

石油降解固体菌肥的制备和应用研究

汪志荣, 朱小燕, 王伟荔, 王静兰, 华亚, 韩志捷 (天津理工大学环境科学与安全工程学院, 天津 300384)

摘要 [目的]研究石油降解固体菌肥的制备和应用。[方法]以从大港石油污染土壤筛选的石油降解细菌菌群为基础,将液体石油降解菌剂接种到麸皮和锯末质量比为1:1的固体介质中培养,通过温度、接种量、培养时间对固体菌肥影响,制备一种活菌数量较高的石油降解固体菌肥,将其应用于不同含盐量的石油污染土壤研究其修复效果。[结果]通过分析不同温度、接种量对固体菌肥的特性的影响确定其短期内的最佳培养条件为:培养温度37℃、接种量为15%、培养3d,获得固体菌肥的活菌量可达 1.95×10^{10} cfu/ml;将石油降解固体菌肥进行60d石油污染土壤修复表明,在含盐量为2.0、6.1 g/kg的2种土壤中,60d修复期结束后,石油降解率分别达52.91%、34.74%。[结论]该固体菌肥适宜用于轻度盐土的石油污染土壤,并取得较好的降解效果。

关键词 固体菌肥;石油降解率;制备;应用

中图分类号 S181.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)06-01810-03

Study on the Preparation and Application of the Petroleum-degrading Solid Fertilizer

WANG Zhi-rong et al (College of Environmental Science and Safety Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384)

Abstract [Objective] The research aimed to study the preparation and application of the petroleum-degrading solid fertilizer. [Method] Take the oil-degrading bacterial community which screening petroleum-contaminated soil in Dagang as the foundation, the petroleum-degrading bacteria were inoculated into the solid medium containing the bran and the sawdust (the mass ratio of 1:1), by temperature, inoculation amount and incubation time effect on solid fertilizer, preparing a higher number of active bacterium oil-degrading solid fertilizer, applied to different amounts of petroleum-contaminated soil salinity to study its restorative effects. [Result] By analyzing the different temperature and inoculation amount of the characteristics of the solid fertilizer to determine the optimal culture conditions for its short-term: culture temperature 37℃, inoculation amount 15%, cultured 3 d. The amount of active bacteria can reach 1.95×10^{10} cfu/ml. The solid fertilizer was used for remediation of crude oil contaminated soil, the experimental results show that under different salinity conditions, the petroleum-degrading rate in crude oil contaminated can respectively reach 52.91%, 34.74% after two months of remediation. [Conclusion] The solid fertilizer is suitable for the low salt of petroleum-contaminated soil, and the effect of degradation is very well.

Key words Solid fertilizer; Petroleum-degrading rate; Preparation; Application

随着石油使用量的不断增加,在石油生产、贮运、加工及使用过程中,由于井喷、泄漏、检修等原因导致石油烃类的溢出和排放,造成土壤石油污染^[1],给油田及周围带来了严重的环境问题。而微生物修复具有不破坏植物生长的土壤环境;对污染物能够降解完全,并将有机物转化为无害的CO₂和H₂O,避免二次污染;处理形式多样;成本明显低于物理和化学法处理等优点,已经越来越受到人们的重视^[2-5]。由于液体石油降解菌群在保存、运输和活性保存等方面存在诸多问题,因此,将微生物固定在载体上以获得高效、易于保存的固体菌肥是生物修复的一个很有前景的方向。

目前,关于石油污染土壤修复的研究大部分集中在石油降解菌株的筛选、石油降解机理以及土壤修复工艺方面,这些研究逐步证实了石油污染土壤微生物修复的可行性,但石油降解固体菌肥的研究较少。向石油污染土壤中投加高效生物菌肥是一种切实可行的原位修复技术,该技术在国外起步较早,已开发出多种商品生物菌剂^[6],并应用于实际的修复工程中,取得良好的修复效果^[7-8]。在我国研究较多的微生物菌肥主要涉及根瘤菌肥料、固氮菌肥料、磷细菌肥料,并制定了微生物肥料的农业行业标准^[9]。关于石油污染土壤修复的石油降解固体菌肥的相关报道较少,在我国处于研发

