

生物小分子刺激石油污染地下水中 土著菌的降解特性

张 艺¹, 石宇佳^{1,2}, 王吉利¹, 王以良¹, 迟崇哲², 张玉玲¹

(1. 吉林大学 新能源与环境学院, 长春 130021;

2. 长春黄金研究院有限公司, 长春 130012)

摘要: 基于石油污染地下水微生物降解机制, 针对我国东北某石油污染地下水低温、低氧、寡营养环境的特点, 采集石油污染地下水, 研究生物小分子物质刺激石油污染地下水中土著菌降解石油烃效率。结果表明: 以石油烃为唯一碳源, 在无机盐基础营养液中分别添加生物小分子氨基酸和有机磷源时, 氨基酸类物质抑制土著菌降解石油烃, 其中抑制能力为甘氨酸(-20.49%)>谷氨酸(-7.81%)>丙氨酸(-4.88%); 有机磷酸脂类促进土著菌降解石油烃, 其中促进能力为卵磷脂(7.91%)>甘油磷酸二钠(7.01%)>磷酸三乙脂(0.03%); 进一步补充生物小分子碳源可提升土著菌降解效率, 其中提升能力为蔗糖(8.03%)>葡萄糖(6.01%)>麦芽糖(2.91%); 在石油烃初始质量浓度为 10 mg/L 的地下水中添加无机盐、卵磷脂和蔗糖, 作用 7 d 时, 受生物小分子物质刺激作用, 降解率可提升至 77.26%; 联合 16SrRNA 扩增子测序, 对刺激前后土著菌进行高通量测序, 证明生物小分子促进土著菌群协同代谢降解石油烃时, 石油烃优势菌属丰度和功能基因表达呈正效应关系。

关键词: 生物小分子; 生物刺激; 土著菌; 石油污染地下水; 降解

中图分类号: X523 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5489(2024)03-0750-09

Degradation Characteristics of Indigenous Bacteria in Petroleum Contaminated Groundwater Stimulated by Biological Small Molecules

ZHANG Yi¹, SHI Yujia^{1,2}, WANG Jili¹, WANG Yiliang¹, CHI Chongzhe², ZHANG Yuling¹

(1. College of New Energy and Environment, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Changchun Gold Research Institute Co., Ltd., Changchun 130012, China)

Abstract: Based on the microbial degradation mechanism of petroleum contaminated groundwater and the characteristics of low temperature, low oxygen, and oligotrophic environments in a certain petroleum contaminated groundwater in Northeast China, we collected petroleum contaminated groundwater and studied the efficiency of indigenous bacteria degrading petroleum hydrocarbons in petroleum contaminated groundwater stimulated by microbial small molecule substances. The results

收稿日期: 2023-10-19. 网络首发日期: 2024-03-08.

第一作者简介: 张 艺(1999—), 女, 汉族, 硕士研究生, 从事地下水土污染控制与修复的研究, E-mail: 2310395168@qq.com.

通信作者简介: 张玉玲(1973—), 女, 蒙古族, 博士, 教授, 从事地下水土污染控制与修复的研究, E-mail: lingling29@126.com;

石宇佳(1998—), 男, 汉族, 硕士, 从事地下水土污染控制与修复的研究, E-mail: shiyj1244060668@126.com.

基金项目: 国家重点研发计划课题项目(批准号: 2020YFC1808805; 2020YFC1808804).

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/22.1340.O.20240306.1211.001>.

show that when petroleum hydrocarbons are used as the sole carbon source and biological small molecule substances such as amino acids and organic phosphorus sources are added to the inorganic salt based nutrient solution, amino acid substances inhibit the degradation of petroleum hydrocarbons by indigenous bacteria, with inhibitory ability of glycine (-20.49%) > glutamic acid (-7.81%) > alanine (-4.88%). Organic phosphate lipids promote the degradation of petroleum hydrocarbons by indigenous bacteria, with promoting ability of lecithin (7.91%) > disodium glycerophosphate (7.01%) > triethyl phosphate (0.03%). Further supplementing biological small molecule carbon sources can improve the degradation efficiency of indigenous bacteria, with the enhancement ability of sucrose (8.03%) > glucose (6.01%) > maltose (2.91%). Adding inorganic salts, lecithin, and sucrose to groundwater with an initial mass concentration of 10 mg/L of petroleum hydrocarbon, after 7 d of stimulation, the degradation rate can be increased to 77.26% due to the stimulation of biological small molecule substances. Combined with 16SrRNA amplicon sequencing, high-throughput sequencing is performed on indigenous bacteria before and after the stimulation, demonstrating that there is a positive correlation between the abundance of dominant petroleum hydrocarbon genera and the expression of functional genes when biological small molecules promote the synergistic metabolism and degradation of petroleum hydrocarbons by indigenous bacterial communities.

