

丛枝菌根作用下土壤中多环芳烃的残留及形态研究^①

曾跃春, 李秋玲, 高彦征, 凌婉婷*, 肖敏

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 采用盆栽试验方法, 以芘为多环芳烃 (PAHs) 代表物, 研究了丛枝菌根 (AM) 作用下土壤中 PAHs 的残留及形态。供试污染土壤中芘的起始浓度为 35.0 mg/kg。结果表明, AM作用下土壤中芘总残留量明显降低; 接种摩西球囊霉菌 *Glomus mosseae* 或幼套球囊霉菌 *Glomus etunicatum* 后, 供试两个污染土样中芘总残留降解率达 32.7% ~ 45.2%, 比未接种对照高 6.8% ~ 9.8%。有机溶剂提取态是土壤中芘残留的主要部分, AM 作用促进了芘各形态之间的转化; 接种AM后土壤 1、2 中芘可脱附态和有机溶剂提取态残留量分别比对照降低了 17.0% ~ 37.8% 和 5.4% ~ 26.6%, 而结合态残留量比对照增加了 12.2% ~ 89.5%。AM 作用能降低土壤中芘可提取态残留含量; 但培养 55 天后土壤中仍有 65.7% ~ 81.7% 芘属于可提取态残留, 对生物有毒害风险。

关键词: 多环芳烃; 形态; 丛枝菌根; 土壤

中图分类号: X131.3

多环芳烃 (PAHs) 是目前土壤环境中常见的一类高风险污染物, 多具有“三致”效应, 难分解、持留期长, 可通过食物链危害农产品安全和人体健康。PAHs 污染土壤的修复问题已成为国内外土壤环境领域的研究热点^[1-3]。相比于物理化学修复, 生物修复由于其操作简单、成本低、修复效果好的优点, 近年来颇受重视^[4-6]。植物之所以能提高土壤中 PAHs 的降解率, 主要是其良好的根际条件促进了土壤微生物活性, 从而加速了 PAHs 的降解。显然, 根系与土体的接触面积、根际微生物的数量和活性是制约根际修复效率的关键。

丛枝菌根真菌 (AMF) 能与大多数速生草本植物形成共生体丛枝菌根 (AM), 菌根的外延菌丝以及良好的菌根际和菌丝际环境能有效地解决植物根际修复中的上述问题。目前, 利用AM来增效植物修复PAHs污染土壤已有研究报道^[7]。然而, 土壤有机污染的修复效率及危害与其形态和生物可利用性密切相关。由于吸附、锁定等作用, 有机污染物进入土壤后, 以多种形态残留于土壤中, 且各形态间可相互转化。近来研究表明, 不同形态有机污染物的生物 (如微生物、植物) 毒性和可利用性差异很大^[8-9]。与可提取态残留相比, 结合态残留的生物可

利用性低、对植物也更安全^[10-12]。一般认为, 结合态残留的形成大大降低了有机污染物的毒性和植物/微生物可利用性, 是土壤污染缓解的重要途径^[13-15]。然而, 从已有的资料来看, 有关菌根修复的研究多忽视了土壤中有有机污染物的形态变化问题, 研究者往往仅从土壤中可提取态有机污染物的含量变化来分析菌根修复土壤有机污染的过程及机理, 这可能在一定程度上会掩盖土壤有机污染的潜在风险、难以准确评价菌根修复土壤污染的效果。

芘是一个有代表性的 PAHs, 已被美国国家环保总署 (USEPA) 列为优先控制PAHs。有研究表明, 其在农田、石油化工污染场地甚至珠穆朗玛峰地区土壤都有较高的残留量^[16-18], 危及生态安全和人类健康。本实验以芘为PAHs代表物, 以两种理化性质不同的土壤为供试土样, 试图探明AM对土壤中PAHs 残留形态的影响, 为深入了解AM修复有机污染土壤的机理及有效、针对地提高修复效率提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

芘购自北京化学试剂公司, 纯度>98%; 二氯甲

^①基金项目: 国家自然科学基金项目 (40701073, 40971137)、江苏省青年科技创新人才基金项目 (BK2007580, 2009315) 和教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-06-0491) 资助。

* 通讯作者 (lingwanting@njau.edu.cn)

作者简介: 曾跃春 (1984—), 男, 浙江金华人, 硕士研究生, 主要从事环境污染控制与生物修复研究。E-mail: Jackzeng0205@126.com

