

中原石油污染土壤原位微生物生态修复技术的应用

张胜 陈立 李政红 张翠云 殷密英 马琳娜 何泽 孙振华 张发旺*

(中国地质科学院水文地质环境地质研究所 河北 正定 050803)

摘要: 利用优化原位土著微生物菌群辅以物理和化学相结合的生态修复技术,进行了河南中原油田石油残留污染土壤的野外修复应用研究。修复结果显示,土壤中残留石油含量平均在2 898.25 mg/kg时,经过99 d微生物生态修复技术的实施,土壤中石油含量降解可达99%以上,为油田区土壤石油残留污染的修复提供了技术方法和推广应用的可行性研究。

关键词: 石油残留污染, 土壤, 原位, 微生物生态修复

Application research of microbial and ecological remediation for oil contaminated soil in Central Plains

ZHANG Sheng CHEN Li LI Zheng-Hong ZHANG Cui-Yun YIN Mi-Ying
MA Lin-Na HE Ze SUN Zhen-Hua ZHANG Fa-Wang*

(Institute of Hydrogeology and Environmental Geology, CAGS, Zhengding, Hebei 050803, China)

Abstract: The field remediation of the oil residue pollution in soil were carried out in Zhongyuan Oil Field, which using the optimistic techniques of in-situ microbial communities combining with the physical and chemistrial methods. The results showed that degradation rate can reach 99% as the oil content of 2 898.25 mg/kg in polluted soil after 99 d microbial and ecological remediation, which provide us the feasible technology and application of oil residue pollution remediation in soil at oilfields.

Keywords: Oil residual contamination, Soil, In-situ, Microbial and ecological remediation

人们对石油产品的大量需求,以及石油工业的迅速发展,使得油田开发造成的土壤污染不可避免。石油污染土壤不仅会破坏其结构、改变其物理化学性质,而且会影响作物的产量和品质,石油中

的多环芳烃具有致癌、致畸、致突变等作用,并能通过食物链在动植物体内逐级富集,危害人类的健康和生命。因此,修复已被污染的土壤,保障人类健康,已引起各国政府及环境学家的广泛关注,成为

当前国内外环保研究的热点。河南中原地区由于石油资源的长期大量开采利用,产生了一些环境问题。尤其是落地原油的污染已影响土壤的质量安全,特别是开采早期形成的石油污染,在土壤中经长期的自然降解,许多易挥发和易降解的组分均已降解,土壤中残留的难降解石油组分仍大量存在,且危害性更大,土壤石油污染的防治研究工作已受到人们的广泛重视。Jorgensen 的试验显示,经生物堆埋,石油污染的土壤中石油可降低 71%^[1]。微生物修复技术主要机理是石油烃直接参与了微生物的生化反应,通过代谢作用降解土壤中的污染物^[2]。土壤微生物修复技术的开发与研究已受到国内外学者的广泛关注^[3-14]。目前已知能降解石油中各种烃类的微生物共有约 100 余属 200 多种,它们分属于细菌、放线菌、霉菌、酵母以及藻类^[15]。本文利用优化土著微生物菌群辅以物理和化学方法相结合的微生物生态综合修复技术,对土壤中长期残留石油污染进行降解修复实验与应用,取得了一些效果。该方法具有处理方法简单、费用低、修复效果好、对环境影响小、无二次污染、可原位治理等优点。因此,本研究为该技术的推广应用提供了技术支撑,具有重要的实际意义。

1 修复区污染概况

河南中原油田濮阳市胡状乡修复区是属于中原油田第五采油场,该采油场是于上世纪 70 年代初开发的,已有近 40 年的开采历史,造成当地大量的土壤污染。我们选择的修复区土壤石油污染状况,为 1991 年因输油管线爆裂油层高盐水和原油严重污染的土壤,当时漏出原油和高盐油层水约 300-500 m³,被灌农田十余亩,灌入深度平均>30 cm,油管处深 2 m 左右,被污染后土地一直不能耕种。该处为中原油田石油污染土壤最为严重的典型区,治理难度很大。因此作为我们此次微生物生态修复场地有较好的代表性。

