农业环境科学学报 2010,29(10):1999-2004

Journal of Agro-Environment Science

两株真菌的分离及其在石油污染土壤修复中的作用

秦 晓 1，唐景春 2，张清敏 2，高 晶 1，李德生 1

(1.天津理工大学环境科学与安全工程学院，天津 300384；2.南开大学环境科学与工程学院，天津 300071)

摘 要：从石油污染的盐碱土壤中分离获得 2 株真菌，并对其生理生化性质进行初步研究 。将 2 株菌扩大培养，制成混合菌剂，通过 盆栽试验，以石油烃降解率、脱氢酶活性和土壤的微生物多样性等为指标，研究了不同剂量的混合菌剂对石油污染土壤修复的作 用。结果表明，添加菌剂各处理的石油烃降解率、脱氢酶活性和微生物多样性明显高于对照；石油烃降解率随菌剂加入剂量的增大 而提高，加入 8%的菌剂，70 d 石油烃降解率可达 63%，是对照组的 1.44 倍。

关键词：石油降解真菌；石油污染土壤；石油烃降解率；脱氢酶活性；微生物多样性

中图分类号：X172 文献标志码:A 文章编号**：1672-2043(2010)10-1999-06**

Isolation of Two Strains of Fungi and Their Effect on Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil

QIN Xiao1, TANG Jing-chun2, ZHANG Qing-min2, GAO Jing1, LI De-sheng1

(1.College of Environmental Science and Safety Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China; 2.College of Environ － mental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract： Two strains of fungi were isolated from petroleum-contaminated saline soil and their physiological characteristics were investigat － ed. The bioremediation of petroleum-contaminated soil was studied using the mixed cultures of the isolated strains. The biodegradation effi － ciency, dehydrogenase activity and microbial diversity of the studied soil were monitored for different treatments in pot experiments. The re － sults showed that compared with the contro(l CK), addition of mixed microbes notably improved the biodegradation efficiency and dehydroge － nase activity and stimulated both the abundance and diversity of the soil microbe. The biodegradation rate increased with higher inoculation amount of microbial consortium. With addition of 8% microbial mixture, the total concentration of petroleum hydrocarbon decreased by 63% after 70 days of incubation, which was 1.44 times higher than that of CK.

Keywords： petroleum degradation fungi; petroleum-contaminated soil; degradation efficiency ; dehydrogenase activity; microbial diversity

石油勘探、开采、加工及运输等生产过程和意外 事故会导致数量不等的石油和含油固体废弃物排放 到周围土壤中，使土壤生态系统受到不同程度破坏［1-3］， 对石油污染土壤的修复已成为环境修复的重要课题。 生物修复是通过投加或刺激土壤中的生物来降解污 染物，并不破坏植物生长所需的土壤环境，具有环境 友好、不产生二次污染的特点［4］。绝大多数微生物生长 的pH值范围介于6~8之间，中性最为适宜，但是在

收稿日期：2010－05－20 基金项目：环境污染过程与基准教育部重点实验室开放基金；国家高

技术研究发展计划项目(863) (2007AA061201)；中国科学

院知识创新工程项目(kzcxl-yw-06-03)

作者简介：秦 晓(1984—)，女，山东青岛人，硕士研究生，主要研究方

向为环境生物学。E-mail：[odyqin@163.com](mailto:odyqin@163.com)

通讯作者：李德生 E-mail: [deshli@tjut.edu.cn](mailto:deshli@tjut.edu.cn) 实际的土壤环境中，偏酸性或偏碱性的情况并不少 见［5］，尤其油田区更为突出，因其土壤含盐量高、碱度 大，影响微生物修复效果。

基于以上问题，本文直接从石油污染盐碱土中分 离降解石油的真菌，制备成真菌菌剂，加入土壤生态 系统后，具有适应性强、竞争力强的特点。通过实验室 内盆栽，模拟修复石油污染盐碱土，以修复过程中的 石油烃降解率、土壤脱氢酶的活性和土壤生态微生物 多样性为指标，检验、检查了两株真菌修复石油污染 的作用。对于利用真菌和真菌-植物联合修复石油污 染盐碱土生态具有重要意义。

1. 材料与方法
   1. 材料

供试土壤：取自天津大港油田，多点取样，表层 0~20 cm 石油污染盐碱土，自然风干，过 100 目筛，混 合均匀备用。其总石油烃含量21 000 mg -kg-1,基本 理化性质参照国家标准［6］测定，如表 1 所示。

