

石油烃污染地下水中微生物群落结构的影响研究

Xueyang Huang^{1,2}, Guo Wei³, Ziting Ding⁴, Huazhi Wang¹, Liping Bai^{1*}

¹生态环境部土壤与农业与农村生态环境技术中心 北京

²中国地质大学水资源与环境学院 北京

³北京投资集团有限公司 北京

⁴山西坤宏环保科技有限公司 山西太原

【摘要】石油烃是通过采集北京某石油烃污染场地土壤样品筛选分离降解菌，将培养的菌悬液按不同比例添加到地下水样中，分析不同比例菌悬液对地下水样中细菌群落结构的影响，研究可利用石油污染物作为碳源和能量来源的细菌。研究结果表明，菌悬液的添加对地下水样中细菌结构有明显影响，与受石油烃污染的原水样相比，24 h 后变形菌门和厚壁菌门的相对丰度分别由 88% 提高到 97% 和由 0.4% 提高到 34.2%。24 h 后假单胞菌属和芽孢杆菌属相对丰度分别由 67% 上升至 99% 和 0.2% 上升至 32.3%，地下水样品中的优势菌为石油烃相关降解菌，研究结果可为石油污染土壤及地下水的生物修复提供理论依据。

【关键词】污染场地；地下水；石油烃；降解菌

【基金项目】国家自然科学基金（No.41471266）

【收稿日期】2025 年 3 月 15 日

【出刊日期】2025 年 4 月 15 日

【DOI】10.12208/j.wrrm.20250003

Research on the Influence of Inoculating Bacterium Suspension on Microbial Community Structure in Petroleum Hydrocarbon Contaminated Groundwater

Xueyang Huang^{1,2}, Guo Wei³, Ziting Ding⁴, Huazhi Wang¹, Liping Bai^{1*}

¹Technical Center for Soil, Agriculture and Rural Ecology and Environment, Ministry of Ecology and Environment, Beijing

²School of Water Resources & Environment, China University of Geosciences, Beijing

³Beijing Investment Group Co., Ltd, Beijing

⁴Shanxi Kunhong Environmental Protection Technology Co., Ltd, Taiyuan, Shanxi

【Abstract】Petroleum hydrocarbon is a common pollutant which has high toxicity and transport property in groundwater. Considering the current supervision demands of groundwater pollution in China, this paper studies the bioremediation method of petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. The degradation bacteria were screened and separated through the soil samples collected at a petroleum hydrocarbon contaminated site in Beijing, China. The cultivated bacterial suspension was added by different proportions into the groundwater samples. The influence of different proportions of bacteria suspension on the bacteria community structure in groundwater samples was analyzed, and the bacteria which could use petroleum pollutants as carbon sources and energy sources were studied. The research results showed that addition of bacterial suspension could have significantly effects on the bacterial structure in groundwater sample. Compared with the raw water samples contaminated by petroleum hydrocarbons, the relative abundance of Proteobacteria and Firmicutes phylum level increased respectively from 88% to 97% and 0.4% to 34.2% after 24 hours. The relative abundance of Pseudomonas and Bacillus genus level increased respectively from 67% to 99%, and 0.2% to 32.3% after 24 hours. The advantage bacteria in groundwater samples were considered as petroleum hydrocarbon-related degradation bacteria. The research results could provide

*通讯作者：Liping Bai

注：本文于 2023 年发表在 OAJRC Environmental Science 期刊 4 卷 1 期，为其授权翻译版本。

theoretical basis for the bioremediation of petroleum contaminated soil and groundwater.

【Keywords】Contaminated site; Groundwater; Petroleum hydrocarbon; Degradation bacteria

1 简介

地下水是我国的重要水资源，主要用于农业灌溉、工矿企业及城镇生活用水。我国有 400 多个城市使用地下水作为饮用水。据统计，我国北方城市 65%的生活用水、50%的工业用水、33%的农业灌溉用水均来源于地下水。

石油类组分是地下水中最为关注的污染物，受污染的地下水难以检测和控制。寻找经济高效修复技术降解地下水中烃类污染物具有重要意义。生物修复是一种环境友好的修复方法，其原理主要是刺激微生物对污染物的降解。微生物修复被广泛应用于处理石油烃污染的土壤和地下水^[1,2]。自然界中已发现的石油降解微生物有 100 多个属、200 多种，主要包括细菌（假单胞菌、芽孢杆菌等）、真菌（曲霉菌、青霉菌等）、放线菌（*Streamomycetes*、*Nocardia* 等）、酵母菌等^[3]。

