

# 土壤中石油污染物微生物降解及其降解去向

齐永强, 王红旗, 刘敬奇

(北京师范大学环境科学研究所 环境模拟与污染控制国家重点实验室, 北京 100875)

**[摘要]** 通过多因素对比预实验, 将筛选出的7个石油烃降解的主要影响因素以正交表方法组合起来, 对其进行了实验研究。探讨了石油迁移转化对于各种土壤物理化学条件及其他环境因素改变的敏感程度, 并找出了各主要影响因素的重要性和最佳水平; 测定了土壤中所存在的石油污染物在生物降解作用下的后期产物, 研究了不同条件下的样品残留污染物组分之间的差异。影响土壤中石油烃类降解的主要因素有土壤石油污染强度、营养物 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )、氧化剂 (3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液)、表面活性剂 (TW80)、温度、土壤含水率和土壤透气性; 在降解的不同阶段, 各个因素的重要性以及最佳水平会发生相应的变化; 在生物降解后期, 土壤中残留的石油污染物主要是正构和异构烷烃; 正构烷烃的色谱图由原来的对称钟形变为左陡右缓的偏钟形; 异构烷烃所占比重增大, 正十五烷和正二十一烷之间的谱图基线被明显抬高。

**[关键词]** 土壤; 石油污染物; 微生物降解

**[中图分类号]** TE991.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742 (2003) 08-0070-06

## 1 研究背景

频繁发生的油轮泄漏事件, 以及战争导致的大范围石油污染, 使得石油类污染物的处理在世界范围内受到了普遍的关注。在石油生产、贮运、炼制加工及使用过程中, 由于井喷、泄漏、检修等原因, 都会有石油烃类的溢出和排放, 造成落地石油污染, 这已成为土壤污染的主要原因之一, 科学工作者正在进行广泛研究, 寻求安全、可靠、经济有效的治理方法。

土壤中石油污染的处理方法按其性质可分为3种: 物理方法、化学方法和生物方法。20世纪80年代之前的落地石油治理所使用的主要是物理方法和化学方法, 这两类方法可以产生一定的实效, 但都存在消积处置、费用昂贵或者二次污染严重等明显的缺陷, 现在仅能作为生物治理方法的一些辅助手段。微生物治理方法出现于80年代后期, 它利

用土壤-微生物-污染物系统所固有的物理、化学和生物过程, 使石油类污染物在微生物的新陈代谢循环中得到转化和去除。微生物法具有费用低、效果好、无二次污染的特点, 是我国目前状况下应优先考虑采用的处理方法, 也是世界上许多发达国家正在研究和实践的石油污染土壤的处理方法。

由于微生物降解依靠的是特定菌种的生理过程, 相对于物理和化学方法而言, 它受环境因素影响的程度更大。这些因素包括污染物的性质和浓度、氧气、温度、湿度、土壤物理化学条件等。只有深入探讨石油迁移转化对于各种土壤物理化学条件及其他环境因素改变的敏感程度, 并找出了各主要影响因素的重要性和最佳水平之后, 才有可能探求促进正向作用、抑制负向作用的途径, 为各因素制定适宜的施用时间序列, 以最大限度地加快降解速度。另一方面, 石油中烃组分的种类很多, 已鉴定出的大约有600种烃类, 还有数千种组分无法辨

**[收稿日期]** 2002-08-19; **修回日期** 2003-06-02

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (29777001)

**[作者简介]** 齐永强 (1979-), 男, 山西临汾市人, 北京师范大学硕士

认<sup>[1]</sup>。各种组分的毒性以及环境特性都各不相同，在生物降解作用之后，它们之间的相对含量也会发生变化，所以有必要摸清土壤中所存在的石油污染物在生物降解作用下的最终去向。为此，笔者进行了微生物降解实验。

## 2 微生物降解实验

### 2.1 实验土样及油样

石油污染土样取自大庆油田杏二联合处理站附近某采油井井台周围。土样经碎散、除杂、过筛(1 mm)、混均，密封储存在试料袋内，以备试验使用。实验用油样为杏二联合站经脱水流程处理后的原油。油样经 230℃ 蒸馏以去除易挥发烃类对实验的影响<sup>[2]</sup>，置于棕色试剂瓶中备用。