表 1 土壤基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of soil

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 指标 | 水解氮/  g.kg-1 | 有效磷/  g.kg-1 | 有效钾/  g.kg-1 | 有机质/  % | pH | 含盐量/  % |
| 测定值 | 0.42 | 0.03 | 49.83 | 2.09 | 8.68 | 2.9 |

主要培养基:PDA (马铃薯培养基；马丁孟加拉 红-链霉素培养基。

有机肥:诺沃肥(胰岛素生产的发酵残渣)。

土壤营养调理剂:磷酸二氢铵-钙粉(1：1。

* 1. 试验方法
     1. 耐盐碱石油降解真菌筛选

石油降解真菌的富集、分离、纯化:取5 g 石油 污染土样接入装有 100 mL PDA 培养基的 250 mL 三角瓶中，于28七，160 r-min-1条件下，摇床培养5 d；待培养液浑浊后，吸取5 mL培养液重新转接入 新鲜PDA培养基中，与上述培养条件相同，连续转 接重复富集培养 4 次。 用无菌枪头取富集培养液 0.5 mL 于马丁孟加拉红-链霉素固体培养基平板上 涂布,28七培养48~56 h；用接种环挑取单菌落，划 线纯化，经过显微镜检查，确定得到单一的纯菌落， 将纯菌株转接于PDA斜面上,28七培养24 h后，于 4 T保存菌种。

石油降解真菌的复筛：取装有2mL无菌水的试 管，将试验菌接入其内，摇匀，制成菌悬液；取孟加拉 红-链霉素固体培养基平板3 个,分别吸取1 mL石油 佣石油醚稀释,0.2 “m超滤膜过滤除菌放入其内， 用无菌玻璃涂布棒将石油均匀涂布整个平板(平板变 成黑褐色)；用无菌镊子夹取小片无菌滤纸，放入上述 已涂石油的平板上，然后将约0.1 mL菌悬液滴在小 滤纸片上,28 T培养48~56 h,观察滤纸片周围颜色 变化，变淡者，即为石油降解菌真菌，滤纸片周围变淡 的圈越大，降解石油的效率就越高。

* + 1. 微生物生理生化测定

1. 形态特征

采用稀释平板法。将每株真菌用无菌蒸馏水稀释 10倍后，取02 mL用无菌玻璃涂布棒均匀涂布于 PDA平板上,28七培养48~56 h,对菌落形态进行观 察并记录。

1. 碳源利用试验［7］

被测碳源为葡萄糖、果糖、乳糖、麦芽糖、山梨醇

和可溶性淀粉。 挑取供试菌种 1 环接入无菌水中，摇 匀制成菌悬液；然后吸取1 mL菌悬液放到无菌培养 皿内，将冷至45 T左右的无碳源基础培养基约15 mL倒入培养皿内，摇匀并静置冷却；同法，每株菌制 平板2个；待表面干燥后，在上述平皿底分成7个小 区，1 个小区为对照，其余6个小区标注试验用碳源， 将米粒大小碳源按标记加到带菌平板上,先正放4 h, 然后28七下倒置培养48 h,观察结果。

1. 氮源利用试验［7］ 被测氮源为硝酸钾、硫酸铵、尿素。培养基为无氮

源基础培养基，方法同碳源利用试验。

1. 过氧化氢酶试验［7］

斜面挑取1 环待试菌置于洁净试管内，滴加 3% 过氧化氢溶液2 mL,于0.5 min内观察，产生气泡为 阳性。

1. 脱氢酶试验［7］

挑取斜面菌种1 环待置于洁净离心管内，加入4 mg-mL-1的TTC (氯化三苯基四氮唑 溶液3 mL,密封离 心管盖，置于暗处37七培养24 h；同时设置对照，不接 菌株。以4 mg-mL-1的TTC溶液为参比,485 nm比较空 白和样品的OD值,样品OD值大，则脱氢酶活性高。