2009 年 6 月 26 日开始对修复区进行基本数据的采取。2009 年 7 月 4 日对修复区进行修复施工,我们选择污染区以输油管爆裂处为中心,长、宽为

50 m×45 m, 3 亩多地进行修复。首先将修复区进行平整与分区,共分为 5 个不同修复条件的小区,各小区面积为 0.5-1 亩左右不等。1 区为微生物生态修复区,约 1 亩;2 区为微生物与苜蓿草混合修复区,约 0.5 亩;3 区为微生物与黑麦草混合修复区,约 0.5 亩;4 区为苜蓿草加营养液修复区,约 0.6 亩;5 区为黑麦草加营养液修复区,约 0.6 亩等。修复设计深度 0-25 cm 最后检测至 50 cm。因篇幅所限本文仅讨论 1 小区的修复结果。

修复区基本数据的采取:先取得修复区表层土壤,土壤岩性为土黄色粉土土壤,土中含有少量 2 mm-10 mm 的小砾石或小姜石,土壤湿容重为 1.72 g/cm³;自然含水量为 16.3%;pH 为 7.4;含盐量为 1 243-18 650 mg/kg,表层土壤本底石油含量为 767.7-5 028.8 mg/kg,平均为 2 898.25 mg/kg;土壤下部 25 cm-50 cm,石油含量为 313.6 mg/kg。pH 为 8.5;含盐量为 1 243 mg/kg。

2 修复材料和方法

2.1 修复用材料

化学试剂: MgSO₄·7H₂O、NH₄NO₃、CaCl₂、FeCl₃、KH₂PO₄、K₂HPO₄、KCl、(NH₄)₂SO₄、CaCO₃、NaCl、可溶性淀粉、蔗糖、乳酸、盐酸、酵母膏、牛肉膏、乙酸钠、琼脂、液体石蜡、石油醚、三氯甲烷等均为分析纯。

其他实验材料:新鲜马铃薯、河南中原石油残留污染土样等。

添加剂:麦糠。

化肥:尿素、硝酸磷钾复合肥等。

室内实验用土壤样品采自河南中原油田修复区石油污染的土壤。

实验用玻璃器皿:150、250 mL 具塞三角瓶,125、1 000 mL 磨口细口试剂瓶,各种不同类型的细菌培养试管、培养皿、橡胶塞等等。

主要仪器:QZD-1 型电磁振荡器、KQ218 超声波清洗器、生物恒温培养箱、高速离心机、高压蒸汽灭菌器、无菌实验室、生化培养箱、HZ150L 恒温摇床培养箱、奥林巴斯生物显微镜、岛津 UV-2250

分光光度计、电热干燥箱及各种化学分析用玻璃仪器。

2.2 测试方法

石油分析测试方法: 为国标 GB/T5750.7-2006 中介绍的紫外分光光度法。

降解石油微生物培养优选方法: 土壤微生物细菌培养用《土壤微生物研究法》^[16], 及参考文献 [17-19] 介绍的方法, 细菌初步鉴定用《常见细菌系统鉴定手册》^[20] 中的方法。

2.3 修复步骤

2.3.1 石油降解菌的分离与优选: 自然界的物质循环中微生物的生化作用是非常重要的一环, 碳的循环也不例外。许多微生物就是碳循环的主要驱动因子之一, 机理就是在微生物的作用下, 将碳氢化合物降解为 CO_2 和 H_2O 的整个过程, 也是自然界对石油污染的自净功能的生态效应, 对土壤环境保护具有一定的实际意义。据此我们用微生物的选择性培养基和富集培养基, 对中原油田修复区石油残留污染土壤的样品进行菌种、菌群的培养分离, 选择优化出实验用降解土壤残油的菌种、菌群。本次试验选择优化出的微生物初步鉴定主要为: 假单胞菌属、微球菌属、放线菌属、真菌类(毛霉、曲霉)等菌群。