### 2.2 实验方法

笔者通过对前人研究成果的归纳和总结，以及之前所作预实验的结果，选取了七个有代表性的影响石油烃降解的因素：土壤石油污染强度 (A)、营养物 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (B)、氧化剂 (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液) (C)、表面活性剂 (TW80) (D)、温度 (E)、土壤含水率 (F) 和土壤透气性 (G)\*，并将它们控制在不同的水平，考察不同因素不同水平下油污土壤的生物降解效果，以及各因子间的相互影响和作用，探求降解速度最大化的途径。

采取七因素四水平的正交实验方案表 (表 1)，表中每一列代表要试验的一种条件，各行代表各影响因素的不同水平。其中，A, B, C, D, E, F, G 分别代表受试的七个影响因素；1, 2, 3, 4 代表各受试因素的不同水平，各因素的不同水平如表 2 所示。

表 1 实验设计正交表

Table 1 Experimental designing orthogonal table

样本号	1 <sup>#</sup>	2 <sup>#</sup>	3 <sup>#</sup>	4 <sup>#</sup>	5 <sup>#</sup>	6 <sup>#</sup>	7 <sup>#</sup>	8 <sup>#</sup>	9 <sup>#</sup>	10 <sup>#</sup>	11 <sup>#</sup>	12 <sup>#</sup>	13 <sup>#</sup>	14 <sup>#</sup>	15 <sup>#</sup>	16 <sup>#</sup>
A	1	3	2	4	1	3	2	4	1	3	2	4	1	3	2	4
B	2	4	4	2	3	1	1	3	1	3	3	1	4	2	2	4
C	3	1	3	1	1	3	1	3	4	2	4	2	2	4	2	4
D	2	2	3	3	4	4	1	1	3	3	2	2	1	1	4	4
E	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2
F	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1
G	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2

表 2 各因素的水平列表

Table 2 List of factors' levels

水平数	污染强度 A/ %	营养物 B	氧化剂 C	表面活性剂 D/ %	温度 E	含水率 F/ %	扰动状况 G
1	0	75/0/0	0	0	20℃ 恒温	25	无扰动
2	1	75/1.6/0.6	0.5	0.05	夏季室温	15	3 天翻土 1 次
3	5	75/4/1.5	1	0.1			
4	10	75/8/3	1.5	0.3			

注：表中各因素不同水平划分的标准为：A—加入的原油占原土重的质量百分比；B—油/NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的不同比例；C—每次加入的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液占原土重的质量比 (g/kg·3d)；D—加入的表面活性剂占原土重的质量百分比；E—室温范围为 16—38℃ (北京，7 月 25 日—9 月 3 日)；F—每 3 天加水 1 次以保持含水率不变；G—无扰动指在受试土样在装盆之后相对位置保持不变，取样后的孔隙用原土填满并标记。

分别于第 0, 4, 8, 17, 36, 73 d 提取土样 5 g, 以四氯化碳对其进行浸提，重复浸提 3 次以后

定容，用紫外分光光度法测定土壤样品中石油烃的浓度。在实验进行至第 73 d 时，笔者对这一次采

\* pH 值也是影响石油烃生物降解的重要因素，pH 值太高或太低都会影响微生物的降解能力。但根据魏德洲<sup>[3]</sup>等人的研究，在微生物处理中不加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的情况下，土壤的中性 pH 值在处理过程中会有明显的下降；而在加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的情况下，土壤中的 pH 值却不会发生明显变化。本试验中使用了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为氧化剂，所以没有将 pH 值作为一个单独的影响因子考虑。

集的所有16个样品的土壤浸提液进行了色谱-质谱分析,考察石油污染物在不同环境条件组合下的生物降解程度。

### 3 实验结果与分析

#### 3.1 各降解影响因子重要性及最佳水平分析

图1中的a, b, c, d图依次分别是污染强度在1, 2, 3, 4各水平下土壤样品石油含量的变化过程。

从图1可以明显看出,不同的污染强度下土壤样品在降解时各自遵循不同的模式。对于污染强度1,土壤中的石油污染在所有73 d的实验中持续降解,到了后期基本被完全降解。污染强度2, 3有

相似的降解过程,在降解的前4 d有一个明显的石油量减少过程;之后,一直到36 d进入了一个类似平台期的阶段,降解量较少;从36 d到实验结束的第73 d,土壤样品开始了缓慢的持续降解过程。污染强度最强的4水平下的样品一直到36 d都没有明显的降解过程,直到73 d时石油含量才显示出一些下降的趋势。总体来说,污染强度在5%以内的石油污染在实验所给条件下会呈现明显的降解过程,但如果石油浓度达到了15%高的水平,生物降解作用就很微弱了。为了深入探讨影响生物降解的每种因素所占的权重以及最优配比,有必要对各次提取所得数据进行正交实验分析。