1. 产脂试验［7］

取装有20 mL产脂培养基的50 mL三角瓶，向其 内接供试菌,28七培养4 d。嗅觉检查。

1. 产酸试验［7］

将供试菌株划线接种于生酸培养平板上,28 T 保温培养10 d,菌落周围形成透明圈的为阳性。

* + 1. 菌剂的制备

混合菌剂的培养采用三级扩大培养法。在28 T,

160 r-min-1振摇条件下，将两种菌先分别培养，第三 级时混合培养，都是PDA培养基。经显微镜检查菌落 数达到一定浓度之后，以腐植酸粉末为载体将混合菌 液吸附于载体上(载体与菌液的质量比为4：1)制备成 菌剂，密封于聚乙烯塑料袋内，室温保存。

* + 1. 土壤盐碱改良及模拟原位修复处理

土壤盐碱改良：取4 kg浇3次透水(即花盆底部 有水渗出)后自然风干的土样，加入3%土壤营养调理 剂充分混合均匀。

模拟原位修复处理:将改良后的土壤装入花盆， 每盆300 g,按照0% (质量百分数，以下同、2%、4%、 8%的比例加入真菌混合菌剂，分别记为 CK、1、2、3， 混合均匀后于室温下培养，隔日浇水50 mL。每个处

理设置3个平行。分别于第 3、7、14、21、28、35、70 d 测 定石油烃降解率、脱氢酶活性。各处理的第 70 d 土壤 样品提取总DNA，进行聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction，PCR和变性梯度凝胶电泳(Denatured Gradient Gel Electrophoresis， DGGE) 分析土壤微生物 的多样性。

* + 1. 分析方法

土壤中总石油烃含量 (Total petroleum hydr ocar bons content，TPH)采用重量法［8］测定。用索式提取法 提取土壤总石油烃，计算每克干土中总石油烃含量， 从而可计算石油烃降解率。

石油烃降解率二丿^叫山0% 式中:为第Id 土壤中总石油烃含量;Mi为第*i* d 土壤中总石油烃含量。

脱氢酶活性测定采用改进的TTC-脱氢酶活性测 定方法［9］，将1 h产生1 “g TF (三苯基甲膳的量定义 为一个酶活力单位。

土壤中真菌多样性的分子生物学分析：对处理第 70 d 不同土壤样品进行总 DNA 提取，然后进行 PCR-DGGE(PCR 仪和 Dcode 突变检测分析系统， Bio-Rad公司分析。土壤样品总DNA的提取和纯化 使用试剂盒(ZR Soil Microbe DNA Kit™ D6001, USA。 将纯化所得总 DNA 作为模板，使用 26S rDNA 中 D1/ D2区特异性引物㈣，进行两轮扩增。第一轮PCR：上 游弓 I物 NL-1 5'-GCATATCAATAAGCGGA GGAAAAG- 3)和下游引物 NL-4(5'-GGTCCGTGT TTCAAGACGG- 3)。第二轮 PCR：上游引物 NL1-GC &-CGCCCGCC GCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGG . GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAG-3'和下游弓I物 LS2(5'-ATTCCC AAACAACTCGACTC-3)扩增目的片段。每50 “L反 应体系中上游与下游引物各1 “L，dNTPs 1 “L，Taq 酶1 “L,模板4 “L,缓冲溶液5 “L,双蒸水37 “L。并 设置阴性对照和阳性对照。94 T 10 min预变性； 94 T 45 s,65七退火45 s，以后每个循环温度降低 1 直至退火温度为55 72 *V* 1 min延伸，并且在 55七进行20个循环,72七最终延伸10 min。扩增产 物用琼脂糖检验。扩增产物进行DGGE分析。电泳 所用聚丙烯酰胺凝胶浓度为8%,变性梯度为30%- 60%。使用电泳缓冲溶液为1xTAEo电泳条件：60 V 恒温，160 V电泳3 h,然后用EB染色30 min,紫外 凝胶成像系统照相，用 Quantity-One 软件分析电泳 条带 。

1. 结果与分析
   1. 真菌分离结果

为了取得高效、彻底的生物修复效果，分离和筛 选污染物的高效降解菌种是生物修复的必然要求［11］。 本试验经过富集培养、分离、纯化以及选择性培养基 复筛试验的验证，从大港油田石油污染盐碱土壤中分 离得到2株可以以石油作为碳源的石油降解真菌。根 据菌株的菌体形态及菌落特征初步判断为酵母菌和 霉菌，分别编号为DF-3和DF-M。将各菌株转接于斜 面培养基,V保存。菌株有待进一步鉴别。

