



文章栏目：土壤污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.202003093

中图分类号 X53

文献标识码 A

李珺, 王雅璇, 罗廷, 等. 利用生物炭负载微生物修复石油烃-镉复合污染土壤[J]. 环境工程学报, 2021, 15(2): 677-687.

LI Xi, WANG Yaxuan, LUO Ting, et al. Remediation of petroleum hydrocarbon-cadmium co-contaminated soil by biochar loaded microorganisms[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(2): 677-687.

利用生物炭负载微生物修复石油烃-镉复合污染土壤

李珺*, 王雅璇, 罗廷, 王丽, 雍姗姗, 张亚红, 兰松, 谢紫苏, 王海燕

西南石油大学化学化工学院, 成都 610500

第一作者: 李珺(1987—), 女, 博士, 副研究员。研究方向: 环境模拟、环境污染修复。E-mail: icy124@hotmail.com

*通信作者

摘要 自四川省长宁某石油烃-重金属镉复合污染土壤中, 筛选出 1 株具有重金属镉(Cd)抗性和石油烃降解能力的菌株, 采用吸附法将菌株固定于玉米芯生物炭上制备成固定化微生物, 并探讨固定化微生物技术(IMT)对土壤石油烃的降解效率以及重金属固定化效果。鉴定结果表明, 成功筛选出的具有 Cd 抗性的石油烃降解菌经鉴定属于柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* sp.)。实验结果表明: 固定化微生物修复石油烃-重金属镉复合污染土壤 60 d 后, 固定化微生物对石油烃降解率达 51.25%, 显著高于游离菌组(40.44%)、生物炭组(31.11%)和空白组(15.18%)($P < 0.05$); 同时, 固定化微生物能够高效固定土壤重金属 Cd, 使其从可交换态、有机结合态向残渣态转变, 可使其残渣态与初始土壤相比增加 6.68 倍; 固定化微生物组的土壤 pH 较初始出现轻微下降, 但维持于 8.42~8.75; 此外, 固定化微生物可显著增加土壤细菌数量(2.48×10^8 cfu·g⁻¹)($P < 0.05$), 土壤脱氢酶活性、过氧化氢酶活性以及多酚氧化酶活性($P < 0.05$)。因此, 采用生物炭固定化微生物技术, 可在高效降解石油烃的同时, 提高重金属 Cd 固定化效果。该研究结果可为 IMT 技术修复石油烃-镉复合污染土壤提供参考。

关键词 固定化微生物; 石油烃; 重金属镉; 复合污染土壤

在石油开采、加工、运输及使用过程中, 原油以及各种石油制品的泄漏和排放事故时有发生, 不可避免地会造成土壤的石油污染^[1]。而土壤石油污染普遍是多种污染物复合污染, 而不是单一污染。石油污染物中除了含有大量有机物外, 还含有重金属等, 他们会进入土壤并对生态环境造成复合污染^[2-3]。近年来, 我国部分油气田地区遭受了不同程度的石油-重金属复合污染。例如, 长宁某页岩气井场土壤中含有原油和重金属镍 2 种污染物^[4]; 黄河三角洲石油污染土壤中重金属元素多达 10 余种^[5]。土壤中多种污染物之间的相互作用使得修复过程变得更加复杂。重金属与有机污染物之间的相互作用可能会改变污染物的形态、溶解度和生物可利用度, 从而相互抑制或促进彼此的修复效率^[6]。重金属及石油中多环芳烃等具有致癌性和诱变性^[7-8], 会对人体健康和自然生态系统造成极大威胁^[9-10], 因此, 有机-重金属复合污染问题在全球范围内引起了极大的关注^[11]。目前, 针对石油-重金属复合污染土壤修复的研究已迫在眉睫。

微生物修复是去除或降解土壤污染物的最常见和最可靠的技术之一, 该技术主要是利用微生物

收稿日期: 2020-03-14; 录用日期: 2020-10-23

基金项目: 四川省科技厅基金项目(2018JY0017)

物的新陈代谢及生物吸附等作用修复污染土壤。但是,将游离菌加入土壤中易受不良影响,导致修复效果不佳。固定化微生物技术(IMT)可为外源微生物提供保护屏障,避免微生物受环境的不利影响,包括与土著微生物竞争、污染物浓度过高、pH和温度不适宜等^[12-13]。WANG等^[14]发现,固定化微生物可以促进盐碱地中多环芳烃的降解,效果优于游离菌。张秀霞等^[15-16]研究了固定化微生物修复石油污染土壤过程中对土壤生物学特性及理化性质的影响,结果表明,固定化微生物处理方式对石油烃降解效果最好,能增加土壤酶活性,对pH具有缓冲作用。IMT不仅可用于修复有机污染土壤,还可应用于重金属污染土壤。有研究表明,生物炭吸附固定化微生物对土壤中U、Cd钝化效果显著^[17]。

目前,关于固定化微生物技术的研究多聚焦于单一污染土壤,针对有机-重金属复合污染土壤的研究鲜见报道^[18]。外源微生物的加入可能会影响土壤微生物生态平衡^[19],故在修复过程中不仅要考察固定化微生物对有机-重金属复合污染土壤修复效果,还要考察其对土壤环境的影响^[20]。土壤酶活性和土壤细菌数量作为土壤生物学特性相关指标,可作为评价修复状况和污染对土壤性质影响的指标^[15,21]。

本研究从四川长宁-威远地区页岩气开发井场重度污染区的含油土壤中筛选出1株具有镉抗性和石油烃降解能力的菌株,以玉米芯生物炭作为固定化材料负载该菌株,研究固定化微生物对镉-石油烃污染土壤的修复效果,以期复合污染土壤的生物修复提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

本研究使用的未受污染土壤取自四川长宁某页岩气井场附近未污染区域。从土壤表层(0~20 cm)处取样,将采集的土壤密封在聚乙烯袋中。自然风干后,将大块土壤破碎研磨并过2 mm的筛网备用。分别将溶于四氯化碳(CCl₄)中的原油和硝酸镉(Cd(NO₃)₂·4H₂O)溶液喷洒于1/4的土壤中,混合均匀置于通风橱内,待CCl₄完全挥发后,与剩下3/4的土壤混合均匀得到石油-镉复合污染模拟土壤。模拟污染土壤物理化学性质如表1所示。

