

石油烃类污染物降解动力学和微生物群落多样性分析

甄丽莎^{1,2}, 谷洁^{1,3*}, 胡婷², 刘晨², 贾凤安², 吕睿²

(1. 西北农林科技大学资源环境学院, 杨凌 712100; 2. 陕西省微生物研究所, 西安 710043;
3. 陕西省循环农业工程技术研究中心, 杨凌 712100)

摘要: 为了探讨不同初始浓度石油污染土壤堆腐化修复机制, 以石油降解菌剂和腐熟鸡粪为调理剂, 研究了初始浓度分别为 5 000 (T1)、10 000 (T2) 和 50 000 mg/kg (T3) 的石油污染土壤堆腐化修复过程石油烃类污染物降解动力学特征和微生物群落多样性。结果表明: 堆腐化修复过程石油烃类污染物降解符合一级反应动力学, 反应常数分别为 0.012、0.094 和 0.050 d⁻¹, 半衰期分别为 6.79、7.37 和 13.86 d。整个堆腐过程石油烃类污染物平均降解速率分别为 112.08、230.05 和 887.93 mg/(kg·d)。3 个处理的孔平均颜色变化率 (average well color development) 和碳源利用率 (除芳香烃类化合物外) 随堆腐进程的推进逐渐升高, 在堆腐中、后期达到最大, T3 处理显著高于 T1、T2 处理。多聚物类和糖类代谢群是堆腐体系中的优势菌群。主成分分析表明 3 个处理的微生物群落差异显著 (除第 9 天外), 起分异作用的碳源主要是糖类和羧酸类。微生物群落的丰富度指数和均一度指数随堆腐进程的推进逐渐升高并在堆腐后期达到最大, 与 T1 处理相比, T3 处理分别高了 0.21% 和 17.64%, 差异达到显著水平 ($P<0.05$)。微生物群落优势度指数在中期达到最大, T1 处理分别比 T2、T3 处理高 2.12% 和 9.44%, 3 个处理间差异不显著 ($P>0.05$)。堆肥结束时 3 个处理的种子发芽指数 (seed germination index, SGI) 分别比堆腐初期提高了 18.26%、20.42% 和 36.41%。该研究结果为黄土高原不同程度石油污染土壤堆腐化修复的应用提供参考依据和理论基础。

关键词: 污染; 土壤; 堆腐; 石油污染土壤; 生物修复; 降解动力学; 微生物群落结构

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.032

中图分类号: X53

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2015)-15-0231-08

甄丽莎, 谷洁, 胡婷, 刘晨, 贾凤安, 吕睿. 石油烃类污染物降解动力学和微生物群落多样性分析[J]. 农业工程学报, 2015, 31(15): 231—238. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.032 <http://www.tcsae.org>
Zhen Lisha, Gu Jie, Hu Ting, Liu Chen, Jia Feng'an, Lü Rui. Kinetics of petroleum hydrocarbon degradation in soil and diversity of microbial community during composting[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(15): 231—238. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2015.15.032 <http://www.tcsae.org>

0 引言

随着石油产业的发展, 大量原油及其加工品进入土壤^[1]。有学者对黄土高原土壤石油污染状况进行了调查研究, 结果显示延河流域土壤石油含量为 2 097~13 488 mg/kg^[2], 地方油井采油区污染状况更为严重, 石油含量高达 6 260~183 828 mg/kg^[3], 远远超过国家农业标准临界值 (500 mg/kg)。石油污染已经成为该地区土壤生态环境保护的一个突出问题^[4]。与物理、化学方法相比, 生物修复被认为是最经济、高效、环保的修复方法^[5]。然而由于污染土壤养分贫乏导致的石油生物降解率低, 成为了石油污染土壤生物修复的限制因素^[6]。通常, 可以通过添加营养物质或外源微生物, 来提高修复过程的石油生物降解率^[7]。堆腐化修复技术是利用自然界广泛分布

的微生物或外源菌株, 通过添加调理剂, 有控制地促进有机物快速分解的固相反应过程^[8-9], 它结合传统堆肥和生物修复的优点, 可以有效克服污染物生物降解率低等缺陷。毛丽华等^[10]采用生物通风堆腐法对石油污染土壤进行修复, 并对堆腐材料及其比例进行了研究。Agamuthu 等^[11]以畜禽粪便和污泥作为调理剂, 研究了不同调理剂对修复过程石油烃类污染物降解率的影响。Dawson 等^[12]研究了石油污染土壤堆腐化修复过程生物学指标的变化, 包括生物量碳、呼吸速率、脱氢酶活性和生物毒性等。Tahseen 等^[13]研究了堆料稳定性和污染物初始浓度对多环芳烃堆腐化修复的影响。但是, 关于不同浓度石油污染土壤堆腐化修复过程石油烃类污染物降解动力学和微生物群落结构的研究却鲜见报道。本文根据黄土高原污染现状人为设置土壤石油浓度, 添加腐熟鸡粪和石油降解菌剂, 研究堆腐化修复过程石油烃类污染物降解动力学特征和微生物群落多样性变化, 为黄土高原不同程度石油污染土壤堆腐化修复的应用提供参考依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

堆腐材料为土壤、腐熟鸡粪和麸皮, 基本理化性质见表 1。

收稿日期: 2015-04-30 修订日期: 2015-07-08

基金项目: 国家自然科学基金 (41171203); 陕西省科学技术研究发展项目 (2014K01-12-06); 农业部“948”项目 (2010-Z20)。

作者简介: 甄丽莎, 女, 山西太原人, 助理研究员, 在职博士, 从事环境微生物方面的研究。西安 陕西省微生物研究所, 710043。

Email: zhenlisha2002@163.com。

*通信作者: 谷洁, 男, 陕西周至人, 研究员, 教授, 博士, 主要从事农业废弃物资源化利用研究。杨凌 西北农林科技大学资源环境学院, 712100。

Email: gujyoy@sina.com。

表 1 堆肥材料基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of raw materials for composting

堆肥原料 Raw materials	有机碳 Organic carbon/(g·kg ⁻¹)	全氮 Total nitrogen/ (g·kg ⁻¹)	全磷 Total P ₂ O ₅ / (g·kg ⁻¹)	全钾 Total K ₂ O/ (g·kg ⁻¹)
土壤 Soil	6.95	0.42	3.10	19.37
麸皮 Bran	452.18	21.36	15.74	28.53
腐熟鸡粪 Mature chicken manure	485.90	19.11	17.62	21.25

