

文章编号 1000-5013(2000) 02-0182-05

湄洲湾天然菌群对石油烃的降解作用

陈碧娥^① 郭厚宝^② 苏荣西^② 苏锦波^②

(① 华侨大学化工学院, 泉州 362011; ② 肖厝环境保护局, 泉州 362113)

摘要 从湄洲湾海域内湾及中湾的 3 个不同站位采集水样, 测定它们对大庆原油的自然降解率. 结果表明, 营养盐及原油的初始浓度对降解作用有很大的影响. 将采集的水样经富集培养后, 分离、纯化, 挑选出 38 个能在以原油为唯一碳源的平板上生长的菌落, 经鉴定这些菌株多数为革兰氏阴性菌. 从微生物细胞的表面结构及其与界面的作用分析海洋烃降解菌革兰氏阴性菌占优势的原因.

关键词 湄洲湾, 烃降解菌, 大庆原油

中图分类号 X 172

文献标识码 A

石油污染是海洋污染中最为严重的问题. 石油在海洋的消失是一个复杂的过程, 受到物理、化学和生物的作用, 微生物在海洋环境中降解烃类物质, 对海洋的净化起重要作用. 国外在 40 年代就开展了细菌降解海洋油污的研究, 我国有关这方面的研究始于 70 年代末期. 目前, 人们关注如何运用生物技术进行石油污染的现场修复^[1]. 生物整治是一种环境治理的方法, 它利用微生物的代谢作用提高污染物降解速度和扩大降解范围. 美国成功地利用生物整治的方法, 清除了 Alaska Exxon Valdez 海岸石油污染, 使近百里海岸的环境质量获得极大的改进^[2]. 湄洲湾是我国南方天然良港, 已规划为全国 4 个国际深水中转港之一. 湄洲湾开发区是福建省重要的石油、化工基地, 随着石化工业的发展和海上运输量的增加, 原油泄漏及船舶航行排油造成海洋石油污染的问题将愈加突出^[3]. 本文研究湄洲湾天然石油烃解降菌的特性, 探讨它在生物整治中的作用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水样 在湄洲湾内湾及中湾选择 3 个站位采集水样. 其中 1 号站位为炼油厂排污口, 2 号站位为油码头, 3 号站位为中湾主航道蜂尾海域. 采样瓶要求预先灭菌, 且水样采集后要当天进行实验.

1.1.2 原油 大庆原油, 由福建炼油厂提供.

收稿日期 1999-07-21 作者简介 陈碧娥(1946-), 女, 副教授

基金项目-2福建省自然科学基金资助项目 al Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.2.3 试剂 石油醚等用于分析测定的试剂为分析纯, 其余试剂均为化学纯.

1.2 培养基及培养条件

1.2.1 海水斜面培养基 在 1 L 海水中, 分别加入 0.1 g NH_2NO_3 , 0.1 g K_2HPO_4 , 0.01 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 痕量的 FeCl_3 , 5 g 原油, pH 值为 7.2.

1.2.2 液体培养基 (1) 不添加营养盐. 取海水 1 L, 加入适量单独灭菌的原油, pH 值为 7.2. (2) 添加营养盐. 添加 0.1 g NH_4NO_3 , 0.1 g K_2HPO_4 于节 1.2.2(1) 的培养基中.

1.2.3 培养方法 将 100 mL 培养液装入 500 mL 三角瓶内, 旋转摇床恒温振荡培养, 温度 26℃, 转速 $210 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$.

1.3 测定方法

菌体数量的测定采用平板计数法. 原油含量的测定采用重量法^[8], 用石油醚萃取油类, 然后水浴蒸去石油醚, 干燥恒重后称其重量. 用精密试纸测 pH 值. 菌体浓度 OD 值, 在 721 分光光度计上波长 660 nm 处测定, 空白样为天然海水.

1.4 石油烃降解菌的富集和分离

在含无机盐及新鲜海水的液体培养基中加入预先灭菌的原油 0.1 g, 26℃ 振荡培养 24 h 后, 于油平板上进行分离纯化. 将能利用原油为唯一碳源的菌株保存在油斜面上.