表1 污染土壤理化性质

Table 1 Major physicochemical characteristics of the soil

有机质/ (mg·kg ⁻¹)	总氮/ (mg·kg ⁻¹)	总磷/ (mg·kg ⁻¹)	pH	含水率/ %	石油烃/ (mg·kg ⁻¹)	Cd(mg·kg ⁻¹)					
						可交换态	碳酸盐 结合态	铁锰氧化物 结合态	有机 结合态	残渣态	总量
5679.74	436.50	65.47	8.65	13.83	10000	3.15	0.88	0.54	1.21	0.30	6.08

1.2 培养基

1) 石油烃重金属液体培养基:石油烃 10 g·L⁻¹、酵母膏 3 g·L⁻¹、NaCl 5 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 0.25 g·L⁻¹、(NH₄)₂SO₄ 1 g·L⁻¹、K₂HPO₄·3H₂O 13 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 4 g·L⁻¹、Cd(NO₃)₂·4H₂O 0.82 g·L⁻¹。

2) 石油烃重金属固体培养基:在上述石油烃重金属液体培养基中加入质量分数为2%的琼脂。富集培养基、基础扩大培养基和固定化培养基见参考文献^[22]。上述培养基pH均调整为7.0~7.5,在121℃、1×10⁵ Pa下高压蒸汽灭菌20 min。

1.3 具有镉抗性的石油烃降解菌的筛选及鉴定

1) 具有镉抗性的石油烃降解菌的筛选。称取10 g新鲜土壤样品(采自长宁某长期遭受石油烃和重金属镉复合污染的地区)进行具有镉抗性的石油烃降解菌筛选,具体筛选方法见文献^[23]。最终得到具有镉抗性且能高效降解石油烃的菌株共计7株(记为W3~W9),冷冻保存于丙三醇中。

2) 菌株的吸附特性及降解特性研究。将筛选出的7株菌株的菌液分别接种1 mL于100 mL含

300 mg·L⁻¹ Cd²⁺的基础扩大培养基中, 在 30 ℃、130 r·min⁻¹下培养 72 h, 取 0.5 g 上清液消解, 采用原子吸收分光光度法测定培养基中镉的含量, 培养基中减少的镉含量被认为全部是菌体吸附的镉含量。镉的吸附率按式 (1) 计算。

$$\eta = \frac{C_{Cd0} - C_{Cdt}}{C_{Cd0}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: η 为菌株对 Cd 的吸附率; C_{Cd0} 为处理前 Cd 浓度, mg·L⁻¹; C_{Cdt} 为处理后 Cd 浓度, mg·L⁻¹。

分别将 1 mL 菌液接入 100 mL 以 10 g·L⁻¹ 石油烃为唯一碳源的无机盐培养基中, 在 30 ℃、130 r·min⁻¹ 下培养 7 d, 采用重量法测定培养基中的石油烃含量, 计算石油烃降解率。石油烃的降解率按式 (2) 计算。

$$R = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: R 为石油烃 (TPH) 降解率; C_0 为处理前石油烃含量, mg·L⁻¹; C_t 为处理后石油烃含量, mg·L⁻¹。

对 7 株菌株进行重金属镉吸附特性和石油烃降解特性的研究, 筛选出 1 株对镉具有耐受性且石油烃去除能力较高的菌株作为鉴定和生理生化实验的供试菌株。

3) 菌株菌落及细胞形态的观察采用稀释涂布平板法。在石油烃重金属固体培养基上培养 1~2 d, 观察菌落的形状、透明度、颜色等指标, 并用扫描电子显微镜 (SEM) 观察菌株的细胞大小和形状。甲基红实验、硝酸盐还原实验、柠檬酸盐实验、吡啶实验、动力实验、接触酶实验、糖发酵实验、V-P 实验、硫化氢产生实验、明胶液化实验、酪蛋白水解实验、革兰氏染色实验方法参照参考文献 [24]。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[25] 和《医学细菌名称及分类鉴定》^[26] 对菌株形态及生理生化实验结果初步鉴定菌株的属。核酸提取及 PCR 扩增方法见文献 [23]。本研究的菌株 16S rDNA 测序结果提交数据库进行 BLAST 比对, 并构建系统发育树, 分析菌株种属。

1.4 固定化微生物的制备及表征

选用玉米芯制备生物炭, 马弗炉 500 ℃ 高温热解 3 h, 热解得到生物炭作为固定化载体^[27]。无菌条件下, 将 1 μL 存于丙三醇中的筛选菌株接入基础扩大培养基中, 置于 30 ℃、130 r·min⁻¹ 恒温摇床中活化 8 h 以上, 作为储备菌液。将 2 g 制备好的生物炭置于 100 mL 固定化培养基中, 在 121 ℃、1×10⁵ Pa 下高压蒸汽灭菌 20 min, 接入 1 mL 储备菌液, 置于 130 r·min⁻¹、30 ℃ 的摇床中固定 18 h 后, 以 3 500 r·min⁻¹ 离心 5 min 后弃上清液, 所得固体即为固定化微生物。生物炭和固定化微生物的形貌表征参照文献 [22]。

1.5 土壤修复实验

固定化微生物修复石油-重金属混合污染土壤在高 15 cm、直径 10 cm 的塑料盆中进行。本研究共设 4 组对照: 对照组 (CK), 生物炭和游离菌均不添加; 游离降解菌组 (FC), 采用平板计数法添加与固定化微生物组等量的游离菌; 固定化微生物组 (IM), 1 g 干土添加 3% 的固定化微生物; 生物炭组 (BC), 1 g 干土添加 3% 的生物炭。每组 3 个重复, 每盆 400 g 土壤。分别以硝酸铵和磷酸氢二钾作为氮源和磷源, 以土壤有机碳为基准, 将土壤中的 C、N、P 调至 C:N:P=100:10:1。定时给土壤翻土保持充分的氧气供给, 并定期添加去离子水, 使土壤含水率维持在 20%。实验周期为 60 d, 每 5 d 分别测定土壤 pH、土壤脱氢酶 (DHA)、多酚氧化酶 (S-PPO) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性、石油烃残留量的变化; 每 10 d 分别测定重金属形态及土壤细菌数量的变化。其中, 含水率采用 105 ℃ 烘干法^[28] 测定; 土壤 pH 采用 1:2.5 (W/V) 的水提取液玻璃电极法^[29] 测定; 有机质、总氮和总磷分别采用重铬酸钾容量法、碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法和氢氧化钠熔融-钼锑抗分光光度法^[30-32] 测定; 重金属形态采用 Tessier 五步浸提法^[33] 测定; 石油烃含量采用重量法^[34] 测定; 脱氢

