

渤海微生物自然混合菌群降解20号 重柴油中正烷烃的研究*

孙修勤 姚乔尔 卢颖

(国家海洋局第一海洋研究所, 青岛)

提要 本文运用气相色谱法, 对渤海微生物自然混合菌群降解20号重柴油中的烷烃的能力进行了实验室研究。

实验测定了在5, 50, 500 ppm三个油浓度下微生物自然混合菌群对正烷烃的降解能力。20天内, 微生物对正烷烃(C_{11} — C_{22})的生物降解率分别为56.63%, 61.45%和72.36%; 物理化学降解率分别为34.18%, 38.18%和19.85%。正烷烃的总降解率分别为90.81%, 99.63%和92.21%。在本实验条件下, 经过20天的降解, 20号重柴油中的 C_{11} — C_{22} 烷烃绝大部分被降解。

海洋石油污染问题的提出始于60年代。到70年代, 世界上每年流入海洋的石油大约1000万吨^[1], 给自然环境和生态系带来了一定影响, 对水产业造成了程度不同的危害。

石油溢入海水中后, 少量低沸点组分在数日内挥发, 其余分散或沉到海底。这些石油, 除部分自动氧化分解及被鱼类、甲壳类和浮游生物所摄食外, 大部分由海洋微生物降解。自动氧化产生的醇、有机酸、高分子有机物等, 最终也要由微生物来利用和分解。

随着渤海湾沿岸和海中油田的开发, 渤海湾的石油污染问题日益受到重视。我们自1980年起, 对渤海石油降解微生物的生态特征及其净化作用进行了研究。本文报道的是运用气相色谱法, 对渤海微生物自然混合菌群降解20号重柴油中的烷烃的能力进行实验室研究的结果。

一、材料与方 法

1. 试样

本实验的海水试样系渤海湾之新鲜海水, 采来后立即进行实验。

2. 培养方法及条件

每个三角瓶中装250 ml新鲜海水(三角瓶预先高压消毒), 营养盐添加量为: $(NH_4)_2SO_4$, 1000 ppm; K_2HPO_4 , 10 ppm。对照瓶内加入2%的 $HgCl_2$ 0.2 ml, 以便杀死其中的微生物。

培养在摇床上进行(110 r/min, 振幅3cm), 培养温度 $20 \pm 1^\circ C$ 。

实验用油为从大连环境保护研究所取来之20号重柴油标准油样。实验中设三个油

* 本实验得到吴宝铃、李冠国、刘卓教授及丁美丽副教授的指导和帮助, 谨致谢忱。

收稿日期: 1987年10月10日。

浓度: 5 ppm, 50 ppm, 500 ppm。

3. 活菌计数

活菌计数采用平板涂布法^[2], 培养基为 WALKER 培养基 (OA No 2), 其组成为: NH_4NO_3 , 1.0 g; 10% KH_2PO_4 , 3.0 ml; 10% K_2HPO_4 , 7.0 ml; 海水 1000 ml; 酚红, 0.003%; 琼脂, 15g; pH = 7.0。此外, 按试验要求分别加入 5 ppm, 50 ppm, 500 ppm 的 20 号重柴油。

由于细菌和真菌要分别计数, 所以计数细菌时, 要向培养基中加入真菌素 15 单位/L。计数真菌时, 每升培养基中加入 50mg 链霉素、50mg 四环素和 20mg 氯霉素。

4. 正烷烃的测定^[3,4]

(1) 仪器: GC-7A 气相色谱仪(日本产)。

(2) 萃取液: 分析纯 CS_2 (色谱图上无杂质峰)。

(3) 试样前处理程序

A. 试样萃取: 将海水试样 250ml 置于分液漏斗中, 加入 30ml CS_2 , 振荡 10 分钟。静置 10 分钟后, 将下部有机萃取液放入具塞三角瓶中, 再加 20ml CS_2 , 操作方法同上。合并两次萃取液, 加入 5g 无水 Na_2SO_4 干燥脱水。

