

多环芳烃长期污染土壤的微生物强化修复初步研究^①

邹德勋^{1,2,3}, 骆永明^{1,2*}, 滕 应^{1,2}, 平立凤^{1,2}, 刘五星^{1,2}, 李振高^{1,2}

(1 中国科学院南京土壤研究所土壤与环境生物修复研究中心, 南京 210008; 2 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 (中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 3 东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 本研究通过室内模拟试验, 以急性毒性较强的菲 (Phe) 和遗传毒性较强的苯并[a]芘 (B[a]P) 为代表性多环芳烃 (PAHs) 污染物, 以不同 C 源、通气状况和水分条件为调控因子, 对 PAHs 长期污染土壤的土著微生物强化修复进行初步研究。结果表明, 搅动处理使污染土壤中 Phe 和 B[a]P 的降解率分别达 59.44% 和 26.14%, 而淹水处理使两者降解率分别达 46.48% 和 13.27%。添加 C 源 (淀粉和葡萄糖) 处理提高了土壤中 PAHs 的降解率, 且随着 C 源的施用量而增加。同时也发现污染土壤中 PAHs 降解菌和微生物总量呈正相关, 并随着 PAHs 降解菌数量的增加, 土壤中 PAHs 降解率也随之提高。可见, 土壤中 PAHs 降解速率主要决定于 PAHs 的降解菌数量。

关键词: 多环芳烃; 污染土壤; 微生物降解; PAHs 降解菌

中图分类号: S154.36

近年来, 土壤修复作为一门新兴的土壤科学分支学科, 已成为环境科学领域研究的热点之一, 其中持久性有机污染物污染土壤修复是研究的重点^[1]。多环芳烃 (PAHs) 是一类持久性有机污染物, 具有较高致癌、致畸、致突变性, 对生态环境安全和人类健康造成较大的威胁^[2], 因此大多数国家都已将其列为优先控制污染物。环境中 PAHs 绝大多数积累于土壤中^[3], 在适宜的情况下它们可能迁移到其他环境介质中, 扩大污染范围并改变暴露途径, 同时也可以通过生物链传递作用将其积累于人体内, 所以修复 PAHs 污染, 尤其是长期污染土壤显得十分重要和迫切。

PAHs 在环境中可通过多种途径得以降解或消除, 包括挥发、光氧化、化学氧化、生物富集、土壤吸附及微生物降解等, 其中微生物在环境中 PAHs 的迁移、转化及降解过程中占有重要的地位^[4]。土著微生物对污染物降解潜力巨大, 同时具有成本低、环境友好等优点, 因此充分利用土著微生物强化修复 PAHs 污染土壤成为土壤修复的重要途径之一。本研究通过室内模拟试验, 以 PAHs 长期

污染土壤为研究材料, 急性毒性较强的菲 (Phe) 和遗传毒性较强的苯并 [a] 芘(B[a]P) 为代表性 PAHs 污染物, 以不同 C 源、通气状况和水分条件为调控因子, 对 PAHs 长期污染土壤的土著微生物强化修复进行初步研究, 以探讨加速农田土壤中 PAHs 降解的最适条件以及与土壤微生物生态的关系, 旨在为 PAHs 污染土壤的生物修复提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土壤 采自长江三角洲地区某持久性有机污染物污染高风险区, 土壤系统分类为漂白铁渗水耕人为土, 多点采集表层土壤 (0~15 cm), 检出植物根系、石砾等残留物, 自然阴干至土壤水分 20% 左右, 过 2 mm 不锈钢筛, 充分混匀, 以供培养试验用。同时测定土壤基本理化性质, 供试土壤的 pH (H₂O) 6.4, 总有机 C 19.2 g/kg, 全 N 1.24 g/kg, 全 P 0.49 g/kg, 全 K 23.62 g/kg, 阳离子交换量 (CEC) 21.73 cmol/kg。供试土壤中多环芳烃菲 (Phe) 和苯并[a]芘 (B[a]P) 的含量分别为 72.8

①基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (40432005)、国家高技术研究发展计划 (2004AA649210)、国家重点基础研究发展规划项目 (2002CB410809/10) 和中国科学院知识创新项目 (CXTD-Z2005-4) 资助。

