

# 菌糠强化微生物降解石油污染土壤修复研究

张博凡<sup>1</sup>,熊 鑫<sup>1</sup>,韩 卓<sup>2</sup>,张秀霞<sup>1\*</sup>,刘泽阳<sup>1</sup>,马 年<sup>1</sup>,刘会娥<sup>1</sup>,顾莹莹<sup>1</sup> (1.中国石油大学(华东)化学工程学院,山东 青岛 266580; 2.胜利油田分公司技术检测中心,山东 东营 257000)

**摘要:**采用菌糠协同高效石油烃降解菌 *Microbacterium.sp.Q2* 进行石油污染土壤修复试验研究,分别设置菌糠固定化微生物组(SIM)、菌糠-游离菌组(SMSB)、菌糠单独组(SMS)和对照组(CK)4 组修复实验。考察不同处理方式下对石油污染土壤微生物数量、酶活性和石油烃降解效果的差异性并确定石油污染土壤的最佳修复方案。结果表明:不同修复方式下,SIM 组的土壤呼吸强度、微生物数量及酶活性较其他组有明显提高,其对石油烃去除率分别比其他 3 组提高 11.84%、22.15%、54.09%。土壤中脱氢酶活性以及微生物活性与石油烃降解率的相关性显著,此外菌糠固定化微生物对石油污染土壤修复具有生物强化和生物刺激协同的作用机制。

**关键词:** 菌糠; 固定化微生物; 土壤修复; 石油烃降解

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2019)03-1139-08

**Bioremediation of petroleum contaminated soil by microorganisms enhanced with spent mushroom substrate.** ZHANG Bo-fan<sup>1</sup>, XIONG Xin<sup>1</sup>, HAN Zhuo<sup>2</sup>, ZHANG Xiu-xia<sup>1\*</sup>, LIU Ze-yang<sup>1</sup>, MA Nian<sup>1</sup>, LIU Hui-e<sup>1</sup>, GU Ying-ying<sup>1</sup> (1. College of Chemical Engineering, China University of Petroleum(East China), Qingdao 266580, China; 2. Technical Detection Center of Shengli Oilfield Branch, Dongying 257000, China). *China Environmental Science*, 2019,39(3): 1139~1146

**Abstract:** The spent mushroom substrate (SS) and *Microbacterium.sp.Q2* bacteria were used to remediate petroleum-contaminated soil and four different treatments which contained spent mushroom substrate immobilized microorganisms (SIM), spent mushroom substrate-free bacteria (SMSB), spent mushroom substrate alone (SMS) and no treatment (CK) were designed in this paper. The aim of this study is to investigate soil microbial number, enzyme activities and the degradation rate of total petroleum hydrocarbon (TPH), exploring an ideal reparative treatment. The results indicated that soil respiration intensity, microbial number and enzyme activities of SIM group were obviously higher than others and the removal rate of TPH was highest which was increased by 11.84%, 22.15% and 54.09% compared with other treatments. Furthermore it is showed that the dehydrogenase activity and microbial activity were significantly correlated with the degradation rate of TPH and immobilized microorganism had the synergistic mechanism of bioaugmentation and biostimulation for remediation of petroleum contaminated soil.

**Key words:** spent mushroom substrate; immobilized microorganism; remediation of soil; degradation rate of oil

近年来,石油行业得到了蓬勃的发展,在对石油的勘探、开发、储运与加工及使用过程中,原油和原油制品跑、冒、滴、漏等造成采油区和炼厂附近大面积土壤污染<sup>[1]</sup>。固定化微生物技术克服了传统方法修复过程中的缺点<sup>[2]</sup>,不仅可以提高菌密度,还有利于屏蔽环境的毒害作用,增强外源菌竞争优势,提高降解效率,在石油污染土壤治理领域中应用越来越广泛<sup>[3~4]</sup>。

菌糠是收获食用菌后废弃的培养基质,据统计每出产 1kg 食用菌约产生 5kg 菌糠,每年约有 8000 多万 t 废弃菌糠通过焚烧、填埋等方式处理,不仅占用了大量土地,燃烧过程中还会产生甲烷等温室气体或有毒化合物(如二噁英)等。研究发现菌糠中富含有机质、钾、钙、镁、氮、磷以及铜、锌、铁等多种营养元素,加工处理后可用于作物肥料和土壤调

理剂<sup>[5]</sup>,同时其结构疏松多孔,表面较粗糙,含有较多官能团和真菌菌丝体,能够分泌漆酶、锰过氧化物酶等,可以吸附染料、重金属、石油烃等多种污染物质<sup>[6]</sup>,改善土壤肥力。

目前,对于农业废弃物的资源化利用,将其作为载体材料固定化微生物,在修复有机污染物方面取得了一定成效<sup>[7~8]</sup>,但由于其只具备单一的吸附性能,降解有机物能力相对较弱。而菌糠不仅可以作为微生物载体,又可以通过细菌-真菌-酶体系强化降解有机污染物<sup>[9~10]</sup>,发挥双向优势,提高污染物去除效率,因此探究菌糠的综合资源化利用方式处理环境

收稿日期: 2018-07-31

基金项目: 中国石油科技创新基金研究项目(2017D-5007-0601);山东省自然科学基金项目(ZR2014BM023)