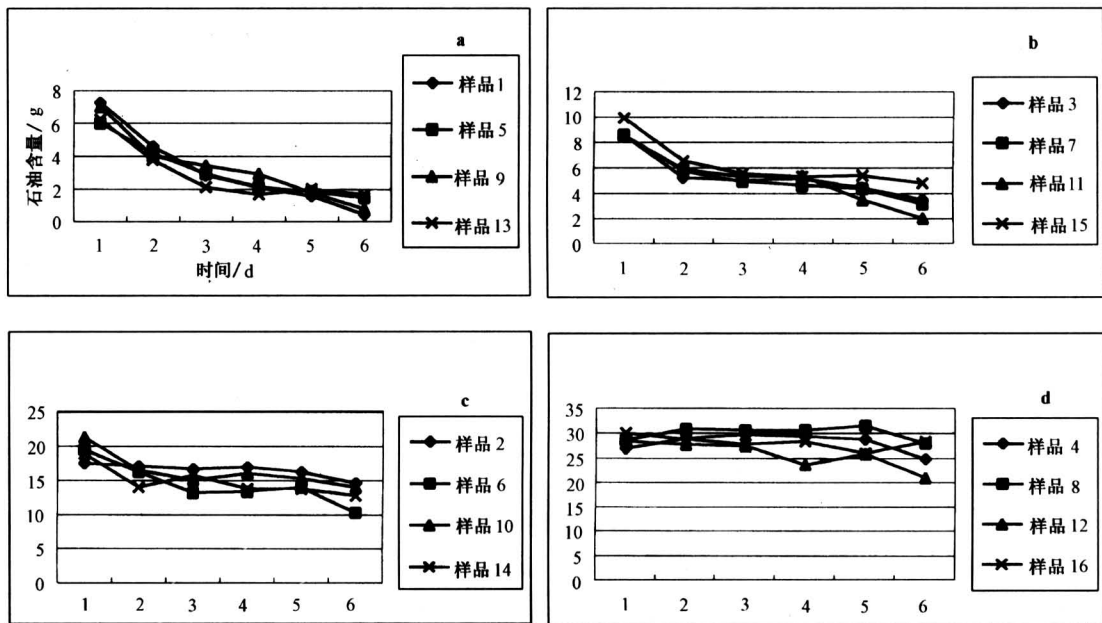


图1 各含油水平样品的含油量减少趋势图

Fig.1 Degradation patterns of the samples at 4 different pollution intensities

使用正交表的方法对实验所得数据进行分析,可以得出所有5个取样时间点上每个因素的极差(重要性程度)以及各自的最佳水平,如图2所示(图中各系列数据之上所标的数字为本因素在5个时间点各自的最佳水平)。

从图2中可以看出73 d的实验时间可以分为3个阶段。以0—8 d, 8—36 d, 36—73 d分别代表实验的早期、中期、晚期3个时间段。在降解的初期阶段,因素A(污染强度)对于油烃的降解产生最主要的影响,其最优施用量为水平3,这说明污染强度的大小对微生物降解石油烃有很大的影响,当石油烃的浓度过高时,就会抑制微生物降解能

力。这有可能是因为一次性加入过多的石油烃会导致大部分微生物因不能适应新的环境而死亡。因素C(氧化剂)在初期的重要程度与因素D(表面活性剂)接近,其最优施用水平为4。强氧化剂 $H_2O_2$ 的加入,一方面必然导致土样中的部分烃类污染物发生氧化降解,另一方面 $H_2O_2$ 的分解可以使土壤中分子氧浓度上升,进而增强好氧微生物的活性,促进石油烃的生物降解。因素D对油烃的降解也具有比较重要的影响,其最优施用水平为3,这有可能是由于表面活性剂能增强有机化合物的亲水性,使原本吸附在土壤胶体上的污染油进入土壤溶液,从而增强了污染油的生物可利用性,使

生物降解速度得到大幅提高，同时由于较多表面活性剂会抑制微生物的生长，反而不利于油烃的降解。West Virginia 大学的 P.P.E. Carriere 等人在研究非离子表面活性剂 Triton x-100 对杂酚油污土