酶、多酚氧化酶和过氧化氢酶活性分别氯化三苯基四氮唑 (TTC) 分光光度法、邻苯三酚比色法和高锰酸钾滴定法^[30,35] 测定; 细菌数量采用稀释涂布平板法^[36] 测定。

2 结果与讨论

2.1 降解菌及其性能分析

1) 菌株吸附特性及降解特性。菌株对镉吸附率和石油烃降解率如图 1 所示。由图 1(a) 可知, 筛选出的菌株 W3、W4 和 W8 均对 Cd^{2+} 有较好的吸附作用, 吸附率均在 28% 以上。3 株菌均能在含 Cd 的培养基中存活并吸附一定量的 Cd, 但整体来说菌株对 Cd 的吸附率相差不大。菌株主要通过吸附沉淀对 Cd^{2+} 产生生物钝化, 利用自身代谢产物与 Cd^{2+} 络合等, 对 Cd 进行吸附^[37]。由图 1(b) 可知, 菌株 W8 对石油烃的降解率最高, 达 39.15%, 而吸附 Cd 效果较好的 W3 和 W4 对石油烃的降解不佳。菌株主要是通过将石油烃作为碳源来维持自身的新陈代谢从而达到去除的目的。将微生物应用于修复石油烃-镉复合污染土壤中, 所需的菌株势必对重金属镉具有较好的抗性, 同时对石油烃具有较好的降解能力才能在污染土壤中更好地存活, 才能使修复效率更佳^[23]。综上所述, W8 是吸附和降解效果最佳的菌株, 故确定 W8 为本研究筛选出的目的菌株, 用作后续生物学特性研究的供试菌株。

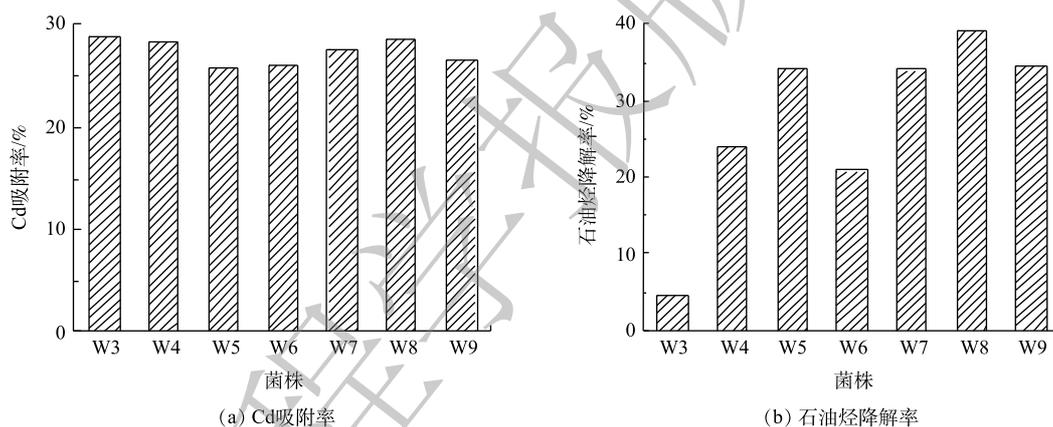
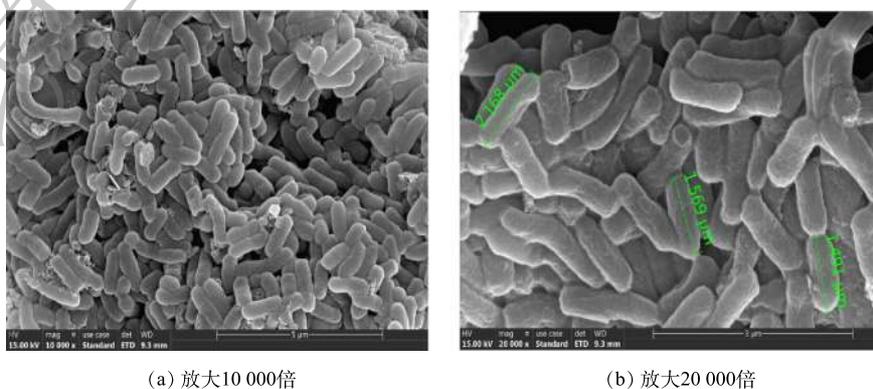


图 1 W3~W9 菌株对 Cd 吸附率和石油烃降解率

Fig. 1 Cd adsorption rate and petroleum degradation rate of strains W3~W9

2) 菌株形态观察及生理生化指标。菌株 W8 的 SEM 图及菌株 W8 和柠檬酸杆菌的生理生化特性对照分别如图 2 和表 2 所示。该菌株的菌落形态为圆形, 颜色为淡黄色, 边缘平滑, 透明度较



(a) 放大10 000倍

(b) 放大20 000倍

图 2 菌株 W8 扫描电镜图

Fig. 2 Scanning electron microscopy (SEM) of strain W8

表 2 菌株 W8 和柠檬酸杆菌的生理生化特性对照

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain W8 and *Citrobacter* sp.

生理生化反应	实验结果	柠檬酸杆菌	生理生化反应	实验结果	柠檬酸杆菌
革兰氏染色	-	-	甲基红实验	+	+
酪蛋白水解实验	-	D	硝酸盐还原实验	+	+
动力实验	-	+	糖发酵实验	+	+
接触酶实验	-	+	V-P实验	-	-
柠檬酸盐实验	+	+	硫化氢产生实验	+	D
吲哚实验	+	d	明胶液化实验	-	-

注：“+”表示呈阳性；“-”表示呈阴性；“d”表示大部分为阳性；“D”表示不同分类单位间反应不同。

差。由图 2 可得出，细菌细胞为杆状，菌体长 1~2 μm 。生理生化实验中除动力实验、接触酶实验、V-P 实验、明胶液化实验、酪蛋白水解实验和革兰氏染色结果呈阴性(-)外，其余生理生化反应均呈阳性(+)。菌株 W8 的形态和生理生化特性同柠檬酸杆菌属的细菌特征相似，初步判定为柠檬酸杆菌。

