

固定化毛霉对工业和农田污染土壤中 多环芳烃的降解和生物有效性评价^{*}

刘 丹^{1,2} 巩宗强^{1**} 金京华³ 李晓军¹ 台培东¹ 李培军¹

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 污染生态与环境工程重点实验室, 沈阳, 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京, 100049;
3. 轻工业环境保护研究所, 北京, 100089)

摘 要 为了探讨微生物修复不同类型多环芳烃污染土壤的可行性,应用固定化毛霉对多环芳烃污染工业土壤及农田土壤进行微生物修复,用羟丙基- β -环糊精(HPCD)提取模拟评价多环芳烃的微生物可利用性,并分析多环芳烃微生物降解和生物可利用性的相关关系.焦化厂污染土壤中多环芳烃的30 d降解率为77.6%,沈抚灌区污染土壤中多环芳烃的30 d降解率为54.2%,焦化厂土壤和污灌区农田土壤中多环芳烃降解差异明显.焦化厂土壤和污灌区土壤中多环芳烃的30 d降解量和多环芳烃的环糊精可提取量具有相关性,各环数多环芳烃的环糊精可提取量变化解释了焦化厂和污灌区土壤中多环芳烃降解的差异机制,说明可用环糊精提取量预测微生物降解土壤多环芳烃的情况.

关键词 多环芳烃, 土壤, 降解, 环糊精, 生物有效性, 毛霉.

多环芳烃(PAHs)分布广、稳定性强、生物富集率高、致癌性强,对环境和人类健康构成极大威胁^[1].城市中焦炭厂、煤气厂等企业在生产过程中产生大量多环芳烃,厂区及周边土壤中多环芳烃的含量高,且老化现象严重^[2].由于我国经济的快速发展,这些企业多处于搬迁状态,遗留下来的土壤污染问题非常严重^[3].另外,由于我国上世纪发展污水灌溉,用含有有机污染物的废水灌溉农田,我国农田土壤也因此遭受多环芳烃的污染,典型污灌区包括天津污灌区、北京燕山石化污灌区及沈抚污灌区等^[4-5].

研究表明,微生物修复是去除环境中多环芳烃的有效方法^[6],土壤微生物能有效去除低环多环芳烃,但能降解高环多环芳烃的优势菌株较少.目前开展了大量多环芳烃的微生物降解研究,例如张杰^[7]等从石油污染土壤中分离获得单一和混合菌株,对土壤中的菲实现了快速降解.很多真菌(例如:白腐真菌和子囊菌)具有氧化降解多环芳烃的能力.真菌一般通过分泌单加氧酶将单个原子引入多环芳烃,产生环氧化物中间体,并逐渐将多环芳烃降解^[8].但是,当前污染土壤微生物修复研究多采用向土壤投加单一污染物的方法,而对多环芳烃原污染土壤的修复研究相对较少,且对不同类型土壤中多环芳烃降解过程的差异缺乏深入研究.另外,当前微生物修复主要关注的是污染物的总量,但是环境中污染物的生物可利用(bioavailable)部分才是最具有威胁的部分,因此应加强土壤修复过程中生物有效性的研究^[9].Papadopoulos等^[10]的研究表明羟丙基- β -环糊精(HPCD)水溶液可更好地评价菲对微生物的生物有效性,但应用HPCD进行不同类型污染土壤中多环芳烃生物有效性的比较研究还相对较少.

因此,本研究应用一种高效降解真菌(*Mucor* sp.)对多环芳烃污染工业土壤及农田土壤进行微生物修复,用HPCD水溶液提取法评价多环芳烃的生物可利用性,分析多环芳烃微生物降解和生物可利用性的相关关系,比较不同类型土壤中多环芳烃降解的差异,进一步论证微生物修复多环芳烃污染土壤的可行性.

1 材料与方法

1.1 供试土壤

实验土壤:(1)北京焦化厂内表层0—20 cm土壤,该厂于1958年建成,2006年停产,在48年的生产

2011年9月21日收稿.