\* 责任作者, 教授, zhixiuxia@upc.edu.cn

污染问题值得探讨。

将菌糠与高效石油烃降解菌结合,通过花盆实验模拟菌糠固定化微生物、菌糠-游离菌以及菌糠单独添加对石油污染土壤原位修复,探究修复过程中对土壤呼吸强度、微生物数量、微生物区系以及土壤生态毒性的影响差异,确定最优修复方式,为菌糠修复石油污染土壤的应用提供一定的技术支撑和理论依据。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

实验土样取自胜利油田 0~20cm 附近石油污染土壤,将土样压碎翻动至松散,风干后过筛,取 40~80 目之间的土壤,即去除较大杂质和直径过小的细土,筛分后的土壤于-20℃低温冷冻保存。

新鲜菌糠选自山东青岛天农食用菌有限公司,初始湿重 15%,过 40 目筛于-20℃低温冷冻保存。

### 1.2 实验菌株

实验菌株 Q2 是以胜利油田污染土壤为菌源,胜利原油为唯一碳源筛选驯化所得土著菌,经 16S rDNA 生物分子学鉴定为 *Microbacterium* sp.Q2,在原油质量浓度为 1000mg/L 的无机盐培养基中,微杆菌 Q2 在 7d 内对石油烃降解率为 45.52%。

### 1.3 修复实验设计

采用盆栽(pot experiment)模拟实验进行石油污染土壤修复研究。用磷酸二氢钾和硝酸钠调节土壤 C、N、P 的质量比为  $\omega(C):\omega(N):\omega(P)=100:10:1$ ,修复过程中可直接采用减重法调节各个花盆中的含水率,使之保持在 18% 左右<sup>[11]</sup>。

试验分 4 组,每组 3 个平行,共 12 盆,每盆分别加入 500g 质量分数为 4.57% 石油污染土壤,分别加入菌糠(SMSB)、菌糠-游离菌(SMS)、菌糠固定化微生物(SIM),其中一组为空白对照组(CK),将 3 个处理组样品放于 30℃、60% RH(Relative humidity,空气相对湿度)的恒温恒湿培养箱中,每天光照 10h,修复过程中每隔 7d 采样测定各花盆中石油烃含量,土壤呼吸强度、微生物数量及土壤酶活性等指标,试验周期为 45d。

### 1.4 土壤呼吸强度及微生物数量的测定

土壤呼吸强度采用碱液吸收法测定,称取 10g 新鲜土壤于 200mL 烧杯中,其中插入含有

5mLNaOH(2mol/L)溶液的小烧杯,置于 30℃下密封培养 24h,将溶液转移至容量瓶中定容,分别以酚酞和甲基橙为指示剂,用 0.1mol/L HCl 溶液滴定,根据消耗量计算出土壤呼吸产生 CO<sub>2</sub> [mg/(kg·h)] 的量。

采用稀释平板计数法测定微生物数量。称取 5g 土壤于盛有 100mL 无菌蒸馏水的锥形瓶中,充分振荡后进行逐级稀释于培养基中涂布,牛肉膏蛋白胨固体培养基用于计数细菌数量,孟加拉红培养基用于计数真菌数量。将涂布好的培养基置于 30±2.0℃ 恒温培养箱中培养 5d 后计数。

采用 DNA 提取-PCR 扩增-DGGE 电泳的分子生物学方法,在修复的第 7d、第 21d 和第 45d,分别采集 4 组盆栽中的土样,提取其总 DNA,对 16SrDNA 的 V3 可变区进行 PCR 扩增,扩增产物由变形梯度凝胶电泳(DGGE)进行检测,研究土壤的微生物区系动态变化。

### 1.5 土壤生理生化参数及生态毒性测定

土壤中漆酶活性测定采用 ABTS-紫外分光光度法,以柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH=4.5),于 420nm 波长下测定吸光度;锰过氧化物酶活性采用愈创木酚-紫外分光光度法,以磷酸为缓冲液(pH=7.0),于 470nm 波长下测定吸光度,定义吸光度每分钟变化 0.01 为一个酶活单位(U)。

储存在活细胞中的荧光素二乙酸酯(FDA)能够被细菌以及酯酶等非专一性酶类水解,释放出荧光素,因此 FDA 水解酶能够较好反映土壤微生物活性以及土壤质量的变化<sup>[12]</sup>。脱氢酶是微生物呼吸过程中分泌的胞内酶<sup>[13]</sup>,它们与微生物种群密切相关,对环境扰动非常敏感。因此,考察这两个指标不仅可以表征土壤的生态毒性,还能从侧面反应污染物的降解效果。

其中 FDA 水解酶以荧光素二乙酸酯为底物,采用分光光度法于 490nm 处测定吸光度;脱氢酶活性采用三苯基四氮唑氯化物(TTC)还原法于 485nm 处测定吸光度数值来表示酶活性大小。

### 1.6 土壤石油烃含量的测定

土壤中石油烃含量采用超声-索氏萃取-重量法测定。具体步骤为准确称取 5.00g 土样于离心管中,以二氯甲烷为萃取剂,振荡,超声萃取 15min,重复 3 次,萃取结束后离心分离,将上清液倒入烧瓶,于 54℃ 旋转蒸发至干且恒重,烧瓶前后质量差即为石油烃

含量。

### 1.7 土壤石油烃降解动力学方程

一级动力学方程,土壤剩余石油烃含量时间变化动力学模型回归方程为:

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = kt \quad (1)$$

式中: $C_0$  为初始石油烃含量; $C$  为时间  $t$  下石油烃含量; $t$  为修复时间; $k$  为微生物降解速率常数。

### 1.8 数据统计分析

实验所得数据采用 Excel 2010 和 origin 9.0 进行处理和制图,采用 SPSS 22.0 软件进行主成分分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 土壤呼吸强度和微生物数量的变化

