

## 一种微生物复合菌剂及其制备方法和应用

### 技术领域

本发明属于有机污染土壤修复技术领域，具体涉及一种微生物复合菌剂及其制备方法和应用。

### 背景技术

在石油的开采、加工及运输过程中，难免会有石油烃类的溢出和排放。被溢出和排放的石油烃经过废气沉降、地表径流等方式进入土壤。积累到土壤中的高浓度烃，不仅会破坏土壤自身的结构，改变其理化性质，还可在农产品中积累，影响作物的产量和品质，并通过食物链进入人体，引发各种疾病，最终危害人体健康和生命安全。由于石油化工行业往往产生大量高盐度废水，因而石油污染土壤常伴有盐碱化的发生。因此，如何修复石油污染盐碱土壤，保障人类健康，成为当前国内外研究的热点。

在众多的石油污染修复方法中，微生物修复技术以其操作简单，处理费用低，环境影响小等优点受到世界各国的重视。目前，国内外已从石油污染土壤中分离筛选出了大量的石油降解菌株，但是石油组成成分复杂，靠单一的微生物菌株很难实现石油烃类污染物的完全降解，这也是目前相关研究一直停滞不前的原因。此外，这些石油降解菌株对烷烃类成分的生物降解效率往往高于芳烃类成分，使得芳烃尤其是高环多环芳烃相对比例增加，导致后期修复难度越来越大。

### 发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供一种微生物复合菌剂及其制备方法和应用，该复合菌剂用于石油烃类污染盐碱土壤的修复，可显著降低污染物的含量，且在电场强化过程中可提高石油烃类污染物的去除效率。本发明的技术方案为：

第一方面，本发明提供一种微生物复合菌剂，所述复合菌剂为海杆菌（*Marinobacter* sp.）HWP-1、海杆菌（*Marinobacter* sp.）HWP-2、芽孢杆菌（*Bacillus* sp.）HWP-3 和芽孢杆菌

## 说明书

(*Bacillus* sp.) HWP-4 复配, 所述海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、所述海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、所述芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和所述芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 均保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏登记号分别为 CCTCC NO: M 20211335, CCTCC NO: M 20211336, CCTCC NO: M 20211337 和 CCTCC NO: M 20211338。

进一步地, 所述微生物复合菌剂中, 海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 菌液的体积比为 (1.5~3): (1.5~3): (0.5~1): (0.5~1), 四株菌的活细胞浓度均为  $10^7 \sim 10^9$  CFU/mL。

第二方面, 本发明提供上述微生物复合菌剂的制备方法, 包括:

(1) 分别配制牛肉膏蛋白胨固体斜面培养基、牛肉膏蛋白胨液体培养基和无机盐培养基, 并控制这三种培养基的盐度为 5%、pH 为 8.6;

(2) 将海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 分别接种于牛肉膏蛋白胨固体斜面培养基, 于  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  条件下培养 48~72 h 进行活化;

(3) 将活化后的菌体, 接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 于  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、140 r/min 条件下振荡培养 48~72 h 得到种子液;

(4) 将种子液按照 5%~10% 的接种量接入无机盐培养基中, 于  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、140 r/min 条件下振荡培养 48~72 h 制得各菌株的菌液, 然后将各菌株菌液混合均匀。

进一步地, 所述牛肉膏蛋白胨固体斜面培养基按照终浓度的组成为: 牛肉膏 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 43.5 g/L,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  6.5 g/L, 琼脂 20 g/L。

进一步地, 所述牛肉膏蛋白胨液体培养基按照终浓度的组成为: 牛肉膏 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 43.5 g/L,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  6.5 g/L。

进一步地, 所述无机盐培养液按照终浓度的组成为:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L、葡萄糖 0.05 g/L、NaCl 43.5 g/L、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  6.5 g/L 和微量元素  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.012 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.003 g/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.003 g/L、 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 g/L、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001 g/L, 石油 50 g/L。