^{*}北京市科学技术研究院创新工程(PXM2011-178203-000002);国家自然科学基金项目(41101295);国家环保公益性行业科研专项(200809047)资助.

^{**}通讯联系人, Tel:024-83970367; E-mail: zgong@iae.ac.cn

过程中,造成了严重的土壤环境污染,其中多环芳烃是土壤中主要污染物;(2)沈抚灌区表层 0—20 cm 土壤,灌区位于中国辽宁省沈阳市东南,抚顺市西北,建于 1960—1965 年,接纳抚顺石油二厂等数十家企业排放的石油化工废水和生活污水,主要污染物为石油烃和多环芳烃.两种土壤分别为工业和农业污染土壤的典型代表.土壤样品经风干后过 2 mm 尼龙筛,室温下保存,分析土样的理化性质,包括土壤质地、总氮、总有机碳、pH 和含水量等.

1.2 固定化菌剂

将从石油污染土壤分离、驯化、选育出的 1 株毛霉菌(*Mucor* sp.)移植于琼脂斜面上,28 ℃下纯化培养 5 d.挑取孢子移植于液体培养基中,28 ℃恒温、130—140 r·min⁻¹、振荡培养 5 d 得到孢子悬浊液,孢子密度为 6×10⁸个·mL⁻¹.将孢子悬浊液按 10% 的接种量置于 200 g 的固定化增殖培养基中搅拌均匀,28 ℃下恒温培养 7 d.

增殖培养基:2% 蔗糖,15% 麸皮,2% 豆粉,0.06% KH₂PO₄,0.15% MgSO₄·7H₂O,0.5% (NH₄)₂HPO₄,1.0%—1.5% 生石灰,80% 玉米芯,然后加入 1.5—2 倍水分,调节 pH=8.0,于 1.0132×10⁵ Pa 压力下灭菌 30 min 两次.

1.3 降解实验

称取 200 g 土壤装于 500 mL 烧杯中,按照 10% 的比例投加固定化菌剂后搅拌均匀,28 ℃恒温静止避光培养,土壤水分含量保持在 25%—30%,N、P、K 按照微生物需要投加.每个处理设 3 个重复,于 0、10、20、30 d 采集土壤样品,分析土壤中多环芳烃的含量及 HPCD 可提取量.

1.4 土壤样品的有机溶剂提取处理

称取 1 g 土样装入 50 mL 玻璃瓶中,加入 20 mL 丙酮、15 mL 二氯甲烷、10 mL 15% 的氯化钠溶液,25 ℃置于摇床,转速 150 r·min⁻¹,振荡 16 h.静置 1 h,吸取有机相 1 mL,氮气吹干,2 mL 乙腈定容,过 0.22 μm 滤膜后用 HPLC 测定多环芳烃的含量

1.5 土壤样品的环糊精提取及处理

称取 1 g 土样装入 25 mL 玻璃离心管中,加入 20 mL 浓度为 70 mmol·L⁻¹的羟丙基-β-环糊精(HPCD)提取剂和 0.05% 的叠氮化钠抑菌剂.25 ℃避光条件下置于摇床中振荡,转速 150 r·min⁻¹.在第 60、120、240 h 时离心收集提取液,第 60、120 h 收集提取液后,重新加入新的 HPCD 提取剂继续振荡提取.最后合并 3 次收集到的提取液,用 10 mL 二氯甲烷溶液萃取,有机相过无水硫酸钠,萃取得到有机相经旋转蒸发至 1 mL 后用氮气吹干,用 2 mL 乙腈定容,过 0.22 μm 滤膜后用 HPLC 检测合并后的全部萃取液中多环芳烃的含量.