Keywords: biological small molecule; bio-stimulation; indigenous bacteria; petroleum pollution of groundwater; degradation

微生物修复作为一种集绿色、环保、低成本等优点为一体的石油烃污染地下水处理技术,能很好地解决地下水中石油烃污染反弹问题,因此受到人们广泛关注^[1-4]. 受限于地下水环境低温、低氧和寡营养等特点,微生物缺少生长代谢必要条件,石油烃降解效率低^[5],通过向含水层中投加微生物代谢必需的营养、能量和电子供/受体等物质,强化土著功能微生物代谢能力和菌群丰度,有利于地下水中石油烃的降解^[6-7]. 目前,人们已开展了一系列基于生物刺激的石油烃修复药剂研究: Liao等^[8]以鼠李糖脂和皂苷为表面活性剂进行生物刺激,发现随着表面活性剂浓度的增加,土著微生物的数量增加,对石油烃的降解明显增加; Wu等^[9]用氮磷物质进行周期性的生物刺激,使难降解石油烃的去除效率提高了10.4%~25.5%; 吴仁人等^[10]发现谷氨酸、脯氨酸和赖氨酸等氨基酸混合物对石油烃降解菌GS3C的代谢促进作用最好,赖氨酸和脯氨酸最关键.

基于内在土著微生物系统,快速净化石油污染地下水原位强化修复的关键是具有高效刺激性、良好生物降解性能和迁移性能的生物刺激有效成分. 生物小分子物质结构简单,易溶解、扩散和渗透,具有多种生物化学功能,可提供碳、氮、磷等营养组分,并能进入细胞体内被微生物利用,解除石油烃对微生物生长的抑制作用、保护和修复细胞. 在实际应用中,单一物质生物刺激对土著微生物菌群的作用效果有限,能在生物刺激过程中发挥不同功能的多物质复合生物刺激更能高效发挥作用^[11-12]. 本文以石油烃污染地下水中土著微生物为研究对象,在基础营养盐基础上,考察不同有机生物小分子生物刺激特性,研究适用于实际地下水环境条件的易于摄取、稳定性好的靶向生物小分子刺激剂,分析有机小分子生物刺激剂作用下土著微生物群落的响应关系,研究结果可为石油烃污染地下水原位土著微生物修复技术研发和工程实施提供科学依据,具有实际应用意义.

1 实 验

1.1 主要仪器

紫外可见分光光度计(U-T3型,上海屹谱公司); 多功能酶标仪(Synergy H1M型,美国宝特公司); 气质联用仪(6890/5973型,美国Agilent公司); 荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(ETC 811型,北京东胜创新生物科技有限公司).

1.2 主要材料

甘氨酸、谷氨酸、丙氨酸、卵磷脂(自大豆提取)、甘油磷酸二钠、磷酸三乙脂、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、正己烷、磷酸二氢钾、磷酸氢二铵、七水硫酸镁、氯化钠和硝酸钾等均为国产分析纯试剂。

石油污染地下水样采自中国东北某石油开采区,污染水样石油烃质量浓度为 10.00 mg/L,石油烃主要成分是烷烃和芳香烃,烷烃以 $C_{10} \sim C_{31}$ 为代表的正构烷烃和带支链烷烃为主,芳香烃以萘和萘的取代物为主;微生物为石油烃污染地下水土著微生物菌群,未进行富集培养。实验用基础营养盐配方:磷酸二氢钾 50.00 mg/L,磷酸氢二铵 50.00 mg/L,七水硫酸镁 150.00 mg/L,氯化钠 10.00 mg/L,硝酸钾 10.00 mg/L。

1.3 方法

1.3.1 高效生物小分子刺激剂识别与最佳含量优化

1) 高效氨基酸识别与最佳含量优化。移取适量石油污染水样于 100 mL 密闭棕色玻璃瓶中,接种 2 mL 菌悬液,用石油烃污染地下水和超纯水,复配补足为石油烃质量浓度 10.00 mg/L 的 100 mL 水样,先按照无机盐配方加入基础营养盐,再加入不同种类的氨基酸(甘氨酸、谷氨酸和丙氨酸)使其质量浓度分别为 0.10, 1.00, 5.00, 10.00, 20.00 mg/L,同时设置不添加氨基酸的空白对照组和添加氨基酸的无菌对照组,所有处理均设置 3 个平行样,于 10 °C 黑暗环境,120 r/min 振荡培养 7 d 后,利用全功能酶标仪和紫外可见分光光度计分别测定微生物 DNA 含量和石油烃的质量浓度。

2) 高效生物小分子磷源识别与最佳含量优化。在氨基酸优化基础上,移取适量石油污染水样于 100 mL 密闭棕色玻璃瓶中,接种 2 mL 菌悬液,复配补足为石油烃质量浓度 10.00 mg/L 的 100 mL 水样,先按照无机盐配方加入基础营养盐,再加入不同种类生物小分子磷源(卵磷脂、甘油磷酸二钠和磷酸三乙脂)使其质量浓度分别为 0.10, 1.00, 5.00, 10.00, 20.00 mg/L,同时设置不添加小分子磷源的空白对照组和添加小分子磷源的无菌对照组,所有处理均设置 3 个平行样,于 10 °C 黑暗环境,120 r/min 振荡培养 7 d 后,利用全功能酶标仪和紫外可见分光光度计分别测定微生物 DNA 含量和石油烃质量浓度。

3) 高效电子供体辅助碳源识别与最佳含量优化。在生物小分子磷源优化基础上,移取适量石油污染水样于 100 mL 密闭棕色玻璃瓶中,接种 2 mL 菌悬液,复配补足为石油烃质量浓度 10.00 mg/L 的 100 mL 水样,先按照无机盐配方加入基础营养盐,再加入不同种类辅助电子供体(葡萄糖、蔗糖和麦芽糖)使其质量浓度分别为 0.10, 1.00, 5.00, 10.00, 20.00 mg/L,同时设置不添加小分子辅助碳源的空白对照组和添加小分子辅助碳源的无菌对照组,所有处理均设置 3 个平行样,于 10 °C 黑暗环境,120 r/min 振荡培养 7 d 后,利用全功能酶标仪和紫外可见分光光度计分别测定微生物 DNA 含量和石油烃质量浓度。