阶段,但研究表明修复效果较好。胥九兵等将2种石油降解细菌菌剂接种到草炭和麸皮的固态培养基中培养,制备BC-E和BC-I2种菌剂,并采用研制的菌剂对石油污染土壤进行修复试验,结果表明1个月污染土壤中的石油降解率可达45%^[10]。于勇等将菌液、油砂、锯末和发酵后的农家肥混合,进行降解试验,发现经过56d的处理,菌剂强化处理单元最终油去除率达47.4%^[11]。笔者以从大港石油污染土壤筛选的石油降解细菌菌群为基础,选择麸皮和锯末作为固态培养的营养源和载体,通过温度、接种量、培养时间对固体菌肥影响,制备一种活菌数量较高的石油降解固体菌肥,将其应用于不同含盐量的石油污染土壤研究其修复效果,以期在现场石油污染盐碱土壤微生物修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验选材。试验用土壤取自天津理工大学校园土,加入原油配置成石油浓度为5 500 mg/kg的石油污染土壤。液体菌剂为高效石油降解细菌菌群,菌群经该实验室通过采自天津大港油田石油污染土壤,筛选驯化后获得^[12]。麸皮是优良的固态发酵的天然原料,含有易于微生物利用的丰富的碳氮源;锯末持水力强,通透性好,有利于氧的传输,为微生物的生长提供有利的降解条件,同时也是良好的土壤改良剂,因此选择麸皮和锯末为菌肥的固体介质。

1.1.2 培养基的选择。试验过程中使用的液体LB培养基为蛋白胨10g、牛肉膏3g、NaCl 5g、蒸馏水1 000 ml、pH 7.0,固体LB培养基为蛋白胨10g、牛肉膏3g、NaCl 5g、蒸馏水1 000 ml、pH 7.0、琼脂18g。

基金项目 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(11JCZDJC25-000);国家级大学生创新创业训练计划项目(201310060008)。

作者简介 汪志荣(1965-),女,辽宁大连人,博士,教授,从事水土资源利用和环境修复研究。

收稿日期 2014-01-28

1.2 石油降解固体菌肥的制备方法 将保存的高效石油降解菌群活化,以灭菌的麸皮、锯末为固体介质进行培养,通过研究不同接种量、温度、培养时间对固体菌肥特性的影响确定最优培养条件,以此制备固体菌肥,为生产实践奠定基础。将石油降解菌群按 10%、15%、30% 的接种量分别接入灭菌的固体介质(麸皮和锯末质量比为 1:1)中,维持 60% 含水率,分别在室温(春末夏初 11~16℃)下、37℃ 下培养并测其在培养过程中的 pH 和细菌数量。

1.3 石油污染土壤修复试验设计 为研究固体菌肥对石油污染盐碱土壤生物修复的作用,进行不同土壤含盐量下的生物修复模拟试验。试验在盆钵(直径 15 cm、高 15 cm)中进行,每盆装土 1 kg,固体菌肥 100 g,每一组做 2 个平行样,石油污染土壤的含盐量设计为轻度盐土 2.0 g/kg、重度盐土 6.1 g/kg,并使土壤水分维持在 20% 左右,在自然温度下进行生物修复。定期采样并测定土壤中石油含量、微生物数量、含盐量、pH。

1.4 分析测定方法

1.4.1 固体菌肥 pH 与细菌数量测定。称取 10 g 固体菌肥加到 90 ml 灭菌的蒸馏水中,用 pH 计测定混合液的 pH;再稀释到合适的浓度,用平板计数法测定活菌数量^[13]。

