

营养物质对海洋土著石油烃降解菌生长影响分析

崔芹芹^{1,2}, 薛建良^{1*}, 王明清³, 姜尔颖¹, 程怡甜¹, 杨晓健¹, 高宇¹, 肖新峰¹

(1. 山东科技大学 化学与环境工程学院, 山东 青岛 266590; 2. 青岛滨海学院 建筑工程学院, 山东 青岛 266555; 3. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:原位生物修复技术是解决石油污染海洋的重要途径之一。采集3个不同海域的海水水样,并对其理化性质进行分析,并在此基础上通过外加营养物质研究其对石油烃降解菌生长、降解石油烃的效果等的影响。结果发现,3个采样点石油烃降解菌种分布较少,仅分离出6株单菌3个不同的菌属。通过分析海水理化性质发现,石油烃降解菌种的数量和营养物质也较少。进一步研究不同的营养物质对石油烃降解菌生长的影响发现,磷氮元素对石油烃降解菌的生长具有显著促进作用;另外,添加氮、磷源后菌的降解效果显著提高,可以达到47.7%和49.6%。初步说明适量增加磷、氮元素对于原位生物修复石油污染海洋十分重要。

关键词:石油烃降解菌;海洋石油污染;原位修复;营养物质

中图分类号:X172;TE991

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2016)03-0097-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2016.03.023

Effect of nutrients on the growth of indigenous petroleum hydrocarbon degradation bacteria in marine environment

CUI Qin-qin^{1,2}, XUE Jian-liang^{1*}, WANG Ming-qing³, JIANG Er-ying¹, CHENG Yi-tian¹, YANG Xiao-jian¹, GAO Yu¹, XIAO Xin-feng¹

(1. College of Chemical and Environmental Engineering, Shandong University of Science and Technology, Qingdao 266590, China; 2. School of Architecture and Engineering, Qingdao Binhai University, Qingdao 266555, China; 3. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: *In situ* bio-remediation technology is one of the important approaches to deal with marine oil pollution. By collecting three different sea water samples, the physico-chemical properties are firstly analyzed. Then, the growth and degradation effects of hydrocarbon degrading bacteria are studied by adding nutrients. The results indicate that there are only 6 strains isolated single petroleum hydrocarbon degradation bacteria and 3 different bacteria genera in three sampling points. By analyzing the physico-chemical properties of water samples, there are a few of petroleum hydrocarbon degradation bacteria and less nutrients in the samples. The effect of nutrients on the growth of hydrocarbon degradation bacteria is further studied. The results indicate that the phosphorus and nitrogen can significantly promote the growth of hydrocarbon degrading bacteria. Additionally, the removal rate of petroleum hydrocarbon is obviously increased by adding the phosphorus and nitrogen, which can reach 47.7% and 49.6%, respectively. These all results suggest that it is important to add phosphorus and nitrogen for *in situ* bio-remediation technology.

Key words: petroleum hydrocarbon degrading bacteria; marine oil pollution; *in situ* remediation; nutrients

随着海上石油开发及远洋石油运输等活动的持续增多,海上溢油/泄油事故等频发,海洋石油污染问题日益凸显,直接导致严重的海洋生态问题^[1-2]。

目前,生物修复技术因其处理效果好、成本低、适应性强以及无二次污染等特点,成为处理石油污染区域生态修复最具前景的技术之一^[3-4]。生物修复技术应用于其他环境介质的研究较多,如土壤石油污染区域生态修复^[5-7]。然而,与其他环境介质不同,海洋环境的特殊性导致生物修复技术的应用

受到一定的限制。有研究表明,海水的盐度超过3.5%或低于0.5%都会影响海洋石油烃降解菌的降解效果^[8]。另外,海洋中的其他因素如温度、潮汐等都会影响生物修复的效果^[2,4,8]。因此,在生物修复技术越来越受到重视的情况下,通过考察环境的理化性质与土著石油降解菌生长、代谢等关系^[9-10],以进一步提出一条切实可行的土著石油烃降解菌修复石油污染海洋的生态的新途径。