1.2 石油污染土壤的制备

供试土壤取自陕北黄土高原(延安市宝塔区河庄坪)无石油烃类污染的农田土壤(0~20 cm), 去除植物残渣, 风干后过 2 mm 筛备用。将一定质量的石油溶于石油醚, 按体积质量比为 1:10(以风干土壤质量计)的比例与土壤混合均匀, 置于通风处 4 周, 使石油醚完全挥发, 制成石油污染土壤。

1.3 石油降解菌剂的制备

制备石油降解菌剂的微生物菌群由课题组通过富集培养, 筛选获得的稳定菌群, 主要由假单胞菌属(*pseudomonas* sp.), (94.14%)组成, 石油质量浓度 10 g/L, 30℃ 180 r/min 培养 15 d, 菌群对石油烃类污染物的降解率为 18%~20%。制备菌剂时, 将-80℃冷冻保存的石油降解菌群接种于 50 mL 牛肉膏蛋白胨培养基中(牛肉膏 3 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 值 7.2~7.4), 30℃ 180 r/min 过夜培养获得一级种子液, 以 5%的接种量将一级种子液接种于新鲜的牛肉膏蛋白胨培养基中, 30℃ 180 r/min 过夜培养获得二级种子液, 按 1:1 体积质量比(以麸皮风干质量计)的比例将二级种子液与灭菌麸皮混合均匀, 30℃静止培养 24 h, 获得石油降解菌剂。

1.4 试验方法

将石油污染土壤、石油降解菌剂和灭菌的腐熟鸡粪按质量比(湿质量)为 10:1:0.5 的比例混合均匀, 调节含水率为 20%左右。试验设置 3 个处理: 土壤石油浓度(以风干土壤质量计)为 5 000 mg/kg (T1 处理)、10 000 mg/kg (T2 处理)和 50 000 mg/kg (T3 处理), 以模拟不同浓度石油污染土壤微生物堆腐化修复。将堆料装入内长×宽×高为 20 cm×12 cm×13 cm, 壁厚 2 cm 的泡沫盒中, 28℃恒温培养, 每 2 天补充水分 100 mL 并进行翻堆以保证堆体水分和氧气充足。在堆腐过程中定期从堆体中部取样, 4℃保存, 用于石油烃含量测定及微生物群落结构分析。

1.5 试验指标及其测定方法

1.5.1 土壤石油烃含量

土壤中石油烃含量的测定采用紫外分光光度法^[14], 称取相当于 5.0 g 风干质量的新鲜样品, 加入 10 mL 石油醚, 25℃ 300 W 超声 10 min, 涡旋振荡 5 min, 6 000 r/min 离心 5 min, 反复提取 5 次, 合并上清液, 无水硫酸钠除水, 用石油醚定容后在 225 nm 处读数, 3 次重复, 计算土壤石油烃含量。

1.5.2 微生物群落结构

称取相当于 5.0 g 风干质量的新鲜土壤, 加入装有 45 mL 无菌生理盐水(0.85%NaCl)的三角瓶中, 摇床(200 r/min)振荡 30 min, 静置后取上清液, 用无菌生理盐水稀释至 10⁻³, 加入 Biolog ECO 生态板中(每孔 150 μL), 置于 25℃恒温培养, 连续培养 240 h, 每 24 h 在 ELISA 反应微平板读数器上 590 nm 处读数 1 次^[15], 计算孔平均颜色变化率和群落功能多样性指数。

孔平均颜色变化率(average well-color development, AWCD)

$$AWCD = \sum_{i=1}^m \frac{(C_i - R)}{31}$$

式中: C_i 为各反应孔在 590 nm 处的吸光值; R 为 ECO 板对照孔 A1 在 590 nm 处的吸光值; m 为孔数。 $C_i - R$ 小于 0 的孔, 计算时记为 0, 即: $C_i - R \geq 0$ 。

群落 Shannon 丰富度指数(H):

$$H = -H = \sum_{i=1}^m P_i \cdot \ln P_i$$

式中: P_i 为第 i 孔相对吸光值与整板平均相对吸光值总和

的比, 即: $P_i = (C_i - R) / \sum_{i=1}^m (C_i - R)$ 。

群落 Simpson 优势度指数(D)

$$D = \sum_{i=1}^m \frac{n_i(n_i - 1)}{N \cdot (N - 1)}$$

式中: n_i 为第 i 孔相对吸光值($C_i - R$), N 为相对吸光值的总和, Simpson 指数通常用 $1/D$ 值表示。

群落 McIntosh 均一度指数(U)

$$U = \sqrt{\sum_{i=1}^m n_i^2}$$

式中: n_i 为第 i 孔相对吸光值($C_i - R$)。

1.5.3 种子发芽指数(seed germination index, SGI)

按质量体积比 1:10 的比例将样品(湿质量)与蒸馏水混合均匀, 滤液 3 000 r/min 离心 10 min, 取 5 mL 上清液于铺有滤纸的 9 cm 培养皿中, 放置 30 粒上海青种子, 以蒸馏水为对照, 3 次重复, 30℃培养 48 h 后测量根长, 计算发芽指数(seed germination index, SGI)^[16]。

