

Study on Plants-Microbial In-Situ Remediation of Petroleum Contaminated Soil

Li CHEN, Fawang ZHANG, Jiang CHEN, Sheng ZHANG, Lin ZHANG,

Institute of Hydrogeology and Environmental Geology, Chinese Academy of Geological Sciences, Zhengding Hebei, 050803;

Email: sunboyli2003@126.com

Abstract: According to the previous experience on remediation experiment in laboratory and field, the study on microbe ecological remediation of petroleum contaminated soil in Zhongyuan oilfield was carried out under 3 different conditions. Through domestication and magnify to cultivate the microbe bearing the ability of petroleum degradation, the microbe amount can increase 9 times. Here the results from remediation show that the technology of microbe cooperated with plants, the microbe technology and the plants technology all possess remedial effect on petroleum contaminated soil through 99-day period remediation, where the technology of microbe cooperated with plants creates the best remedial mission with petroleum hydrocarbon degradation rate of 67.38%, while petroleum hydrocarbon exerts degradation rate of about 40% on petroleum hydrocarbon. Moreover, the experiment results indicate that few nutriment such as soluble salt, NO_3^- , Cl^- , etc can infiltrate into the lower soil layer (50cm). In addition, the results also show that the remediation effect can be impacted by the factors containing temperature, water, oxygen, nutriment and mini-geo-environment.

Keywords: Petroleum; Contaminated soil; plants-microbial; In-situ remediation; Degradation rate

植物-微生物原位修复石油污染土壤试验研究

陈立, 张发旺, 陈江, 张胜, 张琳

中国地质科学院水文地质环境地质研究所, 河北, 正定, 050803;

Email: sunboyli2003@126.com

摘 要: 本文在前期室内外模拟修复试验的基础上, 选择中原油田某油井场旁石油污染场地, 设置 3 种修复条件, 开展植物-微生物联合方法修复石油污染土壤研究。试验显示: 经过驯化、放大培养油污染土壤中具有降解石油能力的微生物, 能使当地此类微生物数量增加 9 倍以上; 修复结果表明: 经过 99 天修复后, 植物-微生物联合方法、纯微生物方法和纯植物方法对石油污染土壤具有明显的修复作用, 其中的石油烃降解率均在 40%, 以植物-微生物联合方法修复效果为最佳, 其中石油烃降解率达 67.38%; 研究结果认为, 修复过程中易溶盐、 NO_3^- 、 Cl^- 等易溶营养物质只有极小部分随水而进入下部土层 (50cm); 影响修复效果的因素包括温度、水、氧气、营养元素、微地质环境等。

关键词: 石油; 污染土壤; 植物-微生物; 原位修复; 降解率

1 引言

石油已成为人类最主要的能源之一, 随着石油产品需求量增加, 大量的石油及其加工品进入土壤, 造成土壤的石油污染日趋严重, 给生物和人类带来危害, 这已成了世界性的环境问题。研究认为, 80% 以上的落地原油被截留在 50cm 以上的表层土壤中^[1], 逐渐积累导致土壤结构的破坏, 影响土壤通透性, 并对农作物的生长和发育造成很大的负面影响^[2]。同时, 石油类污染物还可以通过根系吸收后残留在植物体内, 通过食物链影响人体健康^[3]。各国对石油污染的治理研究较多, 生物修复不是一个新的概念, 但是作为一项

资助信息: 科技部国际合作重点项目 (2005DFA90200) 和河南省国土资源厅基金项目 (濮阳市油田区土壤修复项目)