1.4.2 土壤指标的测定。土壤中石油含量采用三氯甲烷萃取-重量法测定,微生物计数采用平板计数测定,含盐量采用重量法^[14]。

2 结果与分析

2.1 石油降解固体菌肥制备分析

2.1.1 固体菌肥培养过程中 pH 的变化。从图 1 可以看出,对于室温、37℃,在接种量 10%、15%、30% 的条件下,pH 呈现相似的规律,随着培养时间的增加 pH 不断上升;在 7 d 的培养过程中,在 2 种温度下,3 个接种量的(接种量由低到高)pH 变化幅度均不大,室温下分别是 0.45、0.14、0.12,37℃ 下分别是 0.39、0.44、0.44。2 种温度下,固体菌肥中 pH 均升高,造成 pH 升高的原因可能是由于微生物生长需要适宜的酸碱环境,在利用固体介质和培养基中的营养物质过程中,产生一些物质导致了菌液中 pH 的升高,以此营造有利的生长环境;pH 变化幅度不大,主要原因可能是固体介质本身具有缓冲能力,使其在微生物适宜生长的 pH 范围内波动。可以初步判断在整个固体菌肥培养过程中,温度、接种量对菌液中 pH 具有一定的影响。

2.1.2 固体菌肥培养过程中细菌数量的变化。从图 2 可以看出,在不同培养温度(室温和 37℃)和不同接种量的大小情况下,固体菌肥中的微生物数量随培养时间的变化趋势出现相似的规律,即在 0~7 d 微生物数量呈现迅速上升并逐渐达到稳定的趋势,均可达 10^9 cfu/ml;细菌在 3 个接种量下,均有较为理想的长势,培养到 1 d 时微生物在数量级上均保持在 10^9 cfu/ml,这在一定程度上说明将微生物接入到固体介质中,微生物能够较快适应该体系,并开始利用其中的营养物质提供自身生长。

2.1.2.1 不同培养温度下。从不同培养温度对比上看,在 3

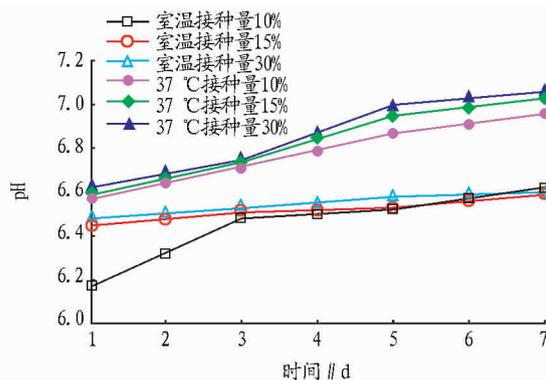


图 1 培养过程中固体菌肥 pH 随着培养时间的变化

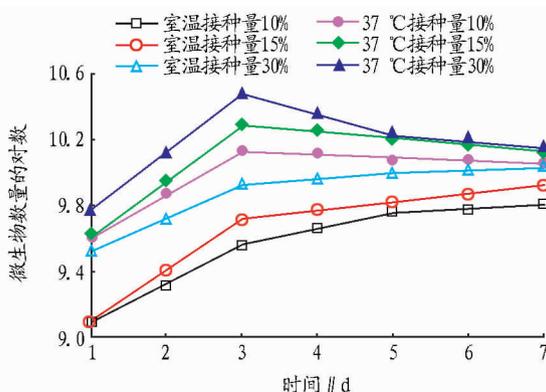


图 2 培养过程中固体菌肥微生物数量的变化

种接种量(分别为 10%、15%、30%)下,在 7 d 培养过程中,37℃ 培养下的微生物数量均比室温下的高,说明 37℃ 较室温更适宜微生物的生长;在 2 种温度下,0~3 d 内微生物数量上升均很快,这在一定程度上说明将微生物接入到固体介质中,微生物能够较快适应该体系,并开始利用其中的营养物质提供自身生长。在室温培养,3 种接种量条件下,在 0~3 d 微生物数量快速增加,3~7 d 趋向平衡,7 d 后均达 10^9 cfu/ml;在 37℃ 培养,3 种接种量条件下,在 0~3 d 微生物数量快速增加达到最大值,均达 10^{10} cfu/ml,3~7 d 有下降的趋势。造成这一现象的主要原因是初期微生物能够较快适应固体介质环境,利用其中的营养物质提供自身生长进行大量的繁殖;在 3~7 d 时,可能是固体介质和培养基中的营养物质不能满足大量繁殖的微生物生长,微生物开始出现死亡呈现出下降的趋势。