* 通讯作者 (ymluo@issas.ac.cn)

作者简介: 邹德勋 (1980—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 主要从事污染土壤微生物修复方面研究。E-mail: zoudexun@yahoo.com.cn

$\mu\text{g/kg}$ 和 $77.9 \mu\text{g/kg}$ 。

1.1.2 化学品 菲 (Phenanthrene)、苯并[a]芘 (Benzo[a] pyrene)、蒽 (Anthracene)、茚 (Fluorene)、二苯并噻吩 (Dibenzothiophene)、二氯甲烷、正己烷、环己烷均为 HPLC 级；其他试剂为分析纯。

1.2 试验设计与实施

表1 试验处理及编号

Table 1 Design of the experiment

编号	ST(0.2)	ST(5)	GL(0.2)	GL(5)	YS	JG	CK
处理	淀粉 (0.2 g/kg)	淀粉 (5 g/kg)	葡萄糖 (0.2 g/kg)	葡萄糖 (5 g/kg)	淹水	搅动	对照

试验采用底部有孔的瓷盆，每盆装土 667 g (相当于 500 g 干土)，用锡箔纸遮住盆口，置于控温、控湿培养室中 (湿度 65%、温度 25°C)，避光培养 90 天，培养期间采用称重法控制土壤水分状况。分别于第 10 天、第 30 天、第 60 天、第 90 天各采集土壤样品 1 次。每盆用小型不锈钢土钻随机采取 8 点，组成混合土样。将所采集的土壤样品分成两份，一份土样于 4°C 保存，以供微生物生态分析用，另一份土样风干，过 1 mm 不锈钢筛，供 PAHs 含量分析用。

1.3 试验方法

1.3.1 PAHs 的提取与测定 土壤中 PAHs 采用二氯甲烷超声法提取，HPLC 测定，具体见参考文献[5-6]。

1.3.2 细菌、真菌、放线菌数量的测定 采用常规平板涂布计数法，微生物总数为细菌、真菌、放线菌 3 者数量之和。

1.3.3 PAHs 降解菌数量的测定 采用改进的 PAHs 降解菌计数板法 (MPN 法)^[7]。

2 结果与讨论

2.1 土壤中 Phe 和 B[a]P 含量的动态变化

分析结果表明，各处理条件下土壤中 Phe 和 B[a]P 含量均随着培养时间的增加而逐渐降低 (图 1、图 2)。B[a]P 由 5 个苯环稠合而成，Phe 为 3 个苯环，前者的毒性、稳定性等均要强于后者，可见这与 Phe 的生物可利用性要大于 B[a]P 有关。然而经方差分析表明各处理间无显著差异 ($p < 0.05$)。从图 3 可以看出，在各处理条件下，其中搅动处理 (JG) 下 Phe 和 B[a]P 降解率较高，分别为 59.44% 和 26.14%；而淹水处理下土壤中 Phe 和 B[a]P 的降

试验处理：① 2 种 C 源 (淀粉、葡萄糖)，2 个水平 (0.2 g/kg 、 5 g/kg)，以固态混入土壤；② 搅动：每隔 3 天搅动 1 次；③ 淹水：保持 1 cm 的水层；④ 对照 (CK)，未采取措施。除淹水处理外，其他处理的土壤含水量为田间持水量的 60%。试验共 7 个处理，每个处理 3 次重复 (表 1)。