1.3.2 复合生物小分子作用效果分析

移取适量石油污染地下水置于 1 L 密闭棕色玻璃瓶中,接种 20 mL 菌悬液,复配补足为石油烃质量浓度 10.00 mg/L 的 1 L 水样,按照无机盐配方加入基础营养盐和生物小分子(卵磷脂 10 mg、蔗糖 10 mg),同时设置空白对照组和无菌对照组,所有处理均设置 3 个平行样,于 10 °C 黑暗环境,120 r/min 振荡培养,每隔 12 h 利用全功能酶标仪和紫外可见分光光度计分别测定微生物 DNA 含量和石油烃质量浓度。同时分别对复合生物小分子投加前和投加后 7 d 的地下水样本进行 16SrRNA 测序,分析复合生物小分子投加对石油烃污染地下水中微生物群落的影响,用荧光定量 PCR 仪进行 16SrRNA 扩增,由上海生物工程有限公司对微生物多样性测序和宏基因组高通量测序。

2 结果与讨论

2.1 高效生物小分子刺激剂识别与最佳含量优化

2.1.1 高效氨基酸识别与最佳含量优化

氨基酸是蛋白质的构件分子,氨基酸类营养透过细胞膜直接被微生物吸收时必然影响蛋白质的合成速度,对微生物的生理活动也产生相应影响,在无机盐基础上,添加氨基酸对土著菌生长和石油烃

降解的影响如图 1 所示. 由图 1(A)可见, 以石油烃为唯一碳源, 丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸均在一定程度上刺激微生物生长, 氨基酸添加量与微生物生物量明显相关, 当氨基酸质量浓度为 5 mg/L 时, 刺激微生物生长效果最佳, 甘氨酸、谷氨酸和丙氨酸刺激下微生物生物量分别达到 3.35, 3.78, 2.08 ng/ μ L, 推测与氨基酸组成相关, 甘氨酸、谷氨酸、丙氨酸成分和微生物生长相关表达蛋白的氨基酸组成相似, 菌体利用相似组分氨基酸, 刺激微生物生长, 刺激作用与相关蛋白相似度有关. 由图 1(B)可见, 添加的 3 种氨基酸均可抑制石油烃降解, 其中抑制能力为甘氨酸 > 谷氨酸 > 丙氨酸. 吴仁人^[13]研究表明, 添加甘氨酸会明显促进正十六烷降解, 排除了谷氨酸作为微量氮源促进降解的可能性; Sørensen 等^[14]研究表明, 当未添加甘氨酸时, 其他氨基酸混合物不影响鞘氨醇单胞菌对异丙隆的降解, 可见不同微生物对微量生长因子需求的种类和数量不同, 推测甘氨酸、谷氨酸和丙氨酸作为氮源满足土著菌中非降解菌生长需求, 与降解菌产生营养竞争关系, 从而影响降解效果.

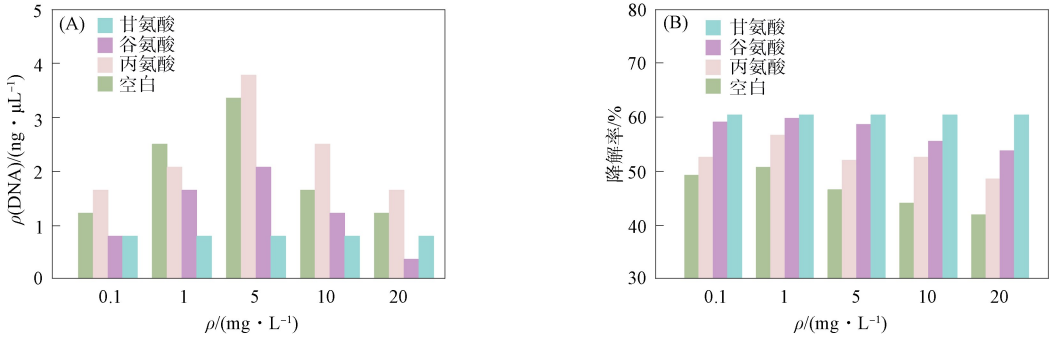


图 1 氨基酸刺激下微生物生长状况(A)和降解石油烃规律(B)

Fig. 1 Microbial growth status (A) and degradation law of petroleum hydrocarbon (B) under stimulation of amino acid

