

土壤石油微生物降解影响因子的正交实验分析

齐永强 王红旗 刘敬奇

(北京师范大学环境科学研究所,环境模拟与污染控制国家重点实验室,北京,100875)

摘 要 利用微生物来降解土壤中的石油类污染物,是当前应用前景最好的土壤石油处理方法。多种因素同时制约着石油类污染物的生物降解。为了量化各因素对彼此的影响,探求促进正向作用、抑制负向作用的途径,为各因素制定适宜的施用时间顺序以及施用量,以最大限度地加快降解速度,笔者设计了本文中的生物降解实验。结果表明,使用多因素复合处理方法可以在土壤石油处理中收到很好的效果,在实验的不同阶段,各影响因素的重要性及最优水平也会不同程度地变化。

关键词 土壤 石油污染 多因素 生物降解实验

Impact of Several Factors on the Bioremediation of Oil in Soil

QI Yongqiang WANG Hongqi LIU Jingqi

(State Key Laboratory of Water Environment Simulation, Institute of Environmental Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Abstract At present, bioremediation is the most promising way to treat oil pollution in soil. Many factors govern the process of bioremediation. The authors designed an experiment with which the interaction between the factors, the methods for maximizing biodegradation and the optimal time order of the factors can be determined. The experimental result shows that oil pollutants can be effectively removed by the combination of different methods, and that the importance and optimal levels of the factors will vary in different stages of the degradation.

Key words soil oil pollution multifactor bioremediation experiment

在矿产开发过程中,落地原油和一些井下作业的污染常常造成严重的土壤石油污染。这些原油大多散落在油井周围,造成了严重的环境污染和生态破坏。近年来,世界各国开始重视土壤中石油污染的处理技术研究。其处理方法按其性质可分为3种(李文利等,1999)物理方法、化学方法和生物方法。20世纪80年代以前的落地石油治理所使用的主要是前两种方法,这些方法所需时间短、见效快,有一定的实效,但存在较明显的缺陷:治理不彻底、费用昂贵或者引起二次污染,所以目前多数只是作为生物治理方法的辅助手段。微生物法利用生物自我调控机制以及微生物对污染物的综合净化功能处理土壤中的石油类污染物,使它们在生物的新陈代谢过程中得到较为彻底的转化和降解,而且最终产物是

CO₂和水,不会产生二次污染,是应用前景最为乐观的土壤石油污染物处理方法(何良菊等,1999)。但所需处理时间较长、对分子量较大的石油组分处理效果不太理想。所以现在倾向于联合运用多种技术,进行复合生物处理,以充分发挥多种技术的联合优势。

由于微生物降解依靠的是特定菌种的生理过程,相对于物理和化学方法处理而言,受环境因素影响的程度更大。这些因素包括污染物的性质和浓度、氧气、温度、湿度、土壤物理化学条件等。为了强化石油污染的生物治理过程,缩短污染治理周期,有必要对不同因素间的相互促进、相互制约的作用机制进行研究,将各因素之间的相互影响量化,探求促进正向作用、抑制负向作用的途径,为各因素制定

适宜的施用时间序列 ,以最大限度地加快降解速度 ,因此设计了如下的复合生物降解实验。

1 实验设计

1.1 实验土样及油样

石油污染土样取自大庆油田杏二联合处理站附近某采油井井台周围。土样经碎散、除杂、过筛(1 mm)混均 ,密封储存在试料袋内 ,以备试验使用。实验用油样为杏二联合站经脱水流程处理后的原油。油样经 230 ℃ 蒸馏以去除易挥发烃类对实验的影响(Dutta 2000) ,置于棕色试剂瓶中备用。

表 1 各因素的水平列表
Table 1 List of factors ' levels

水平数	污染强度(A)%	营养物(B)	氧化剂(C)	表面活性剂(D)%	温度(E)	含水率(F)%	扰动状况(G)
1	0	75/0/0	0	0	20℃ 恒温	25	无扰动
2	1	75/1.6/0.6	0.5	0.5	夏季室温	15	翻土 1 次/3d
3	5	75/4/1.5	1	1	—	—	—
4	10	75/8/3	1.5	3	—	—	—

注 表中各因素不同水平划分的标准为 :A-加入的原油占原土重的质量百分比 ;B-油/ $\text{NH}_4\text{NO}_3/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 的不同比例 ;C-每隔一天加入的 H_2O_2 溶液占原土重的质量比(g/kg·2d) ;D-加入的表面活性剂占原土重的质量百分比。

实验中 ,分别于第 0、4、8、17、36、73 天各提取土样 5 g ,以紫外分光光度法测定土壤样品中石油烃的浓度 ,考察石油污染物在不同的环境条件组合下的生物降解程度 ,同时取土样 1 g 用稀释平板法测定细菌总数。

