

多环芳烃菲对淹水土壤微生物 动态变化的影响

丁克强 骆永明 刘世亮 李振高

(中国科学院南京土壤研究所 南京 210008)

摘 要 本文研究了多环芳烃菲对土壤微生物的动态影响。通过利用生物反应器,观察了淹水条件下太湖流域微碱性粘质乌栅水稻土和红壤地区酸性砂质旱地红砂土中,在加与不加菲后土壤微生物数量的动态变化。试验结果表明,菲对2种土壤中细菌有刺激作用,在旱地红砂土中细菌增加了一个数量级,达 1.63×10^7 cfu/g(干土计)。在一定时间范围内,菲对真菌和放线菌有明显的抑制作用。菲对这2种土壤中微生物数量的影响与土壤性质、反应时间和微生物种类有关。这些观察结果为多环芳烃菲污染土壤的微生物学影响评价和潜在有效降解菌的筛选提供了有用的信息。

关键词 生物反应器;多环芳烃;生物降解;淹水土壤

多环芳烃(PAHs)是指2个或2个以上的芳香环稠合在一起的一类化合物,具有致癌性和致诱变性^[1]。由于多环芳烃类化合物水溶性差,再加上其稳定的环状结构,使其难以生物降解^[2],易在土壤环境中累积。一般认为,多环芳烃主要是由石油、煤炭、木材、气体燃料、纸张等含碳氢化合物的不完全燃烧以及在还原状态中热分解而产生的。环境中PAHs的自然源包括:火山爆发、森林植被和灌木丛的燃烧以及细菌对动物、植物的生化作用等。但是,人为活动特别是化石燃料的燃烧是环境中PAHs的主要来源^[3,4]。由于PAHs为脂溶性,可以通过大气沉降作用经植物叶片进入植物体内或进入土壤中由植物根吸收,并在植物体内迁移、代谢和积累,进而通过食物链危及健康^[5]。

许多研究表明,生物降解是去除土壤中PAHs的主要机制。利用微生物的作用来降解有机毒害污染物是一个新的方向,它具有速度快、效率高、成本低等优点^[5]。生物降解包括通过受污染的土壤中存在的微生物有效利用污染物和将微生物投放到一个新的环境中来降解一些相应的污染物。一些科学家分离出能降解PAHs的纯菌种和混合菌,如从杂酚油污染土壤中分离的以菲为唯一碳源和能源的假单胞菌属细菌(*Pseudomonas stutzeri* P-16和*P. accharophila* P-15)^[6]。Robert等^[7]在生物反应器中使用白腐真菌(*Phanerochaete chrysosporium*)处理受PAHs污染的土壤,在36天后,低分子的PAHs的降解率达70~100%,高分子PAHs的降解率为50~60%;巩宗强等^[8]利用从污染土壤中分离出的真菌在纯培养下进行降解研究,观察到在34天后镰刀菌对芘和苯并蒽的降解率为90%和33.3%,毛霉的降解率为81.5%和49.2%,青霉的降解率为52.2%和46%。目前,对人为添加PAHs是否对土壤中特别在淹水条件下微生物产生影响未见报道。

本试验采用生物反应器培育污染土壤,通过平板计数法动态测定土壤菌落总量来指示多环芳烃菲对淹水土壤中微生物的影响,为PAHs污染水田土壤的评价与生物修复提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试土壤

供试土壤采自江苏常熟中国科学院常熟农业生态实验站和江西鹰潭中国科学院红壤生态实验站,前者为河湖相沉积物发育的潜育水耕土(俗称乌栅水稻土),后者为旱地红砂土,均为表土(0~20 cm),风干后过 2 mm 尼龙筛备用。其理化性质见表 1。

表 1 供试土壤的基本性质

土壤类型	pH (H ₂ O)	有机质 (g/kg)	全 N (g/kg)	全 P (g/kg)	阳离子交换量 (cmol/kg)
乌栅水稻土	7.8	36.3	2.25	0.75	21.59
旱地红砂土	5.5	8.4	0.71	0.72	2.19