2.1.2.2 不同接种量下。从接种量对比看,在 2 种温度、3 种接种量(分别为 10%、15%、30%)下,菌肥在 7 d 培养过程中,随着接种量增加微生物数量均略有增加。在室温培养,3 种接种量条件下,在 7 d 培养过程中微生物数量不断增加,7 d 后微生物数量分别达 6.40×10^9 、 8.40×10^9 、 1.06×10^{10} cfu/ml;在 37℃ 培养,3 种接种量条件下,在 3 d 达到最大值,分别为 1.35×10^{10} 、 1.95×10^{10} 、 3.00×10^{10} cfu/ml。2 种温度下,接种量由 10% 增加至 30%,微生物数量虽有增加,变化幅度均不大;但增加接种量,能够缩短菌种生长的延滞期,从而缩短固体菌肥的培养时间。因此,选择接种量 15% 作为最佳接种量。

综上所述,在 37 ℃、接种量为 15% 的条件下培养固体菌肥,3 d 内微生物数量可达 10^{10} cfu/ml,7 d 后微生物数量有所下降,微生物数量可达 10^9 cfu/ml。在室温培养下,7 d 后微生物数量也可达 10^9 cfu/ml。因此,在生产实践中,可以根据固体菌肥的具体应用情况,选择固体菌肥的培养温度。在短期内制备固体菌肥的最佳培养条件为培养温度 37 ℃、接种量为 15%、培养 3 d。

2.2 石油降解固体菌肥的石油污染土壤修复应用研究 将石油降解固体菌肥应用于石油污染盐碱土壤中,研究其修复能力。将固体菌肥以 10% 的接种量添加到不同含盐量的石油污染土壤中,根据盐渍化土壤的划分标准^[15],石油污染土壤的含盐量设计为轻度盐土 2.0 g/kg、重度盐土 6.1 g/kg,进行 60 d 的生物修复,测得各时期土壤石油含量、细菌数量、含盐量、pH。

2.2.1 土壤中石油降解率。从图 3 可以看出,在不加菌肥的土壤(作为空白对比)中,石油在土著微生物作用下逐步降解,60 d 的修复期结束后,含盐量为 2.0、6.1 g/kg 的 2 种土壤中石油降解率分别达 11.27%、8.09%。添加固体菌肥后,在 2 种盐分条件下,随着时间的增加,土壤中石油降解率在不断的增加;在 0~35 d 内,石油降解率变化幅度较大,在 35~60 d 内石油降解率趋向平稳;在低盐条件下的石油降解率高于高盐条件,在 15 d 时,2 种含盐量下的石油降解率分别为 23.09%、11.58%,说明在短期内微生物对石油有一定程度的降解效果;在第 35 天时,2 种盐分的土壤中石油降解率分别达 46.00%、28.13%;50 d 时,石油降解率变化幅度开始变小,石油降解率分别达 50.36%、32.90%,低盐条件下的石油降解率比高盐条件下高 17.46%;60 d 修复期结束后,石油降解率分别达 52.91%、34.74%。