* 1. 真菌初步鉴定结果

采用常规方法对菌株DF-3和DF-M进行了菌 落和菌体形态观察，并进行拍照，见图1、图2。 菌株 DF-3和DF-M菌落光滑，粘稠，均无色,DF-3菌体较 小,DF-M菌体较大。生化鉴定结果见表2。

* 1. 各处理石油烃降解率

各处理不同时期的石油烃降解率如图3 所示。各 处理的石油烃降解率随着培养时间的增加而不断增

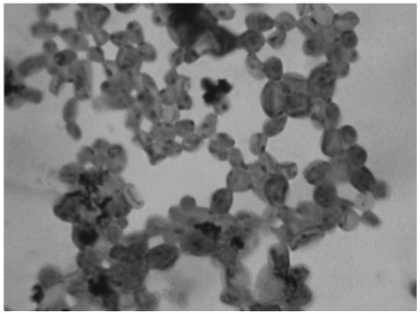


图1菌株DF-3的菌体形态照片

Figure 1 The cell form and structure of Strain DF-3

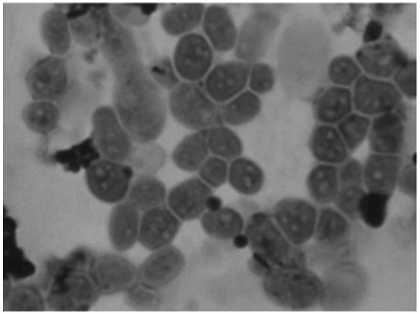


图 2 菌株 DF-M 的菌体形态照片

Figure 2 The cell form and structure of Strain DF-M

表 2 菌株生化鉴定结果

Table 2 Identification results of biochemial characteristics of fungi

氮源利用

碳源利用 过氧化氢酶脱氢酶 产脂 产酸 葡萄糖 果糖 乳糖 麦芽糖山梨醇水溶性淀粉硝酸钾硫酸铵尿素 DF-3

DF-M +

加,35 d后变化速率开始减慢并趋于平缓。与CK处 理相比，添加菌的处理在3d后即开始表现出较强的 降解能力,表明菌剂能快速适应环境。但是前3 d各 处理石油烃降解率差异不大，这可能与菌剂处于生 长适应期有关。 有研究表明，添加复合菌剂需保证足 够的菌体适应期，一般可在10 d后达到高效降解周 期［12］OCK处理中虽然没有加入菌剂，但是通过洗盐和 加入土壤营养调理剂等改良了土壤环境，刺激了土 著微生物的生长，使得石油烃降解率在70 d后达到 了 43.48%。而2%、4%和8%处理第70 d石油烃降解 率分别为 53.07%、57.20%、63.03%， 分别是 CK 的 1.22、1.31、1.44倍。 各处理后期石油烃降解率趋于平 稳，原因可能是易被菌剂利用的石油烃减少，而有害 代谢产物积累，同时加入的真菌在周围环境影响下 也逐渐发生变异，降解石油烃的效率只能保持在一 定水平上。

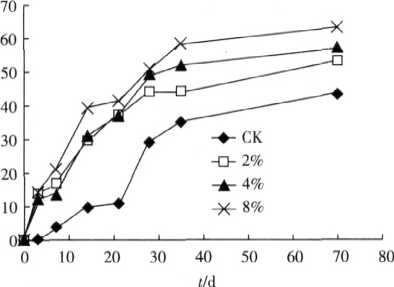
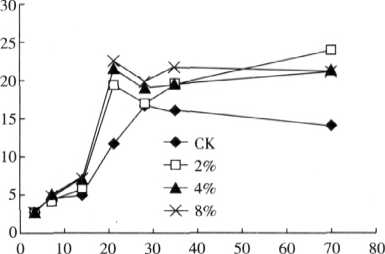