微生物修复技术包括微生物强化和微生物刺激^[4,5]。微生物强化是指在污染介质中添加可降解细菌，加速污染物降解的方法^[6,7]。微生物刺激是指在污染介质中添加氮、磷营养物和 H_2O_2 、 O_2 等电子受体，通过刺激生物生长来加速降解速度的方法^[8-10]。土壤中微生物的种类不同，其分解有机污染物所需的条件也不同，因此生物强化的效果比生物刺激的效果要好，而对于降解菌功能较差的污染土壤，微生物强化具有有效的修复效果^[6,7,11]。加入到污染介质中的外源微生物会受到土著微生物的竞争拮抗，影响生物强化处理的效果^[12,13]。Ueno 和 Wu 从石油污染土壤中分离出具有降解石油能力的本土微生物，并将富集的微生物加入到石油污染土壤中，取得了满意的效果^[6,13]。

已发现数百种微生物能降解石油烃化合物，最常见的属包括假单胞菌属、无色杆菌属、节杆菌属、微球菌属、诺卡氏菌属、不动杆菌属、短杆菌属、棒状杆菌属、黄杆菌属、产碱杆菌属、芽孢杆菌属、分枝杆菌属和红球菌属等^[14]。Sathishkumar 等从石油污染土壤中分离出 57 株石油降解细菌^[15]包括芽孢杆菌属、棒状杆菌属和假单胞菌属。高等研究了不同盐度和原油浓度土壤中微生物群落的变化^[16]，并通过 DGGE 对土壤中活性细菌种类进行分析。研究

结果表明，放线菌、 γ -变形菌、厚壁菌门在石油烃降解中起主导作用。微生物群落结构对生态系统功能的强弱和特点起着决定性的作用^[17]。ShahiA 等研究发现，微生物群落结构的变化与石油烃的去除有关。

土壤污染防治在我国越来越受到重视，由于时间限制，2016 年以前，我国在工业污染场地应用微生物修复技术较少。2016 年，我国颁布了《土壤污染防治行动计划》，2018 年，又颁布了《中华人民共和国土壤污染防治法》，提出了基于风险的土壤及地下水污染控制与修复思路与方法。对于石油烃污染场地的修复与调控，研究石油烃污染介质中微生物群落的变化具有重要意义。

本研究针对石油污染地下水中微生物群落结构的变化，从污染土壤中筛选并富集优势菌，将纯化的优势菌以不同比例的菌悬液添加至污染场地采集的地下水样中，对微生物群落结构的变化进行分析评价，研究结果可为石油污染场地的微生物修复提供理论依据。

2 材料和方法

2.1 土壤和地下水样品

本实验所用的土壤和地下水样品取自中国北京的一家化工厂，根据土壤和地下水调查结果，该地点受到了石油烃的污染。

2.2 培养基

分离培养液组成为（g/L） $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，0.7；KCl，0.7； $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ，2.13； KH_2PO_4 ，1.08； NH_4Cl ，2.13g/L。纯化培养液组成为： $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，0.7g/L；KCl，0.7g/L； $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ，2.13g/L； KH_2PO_4 ，1.08g/L； NH_4Cl ，2.13g/L；琼脂 1.8%~2.0%。Luria-Bertani 培养液组成为（g/L）：胰蛋白胨 10%，酵母提取物 5%，NaCl 10%。将苯经除菌、过滤后加入培养物作为碳源。

2.3 实验方法

（1）隔离

将 10mL 苯溶液、90mL 分离培养基和 1g 受石油烃污染的土壤样品混合制成混合液，加入 250mL 锥形瓶中，30℃条件下以 180r/min 振荡培养一周，得到菌悬液。在培养板中配制含有 10mL 苯溶液和 90mL 无菌净化培养基的培养基。在净化后的培养基

上均匀涂 200 μ L 菌悬液, 将培养基置于培养箱中, 30 $^{\circ}$ C条件下培养一周。

(2) 纯化

接种环用酒精灯火焰灭菌, 挑取冷却后的接种环, 划线接种于纯化后的培养基上, 倒置培养箱, 30 $^{\circ}$ C培养 3d, 重复 3 次, 获得降解菌供实验用。