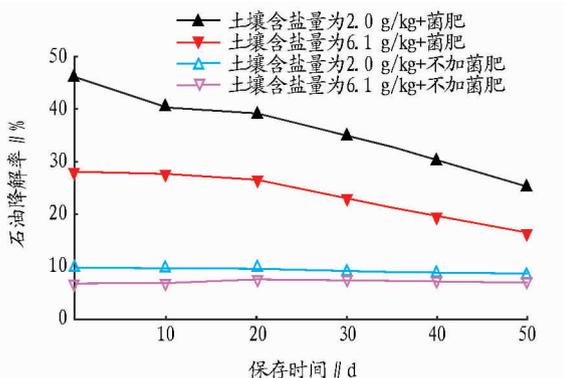


图3 土壤中石油降解率随时间的变化

2.2.2 土壤中微生物数量变化。由图 4 可知,在 60 d 的修复期内,在 2.0、6.1 g/kg 2 种含盐量条件下,在不加菌肥的土壤中,在 25 d 时微生物数量达最大值,分别是 4.8×10^5 、 3.3×10^5 cfu/ml;之后微生物数量均出现了不同程度的降低;60 d 修复期结束后,微生物数量分别为 7.9×10^4 、 4.3×10^4 cfu/ml。添加固体菌肥后,微生物数量在 15 d 时达最大值,分别是 7.7×10^7 、 6.9×10^7 cfu/ml,之后微生物数量开始下降;60 d 修复期结束后,微生物数量分别为 4.8×10^6 、 6.9×10^5 cfu/ml。可见在 60 d 的修复期内,低盐条件下的微生物数

量略高于高盐条件,说明微生物更适宜低盐条件,主要原因是固体菌肥中的微生物受盐胁迫不利于其生长。

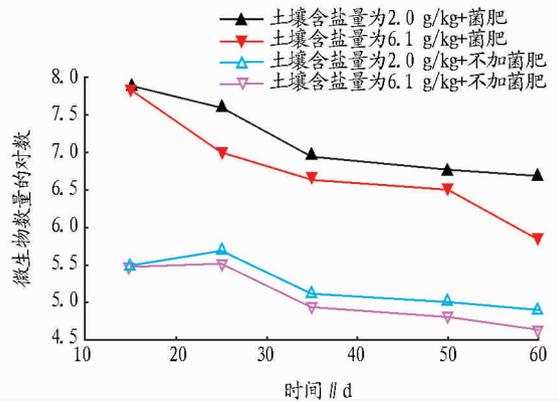


图4 土壤中微生物数量随时间的变化

2.2.3 土壤中含盐量变化。从图 5 可以看出,在 2.0、6.1 g/kg 2 种含盐量条件下,不加菌肥的土壤中,随着时间的推移,土壤中的含盐量出现了不同程度的降低,但变化幅度较小,分别下降 0.583、1.067 g/kg;添加固体菌肥后,土壤中的盐分略有增加,盐分含量在 15 d 达到最大值,分别是 3.250、6.113 g/kg,之后土壤中盐分含量开始不同程度的下降。由于定期浇水,使土壤中的盐分发生改变,到 60 d 修复期结束后,含盐量分别为 2.275、5.317 g/kg。

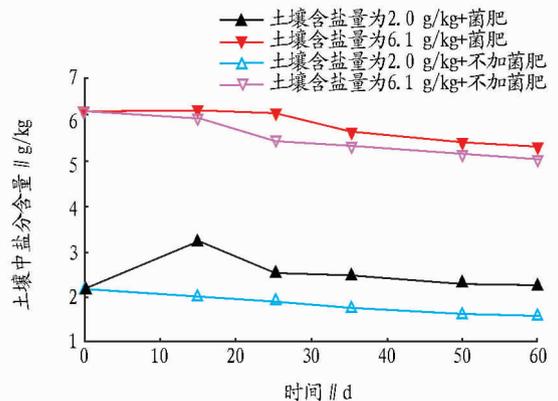


图5 土壤中盐分含量随时间的变化

2.2.4 土壤中 pH 变化。由图 6 可知,在 2.0、6.1 g/kg 2 种含盐量条件下,在 60 d 的修复期内,在不加菌肥、添加固体菌肥的土壤中,随着时间的推移,土壤中的 pH 出现了不同程度的降低,但变化幅度较小;高盐条件下的 pH 略高于低盐条件。pH 降低的主要原因可能是在石油降解过程中石油降解菌产生酸性代谢产物,在土壤中不断积累,导致 pH 降低。