1.6 色谱分析

高效液相色谱为安捷伦 1200 系列,色谱柱为 C-18 柱(ZORBAX Eclipse).污染土壤的待检测样品均使用荧光及紫外检测器进行检测,色谱条件如下:柱温 35 ℃;流动相为乙腈和水,初始 35 min,乙腈配比由 60% 线性增加到 100%,保持此配比运行 10 min,在下一个 10 min 之内乙腈配比再由 100% 线性减小到 60% 并保持此配比运行 5 min;流速为 0.5 mL·min⁻¹;进样量为 10 μL;各种 PAHs 均在其各自的发射/激发波长下进行测定.

2 结果与讨论

2.1 土壤理化性质和多环芳烃含量

土壤样品分别采自北京焦化厂和沈抚灌区 0—20 cm 表层土壤,过 2 mm 尼龙筛,分析其理化性质、多环芳烃含量.结果见表 1 和表 2.

表 1 供试土壤物理化学性质
Table 1 Physical-chemical characteristics of the experimental soils

土壤	土壤质地/%			pH	TN/%	TC/%
	砂土	壤土	粘土			
沈抚灌区土壤	61.4	28.5	10.1	7.2	0.187	7.43
焦化厂土壤	65.8	14.9	19.3	7.7	0.05	1.32

焦化厂污染土壤中多环芳烃总量为 263.33 mg·kg⁻¹,以三环、四环多环芳烃为主,占总量的 90% 以上,其中菲的含量最高,为 110.80 mg·kg⁻¹,占总量的 40.2%. 沈抚灌区土壤多环芳烃总量为 7.22 mg·kg⁻¹,以荧蒽、苯并蒽为主要污染物.有些多环芳烃(如萘、苊等)因含量低、具有挥发性,分析重现性差,本文未分析.

表 2 供试土壤中多环芳烃的浓度
Table 2 PAH concentrations in the experimental soils

多环芳烃	环数	焦化厂土壤		沈抚灌区土壤	
		浓度/(mg·kg ⁻¹)	sd ^a	浓度/(mg·kg ⁻¹)	sd ^a
菲(Phe)	3	110.80	5.16	0.66	0.04
蒽(Ant)	3	57.24	3.94	0.30	0.05
荧蒽(Flt)	4	29.04	1.18	1.59	0.13
芘(Pyt)	4	16.61	0.72	0.69	0.03
苯并蒽(Baa)	4	22.02	2.51	2.62	0.04
蒾(Chry)	4	5.20	0.43	0.09	0
苯并(b)荧蒽(Bbf)	5	6.80	2.41	0.67	0.03
苯并(k)荧蒽(Bkf)	5	2.36	0.23	0.24	0
苯并(a)芘(Bap)	5	4.17	0.21	0.30	0
二苯并(ah)蒽(Daha)	5	0.47	0.02	0.06	0
苯并(ghi)芘(Bghip)	6	3.73	0.20	— ^b	— ^b
茚并(cd)芘(Icdp)	6	4.89	0.34	— ^b	— ^b
总量		263.33	16.67	7.22	0.156

注: a. 标准方差; b. 未检出.

2.2 固定化毛霉对土壤中多环芳烃的降解

固定化毛霉对焦化厂和沈抚灌区污染土壤中多环芳烃的 30 d 降解效果见图 1. 30 d 内焦化厂土壤菲、蒽、荧蒽、苯并蒽和蒾的降解率分别为 94.47%、92.85%、61.33%、77.16% 和 92.81%,但对苯并(k)荧蒽、苯并(a)芘、二苯并(ah)蒽和苯并(ghi)芘等高分子量多环芳烃没有降解. 对沈抚灌区土壤,毛霉对沈抚灌区土壤中各多环芳烃均有降解,菲、蒽、荧蒽、二苯并(ah)蒽的降解率也均在 75% 以上.

由图 1 可以看到焦化厂污染土壤中菲、蒽、苯并蒽和蒾的降解率明显高于沈抚灌区土壤,这可能与土壤的性质有关. 沈抚灌区农田土壤的有机碳含量高于焦化厂土壤(表 1),土壤有机碳能和多环芳烃发生锁定,降低其生物可利用性,后面的环糊精提取也证实了这一点. 另一方面,焦化厂土壤中 3 环多环芳烃比例非常高,可能有利于微生物进行降解.