高效、低成本的清洁技术正日益受重视。近 10 年来, 国际上对生物修复的研究十分活跃, 有些国家已将此技术用于污染土壤的实际修复, 并取得了显著成果^[4]。孙东平等^[5]的研究结果显示, 从油污土壤中筛选的高效石油降解菌, 对石油污染物的降解效果显著; 欧阳威等^[6]的研究结果显示, 高羊茅 (*Festuca arundinacea*) 对于提高微生物菌剂强化分解石油有一定的促进作用; 李方敏等^[7]研究表明玉米草适合在石油污染土壤上种植; 蔺昕等^[8]研究认为植物的吸收和代谢对多环芳烃 (PAHs) 的降解起很大作用; 刘继朝等^[9]通过盆栽试验研究了植物修复中原油田污染土壤的效果。这些研究更多的集中在室内实验的基础上, 现场原位修复或原位试验的研究鲜有报道, 笔者^[10]在陕北地区利用

纯微生物的方法进行了石油污染土壤原位修复试验,取得了良好的效果。笔者在以往研究的基础上,结合刘继朝等人针对中原油田土壤特点筛选的植物,开展植物-微生物生态原位修复中原油田石油污染土壤的研究,以期石油污染土壤的生物修复提供科学依据。

2 试验材料和方法

2.1 试验区背景

试验区位于中原油田某采油井场旁,该油井 1991 年因发生井喷爆裂事故,对周围的土壤产生污染。据调查,当时漏出原油和高盐水约 $200\text{m}^3 \sim 300\text{m}^3$,被污染农田 10 余亩。本次修复土壤岩性为土黄色粉土,其中含有少量 2~10mm 的小砾石或小姜石,土壤湿容重为: $1.72\text{g}/\text{cm}^3$; 自然含水量: 16.3%; pH 为: 7.4; 含盐量为: $1243\text{mg}/\text{kg} \sim 18650\text{mg}/\text{kg}$, 表层土壤本底石油含量为 $767.7\text{mg}/\text{kg} \sim 5028.8\text{mg}/\text{kg}$, 平均为 $2898.25\text{mg}/\text{kg}$; 土壤下部 25cm~50cm, 石油含量为 $313.6\text{mg}/\text{kg}$, pH 为 8.5; 含盐量为: $1243\text{mg}/\text{kg}$ 。

2.2 菌剂及来源

试验菌剂,假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、放线菌属 (*Actinomayces*)、真菌 (*fungus*) 类的霉菌 (*mold*) 青霉属 (*Penicillium*)、毛霉 (*Mucor*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 等菌群,均为试验区油污土壤中筛选分离出的高效石油降解菌。将这些降解菌放大培养 5-8 天后,在修复工作前将培养好的菌液制剂存放于干净的 25L 的 6 个塑料桶中。

2.3 配制营养液

MgSO_4 、 NH_4NO_3 、 CaCl_2 、 FeCl_3 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 。

2.4 所需植物

刘继朝等根据中原油田油污土壤的特点所做的植物修复油污土壤修复实验效果,确定黑麦草作为本次修复植物

2.5 添加剂

麦糠麦秸、尿素和复合肥

2.6 实验仪器

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、752N 紫外可见光栅分光光度计、电热干燥箱及各种化学分析用玻璃仪器。

2.7 分析方法

石油烃含量的测定: 土壤中石油烃含量的测定采用紫外分光光度法。

降解石油微生物细菌培养优选方法: 土壤微生物细菌培养用《土壤微生物研究法》^[11], 和参考文献^{[12]-[14]}介绍的方法, 细菌初步鉴定用《常见细菌系统鉴定手册》^[15]中的方法。

3 试验区的设置和试验步骤

3.1 试验场地的设置

分 3 个试验区, 1 号试验区为纯微生物修复区, 1 亩; 2 号试验区为黑麦草-微生物联合修复区, 0.4 亩; 3 号试验区为纯黑麦草修复区, 0.6 亩。

