。

本研究所选用的 4 种外源石油降解菌群在各试验时段均使土壤 TPH 去除率显著提高, 120 d 时各菌群 TPH 去除率分别是 CK 处理的 7.38 ~ 13.67 倍。从各时段试验结果中可以发现, 各外源石油降解菌群间 TPH 去除率在第 30 d 时差异尚不显著,

而自第 60 d 起开始出现较大差异, 其中 PDC-3 菌群的 TPH 去除率显著优于其他菌群 ( $P < 0.05$ ) 并在 60 ~ 120 d 的整个时段中均保持相对较高, 说明其具有对研究区域土壤的较强适应性和 TPH 降解能力优势。对土壤 TPH 去除率的变化趋势而言, TPH 去除率随处理时间增长而增加, 虽然本研究 120 d 试验周期内各处理土壤 TPH 去除率未达到峰值, 但在 90 d 后其增加均呈现趋缓态势。

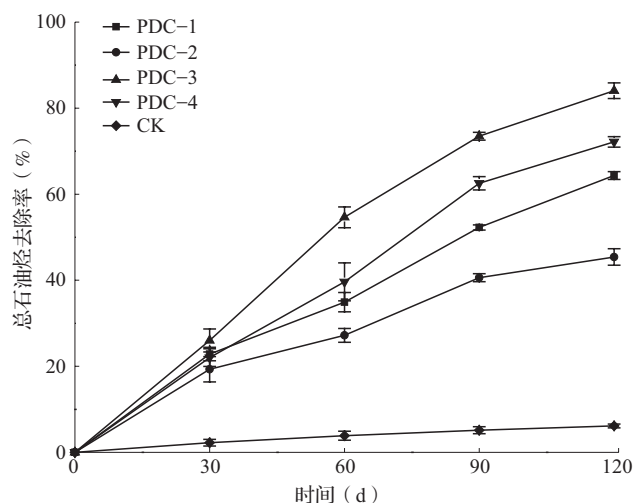


图1 不同外源石油降解菌群对污染土壤总石油烃去除率的比较

### 2.2 优势菌群与植物联合对中度石油污染土壤修复效果的影响

#### 2.2.1 联合修复方法对污染土壤 TPH 去除率的影响

在使用筛选出的优势外源石油降解菌群 PDC-3 与植物联合修复试验中, 种植黑麦草 (PDC-LP)、紫花苜蓿 (PDC-MS)、未种植植物 (PDC-NP) 和仅添加土壤调理剂的控制组 (CK) 4 种不同处理在第 120 d 时土壤 TPH 含量分别降低至 328、417、560、3573 mg/kg, TPH 去除率分别为 91.58%、89.30%、85.65% 和 8.39% (图 2)。其中联合修复方法的 TPH 去除率明显高于非联合方法, 相比未种植植物的 PDC-NP 组, PDC-LP 和 PDC-MS 组的 TPH 去除率分别提高了 6.92% 和 4.26%, 说明修复过程中植物的参与有利于促进土壤 TPH 的去除, 这与近年多项研究所报道的结果类似<sup>[14-16]</sup>。出现这一现象的原因可能包括植物本身对土壤中污染物有一定的降解、富集、固定等作用, 同时植物根系分泌的营养物质及酶等活性物质为土壤微生物提供良好的生存环境, 从而促进微生物生长代谢, 提高微生物对石油污染物的降解活性, 强化对土壤中石油污染物的降解和吸收<sup>[17]</sup>。

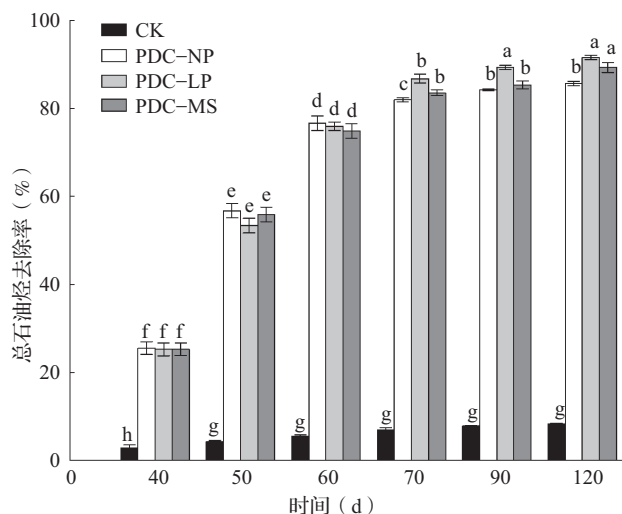


图2 优势菌群与植物联合修复方法对污染土壤的修复效果  
注:不同小写字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