由图 1~3 可以看出,随着时间的延长,土壤呼吸强度以及细菌、真菌数量整体呈现先增加后减少的趋势。修复前期,土壤中营养物质充足,生存环境适宜,经短暂适应期后外源降解菌数量在 7~21d 内增加迅速,生长代谢旺盛,呼吸强度也明显提高。30d 左右时,土壤中 C、N、P 等营养物质减少,土壤氧化还原电位降低<sup>[14]</sup>,同时石油烃分解过程可能会产生有毒中间产物对微生物有毒害作用,导致细菌、真菌数量减少,微生物呼吸强度减弱<sup>[15]</sup>。但总体来看,添加菌糠能够显著提高土壤中微生物数量和活性。

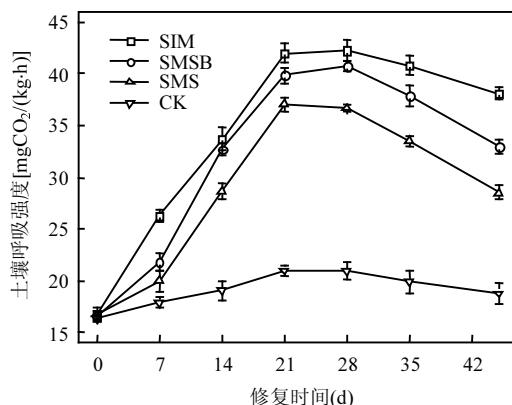


图 1 土壤呼吸强度随修复时间的变化

Fig.1 Variation of soil respiration intensity with remediation time

土壤呼吸强度、微生物量是一个重要的土壤生态指标<sup>[16]</sup>。4 组盆栽实验中,菌糠固定化微生物组(SIM)中的细菌及真菌数量最多,可达  $7.94 \times 10^7 \text{ CFU/g}$  土,  $22.38 \times 10^4 \text{ CFU/g}$  土, 土壤呼吸强度为

$41.95 \text{ mg CO}_2/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 。3 项指标整体均呈现  $\text{SIM} > \text{SMSB} > \text{SMS} > \text{CK}$  趋势。在菌糠和细菌共存体系中,菌糠中的真菌通过产生菌丝体和孢子的方式生长形成伸展的网状结构,为细菌迁移提供通道,强化了细菌生长,推迟了衰亡期,真菌-细菌共存具有协同促进作用,因此 SIM、SMSB 组微生物活性高于 SMS 组。其次,与游离菌组相比,菌糠自身丰富的营养物质以及疏松多孔的特性,不仅可以满足微生物生长代谢繁殖,还能够屏蔽不良土壤环境、增强外源菌与土著菌的竞争作用,进而提高石油烃摄取及降解能力。

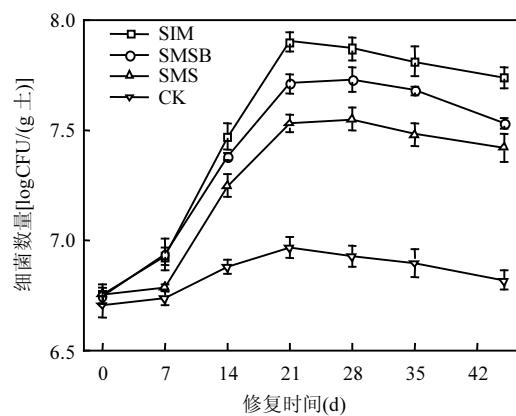


图 2 土壤细菌数量随修复时间的变化

Fig.2 Variation of amount of bacteria in soil with remediation time

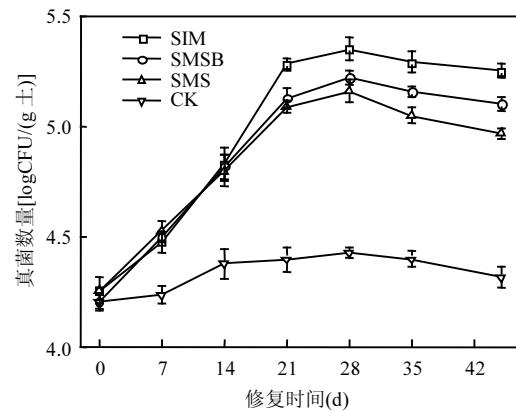


图 3 土壤真菌数量随修复时间的变化

Fig.3 Variation of amount of fungi in soil with remediation time

由图 4 可以看出,每种土样的总 DNA 的 V3 可变区 PCR 扩增结果均有多条亮带,且条带的亮度均较强,说明检测的土样中含有多种微生物。修复 7d 的土样有一个明显的亮带,可认为是修复初期加入的外源降解菌群成为优势菌种造成的;修复 45d 后,所

有土样中的外源降解菌群亮带的亮度均逐渐减弱,说明外源降解菌数量随着修复时间而减少<sup>[17]</sup>,这一趋势与上述土壤呼吸强度和微生物数量变化规律相符合,随着修复进行,土壤整体营养状况、微生物生存环境变差,同时由于土著微生物的竞争作用,导致外源菌数量降低<sup>[18]</sup>;在相同修复时间下,亮度减弱快慢顺序为CK>SMS>SMSB>SIM,这进一步说明菌糠中真菌和石油烃降解菌能够相互促进彼此生长,提高细胞活性.同时菌糠能够为微生物起到保护屏障作用,促进增殖代谢,提高土壤群落多样性和丰富度指数.