B. 试样浓缩: 将上述干燥好的萃取液在旋转蒸发器上浓缩, 温度保持在 35°C 以下。真空度控制在 400mm Hg/cm^2 左右, 蒸馏速率为 15—20 滴/min, 浓缩之萃取液的体积要少于 10ml。

C. 定容: 将蒸馏残液小心地转移到 10ml 容量瓶中并用少量 CS_2 溶剂冲洗两次, 最后定容至刻度, 即可上色谱仪分析。

(4) 色谱分析条件: 色谱柱为 $2100\text{mm} \times 3\text{mm}$, 担体为 chromosorb W, 涂 SE-30 固定液。90— 270°C 程序升温, 进样室温度为 250°C 。检测器为氢火焰检测器, 载气为 N_2 , 50 ml/min, 燃气为 H_2 , 空气。

二、结果与讨论

1. 生物降解、物理化学降解与总降解

为测试生物降解、物理化学降解与总降解, 本实验设立了实验瓶与对照瓶。对照瓶中加入 2% HgCl_2 0.2 ml/L, 以杀死其中的微生物。对照瓶中油量的减少被认为是物理化学降解量, 而实验瓶中油量的减少则被认为是微生物降解量与物理化学降解量的总和。在同一培养条件下, 同样培养时间的对照瓶与实验瓶油量减少之差即为生物降解量。生物降解量与物理化学降解量之和为总降解量。

表 1—3 为三个不同浓度柴油中, 正烷烃 (C_{11} — C_{22}) 20 天内的降解情况。

由表 1—3 可知, 在三个不同油浓度下, 20 天内渤海微生物自然混合菌群对 C_{11} — C_{22} 正构烷烃的生物降解率分别为 56.63%, 61.45% 和 72.36%, 生物降解率有随油浓度增加而增大的现象。在三个油浓度下, 物理化学降解分别为 34.18%, 38.18%, 19.85%。显然, 在高浓度下物理化学降解量较前大大减少。这种现象可以解释为, 在一定的时间和空间中, 由于油浓度的增大, 形成油滴的机会变少, 油滴少则总面积变小, 因而蒸发、乳化、溶解和化学氧化的量就少。

表 1 5ppm 油浓度下正烷烃的降解

Tab. 1 Degradation of n-alkanes in 5ppm diesel oil

降解量及速率 项目	正烷烃												合计
	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	
初 始	—	—	—	0.04	0.14	0.11	0.21	0.26	0.33	0.33	0.26	0.28	1.96
生 物 降 解	—	—	—	0 (0)	0.01 (6.7)	0.01 (9.1)	0.06 (28.6)	0.13 (50.0)	0.22 (66.7)	0.28 (84.8)	0.24 (92.3)	0.16 (57.1)	1.11 (56.63)
物 理 化 学 降 解	—	—	—	0.04 (100)	0.07 (50)	0.10 (90.9)	0.14 (66.7)	0.11 (42.3)	0.06 (18.2)	0.03 (9.09)	0.02 (7.7)	0.10 (35.7)	0.67 (34.18)
总 降 解	—	—	—	0.04 (100)	0.08 (57.1)	0.11 (100)	0.20 (95.2)	0.24 (92.3)	0.28 (84.8)	0.31 (93.9)	0.26 (100)	0.26 (92.9)	1.78 (90.81)

注: ()内数字为降解率(%),表 2, 3 同。

以上现象,与笔者的另外两项研究结果是一致的^[2,3]。20 天的总降解率在 5 ppm, 50 ppm, 500ppm 三个油浓度下分别为 90.81%, 99.63% 和 92.21%, 可见, 经过 20 天的降解, 20号重柴油中的 C₁₁—C₂₂ 正烷烃大部分消失了。

图 1—3 为气相色谱图, 分别表示了三个油浓度下的初始烷烃量和实验结束时实验瓶与对照瓶内之烷烃量。

2. 石油降解与微生物数量间的关系

为了研究石油微生物降解与生物活性间的关系, 在测定油量的同时, 我们测定了细菌和真菌的菌量变化。由于酵母的数量极少, 所以只以霉菌表示真菌菌量变化。图 4, 5 为三个不同油浓度下细菌菌量与正烷烃的变化。图 6, 7 为三个油浓度下霉菌菌量与正烷烃的变化。可见, 烷烃降解与生物量之间呈现较好的对应关系, 特别在 500 ppm 油浓度下, 菌量的增加和烷烃的减少都较显著。

