

漆酶修复石油污染土壤优化实验

郑红婷, 张秀霞*, 钟哲森, 李振伟, 尚琼琼

(中国石油大学(华东)化学工程学院环境与安全工程系, 山东 青岛 266580)

摘要:针对土壤的石油污染问题,在花盆中模拟原位修复实验,采用单因素实验考察有机质与全氮含量比(C/N)、含水率及漆酶活性对石油烃降解率的影响。通过响应曲面法设计实验,建立二次多元回归方程预测模型,确定修复的最佳条件。结果表明:在干旱条件下漆酶可以增强石油烃的生物修复效果。软件预测模型显著且具有准确性,在C/N为12.35:1,漆酶活性为15.03 U/g,含水率为12.62%条件下,修复30 d后石油烃降解率为25.01%。对石油烃降解率影响的显著性从小到大依次为漆酶活性、含水率、C/N。

关键词:石油污染土壤;漆酶;响应面;石油烃降解;优化条件

中图分类号:X53

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2017)04-0109-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2017.04.026

Remediation optimization of oil-contaminated soil by laccase

ZHENG Hong-ting, ZHANG Xiu-xia*, ZHONG Zhe-sen, LI Zhen-wei, SHANG Qiong-qiong

(Department of Environmental and Safety Engineering, College of Chemical Engineering,
China University of Petroleum, Qingdao 266580, China)

Abstract: Based on the problem of oil-contaminated soil, the *in situ* remediation is conducted in flowerpots. The influences of carbon-nitrogen ratio, moisture content and laccase activity on oil degradation rate are investigated by single factor experiment. Then the response surface method is used to design the experiment, by which a prediction model of polynomial regression equation is obtained to determine the optimal parameter arrangement. Under the optimized parameter arrangement, the model is verified. The result shows that laccase can enhance the hydrocarbon degradation under the drought condition. The prediction model is significant and accurate. After remediation for 30 days, the hydrocarbon degradation rate is up to 25.01% when the carbon-nitrogen ratio is 12.35 to 1, the laccase activity is 15.03 U/g and the moisture content is 12.62%. The significance order of the impact on hydrocarbon degradation rate from low to high is laccase activity, moisture content and carbon-nitrogen ratio.

Key words: oil-contaminated soil; laccase; response surface method; oil degradation; optimal condition

由于石油开采、炼制、运输、储存、使用和事故性泄露造成的石油污染土壤已严重威胁到人们的生活^[1-2]。目前,治理石油污染土壤的方法主要有物理法、化学法及生物法,其中生物法的研究较为广泛^[1-4]。微生物治理技术近10几年来在国内外得到了较大发展,微生物可将石油烃作为生长所需碳源和能源进行代谢^[5],但其对pH、水分和养分要求严格^[1],且石油烃类污染物降解速度缓慢,效率低,降解范围有限,限制了此项技术的推广使用。漆酶作为一种多铜氧化酶,利用分子氧通过自由基催化氧化各种芳香族和非芳香族化合物^[6]。在催化氧化过程中,铜离子将得到的电子传递给O₂使之生成H₂O,使得反应体系中含水率增加,有利于微生物在土壤中的活动和氧气传递,提高生物修复效果^[7-9]。陈新芳^[10]探究了生物酶对含油污水的处理效果,结

果表明游离漆酶可以降解污水中石油烃类污染物;贾洪柏等^[11]通过实验证实了漆酶是与石油烃降解相关的主要因素,可以促进微生物对石油烃的降解,扩大微生物降解范围。研究表明,漆酶具有降解水中石油烃污染物的可行性,因此,可以推测漆酶对土壤中石油烃也会具有一定的降解作用。

响应面法(Response surface method)是在单因素实验基础上进行的,对响应曲面及等高线进行分析,利用多元二次回归方程拟合响应值与各因素间函数关系,得到最佳工艺条件,该方法在污染治理中有相应的报道^[12-13]。

笔者通过调节不同的有机质与全氮含量比(C/N)、含水率及漆酶活性,测定不同条件下漆酶修复石油污染土壤的效果,并通过响应面方法获得最佳条件,探讨漆酶对石油污染土壤的修复作用。