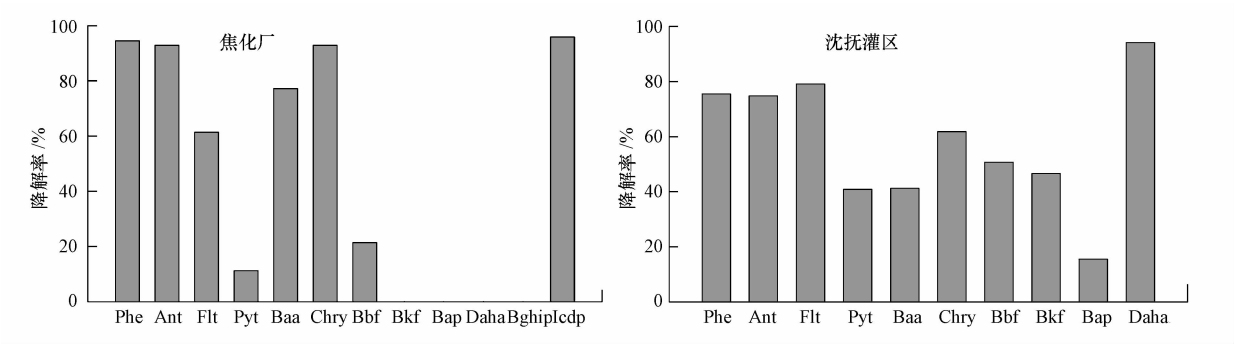


图 1 固定化毛霉对焦化厂和沈抚灌区污染土壤中多环芳烃的 30 d 降解率

Fig.1 Degradation of individual PAH in the coking plant soil and waste water irrigation soil by *Mucor* sp. in 30 days

固定化毛霉对焦化厂和沈抚灌区污染土壤中各环(3—6 环和总量)多环芳烃降解过程见图 2. 多环芳烃的性质影响微生物对其降解,主要在于随着结构上苯环数量的增加,生物可利用性降低,难降解性增强^[11-12]. 本研究中焦化厂和沈抚灌区污染土壤中 3 环多环芳烃的降解率都明显高于 4、5、6 环多环芳烃.

由图 2 可见,毛霉对焦化厂土壤中多环芳烃的降解具有迟滞效应.除 5 环多环芳烃外,其余各环数多环芳烃的 20、30 d 降解率均明显高于 10 d 降解率.5 环多环芳烃的降解率下降可能是由于分析误差造成.焦化厂土壤多环芳烃总量和 3 环多环芳烃降解过程相似,这是因为焦化厂土壤 3 环多环芳烃占绝对比例.与焦化厂土壤不同,毛霉对沈抚灌区土壤总多环芳烃的降解率在第 10 d 就达到 37.8%,30 d 降解率为 54.2%,明显低于焦化厂土壤多环芳烃的降解率 77.6%,可能原因是农田土壤中多环芳烃生物可利用部分比例较低.而沈抚灌区土壤多环芳烃的降解并未出现明显的迟滞效应,尤其是 3 环多环芳烃 10、20、30 d 降解率基本相同,说明毛霉对沈抚灌区土壤中 3 环多环芳烃可实现快速降解,而 4、5 环多环芳烃降解率则随时间增加而增加.