2 结果与讨论

2.1 不同水样中天然菌群对原油的降解作用

在装有 0.1 g 原油和 30 mL 灭菌海水的三角瓶中, 分别接入采自不同站位的水样 70 mL. 在添加和不添加营养盐的情况下, 振荡培养 5 d. 测定水样的 pH 值、OD 值和原油含量(C), 并计算降解率(η), 结果见表 1.

表 1 不同水样的原油自然降解率

水样	液体培养基	pH	OD	$C/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\eta/(\%)$
1 号	加营养盐	6.4	0.90	0.245	75.5
	不加营养盐	6.4	0.01	0.716	28.4
2 号	加营养盐	6.4	1.28	0.238	76.2
	不加营养盐	6.4	0.02	0.608	39.2
3 号	加营养盐	6.4	0.94	25.0	75.0
	不加营养盐	6.3	0.07	81.7	18.3

从表 1 可以看出, 3 个站位水样均存在着烃降解菌. 在添加营养盐的情况下, 3 个水样的原油降解率几乎相同. 在不加营养盐时差别较大, 2 号水样的油降解率最高, 3 号最低. 这说明 3 种水样中所含的天然烃降解菌在数量上是有区别的. 油码头的油污染相对较严重, 油浓度较高, 烃降解菌的数量也较多. 在相同的培养条件下, 添加营养盐为微生物的生长繁殖提供必需的氮、磷, 因而提高了天然菌群的降油作用.

2.2 原油浓度对降解作用的影响

将取自油码头的水样添加不同重量的原油, 使初始油浓度(C_0) 为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. 培养数天后分别测定其原油的含量, 结果见表 2. 表中 t 为培养时间, pH 和 OD 分别表示水样终点的 pH 值和 OD 值.

表 2 初始油浓度对降解作用的影响

$C_0/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	t/h	pH	OD	$C/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\eta/(\%)$
1	120	6.4	1.28	0.238	76.2
5	144	6.4	0.48	3.569	28.6
10	144	6.3	1.60	8.454	15.5

由表 2 可知,海水中原油的初始浓度对降解率有明显的影响,初始油浓度越高降解率越低.由于原油难溶于水而飘浮在海水的表面,烃类的降解为需氧的生物氧化过程,高浓度的原油既减少了氧的供应又有毒性,不利于菌体的生长.因此,只有在低浓度范围内天然菌群对原油的降解作用才较显著.

2.3 天然菌群对原油的降解过程

在添加营养盐的情况下,将初始含油浓度为 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水样,用摇瓶在温度 26℃ 下培养.每 24 h 取一次样,测定原油含量、pH 及培养液的 OD 值,以考察油码头水样中天然菌群对原油的降解过程,结果如图 1 所示.在整个过程中,pH 变化不大,在 24 h 后它由初始的 7.4 降到 6.3 后即保持不变.培养液的 OD 值及原油的降解率均随着培养时间的延长而不断增加,且两者呈同步增长的趋势.经过 5 d 的培养,能自然降解培养液中的 76.2% 的原油,用肉眼观察,可以看到实验过程原油发生了明显变化,如图 2 所示.由图可以看出,初始原油飘浮在海水表面,形成一层油膜.随着时间的推移,油层有气泡生成,培养液的颜色变成棕色,原油的一些组分也分散到水相而形成乳浊状态.

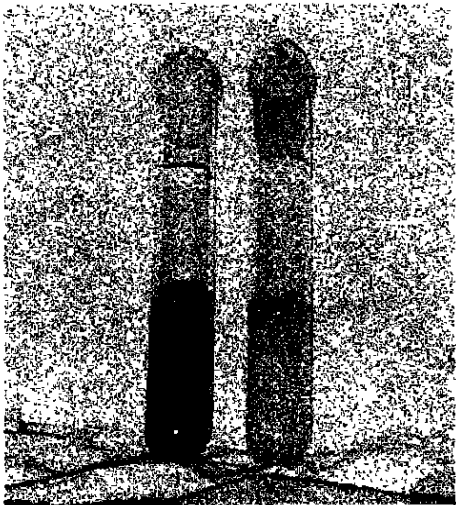
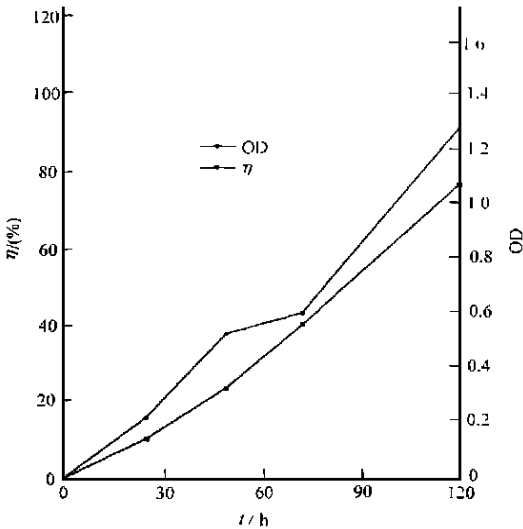