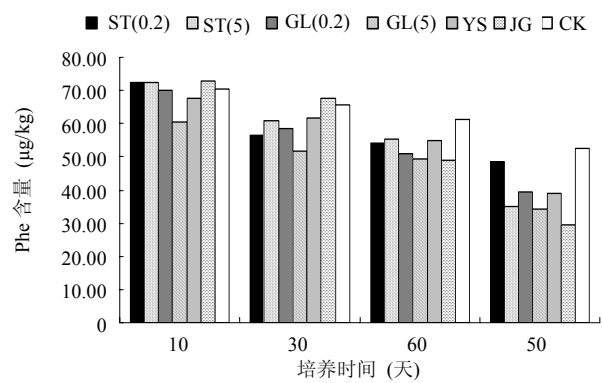


图1 各处理条件下土壤中 Phe 含量的动态变化

Fig. 1 The changes of Phe contents in the soil

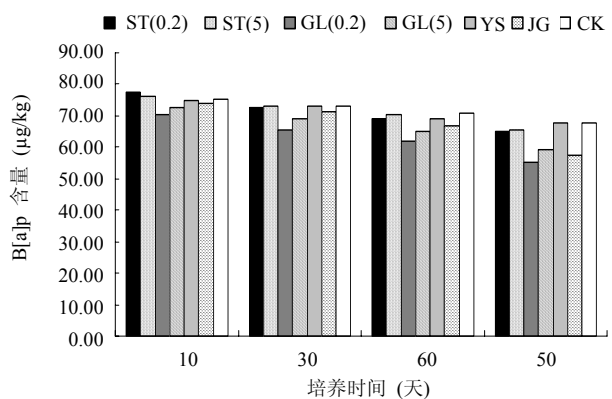


图2 各处理条件下土壤中 B[a]P 含量的动态变化

Fig. 2 The changes of B[a]P contents in the soil

解率较低，分别为 46.48% 和 13.27%。添加葡萄糖处理 GL (0.2 g/kg) B[a]P 的降解率最高，为 29.21%，较 CK 提高 16.15%。可见添加 C 源均在一定程度上提高 PAHs 的降解率，但其降解程度与 C 源种类及用量有关。

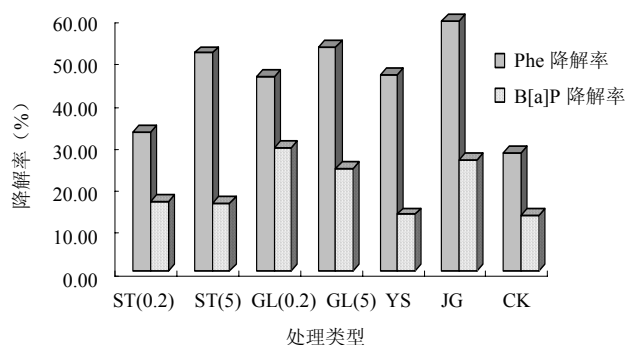


图 3 各处理条件下土壤中 Phe 和 B[a]P 的降解率

Fig. 3 Degradation rate of Phe and B[a]P in soil tested

2.2 土壤微生物总数和多环芳烃降解菌数的动态变化

通过图 4、5 可以看出：不同处理微生物总数和 PAHs 降解菌数有较大差异，总体特征是搅动条件下微生物数量最多；添加 C 源处理次之，不同 C 源种类及水平之间无明显规律性；淹水处理微生物数量最少，由于该分析微生物数量的方法是建立在常规培养条件下，因此此数值并不能体现出淹水条件下厌氧微生物数量。同时，同一处理的不同时期微生物量也不相同，且随着时间的推移而发生动态的变化。从图 6 可看出，污染土壤 PAHs 降解菌数和微生物总数呈正相关关系，这一结果表明土壤中 PAHs 降解菌数量变化在一定程度上可以指示微生物总数的变化。

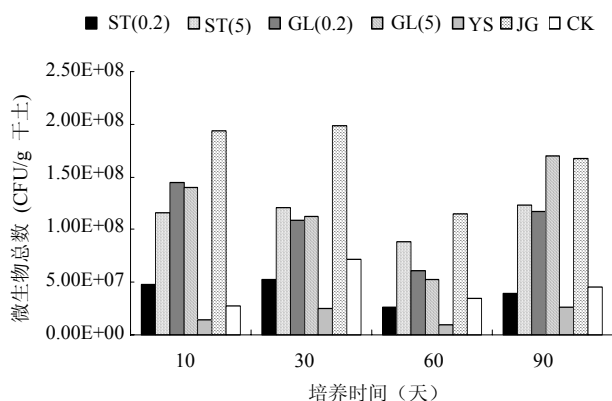


图 4 各处理条件下土壤中微生物总数的动态变化

Fig. 4 The dynamic changes of soil total microbial numbers under different conditions