1.6 数据处理

数据采用 SPSS(18.0)软件进行统计分析, Excel(V2010)软件进行绘图。

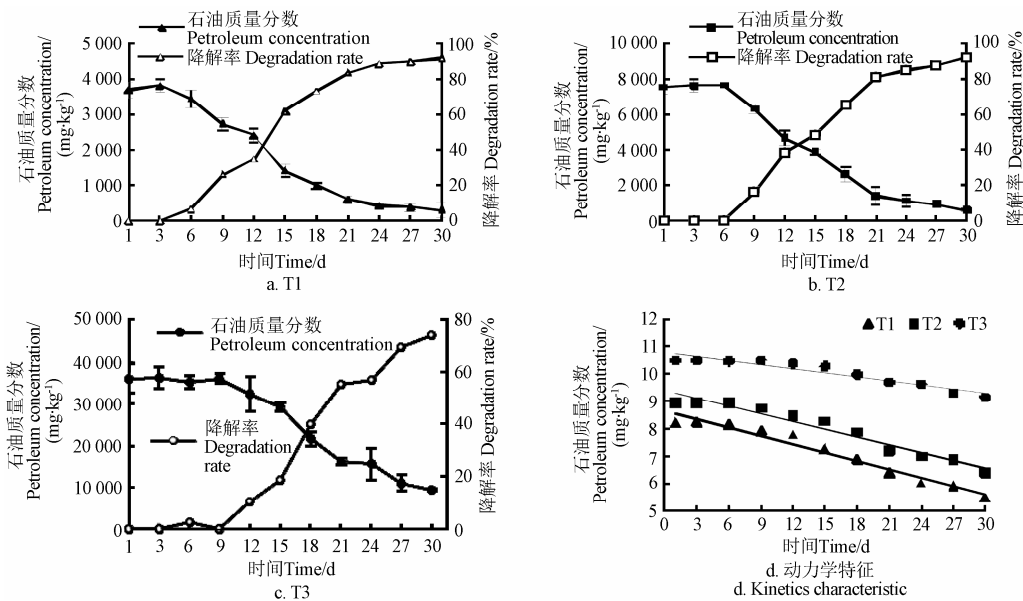
2 结果与分析

2.1 石油污染土壤堆腐化修复过程中石油烃类污染物降解及其动力学

石油污染土壤堆腐化修复是在微生物作用下进行的生化反应过程, 从图 1a, b, c 可以看出, 3 个处理堆腐初期均经历了一段适应期, 石油含量越高适应期越长。适应期后, 3 个处理的土壤石油含量随时间的延长而降低, 石油烃类污染物降解主要发生在堆腐中期, 前 21 天累计石油降解率分别是总降解率的 91.08%、88.37%和 74.67%, 说明了初始土壤石油含量越高, 微生物修复进

程越缓慢。堆腐后期除 T3 处理，其余 2 个处理土壤石油含量基本稳定。堆腐结束时 3 个处理的土壤石油质量分数分别为 (314.58 ± 210.57) 、 (614.06 ± 95.08) 和 $(9373.96\pm290.48)\text{mg/kg}$ ，降解率分别为 91.45%、91.83%

和 73.97%，与初始土壤石油含量差异均达到显著水平 ($P<0.05$)。从堆腐过程的降解速率来看，3 个处理的降解速率中期高，前期和后期低，整个堆腐过程平均降解速率分别为 112.08、230.05 和 887.93 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。



注：T1、T2 和 T3 是初始石油质量分数分别为 5 000、10 000 和 50 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 3 个处理，下同。
Note: T1, T2 and T3 were three treatments of different petroleum initial concentration, which were 5 000, 10 000 and 50 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectively, the same as below.
图 1 不同浓度石油污染土壤堆腐化修复过程石油烃类污染物降解率和动力学特征

Fig.1 Petroleum biodegradation and kinetics characteristic during bioremediation of petroleum hydrocarbon -contaminated soil with different concentration by composting

一般生化反应过程都遵循零级或一级反应动力学^[17]。Peter O Abioye 等^[18]利用有机废弃物强化修复机油污染土壤，研究表明机油生物降解过程符合一级反应动力学，可以用方程（1）表示：

$$\ln c = -kt + a \tag{1}$$

式中： c 为底物浓度， k 为反应速率常数， t 为反应时间。

当 $t=0$ 时， $a=\ln c_0$ ，式中 c_0 为初始土壤石油含量。从图 1d 和表 2 可以看出，3 个处理的土壤石油含量自然对数 ($\ln c$) 与堆腐时间呈线性相关，且拟合优度高 ($P<0.01$)。为进一步了解不同浓度石油污染土壤堆腐化修复进程，改写方程（1）为：

$$c = c_0 \cdot e^{-kt} \tag{2}$$

则 $t_{1/2} = \ln(2)/k$ 。T3 处理的石油半衰期为 13.86 d，分别比 T1、T2 处理长 7.07 和 6.49 d，这也说明了高浓度石油污染土壤的微生物修复进程缓慢。

表 2 不同浓度石油污染土壤堆腐化修复过程石油烃类污染物降解动力学方程

Table 2 Kinetic equations of petroleum biodegradation during bioremediation of petroleum hydrocarbon -contaminated soil with different concentration by composting

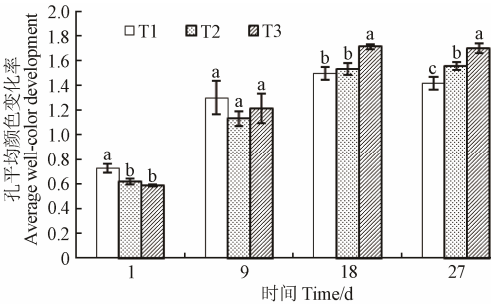
处理 Treatment	动力学方程 Kinetic equations	R^2	Sig.	半衰期 $t_{1/2}/\text{d}$
T1	$\ln c = -0.102t + 8.657$	0.965	<0.01	6.79
T2	$\ln c = -0.094t + 9.378$	0.950	<0.01	7.37
T3	$\ln c = -0.050t + 10.778$	0.892	<0.01	13.86

注： c 为底物浓度， t 为反应时间。
Note: c is the content of substrate, t is time of reaction.

2.2 石油污染土壤堆腐化修复过程中微生物群落结构及其功能多样性

2.2.1 孔平均颜色变化率（average well-color development, AWCD）

AWCD 是微生物群落利用碳源能力的重要指标，反映微生物群落的总体活性^[19]。从图 2 可以看出，在石油污染土壤堆腐化修复过程中，3 个处理的 AWCD 值呈上升趋势，且前期增长速率快后期缓慢。



注：误差棒表示标准偏差 ($n=3$)，不同字母表示差异达显著水平 ($P<0.05$)，下同。
Note: The error bars are the standard deviation ($n=3$), and different letters in the graph indicate significant at 0.05 level, the same below.