2.1.2 高效生物小分子磷源识别与最佳含量优化

生物小分子磷源物质提供必需的磷元素以调节菌体内的磷摄取平衡, 提高微生物代谢能力. 在无机盐基础上, 添加生物小分子磷源物质对土著菌生长和石油烃降解的影响如图 2 所示. 由图 2 可见: 以石油烃为唯一碳源, 添加 0.1~10 mg/L 的甘油磷酸二钠刺激微生物生长, 生物量为 1.23~3.35 ng/ μ L, 仅在 5 mg/L 时石油烃降解率有所上升, 降解率为 67.34%, 推测甘油磷酸二钠刺激了土著微生物中与降解微生物处在营养竞争中的非降解菌群的生长; 当添加 0.1~20 mg/L 的磷酸三乙酯刺激时, 石油烃降解率略降低; 当添加 10~20 mg/L 的卵磷脂时, 可刺激微生物生长, 生物量可达 3.81 ng/ μ L, 正向刺激石油烃降解, 降解率可达 68.46%. 卵磷脂是细胞膜主要组成物质, 细胞膜调控细胞新陈代谢过程, 推测补充卵磷脂直接提升了降解菌群的自我修复能力、信息传递能力、抵御外部侵害能力以及再生能力等, 作为两性分子的卵磷脂在调节菌体内磷摄取平衡的同时, 具有表面活性剂的性质, 能改良溶解度和流动性以提高石油烃生物可利用度, 因此选用 10 mg/L 的卵磷脂作为最佳生物小分子磷源.

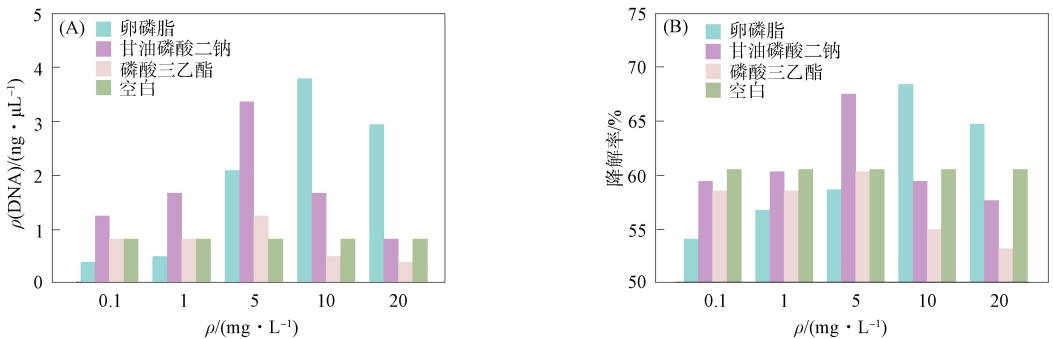


图 2 生物小分子磷源刺激下微生物生长状况(A)和降解石油烃规律(B)

Fig. 2 Microbial growth status (A) and degradation law of petroleum hydrocarbon (B) under stimulation of biological small molecular phosphorus sources

2.1.3 高效电子供体辅助碳源识别与最佳含量优化

部分碳源类物质可作为电子供体,驱动微生物代谢过程,在卵磷脂的基础上,添加电子供体辅助碳源生物小分子物质对土著菌生长和石油烃降解的影响如图 3 所示. 由图 3 可见:在添加 0.1~20 mg/L 麦芽糖刺激下,微生物迅速生长,生物量与麦芽糖质量浓度呈正相关,在添加 5~10 mg/L 麦芽糖刺激下,石油烃降解率为 70.06%~72.11%;在添加 0.1~5 mg/L 葡萄糖刺激下,微生物的生长量降低,降解效率最高上升至 75.06%;添加 1~20 mg/L 蔗糖刺激微生物生长,生物量为 1.23~3.35 ng/ μ L,生物量与蔗糖的质量浓度呈正相关,但仅在蔗糖质量浓度为 10 mg/L 时,石油烃降解率上升,为 77.26%. 推测在较低质量浓度时,蔗糖和石油烃作为竞争碳源,抑制了微生物对石油烃的降解作用,在 10 mg/L 时,降解微生物迅速生长,蔗糖作为电子供体驱动代谢过程,反应体系主要发生蔗糖的降解作用,微生物主要利用蔗糖作为碳源抑制石油烃降解,因此选用 10 mg/L 的蔗糖作为最佳电子供体辅助碳源. Schukat 等^[15]研究了葡萄糖共代谢对一氯苯胺降解的影响,发现添加葡萄糖可促进有关苯胺降解的酶生成. 本文研究表明,加入共代谢基质葡萄糖、蔗糖和麦芽糖均可在一定程度上促进土著微生物的降解性能.

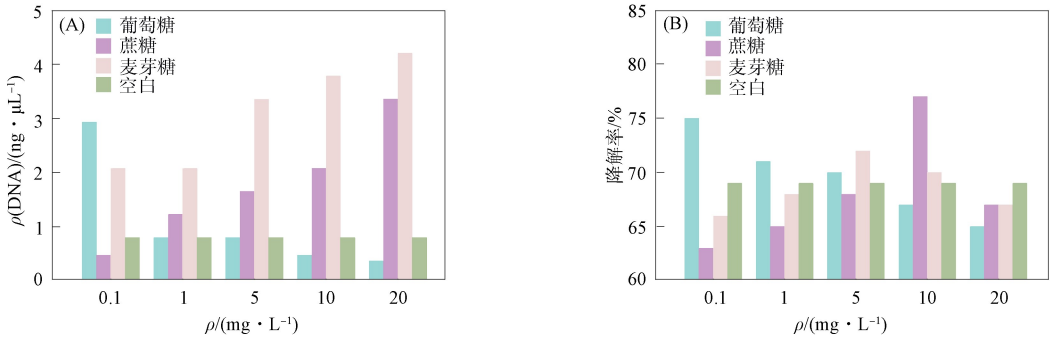


图 3 辅助电子供体刺激下微生物生长状况(A)和降解石油烃规律(B)