处理0 ~ 60 d时段中,优势菌群与植物联合修复和单独使用优势菌群相比,对污染土壤TPH的去除作用无显著差异 ( $P > 0.05$ );自第70 d开始,植物促进土壤TPH去除的作用开始显现,70 ~ 120 d时段中,PDC-LP和PDC-MS均比PDC-NP表现出更好的土壤TPH去除效果。对不同修复植物,PDC-LP处理90 d可去除89.32%的土壤TPH,比同期PDC-MS的TPH去除率提高4.64%,但到120 d时,PDC-LP与PDC-MS处理效果无显著差异 ( $P > 0.05$ ),说明优势菌群与植物联合修复中使用黑麦草比使用紫花苜蓿更早达到较高的去除率,这有利于缩短修复所需周期。

### 2.2.2 优势菌群与植物在联合修复中对污染土壤TPH去除率的贡献率影响

以各处理土壤TPH去除率为基础,采用差减法估算不同因素对土壤中TPH去除作用的累积贡献率,结果如图3、图4所示:优势菌群与植物联用修复污染土壤的各时段中,优势菌群对土壤TPH去除的贡献率均远高于土著微生物菌群或植物的贡献率,且优势菌群的累积贡献率随修复时间的增长呈增加趋势;植物对土壤TPH的去除作用在60 d前不明显,在处理70 d后其作用逐步显现且贡献率随时间增长而增加,显示植物对石油污染物的去除作用与其生长过程密切相关,生物量是其对石油污染土壤修复作用的重要指示指标之一,相同时间内植物生长发育形成的生物量越大修复效果越好,修复前期植物生物量较小时该作用不明显,这一结果与李先梅等<sup>[18]</sup>的研究相似;处理120 d时,优势菌群、土

著微生物菌群、黑麦草对土壤TPH去除的贡献率分别为84.36%、9.16%、6.48%;优势菌群、土著微生物菌群、紫花苜蓿对土壤TPH去除的贡献率分别为86.51%、9.40%、4.09%,由此可见,在本试验过程中,优势菌群对土壤TPH的去除起主要作用,植物对土壤TPH去除作用的贡献率仅为4.09% ~ 6.48%,且其作用主要发生在修复过程的中后期。