图 2 不同浓度石油污染土壤堆腐化修复过程 144 h 孔平均颜色变化率

Fig.2 Values of average well-color development during bioremediation of petroleum hydrocarbon -contaminated soil with different concentration by composting

T1、T3 处理在堆腐第 18 天达到最大，AWCD 值分别为 1.49 ± 0.05 和 1.71 ± 0.02 ，之后稍微降低但基本保持不

变,降幅仅为 5.05%和 0.75%。T2 处理的 AWCD 在第 18 天达到 1.53±0.05 后稍有升高,在第 27 天达到最大,但增幅仅为 1.39%。在堆腐化修复过程的不同时期,3 个处理的微生物活性也存在一定的差异。堆腐第 1 天 T1 处理的 AWCD 值 (0.72±0.03) 显著高于 T2 和 T3 处理 ($P<0.05$), 分别高出 17.29%和 23.38%。第 18 天和 27 天 T3 处理的 AWCD 值最高, 分别比 T1、T2 处理高 14.59%、11.75%和 19.78%、9.39%, 差异达到显著水平 ($P<0.05$)。

2.2.2 微生物群落碳源代谢

微生物对碳源的利用情况可以反映微生物群落的碳代谢功能类群。根据微生物的营养代谢途径可以将 Biolog ECO 生态板 (marix technologies corporation, USA) 上的 31 种单一碳源分为 6 大类,包括糖类 10 种、羧酸类 7 种、

氨基酸类 6 种、多聚物类 4 种、多胺类 2 种和芳香化合物类 2 种^[20]。采用培养 144 h 的吸光值分析不同处理微生物群落对 6 类碳源的利用 (见表 3), 结果表明第 1 天, T1 处理对芳香烃化合物和糖类利用最高, 分别比 T2、T3 处理高 37.66%、82.35%和 41.33%、97.87%, 差异达到显著水平 ($P<0.05$), T2、T3 处理对多聚物类利用最高, 比 T1 处理高 8.14%和 13.95%, 3 个处理间无显著差异 ($P>0.05$)。第 9 天 3 个处理对糖类利用最高, T3 处理分别比 T1、T2 处理高 4.58%和 15.94%, 3 个处理间无显著差异 ($P>0.05$)。第 18 天和 27 天, 3 个处理对多聚物类和糖类利用最高, 3 个处理对多聚物类的利用无显著差异 ($P>0.05$), 对糖类的利用 T3 处理分别比 T1、T2 处理高 36.42%、23.35%和 25.45%、14.36%, 3 个处理间差异达到显著水平 ($P<0.05$)。

表 3 不同浓度石油污染土壤堆腐化修复过程微生物群落对 6 类碳源的利用
Table 3 Using of six groups of carbon sources by microbial community during bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil with different concentration by composting

堆腐时间 Composting time/d	处理 Treatments	糖类 Carbohydrates	氨基酸类 Amino acids	羧酸类 Carboxylic acids	多聚物类 Polymers	多胺类 Amines	芳香化合物类 Aromatic compounds
1	T1	0.93±0.08a	0.53±0.08a	0.50±0.09ab	0.86±0.15a	0.45±0.28a	1.06±0.21a
	T2	0.51±0.09b	0.60±0.12a	0.59±0.09a	0.93±0.07a	0.51±0.15a	0.77±0.04b
	T3	0.47±0.04b	0.70±0.09a	0.39±0.02b	0.98±0.11a	0.58±0.05a	0.75±0.08b
9	T1	1.53±0.01a	1.49±0.27a	1.04±0.16a	1.32±0.55a	1.17±0.13a	0.56±0.08a
	T2	1.38±0.05a	1.30±0.30a	0.88±0.01ab	1.05±0.09a	0.74±0.14b	0.74±0.60a
	T3	1.60±0.20a	1.22±0.19a	0.79±0.08b	1.00±0.10a	1.19±0.16a	1.18±0.36a
18	T1	1.51±0.08c	1.55±0.17a	1.25±0.08b	2.24±0.15a	1.41±0.12a	0.74±0.10a
	T2	1.67±0.04b	1.57±0.11a	1.29±0.03b	1.98±0.19a	1.43±0.03a	0.79±0.09a
	T3	2.06±0.03a	1.69±0.04a	1.43±0.08a	2.14±0.07a	1.44±0.12a	0.47±0.11b
27	T1	1.65±0.05c	1.39±0.04b	1.16±0.05c	1.89±0.11a	1.11±0.06b	0.59±0.15a
	T2	1.81±0.05b	1.50±0.01ab	1.40±0.04b	1.95±0.05a	1.15±0.09b	0.59±0.17a
	T3	2.07±0.06a	1.56±0.09a	1.57±0.02a	1.98±0.07a	1.41±0.17a	0.44±0.02a

注: 平均值±标准差 ($n=3$), 同列数据不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下同。
Notes: The means±standard deviation ($n=3$), different letters in the same column indicate significant at 0.05 level, the same below.

从堆料微生物生理碳代谢群落结构来看,堆腐初期优势群落为芳香烃类和多聚物类代谢群,中期的优势群落为糖类和氨基酸类代谢群,后期以多聚物类和糖类代谢群为优势群落。除堆腐初期羧酸类代谢群最弱外,堆腐中、后期最弱的群落均为芳香化合物类代谢群。

2.2.3 微生物群落代谢主成分分析

为了进一步了解不同浓度石油烃类污染土壤堆腐化修复过程微生物群落结构,对 Biolog ECO 生态板培养 144 h 的吸光值进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 分别提取可以聚集单一碳源变量的数据变异 (累积方差贡献率) 为 57.04%、49.85%、59.03% 和 66.55% 的主成分 PC1 和 PC2 (见图 3), 结果表明在堆腐过程中 3 个处理在主成分坐标系中差异明显。这种差异在第 1 天和第 18 天主要体现在 PC1 上, 第 1 天 T1 处理和 T2、T3 处理分别位于 PC1 的负端和正端, 典型变量值差异显著 ($P<0.05$)。第 9 天 3 个处理间无显著差异 ($P>0.05$)。第 18 天 T1、T2 和 T3 处理分别位于 PC1 的负端和正端, 典型变量值差异极显著 ($P<0.01$)。第

27 天 T3 处理位于 PC1 和 PC2 的正端, T2 处理位于 PC1 和 PC2 的负端, T1 处理位于 PC1 的负端和 PC2 的正端, 方差分析表明 3 个处理在 PC1 ($P<0.01$) 和 PC2 ($P<0.01$) 上差异均达到极显著水平。从典型变量值的离散性来看,堆腐第 27 天 3 个处理的离散 (变异) 最低, 说明随着堆腐化修复进程的推进微生物群落趋于稳定。