2 实验结果与分析

从表 2 和图 1 中可以看出 ,在 73 d 的实验中 ,多数样本有较为明显的降解过程 ,最多的可以达到 93.86 %。不同样本的降解模式各不相同 ,如 3 号样本在第 4 天、第 8 天和第 17 天的降解率差别很小 ,而 1、5 和 9 号样本的降解率则随时间推移有显著的提高。为了深入探讨影响生物降解的每种因素所占的权重以及最优配比 ,有必要对各次提取所得数据进行正交实验分析。

(1)计算各因素每个水平的降解量之和与平均降解量 :其中 I 行表示每个因素的 1 水平所对应的数据之和 , i 行为其平均值 ,即有

$$I = \sum \times 1, i1 = \sum \times 1/4 ;$$

同理 , $II = \sum \times 2, i2 = \sum \times 2/4 ; III = \sum \times 3, i3 = \sum \times 3/4 ; IV = \sum \times 4, i4 = \sum \times 4/4$

(2)分析各因素对降解量影响的大小 :表 3 中最

1.2 实验方法

实验代表性地选取了 7 个影响石油烃降解的因素 :A 代表土壤石油污染强度 ;B 代表营养物(NH_4NO_3 、 K_2HPO_4) ;C 表示氧化剂(3 % H_2O_2 溶液) ;D 表示表面活性剂(TW80) ;E 表示温度 ;F 表示土壤含水率 ;G 表示土壤透气性。并将其控制在不同的水平 ,以考察不同因素不同水平下油污土壤的生物降解效果 ,以及各因子间的相互影响和作用 ,以探求降解速度最大化的途径。

采取七因素四水平的正交实验方案设计实验 ,受试的 7 个影响因素及其不同水平如表 1 所示 :

后一行是同一因素的 $i1, i2, i3, i4$ 中最大值减去最小值之差 ,为极差 R 。直观上而言 ,因素的极差越大 ,则该因素对实验指标的影响也就越显著 ,即为影响降解量的主要因素。因此 ,就表 3 而言 ,因素 A (污染强度)是主要因素 ,其余依次为 C (氧化剂 H_2O_2)、D (表面活性剂)、E (温度)和 B (营养物) ,初期湿度和扰动状况对实验结果的影响不大。

(3)取最优水平组合 :利用正交表的综合可比性 ,在表 3 中比较每个因素在不同水平下试验指标的平均值 $i1, i2, i3, i4$ 的大小 ,选择其中最大者 ,得最优水平组合为——A3C4D3E2 ,因为在该水平下油烃的降解量最大。

(4)结果分析 :以 0~8 天 ,8~36 天和 36~73 天分别代表实验的早期、中期、晚期 3 个时间段 ,则降解的初期阶段 ,因素 A 为污染强度对于油烃的降解产生最主要的影响 ,其最优施用量为水平 3 ,这说明污染强度的大小对微生物降解石油烃有很大的影响 ,当石油烃的浓度过高时 ,就会抑制微生物降解能力。这有可能是因为一次性加入过多的石油烃会导致大部分微生物因不能适应新的环境而死亡。因素 C 为氧化剂在初期的重要程度与因素 D (表面活性

表 2 不同采样时间各样品中油烃的含量(g)以及降解率
Table 2 Oil content and degradation rate of the samples at different times

样本号	第 0 天			第 4 天		第 8 天		第 17 天		第 36 天		第 73 天	
	含油量	含油量	降解率	含油量	降解率	含油量	降解率	含油量	降解率	含油量	降解率	含油量	降解率
1	7.26	4.59	36.72	2.86	60.61	2.09	71.15	1.57	78.42	0.45	93.86		
2	17.55	17.12	2.42	16.68	4.95	16.97	3.27	16.32	7.00	14.66	16.46		
3	8.55	5.22	38.89	5.00	41.48	4.93	42.36	4.44	48.02	3.49	59.17		
4	26.95	26.95	0.00	26.85	0.37	26.68	1.00	26.35	2.23	24.81	7.94		
5	6.01	4.16	30.78	2.95	50.97	2.14	64.48	1.86	69.10	1.49	75.18		
6	19.49	16.32	16.28	13.71	29.65	13.36	31.47	12.80	34.32	10.30	47.14		
7	8.58	5.75	32.96	4.94	42.42	4.62	46.21	4.36	49.21	3.14	63.37		
8	28.66	28.66	0.00	28.66	0.00	28.52	0.49	28.39	0.94	27.98	2.39		
9	7.02	4.00	42.98	3.41	51.40	2.91	58.51	1.80	74.38	0.80	88.61		
10	21.28	16.52	22.35	15.63	26.56	15.63	26.56	15.31	28.03	14.02	34.10		
11	8.58	5.89	31.31	5.33	37.89	5.36	37.57	3.48	59.47	2.04	76.26		
12	28.39	27.65	2.60	26.39	7.05	23.60	16.88	22.79	19.73	20.98	26.09		
13	6.24	3.76	39.74	2.12	66.00	1.68	73.14	2.01	67.75	1.67	73.25		
14	18.91	14.03	25.82	14.21	24.85	13.82	26.90	13.79	27.10	12.85	32.05		
15	9.92	6.55	33.99	5.54	44.17	5.32	46.41	5.40	45.57	4.80	51.63		
16	30.04	28.76	4.29	27.99	6.82	27.85	7.29	27.71	7.76	27.60	8.12		