3 结果与讨论

通过对分离纯化的平板进行测序, 并与数据库中的细菌序列进行比对, 选定的细菌属为芽孢杆菌 (*Bacillus*)。

3.1 地下水微生物群落高通量测序

微生物的生长受温度、振荡速率、碳源浓度等因素影响, 以苯浓度 2000mg/L 为最佳对数悬浮液, 在 40 $^{\circ}$ C、180r/min 条件下进行富集, 将菌悬液分为 5 组, 分别以 1%、5%、10%、15%、20% 的投加量加入石油烃污染地下水样中, 振荡加入菌悬液, 碳源浓度为 100mg/L 时, 在 40 $^{\circ}$ C、180r/min 条件下进行富集, 最后将菌悬液加入到石油烃污染地下水样

中。40 $^{\circ}$ C 培养 24 小时, 每隔 2 小时用紫外分光光度计在 600nm 处测量吸光度, 得到生长曲线(图 1)。

3.1.1 测序质量评价

图 2 可以直观的展示样品间的物种多样性差异。

图 2 显示各处理的稀释曲线趋于平缓, 说明测序数据量平缓、合理, 所有样品中的微生物多样性均被捕获, 扩增出的序列可以反映各样品的细菌群落结构。

3.1.2 多样性指数

多样性指数是评价土壤微生物群落丰富度和均匀度的综合指标。ACE 和 Chao1 指数可用于衡量物种丰富度。图 3 和表 1 显示了本研究中的 ACE 和 Chao1 指数。ACE 和 Chao1 指数越大, 表明土壤微生物群落丰富度越高^[18]Shannon 指数越大, Simpson 指数越小, 表明土壤植物群的均匀度越高^[19,20]本实验中, ACE 和 Chao1 指数值随时间推移呈现下降趋势。