3 结论

(1) 通过将液体石油降解菌剂接种到麸皮和锯末质量比为 1:1 的固体介质中培养,以此来制备石油降解固体菌肥。通过分析不同温度(室温、37 ℃恒温)、接种量(10%、15%、30%)对固体菌肥的特性的影响,确定其短期内的最佳培养条件为:培养温度 37 ℃、接种量为 15%、培养 3 d,获得固体

(下转第 1832 页)

引导作用。一是针对企业牌意识较为淡薄的问题,加强对企业的引导,帮助企业改变陈旧的营销观念,使品牌营销理念成为企业推广产品、增加收入的重要思想保障。二是建立并实施农产品品牌建设与营销的优惠政策,让企业真正体会到农产品品牌效应带来的效益,积极投身到农产品的品牌创建中去。

4.2.2 以“地域优势”为基础,以“三品一标”为导向,打造农产品品牌独特的形象。由于农产品品牌本身形象具有“形象特殊性、地域特殊性和自然条件依赖属性”等特殊特性,所以在进行品牌形象塑造时,应该以地域优势为基础,以“三品一标”为导向,进行农产品品牌形象的塑造。同时又由于品牌的个性是由一致性和识别性两大要素组成,企业在进行品牌塑造时在既要注重保持一致性,又要考虑到品牌是否与消费者有效沟通、进行情感交流达成独特的识别特性,完成品牌的个性塑造,为品牌的差异化创造有利条件^[5]。

4.2.3 打造农产品品牌建设系统营销运作模式。对于企业而言,应充分利用各种社会资源进行品牌传播,不断地进行自我推销,通过建立全面的品牌系统运作模式,实现螺旋式上升的可持续发展格局。可以主要通过两种模式进行,一是与高校、科研机构、企业间的选择性合作,在提升品牌质量的目标下,实现互赢互惠;二是通过国家、省市事业单位与企业之间的品牌学术交流会议、访谈等平台,将企业的农产品品

牌逐步地推广出去,提高农产品品牌认可度、销售率。例如,山东55家农产品企业通过香港国际食品展将本地地区的500多种农产品推向了国际市场。

4.2.4 采取品牌延伸措施,不断拓展品牌范围。随着企业竞争压力的扩大,品牌已经从最初的识别功能、促销功能向信息传递、价值、形象等综合功能的转变。然而不同消费者关于对品牌功能的需求有所不同。为了进一步拓展市场,必须以核心品牌为中心,完善品牌体系,增强对购买者的吸引力。主要的对策就是通过品牌延伸手段来拓宽品牌范围,向顾客提供同一品牌不同功用和形象的农产品。例如四川省农业厅将四川广元7种地方特产组合打造为“广元七绝”,“广元七绝”一个品牌就延伸到了7种地方名产,节约了品牌建设及营销成本。

参考文献

- [1] 余明阳, 杨芳平. 品牌学教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2009: 5.
- [2] 李隽. 农产品品牌营销探析[J]. 广西职业技术学院学报, 2010(5): 74-76.
- [3] 郑智忠. 品牌建设中的问题和对策研究[J]. 商业研究, 2009(5): 88-90.
- [4] 费建. 农产品品牌建设的市场保障体系研究[J]. 中国农民合作社, 2013(2): 44-46.
- [5] 杜明. 用品牌建设促进“一村一品”发展的对策建议——以山西省大同市为例[J]. 山西农业科学, 2013(2): 188-190.