2.3.2 土壤残油污染降解实验步骤: 根据上述实验选出的降解残油污染的优势菌群, 利用不同的培养基对所选出的各类菌群进行放大培养。各类菌群培养 3-5 d 后进行混合培养, 继续培养 5-7 d 后做相应的石油烃降解实验。在室内进行模拟不同含量条件下土壤残油污染的微生态修复实验。实验完成后将优化的菌群进行放大培养, 根据野外具体需要量培养。

3 野外修复步骤

(1) 将待修复场地平整好, 将添加剂按每亩麦糠 700 kg 左右, 约 1 kg/m^2 , 均匀撒入整个修复区, 经拖拉机多次翻耕旋耕使加入的添加剂均匀混入修复层中。(2) 将准备好的接种菌液制剂和营养液, 按各小区的不同修复条件设计要求, 用喷雾器将

菌液按每亩 50 L 均匀喷入。配制营养液, 营养液的主要成分: MgSO_4 、 NH_4NO_3 、 CaCl_2 、 FeCl_3 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 。营养液也是相同量均匀喷入。(3) 整个修复区均匀撒入化肥尿素 80 kg/亩和硝酸磷钾 50 kg/亩。(4) 再次用拖拉机多次旋耕使加入的麦糠、菌液、营养液、化肥等均匀混入修复层中。(5) 将修复区的 60% 面积加盖农用塑料薄膜用于保温、保湿、防雨等。因刚刚降过 30 mm 左右的雨, 土壤含水量较大, 则没有浇水, 另一方面该修复区周边没有灌溉用井。

修复区土壤含水量保持自然。在一定时间间隔取样, 取样方法是在修复区以梅花状取 5 个不同点的同一深度土样, 而后充分混合后 4 分法取样测试。测试成分为: 石油量、pH、土壤易溶盐、含水量、 NH_4^+ 、 NO_3^- 等; 同时监测地表及试验土壤温度。试验期完成后分别对各区试验层下部分层取样。

4 原位微生物生态修复效果

4.1 修复区修复效果

通过上述对石油残油污染修复区微生物生态技术修复的实施, 将修复区又分为无膜覆盖区和覆膜区。修复一定时间间隔取样, 经历了 99 d 的采样监测, 取样方法是在无膜和覆膜区各以梅花状取 5 个不同点的同一深度土样(15 cm), 而后充分混合后四分法取样测试。测试成分为: 石油量、pH、土壤易溶盐、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、降解菌数、细菌总数等。修复期完成后分别对各区试验层下部分层取样。测试结果见表 1-4。

4.2 微生物生态修复土壤中石油的去除率

由表 1、2 可知, 通过野外现场的上述修复, 可以了解微生物生态修复技术, 在土壤石油污染原位修复具有较好的实效性。从表 2 可见, 修复区在加入优化菌液和各种营养元素及添加剂后, 总的来看土壤中石油残油的去除率为 85% 以上, 修复至 99 d 时则去除率达 99.37%。但是, 从数据上看, 覆膜和没覆膜的修复效果有一定的差异, 覆盖膜的去除率慢了一些, 这是因为覆膜后膜阻隔了空气中的氧气进入土壤, 有碍于微生物氧化土壤中石油, 减缓了

表1 修复区土壤中石油含量随时间变化测试结果

Table 1 Test results of oil contents varying with time in the soil of repaired region (mg/kg)

取样日期(月/日) Sampling date (month/day)	6/26	7/7	7/15	7/23	8/3	8/11	8/19	9/2	9/22	10/15
修复天数 Time (d)	0	3	10	18	28	36	44	56	76	99
本底值 Background value										
无膜区 Without film area	2 898.25	119.22	206.15	79.44	77.68	26.06	55.55	306.91	95.71	18.36
覆膜区 Film coating area	2 898.25	212.50	233.57	118.98	384.36	211.91	486.56	-	391.40	18.36

注: - : 无测试数据.

Note: - : None of test data.