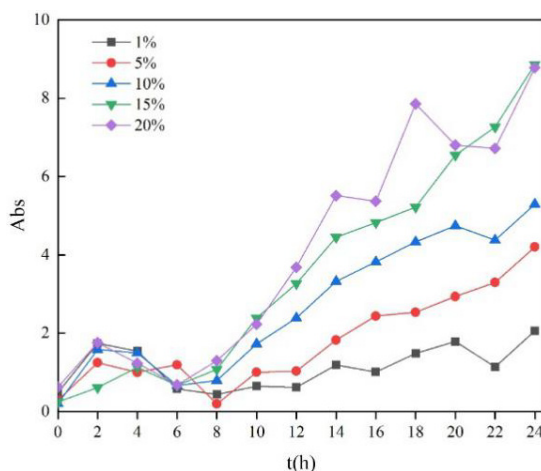


图 1 微生物的生长曲线

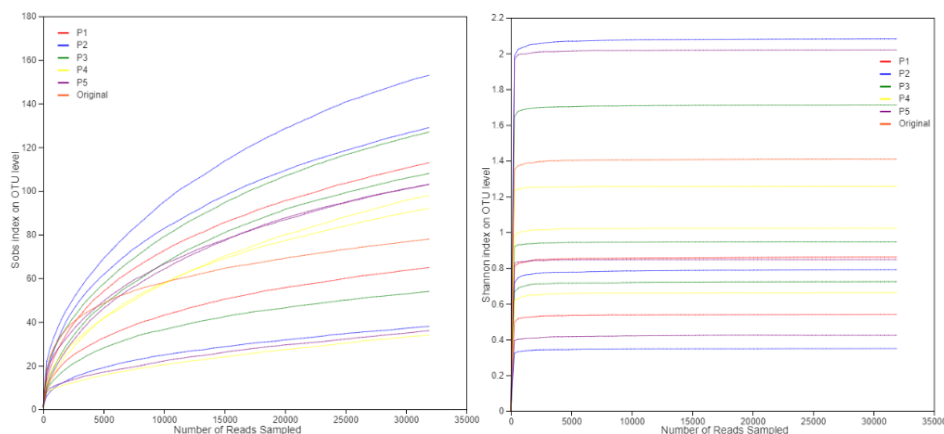


图 2 样品的稀释曲线

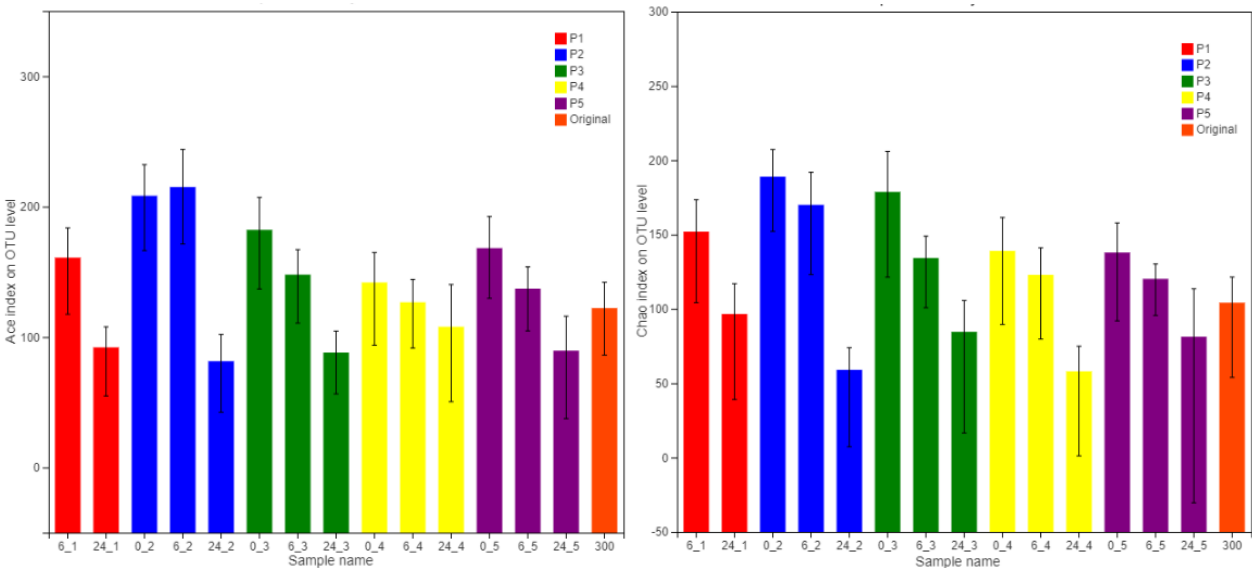


图 3 ACE 和 Chao1 指数结果
表 1 不同样品中微生物群落多样性

No.	Shannon	Coverage (%)	No.	Shannon	Coverage (%)
6-1	0.860238	0.998778	0-4	1.023375	0.998747
24-1	0.539569	0.999279	6-4	0.663037	0.998998
0-2	2.082046	0.998434	24-4	1.25776	0.999499
6-2	0.790283	0.998653	0-5	2.020168	0.998904
24-2	0.349139	0.99953	6-5	0.423286	0.999029
0-3	1.711897	0.998559	24-5	0.846339	0.999467
6-3	0.723491	0.998872	300	1.409682	0.999342
24-3	0.947346	0.999436			

表 1 为地下水样品中微生物群落多样性测定结果，经生物强化处理的样品的 Shannon 指数值低于原水样，说明在石油烃污染地下水添加降解菌可以抑制土著微生物的生长，降低土壤微生物的丰富度和均匀度，与齐等的研究结果一致^[21]。15 个样本的 Coverage 指数均超过 99%，表明测序结果可以代表样本中细菌的真实分布情况^[3]。

3.1.3 土壤微生物群落结构变化

(1) 门级

降解石油烃的主要细菌群包括变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门^[3,9,10,18,22]。对各样品的相对门丰度进行分析，结果如图 4 所示。变形菌门和厚壁菌门是所有样品中的优势门，是石油烃污染土壤中常见的微生物门^[3,22,23]与原水样相比，1%、5%

和 10%菌悬液中变形菌相对丰度分别由 94%、91%和 88%上升至 97%、99%和 97%；15%和 20%菌悬液中厚壁菌相对丰度分别由 0.4%和 2.7%上升至 34.2%和 16.9%。

(2) 属级

图 5 为地下水样品中的优势菌属，在加入菌悬液前，Pseudomonas、Azovibrio 和 Proteiniphilum 为优势菌属，相对丰度分别为 67%、17%和 9.4%；当在 24 小时后将菌悬液加入地下水样品中时，优势菌为 Pseudomonas 和 Bacillus，样品中 Pseudomonas 的丰度分别由 67%上升至 90%、99%、96%和 76%。在投加比例为 1%、5%、10%的地下水样品中，芽孢杆菌的相对丰度分别由 3.1%降至 2.1%、7.1%降至 0.6%、4.9%降至 2.1%；而在投加比例为 15%和 20%