2.3 土壤微生物数量变化与 PAHs 降解的关系

环境中 PAHs 的含量和 PAHs 降解菌存在一定相关性^[8]。土壤中 PAHs 消减的主要途径是微生物的降解作用。因此通过测定土壤中 PAHs 降解菌的

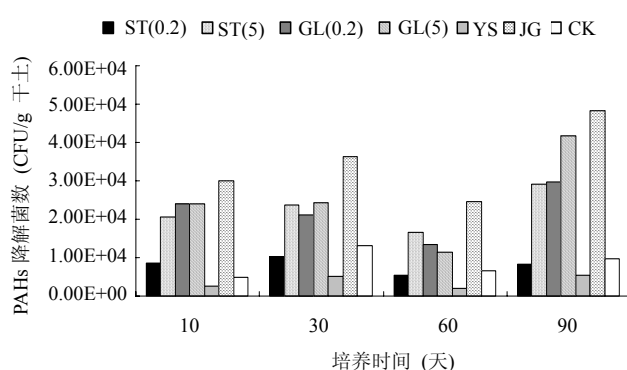


图 5 各处理条件下土壤中 PAHs 降解菌数的动态变化

Fig. 5 The dynamic changes of soil PAHs-degrading microorganisms under different conditions

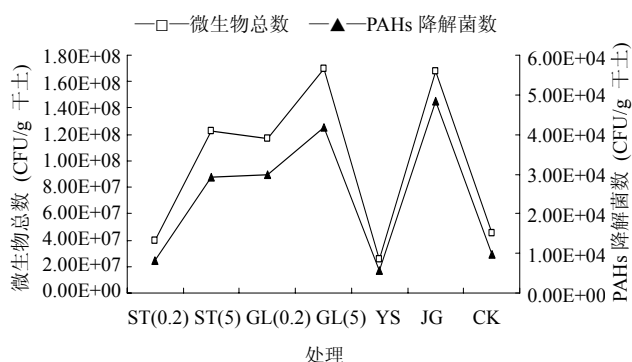


图 6 各处理条件下土壤微生物总数与 PAHs 降解菌数的关系

Fig. 6 Relationship between total microbial numbers and PAHs-degrading microorganisms under different conditions

数量可以间接评估该土壤中 PAHs 的降解情况。通过图 7 可以看出，在培养试验结束时土壤中 PAHs 降解菌数量较高的处理中，PAHs 的含量较低，说明 PAHs 降解菌数量的增加，有利于土壤中 PAHs 的降解。

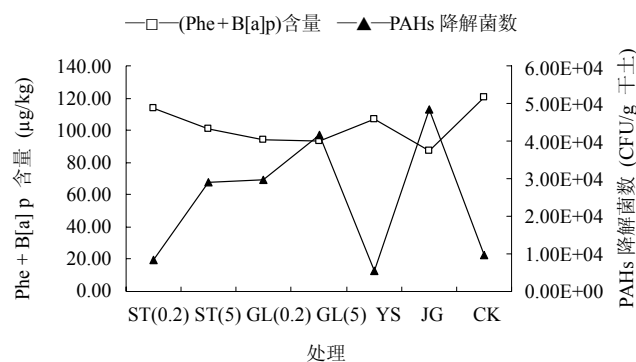


图 7 各处理条件下 PAHs 含量与 PAHs 降解菌数的关系

Fig. 7 Relationship between PAHs concentration and PAHs-degrading microorganisms under different conditions

从文献资料看,大多数研究仅仅考虑土壤中 PAHs 含量与 PAHs 降解菌数量之间的关系,而很少研究其与微生物群落组成之间的关系^[9-10]。同时还发现,除 PAHs 降解菌数量可以反映 PAHs 降解情况外,土壤中微生物群落的组成也影响 PAHs 的降解。PAHs 降解菌数/微生物总数与 PAHs 含量呈负相关(图 8),即当 PAHs 降解菌数/微生物总数的数值较高时,PAHs 降解程度较大,反之亦然。此外,在同一处理条件下不同取样时期也发现了上述的规律。