对 PCA 中 31 种碳源在主成分坐标上的因子载荷 (特征向量) 进行分析 (见表 4), 可以看出第 1 天对 PC1 贡献大 (≥ 0.05) 的碳源中氨基酸类 (38.46%) 和多聚物类 (23.08%) 所占比例较大, 第 18 天对 PC1 贡献最大的是糖类 (50.00%), 其次是羧酸类 (25.00%)。第 27 天对 PC1、PC2 贡献较大的碳源是糖类 (PC1, 47.37%; PC2, 25.00%)、氨基酸类 (PC1, 21.05%; PC2, 25.00%) 和羧酸类 (PC1, 21.05%; PC2, 25.00%)。可见堆腐初期, 对 PC1 起分异作用, 导致 3 个处理差异显著的主要因子是氨基酸类和多聚物类。堆腐中后期, 糖类和羧酸类成为对 PC1、PC2 起分异作用, 导致 3 个处理差异极显著的主要影响因子。

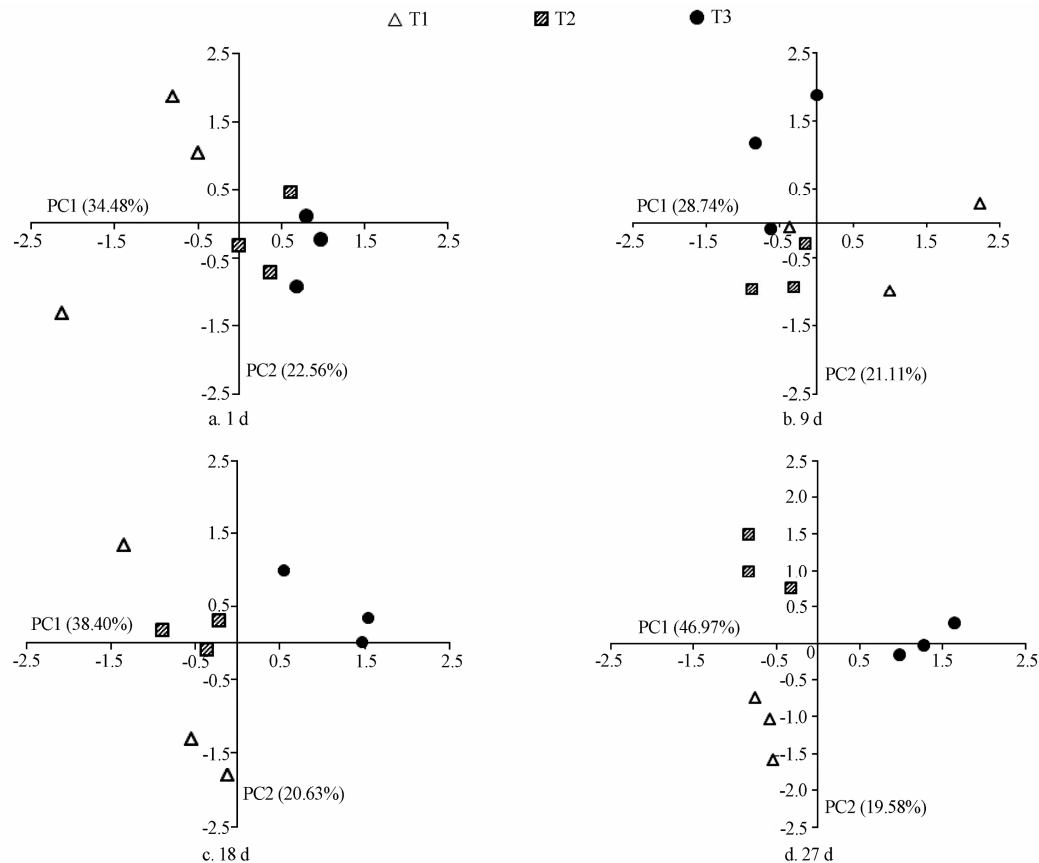


图 3 不同浓度石油污染土壤堆腐化修复过程微生物群落代谢主成分分析

Fig.3 Principal component analysis of microbial community metabolism during bioremediation of petroleum-contaminated soil with different concentration by composting

表 4 对 PC1 和 PC2 贡献的特征向量 (≥ 0.05) 的碳源数
Table 4 Numbers of carbon sources with loading ≥ 0.05 grouped

碳源 Carbon sources	1 d		9 d		18 d		27 d	
	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2
糖类 Carbohydrates	0	4	3	3	8	3	9	2
氨基酸类 Amino acids	5	0	4	2	2	2	4	2
多胺类 Amines	2	0	0	1	0	2	1	1
多聚物类 Polymers	3	3	2	1	1	0	1	1
羧酸类 Carboxylic acids	2	2	3	2	4	2	4	2
芳香化合物 Aromatic compounds	1	0	0	1	1	0	0	0
合计 Total	13	9	12	10	16	9	19	8

2.2.4 微生物群落多样性指数分析

微生物群落多样性指标 Shannon 丰富度指数 (H)、Simpson 优势度指数 ($1/D$) 和 McIntosh 均一度指数 (U) 常被用于评价微生物群落功能多样性^[21]。 H 反映了微生物群落的丰富程度, $1/D$ 则着重于微生物群落中最常见的物种, U 是基于群落物种多维空间上距离的多样性指数, 是群落物种均一性的度量^[22]。从表 5 可以看出, 在整个堆腐化修复过程中 H 和 U 呈逐渐升高的趋势。堆腐第 1 天、第 9 天 T1 处理的 H 值最高, 是 T2、T3 处理的 1.02 倍~1.04 倍。第 27 天 T2、T3 处理的 H 值显著高于 T1 处理 ($P<0.05$), T2、T3 处理无显著差异 ($P>0.05$)。堆肥第 1 天 T1 处理的 U 值显著高于 T2、T3 处理 ($P<0.05$), 分别比 T2、T3 处理高 10.18% 和 10.83%。第 18 天、第 27 天 T3 处理的 U

值最高, 分别比 T1、T2 处理高 14.84%、12.49% 和 17.64%、9.02%, 差异达到显著水平 ($P<0.05$)。1/D 值在整个堆腐过程中呈先上升后下降的趋势, 在第 9 天 3 个处理的 1/D 值达到最大, T1 处理的 1/D 值分别比 T2、T3 处理高 2.12% 和 9.44%, 3 个处理间差异不显著 ($P>0.05$)。第 18 天、第 27 天 T1、T2 处理的 1/D 值显著高于 T3 处理 ($P<0.05$), 分别比 T3 处理高 16.93%、15.61% 和 14.37%、8.59%, T1、T2 处理间无显著差异 ($P>0.05$)。