3) 菌株 16S rDNA 的序列分析。将测序得到的 W8 菌株 16S rDNA 序列提交至数据库进行比对，构建出如图 3 所示的系统发育树。分析结果表明，菌株 W8 与柠檬酸杆菌属的同源性相近(97%)，2 者在系统发育树上聚为 1 簇。综合细菌形态、生理生化实验结果和 16S rRNA 分析，可确定 W8 属柠檬酸杆菌，将其命名为 *Citrobacter* sp. W8。

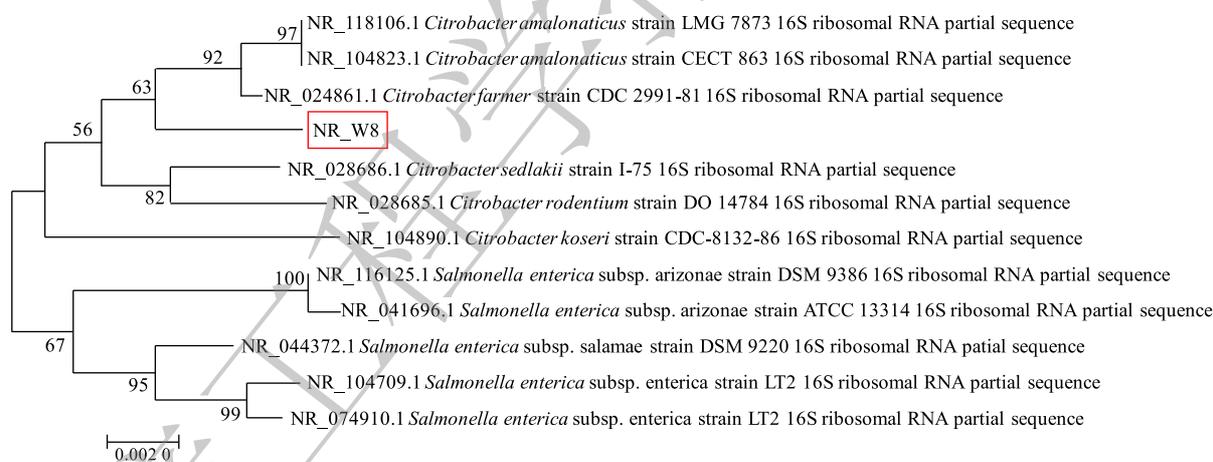


图 3 菌株 W8 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 3 16S rDNA phylogenetic tree of strain W8

2.2 生物炭及固定化微生物表征

生物炭和固定化微生物的形貌表征如图 4 所示。从图 4(a) 可以看到，生物炭骨架结构清晰，形成松散、孔隙发达的结构。生物炭的多孔结构可以给微生物提供较大的附着空间，同时也有利于其对污染物的吸附，缩短污染物与微生物的距离^[38]。由图 4(b) 中可以观察到，生物炭孔径中附着大量目标菌株，这说明生物炭表面已成功负载 *Citrobacter* sp. W8。

2.3 土壤中石油烃降解率的变化

采用不同修复方式对石油烃-Cd 复合污染土壤进行为期 60 d 的修复，修复过程中石油烃 (TPH) 降解率变化如图 5 所示。在 60 d 的修复周期内，各组 TPH 降解率均呈上升趋势，固定化微生物组 (IM)、游离菌组 (FC)、生物炭组 (BC)、空白组 (CK) 的 TPH 降解率分别为 51.25%、40.44%、

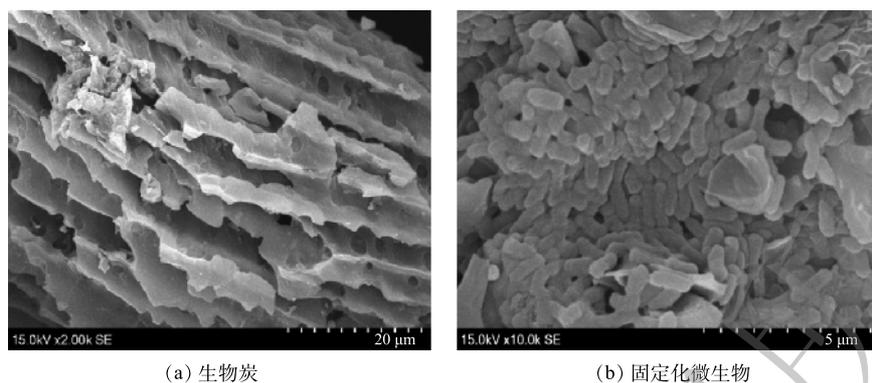


图4 生物炭(2 000倍)和固定化微生物(10 000倍)的扫描电镜图

Fig. 4 SEM of biochar (2 000 times) and immobilized microorganisms (10 000 times)

31.11%、15.18%。在0~30 d内, IM组TPH降解率迅速上升,这主要是因为生物炭的孔隙结构为微生物提供了适宜的生存空间^[39],有效避免了外源微生物与土著微生物的竞争,减轻了污染物对微生物的直接毒害作用。同时,生物炭的加入能够提供N、P、K等营养元素^[40],促使细菌数量迅速增加,进而增强微生物对TPH的代谢能力。生物炭能够吸附部分污染物并缩短微生物与污染物的距离,提高降解效率^[38]。30 d后的降解速率逐渐趋于平稳,这可能与TPH降解过程中产生的有毒代谢产物积累过量以及土壤中营养物质的逐渐缺乏有关。而FC缺乏生物炭的保护作用,TPH降解率明显低于IM($P<0.05$)。BC的TPH降解率明显高于CK,这证明生物炭对TPH的降解有促进作用。CK也有较低的TPH降解率,这主要是由于土著微生物的降解以及TPH的自然挥发^[15]。

2.4 土壤中重金属形态的变化

图6(a)为各组第60天Cd形态含量与初始土壤中Cd形态含量的比值,表示各形态变化的倍数。可以看出,IM组中RS与初始土壤相比增加了6.68倍,相较于其他组而言,IM在降低Cd迁移性方面作用更为明显,这是因为生物炭对重金属的固定起着至关重要的作用。生物炭表面丰富的含氧官能团(羟基和羧基)可以与重金属结合,通过络合或共沉淀降低重金属的可利用态含量^[40]。DAS等^[41]发现,生物炭表面含氧官能团越多,其与金属离子的离子交换作用越强。同时,*Citrobacter* sp.可以通过生物吸附的方式降低部分可利用态重金属^[42]。因此,IM中EX含量的降低是生物炭络合、共沉淀与微生物吸附联合作用。Cd的形态变化表明,添加固定化微生物可减轻Cd的直接毒性,降低Cd的流动性和生物利用度^[17]。