图 2 培养液的外观状态

图 1 天然菌群对原油的降解曲线

1. 培养液的初始状态; 2. 培养 5 d 后培养液的状态

2.4 烃降解菌的形态大小及基本特征

将取自不同站点的水样,经富集培养后,在以原油为唯一碳源的平板上进行分离.经培养挑取 38 个菌落,接种至油斜面上.培养 24 h 后,观察其表面的生长情况、形态、尺寸大小(s)、革兰氏染色鉴定及基本特征,结果如表 3 所示.

从表 3 可以看出,从湄洲湾海域水样分离的这 38 株烃降解菌,它们大部分是细菌.这些细

表 3 烃降解菌的形态、尺寸大小及基本特征^①

菌号	形态	s/ μm	染色鉴定	斜面生长情况	菌号	形态	s/ μm	染色鉴定	斜面生长情况
1	杆状	$(1.5 \sim 3.0) \times (0.5 \sim 1.5)$	G ⁻	卅	22	杆状	$(1.0 \sim 2.0) \times 1.0$	G ⁻	卅
2	杆状	1.5×1.0	G ⁻	卅	23	杆状	$(1.0 \sim 1.5) \times 0.5$	G ⁻	卅
3	杆状	$(2.0 \sim 3.0) \times 0.5$	G ⁻	卅	24	杆状	1.0×0.5	G ⁻	+
4	杆状	2.0×0.5	G ⁻	卅	25	球状	1.0	G ⁺	+
5	球状	$0.5 \sim 1.0$	G ⁺	卅	26	杆状	1.5×0.5	G ⁻	卅
6	杆状	1.5×0.5	G ⁻	+	27	杆状	1.0×0.8	G ⁻	卅
9	球状	0.5	G ⁺	+	28	杆状	$1.5 \times (0.5 \sim 1.0)$	G ⁻	+
10	球状	0.5	G ⁺	+	29	杆状	2.0×0.5	G ⁻	卅
11	杆状	1.0×0.5	G ⁻	卅	30	杆状	$(1.0 \sim 3.0) \times 0.5$	G ⁻	卅
12	杆状	$(1.0 \sim 2.0) \times 0.5$	G ⁻	+	31	杆状	1.0×0.5	G ⁻	+
13	球状	0.5	G ⁺	+	32	杆状	1.0×0.8	G ⁻	+
14	球状	$0.5 \sim 1.0$	G ⁺	+	33	杆状	0.8×0.5	G ⁻	卅
15	杆状	$1.5 \sim 0.8$	G ⁻	卅	34	丝状真菌	2.0	-	卅
16	杆状	2.0×0.5	G ⁻	卅	35	丝状真菌	2.0	-	卅
17	杆状	$(1.0 \sim 2.0) \times 0.8$	G	卅	36	丝状真菌	2.0	-	卅
18	杆状	$(1.0 \sim 1.5) \times 0.5$	G ⁻	卅	37	球状	0.5	G ⁺	+
19	杆状	1.0×0.8	G ⁻	卅	38	杆状	$(1.0 \sim 2.0) \times 0.4$	G ⁻	卅
20	杆状	1.0×0.8	G ⁻	卅	39	杆状	1.5×0.5	G ⁻	卅
21	杆状	1.5×0.8	G ⁻	卅	40	杆状	$(1.0 \sim 2.0) \times (0.8 \sim 1.0)$	G ⁻	卅