壤微生物降解的影响时也证实了这种抑制效果<sup>[4]</sup>。因素 B（营养物）在这一时期也具有有一定重要性。相比之下，另外三个因素在实验初期的影响比较弱。

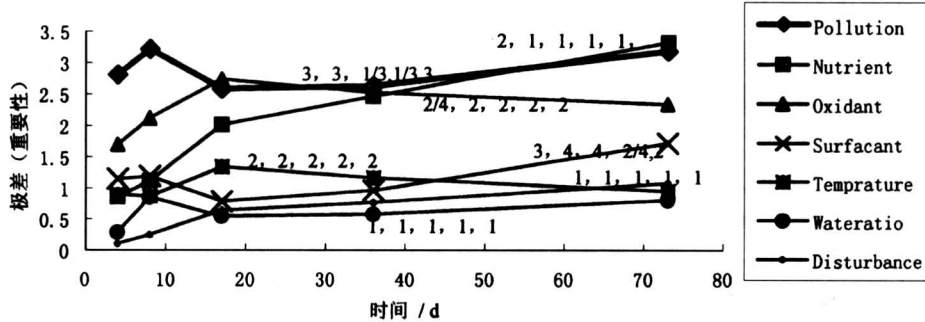


图 2 各因素对降解量的影响随时间变化图

Fig.2 The importance and optimal levels of the factors

实验中、后期各因素的重要性都发生了一些变化。因素 A（污染强度）的显著性逐渐被营养物取代，但是最优水平基本保持在 3，这是因为向原土中加入过多石油可能会致死相当数量的微生物，从而使参加降解活动的微生物总量减少，造成降解率偏低的现象。但当石油浓度不太高时，能够存活的微生物数量较多，并且随着时间的推移，这部分微生物逐渐适应新的环境，利用已有的营养源生长繁殖，从而使具有降解油烃功能的微生物总量增加，降解速度明显加快。据 Dibble 等人的研究<sup>[5]</sup>，当向土壤中添加油泥使土壤中烃浓度达到 1.2 % ~ 1.5 % 时，土壤的呼吸强度增大，当浓度达到 10% 时，土壤的呼吸强度继续增大，但当烃浓度达到 15 % 时，土壤的呼吸强度则开始下降，表明油

污浓度太高会抑制微生物的活性，即在适宜于微生物生命活动的油污浓度范围内，土壤中的油烃量增加有利于增强微生物对污染油的降解。但是如果油烃浓度过高，又会抑制生物活性。

### 3.2 土壤中石油烃降解后期产物组分分析

为了摸清土壤中所存在的石油污染物在生物降解作用下的最终产物，在实验进行至第 73 d 时，笔者对这一次采集的所有 16 个样品的土壤浸提液进行了色谱-质谱分析，探求在长时间的生物降解之后，不同条件下的样品残留污染物组分之间的差异。图 3 是一张比较典型的未降解时与降解后期土壤浸提液的色谱对比图。

从图 3 可以看出，土壤石油烃类生物降解存在三个明显的特点：一是短链烷烃的降解优先于长链

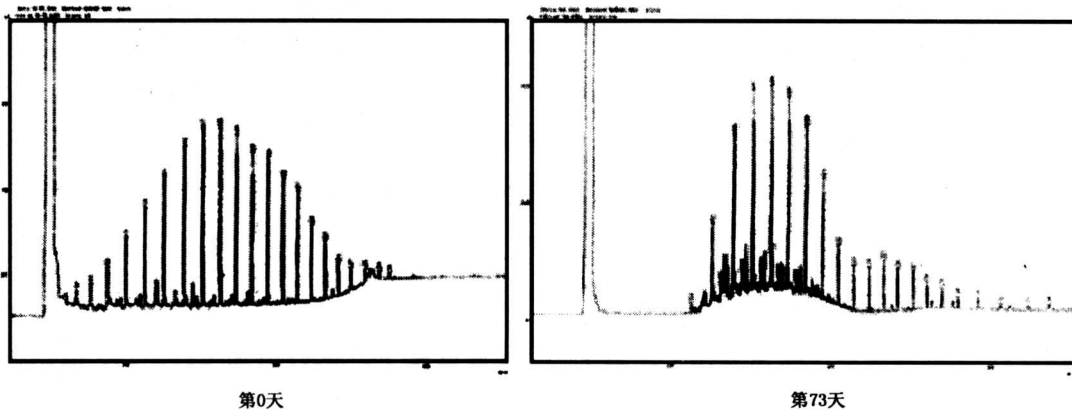


图 3 9 号样品第 0 天与降解至 73 天时土壤提取液的色谱对比图

Fig.3 The chromatograms of 9<sup>#</sup> sample on the initial day and the 73rd day