表 5 不同浓度石油污染土壤堆腐化修复过程
微生物群落多样性指数

Table 5 Diversity indices of microbial community during bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil with different concentration by composting

堆腐时间 Composting time/d	处理 Treatment	丰富度 指数 H	优势度 指数 $1/D$	均一度 指数 U
1	T1	2.89±0.21a	56.24±20.04a	5.63±0.17a
	T2	2.83±0.03a	50.03±4.40a	5.11±0.15b
	T3	2.77±0.01a	41.65±5.05a	5.08±0.13b
9	T1	3.29±0.03a	67.45±5.01a	8.00±0.67a
	T2	3.23±0.01b	66.05±4.93a	7.29±0.34a
	T3	3.24±0.01b	61.63±9.47a	7.77±0.74a
18	T1	3.31±0.00a	57.61±2.10a	9.10±0.30b
	T2	3.32±0.00a	56.96±1.94a	9.29±0.27b
	T3	3.31±0.01a	49.27±1.76b	10.45±0.15a
27	T1	3.30±0.01b	58.98±3.18a	8.73±0.31c
	T2	3.32±0.01a	56.00±1.57a	9.42±0.17b
	T3	3.32±0.00a	51.57±1.00b	10.27±0.24a

2.3 石油污染土壤堆腐化修复对种子发芽指数的影响

种子发芽指数 (SGI) 是评价石油烃类污染土壤健康状况的重要指标^[23]。从图 4 可以看出, 堆腐第 1 天, T2 处理的 SGI 值最大 (0.68 ± 0.10), 分别比 T1、T3 处理高 22.30% 和 38.94%。第 30 天 3 个处理的 SGI 值分别比第 1 天提高了 18.26%、20.42% 和 36.41%, 其中 T2 处理的 SGI 值最大 (0.82 ± 0.10), 分别比 T1、T3 处理高 24.54% 和 22.65%, 但 3 个处理间无显著差异 ($P > 0.05$)。

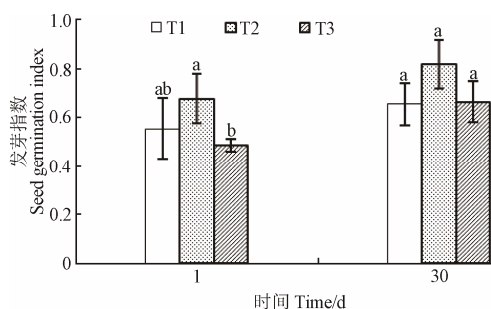


图 4 不同浓度石油污染土壤堆腐化修复对种子发芽指数的影响

Fig.4 Effect of bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil with different concentration by composting on germination index

3 讨论

堆腐化修复技术是治理石油烃类污染土壤的重要方式^[9], 在实际应用中取得了良好的效果, 但是污染物的生物降解率仍是石油烃类污染土壤修复的限制因素。Grace Liu 等^[24]研究了堆腐体系初始养分比例、外源微生物和表面活性剂对石油烃类污染物降解的影响, 结果表明各处理的石油烃类污染物降解主要发生在堆腐前期 (第 1~35 天), 遵循一级反应动力学, 反应速率常数为 $0.012 \sim 0.042 \text{ d}^{-1}$ 。张秀霞等^[17]研究也表明在好氧堆腐体系中添加木屑、鸡粪等作为调理剂, 24 d 后石油质量分数从 18.77% 降低至 8.87%, 石油烃类污染物降解主要发生在堆腐前期, 整个堆腐过程遵循一级反应动力学, 反应速率常数为 0.035 d^{-1} 。本研究结果显示, 不同初始浓度的石油污染土壤在堆腐化修复过程的初期都有一段适应期, 初始石油浓度越高适应期越长, 适应期后石油降解率逐渐上升, 石油烃类污染物的降解主要发生在堆腐过程的前期和中期, 且初始浓度越高石油烃类污染物降解越滞后, 堆腐后期石油烃类污染物降解趋于稳定。这可能有三方面的原因: 一、在堆腐修复的前期, 易被生物利用的烷烃和小分子量的芳香烃被微生物分解^[25], 堆腐后期石油烃中的极性组分 (沥青类) 无法被微生物进一步利用^[26], 导致了堆腐后期石油降解缓慢; 二、随着堆腐化修复进程的推进, 堆腐体系中的微生物群落逐渐适应环境, 增强其降解石油的能力^[12], 堆腐后期由于微生物自身代谢产物和难降解烃类的积累, 抑制了微生物的活性, 影响了石油的生物降解; 三、堆腐化修复过程中, 堆腐材料对石油污染物的吸附-解吸附作用限制了其在堆料中的扩散, 从而降低了石油的生物可利用性^[27]。本研究的石油烃类污染物降解符合一级动力学反应, 初始石油浓度越

高平均降解速率越大, Tahseen^[13]的研究也证实了芳香烃类污染物的生物降解速率随初始浓度增加而升高。

石油污染土壤堆腐化修复的本质是利用微生物的代谢活动, 将石油烃转化为 H_2O 和 CO_2 等无害化物质的过程。在这一过程中, 微生物既是石油降解的执行人, 又是降解过程的核心动力, 其代谢活性可以用 AWCD 值来反映^[28], 本研究结果表明石油烃污染土壤堆腐化修复过程中、后期的 AWCD 值最高, 说明堆腐中、后期的微生物群落代谢活性强, 结合石油降解的变化, 可以排除堆腐后期石油降解缓慢是由于微生物代谢活性不高引起的。在整个堆腐化修复过程中, 初始石油浓度越高, AWCD 值越高, 上升速率越快, 这与石油降解速率相互印证。AWCD 值代表的是微生物群落的整体代谢活性, 而微生物对 6 类碳源的利用可以反映微生物群落的代谢功能类群。本研究结果表明, 随着堆腐化修复进程的推进, 微生物群落趋于稳定, 由堆腐初期的芳香烃类和多聚物类代谢群逐步转变为多聚物类和糖类代谢群, 而且初始石油浓度越高, 这两类代谢类群活性越强。Grace Liu 等^[24]研究表明在石油污染土壤堆腐化修复过程中, 微生物群落的变化与其石油降解能力解密切相关。这说明在本研究堆腐系统中, 对石油降解起主要作用的是以多聚物类和糖类为碳源的微生物类群。从主成分分析 (PCA) 结果表明, 堆腐化修复过程微生物群落结构存在显著差异, 这种差异主要体现在对糖类和氨基酸类碳源的利用上, 而对多聚物类碳源的代谢无显著差异。综合分析表明, 在本研究中以糖类为主要碳源的微生物群落对石油降解起关键性作用。