采用不同修复方式对石油烃-Cd复合污染土壤进行为期60 d的修复,修复过程中土壤中Cd形态含量变化如图6(b)所示。土壤中重金属形态可以分为可交换态(EX)、碳酸盐结合态(CB)、铁锰氧化物结合态(OX)、有机结合态(OM)和残渣态(RS)。5种形态的重金属的生物可利用性为:EX>CB>OM>OX>RS^[43]。从图6(b)中可以看出,初始土壤(i)中Cd的EX含量较高,占重金属总量的51.78%,RS含量低,土壤中重金属迁移性强,生物有效性高,土壤环境风险高。修复60 d后,BC、IM、FC、CK各组土壤中EX含量分别从初始 $3.1503 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 降至2.124、1.9429、2.6011 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和2.9570 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。土壤中石油烃被微生物降解导致有机质含量降低,OM含量下降,其中IM下降最

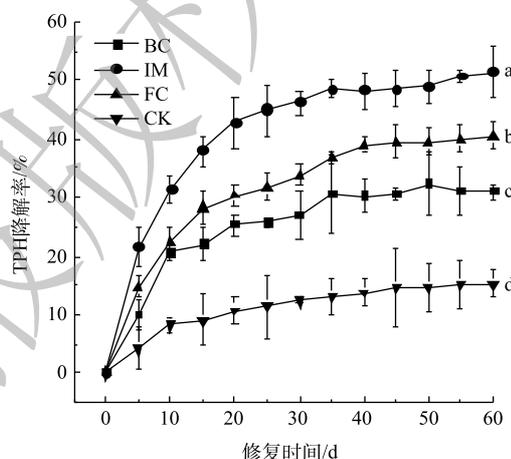


图5 石油烃降解率

Fig. 5 Degradation rate of TPH

多, 减少了 $0.6653 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。IM 组 Cd 的 OX 和 RS 含量增加最多, 分别增加了 0.2518 和 $1.7257 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。此外, 培养时间也有利于 Cd 从非残留组分向残留组分的转移。

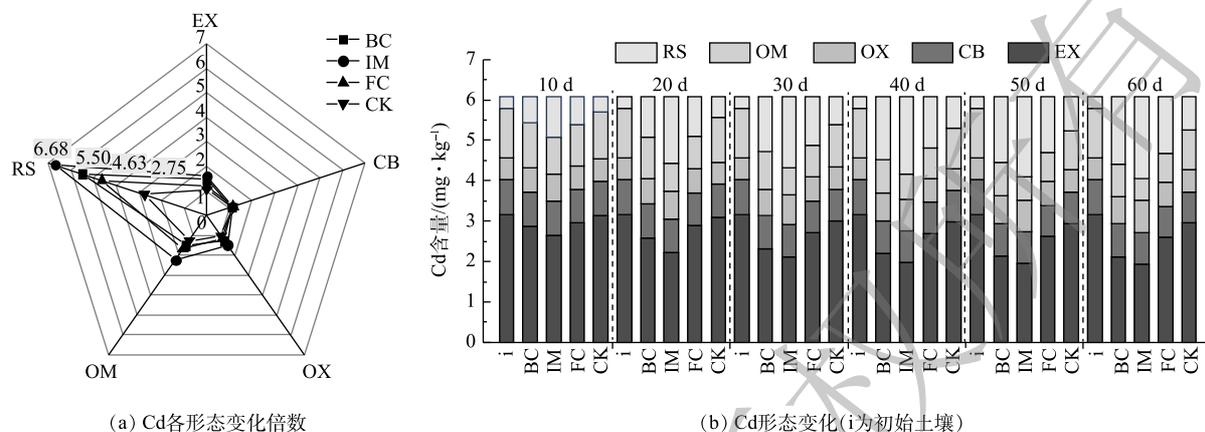


图 6 Cd 形态的变化及其变化倍数

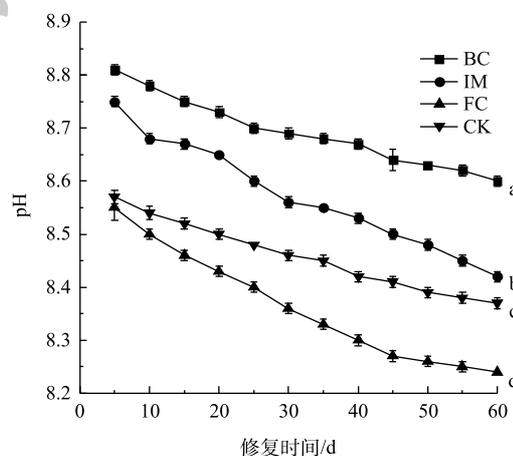
Fig. 6 Change of Cd fraction and its changed times

2.5 土壤 pH 的变化

由于生物炭呈碱性, 故生物炭的加入轻微提升了 IM 和 BC 组的土壤 pH, 分别为 8.75 和 8.81。 *Citrobacter* sp.W8 在 pH 为 5~9 时均能较好生长, 因此, 菌株的生长不会受到生物炭导致土壤 pH 变化的影响。采用不同修复方式对石油烃-Cd 复合污染土壤进行修复, 在 60 d 的修复过程中土壤 pH 的变化如图 7 所示。修复周期内各组土壤 pH 均呈下降趋势, 这是因为微生物在代谢石油烃的过程中产生了脂肪酸等有机酸^[44]。在土壤中添加生物炭 (BC 和 IM) 后, 土壤 pH 明显高于不添加生物炭 (CK 和 FC) 的处理组 ($P < 0.05$)。与 FC 相比, BC 和 IM 对土壤 pH 的影响相对较小, 维持在原土 pH (8.65) 附近, 具有一定的缓冲作用。这是因为, 在热解过程中生物炭中灰分含量的增加, 以及生物炭中表面官能团和可溶性碳酸盐的作用, 可以中和土壤的酸性^[45]。pH 突然改变会对微生物造成损害, 抑制相关酶活性^[46], 而 pH 的缓冲作用可减轻微生物损伤。同时, 生物炭的加入相对提高了土壤 pH, 这会促进重金属沉淀, 增强重金属的固定, 从而减轻重金属对微生物的毒性^[47]。