笔者以采集的不同海域的海水样品富集并鉴定

收稿日期:2015-08-28

基金项目:国家自然科学基金(51408347);国家海洋局海洋溢油鉴别与损害评估技术重点实验室开放基金(201407);青岛市应用基础研究计划项目(15-9-1-58-jch)

作者简介:崔芹芹(1983-),工程硕士,讲师,研究方向为石油污染区域的生物修复, cuixuefei110@163.com;薛建良(1983-),博士,讲师,研究方向为石油污染区域的生物修复,通讯联系人, LL-1382@163.com。

石油烃降解菌的种类,分析海域的理化性质与土著石油烃降解菌生长的关系。并在此基础上,通过添加不同的营养物质,分析其对该水样中石油烃降解菌种的增殖情况和降解石油烃效果的影响。

1 实验材料及方法

1.1 样品采集

选择青岛市西海岸部分海域作为石油烃降解菌筛选的海域。其中所有样品集中来自于 3 个采样点:黄岛客运码头采样点(S1)、黄岛前湾港采样点(S2)和唐岛湾(S3),共计 37 个水样。

1.2 菌株的富集及鉴定

1.2.1 菌株的富集

在无菌操作台中,向锥形瓶中加入一定量无机盐液体培养基,移取所选采集的水样 3 mL,接种到锥形瓶中。之后添加 1 mL 柴油。将该锥形瓶置于 30℃、160 rmp 的恒温培养箱里培养 7 d。取出锥形瓶,按同样方法移取 3 mL 菌液,接种于新配置无机盐液体培养基的锥形瓶中,同等条件下培养 7 d;重复上述步骤 3 次,即筛选富集完毕。

1.2.2 菌株的纯化及鉴定

利用接种环从上述富集完毕的菌液中提取一定量菌液,在无机固体培养基中划线。划线得到的含有菌株的培养基置于 30℃ 恒温箱中培养 3 d。从培养基中选择形体不一样的进行分别挑选,用无菌液稀释后,继续上述方法培养。重复上述步骤 3 ~ 4 次,直到固体培养基中只含 1 种菌为止,完成水样中石油烃降解菌的分离纯化。将获得的各个单一菌株进行鉴定,通过 UNIQ-10 柱式真菌 DNA 提取装置进行提取,18S rRNA 通过 PCR 扩增仪进行扩增。PCR 扩增完成后使用 DNA 测序仪进行测定。测定结果使用 BLAST 程序和 MycoBank 中的基因数据库进行比对,得到结果。

1.3 各种培养基的制备

1.3.1 无机盐培养基

无机盐液体培养基组成:Na₂HPO₄ 0.6 g/L, KH₂PO₄ 0.2 g/L, NaNO₃ 4.0 g/L, MgSO₄ 0.3 g/L, CaCl₂ 0.01 g/L, FeSO₄ 0.01 g/L, 酵母粉 0.5 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 为 7.2 ~ 7.4。制备固体培养基时,在此基础上添加琼脂 15 ~ 20 g。

1.3.2 各种营养物质培养基

普通无机盐培养基(A):即上述无机盐液体培养基;多碳源培养(B):即在上述无机盐液体培养基基础上添加 0.1 g 酵母粉;多氮源培养基(C):即在

上述无机盐液体培养基基础上添加 0.4 g NaNO₃;多磷源培养基(D):即在上述无机盐液体培养基基础上添加 0.06 g NaHPO₄。

1.4 各指标的分析方法

1.4.1 海水基本理化性质测定方法

pH:pH 测定法;盐度:重量法;含油率:红外分光光度法;TOC:非色散红外光谱法;有效氮:紫外分光光度法;有效磷:钼酸铵分光光度法。

1.4.2 海水中石油烃降解菌的菌种数量测定方法

参照最大或然数(Most probable number, MPN)测定石油烃降解菌数量^[11]。

1.4.3 石油烃降解率测定方法

石油烃降解率采用紫外分光光度法测定^[12]。其步骤为:取一定量的待测海水水样,加入一定量的 25% 的硫酸酸化。然后取 5 mL 已酸化的样品转移到 500 mL 的分液漏斗中,并加入 5 mL 正己烷。振荡分液漏斗 2 min,静置分层。上层正己烷萃取液移至比色管中,下层水样放至原水样中。振荡原水水样,重复上述步骤 3 次。得到的萃取液在 225 nm 波长下测定其吸光值。依据标准曲线法算出其浓度。石油烃的降解率为:

$$\eta = [(C_0 - C_1)/C_0] \times 100\%$$

式中: η 为去除率,% ; C_0 为初始质量浓度,mg/L; C_1 为剩余质量浓度,mg/L。

2 结果与讨论

2.1 菌株的鉴定

从每个待测样品中取一定量的水样加到无机盐培养基中,并添加一定量的柴油作为筛选剂。经培养、富集、筛选等步骤后,进行 PCR-DGGE 分析。

通过对 DGGE 的条带进行切胶回收测序后,得到了各样品中的菌种,结果如表 1 所示。

表 1 各水样中可能存在的菌种(登录号)

采样点	最相似菌种(登录号)
S1	动杆菌属(HQ670704.1)
	假单胞菌属(DQ289057.1)
	假单胞菌属 N9-5(EU107175.1)
S2	红球菌属(EU326491.1)
	动杆菌属(HQ670704.1)
	假单胞菌属(HM030992.1)
S3	动杆菌属(JN601429.1)
	动杆菌属(HQ670704.1)

从表 1 中可以看出,3 个采样点分类出菌株种类较少,仅有 6 株单菌 3 个不同的菌属。3 个不同

的菌属分别是假单胞菌属 (*Pseudomonas sp.*)、动杆菌属 (*Acinetobacter sp.*)、红球菌属 (*Rhodococcus sp.*) 等。假单胞菌属 (*Pseudomonas sp.*) 也是报道中易产生表面活性剂的菌属。其中, S1 采样点发现的主要是假单胞菌属 (*Pseudomonas sp.*), 共 2 种单菌; S2 采样点分别发现了假单胞菌属 (*Pseudomonas sp.*)、动杆菌属 (*Acinetobacter sp.*)、红球菌属 (*Rhodococcus sp.*) 各 1 株菌种。

2.2 海水理化性质分析

为进一步探讨所选海域石油烃降解菌种降解石油烃的潜力, 首先分析海水理化性质, 并对海域的海水理化性质进行了分析, 结果如表 2 所示。

表 2 海水水质基本性质

	pH*	温度/ ℃*	含油率/ % ^①	盐度/ ‰ ^①	TOC/ ‰*	有效氮质量浓 度/(mg·L ⁻¹)
S1	5.5	15.5	1.31	3.10	1.83	0.754 ± 0.241
S2	6.5	18.5	1.63	3.32	1.91	1.850 ± 0.319
S3	6.5	13.5	1.28	3.15	1.68	0.543 ± 0.116

	有效磷质量浓 度/(mg·L ⁻¹)	TOC/ 有效氮 ^①	TOC/ 有效磷 ^①	石油烃降解菌/ (个·mL ⁻¹)
S1	0.126 ± 0.036	12.03	71.94	114 ± 27
S2	0.105 ± 0.013	4.32	76.12	288 ± 34
S3	0.112 ± 0.027	15.40	74.66	47 ± 18

注: ①均为平均值。

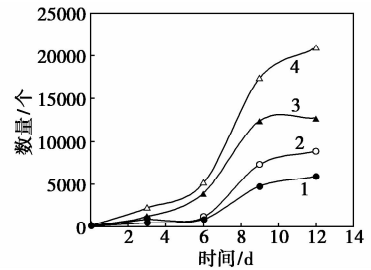
从表 2 中可以看出, 各采样点采集到的海水水样中石油烃降解菌的数量十分有限。S1、S2 和 S3 采样点中石油烃降解菌的数量仅分别为 (114 ± 27)、(288 ± 34)、(47 ± 18) 个/mL。另外, 所研究的海域海水样品中各营养物质较少。其中, 有效氮质量浓度仅为 0.54 ~ 1.85 mg/L, 有效磷质量浓度仅为 0.105 ~ 0.112 mg/L。在水样中, 各种营养物质组成失衡 TOC/有效氮最小仅为 4.32, TOC/有效磷比仅为 71.94 ~ 76.12。