注 :含油量单位为 g 降解率单位为 %。

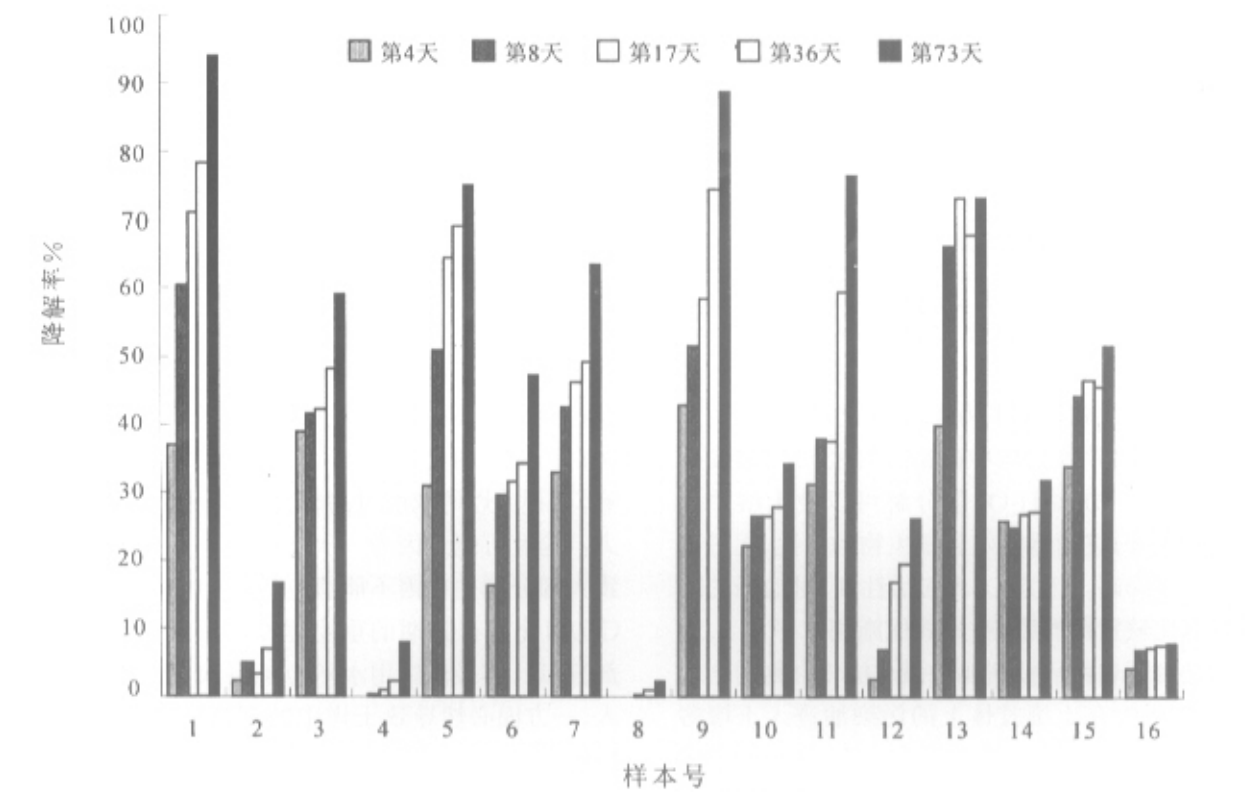


图 1 各样本油烃降解率变化图

表 3 第 4 天降解量的正交表

Table 3 Orthogonal table of the 4 th day's degradation								
样本号	A	B	C	D	E	F	G	Y _i
1	1	2	3	2	2	1	2	2.67
2	3	4	1	2	1	2	2	0.42
3	2	4	3	3	2	2	1	3.32
4	4	2	1	3	1	1	1	0.00
5	1	3	1	4	2	2	1	1.85
6	3	1	3	4	1	1	1	3.17
7	2	1	1	1	2	1	2	2.83
8	4	3	3	1	1	2	2	0.00
9	1	1	4	3	1	2	2	3.02
10	3	3	2	3	2	1	2	4.75
11	2	3	4	2	1	1	1	2.69
12	4	1	2	2	2	2	1	0.74
13	1	4	2	1	1	1	1	2.48
14	3	2	4	1	2	2	1	4.88
15	2	2	2	4	1	2	2	3.37
16	4	4	4	4	2	1	2	1.29
I	10.01	9.76	5.10	10.19	15.15	19.88	19.14	—
II	12.21	10.92	11.34	6.52	22.33	17.61	18.35	—
III	13.24	9.29	9.16	11.10	—	—	—	—
IV	2.03	7.52	11.88	9.68	—	—	—	—
i1	2.50	2.44	1.28	2.55	1.89	2.48	2.39	—
i2	3.05	2.73	2.84	1.63	2.79	2.20	2.29	—
i3	3.31	2.32	2.29	2.77	—	—	—	—
i4	0.51	1.88	2.97	2.42	—	—	—	—
R	2.80	0.85	1.69	1.15	0.90	0.28	0.10	—

注 :R-同一因素的 i1 ,i2 ,i3 ,i4 最大值减去最小值之差 称极差。

剂)接近,其最优施用水平为 4,强氧化剂 H₂O₂ 的加入,一方面必然导致土样中的部分烃类污染物发生氧化降解,另一方面 H₂O₂ 的分解可以使土壤中分子氧浓度上升,进而增强好氧微生物的活性,促进石油烃的生物降解。因素Ⅰ(表面活性剂)对油烃的降解也具有比较重要的影响,其最优施用水平为 3,这有可能是由于表面活性剂能增强有机化合物的亲水性,使原本吸附在土壤胶体上的污染油进入土壤溶液,从而增强了污染油的生物可利用性,使生物降解速度得到大幅提高,同时由于较多表面活性剂会抑制微生物的生长,反而不利于油烃的降解。这种抑