Fig. 3 Microbial growth status (A) and degradation law of petroleum hydrocarbon (B) under stimulation of auxiliary electron donors

2.2 复合生物小分子刺激作用效果分析

在添加和未添加复合生物小分子的石油烃污染地下水中,土著微生物状况及石油烃降解效果如图 4 所示. 由图 4(A)可见:当未添加复合生物小分子时,土著微生物生长较慢,2 d 内微生物量达到峰值 0.71 ng/ μ L,之后土著微生物生长处于稳定期,微生物量维持在 0.31~0.61 ng/ μ L;在添加复合生物小分子后,土著微生物快速生长,2 d 内地下水中土著微生物量从 0.07 ng/ μ L 增加到 4.07 ng/ μ L,之后保持在 2.26~3.83 ng/ μ L,7 d 内土著微生物量的增长量最高可达 5.73 倍. 由图 4(B)可见:由于地下水中有有效碳源含量明显降低,因此土著微生物对石油烃的降解在 3 d 后趋于平缓,土著微生物在 3 d 内对添加与未添加复合生物小分子的石油烃污染地下水的降解率分别为 77.26% 和 60.10%;

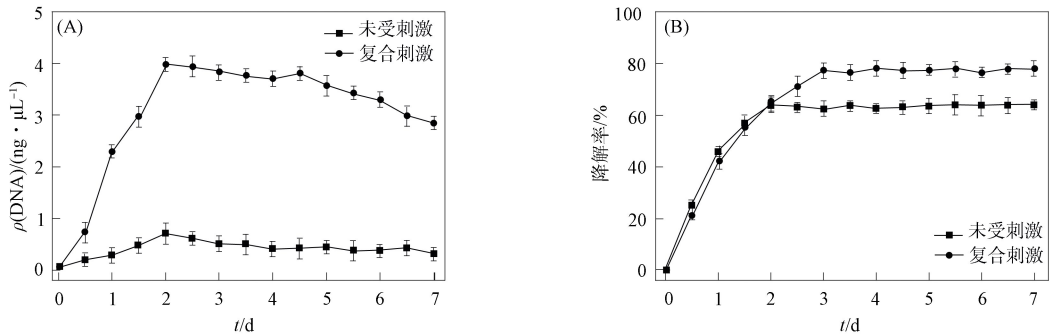


图 4 复合刺激下微生物生长状况(A)和降解石油烃规律(B)

Fig. 4 Microbial growth status (A) and degradation law of petroleum hydrocarbon (B) under compound stimulation

相比于未添加复合生物小分子, 土著微生物对石油烃的降解效率在 3 d 内增加了 17.16 个百分点, 石油烃降解效果明显提升, 之后随着地下水中石油烃的消耗, 微生物能利用的有效碳源含量明显降低, 导致地下水中土著微生物量下降, 但石油烃降解效率基本保持不变。

根据复合刺激药剂的含氮量和含磷量, 计算出添加物质的氮磷比($n(N) : n(P)$)为 3.19 : 1。微生物的化学组成和营养类型决定了细胞的营养需求, 石油降解菌主要是化能异养菌, 在异养菌的生长繁殖过程中, 营养物质的供给平衡应与细菌细胞的元素组成相对应, 添加药剂的氮磷比为 3.19 : 1 与细胞元素组成中氮磷比约 4.67 : 1 相近, 药剂刺激下石油烃降解过程呈现较好的稳定性, 与文献[16]结果相符。由于未添加有机氮源物质刺激, 微生物对氮源供给敏感, 药剂氮磷比可进一步优化, 同时受限于微生物代谢特性和适应能力差异, 因此即使添加了磷源和碳源也未实现石油烃降解效率的大幅度提升。

复合刺激前后微生物降解石油烃动力学拟合结果如图 5 所示, 由图 5 可见, 复合刺激后二级降解动力学方程拟合效果最佳, 动力学方程为 $y=0.0033x+0.0167$, $R^2>0.9000$ 。在无机盐基础上, 不同生物小分子物质促进降解效果(以促进降解率增长的百分数表示促进降解效果)如图 6 所示。由图 6 可见, 按对石油烃降解刺激降解效果排列, 生物小分子磷源类物质: 卵磷脂>甘油磷酸二钠>磷酸三乙脂; 电子供体辅助碳源物质: 蔗糖>葡萄糖>麦芽糖; 氨基酸物质抑制降解效果: 甘氨酸>谷氨酸>丙氨酸。卵磷脂满足微生物生长所需磷元素的同时, 可促进石油烃溶解, 改变其生物利用度, 磷素本身没有电子移动功能, 复合蔗糖作为电子供体参与氧化还原反应, 驱动代谢过程, 提高了石油烃降解效率, 作为磷源的卵磷脂和作为电子供体的蔗糖刺激降解效果相似, 分别刺激增长了 7.91 和 8.03 个百分点。

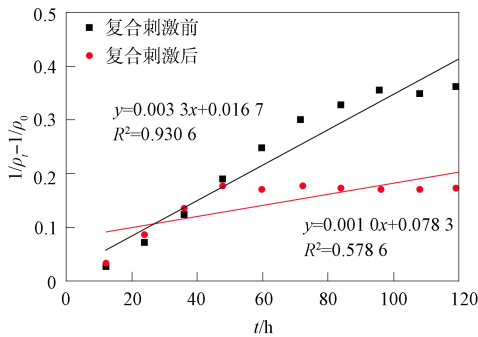


图 5 复合刺激前后微生物降解石油烃动力学规律

Fig. 5 Dynamic law of microbial degradation of petroleum hydrocarbons before and after compound stimulation