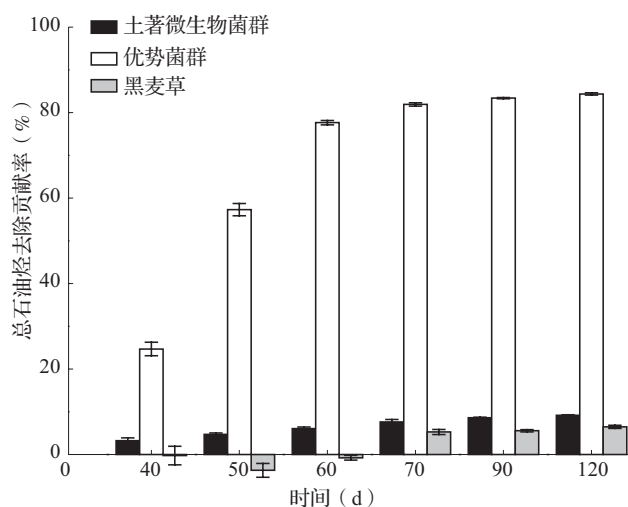


图3 优势菌群与黑麦草对去除污染土壤总石油烃的贡献率比较

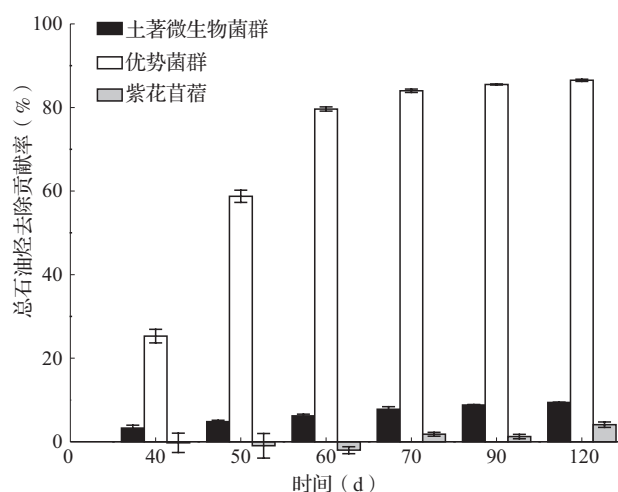


图4 优势菌群与紫花苜蓿对去除污染土壤总石油烃的贡献率比较

### 2.3 联合修复方法修复120 d对污染土壤中石油烃各组分含量的影响

优势菌群与植物联合修复120 d后,土壤C10 ~ C40各组分石油烃含量变化的结果(图5)显示,和修复前土壤中石油烃组分含量相比(t0),PDC-LP、PDC-MS、PDC-NP均对高分子量的C22 ~ C40石油

烃具有较好去除效果,其中 C22 ~ C34 石油烃含量从 2530 mg/kg 分别降低至 207、276、304 mg/kg,去除率分别为 91.81%、89.09%、88.00%; C35 ~ C40 石油烃含量从 1326 mg/kg 分别降低至 73、93、197 mg/kg,去除率分别为 94.49%、92.99%、85.14%。而 CK 组对 C22 ~ C34 和 C35 ~ C40 石油烃的去除率仅分别为 22.83% 和 24.33%。PDC-LP、PDC-MS、PDC-NP 对低分子量的 C10 ~ C12 石油烃去除率均为 100%,但对 C13 ~ C16 石油烃去除率分别仅为 44.44%、42.22%、8.89%,而 C17 ~ C21 石油烃含量不降反升,分别由处理前的 22 mg/kg 增至 40、39、45 mg/kg,增幅分别为 81.82%、77.27%、104.55%。与此同时,CK 组 C13 ~ C16 和 C17 ~ C21 石油烃也出现增加,由处理前的 15、22 mg/kg 分别增至 152、465 mg/kg。

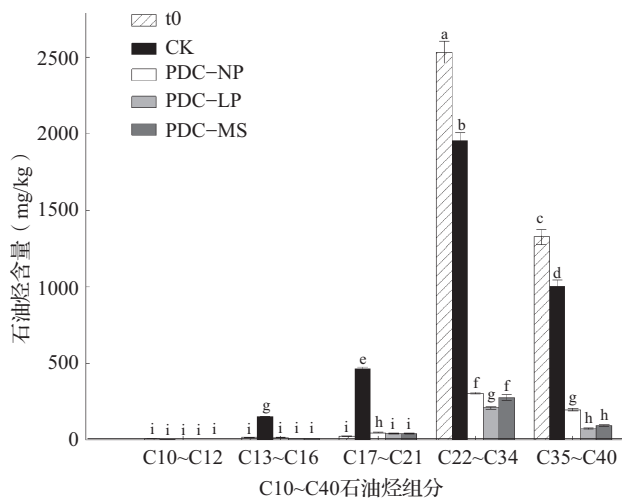


图5 优势菌群与植物联合修复 120 d 对污染土壤中 C10 ~ C40 石油烃各组分含量影响

优势菌群与植物联合修复 120 d 后土壤石油烃各组分含量变化表明: 分子量大且分子结构稳定的石油污染物被微生物降解的难度较大; 低分子量、烷基链分支化程度低的烷烃及单环芳香烃通常易被微生物降解, 而高分子量、烷基链分支