(上接第1812页)

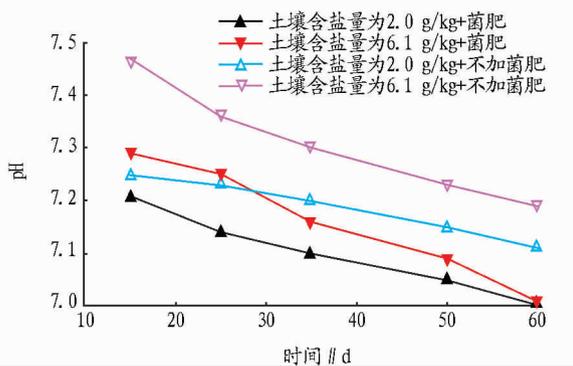


图6 土壤中pH随时间的变化

菌肥的活菌量可达 1.95×10^{10} cfu/ml。

(2) 将石油降解固体菌肥应用于不同含盐量的石油污染土壤中, 对其进行了60 d的生物修复, 结果表明, 在含盐量为2.0、6.1 g/kg的2种土壤中, 60 d修复期结束后, 固体菌肥对石油的降解率分别达52.91%、34.74%, 该固体菌肥适于轻度盐碱石油污染土壤; 其修复效果明显优于自然降解, 固体菌肥发挥了显著作用。

(3) 固体菌肥的应用受外界因素影响较大, 温度、土壤湿度、盐碱性、空气的流通性的差异均会不同程度地影响到固体菌肥对石油的降解能力。因此, 在未来的实际应用时还需要考虑固体菌肥的最佳使用方法、条件, 使固体菌肥发挥最大效力。

参考文献

- [1] 齐永强, 王红旗. 微生物处理土壤石油污染的研究进展[J]. 上海环境科学, 2002, 50(20): 4125-4128.
- [2] 程国玲, 李培军. 石油污染土壤的植物与微生物修复技术[J]. 环境工程学报, 2007, 1(6): 91-96.
- [3] 刘五星, 骆永明, 滕应, 等. 石油污染土壤的生物修复研究进展[J]. 土壤, 2006, 38(5): 634-639.
- [4] 汪洋, 史典义, 聂春雨, 等. 石油污染土壤的微生物修复技术[J]. 生物技术, 2009, 19(2): 94-96.
- [5] 吴凡, 刘训理. 石油污染土壤的生物修复研究进展[J]. 土壤, 2007, 39(5): 701-707.
- [6] MARK A S, JAMES S B, CHERYA P, et al. Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland[J]. Ecological Engineering, 2004, 22: 263227.
- [7] GENTILI A R, CUBITTO M A, RODRIGUEZ M S. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes[J]. Int Biodeterior Biodegrad, 2006, 57: 222-228.
- [8] DZUL-PUC J D, ESPARZA-GARCIA F, BARAJAS-ACEVES M, et al. Benzo[a]pyrene removal from soil by Phanerochaete chrysosporium grown on sugarcane bagasse and pine sawdust[J]. Chemosphere, 2005, 58: 1-7.
- [9] 农业部中国农科院土肥所. NY 227-94, 微生物肥料[S]. 北京: 中国标准出版社, 1994.
- [10] 胥九兵, 迟建国, 邱维忠, 等. 石油降解菌剂的研制及其在石油污染土壤修复中的应用[J]. 生物加工过程, 2009, 7(6): 21-24.
- [11] 于勇勇, 丁爱中, 欧阳威, 等. 微生物菌剂强化处理油砂[J]. 化工环保, 2006, 26(3): 218-221.
- [12] WANG Z R, LI Y N, ZHU X Y, et al. Experimental Study on Oil-degradation Microbial Consortium from Oil-contaminated Soil by Different Enrichment and Domestication[J]. Advanced Materials Research, 2013, 779/780: 1304-1308.
- [13] 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭. 环境工程微生物检验手册[K]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 216-21.
- [14] 中国林业科学研究院林业研究所森林土壤研究室. 森林土壤水溶性盐分分析 LY/T 1251-1999[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [15] 王遵亲, 祝寿泉, 俞仁培. 中国盐渍土[M]. 北京: 科学出版社, 1993.