## 说明书

第三方面，本发明提供上述微生物复合菌剂在修复石油污染盐碱土壤或者多环芳烃污染土壤中的应用。

进一步地，所述应用的方法包括：将石油污染盐碱土壤或者多环芳烃污染土壤中添加微生物复合菌剂混匀，使土壤中微生物数量达到  $10^7\sim 10^9$ CFU/g，土壤盐分和 pH 值分别为 1~1.5%和 8.0~9.0，并控制土壤含水量为 12%~18%。

优选地，对混有微生物复合菌剂的石油污染盐碱土壤或者多环芳烃污染土壤施加 0.8~1.5V/cm 的直流电场，电极极性每 10~30min 切换一次，处理时间不少于 100 天。

与现有技术相比，本发明的有益效果为：

(1) 本发明的微生物复合菌剂所涉及的四株降解菌对石油中含有的总石油烃和高环多环芳烃均具有较高的降解能力，且对不同盐碱度具有广泛的适应性，可生长的盐度范围达 0~15% 或 0~20%，可生长的 pH 范围达 5~10 或 5~11，可用于不同盐碱度的石油烃类污染土壤的修复。

(2) 本发明的微生物复合菌剂在修复过程中可综合不同菌在降解石油烃不同组分过程中的协同性，解决修复过程中高环多环芳烃相对比例逐渐增加导致后期修复难度逐渐增大的问题，提高石油烃类污染物的降解效率。

总之，将本发明复合菌剂用于石油烃类污染盐碱土壤的修复，可显著降低总石油烃及其主要组分烷烃和芳烃的含量，且在电场强化作用下可提高石油烃类污染物的去除效率。

### 附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 为本发明实施例 1 中复合菌剂和单菌液对石油烃的降解率；

图 2 为本发明实施例 2 中复合菌剂和单菌液对多环芳烃的降解率；

图 3 为本发明实施例 3 中由 HWP-1、HWP-2、HWP-3 和 HWP-4 构成的复合菌剂及其在电场强化作用下修复石油污染盐碱土壤和芘污染盐碱土壤的过程中总石油烃和芘含量变化；

图 4 为本发明实施例 3 中复合菌剂及其在电场强化作用下修复石油污染盐碱土壤的过程中石

油烃不同组分含量变化；

图 5 为本发明实施例 3 中复合菌剂及其在电场强化作用下修复石油污染盐碱土壤的过程中微生物群落结构；

图 6 为本发明实施例 4 中由 HWP-1 和 HWP-3 构成的复合菌剂及其在电场强化作用下修复石油污染盐碱土壤的过程中总石油烃含量变化；

图 7 为本发明实施例 5 中由 HWP-2 和 HWP-4 构成的复合菌剂及其在电场强化作用下修复石油污染盐碱土壤的过程中总石油烃含量变化；

图 8 为本发明实施例 6 中由 HWP-1、HWP-2、HWP-3 和 HWP-4 构成的复合菌剂及其在电场强化作用下修复油田区石油污染土壤和化工园区多环芳烃污染土壤的过程中总石油烃浓度变化和多环芳烃降解率；

注：图 1、2、4 中不同字母表示不同处理间有显著性差异，相同字母则表示无显著性差异。

### 具体实施方式

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

在本发明的具体实施例中，海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 的获取过程具体如下：

#### 一、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1 的获取

##### (1) 菌株的富集、纯化

土壤样品为采自延长油田子北采油厂的石油污染土壤。以芘为唯一碳源，采用定时定量转接、逐步提高碳源浓度的方法对多环芳烃降解菌进行富集。具体为：称取 5 g 石油污染土壤，加入到 45 mL 无机盐培养液中，加入芘母液使芘的终浓度为 25 mg/L，30℃恒温摇床避光富集培养 5 d；取菌液 5 mL，加入到 45 mL 新鲜的无机盐培养液中，加入芘母液，使芘的终浓度为 50 mg/L，30℃恒温摇床避光富集培养 5 d。采用同样的方法，将芘的浓度依次提