烷、正己烷、丙酮、无水硫酸钠、层析用硅胶（200 ~ 300 目）均为分析纯；甲醇为色谱纯。5 m × 3 m 温室，医用数控超声波清洗器，台式高速离心机，低温冰箱，水浴锅，高效液相色谱仪。

供试菌剂购自北京市农林科学院植物营养与资源

研究所“中国丛枝菌根真菌种质资源库（BGC）”。两种菌分别为：摩西球囊霉菌 *Glomus mosseae* (AMF1)、幼套球囊霉菌 *Glomus etunicatum* (AMF2)。

供试两种土壤分别采自南京板桥、音乐台，其理化性质见表 1。

表 1 供试土壤的基本性质

Table 1 Basic properties of tested soils

土壤	采集地	有机质 (g/kg)	pH 值	砂粒 (g/kg)	粉粒 (g/kg)	黏粒 (g/kg)
土壤 1	板桥	16.8	5.53	629	206	83
土壤 2	音乐台	22.8	5.27	296	495	103

污染土样的制备：配制 1% 的丙酮溶液，均匀加入到供试土样中，待丙酮挥发完全后混匀，并用未污染土样充分混合，以使萘分布均匀，采集制备好的土样进行测定。测得各土壤萘起始浓度均为 35.0 mg/kg。

1.2 实验方法

称取一系列上述制备的污染土样 200 g 于盆钵中，称取菌剂 20 g 均匀覆于上面，再覆盖 150 g 制备好的污染土，加水至 50% 田间持水量，静置过夜。供试植物为紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.)，用 10% H_2O_2 浸泡 10 min，经催芽后分别播于上述盆钵中，2 ~ 3 天出苗，一周左右进行间苗，每盆留苗 6 株。试验中，设接种 AMF1、AMF2 和未接种对照 3 种处理。每个处理 3 个重复。每 5 天随机交换盆钵的位置。培养 55 天后采样。土壤采集后充分混匀，置低温冰箱中待分析。

1.3 样品提取及分析方法^[9]

可脱附态 (desorbing fraction)：取 3 g 干燥过筛土样于 25 ml 玻璃离心管中，加入 15 ml 提取液（超纯水配制，HPCD 浓度为 70 mmol/L，叠氮化钠浓度为 0.5 g/ml），在 150 r/min，25℃，避光条件下振荡。时间间隔分别为 60、120、240 h，每个间隔将离心管从摇床取出，于 2000 r/min 下离心 25 min，倒出上清液，加入新的提取液；每次倒出的上清液合并，0 ~ 4℃ 保存。收集的全部上清液用 10 ml 的二氯甲烷液-液萃取，重复 3 次。萃取液用无水硫酸钠过滤干燥，旋转蒸发仪蒸干，甲醇定容至 2 ml，过 0.22 μm 微孔滤膜，HPLC 测定。

有机溶剂提取态 (non-desorbing fraction)：将上一步提取后土样 37℃ 烘干，加入 10 ml 的 1:1 (体积比) 的二氯甲烷与丙酮混合萃取液，超声萃取 10 min，离心，收集上清液，重新加入萃取液，重复 5 次。萃取液用无水硫酸钠过滤干燥，旋转蒸发仪蒸干，甲醇

定容至 2 ml，过 0.22 μm 微孔滤膜，HPLC 测定。

结合残留态 (bound residue)：以上过程提取后土样，加入 10 ml，2 mol/L 的 NaOH，100℃ 条件下水浴 2 h，冷却，离心，取上清液，并用少量 NaOH 润洗土壤，收集润洗液；用 6 mol/L 的 HCl 调 pH 值小于 2.0，10 ml 二氯甲烷液-液萃取，重复 3 次。萃取液用无水硫酸钠过滤干燥，旋转蒸发仪蒸干，甲醇定容至 2 ml，过 0.22 μm 微孔滤膜，HPLC 测定。

HPLC 分析条件：色谱柱为 4.6 mm × 150 mm 烷基 C18 反相柱；流动相为色谱纯甲醇，流速 1 ml/min；柱温 30℃；进样量 20 μl；检测波长 245 nm。

1.4 数据处理

利用 Excel 和 SPSS 软件进行实验数据的统计分析。

2 结果分析与讨论

2.1 AM 作用下土壤中 PAHs 的总残留量

AM 是植物根系与 AM 真菌相结合的互惠共生体，利用 AM 修复有机污染土壤综合了植物修复与微生物修复的优点，克服了两者在实际应用中的缺陷，起到了降解污染物并促进植物生长的作用。