的样品中,芽孢杆菌的相对丰度分别由 0.2%升高至 32%、由 2.2%升高至 16.9%。石油污染土壤的优势菌种有假单胞菌、无色杆菌、芽孢杆菌和不动杆菌

[9,10,14-16,18,22]。本次试验地下水样品中变形菌和假单胞菌为优势菌种,研究结果表明本研究分离纯化的菌株能够利用石油烃作为碳源和能量进行生长。

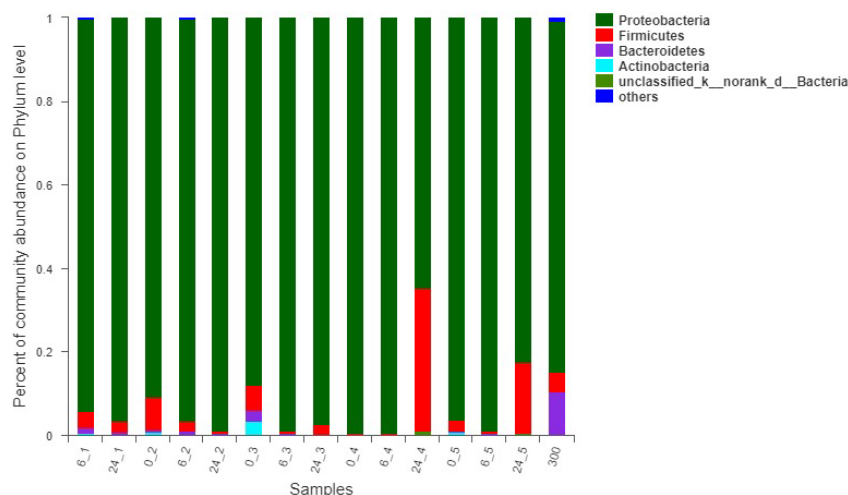


图4 地下水微生物门类相对丰度

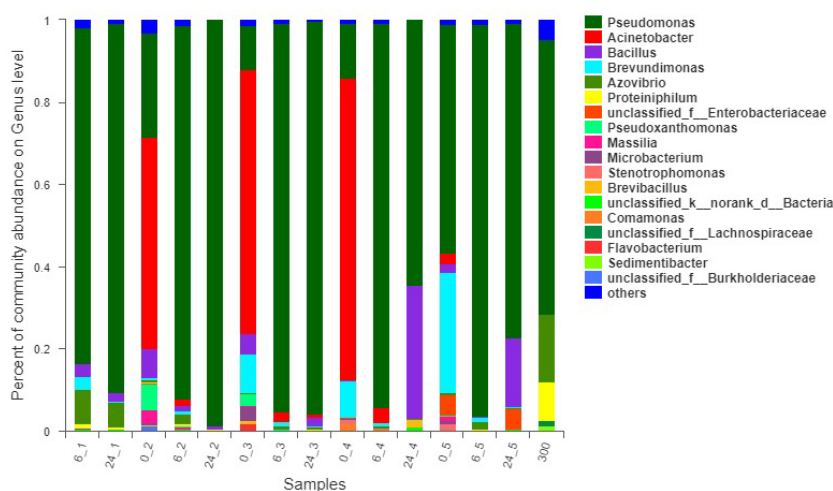


图5 地下水中丝虫属微生物的相对丰度

4 结论

(1) 从石油烃降解菌中筛选、分离、纯化得到具有降解石油烃能力的芽孢杆菌受污染的土壤。

(2) 添加不同比例的菌悬液后石油烃污染地下水样品中的群落结构发生了明显变化,在门水平上,变形菌门(Proteobacteria)为优势菌,在属水平上,假单胞菌(Pseudomonas)和芽孢杆菌(Bacillus)为优势菌。

(3) 地下水样品中的优势菌为石油烃相关降解菌,研究结果可为石油污染土壤及地下水的生物修复提供理论依据。

参考文献

- [1] Chaîneau, C.H., Rougeux, G., Yéprémian, C. & Oudot, J. (2005). Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil, *Soil Biology & Biochemistry* 37 (8), 1490-1497.
- [2] Lu, X.X., Li, X.L., Ma, J., Wu, S.K., Chen, C.Q. & Wu, W. (2011). Enhanced Bioremediation of Coking Plant Soils Contaminated with Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science* 32 (3), 864-869. (in Chinese).