3.2 试验步骤

- 第一步, 将待修复的场地经过拖拉机 2 次翻耕, 3 次旋耕, 并平整;
- 第二步, 按每亩 700kg, 将准备好的麦糠麦秸均匀的撒到土壤表层, 将尿素和硝酸磷钾复合肥均匀撒到修复土壤表层 (尿素每亩 50kg、硝酸磷钾复合肥每亩 25kg), 用拖拉机进行旋耕, 深度尽量控制在 25cm 左右;
- 第三步, 将配置好的菌剂用喷雾器按每亩 50L 均匀的喷洒在 1 号、2 号试验区;
- 第四步, 按每亩 50L 将配置好的营养液, 用喷雾器均匀的喷洒在各个试验区;
- 第五步, 利用拖拉机反复旋耕, 翻耕深度尽量控制在 25cm 左右, 使得修复土壤与麦糠麦秸、化肥、菌液和营养液混合均匀;
- 第六步, 将 1 号试验区表面覆盖薄膜, 将准备好的黑麦草籽播种在 2 号、3 号试验区内;
- 第七步, 定期取样, 测试修复土壤中石油烃含量、pH、含水量、土壤易溶盐、 NH_4^+ 、 NO_3^- , 取样方法采用同一深度的梅花状 5 分法, 即在每个试验区内的东西南北中方位的同一深度各取同样量的土壤样, 混合均匀后再行测试。

4 试验结果与讨论

4.1 修复土壤中菌群分布状况

天然土壤中含有丰富的降解石油污染物的微生物, 将这些微生物经过驯化、放大培养, 投加到土壤中, 能克服其他外源菌所面临的存活力较弱、与土著微生物之间存在竞争关系等一系列问题, 且使土壤中

这类降解菌数目明显增加, 增强了降解石油污染物的能力。表 1 是在修复后第 99 天分析各试验区土壤微生物数量分布情况。

Table 1. Distribution of microbes numbers in soils samples after 99 days
表 1. 99 天土壤样品中微生物数量分布 (个/g)

试验区	细菌 (个/g)		真菌 (个/g)		放线菌 (个/g)	
	总数	嗜油菌	总数	嗜油菌	总数	嗜油菌
试验前	7.1×10^5	3.6×10^3	7.6×10^5	2.8×10^3	1.8×10^4	1.8×10^2
1 号	6.2×10^7	4.5×10^5	8.1×10^6	3.2×10^4	1.4×10^5	1.7×10^3
2 号	5.6×10^8	6.4×10^7	2.8×10^7	1.8×10^5	3.1×10^5	7.1×10^3
3 号	2.8×10^6	1.9×10^4	1.4×10^6	7.2×10^3	4.2×10^4	4.1×10^2

由表 1 看出, 1 号、2 号试验区中的嗜油菌数量明显比 3 号试验区的嗜油菌数量高, 比修复前的嗜油菌更高, 其原因在于撒入的菌液含有大量的嗜油菌, 且修复土壤中经过一段驯化能产生代谢污染物的能力, 使原本不能够转化或转化非常慢的污染物被代谢降解, 微生物的这种适应性促使嗜油菌数量增加^[16]。3 号纯植物区的微生物总数为修复前的 9 倍, 这说明植物的

根际效应促进了土壤中微生物的生长繁殖, 同时所加入的营养液、化肥等对微生物也具有激化的作用。

4.2 修复土壤中石油的去除率

分别在播种 0d、3d、10d、18d、28d、36d、44d、56d、76d 和 99d 取土壤样品测试, 结果见表 2 和图 1。

Table 2. Chang of degradation rates with time in oil contaminated soils of different plots(%)
表 2. 各试验区石油降解率随时间变化 (%)

试验区	0 天	3 天	10 天	18 天	28 天	36 天	44 天	56 天	76 天	99 天
1 号	0	11.7	15.43	18.35	25.12	29.27	27.96	46.37	54.78	57.34
2 号	0	12.4	17.89	22.34	29.47	33.13	38.34	50.12	63.21	67.38
3 号	0	5.1	5.89	10.03	20.17	25.14	27.19	41.45	39.26	43.27