三、结 语

本实验运用气相色谱法对渤海微生物自然混合菌群降解 20 号重柴油中的正烷烃进行了研究。实验证明, 气相色谱法为监测石油微生物降解的链烷烃变化提供了迅速而有效的手段。

实验测定了在 5, 50, 500 ppm 三个油浓度下微生物自然混合菌群对正烷烃的降解能力。20 天内, 微生物对正烷烃 (C₁₁—C₂₂) 的生物降解率分别为 56.63%, 61.45% 和 72.36%; 物理化学降解率分别为 34.18%, 38.18% 和 19.85%。可见, 生物降解率有随初始油浓度增大而增大、物理化学降解率有随初始油浓度增大而减小的趋势。

20 天内, 正烷烃的总降解率在三个油浓度下分别为 90.81%, 99.63% 和 92.21%, 由此可见, 在本实验条件下, 经过 20 天的降解, 20 号重柴油中的 C₁₁—C₂₂ 烷烃绝大部分被降解掉了。

表 2 50ppm 油浓度下正烷烃的降解
Tab. 2 Degradation of n-alkanes in 50ppm diesel oil

降解量及速率 项目	正烷烃	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	合计
初 始	—	0.05	0.18	0.49	0.87	1.54	3.26	4.25	5.21	4.82	4.61	1.83	27.11	
生 物 降 解	—	0 (0)	0 (0)	0.06 (12.2)	0.33 (37.9)	0.75 (48.7)	1.72 (52.8)	2.69 (63.3)	3.61 (69.3)	3.52 (73.0)	2.55 (55.3)	1.43 (78.1)	16.66 (61.45)	
物 理 化 学 降 解	—	0.05 (100)	0.18 (100)	0.43 (87.8)	0.48 (55.2)	0.78 (50.6)	1.54 (47.2)	1.56 (36.7)	1.57 (30.1)	1.30 (27.0)	2.06 (44.7)	0.40 (21.9)	10.35 (38.18)	
总 降 解	—	0.05 (100)	0.18 (100)	0.49 (93.1)	0.81 (99.4)	1.53 (100)	3.26 (100)	4.25 (99.4)	5.18 (100)	4.82 (100)	4.61 (100)	1.83 (100)	27.01 (99.63)	

表 3 500ppm 油浓度下正烷烃的降解
Tab. 3 Degradation of n-alkanes in 500ppm diesel oil

降解量及速率 项目	正烷烃	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	合计
初 始	—	0.40	0.76	2.41	5.36	8.65	15.47	30.38	39.71	48.65	47.53	47.16	21.24	267.72
生 物 降 解	—	0.28 (70.0)	0.17 (22.4)	1.11 (46.1)	3.56 (66.4)	6.47 (74.8)	11.5 (74.3)	21.79 (71.7)	31.18 (78.5)	37.79 (77.7)	36.85 (77.5)	40.06 (84.9)	2.95 (13.9)	193.71 (72.36)
物 理 化 学 降 解	—	0.12 (30.0)	0.59 (77.6)	1.30 (53.9)	1.78 (33.2)	2.18 (25.2)	3.97 (25.7)	8.48 (27.9)	7.96 (20.0)	8.41 (17.3)	8.30 (17.5)	6.12 (13.0)	3.94 (18.5)	53.15 (19.85)
总 降 解	—	0.40 (100)	0.76 (100)	2.41 (100)	5.34 (99.6)	8.65 (100)	15.47 (100)	30.27 (99.6)	39.14 (98.6)	46.2 (95.0)	45.15 (95.0)	46.18 (97.9)	6.89 (32.4)	246.86 (92.21)