图3石油烧降解率随时间的变化

Figure 3 Degradation rate of total petroleum hydrocarbons with time

拱\*<進籬姿毎2

* 1. 各处理脱氢酶变化 生物体中绝大多数氧化还原反应都是在脱氢酶 及氧化酶的催化下进行。 石油烃经脱氢酶催化氧化， 最后通过电子传递链而被氧化，此时通过氧化磷酸化 作用生成腺苷三磷酸(AtP ,是异养生物体取得能量 的主要途径。 微生物降解石油烃的过程中，石油烃通 过脱氢酶活化氢原子并传递给特定的受氢体，实现石 油烃的氧化和转化［13］。 生物体的脱氢酶活性在很大程 度上反映了微生物的活性，而且能直接表示微生物细 胞对基质降解能力的强弱［14］。 如图4所示，随着培养 时间的增加脱氢酶活性逐渐增大，说明修复过程中微 生物的活性逐渐增强，这也与石油烃降解率变化趋势 基本相同。但在36 d后,各处理的脱氢酶活性的变化 速率逐渐减小，4%和 8%处理的脱氢酶活性在末期甚 至有所降低，2%处理的脱氢酶活性仍缓慢增大，这可 能是由于在修复后期易降解污染物减少，难降解物质 积累以及有毒代谢产物增加，导致微生物活性降低， 而不同处理的微生物活性降低程度不同，造成了脱氢 酶活性变化的差异。



*i/d*

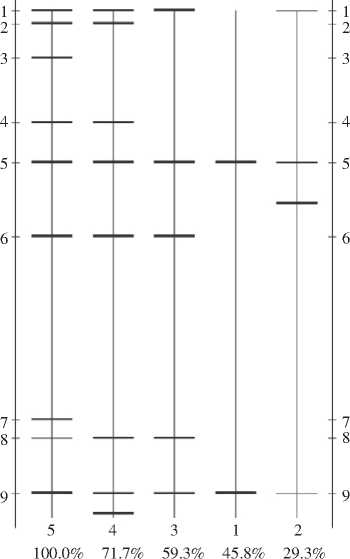
图4脱氢酶随时间的变化

Figure 4 Changes in dehydrogenase activity with time

* 1. 土壤微生物多样性的变化

以各处理第70 d的土壤样品总DNA为模板，使 用 26S rDNA 中 D1/D2 区的通用引物进行巢式扩增， 最终获得长约为 300 bp 的 26S rRNA 基因 D1/D2 区 扩增产物，以扩增产物进行DGGE分析，进一步分析 各处理中真菌种群的分布情况，结果如图5所示。 图 5 (a中条带的多少反映出土壤中真菌种群多样性，条 带的粗细则反映了种群密度的差异。 由图 5(b 可以 看出，各处理中真菌群落多样性明显不同，各种群密 度也存在差异。 泳道1(菌剂 仅有2条带，代表加入 的两种真菌，而且其他各处理中都有这2条带；泳道2 CK 有4条带，其中有2条与菌剂中的 2条相同，说 明菌剂中的真菌源于对照土样；泳道5(8%处理 有9

1 2 3 4 5



**(a** (b

Lane： 1.mixed microbes ；2.CK；3.sample 1；4.sample 2；5.sample 3  
图 5 菌剂及各处理土样第 70 d DGGE 图及 Quantity-One 处理泳道条带结果

Figure 5 DGGE profile(a and Quantity-One analysis resul(t b of mixed microbes and each sample after 70 days of incubation.

条带，说明8%处理后增加了真菌的多样性，而泳道3 2%处理 和泳道 4(4%处理 分别有 5 条和 8 条泳 带，虽然也增加了条带，但不及8%处理增加条带多。 这可以解释为什么加入的菌剂相对多，降解石油污染 的效果相对好。添加菌剂的各处理中都有菌剂的 2条 带，表明分离得到的两株真菌在各处理土样中都能存 活并保持一定生物量(条带的粗细基本相同 和活性， 再一次证实从石油污染盐碱土中分离得到降油真菌 能较好地适应原污染环境并能充分发挥其降油、修复 污染土壤生态的作用。

1. 结论

通过 2 株耐盐碱石油降解真菌对石油污染土壤 的修复作用研究，可初步得出以下结论。

(1 经过分离得到2株耐盐碱真菌，能适应盐碱 石油污染土壤，确有降解石油烃的作用。

(2 经过 70 d 的修复，土壤中各处理总石油烃 含量都有明显下降,CK、％、％和8%处理石油烃降 解率分别达到43.48%、53.07%、57.20%、63.03%；各处 理的土壤脱氢酶活性随着培养时间的增加逐渐增强， 其中添加菌剂处理的脱氢酶活性要远高于 CK。

(3 对比各处理，随着菌剂加入剂量的增加，石油 烃的降解率也明显提高，土壤生态也得到不同程度的 修复，表现为微生物的多样性增加。但是，为了降低修 复土壤生态的成本，加入 5%~6%的真菌菌剂是适当 的。 用于实际土壤生态修复工程，还要考虑真菌-细 菌、真菌-细菌-植物联合修复，以达到低成本、高效、 快速修复石油污染土壤生态系统的目的。

参考文献：

1. 丁克强，骆永明，孙铁珩,等.通气对石油污染土壤生物修复的影响[J]. 土壤, 2001, 33(4 ：185-188.