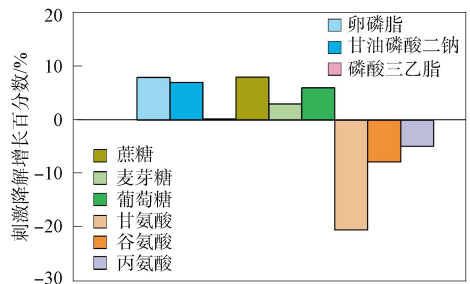


图 6 生物小分子物质刺激降解增长百分数

Fig. 6 Percentage of degradation growth under stimulation of biological small molecules

2.3 复合生物小分子刺激下微生物群落响应特征

2.3.1 微生物群落组成变化

在复合生物小分子刺激下, 石油烃污染地下水中微生物群落组成发生了明显变化, 结果如图 7 所示。由图 7 可见: 在微生物门水平上, 复合生物小分子投加后 *Proteobacteria*(变形菌)相对丰度基本不发生变化, *Actinobacteria*(放线菌)的相对丰度降低了 0.68 个百分点, *Bacteroidetes*(拟杆菌)的相对丰度升高了 5.34 个百分点; 在微生物属水平上, 优势菌属 *Pseudomonas*(假单胞菌)的相对丰度在复合生物小分子投加后由 61.89% 下降至 55.49%, 微生物菌属 *Janthinobacterium*(詹森菌)、*Dyadobacter*(成对杆菌)、*Rhizobium*(根瘤菌)、*Caulobacter*(柄杆菌)、*Brevundimonas*(短波单胞菌)、*Sphingobium*(鞘脂菌)和 *Novosphingobium*(新鞘脂菌)的相对丰度有不同程度的增加; 在复合生物小分子投加后, 石油烃污染地下水中大多数优势微生物具有石油烃降解能力, 通过介导氧化还原反应而氧化有机物的微生物占比明显提高, 如 *Janthinobacterium* 能参与无机电子供/受体的转化过程, 具有将多种复杂有机物作为能源和碳源进行生长的能力^[17]; *Rhizobium* 属于固氮菌, 具有降解多种多环芳烃的能力^[18]; *Caulobacter* 具有通过介导氧化还原反应而氧化有机物的能力^[19]; *Pseudomonas* 能将多

种类型的碳氢化合物作为唯一的碳源和能源,能高效去除石油污染环境中的饱和脂肪烃^[20].复合生物小分子物质提供了更多种类和量的营养刺激,地下环境中石油烃降解功能微生物快速生长,激发了优势菌属的生物活性,提高了土著微生物群落系统中无机电子供/受体的转换能力,达到高效降解石油烃的目的.

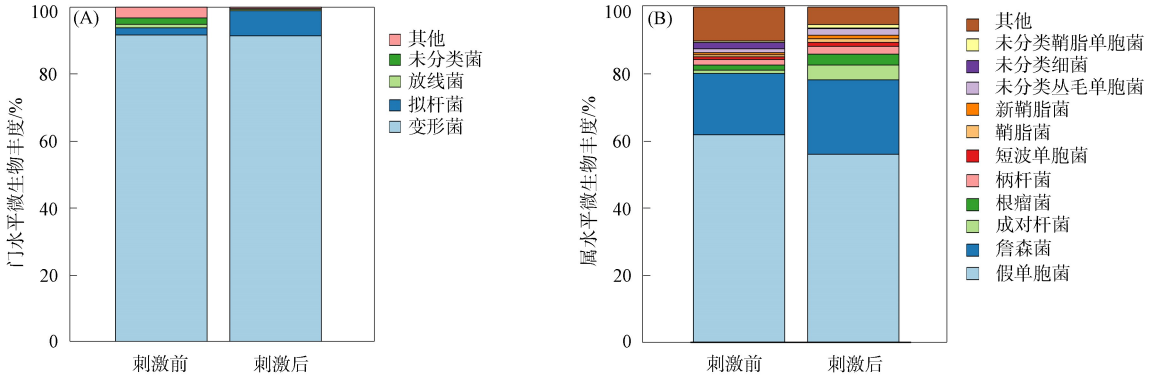


图 7 刺激前后微生物门(A)和属(B)水平上的群落组成

Fig. 7 Community composition of microbial phylum (A) and genus (B) level before and after stimulation

2.3.2 微生物群落代谢功能变化

微生物群落代谢功能基因丰度变化可反映复合生物小分子投加对微生物群落的影响,基于FAPROTAX数据库功能预测微生物群落代谢功能如图8所示.