表 2 为培养 55 天后两种土壤各处理中萘的总残留量。结果表明，接种 AMF 后土壤中萘的总残留量明显降低。土壤 1 接种 AMF1、AMF2 后，萘总残留量分别下降至 19.2、20.2 mg/kg，降解率达到 45.2%、42.2%；土壤 2 接种 AMF1、AMF2 后，萘总残留量分别下降至 23.6、23.3 mg/kg，降解率也达到了 32.7%、33.4%；而未接种对照中，土壤 1、2 萘总残留浓度分别为 22.6、26.4 mg/kg，降解率分别为 35.4%、24.6%。接种 AMF 后土壤中萘总残留降解率比未接种对照高 6.8% ~ 9.8%。Joner 等^[19]采用盆栽实验方法，在两种工业污染土壤中种植三叶草与黑麦草，定期测定

根际周围 PAHs 的降解效率, 同样得出, AM 能明显促进土壤中 PAHs 的降解。AM 会对其他微生物产生直接影响或通过改变根系分泌物产生间接影响, 其外生菌丝能延伸数厘米以上, 并分泌有机物, 这些物质能够促进土壤微生物数量的增加和活性的增强。李秋玲等^[7]研究发现, 同一污染强度下 (菲浓度为

59.79 mg/kg), 与不接种 AMF 相比, 接种 AMF 后土壤中细菌、真菌和放线菌数量有较大提高。60 天后, 接种 AMF 土壤中真菌数量比无 AMF 对照高 72% ~ 329%, 放线菌则最大提高了 92%。说明接种 AMF 明显提高土壤微生物的数量和活性, 进而促进土壤中 PAHs 的降解。

表 2 AM 作用下土壤中萘的总残留浓度及降解率

Table 2 Effects of AM on the residual forms and degradation rate of acenaphthene in soils

处理	总残留量 (mg/kg)		降解率 (%)	
	土壤 1	土壤 2	土壤 1	土壤 2
对照	22.6 ± 1.1	26.4 ± 1.3	35.4 ± 3.1	24.6 ± 3.7
摩西球囊霉菌	19.2 ± 1.7	23.6 ± 0.5	45.2 ± 5.0	32.7 ± 1.4
幼套球囊霉菌	20.2 ± 0.6	23.3 ± 0.4	42.2 ± 1.7	33.4 ± 1.2

本实验还发现, PAHs 的降解与土壤有机质含量有密切关系。土壤 1 中, 萘的总残留降解率为 35.4% ~ 45.2%, 而在有机质含量相对较高的土壤 2 中降解率只有 24.6% ~ 33.4%。有机质含量高的土壤对 PAHs 的吸附量和吸附强度均较高, 有机质吸附限制了土壤中 PAHs 的降解。平立凤等^[20]认为, 有机质对 PAHs 生物过程的影响是双方面的。其一是有机质作为一种营养物质, 有利于吸收、转化或降解 PAHs 生物的生存和生长, 增强生物修复活性; 其二是有机质强烈吸附 PAHs 变成吸附态, 其中一部分可能会形成结合残留态, 难以被生物利用, 从而减少了生物毒性。PAHs 的生物可利用性与其在土壤中的赋存形态密切相关。

2.2 AM 作用下土壤中 PAHs 的赋存形态

有机污染物在土壤中的残留形态, 分为可提取态残留 (可脱附态残留与有机试剂提取态残留之和) 与结合态残留。前者指无需改变化学结构、可用溶剂提取并用常规残留分析方法所鉴定分析的这部分残留; 后者则难于直接萃取。两部分之间的界限并不是十分明显。

图 1 为 AM 作用下培养 55 天后土壤中萘的赋存形态。结果表明, 土壤 1 (图 1a) 接种 AMF1 后, 可脱附态、有机溶剂提取态、结合残留态分别为 5.7、9.9、3.5 mg/kg, 各残留组分占总残留量的比例分别为 29.8%、51.9%、18.3%; 土壤 1 接种 AMF2 后, 可脱附态、有机溶剂提取态、结合残留态分别为 6.7、8.0、5.5 mg/kg, 各残留组分占总残留量的比例分别为 32.9%、39.7%、27.3%; 而未接种对照中, 可脱附态、有机溶剂提取态、结合残留态分别为 9.2、10.5、2.9 mg/kg, 各残留组分占总残留量的比例分别为 40.6%、46.5%、