制效果也被 Patrick 等在研究了非离子表面活性剂 Triton x-100 对杂酚油污染土壤微生物降解的影响时所证实(Carriere,1995)。因素Ⅱ(营养物)在这一时期也具有一定重要性。相比之下,另外 3 个因素(E、F、G)在实验初期的影响比较弱。

2.1 降解初期(第 0~8 d)各因素重要性及其最优水平分析

选取第 4 天作为实验初期的代表,对其进行正交分析(表 3)。

(1)计算各因素每个水平的降解量之和与平均降解量:其中 I 行表示每个因素的 1 水平所对应的数据之和,i 行为其平均值,即有

$$I = \sum \times 1, i1 = \sum \times 1/4;$$

同理,II = $\sum \times 2, i2 = \sum \times 2/4$;III = $\sum \times 3, i3 = \sum \times 3/4$;IV = $\sum \times 4, i4 = \sum \times 4/4$

(2)分析各因素对降解量影响的大小:表 3 最后一行是同一因素的 i1 ,i2 ,i3 ,i4 中最大值减去最小值之差,为极差 R。直观上而言,因素的极差越大,则该因素对实验指标的影响也就越显著,即为影响降解量的主要因素。因此,就表 3 而言,因素 A (污染强度)是主要因素,其余依次为 C (氧化剂 H₂O₂)、Ⅰ(表面活性剂)、E (温度)、Ⅱ(营养物),初期湿度和扰动状况对实验结果的影响不大。

(3)取最优水平组合:利用正交表的综合可比性,在表 3 中比较每个因素在不同水平下试验指标的平均值 i1 ,i2 ,i3 ,i4 的大小,选择其中最大者,得最优水平组合为——A3C4D3E2,因为在该水平下油烃的降解量最大。

(4)结果分析:以 0~8 天,8~36 天和 36~73 天分别代表实验的早期、中期、晚期 3 个时间段,则降解的初期阶段,因素 A 为污染强度对于油烃的降解产生最主要的影响,其最优施用量为水平 3,这说明污染强度的大小对微生物降解石油烃有很大的影响,当石油烃的浓度过高时,就会抑制微生物降解能力。这有可能是因为一次性加入过多的石油烃会导致大部分微生物因不能适应新的环境而死亡。因素 C 为氧化剂在初期的重要程度与因素Ⅰ(表面活性剂)接近,其最优施用水平为 4,强氧化剂 H₂O₂ 的加入,一方面必然导致土样中的部分烃类污染物发生氧化降解,另一方面 H₂O₂ 的分解可以使土壤中分子氧浓度上升,进而增强好氧微生物的活性,促进石油烃的生物降解。因素Ⅰ(表面活性剂)对油烃的降