化程度高的烷烃及多环芳烃往往较难被微生物利用<sup>[19-21]</sup>。本研究优势菌群单独使用或与植物联合修复对 C13 ~ C16 石油烃降解率均较低, 同时 C17 ~ C21 石油烃含量不降反升, 是由于微生物对石油烃降解过程中, 高分子量石油烃经过末端或次末端断链过程分子量减小成为中、低分子量组分, 因此, 中、低分子量石油烃在被进一步降解前其含量可能出现阶段性增长<sup>[22-25]</sup>。同时由于低分子量石油烃分解代谢路径较为简单, 往往被微生物优先利用, 因此在本试验中 C13 ~ C16 石油烃的积累效应比 C17 ~ C21 石油烃弱, 该结果表明优势菌群单独使用或与植物联合修复 120 d 时并未达到修复平台期, 随着修复继续进行和中、低分子量石油烃组分的持续降解, 土壤 TPH 含量有望进一步降低。

#### 2.4 联合修复方法修复 120 d 对污染土壤理化性质的影响

优势菌群与植物联合修复 120 d 后, PDC-LP、PDC-MS、PDC-NP 处理土壤 pH 由初始 8.09 降低至 7.51 ~ 7.62 (表 5); 相比 CK 处理, PDC-LP、PDC-MS、PDC-NP 有机质含量分别降低 33.04%、31.47%、19.85%。石油污染普遍使土壤有机质含量增加, 这是由于石油污染使土壤含碳烃类增加, 而有机质是土壤有机碳总量的反应, 但这些含碳烃类物质不能释放出有效养分以供土壤中的生物吸收利用<sup>[26-28]</sup>。修复过程中土壤有机质含量的下降主要由微生物及植物对土壤含碳烃类物质的降解、吸收、转化及其生长代谢对土壤有机质的消耗所造成。此外, PDC-NP 与 CK 相比, 有效磷含量提高 13.27%, 全氮和速效钾含量无显著差异 ( $P>0.05$ ); 种植植物的 PDC-LP、PDC-MS 处理相比未种植植物的 PDC-NP、全氮、有效磷、速效钾含量均有所降低。由此可见, 优势菌群在修复污染土壤过程中, 除可去除土壤中的石油污染物外, 还能够有效

表 5 优势菌群与植物联合修复 120 d 对土壤基本理化性质的影响

| 处理     | pH           | 有机质<br>(g/kg) | 全氮<br>(g/kg) | 有效磷<br>(mg/kg) | 速效钾<br>(mg/kg)  |
|--------|--------------|---------------|--------------|----------------|-----------------|
| CK     | 8.06 ± 0.02a | 20.40 ± 0.32a | 0.70 ± 0.02a | 169.83 ± 8.02b | 355.01 ± 12.00a |
| PDC-NP | 7.57 ± 0.12b | 16.35 ± 0.75b | 0.67 ± 0.04a | 192.37 ± 9.27a | 372.88 ± 18.12a |
| PDC-LP | 7.62 ± 0.17b | 13.66 ± 0.40c | 0.51 ± 0.10b | 158.42 ± 6.59c | 282.75 ± 10.64c |
| PDC-MS | 7.51 ± 0.09b | 13.98 ± 0.81c | 0.60 ± 0.05b | 170.75 ± 3.96b | 318.94 ± 9.91b  |

注: 表中数值为平均值 ± 标准误, 同列数值后不同小写字母表示不同处理间差异显著 ( $P<0.05$ )。

改善土壤 pH, 降低污染土壤对生物生长的胁迫作用, 有利于恢复土壤功能; 同时菌群代谢对土壤全氮和速效钾无明显消耗, 并通过解磷作用提高了土壤有效磷含量, 对恢复土壤肥力有一定作用; 修复过程中, 植物生长虽然对土壤养分有一定消耗, 但修复后土壤有机质、全氮、有效磷和速效钾含量相比背景土壤均大幅提高, 土壤肥力整体得到改善。

### 3 结论

在本试验条件下, 初步可以得出以下结果:

(1) 优势外源石油降解菌群筛选试验结果表明, PDC-3 菌群在 4 种供试外源石油降解菌群中优势最为明显, 可有效去除华北油田雄安新区境内生产作业区中度石油污染土壤中 TPH, 处理 120 d TPH 去除率达 84.07%。