收稿日期:2016-10-25

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2014BM023);中国石油科技创新基金项目(2009D-5006-07-01);青岛市科技发展指导计划项目(KJZD-12-65-jch);中央高校基本科研业务费专项资金(11CX05011A);中国石油大学(华东)创新工程(YCXJ2016032);中央高校基本科研业务费专项资金资助(14CX06101A)

作者简介:郑红婷(1990-),女,硕士研究生,主要从事环境污染控制技术研究, zhenghongting2014@163.com;张秀霞(1966-),女,博士,教授,主要从事土壤污染修复工作,通讯联系人,0532-86983056, zhxiuxia@upc.edu.cn。

1 实验部分

1.1 实验材料

原土为校园内树根部分土壤,颜色呈黄褐色。将原土风干、破碎、过筛后加入正己烷稀释的原油搅拌均匀,通风放置 3 个月使正己烷完全挥发后得到配制的石油污染土壤,其外观呈浅黑色,有油味,较干燥,其理化性质如表 1 所示;实验用漆酶(Laccase)购自山东苏柯汉生物工程股份有限公司,为淡黄色固体粉末,适用 pH 范围是 4.5 ~ 6.5,温度范围是 30 ~ 65℃。

表 1 配制土壤理化性质

含水率/%	有机质/(mg·g ⁻¹)	全氮/%	速效磷/(mg·g ⁻¹)	石油烃/%	脱氢酶/(mg·g ⁻¹)	过氧化氢酶/[mL·(g·h) ⁻¹]
2~8	90~130	0.4~0.7	(1.76~3.2) × 10 ⁻²	3.48~5.37	28~30	0.67~0.73

1.2 主要设备

KQ-400KDB 型高功率数控超声波清洗仪,昆山市超声仪器有限公司生产;RJ-TDL-5A 型低速台式大容量离心机,无锡市瑞江分析仪器有限公司生产;HSX-250 型恒温恒湿培养箱,上海秣马恒温设备厂生产;UV-6000PC 型紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司生产。

1.3 单因素实验

选取漆酶活性、碳氮比及含水率 3 个因素,通过单因素实验考察 3 个因素对土壤中石油烃降解效果的影响,确定漆酶修复石油污染土壤的最佳条件。

(1) 在花盆中加入 500 g 过 60 ~ 80 目筛的实验土壤(每 2 个为一组平行样)并调节碳氮比为 10:1,含水率为 10%,加入漆酶以调节土壤漆酶活性分别为 10、12、14、16 U/g。在温度为 30℃,空气湿度为 55% 的恒温恒湿培养箱中培养 30 d,每隔 6 d 取样测定石油烃含量,计算石油烃降解率 η 。得到最佳漆酶活性。

(2) 调节土壤漆酶活性为 12 U/g,含水率为 10%,碳氮比分别为 5:1、10:1、15:1、20:1。在温度为 30℃,空气湿度为 55% 的恒温恒湿培养箱中培养 30 d。得到最佳碳氮比。

(3) 调节土壤漆酶活性为 12 U/g,碳氮比为 10:1,含水率分别为 5%、10%、15%、20%。在温度为 30℃,空气湿度为 55% 的恒温恒湿培养箱中培养 30 d。得到最佳含水率。

1.4 响应面优化实验

采用响应面优化 Box-Behnken (BBD) Design

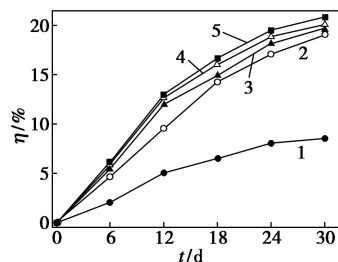
实验设计模型,以漆酶活性、碳氮比、含水率为因素,以石油烃降解率为响应值进行优化实验,最终确定石油烃降解效果最佳条件组合。