表2 修复区土壤中石油随时间的去除率

Table 2 Test results of oil removal rate varying with time in the soil of repaired region (%)

取样日期(月/日) Sampling date (month/day)	6/26	7/7	7/15	7/23	8/3	8/11	8/19	9/2	9/22	10/15
修复天数 Time (d)	0	3	10	18	28	36	44	56	76	99
本底值 Background value										
无膜区 Without film area	0	95.89	92.89	97.25	94.64	99.10	98.08	89.41	96.70	99.37
覆膜区 Film coating area	0	92.76	91.94	95.89	86.74	92.69	83.21	-	86.49	99.37

注: - : 无测试数据.

Note: - : None of test data.

其去除率。因此,今后大面积修复时只要环境(如:温度、湿度等)条件许可可不必覆膜。另外,从数据上也可看出土壤中石油残油的不均一性和团块状,使取得的数据有些异常值,说明在修复过程中短时间内土壤中石油团块降解是相对缓慢的。但整体来说微生物对土壤中石油残油的降解修复效果还是显著的。

4.3 土壤 pH、含水量、易溶盐(TDS)、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 、降解菌数、细菌总数含量分析

环境的 pH 对微生物的生命活动有一定影响,它可引起细胞膜电荷的变化,影响微生物对营养物质的吸收及酶的活性,并使环境中营养物质的可利用性和有害物质的毒性改变。每一种微生物的生存都有一定的 pH 值范围和最适 pH 值。大多数细菌的最适 pH 值为 6.5-7.5,放线菌为 7.5-8.0,真菌可以在广泛的 pH 范围内生长发育,如 pH 值在 3.0 以下 9.0 以上仍能生长,最适在 5.0-6.0。由表 3 的 pH 值监测可知,加入的营养液中含有较多的磷酸盐,因而使土壤中加入了一定量的磷酸盐缓冲剂,使 pH 值保持在 7.0-8.2,大多在 7.5 左右,而大部分石油降解菌最适环境为中偏碱性。在此 pH 值范围内对此次修复影响不大,加入的磷酸盐主要是为微生物的生长增加营养元素。

水是细胞生存不可少的物质,也是微生物对石油污染物降解过程中的重要介质和氧的来源。因此在修复区要使土壤保证需要的水量,一般应保持在 20%左右,我们选择的修复时间段刚好为当地的雨季,有一定的降水补给,调控了修复区土壤含水量,促进了微生物对石油残油的降解作用。

营养元素参与微生物细胞组成、构成酶的活性成分、物质运输系统,以及提供生理活动所需的能量。微生物细胞的组成主要元素是 C、H、O、N、P 等,其中 C、H 来自有机物如石油污染物。氧来自水和空气及其他调控的氧源。而氮和磷及 S、K、Ca、Mg、Fe 微量元素等作为营养物质需要进行补充和调控。因此我们对修复区土壤进行了 N、P、S、K、Ca、Mg、Fe 等元素的补充和调控,并利用当地麦糠作为添加剂补充其它生物素和营养盐,而且麦糠对土壤进行了改良使土壤蓬松透气,增高土壤的含氧量等作用。表 3 为各区易溶盐、 NH_4^+ 、 NO_3^- 含量随试验过程的变化,从中可见修复区于 7 月 5 日补充了各种营养元素,反映出随修复进程微生物将石油和各类元素利用、降解、转化的过程。表中显示微生物的活动强度也是随着添加营养的增高而活性强度增大,该过程验证了本次试验调控添加的营养元素比较适度,石油降解的效果显著。

4.4 修复过程对下层土壤的影响

表 4 是修复完成后对修复区下部 50 cm 深度进行的石油、pH、含水量、易溶盐(TDS)、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 、降解菌数、细菌总数含量测试。从测试结果可见修复区修复层的下部土壤石油含量并没有明显的增加,与初始相同深度土壤残油含量的 21.4 mg/kg 对比变化不大。覆膜的还有些降低,说明修复层土

壤中石油没有向下扩散均被降解。从 pH、易溶盐、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 、降解菌数、细菌总数含量也可看出变化不是很大,也就是说氮、磷等易溶盐营养物质只有极少部分随水而进入下部土层,降解菌数和细菌总数也少于上层土壤。该结果为今后此类修复工作对易溶营养的要求和添加方法具有重要的意义。