## 说明书

高，直至 100 mg/L，并分别在 30 °C 恒温摇床避光富集培养 5 d。

将最后一次富集培养的菌液用无机盐培养液进行梯度稀释，取稀释液 100  $\mu$ L 涂布于无机盐固体培养基上，30 °C 培养至有肉眼可见的明显菌落，根据菌落外部形态，挑取其中生长旺盛的单菌落进一步于无机盐固体培养基平板中纯化，如此反复多次，直至分离出纯菌。再将该菌落接种于含苾的无机盐培养液中培养以验证其是否能以苾为唯一碳源生长。纯化后的菌种保存于牛肉膏蛋白胨培养基斜面中。

所述培养基盐度均为 5%，pH 均为 8.6，配制方法如下：

无机盐培养液：(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 g、葡萄糖 0.05 g、NaCl 43.5 g、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 6.5 g 和微量元素 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.012 g、MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003 g、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003 g、CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001 g，蒸馏水定容至 1 L，pH 为 8.6，121 °C 灭菌 20 min。

无机盐固体培养基：上述无机盐培养液中加入 2% 的琼脂，pH 8.6，121 °C 灭菌 20 min，制作培养基平板，待其凝固后取 0.5 mL 已过滤除菌的苾母液（5 g/L）涂于表面，待溶剂挥发后形成一层苾的固体膜。

牛肉膏蛋白胨培养基：牛肉膏 5 g，蛋白胨 10 g，NaCl 43.5 g，MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 6.5 g，蒸馏水定容至 1 L，pH 8.6，121 °C 灭菌 20 min。

所述苾母液的配制：以丙酮为溶剂，配制 5 g/L 的苾的丙酮溶液，并用已灭菌（121 °C，20 min）的 0.22  $\mu$ m 有机滤膜过滤除菌。

### （2）菌种的鉴定

① 发明菌株菌落特征为圆点状、透明、边缘不规则；细胞形态为长杆状、无芽孢。

② 对发明菌株进行生理生化鉴定，接触酶实验和淀粉水解实验均呈阳性，具有运动性，吲哚实验、NaNO<sub>3</sub> 还原反应、明胶水解实验、NaNO<sub>2</sub> 还原反应，脂酶反应及革兰氏染色均呈阴性。

③ 将发明菌株交由测序公司进行 16S rRNA 序列测定，将序列信息输入 NCBI（[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)）数据库进行 BLAST 分析，与海杆菌属（*Marinobacter* sp.）中的多个菌种基因序列相似性达 99% 以上。通过与基因库中典型模式菌株序列构建系统发育树，结合①中菌落和细胞形态特征以及②中生理生化特征，进一步确定发明菌株为 *Marinobacter* sp. 属。将该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏名称为 *Marinobacter* sp. HWP-1，保藏登记号为 CCTCC NO: M 20211335。

### 二、海杆菌（*Marinobacter* sp.）HWP-2 的获取

### (1) 菌株的富集、纯化

菌株的富集、纯化方法同海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1 的获取。

### (2) 菌种的鉴定

①发明菌株菌落特征为点状，透明，边缘整齐；细胞形态为短杆状，无芽孢。

②对发明菌株进行生理生化鉴定，接触酶实验、 $\text{NaNO}_3$  还原反应、明胶水解实验和  $\text{NaNO}_2$  还原反应均呈阳性，具有运动性，吲哚实验、淀粉水解实验、脂酶反应及革兰氏染色均呈阴性。

③将发明菌株交由测序公司进行 16S rRNA 序列测定，将序列信息输入 NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 数据库进行 BLAST 分析，与海杆菌属 (*Marinobacter* sp.) 中的多个菌种基因序列相似性达 99% 以上。通过与基因库中典型模式菌株序列构建系统发育树，结合①中菌落和细胞形态特征以及②中生理生化特征，进一步确定发明菌株为 *Marinobacter* sp. 属。将该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏名称为 *Marinobacter* sp. HWP-2，保藏登记号为 CCTCC NO: M 20211336。