2 结果与讨论

2.1 单因素对石油烃降解效果的影响

2.1.1 漆酶活性的影响

在不同漆酶活性条件下,利用漆酶修复石油污染土壤 30 d,石油烃降解率随时间的变化情况如图 1 所示。



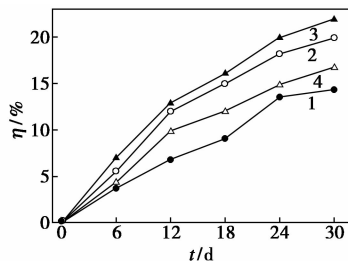
1—0 U/g;2—10 U/g;3—12 U/g;4—14 U/g;5—16 U/g

图 1 不同漆酶活性下石油烃降解率随时间的变化情况

从图 1 可以看出,石油烃降解率随着时间的增加而不断增加,修复后期增加速度较慢,且漆酶活性越高石油烃降解效果越好。当漆酶活性为 16 U/g,修复 30 d 后石油烃降解率可以达到 20.84%;漆酶活性为 14 U/g,修复 30 d 后石油烃降解率为 20.08%,与 16 U/g 时相比差别不大,说明石油烃降解效果并不是随着漆酶活性的增加而无限制的上升。漆酶作为一种多酚氧化酶,主要作用于酚类等物质,但是在介体存在时也可氧化非酚类物质,在一定程度上增加了微生物作用范围,进而提高了石油烃降解效果^[8,14-15]。

2.1.2 碳氮比的影响

在不同碳氮比条件下,利用漆酶修复石油污染土壤 30 d,石油烃降解率随时间的变化情况如图 2 所示。



1—5:1;2—10:1;3—15:1;4—20:1

图 2 不同碳氮比下石油烃降解率随时间的变化

由图2可知,石油烃降解率随着实验时间的延长有所增长,说明调节土壤营养比例对石油烃降解具有促进作用。碳氮比为5:1、10:1、15:1、20:1时,修复30d后石油烃降解率分别为14.34%、19.91%、21.91%、16.79%。石油烃降解率随着氮源的减少而增加,碳氮比为15:1时效果最好;之后碳氮比再增加石油烃降解效果反而降低。土壤中石油烃降解既与漆酶有关,又与土著微生物有关,当氮源严重不足时会抑制土壤系统中微生物的正常生长代谢^[3],降低产酶效率,不利于石油烃的去除。

2.1.3 含水率的影响

在不同含水率条件下,漆酶修复石油污染土壤30d,石油烃降解率随时间的变化情况如图3所示。

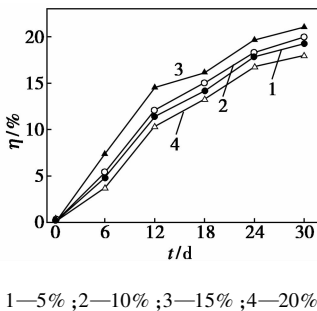


图3 不同含水率下石油烃降解率随时间的变化

从图3可知,在不同含水率条件下,随着修复的时间的延长石油烃降解率不断增加,在修复后期趋于平缓。当含水率为15%时,修复30d后石油烃降解率最大,为21.03%;含水率增加至20%左右时,石油烃降解效果反而下降。含水率增加在一定程度上可以提高土壤中氧气含量,有利于漆酶催化氧化反应^[16],同时可以促进酶与底物接触,降低有机质的抑制作用,提高污染物去除率^[17]。同时,土壤中微生物生长繁殖需要水分,含水率过低不能达到微生物的正常生活需求,呼吸作用减缓,不利于污染物降解^[3];水分会在土壤颗粒表面形成水化层,降低石油烃污染物在土壤上的黏附^[12],促进酶及微生物与污染物的接触,提高石油烃降解效果。当含水率达到20%及以上时,土壤呈泥浆状态,不利于氧气在土中的溶解及微生物和酶的迁移。研究表明,微生物修复石油污染土壤,含水率一般控制在30%~90%时效果最佳,含水率过低时系统中生物数量少且在环境中的迁移受到限制,不利于污染物降解^[3]。因此,漆酶可以更好地适用于干旱环境中污染的去除。

2.2 漆酶修复石油污染土壤的响应面优化

2.2.1 响应面优化实验结果

根据单因素得到的实验结果,以碳氮比(C/N)