*旱地红砂土的基本性质引自文献^[11]

1.2 供试多环芳烃

菲(phenanthrene)纯度>97%,为德国 Fluka 公司产品。

1.3 试验设计与实施

生物反应器^[12]:如图 1 所示,选用 PVC 材料制作,底的直径 20cm,高 11cm。配有 pH 电极,氧化还原电极,温度计。

实验操作:分别称取 400 g 过 2 mm 筛的风干土,加入 200 ml 含菲丙酮溶液,使土壤中菲的浓度为 100 mg/kg(参照荷兰 PAHs 污染土壤治理的最低标准^[13])。设空白对照。共有 4 个处理:对照水稻土,加菲水稻土,对照红壤,加菲红壤。重复 4 次。加入菲溶液后,自然风干 24h,混匀,装入反应器中。加蒸馏水,使

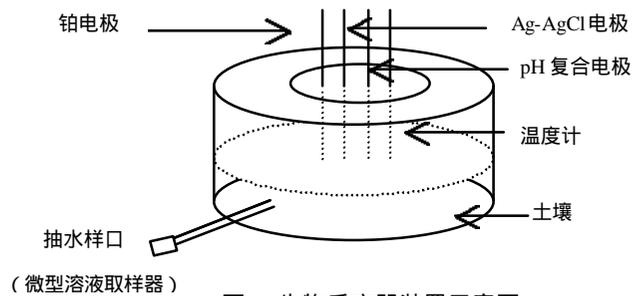


图 1 生物反应器装置示意图

土面上水层达 1cm,作为淹水(厌氧条件)处理。插入电极和温度计,在人工培养箱中 27℃ 下培养 6 周。定期加水维持水面,并测定生物反应器内的土壤微生物数量、pH 值、Eh 值和温度的变化。本文仅报道土壤微生物的动态变化。

微生物分离方法和培养基^[14]:细菌:牛肉膏蛋白胨琼脂平板表面涂布法;真菌:马丁氏培养基平板表面涂布法;放线菌:改良高氏一号合成培养基平板表面涂布法。

文中所列结果为 4 次重复的平均值,数据经方差分析,用新复极差法作多重比较。

2 结果与讨论

2.1 菲对土壤细菌数量的动态影响

从图 2 可见,经过 42 天的反应,在供试的 2 种土壤中菲污染的与对照的细菌数量变化趋向相似,都有一个先缓慢上升,后又急剧下降的过程,这种现象在来自常熟的水稻土中尤为明显。在培养 14 至 35 天期间,常熟乌栅水稻土的细菌数量远高于鹰潭旱地红砂土的细菌数量,虽然 2 种土壤的起始细菌数量相差不大。从动态变化角度来看,从开始到 14 天,2 种土壤的细菌数量变化不大;从 14 天到 28 天,加菲与对照处理的乌栅水稻土的细菌数量迅速增加 ($p < 0.05$),对照土从 3.14×10^6 cfu/g 干土增加到 6.40×10^7 cfu/g 干土,加菲土从 3.75×10^6 cfu/g 干土增加到 6.80×10^7 cfu/g 干土;28 天后 2 种处理都开始下降,但

加菲土下降的速度比对照快 ($p < 0.01$) ;到培养 42 天时,两者接近,基本上回复到起始的数量水平。就旱地红砂土而言,总体上,加入菲的土壤细菌数量多于对照 ($p < 0.05$); 在 14 天和 28 天时,菲处理的红壤细菌数量出现 2 次高峰。这种锯齿形变化的原因有待进一步研究。但可以推测,在初期细菌可能忍耐并适应了菲的加入剂量,后来可能利用了

PAHs (2 环或 3 环)作为碳源和能源^[15],刺激了一些细菌生长,从而使细菌数量增加,而后或者由于菲的毒性抑制细菌的生长或者由于有机物被快速消耗而导致微生物死亡,细菌数量又快速减少。从常熟乌栅水稻土的未加多环芳烃菲(对照)处理的细菌数量也出现急剧上升的情况分析,这种土壤中可能存在对多环芳烃有自然降解功能的土著细菌。