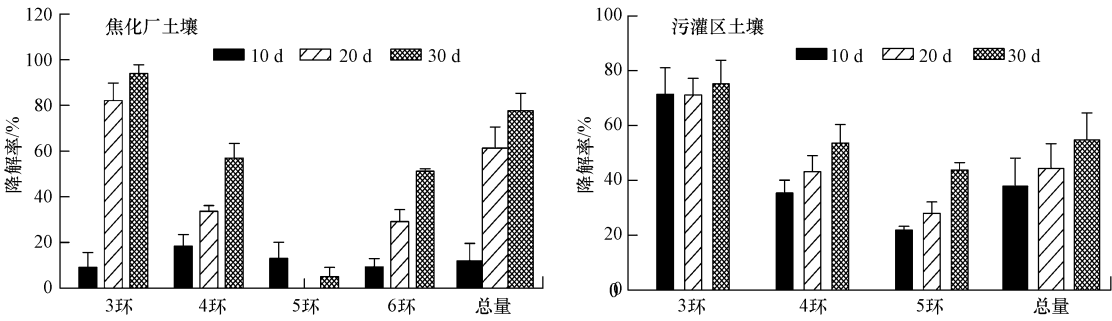


图 2 固定化毛霉对焦化厂和沈抚灌区污染土壤中各环数多环芳烃的降解
Fig. 2 Degradation of PAHs with same rings in coking plant soil and waste water irrigation soil by *Mucor* sp.

环境中多环芳烃的微生物降解和很多因素有关,由表 1、2 可知,焦化厂土壤污染物浓度大,土壤粘度大,有机质含量低,不利于微生物快速发挥其降解性能,这些都影响微生物对污染物的初始降解.当毛霉经过 10 d 的迟滞期后,适应了土壤环境,它的降解效果也得到充分体现.而对于沈抚灌区土壤,因其土质松软,pH 值适中,营养成分充足,微生物刚投加到土壤中就有较好的降解效果.

2.3 多环芳烃的环糊精可提取量

焦化厂土壤中,65% 的 3 环多环芳烃为环糊精可提取部分,其余 4、5、6 环分别为 55%、32% 和 9%,说明各环数多环芳烃随着环数的增加,环糊精可提取性明显下降,总体上 3 环多环芳烃的生物可利用性部分比例较高.沈抚灌区土壤中环糊精对 4 环多环芳烃的提取量最大,3 环和 5 环相对较少.这是因为沈抚灌区土壤主要以 4 环多环芳烃为主要污染物,提取出的 4 环多环芳烃的量相对较多.多环芳烃的分子量大小直接影响其生物可利用性,分子量越高,其水溶性越差,生物可利用性就越低^[6].如图 3 所示,对于焦化厂土壤,多环芳烃降解过程中环糊精提取的多环芳烃总量在第 10 d 最大(158 mg·kg⁻¹),这可能是因为在这 10 d 内微生物作用活化了土壤中的多环芳烃(主要是 3 环多环芳烃),但还不能降解多环芳烃,这也解释了图 2 中多环芳烃降解的迟滞效应.

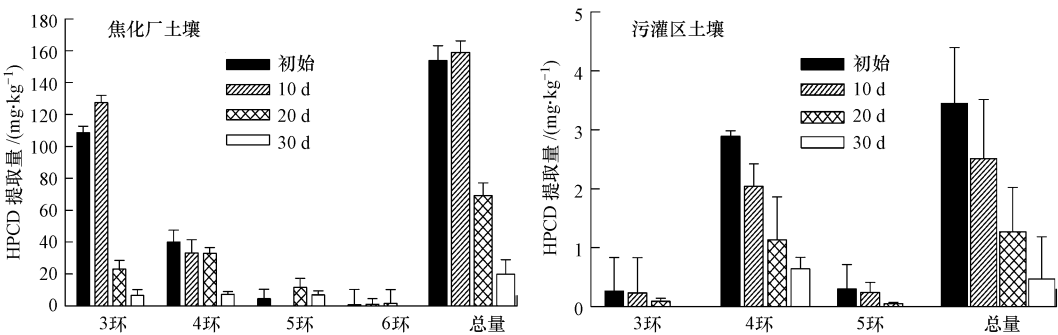


图 3 焦化厂和沈抚灌区污染土壤中各环数多环芳烃的环糊精可提取量
Fig. 3 HPCD extractable amounts of PAHs with same rings in coking plant soil and waste water irrigation soil