从石油烃降解菌的数量和营养物质的质量浓度来看, 所选择的海域中营养物质质量浓度较低和比例失衡是石油烃降解菌的数量较少的重要原因。

2.3 不同营养盐添加条件下石油烃降解菌变化情况

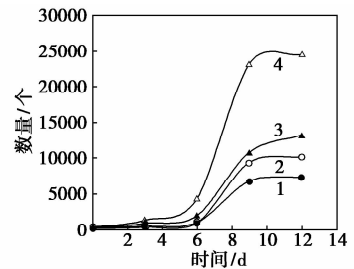
为考察营养物质对不同海域石油烃降解菌的影响, 从 3 个采样点各选出 1 个代表性的海水水样, 从中各取 1 mL 加入到 4 种不同的培养基中 [分别为普通无机盐培养基(A)、多碳源培养(B)、多氮源培养基(C)和多磷源培养基(D)]。并分别培养 3、6、9 d 和 12 d, 测定石油烃降解菌数量的变化, 其结果

如图 1 ~ 图 3 所示。



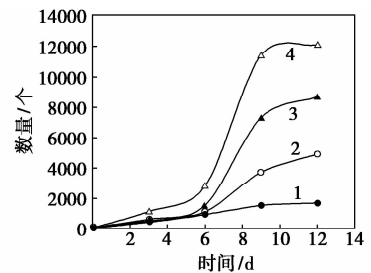
1—A; 2—B; 3—C; 4—D

图 1 S1 菌种生物量变化趋势图



1—A; 2—B; 3—C; 4—D

图 2 S2 菌种生物量变化趋势图



1—A; 2—B; 3—C; 4—D

图 3 S3 菌种生物量变化趋势图

从图 1 ~ 图 3 可以看出, 3 个不同采样点的水样中石油烃降解菌在不同的培养基进行培养后均显著增多。以采样点 S1 为例, 在 A、B、C、D 4 种培养基分别培养 12 d 后, 石油烃降解菌数量从 120 个分别增大到 5 900、8 900、12 700 个和 20 900 个。从这个数值上来看, 营养物质对生物生长的促进作用也不尽相同。特别是, 在增加磷源的培养基中, 石油烃降解菌生长迅速, 经过 12 d 的培养, 石油烃降解菌生长高出普通无机盐培养基中的 4 倍。当基本碳源足够的情况下, 其促进石油烃降解菌生长的作用大小排序为: 磷源 > 氮源 > 碳源。其他采样点水样中石油烃降解菌生长也有同样的规律。

另外, 不同采样点水样中石油烃降解菌的生长存在差异。以同一种培养基为例, 在无机盐培养条件下, S1、S2 和 S3 采样点的石油烃降解菌经过 12 d

培养后,石油烃降解菌增殖迅速,分别增加了 49、24 倍和 34 倍。即使在不同的培养条件下,各采样点生物增殖速度也不相同。在多磷培养条件下,12 d 后,S1、S2 和 S3 水样中的石油烃降解菌数量分别是 20 900、24 500 个和 12 100 个。说明不同的石油烃降解菌对培养条件的要求和适应情况差异较大。

3.3 不同营养条件下石油烃降解效果差异分析

以 S1 采样点的水样为研究对象,通过无机培养基进行富集培养。当生物浓度达到一定量之后,分别取同样数量的石油烃降解菌悬浮液 4 份加入到 A、B、C、D 4 种培养基中,并分别添加一定数量的柴油作为降解目标物质,保证柴油的质量浓度为 10 mg/L。经过 7 d 培养降解后,对残余的柴油进行定量分析,结果如表 3 所示。

表 3 不同培养条件下石油烃去除率 %

A	B	C	D
34.5	39.9	47.7	49.6

从表 3 中可以看出,在不同的培养条件下,菌群的降解效果差异较大。其中,在无机普通培养条件下,石油降解率达到 34.5%,然而在碳源充足,添加氮源和磷源的条件,菌群的降解效果显著提高,分别达到 47.7% 和 49.6%。这也说明氮磷元素对于菌群降解石油烃的重要性。