2.2 菲对土壤真菌数量的动态影响

从图 3 可以看出,虽然与细菌一样,乌栅水稻土中的真菌量也多于红壤砂土,但是加菲后土壤中真菌的变化不同于细菌。在乌栅水稻土中,培养 14 天后,对照土中的真菌数量比菲处理土高得多,表明菲对真菌生长的明显抑制作用。旱地红砂土的情况类似,但对照处理的真菌数量的高峰值比乌栅水稻土早 1 周,这可能与土壤性状差异有关。在 14 天时,对照红壤的真菌数量为 3.80×10^3 cfu/g 干土,加菲红壤为 7.00×10^2 cfu/g 干土,两者差异达极显著水平 ($p < 0.01$); 在 21 天时,对照乌栅水稻土为 6.36×10^3 cfu/g 干土,加菲水稻土为 2.12×10^3 cfu/g 干土,两者差异达显著水平 ($p < 0.05$)。菲对土壤中真菌活性产生抑制作用的这一观察结果与宋玉芳等研究的结果^[16]相吻合。

2.3 菲对土壤放线菌数量的动态影响

如图 4 所示,土壤中放线菌的动态变化不同于细菌和真菌的动态变化。在开始 2 周内,两种土壤的菲处理与对照的放线菌数量都表现为先下降后回升的趋势,这在 2 种土壤的对

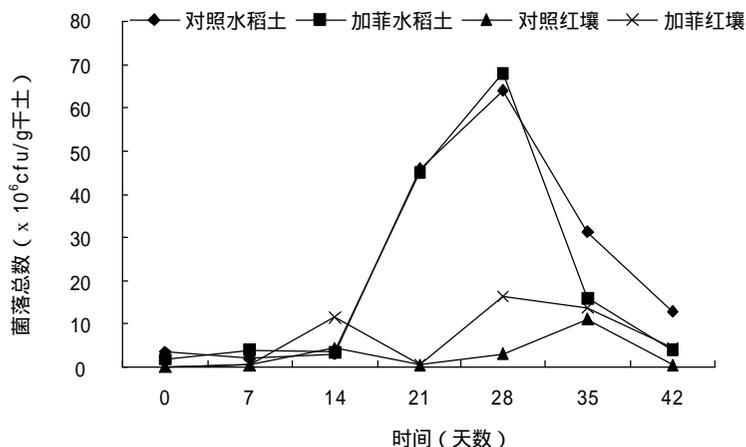


图 2 加与不加菲土壤中细菌数量的动态变化

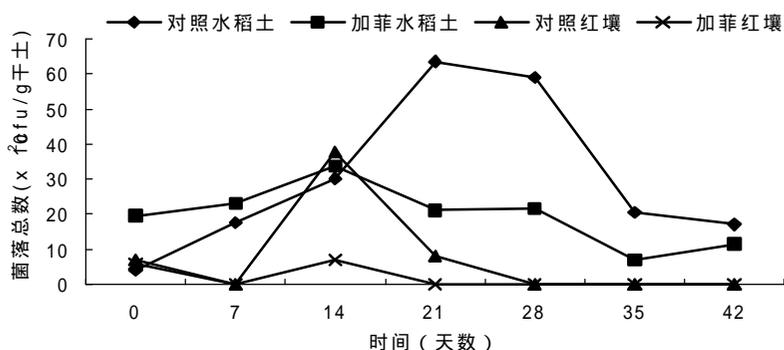


图 3 加与不加菲土壤中真菌数量的动态变化

照处理尤为明显。总体上,菲处理后放线菌的数量较低,这在旱地红砂土中格外突出。此外,在试验的中、后期,旱地红砂土中的放线菌数量通常高于乌栅水稻土中的放线菌数量。对照红壤的变化幅度为从 $4.69 \times 10^4 \sim 7.27 \times 10^4 \text{cfu/g}$ 干土,加菲红壤为 $0.78 \times 10^4 \sim 3.84 \times 10^4 \text{cfu/g}$ 干土;对照乌栅水稻土从 $1.32 \times 10^4 \sim 4.18 \times 10^4 \text{cfu/g}$ 干土,加菲乌栅水稻土从 $1.13 \times 10^4 \sim 4.96 \times 10^4 \text{cfu/g}$ 干土。