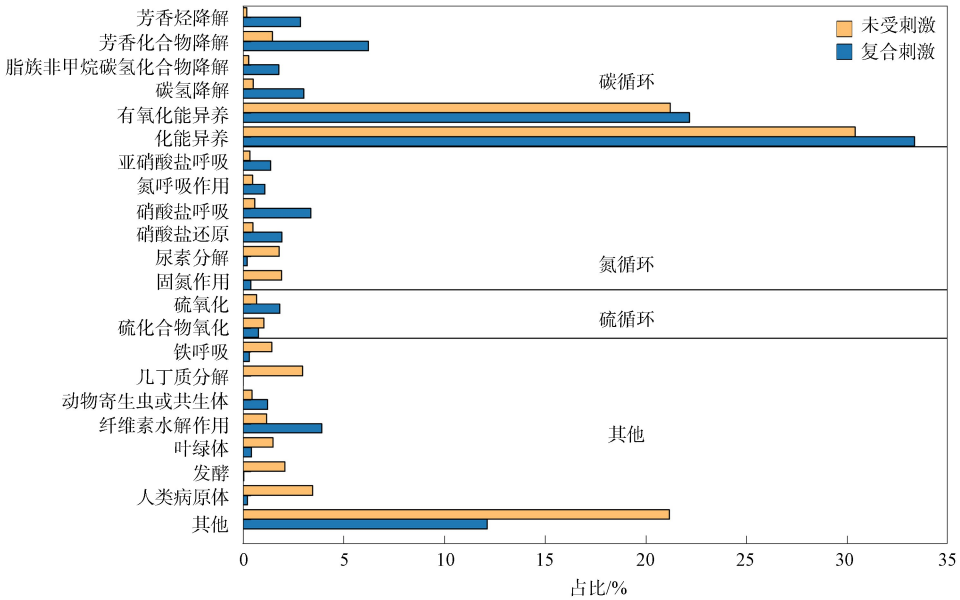


图 8 刺激前后降解菌群功能基因组成

Fig. 8 Functional gene composition of degradation microbial community before and after stimulation

由图8可见:复合生物小分子投加后,微生物群落有关碳、氮和硫循环方面的功能基因丰度分别提高了3.68,5.86和0.89个百分点,其中微生物群落有关碳循环功能基因丰度变化主要与好氧化能异养和化能异养相关,与氮循环功能基因丰度变化主要与硝酸还原和氮呼吸相关,与硫循环功能基因丰度变化主要与硫化物的暗氧化相关;地下水环境中的石油类污染物的降解主要在化能异养型微生物的参与下完成,在该过程中微生物以石油烃为碳源,通过参与硫和氮循环过程获得电子受体,将生物无法直接利用的化学能转化为可直接利用的能量形式(即腺苷三磷酸(ATP))而氧化有机污染物^[21];微生物群落与石油烃代谢途径直接相关的功能基因丰度也有不同程度的提高,微生物群落有关碳氢降解、脂族非甲烷碳氢化合物降解、芳香化合物降解和芳香烃碳氢降解基因的相对丰度在复合生物小分子投加后分别提高了2.50,1.49,4.76和2.66个百分点,表明微生物对有利于石油烃降解的条件做出

了积极响应,向地下水中投加复合生物小分子提高了微生物群落系统中无机电子供/受体的转换能力,加强了微生物菌属间的共代谢机制,增强了微生物群落降解石油烃效率,达到高效降解石油烃的目的。

3 结 论

1) 在营养盐基础上,向石油污染地下水中添加不同种类和浓度的生物小分子物质进行生物刺激修复实验发现:添加氨基酸可抑制石油烃降解,添加生物小分子物质磷源和电子供体辅助碳源可刺激石油烃降解,其中卵磷脂与蔗糖是最关键有效的营养刺激因子;

2) 研究得到一个复合生物刺激剂配方:磷酸二氢钾 50.00 mg/L,磷酸氢二铵 50.00 mg/L,七水硫酸镁 150.00 mg/L,氯化钠 10.00 mg/L,硝酸钾 10.00 mg/L,卵磷脂 10.00 mg/L,蔗糖 10.00 mg/L,刺激剂作用 7 d 时石油烃降解率由 59.24% 提升至 77.26%,微生物降解石油烃二级动力学方程为 $y=0.0033x+0.0167$, $R^2>0.9000$;

3) 揭示了外加生物小分子物质实现高效降解效率的原因并确认关键菌属,外加生物小分子物质刺激石油烃关键降解菌 *Proteobacteria* 丰度相对稳定, *Bacteroidetes* 丰度明显提升,改善了降解体系的微生物群落结构,强化了微生物相关代谢相应功能基因的表达,达到高效降解石油烃的目的。