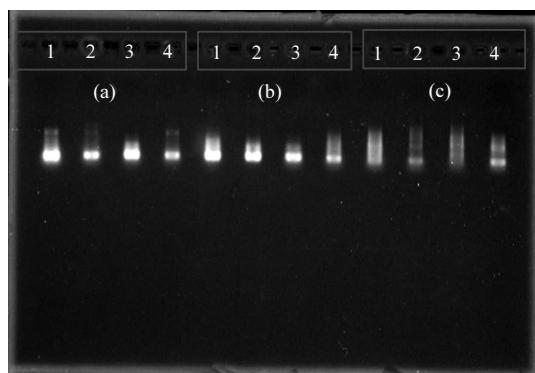


图4 土壤DNA V3可变区的PCR电泳

Fig.4 Soil V3DNA variable region PCR electrophoresis map

1.菌糠固定化微生物组;2:菌糠-游离菌组;3:菌糠单独组;4:空白对照;  
(a)修复7d;(b)修复21d;(c)修复45d

## 2.2 土壤生理生化参数及生态毒性变化

由土壤漆酶和锰过氧化物酶含量变化可见,与其他实验组相比对照组因分泌漆酶和锰过氧化酶含量较低,基本可忽略不计.

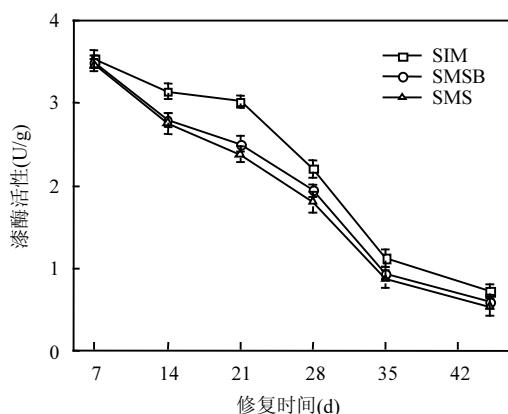


图5 土壤漆酶活性随修复时间变化

Fig.5 Variation of laccase activities in soil with remediation time

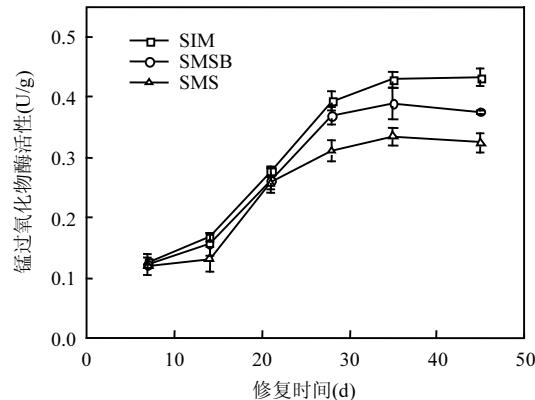


图6 土壤锰过氧化物酶活性随时间变化

Fig.6 Variation of Mn-peroxidase activities in soil with remediation time

菌糠中存在白腐菌等多种真菌,分泌的漆酶和锰过氧化物酶的释放,有助于土壤石油烃类化合物的去除<sup>[19]</sup>.由图 5~6 可以看出,随着修复时间的延长,SIM、SMSB 和 SMS 组中的漆酶活性不断降低,分别从 3.531,3.489,3.459U/g 减少至 0.726,0.602,0.542U/g,而锰过氧化物酶活性不断提高,但在 45d 时,其活性分别为 0.432,0.376,0.325U/g,仍比漆酶活性低,一方面是由于菌糠初始酶含量存在一定的差异<sup>[20]</sup>,另一方面是由于土壤体系较为复杂,加入菌糠后,土壤抑制了白腐菌等真菌分泌漆酶而促进了锰过氧化物酶的分泌.此外,SIM 组二者酶活性在整个修复过程中均高于其他组,这是由于真菌分泌的多种胞外氧化酶和水解酶<sup>[21]</sup>与细菌分泌的胞内酶在代谢酶系方面的互补性优势.