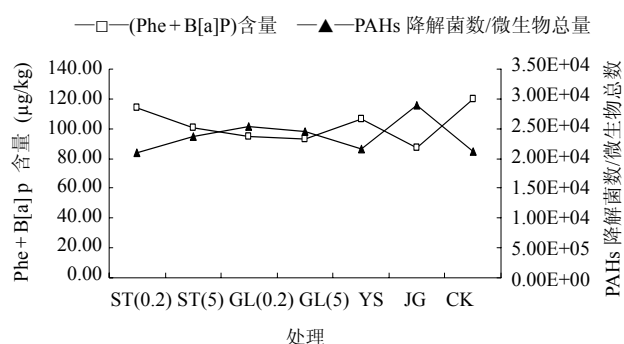


图 8 各处理条件下 PAHs 含量与 PAHs 降解菌数/微生物总数的关系

Fig. 8 Relationship between PAHs concentration and PAHs-degrading microorganisms / total microbial numbers under different conditions

3 结语

(1) 搅动处理改善了土壤通气状况,促进好氧性 PAHs 降解菌的生长,PAHs 的降解效果最佳,Phe 和 B[a]P 的降解率分别为 59.44% 和 26.14%;淹水处理微生物数量较少,PAHs 降解率较低,Phe 和 B[a]P 的降解率分别为 46.48% 和 13.27%。添加 C 源处理均改善了土壤微生物的营养条件,促进其生长繁殖,因此有助于提高 PAHs 的降解率。不同 C 源及其不同水平的促进作用也不一样,对 B[a]P 的降解而言,添加葡萄糖 0.2 g/kg 时效果好。

(2) 在 PAHs 长期污染土壤中 PAHs 降解菌和微生物总量呈正相关关系,并随着 PAHs 降解菌数量的增加,土壤中 PAHs 降解率也随之提高。

参考文献:

- [1] 骆永明,滕应,过园. 土壤修复—新兴的土壤科学分支学科. 土壤, 2005, 37 (3): 230-235
- [2] Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, 206 (1):73-93
- [3] Wild SR, Jones KC. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. Environ. Pollut., 1995, 88 (1): 91-108
- [4] Cerniglia CE. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Current Opinion in Biotechnology, 1993, 4 (3): 331-338
- [5] 丁克强, 骆永明, 刘世亮. 利用改进的生物反应器研究不同通气条件下土壤中菲的降解. 土壤学报, 2004, 41 (2): 245-251
- [6] 刘世亮, 骆永明, 丁克强. 苯并[a]芘污染土壤的丛枝菌根真菌强化植物修复作用研究. 土壤学报, 2004, 41 (3): 336-342
- [7] Wrenn BA, Venosa AD. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. Can. J. Microbiol., 1996, 42 (3): 252-258
- [8] 谷体华, 袁建军, 郑天凌. 泉州湾表层沉积物对多环芳烃潜在降解活性的研究. 厦门大学学报 (自然科学版), 2005, 44 (B06): 102-106
- [9] Bogardt AH, Hemmingsen BB. Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. Appl. Environ. Microbiol., 1992, 58 (8): 2579-2582
- [10] 田蕴, 郑天凌, 王新红. 厦门西海域表层水中 PAHs 污染与 PAHs 降解菌分布的关系. 热带海洋学报, 2003, 22 (6): 15-21

Enhanced Microbial Remediation of Long-term Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Polluted Soils

ZOU De-xun^{1,2,3}, LUO Yong-ming^{1,2,3}, TENG Ying^{1,2}, PING Li-feng^{1,2}, LIU Wu-xing^{1,2}, LI Zhen-gao^{1,2}

(1 Soil and Environmental Bioremediation Research Centre, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2

State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China;

3 College of resources and environmental Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: An incubation experiment was carried out with farmland soils long-term polluted by PAHs under different carbon sources, aeration condition, and soil moisture contents. The results showed that aeration treatment enhanced degradation rates of Phe and B[a]P in soils to 59.44% and 26.14%, while submerging treatment enhanced them to 46.48% and 13.27%, respectively. Glucose and starch carbon sources were beneficial to the growth of soil microorganisms, thus accelerated the degradation of PAHs in polluted soils. Soil PAHs degradation rate was not only correlated with carbon sources, but also closely correlated with their application contents. The results also indicated soil PAHs-degrading microorganisms were positively correlated with total microorganism numbers in long-term PAHs polluted soils.

Key word: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Polluted soils, Microbial degradation, PAHs-degrading bacteria