12.9%。土壤 2 (图 1b) 接种 AMF 后情况大体相同, 可脱附态、有机溶剂提取态、结合残留态组分占总残留比例分别为 26.3% ~ 32.1%、33.6% ~ 42.3%、31.4% ~ 34.3%; 未接种对照中 3 种残留组分占总残留比例依次为 34.5%、40.8%、24.7%。可见, 土壤中萘的赋存形态主要以有机溶剂提取态存在, 其次为可脱附态残留, 结合残留态所占比例最少。进一步计算发现, 相比未接种对照, 接种 AMF 后降低了土壤中萘可脱附态和有机溶剂提取态残留量, 增加了结合态残留量。土壤 1、2 接种 AMF 后, 可脱附态和有机溶剂提取态残留量分别比对照降低了 17.0% ~ 37.8% 和 5.4% ~ 26.6%, 而结合态残留量比对照增加了 12.2% ~ 89.5%。出现这现象可能是由于 AM 作用下促进土壤微生物数量的增加和活性的增强, 从而加快了萘可脱附态和有机溶剂提取态残留的降解; 同时微生物活动促进了结合态残留的形成, 这与 Gan 等^[21]的研究一致。

另有研究表明, 老化一年后, 土壤中的萘和菲的结合态残留量分别占总量的 25% 和 60%^[22]。He 等^[23]研究了珠三角地区土壤中 PAHs 结合态残留含量发现, PAHs 结合态残留量达 234.45 ~ 1424.57 μg/kg, 占总量的 33.78 ~ 57.44%。很多学者发现, 土壤有机质是 PAHs 的一个主要吸附剂, PAHs 结合态量与其含量呈显著性正相关^[24-25]。本研究中也发现同样的现象, 在有机质含量高的土壤 2 中萘结合态残留可达 6.5 ~ 8.1 mg/kg, 而有机质含量相对较低的土壤 1 中其含量只有 2.9 ~ 5.5 mg/kg。有研究报道, 97% 以上的结合残留存在于土壤有机质中, 只有 3% 以下的结合残留物存在于土壤矿物质部分^[18], 这是土壤中污染物结合态含量与有机质含量呈显著性正相关的原因。

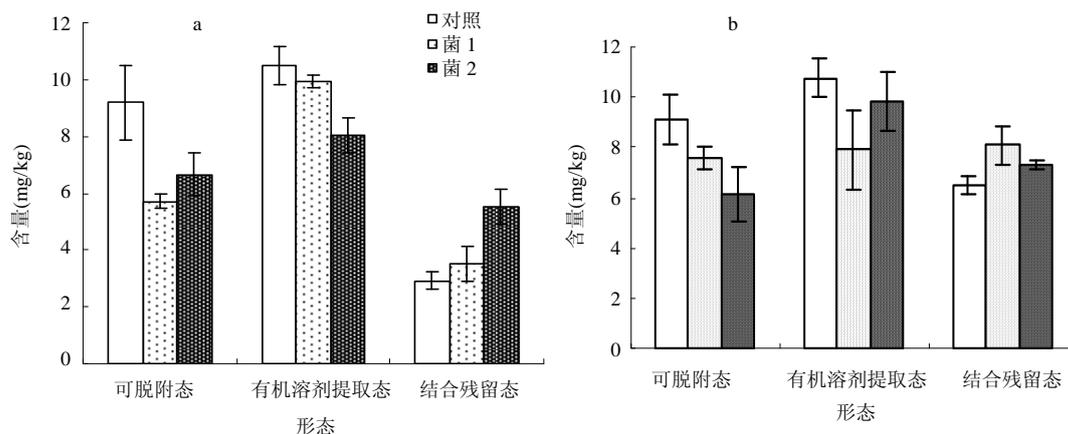


图 1 AM 作用下土壤中萘的残留形态 (a, 土壤 1; b, 土壤 2)