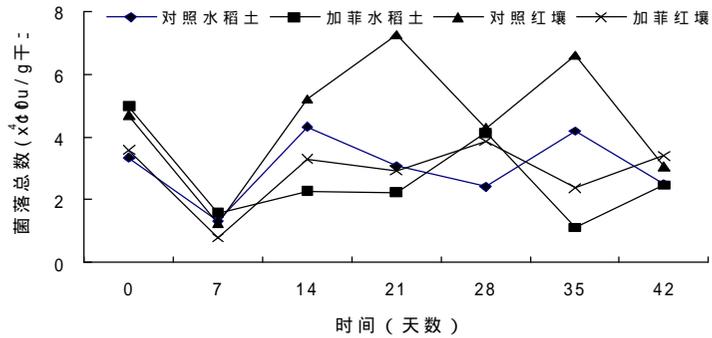


图 4 加菲与不加菲土壤中放线菌数量的动态变化

菲对放线菌的抑制作用出现在 1 周后,这与真菌的情况(图 3)基本吻合。旱地红砂土比乌栅水稻土酸性强、肥力差(表 1),但放线菌数量却是旱地红砂土多于乌栅水稻土,表明在相同的土壤生态系统中,放线菌较耐贫瘠。

与细菌和真菌的数量变幅相比,各处理土壤中的放线菌数量保持在 10^4 的数量级上,总体上变幅不大,这表明在本实验条件下,菲对放线菌的影响不如对细菌和真菌的影响敏感。

3 结 语

通过以上试验可以大致反映出不同培育阶段微生物对菲的响应情况。在本实验条件下,3 大菌都有一个升高与下降的过程,这可能与反应器中微生物对低浓度菲的本能适应、刺激或抑制等有关。Domsch 等^[17]研究表明农药对微生物的抑制有一时间范围,过后又迅速恢复,数量显著增加,从而造成微生物数量的不规则变化。这些动态变化的机制尚待探明。

乌栅水稻土细菌的数量级在 $10^6 \sim 10^7$ 间变化,旱地红砂土在 $10^4 \sim 10^7$ 间变动。菲处理土细菌总量大于对照土,表现出明显的刺激效应,这暗示从土壤中筛选菲降解细菌的可能性。供试土壤中真菌数量级在 $10^2 \sim 10^3$ 之间变化,相对地红壤中真菌更少。菲对真菌有抑制作用。菲对放线菌也有抑制作用,但其影响程度在 10^4 数量级范围内,不如细菌和真菌的明显。所以,在这 2 种试验的土壤中,能够适应菲污染影响的真菌和放线菌可能不如细菌,也就是说,更宜于从细菌中筛选有效的降解菌。

土壤微生物的变化是污染土壤生态环境中微生物活性的敏感指示。菲污染影响到土壤 3 大菌的数量及其组成,这些变化可以反映和评价多环芳烃污染土壤的生物环境风险及危害,同时可以为污染土壤特别是淹水条件下筛选多环芳烃物的有效降解菌株提供有用信息,进而为多环芳烃污染土壤的生物修复技术的研究与发展奠定基础。

致谢 南京农业大学实习生王琳同学参与了部分研究工作,在此深致谢意。

参 考 文 献

- White P A et al., Environmental Toxicological Chemistry, 1998, 17: 286~303
- Stephanine L.T. et al., Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 283~287
- Benner B A et al., Environmental Science and Technology, 1990, 24: 1418~1327

(下转第 236 页)