## 三、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 的获取

### (1) 菌株的富集、纯化

菌株的富集、纯化方法同海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1 的获取

### (2) 菌种的鉴定

①发明菌株菌落特征为小点状，淡黄色，边缘光滑，中间突起；细胞形态为杆状、有芽孢。

②对发明菌株进行生理生化鉴定，接触酶实验、淀粉水解实验、 $\text{NaNO}_3$  还原反应、 $\text{NaNO}_2$  还原反应、明胶水解实验、革兰氏染色均呈阳性，具有运动性，吲哚实验和脂酶反应均呈阴性。

③将发明菌株交由测序公司进行 16S rRNA 序列测定，将序列信息输入 NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 数据库进行 BLAST 分析，与芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 中的多个菌种基因序列相似性达 99% 以上。通过与基因库中典型模式菌株序列构建系统发育树，结合①中菌落和细胞形态特征以及②中生理生化特征，进一步确定发明菌株为 *Bacillus* sp. 属。将该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏名称为 *Bacillus* sp. HWP-3，保藏登记号为 CCTCC NO: M 20211337。

## 四、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 的获取

## 说明书

---

### (1) 菌株的富集、纯化

菌株的富集、纯化方法同海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1 的获取

### (2) 菌种的鉴定

①发明菌株菌落特征为菌落形态不规则，边缘裂纹状，中间扁平，白色不透明；细胞形态为短杆状、有芽孢。

②对发明菌株进行生理生化鉴定，接触酶实验和  $\text{NaNO}_3$  还原反应呈阳性，不具有运动性，淀粉水解实验、吲哚实验、明胶水解实验、 $\text{NaNO}_2$  还原反应，脂酶反应及革兰氏染色均呈阴性。

③将发明菌株交由测序公司进行 16S rRNA 序列测定，将序列信息输入 NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 数据库进行 BLAST 分析，与海杆菌属 (*Bacillus* sp.) 中的多个菌种基因序列相似性达 99% 以上。通过与基因库中典型模式菌株序列构建系统发育树，结合①中菌落和细胞形态特征以及②中生理生化特征，进一步确定发明菌株为 *Bacillus* sp. 属。将该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏名称为 *Bacillus* sp. HWP-4，保藏登记号为 CCTCC NO: M 20211338。

## 实施例 1

复合菌剂和单菌液对石油烃的降解能力

单菌液和复合菌剂的制备方法：将海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 分别接种于盐度为 5%、pH 为 8.6 的牛肉膏蛋白胨固体斜面培养基上， $30\pm 1^\circ\text{C}$  条件下培养 48~72 h 进行活化。将活化后的菌体，接种于盐度为 5%、pH 为 8.6 的牛肉膏蛋白胨液体培养基中， $30\pm 1^\circ\text{C}$ ，140 r/min 振荡培养 48~72 h 得到种子液。将种子液按照 5%~10% 的接种量接入盐度为 5%、pH 为 8.6 的以石油为唯一碳源的无机盐培养基， $30\pm 1^\circ\text{C}$ ，140 r/min 振荡培养 48~72 h 制得各菌株的菌液。将海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 菌液按体积比 3: 3: 1: 1 进行混合得到复合菌剂。

将上述复合菌剂及各单菌液分别按照体积比 3% 的接种量分别接入 100 mL 石油含量为 5%、pH 为 8.6 的无机盐培养基中， $30\pm 1^\circ\text{C}$ ，140 r/min 条件下处理 7 天。每处理设三个重复，

## 说明书

以未投加菌液为对照。处理结束后，萃取培养液中残留石油，计算石油去除率，对比混合菌液与单菌液总石油烃降解能力。

试验结果见图 1。经过 7 天处理后，四种单菌液对石油的降解率为 62.9%~73.5%，复合菌剂对石油的降解率为 89.5%，比单菌液最高降解率提高了 16.0%，未投加菌液的反应体系中，石油降解率仅为 9.2%（对照）。结果表明，在摇瓶培养体系中，四种单菌液对石油烃有良好的降解能力，而复合菌剂比单一降解菌液具有更高的石油降解能力。