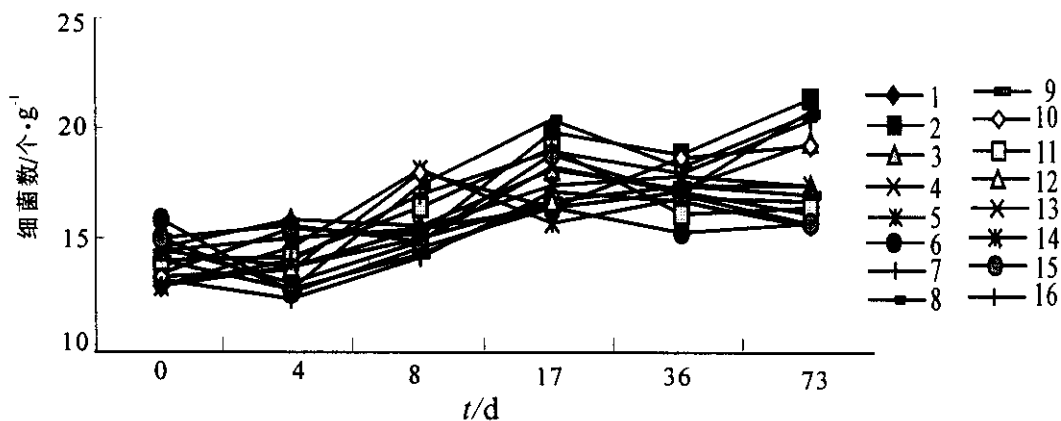


图 3 各样品细菌总数随时间的变化

Fig.3 Bacteria numbers of the samples

1~16-样品号;1~16-sample numbers

3 结论

(1) 利用微生物,并结合一定的物理、化学方法可以在土壤石油处理中收到很好的效果。实验结果表明,适宜的温度、适量的营养、足够的氧供体有利于提高微生物活性,提高土壤石油降解效率。

(2) 利用微生物法处理土壤石油,污染强度的变化对处理效果的影响最大。当土壤含油率为 1.6% 时,降解率最高可以达到 93.9%;含油率为 4.2% 时,降解率可以下降到 47.1%;而当含油率上升为 6.5% 时,降解率明显下降为 8.1%。

(3) 在实验的初期、中期和后期,实验所预先选定的 7 个因素对降解量影响的重要性都随时间发生变化。在实验初期污染强度是首要因素,氧化物、营养物和表面活性剂依次位于第 2、3、4 位;实验中期,氧化物上升至第 1 位因子,温度取代表表面活性剂居第 4 位;到了实验后期,营养物成为最主要的影响因素,污染强度、氧化物和表面活性剂分别位于第 2、3、4 位。所以,不能笼统地说其中某个因子最主要,应根据油烃所处的生物反应阶段控制降解条件。

(4) 此次实验所选择温度、湿度以及扰动状况的 2 个水平,在实验过程中对降解率的影响没有表现出明显的差异性。这有可能是因为所选择的两个水

平对于微生物活性的影响基本一样,这三种因素的最优水平组合还需深入研究。

参 考 文 献

- 李文利,王忠彦,胡永松. 1999. 土壤和地下水石油污染的生物治理. 重庆环境科学, 21(2): 36~37.
- 何良菊,魏德洲,张维庆. 1999. 土壤微生物处理石油污染的研究. 环境科学进展, 7(3): 110~115.
- 史家,徐亚同,张圣章. 1993. 环境微生物学. 上海: 华东师范大学出版社, 68~100.

References

- Carriere P PE. 1995. Enhanced biodegradation of creosote-contaminated soil. Waste Management, 579~583.
- Dutta T K. 2000. Fate of crude oil by the combination of photo oxidation and biodegradation. Environmental Science & Technology, 34(8): 1500~1505.
- He Liangju, Wei Dezhou, Zhang Weiqing. 1999. Study of Bioremediation of oil pollution in soil. Environmental Progress, 7(3): 110~115 (in Chinese with English abstract).
- Li Wenli, Wang Zhongyan, Hu Yongsong. 1999. Bioremediation of oil pollution in soil and groundwater. Chongqing Environmental Science, 21(2): 36~37 (in Chinese with English abstract).
- Shi Jialiang, Xu Yatong, Zhang Shengzhang. 1993. Environmental microbiology. Shanghai Press of East China Normal University, 68~100 (in Chinese).