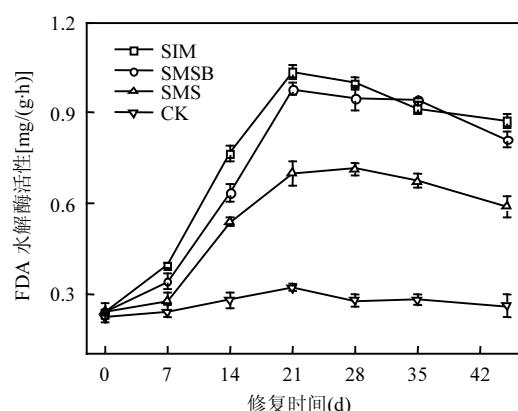


图7 土壤FDA水解酶活性随时间变化

Fig.7 Variation of FDA hydrolysis in soil with remediation time

由图 7~8 可以看出,土壤中 FDA 水解酶和脱氢

酶与微生物数量变化趋势具有一致性。整个修复过程中,CK(对照组),两种酶活性均在 $0.3\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ , $5.0\mu\text{gTPF}/(\text{g}\cdot6\text{h})$ 附近波动,变化不大。而SIM、SMSB、SMS组的酶活性均高于CK组,这是由于外源菌、菌糠的添加以及土壤中石油烃为外源微生物提供新的碳源提高了微生物数量和代谢活性。此外,两种酶活性在21d达到最大,FDA水解酶分别为1.036, $0.979,0.702,0.321\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ,脱氢酶活性分别为24.76, $22.43,15.57,6.32\mu\text{gTPF}/(\text{g}\cdot6\text{h})$ 。修复过程中,SIM组酶活性最高,这是由于菌糠中营养物质充足,且固定化方式能够避免微生物受到外界的毒害作用,进而分泌酶能力也相应较高<sup>[22]</sup>。35d左右时,石油烃分解的中间产物的毒性累积以及难降解组分的残留,抑制了微生物的活性,同时菌糠在土壤中易腐解,结构松散易碎,部分微生物脱落甚至死亡,导致SIM组酶活性略低于SMSB组。然而修复后期,菌糠腐解产生的腐殖酸作为一种类表面活性剂<sup>[23]</sup>不仅能够增加土壤肥力,还能提高微生物对石油烃的摄取能力,使得SIM组酶活性又高于SMSB组。

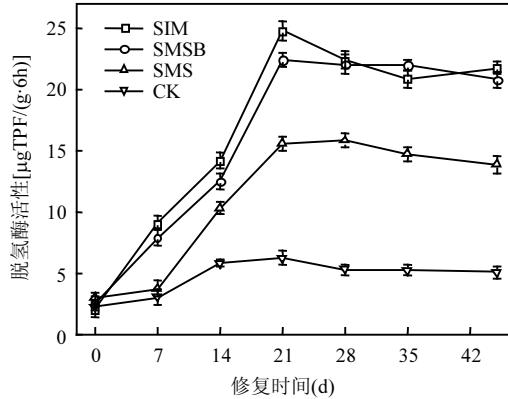


图8 土壤脱氢酶活性随时间变化

Fig.8 Variation of dehydrogenase activities in soil with remediation time

### 2.3 土壤石油烃含量的变化

由图9可以看出,随着修复时间延长,石油烃含量逐渐降低,其中在10~28d内,各组中石油烃降解速率最高,这与上述微生物数量以及酶活性变化趋势相一致,45d内SIM组中石油烃含量减少 $29.23\text{mg/g}$ 土,降解性能均高于其他组。

生物修复45d后提取土壤中石油烃进行光谱扫描,由图10可见4组样品在190~200nm和225~240nm处均有吸收,与CK组相比其他3个处理组样

品吸光度数值有明显的减少,说明石油烃分别有不同程度的降解。其中吸光度大小顺序为CK>SMS>SIMB>SIM。图11为修复45d测得的总石油烃降解率<sup>[24]</sup>,分别为63.05(SIM组),51.21(SMSB组),40.90(SMS组),8.96%(CK组),该结果与图10光谱扫描结果趋势相一致,菌糠固定化微生物修复效果最优。

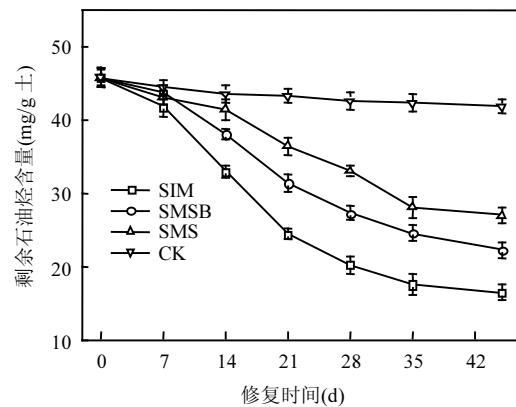


图9 不同修复方式下剩余石油烃含量随时间变化

Fig.9 Variation of residual petroleum hydrocarbon content in soil with remediation time under different remediation methods

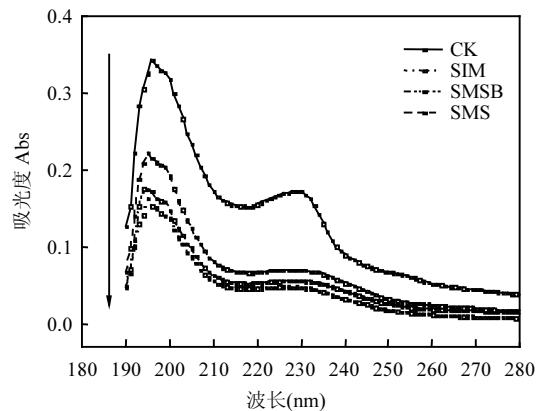


图10 不同修复方式下剩余石油烃光谱扫描图

Fig.10 Spectral scanning diagram of petroleum hydrocarbon under different remediation methods

由图12可以看出,不同修复方式下微生物降解石油烃符合一级反应动力学模型。各组反应速率常数k为0.0273,0.0243,0.0137和0.0016/d,实验组分别是CK组的17.06,15.18,8.56倍,反应速率大幅度提高,并明显缩短生物修复周期。其中,菌糠固定化微生物组修复效果最好,这是细菌-真菌-酶体系共同作用的结果。细菌对简单烃类的降解速度快,而对结构复杂的石油烃降解较为缓慢<sup>[25]</sup>,而真菌能够分泌多种

胞外酶促进分子量高、难降解物质的分解,减少其对微生物的毒害作用。此外,利用真菌分泌的P450酶系以及细菌分泌的胞内加氧酶二者代谢酶的互补性优势,达到高效快速降解土壤中石油烃的目的。