数值, 低、中、高 3 种菲处理的分别是 0.01、0.08、0.09 mg/g 土, 说明 B、C 处理的植物能够明显地增加土壤中多酚氧化酶的活性, 从而促进对菲的降解。50 天以后, 多酚氧化酶活性的变化趋势在各处理间相同, 到 60 天收获时其数值分别为 0.16、0.12、0.06 mg/g 土。低剂量菲处理的植物对酶活性的作用最大, 而中、高剂量处理的可能由于菲的抑制作用, 土壤的多酚氧化酶活性减少。可见, 黑麦草对土壤多酚氧化酶的产生有促进作用, 这种作用与植物生长时间和土壤中菲含量与毒性有关, 表现为随时间而变化。

3 结 论

通过在不同菲浓度处理土壤上种植黑麦草 60 天的盆栽试验观察到, 土壤中菲的可提取浓度随着时间延长逐渐减少且在黑麦草生长的土壤中菲含量有进一步减少的现象。认为, 土壤具有自然修复菲污染的功能, 而黑麦草对土壤中的菲有降解作用。这种作用可能与种植黑麦草后土壤多酚氧化酶活性提高有关。黑麦草对土壤中菲的降解修复作用还与土壤菲污染程度和植物生长期有关。增加黑麦草产量, 增强土壤多酚氧化酶活性, 是一条能提高黑麦草植物修复菲污染土壤能力的途径。

参 考 文 献

- 1 Anderson T.A. *et al.*. Environmental Science and Technology, 1993, 27: 2630~2635
- 2 April W. and Sims R.C..Chemosphere, 1990, 20: 253~265
- 3 Gunther, T. Dornberger, U. and Fritsche, W. Appl. Environ. Microbial. 1996, 54: 2549~2555
- 4 Binet, P. *et al.*. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32: 2011~2017
- 5 Banks M.K. Lee E. and Schwab A.P. J. Environ. Qual, 1999, 28: 294~298
- 6 龚子同等编著.《中国土壤系统分类—理论·方法·实践》, 北京: 科学出版社, 1999, 165~167
- 7 宋玉芳等. 土壤、植物样品中多环芳烃 (PAHs) 分析方法研究, 应用生态学报, 1995, 6: 92~96
- 8 关松荫等编著.《土壤酶及其研究法》. 北京: 农业出版社, 1986, 323~328

(上接第 232 页)

- 4 Sims, R.C. & Overcash, M.R., Residue Reviews, 1983, 88: 1~68
- 5 Jones K.C. *et al.*, Environ. Pollut., 1989, 56: 337~351
- 6 William T.S. Michael D.A., Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61: 357~362
- 7 Robert M. *et al.*, Environmental Science and Technology, 1997, 31: 2626~2633
- 8 巩宗强等, 多环芳烃污染土壤的生物泥浆法修复, 环境科学, 2001, 22: 112~116
- 9 张春桂等, 污染土壤生物恢复技术, 生态学杂志, 1997, 16: 52~58
- 10 Mahmood S. K. & Rao P. R., Environ. Contam. Toxicol. 1993, 50: 486~491
- 11 江西红壤试验站和江西农牧海业厅土地利用管理局编, 江西红壤研究(II). 南昌: 江西科学出版社, 1987, 20~21
- 12 宋静, 骆永明等, 沉积物-水界面营养盐释放研究 I Rhizon SMS 在底泥氮释放研究中的应用. 土壤学报, 2000, 37: 515~520
- 13 孟范平, 吴方正. 土壤的 PAHs 污染及其生物治理技术进展. 土壤学进展, 1995, 23: 32~42
- 14 中国科学院南京土壤研究所微生物室编著. 土壤微生物研究方法. 北京: 科学出版社, 1985
- 15 Cemiglia, C *et al.*, Applied Microbiology, 1984, 6: 145~154
- 16 宋玉芳等. 表面活性剂 TW-80 对土壤中的多环芳烃生物降解的影响. 应用生态学报, 1999, 10:230~232
- 17 Domsch K. H. *et al.*, Arch. Microbiol., 1994, 97: 283~301