Fig. 1 Effects of AM on residual forms of acenaphthene in soils

2.3 AM 作用下土壤中 PAHs 的有效性

可提取态残留物的生物活性较高，能直接对生物（动植物、微生物）产生毒害影响，通常用来衡量污染物的有效性。AM 作用能降低土壤中萘可提取态残留量，见图 2。接种 AMF1、AMF2 培养 55 天后土壤 1 中萘可提取态残留量分别为 15.6、14.7 mg/kg，土壤 2 中萘可提取态残留量分别为 15.5、16.0 mg/kg。相比未接种对照，土壤 1、2 中萘可提取态残留量分别下降了 20.5% ~ 25.3% 和 19.6% ~ 22.2%。接种 AMF 能降低土壤中污染物的可提取态残留量，减小其对生物的毒害。进一步计算发现，即使接种 AMF 后土壤中可提取态残留量仍然占总残留量的 65.7% ~ 81.7%。说明培养 55 天后，土壤中仍有相当部分萘属于可提取

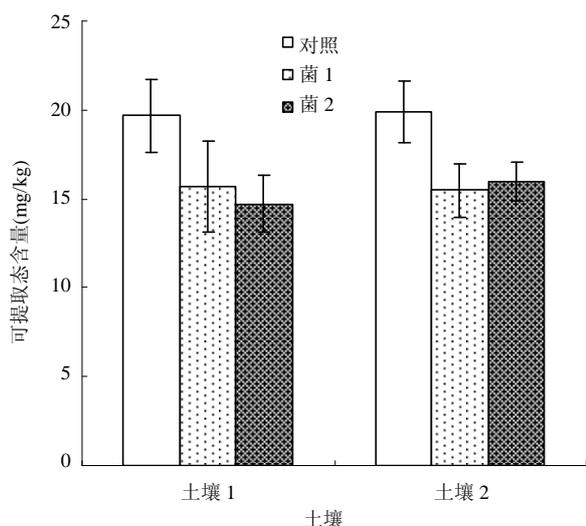


图 2 接种 AMF 后土壤中萘可提取态浓度

Fig. 2 Residual concentrations of extractable fractions of acenaphthene in soils with AMF

残留，对生物有毒害风险。汪海珍等^[13]研究土壤中甲磺隆残留物发现，培养 112 天后其可提取态残留量为初始量的 16.1% ~ 75.5%，并随时间延长而逐渐降低。表明，污染物进入土壤初期主要以可提取态残留存在，随时间增加，可提取态残留能转变形成结合态残留或直接降解。

3 结论

(1) AM 作用下土壤中萘总残留量明显降低；接种摩西球囊霉菌 *Glomus mosseae* (AMF1) 或幼套球囊霉菌 *Glomus etunicatum* (AMF2) 后，供试两个污染土样中萘总残留量降解率达 32.7% ~ 45.2%；接种 AMF 后土壤中萘总残留降解率比未接种对照高 6.8% ~ 9.8%。

(2) 有机溶剂提取态是土壤中萘残留的主要部分，AM 作用促进了萘各形态之间的转化；接种 AMF 后土壤 1、2 中萘可脱附态和有机溶剂提取态残留量分别比对照降低了 17.0% ~ 37.8% 和 5.4% ~ 26.6%，而结合态残留量比对照增加了 12.2% ~ 89.5%。

(3) AM 作用能降低土壤中萘可提取态残留含量。但培养 55 天后土壤中仍有 65.7% ~ 81.7% 萘属于可提取态残留，对生物有毒害风险。

参考文献：

[1] Ling WT, Gao YZ. Promoted dissipation of phenanthrene and pyrene in soils by amaranth (*Amaranthus tricolor* L.). *Environ Geol.*, 2004, 46: 553-560

[2] Zhu LZ, Gao YZ. Prediction of phenanthrene uptake by plants with a partition-limited model. *Environ. Pollut.*, 2004, 131: 505-508