2.6 土壤酶活性的变化

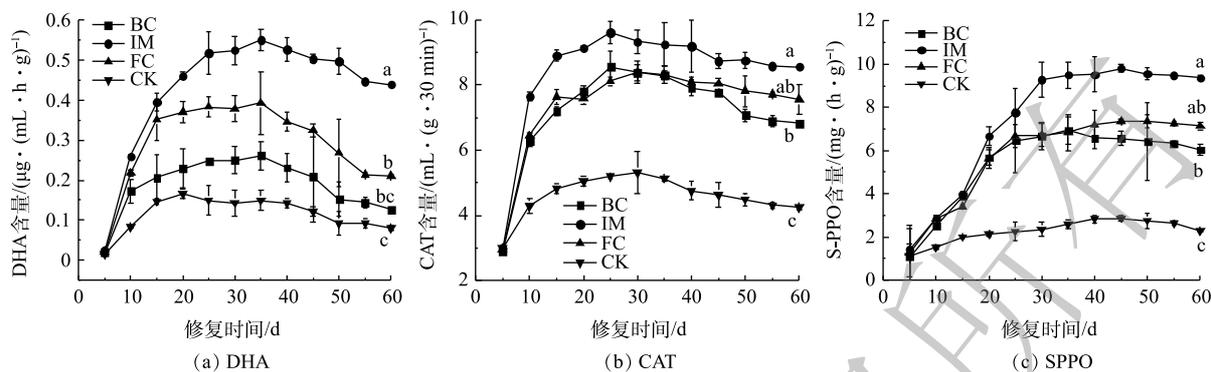
生物修复效果的关键在于微生物活性及酶促反应速率的高低^[48]。土壤酶在微生物新陈代谢过程中起着催化作用, 可以作为评价石油污染土壤修复效果的指标^[49]。采用不同修复方式对石油烃-镉复合污染土壤进行修复, 在 60 d 的修复过程中土壤 CAT、DHA、S-PPO 活性变化如图 8 所示。60 d 内, IM 组对土壤 DHA、CAT、S-PPO 活性均有促进作用, 最大值分别为 $0.5497 \mu\text{g} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h} \cdot \text{g})^{-1}$ 、 $9.0637 \text{ mL} \cdot (\text{g} \cdot 30 \text{ min})^{-1}$ 和 $9.8093 \text{ mg} \cdot (\text{h} \cdot \text{g})^{-1}$ 。修复过程中酶活性均呈先增大后缓慢减小的趋势。添加游离菌、生物炭和固定化微生物都能增加土壤酶活性, 但 IM 组 3 种酶活性均高于其他 3 组。这是因为, IM 组中的生物炭能够降低土壤不良环境对固定化菌株的负面影响, 使微生物具有较高的活性, 因而促进微生物分泌更多的酶。修复前期土壤中的营养物质充足, 微生物数量增加, 酶活



注: 不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图 7 土壤 pH

Fig. 7 Soil pH



注:不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

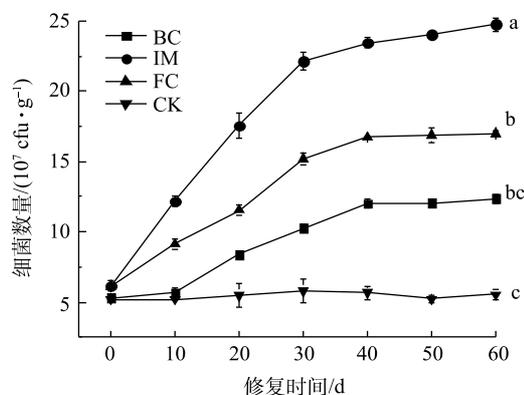
图8 DHA、CAT和S-PPO活性

Fig. 8 Soil dehydrogenase activity, catalase activity and polyphenol oxidase activity

性也随之提高。但随着微生物数量的大量增加,土壤中营养物质缺乏,并且在生长繁殖过程中产生了许多有害的代谢产物,导致后期土壤酶活性缓慢下降^[49]。同时,Cd化学形态的改变对土壤酶活性也有不同程度的影响^[50]。结合图6(a)可知,IM组中Cd的可交换态含量降低最多,残渣态含量增加亦最多,导致该组Cd的生物毒性较小,所以土壤酶活性高。目前,针对土壤酶活性受抑制的机理主要有2种解释:一是土壤微生物数量和活性决定土壤酶的合成与分泌,污染物会抑制土壤微生物的生长繁殖,减少微生物分泌土壤酶,降低酶活性;二是污染物直接与酶的活性位点结合,使酶失活^[51]。固定化微生物的加入使得石油烃含量降低,减少了污染物与酶的结合位点;同时,Cd的生物可利用性和石油烃含量的降低也减轻了污染物对微生物的抑制作用,使微生物分泌酶的能力增强。因此,IM组脱氢酶、过氧化氢酶和多酚氧化酶的活性表现为最强。

2.7 土壤细菌数量的变化

采用不同修复方式对石油烃-Cd复合污染土壤进行修复,在60d的修复过程中土壤细菌数量变化如图9所示。在修复过程中,固定化微生物、游离菌及生物炭的添加都能促进土壤微生物的生长,细菌呈先增大后平缓的趋势。但是,各实验组的上升幅度不同:IM组最高,从 6.18×10^7 增加到 2.48×10^8 cfu·g⁻¹;其次为FC组,从 6.09×10^7 增加至 1.70×10^8 cfu·g⁻¹。IM和FC组细菌数量均高于BC和CK组,这说明固定化微生物和游离菌的加入提高了土壤细菌量,使细菌数量处在较高的水平,能够提高细菌对石油烃的降解。在修复初期,IM组细菌数量迅速增加,其原因主要有4个方面:1)生物炭的多孔特性可以将微生物吸附在内孔,提高细菌数量,减少外界不良环境对微生物的影响^[52];2)生物炭利用其强吸附能力将TPH吸附在表面,供生物炭上的降解菌降解^[53];3)重金属形态对微生物毒害作用存在明显差异^[54],IM组Cd的化学形态最大程度地从可交换态和有机结合态转换成了残渣态,降低了Cd对微生物的直接毒害作用;4)外源微生物*Citrobacter* sp. W8的加入可能对土著微生物的生长起促进作用,土壤中细菌总量增多,细菌对石油烃的降解也随之提高。而游离菌直接加入土壤中,因其不适应土壤环境,故其细菌数量增加缓慢;随着修复时间的延长,细菌以石油烃为碳源,不断繁殖,细菌量增多。在40~60d内,细菌数量变化不大,这是因为在石油烃降解过程中产生并积累了一