参 考 文 献

- [1] 赵萌萌,薛林贵. 石油污染的生物治理技术研究 [J]. 环境科学与管理, 2015, 40(5): 41-43. (ZHAO M M, XUE L G. Research Progress of Applying Biological Treatment Technology in Petroleum Pollution Control [J]. Environment Science and Management, 2015, 40(5): 41-43.)
- [2] 陈辉伦. 石油污染浅层含水层的微生物修复研究进展 [J]. 安全与环境工程, 2015, 22(1): 66-72. (CHEN H L. Research Progress in Microbial Remediation of Petroleum-Contaminated Shallow Aquifer [J]. Safety and Environmental Engineering, 2015, 22(1): 66-72.)
- [3] 李明堂,张秀芳,盛连喜,等. 硝基苯污染地表水的生物修复模拟研究 [J]. 东北师大学报(自然科学版), 2008, 40(1): 131-135. (LI M T, ZHANG X F, SHENG L X, et al. Simulated Bioremediation of Surface Water Polluted with Nitrobenzene [J]. Journal of Northeast Normal University (Natural Science Edition), 2008, 40(1): 131-135.)
- [4] 董军,徐暖,刘同喆,等. 乳化植物油强化土著微生物修复中高浓度 Cr(VI) 污染地下水 [J]. 吉林大学学报(地球科学版), 2018, 48(1): 234-240. (DONG J, XU N, LIU T Z, et al. Indigenous Microbial Remediation of Middle-High Concentration Cr(VI) Contaminated Groundwater Enhanced by Emulsified Vegetable Oil [J]. Journal of Jilin University (Earth Science Edition), 2018, 48(1): 234-240.)
- [5] IMANI M, MIANGOLEH M E, ABADI M B. Bioremediation Process for Oil Contaminated Underground Water [C]// IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, [S.l.]: IOP Press, 2018: 012032-1-012032-10.
- [6] 杨悦锁,雷玉德,杜新强,等. 当地下水邂逅 DNA: 石油类有机污染及其生物降解 [J]. 吉林大学学报(地球科学版), 2012, 42(5): 1434-1445. (YANG Y S, LEI Y D, DU X Q, et al. When Groundwater Meets DNA: Petroleum Hydrocarbon Stress vs Biodegradation [J]. Journal of Jilin University (Earth Science Edition), 2012, 42(5): 1434-1445.)
- [7] WU M L, WU J L, ZHANG X H, et al. Effect of Bioaugmentation and Biostimulation on Hydrocarbon Degradation and Microbial Community Composition in Petroleum-Contaminated Loessal Soil [J]. Chemosphere, 2019, 237: 124456-124464.
- [8] LIAO C J, LIANG X J, LU G N, et al. Effect of Surfactant Amendment to PAHs-Contaminated Soil for Phytoremediation by Maize (*Zea mays* L) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 112: 1-6.
- [9] WU M L, MA C, WANG D, et al. Nutrient Drip Irrigation for Refractory Hydrocarbon Removal and Microbial Community Shift in a Historically Petroleum-Contaminated Soil [J]. Science of the Total Environment, 2020, 713: 136331-1-136331-8.
- [10] 吴仁人,党志,易筱筠,等. 氨基酸对烷烃降解菌 GS3C 降解性能的影响 [J]. 环境科学研究, 2009, 22(6): 702-706. (WU R R, DANG Z, YI X Y, et al. Effect of Amino Acids on Degrading Capability of a n-Alkanes Degrading Strain GS3C [J]. Research of Environmental Sciences, 2009, 22(6): 702-706.)

- [11] WANG J L, ZHANG Y L, YANG Q C, et al. A Starch-Based Controlled-Release Targeted Nutrient Agent to Stimulate the Activity of Volatile Chlorinated Hydrocarbon-Degrading Indigenous Microflora Present in Groundwater [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 247: 114262-1-114262-16.
- [12] ZHEN L S, HU T, LÜ R, et al. Succession of Microbial Communities and Synergetic Effects during Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil Enhanced by Chemical Oxidation [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 410: 124869-1-124869-10.
- [13] 吴仁人. 氨基酸及碳纳米管对烷烃降解菌 GS3C 降解性能的影响和机理研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2011. (WU R R. The Mechanism Study of Amino Acids or Carbon Nanotubes Amendment on Biodegradation Activities of an Alkane Grading Strain GS3C [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011.)
- [14] SØRENSEN S R, RONEN Z, AAMAND J, et al. Growth in Coculture Stimulates Metabolism of the Phenylurea Herbicide Isoproturon by *Sphingomonas* sp. Strain SRS2 [J]. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 2002, 68(7): 3478-3485.
- [15] SCHUKAT B, JANKE D, KREBA D, et al. Cometabolic Degradation of 2-and 3-Chloroaniline because of Glucose Metabolism by *Rhodococcus* sp. An117 [J]. *Current Microbiol*, 2015, 9: 81-86.
- [16] 胡盼. 有机肥营养体系生物刺激修复石油污染土壤研究 [D]. 青岛: 中国石油大学(华东), 2020. (HU Y. Research of Bio-stimulation on the Repairing of Petroleum-Contaminated Soil by Organic Fertilizer System [D]. Qingdao: China University of Petroleum (East China), 2020.)
- [17] SIGGINS A, THOM C, HEALY M G, et al. Simultaneous Adsorption and Biodegradation of Trichloroethylene Occurs in a Biochar Packed Column Treating Contaminated Landfill Leachate [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 403: 123676-1-123676-9.
- [18] HUANG Z, NI B, JIANG C Y, et al. Direct Sensing and Signal Transduction during Bacterial Chemotaxis toward Aromatic Compounds in *Comamonas Testosteroni* [J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 101(2): 224-237.
- [19] WANG J L, ZHANG Y L, DING Y, et al. Comparing the Indigenous Microorganism System in Typical Petroleum-Contaminated Groundwater [J]. *Chemosphere*, 2023, 311: 137173-1-137173-14.
- [20] QI Y B, WANG C Y, LÜ C Y, et al. Removal Capacities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by a Newly Isolated Strain from Oil Field Produced Water [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(2): 215-227.
- [21] WANG J L, ZHANG Y L, DING Y, et al. Stress Response Characteristics of Indigenous Microorganisms in Aromatic-Hydrocarbons-Contaminated Groundwater in the Cold Regions of Northeast China [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 246: 114139-1-114139-14.

(责任编辑: 单 凝)