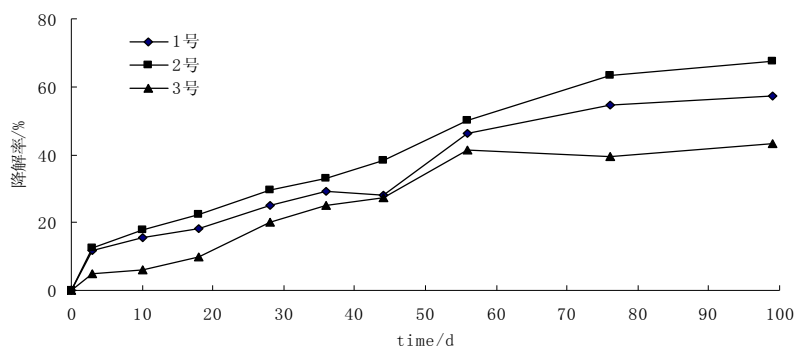


Figure 1. Chang of oil degradation rates with time in solis of different plots

图 1. 各修复区降解率随时间变化

从表、图可知, 植物与微生物联合方法对石油污染土壤具有明显的修复效果, 第 99 天石油烃降解率达到了 67.38%, 纯微生物的修复效果也比较明显, 第 99 天降解率达到了 57.34%, 说明菌液的施加加速了生物修复的速度; 纯植物试验区, 第 99 天石油烃的降解率

在 43.27%, 说明黑麦草对石油污染土壤也具有修复功能。

微生物对石油污染物代谢的生理过程一般通过接触并吸附石油、分泌胞外酶、石油污染物的吸收及胞内代谢完成。它降解石油的关键是氧化酶对石油的氧

化^[17]。1号、2号试验区在第3天污染土壤中石油烃降解率就达到了11.7%以上,而3号试验区石油烃降解率明显低于这两个试验区,说明加入的优化菌液修复作用速度很快,其适应期1-3天;76d后1号、2号试验区石油降解率增加变缓主要是由于石油中易被微生物所利用的组分逐渐消耗所致。

植物根际有着特殊的物理和化学性质,其修复功能主要体现在植物根系的吸收、转化作用及分解有机污染物的作用^[18]。第3天至18天期间,3号试验区中污染土壤中石油烃降解率虽低但仍在5%以上,这是由于加入的营养液、化肥、麦糠麦秸以及翻耕等综合作用,为原有土壤中的微生物提供了营养物质和氧气,激活了原有土壤中微生物对其中的石油烃的降解作用,第28天后,油污土壤中石油烃降解率明显增加,说明植物对油污土壤起到修复作用。

另外,1号试验区第44天和3号试验区第56天石油烃降解率数值有突变现象,这可能与取样的不均匀性有关,也反映了土壤物质成分的不均一性和复杂性。

4.3 试验过程对下层土壤的影响

修复第99天,对试验区下部土壤50cm深度处取样测试石油烃、易溶盐、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 含量,结果见表3。

Table 3.Oil contents,contents of soluble salt, NH_4^+ , NO_3^- and Cl^- in different plots after experiments(50cm)

表3. 试验后各区土壤中石油烃、易溶盐、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 Cl^- 等含量(50cm)

试验区	石油含量 (mg/Kg)	易溶盐 (mg/Kg)	NH_4^+ (mg/Kg)	NO_3^- (mg/Kg)	Cl^- (mg/Kg)
试验前 (对照)	313.6	1243	9.18	31.23	932.33
1号	310.78	1289	11.83	32.48	1017.02
2号	294.37	1301	7.46	29.27	901.87
3号	311.67	1278	12.34	30.18	890.78

由表3可知,修复层的下部土壤石油烃含量未有明显增加,说明修复层土壤中石油没有向下扩散均被降解;易溶盐、 NO_3^- 、 Cl^- 含量变化均为变化不大,说明 NH_4^+ 、 NO_3^- 、磷等等易溶盐营养物质只有极小部分随水而进入下部土层。这为今后此类修复工作对营养物质的要求和添加方法具有重要的意义。