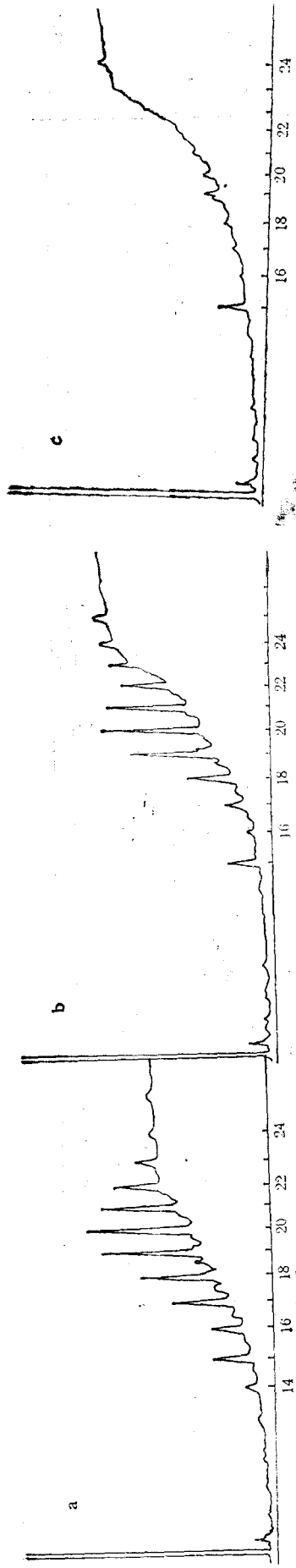


图 1 5ppm 油浓度下的烷烃降解 Fig. 1 Degradation of alkanes in 5ppm diesel oil
 a. 第 0 天; b. 第 20 天, 对照组; c. 第 20 天, 实验组。图 2, 3 同。