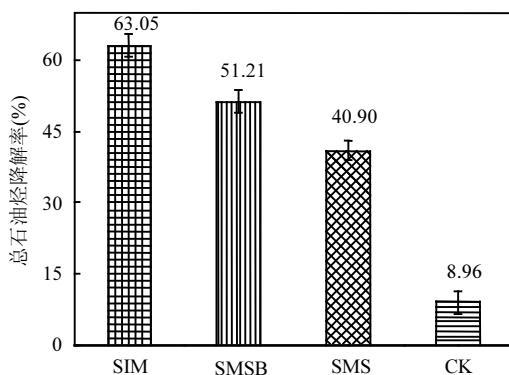


图 11 不同修复方式下 45d 后石油烃降解率

Fig.11 The degradation rate of petroleum hydrocarbon under different remediation methods after 45d

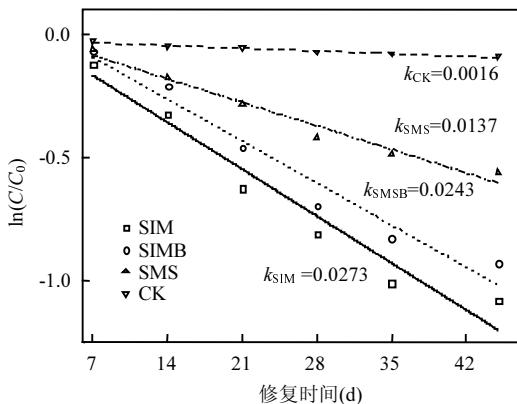


图 12 不同修复方式下对石油烃降解动力学拟合

Fig.12 Kinetics of petroleum hydrocarbon degradation under different remediation methods

## 2.4 石油烃降解主成分分析

表 2 环境因子与排序轴之间的相关性

Table 2 Correlation coefficient of environmental factors with two axes of PCA

项目	石油烃降解率	土壤呼吸强度	细菌数量	真菌数量	漆酶	锰过氧化物酶	FDA 水解酶	脱氢酶
第 1 轴	0.941**	0.733*	0.935*	0.604*	-0.218	0.659*	0.368	0.952**
第 2 轴	0.325	0.963*	0.919**	0.241	-0.966*	0.903*	0.622*	0.970**

注:\*在 0.05 水平的相关性显著;\*\*在 0.01 水平的相关性显著。

由图 13 可以看出,细菌、真菌数量、脱氢酶活性以及土壤呼吸强度位于第 1 象限,其中细菌和真菌数量差异体现在 PC2 上,而与脱氢酶活性以及土壤呼吸强度差异性体现在 PC1 上。FDA 水解酶和锰

过氧化物酶位于第 2 象限,漆酶位于第 3 象限,在 PC1、PC2 均有一定差异性。以上结果表明不同环境因子指标对石油烃降解效果影响不相同。由表 2 可以得到 8 个因子与排序轴之间的相关系数,石油烃

PCA 各排序轴的特征值和累积解释量如表 1 所示,第 1、2、3 轴的特征值分别为 6.558、1.299、0.143,累积值为 100%,按照一般提取要求累积解释量达 85%,并且特征根 > 1 的原则,其中第 1、2 轴累积值为 98.214%(分别为 81.972%、16.242%),因此选择第 1、2 轴作为主要成分分析,分别记为 PC1、PC2。

表 1 PCA 排序的特征值及累积解释量

Table 1 Eigen value and cumulative contribution rate

排序轴	特征值	石油烃降解率-环境因子累积解释量(%)
第 1 轴	6.558	81.972
第 2 轴	1.299	16.242
第 3 轴	0.143	100.000

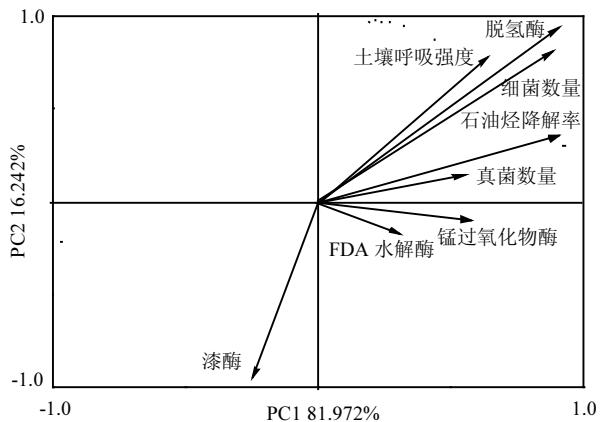


图 13 土壤石油烃降解率与环境因子的主成分分析

Fig.13 PCA of Petroleum hydrocarbon degradation rate and environmental factors in soils

降解率与第1轴呈极显著正相关关系( $P<0.01$ ),而与第2轴相关性不明显.此外,土壤呼吸强度、细菌、真菌数量和锰过氧化物酶活性与第1排序轴呈显著正相关( $P<0.05$ ),脱氢酶活性呈显著正相关( $P<0.01$ ),而与漆酶、FDA水解酶活性相关性不大.

随着微生物数量以及土壤呼吸强度的增加,石油烃降解率也相应提高,这是由于外源菌的加入包括高效石油烃降解菌和菌糠中的真菌提高了土壤微生物数量,对石油烃的去除有显著的促进作用,微生物以石油烃为碳源,不同修复时间和方式,对其利用率也存在差异性,利用程度越高,微生物代谢活动增强,呼吸强度增加,也相应的提高石油烃降解率.脱氢酶为石油烃中氢原子活化提供受氢体<sup>[26-27]</sup>,可实现石油烃的氧化转化,此外脱氢酶还可反应石油烃生物降解活性进而用于评价降解性能,因此,脱氢酶活性越高表明石油烃降解效果较好,具有显著正相关关系,也进一步说明菌糠固定化微生物组修复效果最佳.