3 结论

通过采集 3 个不同海域的海水水样,分析了石油烃降解菌种的种类,并进一步分析了添加营养物质对各采样点石油烃降解菌种的生长和降解石油烃效果的差异。

(1)通过对 3 个采样点水样的分析发现,3 个采样点石油烃降解菌种分布较少,仅分离出 6 株单菌 3 个不同的菌属。分别是假单胞菌属(*Pseudomonas sp.*)、动杆菌属(*Acinetobacter sp.*)、红球菌属(*Rhodococcus sp.*)。

(2)通过分析 3 个采样点采集水样的海水理化性质发现,石油烃降解菌种的数量较少,仅为 (114 ± 27) 、 (288 ± 34) 、 47 ± 18 个/mL。各样品中的营养物质也较少。有效氮质量浓度仅为 0.54 ~ 1.85 mg/L,有效磷质量浓度仅为 0.105 ~ 0.112 mg/L。而且,各种营养物质组成失衡 C/N 最小仅为 4.32,C/P 仅为 71.94 ~ 76.12。这说明营养物质的缺失对石油烃降解菌的生长有限制作用。

(3)通过添加不同营养物质进行研究发现,各

采样点的水样中石油烃降解菌在不同的培养条件下均显著增多。这说明营养物质对生物生长的促进作用也不尽相同。当基本碳源足够的情况下,其促进石油烃降解菌生长的作用的大小排序为:磷源 > 氮源 > 碳源。另外,不同采样点水样中石油烃降解菌的生长存在差异。

(4)在不同的营养物质条件下,石油烃降解菌的降解效果差异较大。其中,在无机普通培养条件下,石油降解率可以达到 34.5%,然而在碳源充足的条件下,添加氮源和磷源的条件,菌群的降解效果显著提高,分别达到 47.7% 和 49.6%。这也说明氮磷元素对于菌群降解石油烃的重要性。

参考文献

- [1] Bachmann R T, Johnson A C, Edyvean R G. Biotechnology in the petroleum industry: An overview [J]. *Int Biodeterior Biodegradation*, 2014, 86: 225 - 237.
- [2] Xue Jianliang, Yu Yang, Bai Yu, et al. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: A review [J]. *Curr Microbiol*, 2015, 71: 220 - 228.
- [3] Kriti Singh, Subhash Chandra. Treatment of petroleum hydrocarbon polluted environment through bioremediation: A review [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2014, 17(1): 1 - 8.
- [4] Mulherji S, Jagadevan S, Mohapatra G, et al. Biodegradation of diesel oil by an arabian sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field [J]. *Bioresour Technol*, 2004, 95: 281 - 286.
- [5] 张秀霞, 耿春香, 房苗苗, 等. 固定化微生物应用于生物修复石油污染土壤 [J]. *石油学报(石油加工)*, 2008, 24(4): 409 - 414.
- [6] 张秀霞, 郑茂盛, 王荣靖, 等. 石油污染土壤中高效石油烃降解菌 Y-16 的筛选及其降解性能 [J]. *环境工程学报*, 2010, 8(4): 1916 - 1920.
- [7] 万春黎, 杨雪, 杜茂安, 等. 油污染土壤中细菌群落结构特征 [J]. *石油学报(石油加工)*, 2010, 26(6): 928 - 933.
- [8] de Carvalho C C C R, da Fonseca M M R. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 51: 389 - 399.
- [9] 李政, 梁昌峰, 赵朝成, 等. 应用 SPSS 软件分析石油污染土壤微生物生态环境 [J]. *石油学报(石油加工)*, 2012, 28(2): 345 - 351.
- [10] 刘五星, 骆永明, 滕应, 等. 石油污染土壤的生态风险评估和生物修复 II 石油污染土壤的理化性质和微生物生态变化研究 [J]. *土壤学报*, 2007, 44(5): 848 - 853.
- [11] Chaîneau C H, Rougeux G, Yéprémian C, et al. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37: 1490 - 1497.
- [12] 吴丽卿, 詹秀美. 紫外分光光度法测定海水中的石油烃 [M]. 北京: 海洋出版社, 1992: 49 - 54. ■