(A)、漆酶活性(B)及含水率(C)为自变量,以30d石油烃降解率(η)为响应值,进行17组实验(5组中心实验)。响应面实验因素与水平设计如表2所示,响应曲面各系数方差分析如表3所示。

表2 漆酶修复石油污染土壤的响应面实验因素与水平

因素	水平		
	-1	0	1
C/N(A)	10	12.5	15
漆酶活性/(U·g ⁻¹)(B)	14	15.0	16
含水率/(%) (C)	10	12.5	15

表3 二次响应面模型和方差分析

变量	平方和	自由度	均方根	F值	Prob > F
模型	14.85	9	1.65	1148.36	<0.0001
A	0.17	1	0.17	119.12	<0.0001
B	0.024	1	0.024	16.85	0.0045
C	0.038	1	0.038	26.32	0.0014
AB	9.025E-003	1	9.025E-0.003	6.28	0.0406
AC	0.044	1	0.044	30.70	0.0009
BC	0.016	1	0.016	10.88	0.0132
A ²	6.86	1	6.86	4772.59	<0.0001
B ²	3.32	1	3.32	2314.02	<0.0001
C ²	2.91	1	2.91	2024.20	<0.0001
残差	0.010	7	1.436E-003	—	—
失拟项	2.575E-003	3	8.583E-004	0.46	0.7258
误差	7.480E-003	4	1.870E-003	—	—
总离差	14.86	16	—	—	—

从表3可知,该模型的显著系数 $P < 0.0001$,表示其非常显著;模型 $R^2 = 0.9993$,说明拟合度较好,精确度较高,该模型可以用来分析和预测结果。一次项系数A、B、C和二次项系数AC、A²、B²、C²的显著系数均小于0.01,其影响非常显著;而二次项系数AB、BC的显著系数均小于0.05,但大于0.01,其影响显著。综合对比可知,对石油烃降解率影响的显著性为:漆酶活性(B) < 含水率(C) < 碳氮比(A)。

以30d石油烃降解率为响应值 η ,利用响应面软件对BBD的实验结果进行二次多项回归拟合,各个因素与响应值之间的关系式为:

$$\eta = 24.81 - 0.15A + 0.055B + 0.069C - 0.047AB - 0.11AC + 0.063BC - 1.28A^2 - 0.89B^2 - 0.83C^2, R^2 = 0.9993$$

2.2.2 响应曲面图分析

碳氮比、漆酶活性及含水率两两相互作用的响应面分析结果如图4~6所示。

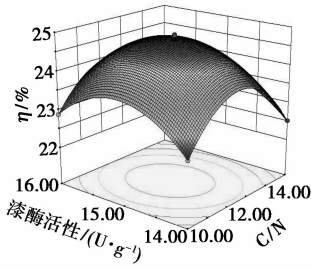


图 4 漆酶活性与碳氮比对石油烃降解率相互作用的响应面

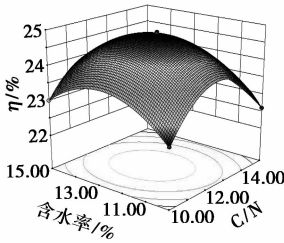


图 5 含水率与碳氮比对石油烃降解率相互作用的响应面

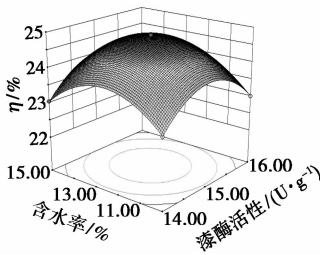


图 6 漆酶活性与含水率对石油烃降解率相互作用的响应面

由图 4~6 与表 3 可知,漆酶活性、碳氮比及含水率并不是越大越有利于石油烃降解,其对石油烃降解的影响作用程度不同,但是三者之间存在着显著的交互作用,在最佳条件下可以使得降解率达到最高。将二次多元回归方程求导,取得降解率极大值点时的最佳参数,得到 C/N 为 12.35,漆酶活性为 15.03 U/g,含水率为 12.62%,此时,石油烃降解率的理论值达 24.82%。