- [3] Tan, Y.P., Ma, Y. & Lv, J. (2016). Analysis of Environmental Microbial Remediation of Oil Pollution. *Hebei Agricultural Sciences*. 55 (17), 4353-4358. (in Chinese).
- [4] Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C. & Ciani, M. (2012) Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 66 (1), 39-46.
- [5] Abed, R.M.M., Al-Sabahi, J., Al-Maqrashi, F., Al-Habsi, A. & Al-Hinai, M. (2014). Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 89 (4), 58-66.
- [6] Wu, M.L., Chen, L.M., Tian, Y.Q., Ding, Y. & Warren, A.D. (2013). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environmental Pollution*. 178 (1), 152-158.
- [7] Castiglione, M. R., Giorgetti, L., Becarelli, S., Siracusa, G. & Gregorio, S. D. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of Viciafaba L. *Environmental science and Pollution Research*, 23 (8), 1-12.
- [8] Qiao, J., Chen, W. & Zhang, C.D. (2010). Effects of different nutrient additives on bioremediation of petroleum contaminated soil. *Environmental Chemistry*. 29 (01), 6-11. (in Chinese).
- [9] Yang, Q., Wu, M.L., Nie, M.Q., Wang, T.T. & Zhang, M.H. (2015). Effects and Biological Response on Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil. *Environmental Science*. 36 (05), 1856-1863. (in Chinese).
- [10] Ye, X.Q., Wu, M.L., Chen, K.L., Li, W. & Yuan, J. (2017). Impacts of Bioremediation on Microbial Communities and Different Forms of Nitrogen in Petroleum Contaminated Soil. *Environmental Science*, 38 (02), 728-734.
- [11] Xu, Y.H. & Lu, M. (2010). Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*. 183 (1/2/3), 395-401.
- [12] Liu, P.W.G., Whang, L.M., Yang, M.C. & Cheng, S.S. (2008). Biodegradation of dieselcontaminated soil: A soil column study. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 39 (5), 419-428.
- [13] Liu, P.W.G., Chang, T.C., Whang, L.M., Kao, C.H., Pan, P.T. & Cheng, S.S. (2011). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 (8), 1119-1127.
- [14] Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I. & Okuyama, H. (2007). Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 23 (12), 1739-1745.
- [15] Sathishkumar, M., Binupriya, A.R., Baik, S.H. & Yun, S.E. (2008). Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. *Clean-Soil Air Water*. 36 (1), 92-96.
- [16] Gao, Y.C., Wang, J.N., Guo, S.H., Hu, Y.L., Li, T.T., Mao, R. & Zeng, D.H. (2015). Effects of salinization and crude oil contamination on soil bacterial community structure in the Yellow River Delta region, China. *Applied Soil Ecology* 86, 165-173.
- [17] Loreau, M. (2001). Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. *Scienc*. 294 (5543), 804-808.
- [18] Qi, Y.Y. (2019). Study on removal method and mechanism of petroleum hydrocarbon residue in soil. Master thesis, Xi'an University of Architecture and Technology, Shanxi, China. (in Chinese)
- [19] Li, H., Ye, D., Wang, X., Matthew, L.S., Wang, J., Hao, Z.Q., Zhou, L.S., Dong, P., Jiang, Y. & Ma, Z.S. (2014). Soil bacterial communities of different natural forest types

- in Northeast China. *Plant and Soil*, 1-2 (383), 203-216.
- [20] Sengupta, A. & Dick, W.A. (2015). Bacterial Community Diversity in Soil Under two Tillage Practices as Determined by Pyrosequencing. *Microbial Ecology*. 70 (3), 853-859.
- [21] Cen, X.F. & Tang, B. (2008). Classification, Application and Research Progress of the Bioremediation Bacteria. *Journal of Anhui Agriculture Science* 36(30), 13352-13354, 13380. (in Chinese).
- [22] Liu, J., Song, X. & Sun, R.L. (2014). Petroleum pollution and the microbial community structure in the soil of Shengli Oilfield. *Chinese Journal of Applied Ecology*. 25 (03), 850-856. (in Chinese).
- [23] Khan, M.A.I., Biswas, B., Smith, E., Mahmud, S.A., Hasan, N.A., Khan, M.A.W., Naidu, R. & Megharaj, M. (2018). Microbial diversity changes with rhizosphere and hydrocarbons in contrasting soils. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 156, 434-442.
- 版权声明:** ©2025 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

**OPEN ACCESS**