注:不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图9 土壤细菌数量

Fig. 9 Number of bacteria in soil

些有毒中间产物, 这些有毒中间产物对细胞有毒害作用, 因而对细菌数量有一定的抑制作用^[49]。

3 结论

1) 筛选出1株具有镉抗性的石油烃降解菌, 该菌株为柠檬酸杆菌, 命名为 *Citrobacter* sp.W8, 该菌株可有效用于固定化微生物技术修复石油烃-镉复合污染土壤。

2) 固定化微生物技术可利用微生物新陈代谢显著降低土壤石油烃含量, 并通过生物炭吸附、络合和共沉淀作用及生物吸附作用将重金属 Cd 由可交换态和有机结合态转化为残渣态, 从而达到固定土壤重金属的效果。

3) 生物炭固定化微生物对土壤 pH 具有缓冲作用, 从而减轻 pH 突变对微生物造成的损害。此外, 该技术通过促进 HDA、CAT、SPPO 的分泌, 以及土壤细菌数的增加, 达到提高土壤微生物活性的目的。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] TANG L, ZENG G, SHEN G, et al. Rapid detection of picloram in agricultural field samples using a disposable immune membrane-based electrochemical sensor[J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(4): 1207-1212.
- [3] 马永松, 李琦, 罗廷, 等. 电动微生物法修复石油和镍污染土壤的研究[J]. 环境科学与技术, 2019, 42(8): 201-208.
- [4] MA Y S, LI X, MAO H M, et al. Remediation of hydrocarbon-heavy metal co-contaminated soil by electrokinetics combined with biostimulation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 353: 410-418.
- [5] 李沅蔚, 邹艳梅, 王传远. 黄河三角洲油田区土壤重金属的垂直分布规律及其影响因素[J]. 环境化学, 2019, 38(11): 2583-2593.
- [6] MA J W, WANG F Y, HUANG Z H, et al. Simultaneous removal of 2,4-dichlorophenol and Cd from soils by electrokinetic remediation combined with activated bamboo charcoal[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 176(1-3): 715-720.
- [7] XU P, ZENG G M, HUANG D L, et al. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 424: 1-10.
- [8] 刘慧杰, 张虎山. 海洋石油污染及治理措施[J]. 广州环境科学, 2012, 27(4): 35-38.
- [9] SILVA D A, C F, LOPES M V, VAZ RIBEIRO M R, et al. Cadmium and lead in seafood from the Aratu Bay, Brazil and the human health risk assessment[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2016, 188(4): 259.
- [10] ISTRATE I A, COCARTA D M, WU Z, et al. Minimizing the health risks from hydrocarbon contaminated soils by using electric field-based treatment for soil remediation[J]. *Sustainability*, 2018, 10(1): 253.
- [11] 黄荣霞, 周际海, 袁颖红, 等. 石油污染土壤修复研究进展[J]. 南昌工程学院学报, 2016, 35(3): 48-54.
- [12] WANG Z, XU Y, WANG H, et al. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms[J]. *Pedosphere*, 2012, 22(5): 717-725.
- [13] WANG X, SUN S, LU J, et al. Remediating chlorpyrifos-contaminated soil using immobilized microorganism technology[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2019, 28(1): 349-357.
- [14] WANG S, LI X, LIU W, et al. Degradation of pyrene by immobilized microorganisms in saline-alkaline soil[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(9): 1662-1669.
- [15] 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.
- [16] 张秀霞, 张守娟, 张涵, 等. 固定化微生物对石油污染土壤理化性质的调控作用[J]. 石油加工, 2014, 30(6): 1106-1112.
- [17] 戚鑫, 陈晓明, 肖诗琦, 等. 生物炭固定化微生物对U、Cd污染土壤的原位钝化修复[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(8): 1683-1689.
- [18] WANG C H, GU L, GE S, et al. Remediation potential of immobilized bacterial consortium with biochar as carrier in pyrene-