## 2.5 菌糠固定化微生物强化修复石油烃污染土壤的作用机理

土壤修复过程中虽无需考虑载体的回收问题,但随着修复时间延长,会成为土壤体系的一部分,因此对载体材料营养物质及无毒无害特性的要求更为严格<sup>[28]</sup>,选择菌糠作为固定化载体材料,采用吸附法固定石油烃降解菌,制备所得固定化微生物既满足了营养物质的需求,同时对土壤也无毒害作用.

与游离菌组相比,固定化微生物组能够通过表面吸附和微孔填充两种作用机制<sup>[2]</sup>吸附、富集土壤中石油烃,增加微生物对污染物的生物可利用性.此外,固定化微生物能够疏松土壤,增强氧气的流动,改善土壤环境,增加土壤肥力,为微生物提供一个有利的缓冲体系,使得外源降解菌成为优势菌种,同时该微环境也是对土著微生物的一个重要驯化场所,能提高土著菌的菌密度和活性稳定性,进而达到生物刺激与强化协同作用机制.综上所述,菌糠固定化微生物修复石油污染土壤效果更好,建议采用该方式.

## 3 结论

3.1 从土壤菌落结构看,菌糠固定化微生物组在28d左右时土壤呼吸强度、细菌及真菌数量最高分别为 $41.95\text{mg CO}_2/(\text{kg}\cdot\text{h})$ , $7.94\times 10^7\text{CFU/g 土}$ , $22.38\times$

$10^4\text{CFU/g 土}$ ,能长期使得外源降解菌为优势菌种,维持较高微生物活性.

3.2 修复45d后,菌糠固定化微生物组对石油烃的降解效率最高,可达63.05%,修复效果最好.比其他多分别高出11.84%,22.15%,54.09%,并能明显缩短修复周期.因此,菌糠固定化微生物为最佳土壤修复方式.

3.3 菌糠固定化微生物对石油污染土壤修复具有生物强化和生物刺激协同作用机制.载体材料不仅可为外源菌提供生存场所,还可吸附富集石油烃,协同细菌-真菌达到强化修复的目的.

## 参考文献:

- 齐永强,王红旗,刘敬奇,等.土壤中石油污染物微生物降解过程中各石油烃组分的演变规律 [J]. 环境科学学报, 2003,23(6):834-836.  
Qi Y Q, Wang H Q, Liu J Q, et al. Component changes of hydrocarbon during the process of bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil [J]. Acta Scientiae Circumstantiae. 2003,23(6):834-836.
- 钱林波,元妙新,陈宝梁.固定化微生物技术修复PAHs污染土壤的研究进展 [J]. 环境科学, 2012,33(5):1767-1776.  
Qian L B, Yuan M X, Chen B L. Research progress about bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with immobilized microorganism technique [J]. Environmental Science, 2012,33(5):1767-1776.
- Varjani S J, Upasani V N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017,120:71-83.
- 王丽萍,李丹,许锐伟,等.专性菌系对石油烃污染土壤的修复性能 [J]. 中国环境科学, 2018,38(4):1417-1423.  
Wang L P, Li D, Xu R W, et al. Remediation performance of constructed specific bacteria on petroleum hydrocarbon contaminated soil [J]. China Environment Science, 2018,38(4):1417-1423.
- Mohd Hanafi F H, Rezania S, Mat Taib S, et al. Environmentally sustainable applications of agro-based spent mushroom substrate (SMS): an overview [J]. Journal of Material Cycles and Waste Management, 2018,20(3):1383-1396.
- Wu J, Zhang T, Chen C, et al. Spent substrate of Ganoderma lucidum as a new bio-adsorbent for adsorption of three typical dyes [J]. Bioresource Technology, 2018,266:134-138.
- 张秀霞,张守娟,张涵,等.固定化微生物对石油污染土壤生物学特性的影响 [J]. 石油学报(石油加工), 2015,31(1):112-118.  
Zhang X X, Zhang S J, Zhang H, et al. Influence of immobilized microorganism on biological characteristics of petroleum-contaminated soil [J]. Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section), 2015,31(1):112-118.
- 王玉建,李红玉.固定化微生物在废水处理中的研究及进展 [J]. 生物技术, 2006,16(1):94-96.  
Wang Y J, Li H Y. Advances in immobilized microorganism and its