① 斜面生长情况“+”号的多少表示菌苔的厚度;杆状尺寸大小为长乘于直径,球状尺寸大小为直径,丝状真菌尺寸大小为菌丝直径

菌,它们多数是革兰氏阴性(G⁻)杆菌,只有少数是革兰氏阳性(G⁺)球菌.这与周宗澄等⁶⁾报道的厦门港石油烃降解菌中,其“多数站位都是革兰氏阴性菌占优势”的情况相似.可以从微生物和界面的相互作用以及细菌细胞表面结构和组成等方面,解释为什么海洋的烃降解菌中革兰氏阴性菌占多数.石油成分中除含有少量挥发性物质外大部分难溶于水,所含烃类化合物的憎水性是微生物进行代谢、降解的主要障碍.因为烃类物质必须通过细胞壁才能进入细胞,而被位于细胞膜内的烃降解酶所代谢.微生物利用烃类物质有两种可能的途径.一种是微生物首先分泌能降低水——油界面张力的乳化剂.它使石油变为由微小油滴构成的乳剂并被动扩散进入细胞内,从而被降解.另一种是细胞直接与油滴表面接触.G⁻杆菌细胞壁的外层是脂多糖、多糖和类脂的复合物,它为细胞提供一个两亲的分子层,使得细胞直接与油滴表面接触,烃类化合物就易于进入细胞.而G⁺菌的细胞壁是由肽聚糖组成的,不含类脂质,这可能是在有石油污染的海洋环境中烃降解菌G⁻杆菌占优势的原因.

3 结论

湄洲湾海域的天然菌群中存在着烃降解菌,对海水石油污染起净化作用.不同站位的水样对原油的自然降解率不同,油码头水样的自然降解率最高.氮、磷营养盐的存在能提高烃降解菌对原油的降解作用,高浓度的原油会抑制降解作用.经鉴定,从水样中分离出的烃降解菌多

数为 G^- 菌. 天然菌群中的烃降解菌 G^- 菌能占优势, 其主要原因是 G^- 菌细胞壁的外层含有脂多糖. 它提供一个两亲的分子层, 使憎水的烃类化合物直接与细胞表面接触并进入细胞.

参 考 文 献

- 1 Law At. Oil biodegradation in straits of Malacca[J]. J. Mar. Biotechnol., 1997, 5(2): 162 ~ 167
- 2 Sugai S F. Environmental influences on the microbial degradation of Exxon Valdez Oil on the shorelines of Prince William Sound Alaska[J]. Environ. Sci. Technol., 1997, 31: 1564 ~ 1572
- 3 李永忠. 原油泄漏对湄洲湾海域水质污染分析[J]. 福建环境, 1997, 14(3): 32 ~ 34
- 4 城市建设环境保护部环境保护局编. 环境监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1986. 143 ~ 146
- 5 周宗澄, 倪纯治, 李志棠等. 海洋污染微生物降解的研究[J]. 海洋学报, 1983, 5(6): 637 ~ 644

A Study on Petroleum Hydrocarbon Degradation by Natural Microbes in Sea Water from Meizhou Bay

Chen Bie^① Guo Honbao^② Su Rongxi^② Su Jinbo^②

(^① College of Chem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou;

^② Xiaocuo Environ. Prot. Adm., 362113, Quanzhou)

Abstract Specimens of sea water are collected from three different sites in Inner Bay and Middle Bay of Meizhou Bay; and the natural degradation of crude oil from Daqing by these specimens are measured. The results show that nutrient salts and initial concentration of crude oil greatly influence the degradation. The oil degrading microbes from the specimens are enriched, cultured, isolated and purified. Thirty eight bacterial colonies can be grown on agar plate where crude oil is taken by them to be the sole carbon source. Most of these bacterial strains have been identified as Gram-negative bacteria. From surface structure of microbial cells and their action with boundary interfaces, the authors analyze the reason why Gram-negative bacteria occupy a dominant position in the degradation of marine hydrocarbon.

Keywords Meizhou Bay, hydrocarbon degrading bacteria, Daqing crude oil