表 3 修复区土壤 pH、易溶盐、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 、降解菌数、细菌总数含量随时间变化测试结果

Table 3 The test results of pH, TDS, NH_4^+ , NO_3^- , Cl^- , degrading bacterial count and total bacterial count varying with time in the soil of repaired region

取样日期(月/日) Sampling date (month/day)	6/26	7/7	7/15	7/23	8/3	8/11	8/19	9/2	9/22	10/15
修复天数 Time (d)	0	3	10	18	28	36	44	56	76	99
本底值 Background value										
无膜区 pH Without film area pH	7.4	7.8	7.4	7.5	7.1	7.3	8.2	7.3	7.8	7.2
易溶盐 TDS (mg/kg)	18 650	1 825	382	497	218	965	153	360	48	1 705
NH_4^+ (mg/kg)	56.74	364.07	49.65	46.10	153.72	150.96	55.51	60.57	69.71	9.18
NO_3^- (mg/kg)	28.14	27.13	29.14	15.81	116.81	168.03	126.49	114.14	184.02	99.44
Cl^- (mg/kg)	2 548.40	3 729.30	932.30	932.33	1 771.40	1 678.20	279.70	2 797.00	932.30	2 797.00
降解菌数 Degrading bacterial count (CFU/g)	2.5×10^7	1.1×10^7	8.5×10^5	2.6×10^6	8.0×10^5	8.8×10^5	2.1×10^6	2.1×10^5	3.2×10^5	3.0×10^5
细菌总数 Total bacterial count (CFU/g)	1.5×10^6	4.3×10^7	1.1×10^7	2.6×10^6	6.5×10^6	1.3×10^6	5.9×10^6	3.3×10^6	2.0×10^6	8.0×10^5
覆膜区 pH Film coating area pH	7.4	7.5	8.2	7.7	7.0	7.3	7.5	7.7	7.4	7.5
易溶盐 TDS (mg/kg)	18 650	1 926	219	1 141	1 436	1 448	1 509	46	587	127
NH_4^+ (mg/kg)	56.74	216.78	313.24	52.01	401.64	95.87	51.75	31.97	80.60	9.18
NO_3^- (mg/kg)	28.14	28.14	8.20	21.60	497.90	49.62	79.68	62.20	132.41	75.37
Cl^- (mg/kg)	2 548.4	6 526.3	559.4	2 237.6	6 153.4	6 060.1	3 822.5	1 118.0	559.4	745.8
降解菌数 Degrading bacterial count (CFU/g)	2.5×10^7	9.5×10^5	8.5×10^5	7.2×10^6	3.0×10^5	2.4×10^5	2.1×10^5	2.1×10^4	5.0×10^4	5.0×10^4
细菌总数 Total bacterial count (CFU/g)	1.5×10^6	2.2×10^6	4.0×10^6	7.2×10^6	3.0×10^6	5.5×10^5	2.2×10^6	1.9×10^6	1.9×10^6	5.0×10^5

表 4 修复后修复区下部 50 cm 土壤中石油、pH、易溶盐(TDS)、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 、降解菌数、细菌总数含量测试结果

Table 4 The test results of oil count, pH, TDS, NH_4^+ , NO_3^- , Cl^- , degrading bacterial count and total bacterial count with time in the 50 cm-deep soil of repaired region after remediation

修复区下部(深 50 cm) Low position of repaired region (50 cm-deep)	石油 Oil (mg/kg)	pH	易溶盐 TDS (mg/kg)	NH_4^+ (mg/kg)	NO_3^- (mg/kg)	Cl^- (mg/kg)	降解菌数 Degrading bacterial count (CFU/g)	降解菌数 Total bacterial count (CFU/g)
无膜区 Without film area	29.36	7.5	1 331	14.00	31.23	932.33	4.5×10^3	2.7×10^5
有膜区 Film coating area	18.36	7.2	805	9.18	19.19	745.87	4.5×10^3	1.3×10^5