- Cr (VI) co-contaminated soil[J]. *Environmental Technology*, 2019, 40(18): 2345-2353.
- [19] TRIBEDI P, SIL A K. Bioaugmentation of polyethylene succinate-contaminated soil with *Pseudomonas* sp. AKS2 results in increased microbial activity and better polymer degradation[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(3): 1318-1326.
- [20] FESTA S, COPPOTELLI B M, MORELLI I S. Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: Impact on the bacterial community and biodegradation[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 98: 8-19.
- [21] 张志明. 不同农艺措施对土壤微生物和酶活性的影响[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
- [22] 马伶俐. 生物炭基固定化微生物及对石油污染土壤的修复研究[D]. 成都: 西南石油大学, 2017.
- [23] 马永松, 李琦, 李珍珍, 等. 一株镍抗性和石油烃降解菌的分离鉴定及其生物学特性[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(10): 169-177.
- [24] 程丽娟, 薛泉宏, 韦革宏, 等. 微生物学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [25] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [26] 赵乃昕, 苑广盈, 李赫, 等. 医学细菌名称及分类鉴定[M]. 济南: 山东大学出版社, 2013.
- [27] 任宏洋, 马伶俐, 王兵, 等. 生物炭基固定化菌剂对石油类污染物的高效降解[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(11): 6177-6183.
- [28] 陈伟胜, 童玲, 唐国斌. 石油污染土壤含水率的测定[J]. *华北水利水电学院学报*, 2012, 33(4): 93-96.
- [29] 成斌斌. 土壤pH的测定[J]. *化学教与学*, 2014(4): 95-97.
- [30] 张守娟. 固定化微生物对石油污染土壤环境因子的调控作用研究[D]. 青岛: 中国石油大学(华东), 2014.
- [31] 陈春霏, 付洁, 梁鹏, 等. 土壤中全氮分析方法的研究进展[J]. *中国环境监测*, 2018, 34(1): 112-119.
- [32] 陆杏英. 钼锑抗比色法测定土壤中的总磷[J]. *环境科学技术*, 1991, 4(3): 33-34.
- [33] TESSIER A, CAMPBELL P G C, BISSON M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals[J]. *Analytical Chemistry*, 1979, 51(7): 844-851.
- [34] WU M, DICK W A, LI W, et al. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2016, 107: 158-164.
- [35] 顿咪娜, 胡文容, 裴海燕, 等. 脱氢酶活性检测方法及应用[J]. *工业水处理*, 2008, 28(10): 1-4.
- [36] 韩慧龙, 陈镇, 杨健民, 等. 真菌-细菌协同修复石油污染土壤的场地试验[J]. *环境科学*, 2008, 29(2): 2454-2461.
- [37] 张旭辉, 孙斌, 魏志敏, 等. 2株耐镉微生物的筛选及其对镉的吸附钝化差异机制[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(5): 869-876.
- [38] WANG T, LI Y, JIANG A C, et al. Suppression of chlorantraniliprole sorption on biochar in soil-biochar systems[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2015, 95(3): 401-406.
- [39] EL-BORAI A, ELTAYEB K, MOSTAFA A, et al. Biodegradation of industrial oil-polluted wastewater in egypt by bacterial consortium immobilized in different types of carriers[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2016, 25(5): 1901-1909.
- [40] UCHIMIYA M, CHANG S, KLASSON K T. Screening biochars for heavy metal retention in soil: Role of oxygen functional groups[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 190(1/2/3): 432-441.
- [41] DAS D D, SCHNITZER M I, MONREAL C M, et al. Chemical composition of acid-base fractions separated from biooil derived by fast pyrolysis of chicken manure[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(24): 6524-6532.
- [42] MACASKIE L E, DEAN A C R. Strontium accumulation by immobilized cells of a *Citrobacter* sp[J]. *Environmental Technology Letters*, 1985, 5: 177-186.
- [43] SU H, FANG Z, TSANG P E, et al. Remediation of hexavalent chromium contaminated soil by biochar-supported zero-valent iron nanoparticles[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 318: 533-540.
- [44] VARMA S S, LAKSHMI M B, RAJAGOPAL P, et al. Degradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in contaminated soil using *Bacillus pumilus* MVSV3[J]. *Biocontrol Science*, 2017, 22(1): 17-23.
- [45] JEFFERY S, VERHEIJEN F G A, VAN DER VELDE M, et al. A quantitative review of the effects of biochar application to

- soils on crop productivity using meta-analysis[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2011, 144(1): 175-187.
- [46] 国春菲. 土壤盐分和pH对滨海盐土土壤微生物多样性的影响[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2013.
- [47] JIANG J, XU R, JIANG T, et al. Immobilization of Cu(II), Pb(II) and Cd(II) by the addition of rice straw derived biochar to a simulated polluted Ultisol[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 229-230: 145-150.
- [48] 王晓玲, 陈宏坤, 郑瑾, 等. 固定化技术提高微生物对土壤中石油烃降解性能研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(30): 13-17.
- [49] 王华金, 朱能武, 杨崇, 等. 石油污染土壤生物修复对土壤酶活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(6): 1178-1184.
- [50] 李楠. 重金属形态与土壤酶活性关系研究[D]. 西安: 西安科技大学, 2015.
- [51] 周显勇, 刘鸿雁, 刘艳萍, 等. 植物修复重金属和抗生素复合污染土壤微生物数量和酶活性的变化[J]. *农业环境科学学报*, 2019, 38(6): 1248-1255.
- [52] 孔露露. 生物炭修复石油污染土壤的研究及机理分析[D]. 天津: 南开大学, 2015.
- [53] XIONG B, ZHANG Y, HOU Y, et al. Enhanced biodegradation of PAHs in historically contaminated soil by *M. gilvum* inoculated biochar[J]. *Chemosphere*, 2017, 182: 316-324.
- [54] CHENG J, SUN Z, YU Y, et al. Effects of modified carbon black nanoparticles on plant-microbe remediation of petroleum and heavy metal co-contaminated soils[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2019, 21(7): 634-642.

(本文编辑: 金曙光, 郑晓梅)

Remediation of petroleum hydrocarbon-cadmium co-contaminated soil by biochar loaded microorganisms

LI Xi*, WANG Yaxuan, LUO Ting, WANG Li, YONG Shanshan, ZHANG Yahong, LAN Song, XIE Zisu, WANG Haiyan

School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest Petroleum University, Chengdu 610500, China

*Corresponding author, E-mail: icy124@hotmail.com

Abstract A bacterial strain with heavy metal cadmium (Cd) resistance and petroleum hydrocarbons degradation ability was isolated from petroleum hydrocarbons and heavy metal Cd co-contaminated soil sampled from Changning, Sichuan province. The strain was fixed on corncob biochar by adsorption method to obtain immobilized microorganisms. The degradation efficiency of soil petroleum hydrocarbons and the immobilization effect of heavy metals by immobilized microorganism technology (IMT) were investigated. The results showed that the selected strain had the ability of Cd resistance and petroleum hydrocarbons degradation, which was identified as *Citrobacter* sp. Remediation of petroleum hydrocarbon-heavy metal Cd contaminated soil by immobilized microorganisms after 60 d, the degradation rate of petroleum hydrocarbons by immobilized microorganisms was 51.25%, significantly higher than that of the free bacteria group (40.44%), biochar group (31.11%) and blank group (15.18%) ($P < 0.05$). At the same time, immobilized microorganisms could effectively immobilize the heavy metal Cd in the soil by changing the exchangeable and organic matter-bound species to the residual species, which could increase the residual species by 6.68 times compared with the initial soil. The addition of immobilized microorganisms caused slight decrease of soil pH compared with that in the initial stage, but maintained 8.42~8.75. Moreover, immobilized microorganisms significantly increased the number of soil bacteria (2.48×10^8 cfu·g⁻¹) ($P < 0.05$), soil dehydrogenase activity, catalase activity and polyphenol oxidase activity ($P < 0.05$). Biochar immobilized microorganisms could not only efficiently degrade petroleum hydrocarbons, but also improve the heavy metal immobilization. The research results could provide theoretical support for remediation of petroleum-Cd co-contaminated soil by IMT.

Keywords immobilized microorganism; petroleum hydrocarbon; cadmium; co-contaminated soil