4.4 修复技术的控制因素

本次试验的修复技术是充分优化利用原位微生物菌群,辅以植物方法并与地质环境相结合,以微观效应改变宏观环境的原位修复技术。应用该技术的关键

是微生物和植物的相互结合、相互依存、相互作用和调控。调控因素主要有温度、水、氧气、营养元素、地质环境的改善等等。

4.4.1 土壤温度的调控

温度是影响微生物生长与存活重要因素之一,微生物的活动强度、生化作用都与此相关。温度的过高或过低都可抑制生长或导致微生物死亡,环境中的微生物均在一定的温度范围内生存,温度的适中可使细菌细胞中的生物化学反应速率加快。试验区强化的微生物菌群大多为中温微生物(13-45℃),25--38℃为最适生长温度。本次试验初期,1号试验区(纯微生物试验区)地表覆盖薄膜,就是为了保持土壤中昼夜温差不至变化较大,而2号和3号试验区为了植物的生长,未覆盖薄膜。测试修复阶段地表的最高和最低温度结果表明,该地区地表最高温度在7月至9月大多为35℃以上,最低温度均大于20℃,昼夜温差不大。因此,试验期间不用调控试验区土壤温度,修复效果也是很好的。但是如在其它季节就需要采取措施增温保温等。通过此次修复过程,也可得出在该地区开展微生物修复技术的最佳温度时期应在每年的6月下旬—9月中旬,使土壤温度保持在25℃以上,能保证微生物细菌的活力和繁殖力。

4.4.2 土壤中氧的调控

氧的供应成为微生物细菌降解有机物过程的重要调控因子之一。环境条件的调控包括氧气的供给,供氧量的多少能影响微生物细胞内许多酶的活性和细胞的呼吸作用,控制着微生物的生长和对有机物的降解能力。本次修复主要从四个方面对土壤氧的供给进行了调控,首先是充分翻耕试验土壤层,使其充分与大气混合。其次是保证试验土壤具有一定的含水量,使含水量保持在20%左右,水中提供的氧。另外,试验区土壤中添加麦糠麦秸,该类添加剂不仅廉价易取,并能为土壤补充营养元素,而且对修复层土壤进行了改良增大了蓬松性和通透性,使空气中的氧容易进入。加入的含氧营养元素 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4NO_3 、 NO_3^- 等也提供了大量的氧。上述调控措施为微生物降解土壤中的石油提供了充分的氧源。保证了微生物细菌在降解土壤中石油所需要的氧气。

4.4.3 营养元素的供给

营养元素是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 微量元素等等作为营养物质需要进行补充和调控。因此,利用配置的营养液对试验区土壤进行了 N、P、S、K、Ca、Mg、Fe 等元素的补充和调控;同时,尿素和复合肥中也含有所需的大量营养元素,以及添加的麦糠麦秸也补充其它生物素和营养盐。

5 结论

5.1 土壤中菌群分布状况

将油污土壤中具有降解石油能力的微生物,经过驯化、放大培养,投加到试验区中。由于撒入的菌液含有大量的嗜油菌,且修复土壤中经过一段驯化能产生代谢污染物的能力,原本不能够转化或转化非常慢的污染物被代谢降解,使得 1 号、2 号试验区中的嗜油菌数量明显比 3 号试验区的嗜油菌数量高,比修复前的嗜油菌更高。

5.2 修复效果

植物-微生物联合方法、纯微生物方法和纯植物方法对石油污染土壤具有明显的修复作用,其中的石油烃降解率均在 40%,以植物-微生物联合方法修复效果为最佳,其中石油烃降解率达 67.38%;本次投加的菌剂在中原地区有 1-3 天的适应期,植物的修复功能在 18 天以后才充分体现。

5.3 对下部土壤的影响

修复层的下部土壤石油烃含量未有明显增加,易溶盐、 NO_3^- 、 Cl^- 等易溶营养物质只有极小部分随水而进入下部土层。

5.4 影响因素的控制

修复期选择在 6-9 月,当地最低气温 25°C 以上,是修复的最佳气温区间;翻耕作用、添加的麦糠麦秸、营养液以及化肥提供了大量的氧,增强了微生物的生长的降解能力;同时,配置的营养液、添加的麦糠麦秸、化肥提供了大量的营养元素。