- Research on Waste Water Treatment [J]. Biotechnology, 2006,16(1): 94–96.
- [9] Asemoloye M D, Jonathan S G, Jayeola A A, et al. Mediational influence of spent mushroom compost on phytoremediation of black-oil hydrocarbon polluted soil and response of *Megathyrsus maximus* Jacq [J]. Journal of Environmental Management, 2017,200:253–262.
- [10] 宁大亮,王慧,王立华,等.难降解有机物对白腐真菌P450的诱导及P450的作用 [J]. 中国环境科学, 2009,29(4):407–412.
- Ning D L, Wang H, Wang L H, et al. Induction and function of cytochrome P450 in degradation of refractory organic chemicals by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. China Environment Science, 2009, 29(4):407–412.
- [11] 滕芝.石油污染土壤的微生物强化修复作用及其机理研究 [D]. 青岛:中国石油大学(华东), 2012.
- Teng Z. Study on bioaugmentation repair of oil-polluted soil and its mechanism [D]. Qingdao: China University of Petroleum (East China), 2012.
- [12] 刘海芳,马军辉,金辽,等.水稻土FDA水解酶活性的测定方法及应用 [J]. 土壤学报, 2009,46(2):365–367.
- Liu H F, Ma J H, Jin L, et al. Determination of activity of hydrocarbon in paddy soils application in Taihu Lake region [J]. Acta Pedologica Sinica. 2009,46(2):365–367.
- [13] Ebadi A, Khoshkholgh Sima N A, Olamaee M, et al. Remediation of saline soils contaminated with crude oil using the halophyte *Salicornia persica* in conjunction with hydrocarbon-degrading bacteria [J]. Journal of Environmental Management, 2018,219:260–268.
- [14] 王聪颖,王芳,王涛,等.生物强化和生物刺激对土壤中PAHs降解的影响 [J]. 中国环境科学, 2010,30(1):121–127.
- Wang T, Yin C Q, Bian Y R, et al. Effects of bioaugmentation and biostimulation Oil PAHs degradation in soil [J]. China Environment Science. 2010,30(1):121–127.
- [15] 贾建丽,李广贺,张旭.石油污染土壤生物修复的中试系统构建与运行效果 [J]. 中国环境科学, 2005,25(3):339–342.
- Jia J L, Li G H, Zhang X. Design establishment and operation effect of the pilot system in the oil contaminated soils bioremediation [J]. China Environment Science, 2005,25(3):339–342.
- [16] 唐玉妹,魏朝富,颜廷梅,等.土壤质量生物学指标研究进展 [J]. 土壤, 2007,39(2):157–163.
- Tang Y S, Wei C F, Yan T M, et al. Biological indicator of soil quality: A review [J]. Soils. 2007,39(2):157–163.
- [17] 杨茜,吴蔓莉,聂麦茜,等.石油污染土壤的生物修复技术及微生物生态效应 [J]. 环境科学, 2015,36(5):1856–1863.
- Yang Q, Wu M L, Nie M Q, et al. Effects and biological response on bioremediation of petroleum contaminated soil [J]. Environmental Science, 2015,36(5):1856–1863.
- [18] 姜睿玲,杨统一,唐玉斌,等.多环芳烃污染对桑园土壤微生物结构及种群多样性的影响 [J]. 中国环境科学, 2012,32(9):1655–1661.
- Jiang R L, Yang T Y, Tang Y B, et al. Effect of PAHs pollution on microbial structure and population diversity of mulberry orchard soil [J]. China Environment Science, 2012,32(9):1655–1661.
- [19] Li X, Wu Y, Lin X, et al. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil microcosms amended with mushroom cultivation substrate [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2012,47:191–197.
- [20] Karanasios E, Tsipopoulos N G, Karpouzas D G, et al. Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in biobed systems [J]. Chemosphere, 2010,80(8): 914–921.
- [21] 韩慧龙,汤晶,江皓,等.真菌-细菌修复石油污染土壤的协同作用机制研究 [J]. 环境科学, 2008,29(1):189–195.
- Han H L, Tang J, Jiang H, et al. Synergy between fungi and bacteria in fungi-bacteria augmented remediation of petroleum-contaminated soil [J]. Environment Science, 2008,29(1):189–195.
- [22] 肖敏,高彦征,凌婉婷,等.菲、芘污染土壤中丛枝菌根真菌对土壤酶活性的影响 [J]. 中国环境科学, 2009,29(6):668–672.
- Xiao M, Gao Y Z, Ling W T, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on enzymes activity in soils contaminated by phenanthrene and pyrene [J]. China Environmental Science, 2009,29(6):668–672.
- [23] 曾宪成,韩立新,张彩凤,等.我国腐植酸类表面活性剂应用概述 [J]. 腐植酸, 2011,(6):1–4.
- Zeng X C, Han L X, Zhang C F, et al. Outline on development and application of Chinese humic acid surfactants [J]. Humic Acid, 2011,(6):1–4.
- [24] Villalobos M, Avila-Forcada A P, Gutierrez-Ruiz M E. An improved gravimetric method to determine total petroleum hydrocarbons in contaminated soils [J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2008,194(1–4): 151–161.
- [25] Wang S J, Wang X. Bioremediation of petroleum contaminated soils collected all around China: The extensive application and the microbial mechanism [J]. Petroleum Science and Technology, 2018, 36(13):974–980.
- [26] Du J, Sun P, Feng Z, et al. The biosorption capacity of biochar for 4-bromodiphenyl ether: study of its kinetics, mechanism, and use as a carrier for immobilized bacteria [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016,23(4):3770–3780.
- [27] 郭婷,张承东,张清敏.生物修复石油污染盐碱土壤小试模拟系统中土壤性质与微生物特性变化 [J]. 中国环境科学, 2010,30(8): 1123–1129.
- Guo T, Zhang C D, Zhang Q M, et al. Changes of soil properties and microorganism characteristic during bioremediation of petroleum-contaminated saline soil in microscale simulation study [J]. China Environmental Science, 2010,30(8):1123–1129.
- [28] 李静华.固定化微生物强化修复石油污染土壤的研究 [D]. 广州:华南理工大学, 2017.
- Li J H. Bioaugmentation of crude-oil contaminated soil by immobilized microorganisms [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.

**致谢:** 本实验在张亮同学的指导下完成,并协助采样工作,在此表示感谢。

**作者简介:** 张博凡(1994-),女,河北石家庄人,中国石油大学(华东)硕士研究生,主要研究方向为环境污染控制技术。