(2) 优势菌群与黑麦草或与紫花苜蓿联合修复中度石油污染土壤均可比单独使用优势菌群修复获得更好效果。优势菌群与黑麦草联用或与紫花苜蓿联用修复 120 d, TPH 去除率分别为 91.58% 和 89.30%, 相比单独使用优势菌群 TPH 去除率分别提高 6.92% 和 4.26%, 修复后土壤 TPH 含量均小于 500 mg/kg, 符合《全国土壤污染状况评价技术规范》(环发[2008]39号)中土壤石油烃总量标准。此外, 选用黑麦草作为联合修复植物, 90 d 时可去除 89.32% 的土壤 TPH, 比使用紫花苜蓿修复效果提高 4.64%, 有利于修复周期的缩短。

(3) 优势菌群与植物联合修复过程中, 优势菌群对去除土壤 TPH 的贡献远高于土著微生物菌群或植物, 120 d 时其贡献率为 84.36% ~ 86.51%, 对土壤 TPH 的去除起主要作用。植物对土壤 TPH 去除的贡献率为 4.09% ~ 6.48%, 且其作用主要发生在修复过程的中后期。

(4) 优势菌群单独使用或与植物联合修复中度石油污染土壤 120 d 后均可有效去除低分子量 C10 ~ C12 石油烃及高分子量 C22 ~ C40 石油烃组分, 去除率为 85.14% ~ 100.00%。在修复过程中, 由于高分子量石油烃组分的末端断链作用, 中分子量 C13 ~ C21 石油烃组分出现阶段性积累效应, 其中 C17 ~ C21 石油烃含量甚至不降反增。随着修复继续进行和中、低分子量石油烃组分的持续降解, 土壤 TPH 含量有望进一步降低。

(5) 使用优势菌群与植物联合修复法对中度石油污染土壤进行生物修复, 可有效改良土壤基本理

化性质, 提升土壤肥力, 有利于修复后土壤功能的恢复, 详细作用有待后续深入研究。

### 参考文献:

- [1] 魏样. 土壤石油污染的危害及现状分析 [J]. 中国资源综合利用, 2020, 38 (4): 120-122.
- [2] 刘五星, 骆永明, 滕应, 等. 我国部分油田土壤及油泥的石油污染初步研究 [J]. 土壤, 2007, 39 (2): 247-251.
- [3] 刘雪松, 蔡五田, 李胜涛. 石油类污染场地土壤与地下水污染调查实例分析 [J]. 水文地质工程地质, 2010, 37 (4): 121-125.
- [4] 任慧. 高浓度石油污染土壤异位-原位联合生物修复技术研究 [D]. 济南: 山东师范大学, 2015.
- [5] Napp A P, Allebrandt S R, Pereira J E S, et al. Scale-up treatment of petroleum hydrocarbon-contaminated soil using a defined microbial consortium [J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2021, 19: 6023-6032.
- [6] 李春荣. 石油污染土壤的生态效应及生物修复研究 [D]. 西安: 长安大学, 2009.
- [7] 何云馨. 不同类型溢油污染潮间带生物修复可行性现场中试研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [8] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验 (第五版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2018.
- [9] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.
- [10] 王娣, 马闯, 高欢, 等. 微生物强化对石油污染土壤的修复特性研究 [J]. 农业环境科学学报, 2020, 39 (12): 2798-2805.
- [11] Cerqueira V S, Hollenbach E B, Maboni F, et al. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28: 1203-1222.
- [12] Ebadi A, Sima N A K, Olamaee M, et al. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium [J]. Journal of Advanced Research, 2017, 8 (6): 627-633.
- [13] Wu M L, Dick W A, Li W, et al. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2016, 107: 158-164.
- [14] Gurska J, Wang W, Gerhardt K E, et al. Three year field test of a plant growth promoting rhizobacteria enhanced phytoremediation system at a land farm for treatment of hydrocarbon waste [J]. Environmental Science and Technology, 2009, 43 (12): 4472-4479.
- [15] 李春荣, 王文科, 曹玉清. 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.
- [16] 刘继朝, 崔岩山, 张燕平, 等. 植物与微生物对石油污染土壤修复的影响 [J]. 生态与农村环境学报, 2009, 25 (2): 80-83.