### 实施例 2

复合菌剂和单菌液对多环芳烃的降解能力

各单菌液和复合菌剂的制备方法同实施例 1。

将上述复合菌剂及各单菌液分别按照体积比 3%的接种量分别接入 100 mL 含有 50 mg/L 芘和 5 mg/L 苯并[a]芘的无机盐培养基中， $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，140 r/min 避光振荡培养 7 天。每处理设三个重复，以未投加菌液为对照。处理结束后，分别测定芘和苯并[a]芘的含量，计算降解率，对比混合菌剂和单菌液对高环多环芳烃的降解能力。

从图 2 可以看出，经过 7 天处理后，四种单菌液对芘的降解率为 46.9%~51.0%，复合菌剂对芘的降解率为 68.1%，比单菌液最高降解率提高了 17.0%，未投加菌液的反应体系中，芘降解率仅为 9.7%（对照）。四种单菌液对苯并[a]芘的降解率为 34.5%~45.4%，复合菌剂对苯并[a]芘的降解率为 58.6%，比单菌液最高降解率提高了 13.1%，未投加菌液的反应体系中，苯并[a]芘降解率仅为 4.5%。结果表明，在摇瓶培养体系中，四种单菌液对芘和苯并[a]芘均有良好的降解能力，而复合菌剂比单一降解菌液具有更高的多环芳烃能力。

### 实施例 3

海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 复合菌剂在石油污染盐碱土壤和高环多环芳烃污染盐碱土壤修复中的应用

复合菌剂的制备同实施例 1。

试验土壤：本实施例分别采用自配石油污染土壤和芘污染土壤。所用土壤为砂质壤土，石油采自延长油田，芘（纯度>99%）购自上海麦克林生化科技有限公司。将土壤风干后过 2 mm 筛，分别配制成含油量为 45~50 g/kg 的石油污染土壤和 250~300 g/kg 的芘污染土壤，室



温下避光平衡至少两周。

复合菌剂修复：将复合菌液分别加入石油污染土壤和芘污染土壤中，使微生物数量达到  $10^7 \sim 10^9$  CFU/g，土壤盐分 1.0%~1.5%、pH 值 8~9，土壤含水率 16%~18%。将配制好的污染土壤装入 PVC 土壤箱（18 cm×10 cm×8 cm）中。

电场-复合菌剂修复：将复合菌液分别加入石油污染土壤和芘污染土壤中，使微生物数量达到  $10^7 \sim 10^9$  CFU/g，土壤盐分 1.0%~1.5%、pH 值 8~9，土壤含水率 16%~18%。将配制好的污染土壤装入 PVC 土壤箱（18 cm×10 cm×8 cm）中，将土壤压实，将两对石墨电极（15 × 1 cm）插入土壤中，间距 15 cm，施加 1.0~1.5 V/cm 的直流电场，每 10 min 切换一次电极极性。

对照处理的石油污染土壤和芘污染土壤既不添加复合菌剂也不施加电场，但添加相同量的无机盐培养液，使土壤盐分达到 1.0%~1.5%、pH 值 8~9，土壤含水率 16%~18%。

试验过程中定期向土壤中加入水，使土壤含水率保持在 16%~18%。每 10 天采样一次，分别监测总石油烃及其不同组分含量变化和芘含量变化，试验共进行 100 天，同时，采用高通量测序技术监测 100 天后复合菌剂修复和电场-复合菌剂修复石油污染土壤中微生物群落结构。

石油污染土壤中总石油烃含量变化见图 3a。复合菌剂处理后 100 天后，总石油烃含量明显降低，由初始的 45.3 g/kg 降至 25.4 g/kg，降解率为 44.0%。在电场-复合菌剂修复中，100 天后总石油烃含量由初始的 45.3 g/kg 降至 16.9 g/kg，降解率达 62.6%。相较而言，对照中总石油烃降解率仅为 10.1%，说明本发明复合菌剂对石油污染盐碱土壤有显著的修复效果，而电场的施加可促进复合菌剂的修复效能。

芘污染土壤中芘含量变化见图 3b。复合菌剂处理后 100 天后，芘含量由初始的 290.1 mg/kg 降至 111.0 mg/kg，降解率为 61.8%。在电场-复合菌剂修复中，100 天后芘含量由初始的 290.1 mg/kg 降至 70.9 mg/kg，降解率达 75.6%。对照中芘降解率仅为 11.1%，说明本发明复合菌剂对高环多环芳烃污染盐碱土壤有明显的修复效果，而电场的施加可促进复合菌剂的修复效能。