总之,原位微生物生态修复技术在野外原位石油

污染土壤修复效果是显著的,并具有处理方法简单、修复效果好、无二次污染等优点。利用微生物生态的观点探索我国污染土壤修复提供经济有效的技术方法,对人类的可持续发展具有一定的实际意义。

References (参考文献)

- [1] Chen Hejian. Permeability and degradation rule of crude oil in the soil[J]. Environmental protection of oil & gas fields, 2000,10(4):14-15.
- [2] Lv Zhipin, Cheng Longfei. The Influence on corn growth caused by petroleum concentration of soil contaminated by petroleum[J]. Environmental protection of oil & gas fields, 2001,11(1):36-237.
- [3] Sun Tieheng, Zhou Qixing. Pollution ecology[M]. Beijing: Science Press, 2001: 309-368. (Ch).
- [4] Carrawayjw, Doylejr. Innovative Remedial action at a wood-treating superfund site[J]. Tappi Journal, 1991,74(7):113-118.
- [5] Sun Dongping, Hu Lingyan, Zhou Lingli, et al. A compost process for oil-contaminated soil by high efficiency petroleum degrading microorganisms[J]. Environmental Science & Technology, 2007,30(6):86-89.
- [6] Ou Yangwei, Liu Hong, Yu Yongyong, et al. The combined effects of tall fescue (*Festuca arundinace*) phyto-remediation and bio-augmentation on treatment of oil-contaminated soil [J]. Chinese journal of environmental engineering, 2006,7(1):94-97.
- [7] Li Fangming, Yao Jinlong, Wang Qionshan. Screening of plants for phytoremediation of petroleum contaminated soils [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006,22 (9):429-431.
- [8] Lin Xin, Li Peijun, Tai Peidong, et al. Research progress in phytomicrobial remediation of petroleum-contaminated soil[J]. Chinese journal of ecology, 2006,25(1):93-100.
- [9] Liu Jichao, Zhang Yanping, Zou Shuzeng. Effects of oil-contaminated soil on the germination and growth of plant seedling[J]. Bulletin of soil and water conservation, 2009,29(3):123-126.
- [10] Chen Li, Zhang Fawang, Zhang Sheng, et al. Experimental study of in-situ geomicrobial remediation for oil contaminated soil in North Shaanxi Province[J]. Journal of soil and water conservation, 2009,23(2):162-165.
- [11] Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. Methods for Studying Soil Microbial[M]. Beijing: Science Press, 1985: 51-59.
- [12] Lin Li, Yang Huifang, Jia Shengfen. Study on bioremediation of petroleum-polluted soil[J]. Shanghai Environmental Sciences, 2000,7:325-329.
- [13] Zhang Hairong, Li PeiJun, Sun Tieheng, et al. Bioremediation on 4 soils contaminated by petroleum oils using prepared bed processes[J]. Journal of agro-environment science, 2001,20(2):78-80.
- [14] He Yi, Wu Hai, Wei Wei. Bacteria-Based bioremediation technique for oil-polluted soil [J]. Soils, 2005,37(3):338-340.
- [15] Dong Xiuzhu, Cai Miaoying. Common manual of systematic bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001,97-390.
- [16] Zhou Qixing, Song Yufang. Remediation of contaminated soils: Principles and methods[M]. Beijing: Science Press, 2004,6-14.
- [17] Liu Guoliang, Su Youming, Gu Shumin, et al. New progress in bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. Chemistry & Bioengineering, 2008,25(8):84-88.
- [18] Li Yunhui, Wen Ronglian, Mo Cehui. Advances in Phytoremediation of Organic Pollutants in Soil[J]. Guangdong agricultural sciences, 2007(12):96-98.