2.2.3 响应曲面模型验证

为验证该模型的准确性,在上述最佳条件下进行室内模拟修复实验,在 30℃ 恒温培养箱中培养 30 d 后测定石油烃降解率,为 25.01%,与上述预测理论值 24.82% 相差不大,说明该模型可以预测石油污染土壤的修复效果。

3 结论

(1) 单因素实验表明最佳条件是漆酶活性为

14 U/g,碳氮比为 15:1,含水率为 15%。

(2) 软件模拟方程为 $\eta(\%) = 24.81 - 0.15A + 0.055B + 0.069C - 0.047AB - 0.11AC + 0.063BC - 1.28A^2 - 0.89B^2 - 0.83C^2$, $R^2 = 0.9993$; 在碳氮比为 12.35:1,漆酶活性为 15.03 U/g,含水率为 12.62% 的最佳条件下,30 d 石油烃降解率为 25.01%。对石油烃降解影响的显著性从小到大依次为漆酶活性、含水率、碳氮比。

(3) 通过含水率单因素实验可知,在干旱条件下漆酶可以有效地提高石油烃的生物修复效果。

参考文献

- [1] 刘文超,李晓森,刘永民,等. 石油污染土壤修复技术应用现状[J]. 油田化学,2015,32(2):307-312,316.
- [2] 邓绍云,徐学义,邱清华. 我国石油污染土壤修复研究现状与展望[J]. 北方园艺,2012,(14):184-190.
- [3] Subhash Chandra. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon[J]. Ann Microbiol,2013,63:417-431.
- [4] Mei Fangzhou, Xing Zhongyuan. Effect of biosurfactants on laccase production and phenol biodegradation in solid-state fermentation[J]. Appl Biochem Biotechnol,2010,164:103-114.
- [5] Guo Huan, Yao Jun, et al. Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity[J]. Chemosphere,2012,87(11):1273-1280.
- [6] 曹明乐,张海波,黄峰,等. 漆酶的研究进展[J]. 山东林业科技,2012,(3):106-115,127.
- [7] 高恩丽. 灵芝漆酶的生产及其应用基础研究[D]. 杭州:浙江大学,2007.
- [8] 刘家扬. 白腐真菌 Pycnoporus sp. SYBC-L3 产漆酶及应用研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [9] Rivera Hoyos, Claudia M Morales Alvarez, Edwin David Poutou-Piñales, et al. Fungal laccases[J]. Fungal Biology Reviews,2013,27:67-82.
- [10] 陈新芳. 油对水质稳定剂性能的影响及酶法处理含有污水的研究[D]. 北京:北京化工大学,2007.
- [11] 贾洪柏,曲丽娜,王秋玉. 真菌漆酶活性与石油降解率的关系[J]. 安徽农业科学,2014,42(7):2097-2100.
- [12] 张涵,韩雨彤,张守娟,等. 响应曲面优化固定化微生物修复石油污染土壤[J]. 石油学报(石油加工),2015,31(4):1028-1034.
- [13] 张秀霞,吴佳东,滕芝,等. 响应面法优化固定化微生物降解石油污染物[J]. 石油学报(石油加工),2012,28(5):876-882.
- [14] Theuerl, Susanne, Buscot, et al. Laccases: Toward disentangling their diversity and functions in relation to soil organic matter cycling[J]. Biology and Fertility of Soils,2010,46(3):215-225.
- [15] Emad Dehghanifard, Ahmad Jonidi Jafari, Roshanak Rezaei Kalantary, et al. Biodegradation of 2,4-dinitrophenol with laccase immobilized on nano-porous silica beads[J]. Environmental Health Science & Engineering,2013,10(25):1-9.
- [16] 付辉,孟瑶,梁红,等. 复合白腐真菌菌剂修复原油污染土壤[J]. 森林工程,2012,28(4):17-20.
- [17] Mi Youn Ahn, Jerzy Dee, Jang Eok Kim, et al. Treatment of 2,4-Dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase[J]. Bioremediation and Biodegradation,2002,31:1509-1516. ■