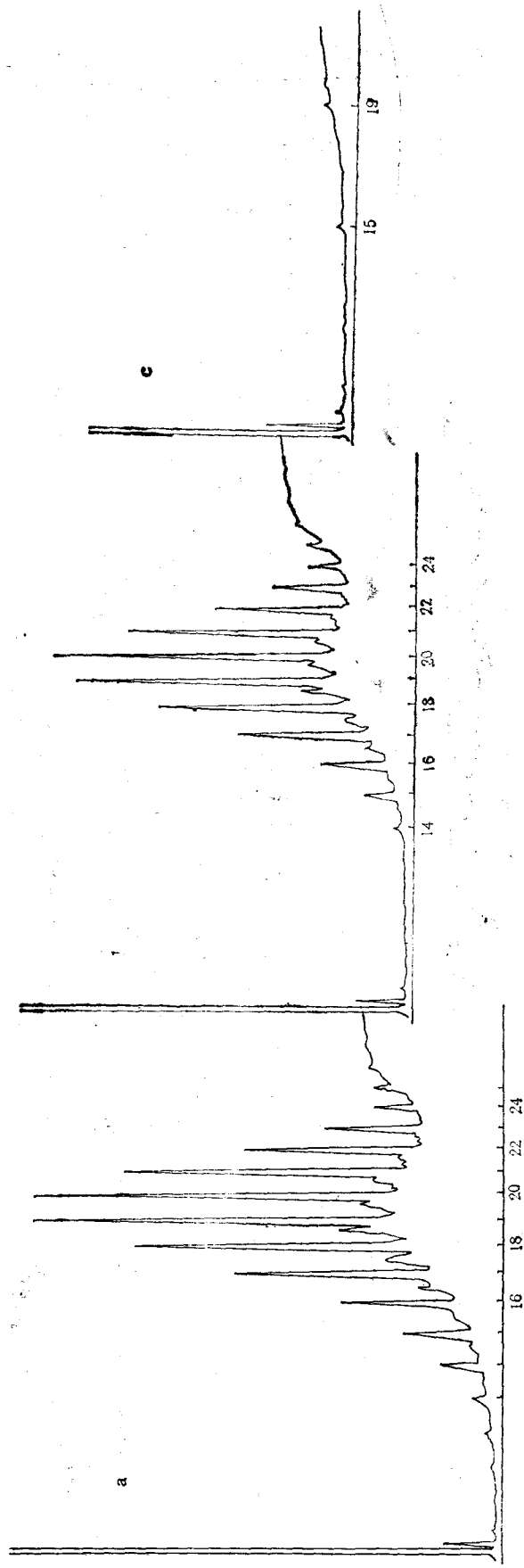


图 2 50ppm 油浓度下的烷烃降解 Fig. 2 Degradation of alkanes in 50ppm diesel oil

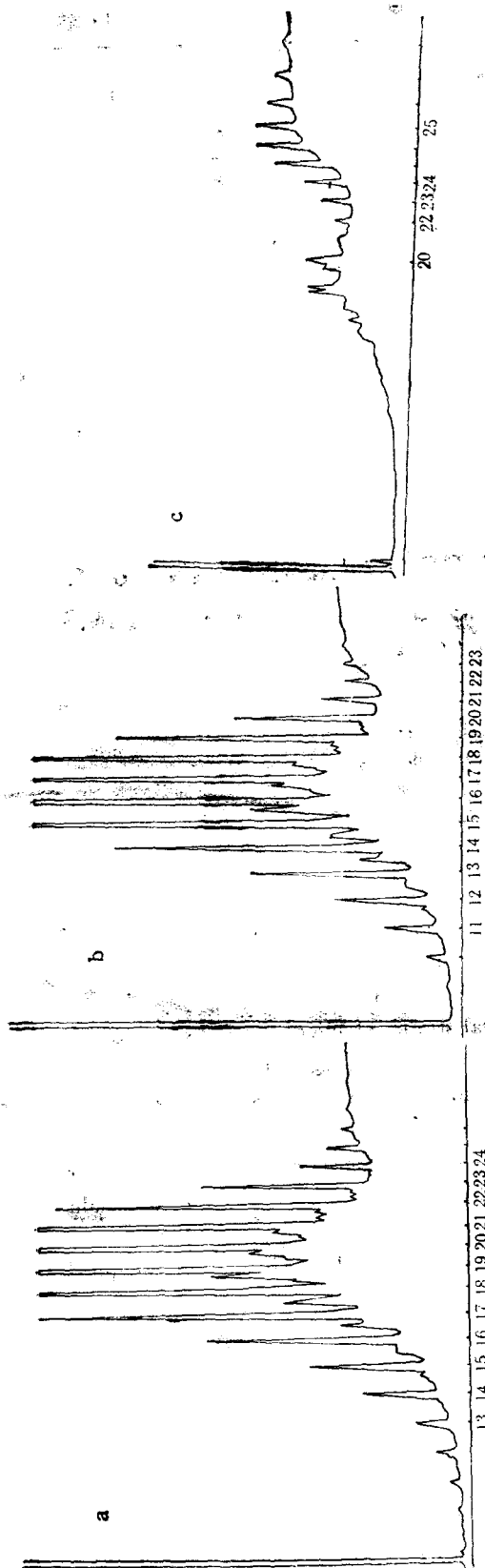


图 3 500ppm 油浓度下的烷烃降解

Fig. 3 Degradation of alkanes in 500ppm diesel oil

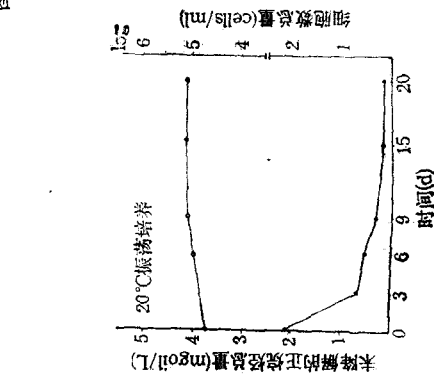


图 4 5ppm 油浓度下正烷烃与细菌菌量变化

Fig. 4 Changes in number of bacterial cells and n-alkanes in 5ppm diesel oil

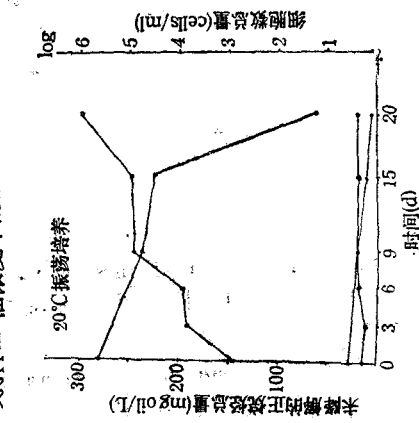


图 5 50,500ppm 油浓度下正烷烃与细菌菌量变化

Fig. 5 Changes in number of bacterial cells and n-alkanes in 50ppm and 500ppm diesel oil