[3] 邹德勋, 骆永明, 徐凤花, 滕应, 李振高. 土壤环境中多环芳

- 烃的微生物降解及联合生物修复. 土壤, 2007, 39(3): 334-340
- [4] Gao YZ, Zhu LZ. Plant uptake accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*, 2004, 55: 1169-1178
- [5] 李春荣, 王文科, 柴丽红. 石油污染土壤的生物修复技术研究. 土壤, 2008, 40(5): 824-827
- [6] Gao YZ, Zhu LZ. Phytoremediation and its models for organic contaminated soils. *J. Environ. Sci.*, 2003, 15: 302-310
- [7] 李秋玲, 凌婉婷, 高彦征, 卢晓丹, 曾跃春. 丛枝菌根对土壤中多环芳烃降解的影响. 农业环境科学学报. 2008, 27(5): 1705-1710
- [8] Ehlers LJ, Luthy RG. Contaminant bioavailability in soil and sediment. *Environ. Sci Technol.*, 2003, 37: 295-302
- [9] Sabate J, Vinas M, Solanas AM. Bioavailability assessment and environmental fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in biostimulated creosote-contaminated soil. *Chemosphere*, 2006, 63: 1648-1659
- [10] Khan SU. Plant uptake of unextracted (bound) residues from an organic soil treated with prometryn. *J. Agric. Food Chem.*, 1980, 28: 1096-1098
- [11] Suss A, Grampp B. The uptake of absorbed monolinuron in the soil by mustard plants. *Weed Res.*, 1973, 13: 254-256
- [12] Fuhe F, Mittelstaedt W. Plant experiment on the bioavailability of unextracted [carbonyl-¹⁴C] methabenzthiazuron residues from soil. *J. Agric. Food Chem.*, 1980, 28: 122-125
- [13] 汪海珍, 徐建民, 谢正苗, 叶庆富. 土壤中¹⁴C-甲磺隆存在形态的动态研究. 土壤学报, 2001, 37(8): 547-557
- [14] Kohl SD, Rice JA. The binding of contaminants to humin: A mass balance. *Chemosphere*, 1998, 36: 251-261
- [15] Northcott GL, Jones KC. Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environ. Pollut.*, 2000, 108: 19-43
- [16] 匡少平, 孙东亚, 孙玉焕, 赵辉. 中原油田油泥及周边土壤中 PAHs 的污染特征. 农业环境科学学报, 2008, 27(3): 855-861
- [17] 王小萍, 姚檀栋, 丛志远, 燕新梁, 康世昌, 张勇. 珠穆朗玛峰地区土壤和植被中多环芳烃的含量及海拔梯度分布. 科学通报, 2006, 51(21): 2517-2525
- [18] 李丽, 曹云者, 李秀金, 高新华, 李发生. 典型石油化工污染场地多环芳烃土壤指导限值的获取与风险评价. 环境科学研究, 2007, 20(1): 30-35
- [19] Joner EJ, Leyval C. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.*, 2003, 37: 2371-2375
- [20] 平立凤, 骆永明. 有机质对多环芳烃环境行为影响的研究进展. 土壤, 2005, 37(4): 362-369
- [21] Gan J, Koskinen WC, Becker RL, Buhler DD. Effect of concentration on persistence of alachlor in soil. *Journal of Environmental Quality*, 1995, 24: 1162-1169
- [22] Ncibi MC, Mahjoub B, Gourdon R. Effects of aging on the extractability of naphthalene and phenanthrene from Mediterranean soils. *J. Hazard Mat.*, 2007, 146: 378-384
- [23] He LL, Song JZ. Characterization of extractable and non-extractable polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and sediments from the Pearl River Delta, China. *Environ. Pollut.*, 2008, 156: 768-774
- [24] 倪进治, 骆永明, 魏然. 土壤有机和无机组分对多环芳烃环境行为影响的研究进展. 土壤, 2006, 38(5): 559-564
- [25] Chiou CT, McGroddy SE, Kile DE. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32: 264-266

Effects of Arbuscular Mycorrhiza (AM) on Residual and Forms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils

ZENG Yue-chun, LI Qiu-ling, GAO Yan-zheng, LING Wan-ting, XIAO Min

(College of Resource and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Pot experiment was conducted with a series of treatments of soils in a greenhouse to investigate the effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on the residual forms of PAHs in soils. The initial concentrations of acenaphthene in soils were 35.0 mg/kg. It has been found that AM significantly reduced acenaphthene content in soils. The degradation rates of acenaphthene in soils with inoculation of *Glomus mosseae* and *Glomus etunicatum* were 32.7% - 45.2%, increased by 6.8% - 9.8% than the control (without AM). The non-desorbing fractions dominated the total residues of acenaphthene, and AM promoted the transformation between acenaphthene forms. The desorbing fractions and non-desorbing fractions of acenaphthene were 17.0% - 37.8% and 5.4% - 26.6% lower than the control, while the bound residual was 12.2% - 89.5% higher than the control. AM may reduce the amount of extractable residues of acenaphthene, however, the extractable fractions account for 65.7% - 81.7% of total residues of acenaphthene in soils after 55-day incubation, having a toxic risk to organisms.

Key words: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Residual forms, Arbuscular mycorrhiza (AM), Soil