Shannon 丰富度指数 (H')、Simpson 优势度指数 ($1/D'$) 和 McIntosh 均一度指数 (U') 从不同侧面反映了土壤微生物群落的功能多样性。本研究结果显示, 随着石油污染土壤堆腐化修复进程的推进, 微生物群落的丰富度和均一度逐渐升高, 说明堆腐化修复体系有利于提高微生物群落丰富性和功能多样性。优势度指数堆腐化修复中期达到最大值, 之后缓慢下降, 但仍高于堆腐初期, 其中低初始浓度的处理最高, 说明在堆腐化修复的中期形成了优势菌群改变了微生物群落结构, 石油初始浓度越低越有利于优势菌群的生长, 但优势度指数无显著性差异, 同时 PCA 结果也显示在堆腐中期微生物群落在坐标系中差异不显著, 说明初始石油浓度对微生物群落中的优势菌群影响较小。

种子发芽指数是反映土壤健康状况的敏感性指标, Wang 等^[23]研究表明种子发芽指数与土壤石油浓度呈正比。本研究结果表明, 堆腐化修复石油污染土壤后种子发芽指数显著提高, 说明利用微生物菌剂堆腐化修复石油污染土壤可以有效改善土壤健康状况。

4 结论

1) 石油初始质量分数分别为 5 000 (T1)、10 000 (T2) 和 50 000 mg/kg (T3) 的石油降解符合一级反应动力学, 反应常数分别为 0.012、0.094 和 0.050 d^{-1} , 半衰期分别为 6.79、7.37 和 13.86 d。高浓度初始石油量延缓堆

腐化修复进程。堆腐结束时, 3 个处理降解率分别为 91.45%、91.83%和 73.97%, 石油平均降解速率分别为 112.08、230.05 和 887.93 mg/(kg·d)。石油降解速率随初始石油浓度增加而升高。

2) 3 个处理的孔平均颜色变化率和碳源利用率(除芳香烃类化合物外)升高, 其中 T3 处理涨幅最大, 堆腐中、后期达到最高, T3 处理显著高于 T1、T2 处理。随堆腐化进程的推进, 3 个处理的多聚物类和糖类代谢群逐渐成为优势菌群, 且微生物群落趋于稳定。主成分分析表明 3 个处理的微生物群落差异显著(除第 9 天外), 起分异作用的碳源主要是糖类和羧酸类。

3) 微生物群落的丰富度指数和均一度指数随堆腐化进程的推进逐渐升高并在堆腐后期达到最大, 与 T1 处理相比, T2、T3 处理的丰富度指数、均一度指数分别高了 0.61%、7.90%和 0.61% 17.64%; 微生物群落优势度指数在中期达到最大, T1 处理分别比 T2、T3 处理高 2.12%和 9.44%。

4) 堆肥结束时, 3 个处理的种子发芽指数分别比堆腐初期提高了 18.26%、20.42%、36.41%, 其中 T2 的种子发芽指数最高, 分别比 T1、T3 处理高 24.54%和 22.65%。

[参 考 文 献]

- [1] Zhou Qixing, Sun Fuhong, Liu Rui. Joint chemical flushing of soils contaminated with petroleum hydrocarbons[J]. *Environment International*, 2005, 31(6): 835—839.
- [2] 刘培, 梁继东, 高伟, 等. 延安石油开采对周边黄土污染的调查分析[J]. *西安交通大学学报*, 2011, 45(7): 123—128.
Liu Pei, Liang Jidong, Gao Wei, et al. Investigation of soil contamination caused by petroleum exploitation in Yan'an[J]. *Journal of Xi'an Jiao Tong University*, 2011, 45(7): 123—128. (In Chinese with English abstract).
- [3] 张妍. 黄土区石油污染土壤的现状及其修复[J]. *商洛学院学报*, 2008, 22(2): 56—58.
Zhang Yan. Current situation and techniques of remediating of petroleum contaminated soils of the Loess Area[J]. *Journal of Shangluo University*, 2008, 22(2): 56—58. (In Chinese with English abstract)
- [4] Tang Jingchun, Wang Min, Wang Fei, et al. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(5): 845—851.
- [5] Margesin R, Schinner F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3127—3133.
- [6] Sayara T, Sarrà M, Sánchez A. Preliminary screening of co-substrates for bioremediation of pyrene- contaminated soil through composting[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172(2/3): 1695—1698.
- [7] Romantschuk M, Sarand I, Petänen T, et al. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches[J]. *Environmental Pollution*, 2000, 107(2): 179—185.
- [8] 马瑛, 张甲耀, 侯祖军, 等. 堆肥化生物修复技术处理有毒有害固体废弃物的模拟研究[J]. *环境科学*, 1997, 18(4): 65—68.
Ma Ying, Zhang Jiayao, Hou Zujun, et al. Simulative study of bioremediation of poisonous and harmful solid waste by composting[J]. *Environmental Science*, 1997, 18(4): 65—68. (In Chinese with English Abstract)
- [9] Semple K T, Reid B J, Fermor T R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 112(2): 269—283.
- [10] 毛丽华, 刘菲, 马振民, 等. 生物通风堆肥法修复原油污染土壤的实验研究[J]. *环境科学学报*, 2009, 29(6): 1263—1272.
Mao Lihua, Liu Fei, Ma Zhenmin, et al. Remediation of crude oil-contaminated soil by bioventing and composting technology[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(6): 1263—1272. (In Chinese with English abstract).
- [11] Agamuthu P, Tan Y S, Fauziah S H. Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes[J]. *Procedia Environmental Sciences*, 2013, 18: 694—702.
- [12] Dawson J J C, Godsiffe E J, Thompson I P, et al. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(1): 164—177.
- [13] Tahseen Sayara, Montserrat Sarrà, Antoni Sánchez. Effects of compost stability and contaminant concentration on the bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 179(1/2/3): 999—1006.
- [14] 程建安. 紫外分光法测定土壤中的石油污染物[D]. 济南: 山东大学, 2012.
Cheng Jian'an. Ultraviolet spectrophotometry for the determination of petroleum contaminants in soil[D]. Jinan: Shandong University, 2012.
- [15] Kong W D, Zhu Y G, Fu B J, et al. The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 143(1): 129—137.
- [16] 史龙翔, 谷洁, 潘洪加, 等. 复合菌剂提高果树枝条堆肥过程中酶活性[J]. *农业工程学报*, 2015, 31(5): 244—251.
Shi Longxiang, Gu Jie, Pan Hongjia, et al. Improving enzyme activity by compound microbial agents in compost with mixed fruit tree branches and pig manure during composting[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2015, 31(5): 244—251. (In Chinese with English abstract)
- [17] 张秀霞, 单宝来, 张剑杰, 等. 降解菌 HJ-1 降解石油动力学[J]. *中国石油大学学报: 自然科学版*, 2009, 33(5): 140—143.
Zhang Xiuxia, Shan Baolai, Zhang Jianjie, et al. Kinetics on strain HJ-1 degrading petroleum[J]. *Journal of China University of Petroleum: Nature Science Edition*, 2009, 33(5): 140—143. (In Chinese with English abstract)
- [18] Abioye P O, Aziz A A, Agamuthu P. Enhanced biodegradation of use engine oil in soil amended with organic wastes[J]. *Water Air Soil Pollut*, 2010, 209: 173—179.
- [19] Zabinski C A, Gannon J E. Effect of recreational impact on soil microbial communities[J]. *Environmental Management*, 1997, 21(2): 233—238.
- [20] Papatheodorou E M, Efthimiadou E, Stamou G P. Functional diversity of soil bacteria as affected by management practices and phonological stage of *Phaseolus vulgaris*[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2008, 44(4): 429—436.
- [21] Gomez E, Ferreras L, Toresani S. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(13): 1484—1489.
- [22] Fang Hua, Yu Yunlong, Chu Xiaoqiang, et al. Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(3): 380—386.
- [23] Wang Jiangang, Zhan Xinhua, Zhou Lixiang, et al. Biological indicators capable of assessing thermal treatment efficiency of hydrocarbon mixture-contaminated soil [J]. *Chemosphere*, 2010, 80(8): 837—844.
- [24] Pao-Wen Grace Liu, Tsung Chain Chang, Liang-Ming Whang, et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(8): 1119—1127.