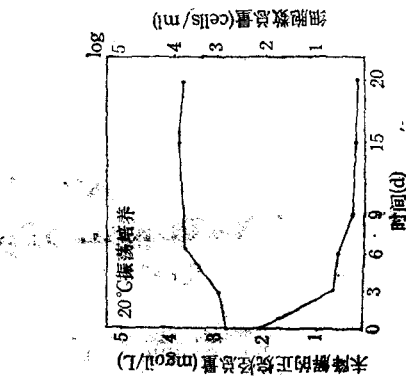


图 6 5ppm 油浓度下正烷烃与霉菌菌量的变化

Fig. 6 Changes in number of fungal cells and n-alkanes in 5ppm diesel oil

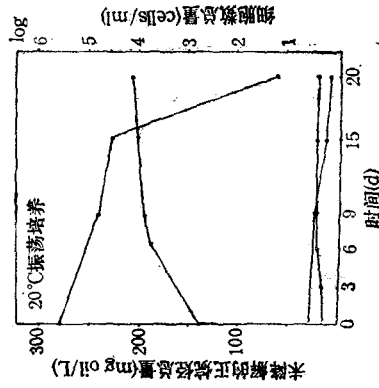


图 7 50,500ppm 油浓度下正烷烃与霉菌菌量的变化

Fig. 7 Changes in number of fungal cells and n-alkanes in 50ppm and 500ppm diesel oil

● 为正烷烃; ○ 为菌量。图 5, 6, 7 同。

实验期间,石油降解细菌、石油降解霉菌的菌量与正烷烃的含量之间呈现较好的对应关系。

参 考 文 献

- [1] 褚家成、王容、张万玉, 1982。海上溢油的风化特性和对污染油种的鉴别。 *Envir. Chem.* **1** (4): 297—303。
- [2] 門 田元, 多贺信夫, 1985。海洋微生物研究法。东京大昭和印刷株式会社, 41—50, 107—116。
- [3] 清水 潮, 1976。海洋の石油汚染と微生物。 *遺伝* **6**: 15—20。
- [4] 藤沢浩明, 村上正志, 1981。わが国の沿岸海域における炭化水素酸化細菌に関する生態学の研究——VI 海洋中の重油分解細菌のスクリーニング法。 *Shimonoseki Univ. Fish.* **30**(1): 13—24。
- [5] Ahearn, D. G. and S. P. Meyers, 1973。The Microbial Degradation of Oil Pollutants. Publi. No. LSU-SG-73-01。 3—32, 185—282。
- [6] Walker, J. D. and R. R. Colwell, 1976。Longchain n-alkanes occurring during microbial degradation of petroleum。 *Canadian J. Microbio.* **22**(6): 886—891。

A STUDY ON THE DEGRADATION OF n-ALKANES IN No. 20 DIESEL OIL BY NATURAL STRAINS OF MICROORGANISMS FROM THE BOHAI SEA

Sun Xiuqin, Yao Qiaoer and Lu Ying

(First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao)

ABSTRACT

An experiment was conducted using gas chromatography to study the n-alkanes in No. 20 diesel oil, which was degraded by the natural strains of microorganisms from the Bohai Sea. The experiment has proved that the gas chromatography is rapid and effective for checking the n-alkanes' change due to the petroleum biological degradation.

The oil-degradation of the n-alkanes by the natural strains of microorganisms was determined at 5, 50, 500 ppm diesel oil in 20 days of incubation, the bio-degradation rates of the n-alkanes were 56.63%, 61.45% and 72.36%; the physical and chemical decomposition rates were 34.18%, 38.18% and 19.85%; and the total degradation rates of the n-alkanes were 90.81%, 99.63% and 92.21% respectively, at the three different diesel oil concentration. It was clear under the experimental conditions that the n-alkanes (C_{11} — C_{22}) in the No. 20 diesel oil could be mostly degraded.

During the experiment, a better relation between the content of the n-alkanes and the numbers of the oil-degrading bacteria and fungi existed.