石油污染土壤中石油不同组分含量变化见图 4，复合菌剂处理后烷烃和芳烃含量均有明显的降低，降解率分别为 54.6%和 43.6%，在电场-复合菌剂修复中，烷烃和芳烃降解率分别为 71.4%和 59.8%，而对照中烷烃和芳烃降解率分别仅为 13.2%和 7.8%。说明本发明复合菌剂对石油不同组分均有良好的降解能力，而在电场的作用下该降解能力可以得到显著提升。

由图 5 可知，不管是在复合菌剂修复还是电动-复合菌剂修复过程中，相较于其它菌属，海杆菌属（*Marinobacter*）和芽孢杆菌属（*Bacillus*）均为优势菌属。其中，复合菌剂修复中，

## 说明书

海杆菌属 (*Marinobacter*) 丰度为 28.3%，芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的丰度为 17.4%；电动-复合菌剂修复中，海杆菌属 (*Marinobacter*) 丰度达 30.4%，芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的丰度为 10.6%。表明由海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 组成的复合菌剂在石油烃污染盐碱土壤修复过程中可保持为优势菌属，且在电场环境中也可保持为优势菌属，具有良好的应用前景。

### 实施例 4

海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 复合菌剂在石油污染盐碱土壤修复中的应用

单菌液和复合菌剂的制备方法：将海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 分别接种于盐度为 5%、pH 为 8.6 的牛肉膏蛋白胨固体斜面培养基上，30±1℃ 条件下培养 48~72 h 进行活化。将活化后的菌体，接种于盐度为 5%、pH 为 8.6 的牛肉膏蛋白胨液体培养基中，30±1℃，140 r/min 振荡培养 48~72 h 得到种子液。将种子液按照 5%~10% 的接种量接入盐度为 5%、pH 为 8.6 的以石油为唯一碳源的无机盐培养基，30±1℃，140 r/min 振荡培养 48~72 h 制得各菌株的菌液。将海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 菌液按体积比 3:1 进行混合得到复合菌剂。

试验土壤的配制同实施例 3。

复合菌剂修复、电场-复合菌剂修复和对照处理过程同实施例 3。

试验过程中定期向土壤中加入水，使土壤含水率保持在 16%~18%。每 10 天采样一次，监测总石油烃含量变化，试验共进行 100 天。

总石油烃含量变化见图 6。由海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 构成的复合菌剂处理后 100 天后，总石油烃含量由初始的 45.3 g/kg 降至 27.1 g/kg，降解率为 40.2%。在电场-复合菌剂修复中，100 天后总石油烃含量由初始的 45.3 g/kg 降至 19.3 g/kg，降解率为 57.4%。相较于对照中的 10.1% 而言，由海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 构成的复合菌剂对石油污染盐碱土壤有显著的修复效果，电场的施加可促进该复合菌剂的修复效能，但其修复效果低于由海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 构成的复合菌剂的修复效果。

### 实施例 5

## 说明书

海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 复合菌剂在石油污染盐碱土壤修复中的应用

单菌液和复合菌剂的制备方法：将海杆菌(*Marinobacter* sp.)HWP-2 和芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) HWP-4 分别接种于盐度为 5%、pH 为 8.6 的牛肉膏蛋白胨固体斜面培养基上，30±1℃条件下培养 48~72 h 进行活化。将活化后的菌体，接种于盐度为 5%、pH 为 8.6 的牛肉膏蛋白胨液体培养基中，30±1℃，140 r/min 振荡培养 48~72 h 得到种子液。将种子液按照 5%~10%的接种量接入盐度为 5%、pH 为 8.6 的以石油为唯一碳源的无机盐培养基，30±1℃，140 r/min 振荡培养 48~72 h 制得各菌株的菌液。将海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 菌液按体积比 3: 1 进行混合得到复合菌剂。