- [17] 魏祥. 石油污染对土壤性状的影响及植物修复效应研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [18] 李先梅, 肖易, 吴芸紫, 等. 华北油田石油污染土壤的修复植物筛选 [J]. 环境科学与技术, 2015, 38 (6): 14-19.
- [19] Das K, Mukherjee A K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India [J]. Bioresource Technology, 2007, 98 (7): 1339-1345.
- [20] Kanaly R A, Harayama S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182 (8): 2059-2067.
- [21] Zhang Z Z, Hou Z W, Yang C Y, et al. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8 [J]. Bioresource Technology, 2011, 102 (5): 4111-4116.
- [22] Abbasian F, Lockington R, Mallavarapu M, et al. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176 (3): 670-699.
- [23] Meckenstock R U, Boll M, Mouttaki H, et al. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2016, 26 (1-3): 92-118.
- [24] 齐永强, 王红旗, 刘敬奇. 土壤中石油污染物微生物降解及其降解去向 [J]. 中国工程科学, 2003, 5 (8): 70-75.
- [25] Therone-Holst M, Wentzel A, Ellingsen T E, et al. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73 (10): 3327-3332.
- [26] 任芳菲. 石油污染土壤的理化性质和微生物群落功能多样性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [27] 张晓阳, 李凯荣, 张麟君. 陕北石油污染对土壤理化性质的影响 [J]. 水土保持研究, 2013 (3): 32-38.
- [28] 刘五星, 骆永明, 滕应, 等. 石油污染土壤的生态风险评价和生物修复 II. 石油污染土壤的理化性质和微生物生态变化研究 [J]. 土壤学报, 2007, 44 (5): 848-853.

#### Effects of exogenous petroleum degrading microbial consortium and phyto-microbial remediation on medium level petroleum contaminated soil from North China

SUN Jing<sup>1</sup>, CAI Dian-xiong<sup>1, 2\*</sup>, JIANG Guang-yong<sup>1</sup>, REN Hui-zhan<sup>1</sup>, WU Hui-jun<sup>2</sup> (1. Research Center for Applied Biological Technology and Equipment, Tianjin Research Institute for Advanced Equipment, Tsinghua University, Tianjin 300300; 2. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** The remediation effects of petroleum degrading microbial consortium on medium level petroleum contaminated soil from North China was studied through exogenous petroleum degrading microbial consortiums screening and laboratory simulation of phyto-microbial remediation. The results indicated: TPH degrading efficiency of PDC-3 microbial consortium was 84.07%, which was the highest among the four microbial consortiums screened. In the laboratory remediation simulation, after 120 d, PDC-3 phyto-microbial treatments achieved better remediation effects than that of PDC-3 treatment alone. The TPH degrading efficiencies of PDC-3 with *Lolium perenne* L. planting and PDC-3 with *Medicago sativa* L. planting were 91.58% and 89.30% respectively, and the soil TPH were both reduced to lower than 500 mg/kg. Moreover, PDC-3 with *L. perenne* planting reached up to 89.32% TPH degrading efficiency in 90 d, and required shorter remediation period than that of PDC-3 with *M. sativa* planting. Furthermore, PDC-3 was the major factor in soil TPH degrading process, its TPH degrading contribution rate was much higher than that of endogenous microbial consortiums or plants; Plants contributed up to 4.09% ~ 6.48% of the soil TPH degraded, and it functioned mostly in the late stage of the remediation process. Meanwhile, PDC-3 microbial consortium effectively removed 85.14% ~ 100.00% C10 ~ C12 and C22 ~ C40 petroleum hydrocarbons in 120 d when used alone as well as in phyto-microbial remediation. However, the C13 ~ C21 petroleum hydrocarbons showed a temporary accumulation effect. At last, soil pH and fertility were improved during phyto-microbial remediation using PDC-3, which would be important for soil function restoration.

**Key words:** North China; exogenous petroleum degrading microbial consortium; phyto-microbial remediation; medium level petroleum contaminated soil; remediation effects