5 结论

从整个修复过程和方法上可得出如下主要结论:通过对石油开采区输油管线爆裂油层高盐水和原油严重污染的土壤的原位微生物生态修复技术方法的实施应用,利用强化原位微生物菌群辅以物理和化学方法与土壤环境相结合的微生物生态技术。对修复区土壤营养元素、土壤环境因子改善等的调控,如:添加剂麦糠按约 1 kg/m^2 ,菌液、营养液按每亩 50 L 均匀喷入,均匀撒入尿素 80 kg/亩 和硝酸磷钾 50 kg/亩 。修复结果显示,土壤中修复初期平均石油含量在 $2\ 898.25 \text{ mg/kg}$ 时,经过 99 d 原位微生物修复,土壤中石油含量降解可达 99% 。整体来说修复效果是显著的,验证了土壤微生物生态修复技术在中原油田土壤石油残油污染修复的有效性,探索了推广应用的可行性。也验证了本次试验调控添加的营养元素、添加剂和对土壤环境的改善是比较适度的,方法是可行的。具有处理方法简单、费用低、修复效果好、对环境影响小、无二次污染、可原位修复等优点,具有较好的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Jørgensen KS, Puustinen J, Suortti AM. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles[J]. *Environmental Pollution*, 2000, 107(2): 245–254.
- [2] de Bont JAM. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis[J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16(12): 493–499.
- [3] Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, et al. In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium[J]. *Current Microbiology*, 2001, 43(5): 328–335.
- [4] Gallego JLR, Loredó J, Llamas JF, et al. Bioremediation of diesel-contaminated soil: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation[J]. *Biodegradation*, 2001, 12(5): 325–335.
- [5] Widdel F, Rabus R, Kube M, et al. The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1[J]. *Archives of Microbiology*, 2005, 183(1): 27–36.
- [6] Tazaki K, Asada R, Kogure K, et al. Bioremediation of coastal areas 5 years after the *Nakhodka* oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2004, 30(7): 911–922.
- [7] Wang JL, Zhao X, Wu WZ. Biodegradation of phthalic acid esters (PAEs) in soil bioaugmented with acclimated activated sludge[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(12): 1837–1841.
- [8] Ghazali FM, Rahman RNZA, Salleh AB, et al. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2004, 54(1): 61–67.
- [9] 杨雪莲, 李凤梅, 刘婉婷, 等. 高效石油降解菌的筛选及其降解特性[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(1): 230–233.
- [10] 姚治华, 王红旗, 刘敬奇, 等. 石油污染土壤中苯降解菌的筛选及降解特性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(6): 1498–1503.
- [11] 郑金秀, 彭祺, 张甲耀, 等. 优势降解菌群生物强化修复石油污染土壤[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(5): 1212–1216.
- [12] 马宏瑞, 赵敏, 张景飞. 假单胞菌 DS-III的脱氢酶活性与石油烃降解动力学特性[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(2): 559–562.
- [13] 张胜, 陈立, 张发旺, 等. 西北黄土区石油污染土壤原位微生物生态修复试验研究[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(5): 765–771.
- [14] 张胜, 毕二平, 陈立, 等. 微生物修复石油污染地下水的实验研究[J]. *现代地质*, 2009, 23(1): 120–124.
- [15] 沈铁孟, 黄国强, 李凌, 等. 石油污染土壤的原位修复技术[J]. *环境科学动态*, 2002(3): 13–15.
- [16] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 1–353.
- [17] 林力, 杨惠芳, 贾晋芬. 石油污染土壤的生物整治研究[J]. *上海环境科学*, 2000, 19(7): 325–329.
- [18] 张海荣, 李培军, 孙铁珩, 等. 四种石油污染土壤生物修复技术研究[J]. *农业环境保护*, 2001, 20(2): 78–80.
- [19] 何翊, 吴海, 魏薇. 石油污染土壤菌剂修复技术研究[J]. *土壤*, 2005, 37(3): 338–340.
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.