- [25] 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.
- [26] Lee S H, Lee S, Kim D Y, et al. Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 143(1/2): 65—72.
- [27] Pao-Wen Grace Liu, Tsung Chain Chang, Chih-Hung Chen, et al. Effects of soil organic matter and bacterial community shift on bioremediation of diesel-contaminated soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 85: 661—670.
- [28] 席劲瑛, 胡洪营, 姜健, 等. 生物过滤塔中微生物群落的代谢特性[J]. *环境科学*, 2005, 26(4): 165—170.
- Xi Jinying, Hu Hongying, Jiang Jian, et al. Metabolic properties of the microbial community in the biofilters using biollog microplates[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2005, 26(4): 165—170. (In Chinese with English abstract)

Kinetics of petroleum hydrocarbon degradation in soil and diversity of microbial community during composting

Zhen Lisha^{1,2}, Gu Jie^{1,3*}, Hu Ting², Liu Chen², Jia Feng'an², Lü Rui²

(1. College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. Shaanxi Province Microbiology Institute, Xi'an 710043, China;

3. The Research Center of Recycle Agricultural Engineering and Technology of Shaanxi Province, Yangling 712100, China)

Abstract: In order to investigate the mechanism of bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting, an experiment was conducted with bacteria agent and mature chicken manure as amendment. We studied the kinetics of petroleum hydrocarbon degradation and the diversity of microbial community during the bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting with different concentrations. The concentrations included 5 000 mg/kg (T1), 10 000 mg/kg (T2) and 50 000 mg/kg (T3). The results showed that biodegradation of petroleum hydrocarbon followed the first-order model during composting. The constants of biodegradation rate in 3 treatments respectively were 0.012, 0.094 and 0.050/d. The half-life period was 6.79 d in T1 treatment, 7.37 d in T2 treatment and 13.86 d in T3 treatment. The average degradation rate was 112.08 mg/(kg·d) in T1 treatment, 230.05 mg/(kg·d) in T2 treatment and 887.93 mg/(kg·d) in T3 treatment during composting. This indicated that the average degradation rate increased with the increase in the petroleum hydrocarbon concentration. The average well-color development (AWCD) and use of carbon sources (except aromatic compounds) increased during the composting process, and reached the peak at the end of composting. There was a sharp rise in AWCD at the beginning of composting. This phenomenon could be easily explained by the fact that the total activity of soil microbial community increased significantly in the early of the process, while the use of carbon sources rose. The value of AWCD and the use of carbon sources in T3 were significantly higher than that in T2 and T3 at the end of composting. This demonstrated that there were dominant microbial consortia in the treatment with higher petroleum hydrocarbon concentration, and the dominant microbial consortia raised the total activity of soil microbial community and the use of carbon source. The dominant microbial consortia were metabolism communities of polymers and carbohydrates in composting process. The principal component analysis results revealed that there was a significant difference in soil microbial community structure among 3 treatments and the difference was mostly related to the use of carbohydrates and carboxylic acids. The microbial community diversity, as indicated by Shannon and McIntosh, increased during the composting process, and reached the peak at the end of stage. The values of Shannon and McIntosh in T3 were 0.21% and 17.64% higher than those in T1 respectively, and the differences were significant at 0.05 level ($P < 0.05$). Simpson reached the maximum in middle stage. The value of Simpson in T1 was 2.12% and 9.44% higher than that in T2 and T3 respectively ($P > 0.05$). This phenomenon was likely due to the stimulating effect of lower concentration of petroleum hydrocarbon on the growth of the dominant microbial consortia. However, the structure of soil microbial community in 3 treatments had no significant difference. The seed germination index (SGI) reached the maximum at the end of composting. Compared with the first stage of composting, the SGI in 3 treatments increased respectively by 18.26%, 20.42% and 36.41%. This suggested that bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting had a high effect for improving soil health. The results can provide a reference and theoretical basis for the application of bioremediation in petroleum hydrocarbon-contaminated soil in the Loess Plateau by composting with different concentrations.

Key words: pollution; soils; composting; petroleum hydrocarbon-contaminated soil; bioremediation; degradation kinetics; microbial community structure