DING Ke -qiang, LUO Yong -ming, SUN Tie -heng, et al. The effect of ventilation on bioremediation for petroleum -contaminated soil [J]. Soils, 2001, 33(4 ：185-188.

1. 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 © ： 189-195.

HAN Hui -long, TANG Jing, JIANG Hao, et al. Synergy between fungi and bacteria in fungi -bacteria gaugmented remediation of petroleum - contaminated soil[J]. Environmental Science, 2008, 29(1 ： 189-195.

1. 姚德明,许华夏,张海荣,等.石油污染土壤生物修复过程中微生物 生态研究[J].生态学杂志,2002,21 © ：26-28.

YAO De-ming, XU Hua -xia, ZHANG Hai-rong, et al. Microbiological ecology during bioremediation for oil contaminated soil [J ]. Chinese Journal of Ecology , 2002, 21(1 :26-28.

1. 刘五星，骆永明，滕 应，等•石油污染土壤的生物修复研究进展[J]. 土壤, 2006, 38(5 :634-639.

LIU Wu -xing, LUO Yong -ming, TENG Ying , et al . Advances in bioremediation of petroleum contaminated soil[J]. Soils, 2006, 38(5 : 634-639.

1. 张宝良•油田土壤石油污染与原位生物修复技术研究[D].黑龙江： 大庆石油学院,2006.

ZHANG Bao - liang . Research on in - situ bioremediation for oil - contaminated soil in oilfields [ D ] . Heilongjiang ： Daqing Petroleum Institute, 2006.

⑹刘光崧.土壤理化分析与剖面描述[M].北京：中国标准出版社, 1996： 121-265.

LIU Guang -song. Soil physical and chemical analysis & description of soil profiles[M]. Beijing： China Standard Press, 1996： 121-265.

1. 杜连祥，路福平•微生物学实验技术[M].北京：中国轻工业出版社, 2005： 165-168.

DU Lian -xiang, LU Fu -ping. Experimental technique of microbiology [M]. Beijing： China Light Industry Press, 2005： 165-168.

1. 奚旦立，孙裕生,刘秀英•环境监测[M].修订版•北京:高等教育出版 社, 1995： 404-405.

XI Dan -li, SUN Yu -sheng, LIU Xiu -ying. Environmental monitoring [M]. Revision. Beijing： Higher Education Press, 1995： 404-405.

1. 张清敏.环境生物学实验技术[M].北京：化学工业出版社，2005：

130-131.

ZHANG Qing -min. Experimental technique of environmental biology [M]. Beijing： Chemical Industry Press， 2005： 130-131.

1. Cheunjit J Prakitchaiwattana， Graham H Fleet， Gillian M. Heard application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes[J]. FEMS Yeast Res， 2004， 4 (8 ： 865-877.
2. 徐金兰， 黄廷林， 唐智新， 等. 高效石油降解菌的筛选及石油污染土 壤生物修复特性的研究J].环境科学学报,2007, 27 (4 ：622-628.

XU Jin -lan， HUANG Ting -lin， TANG Zhi -xin， et al. Isolation of petroleum degradation bacteria and its application to bioremediation of petroleum-contaminated soil[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(4 ： 622-628.

1. 陈荣灿, 卞卫国, 王林霞. 石油烃降解复合菌对含油污泥的降解特 性 J].干旱区研究,2007, 11(24)： 850-853.

CHEN Rong-can, BIAN Wei-guo, WANG Lin-xia. Study on biodegra － dation of oily sludge treated with complex bacteria[J]. Arid Zone Re－ search, 2007, 11(24 ：850-853.

1. Neilson A H. Organic chemicals： An environmental perspective [M]. New York： Lewis Publishers, 2000.
2. 解 军,祁 峰,裴海燕,等.脱氢酶活性检测方法及其在环境监测 中的应用[J].中国环境监测,2006,22(5 ： 13-18.

XIE Jun, QI Feng, PEI Hai-yan. Determining method of dehydrogenase activity and its application in environmental monitoring[J]. Environ－ mental Monitoring in China, 2006, 22(5 ： 13-18.