试验土壤的配制同实施例 3。

复合菌剂修复、电场-复合菌剂修复和对照处理过程同实施例 3。

试验过程中定期向土壤中加入水，使土壤含水率保持在 16%~18%。每 10 天采样一次，监测总石油烃含量变化，试验共进行 100 天。

总石油烃含量变化见图 7。由海杆菌 (*Marinobacter* sp.)HWP-2 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 构成的复合菌剂处理后 100 天后，总石油烃含量由初始的 45.3 g/kg 降至 28.0 g/kg，降解率为 38.1%。在电场-复合菌剂修复中，100 天后总石油烃含量由初始的 45.3 g/kg 降至 20.5 g/kg，降解率为 54.7%。相较于对照中的 10.1%而言，由海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 构成的复合菌剂对石油污染盐碱土壤有显著的修复效果，电场的施加可促进该复合菌剂的修复效能，但其修复效果低于由海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 构成的复合菌剂的修复效果。

### 实施例 6

海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 复合菌剂在油田区石油污染土壤和工业园区多环芳烃污染土壤修复中的应用。

单菌液和复合菌剂的制备方法同实施例 1。

试验土壤：采自延长油田的石油污染土壤和宁东工业园区某化工厂附近的多环芳烃污染土壤。其中，油田区土壤中石油烃浓度达 3.5%(w/w)，pH 为 8.5，土壤盐分 0.15%；工业园

区土壤多环芳烃总含量约 2850  $\mu\text{g/kg}$ ，包含 12 种多环芳烃，环数为 2~6。将土壤自然风干后过 2 mm 筛备用。

复合菌剂修复、电场-复合菌剂修复和对照处理过程同实施例 3。

试验过程中定期向土壤中加入水，使土壤含水率保持在 16%~18%。每 10 天测定一次油田区土壤中的总石油烃含量，试验共进行 100 天，100 天后测定工业园区土壤中不同环数多环芳烃含量。

石油污染土壤中总石油烃含量变化见图 8a。海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 复合菌剂对油田区石油污染土壤表现出了良好的修复效果，100 天后，总石油烃浓度由初始的 3.5% 降至 2.1%，降解率为 40.4%。在电场-复合菌剂修复中，100 天后总石油烃浓度由初始的 3.5% 降至 1.5%，降解率为 57.3%。对照中总石油烃降解率仅为 9.8%，说明本发明复合菌剂对油田区石油污染盐碱土壤有良好的修复效果，而电场的施加可促进复合菌剂的修复效能。

多环芳烃污染土壤中多环芳烃降解率见图 8b。海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-1、海杆菌 (*Marinobacter* sp.) HWP-2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-3 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) HWP-4 复合菌剂对工业园区不同环数多环芳烃表现出良好的修复效果，100 天后，萘的降解率为 84.3%，3 环的二氢萘、萘和菲降解率为 63.2%-94.9%，4 环的荧蒽、芘和苯并[a]蒽降解率为 60.3%-73.3%，5 环的苯并[b]荧蒽、苯并[a]芘和二苯并[a,h]蒽降解率为 30.8%-41.6%，6 环的茚并[1,2,3-cd]芘和苯并[ghi]花降解率为 19.9%-23.5%。在电场-复合菌剂修复中，萘的降解率达 96.9%，3 环的二氢萘、萘和菲降解率达 81.3%-99.5%，4 环的荧蒽、芘和苯并[a]蒽降解率达 75.8%-81.4%，5 环的苯并[b]荧蒽、苯并[a]芘和二苯并[a,h]蒽降解率达 43.7%-56.8%，6 环的茚并[1,2,3-cd]芘和苯并[ghi]花降解率达 31.8%-32.2%。

综上，本发明复合菌剂可用于石油烃类污染盐碱土壤，能够显著降低总石油烃及其主要组分烷烃和芳烃的含量，同时，本发明复合菌剂也可用于多环芳烃污染土壤的修复，对 2~6 环多环芳烃具有不同程度的降解能力，且在电场强化作用下可提高污染物的去除效率。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明的保护范围应以所附权利要求为准。