烷烃的降解, 所以钟形左部的降解比右部明显得多; 二是正构烷烃的降解优先于支链烷烃的降解, 所以降解后期支链烷烃在浸提液样品中相对比降解初期有了明显的增加 (经过质谱定性, 图中各正构烷烃峰中间夹杂的小峰全部是异构烷烃); 三是在 C15 和 C21 之间, 谱图基线被明显抬高, 这是由于异构烷烃的种类过多而且含量都不很高, 造成了即使用毛细柱程序升温也无法将它们全部分离开来, 以致于多数异构烷烃混合出峰, 抬高了基线。这些异构烷烃来自何处呢? 笔者认为, 首先是因为正构烷烃降解速度较快, 使异构烷烃的相对数量提高; 其次是因为更高分子量的支链烷烃经过末端断链或次末端断链过程, 分子量减小, 造成这些被降解了的支链烷烃沸点降低, 与原先存在于 C15 和 C21 之间的异构烷烃混合出峰。

其余的样品与图 3 所示的形状相似, 但各有不同点。为了更好地分析样品组分之间的差异, 对各个样品的色谱图形进行了量化。具体方法如下:

1) 将正构烷烃分成若干组, 各代表不同碳数段烷烃的降解情况。

2) 计算各正构烷烃的峰面积与样品所有峰总面积的比值, 作为此烷烃的相对峰面积。

3) 将各组烷烃的相对峰面积相加, 作为表征此组烷烃含量的标准。

根据上述方法进行统计, 可以得出如图 4 所示的结果。图 4 中的 Pr 指的是姥鲛烷 (2, 6, 10, 14-四甲基十五烷), Ph 指的是植烷 (2, 6, 10, 14-四甲基十六烷), 这两种异构烷烃都是生物降解评估中常用的标志物, 从前面的质谱分析中可以看出这两种烃的含量在油样中是比较高的。

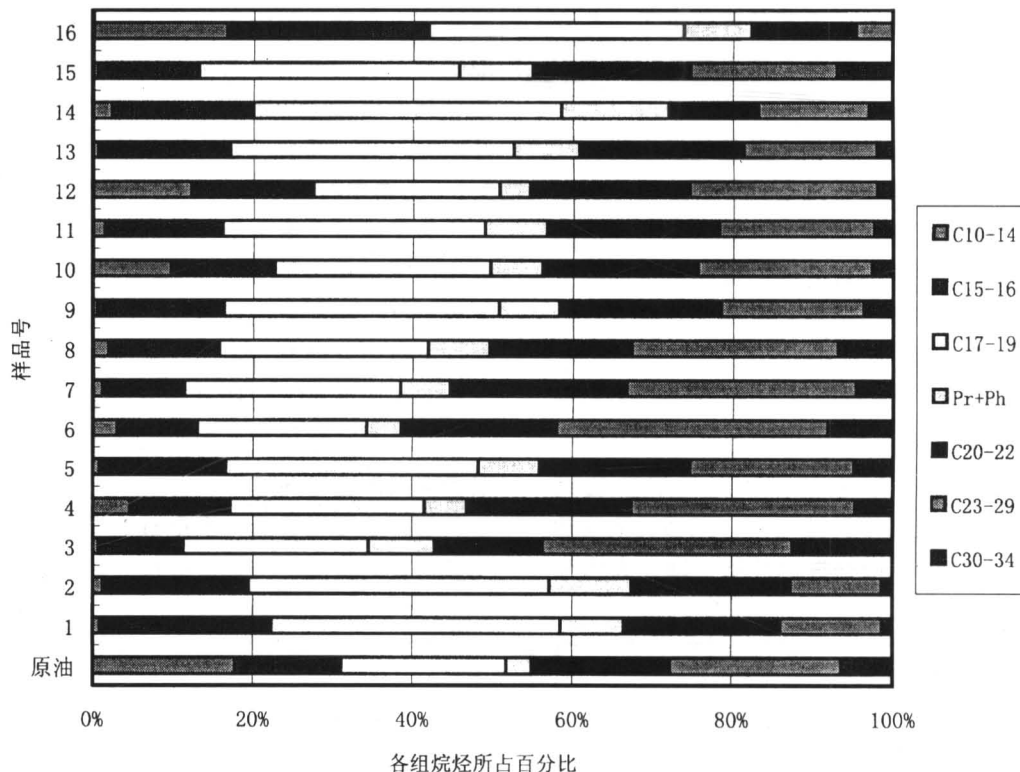


图 4 生物降解后期正构烷烃百分比分组统计图

Fig.4 Statistic graph of n-alkanes's relative content at late phase of the degradation

C10—C14 基本上被完全降解, 只有在污染强度最高 (10%), 生物降解不太明显的几个样品中较大量地存在。但总体来说这一碳数段的烷烃还是最容易降解的; C17—C19 在几乎所有的样品中都变成了占最大比重的成分, 这一方面是由于 C17—C19 本身就是占烃类比重最大的组分; 另一方面碳

数在 20 以上的烷烃通过末端断链或次末端断链从而碳数减少, 也会增加 C17—C19 区间的烷烃含量, 从而使它们的相对含量升高; Pr 和 Ph 在降解后期相对含量普遍升高, 这说明了异构烷烃的降解要慢于正构烷烃, 造成其相对含量增加; 与原油的图谱相比, 各样品在 73 d 的图谱普遍有左移, 这

从另一侧面也说明了低碳数的烷烃较高碳数的烷烃更容易降解。同时，这一左移现象也与色谱图中形成的左陡右缓的偏钟形图谱相符合。

由图 4 可以看出，经过 73 d 的生物降解，土壤石油烃类的组分发生了很大的变化。

#### 4 结果与讨论

本研究通过室内可控条件下的土壤落地石油污染模拟实验，得出了以下结论：

1) 使用微生物法可以有效降解土壤中存在的石油污染。

2) 诸多因素同时控制着石油烃的降解过程，其中比较重要的因素包括污染强度、营养物质、氧化剂、表面活性剂、温度、湿度、土壤扰动状况。在降解的不同阶段，各个因素的重要性以及最佳水平会发生变化。

3) 在生物降解后期，土壤中残留的石油污染

物主要是正构和异构烷烃。正构烷烃的色谱图由原来的对称钟形变为左陡右缓的偏钟形；异构烷烃所占比重增大，C15 和 C21 之间的谱图基线被明显抬高。

#### 参考文献

- [1] 亨特 J M. 石油地球化学和地质学 [M]. 胡伯良译. 北京：石油工业出版社，1986. 18~22
- [2] Dutta T K, Harayams S. Fate of crude oil by the combination of Photooxidation and biodegradation [J]. Environ Sci Technol, 2000, 34: 1 500~1 505
- [3] 魏德洲, 秦煜民.  $H_2O_2$  在石油污染土壤微生物治理过程中的作用 [J]. 中国环境科学, 1997, 17 (5): 429~432
- [4] Carriere P P E, Mesania A. Enhanced biodegradation of creosote-contaminated soil [M]. Waste Management, 1995. 579~583
- [5] 金文标, 宋莉晖, 董晓利, 等. 油污土壤微生物治理的影响因素 [J]. 环境保护, 1998, (10): 27~28

## A Research on the Bioremediation and the Fate of Oil Pollutant in Soil

Qi Yongqiang, Wang Hongqi, Liu Jingqi

(State Key Laboratory of Water Environment Simulation, Institute of Environmental Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

[Abstract] Bioremediation is now a promising way to treat oil-polluted soil. In this paper, the author arranged the 7 main factors influencing the bioremediation found in former experiments on 16 samples with the help of orthogonal table and performed a series of experiments. The relative weights and optimal levels of these factors are found; the fates of different components in oil during the late phase of the bioremediation are studied; the structure differences among the residues are analyzed. The 7 factors influencing the bioremediation of oil-polluted soil are: pollution intensity, nutrients ( $NH_4NO_3$ ,  $K_2HPO_4$ ), oxidant (3%  $H_2O_2$  Solution), surfactant (TW80), temperature, water ratio and soil disturbance. The weights and optimal levels of factors can change during different phases of the bioremediation. In the late phase of the bioremediation, the main residues of oil pollutant are n-alkanes and isomeric alkanes. The spectrogram of n-alkanes changes from a symmetrical bell shape to an unsymmetrical bell shape. The proportion of isomeric alkanes increases and the base line from C15 to C21 is driven up.

[Key words] soil; oil pollution; bioremediation