随后,因为微生物降解作用,生物可利用多环芳烃(即环糊精提取的多环芳烃总量)逐渐下降.值得注意的是 5 环多环芳烃的环糊精提取量也有升高的现象,这可能同样是因为微生物作用释放,但这些多

环芳烃降解量相对较少. 对于污灌区土壤,多环芳烃降解过程中各环数多环芳烃的环糊精可提取量随着时间的推移呈现明显下降趋势,并没有出现升高的现象,这是因为毛霉对污灌区土壤中各环数多环芳烃均有一定程度的直接降解,未出现降解迟滞效应. 总体上,各环数多环芳烃的环糊精可提取量的变化很好地解释了以上两种不同类型土壤中多环芳烃降解的差异机制.

2.4 多环芳烃降解量和环糊精提取量的相关性

相关性分析表明,焦化厂土壤和污灌区土壤中多环芳烃的 30 d 降解量和环糊精的提取量(针对初始土壤)具有相关性(图 4),相关性方程分别为 $Y = 1.5x - 2.24 (r^2 = 0.97 \ P < 0.0001)$ 和 $Y = 1.33x - 0.17 (r^2 = 0.73 \ P = 0.0018)$,其中 Y 为多环芳烃 30 d 降解量,x 为环糊精提取土壤中多环芳烃的量. 由此说明可以由多环芳烃的环糊精提取量预测多环芳烃的降解量. Stokes 等^[13]也验证了 HPCD 提取与多环芳烃降解具有很强的相关性. 在实际场地污染土壤的评价中,Papadopoulos 等^[14]发现土壤中多环芳烃 HPCD 可提取部分与微生物降解的部分是非常接近的. Hickman 等^[15]则进一步证明了 HPCD 提取可以预测代表性的复杂多介质环境中潜在的 16 种多环芳烃的生物降解. 本研究对两种不同类型土壤进行了对比分析,拓展了 HPCD 提取的应用范围,两个方程系数的差异反映了不同土壤的差别.

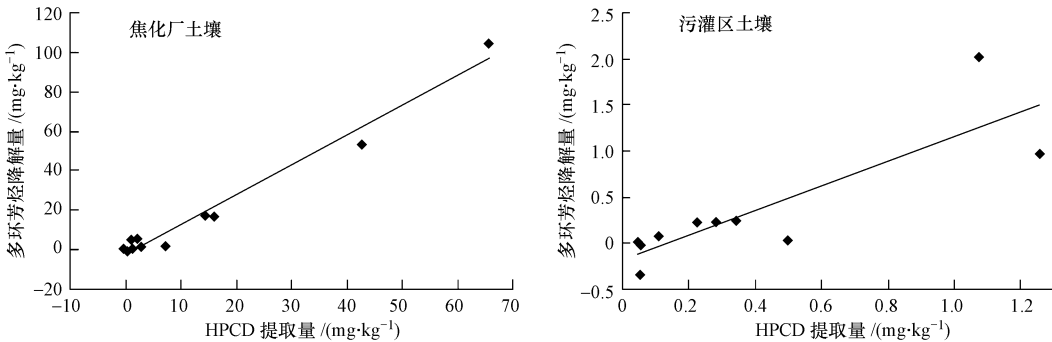


图 4 焦化厂土壤和污灌区土壤中多环芳烃的 30 d 降解量和环糊精提取量的相关分析
Fig.4 Correlations between PAH degraded in 30 days and HPCD extractable amounts in coking plant soil and waste water irrigation soil

3 结论

固定化毛霉对焦化厂和沈抚灌区土壤中的多环芳烃均具有较好的降解效果,3 环多环芳烃的降解率都明显高于 4、5、6 环多环芳烃. 固定化毛霉对焦化厂土壤中的多环芳烃降解具有迟滞效应,沈抚灌区土壤多环芳烃的降解并未出现明显的迟滞效应. 焦化厂污染土壤中多环芳烃(初始浓度 263 mg·kg⁻¹)的 30 d 降解率为 77.6%,沈抚灌区污染土壤中多环芳烃(初始浓度 7.2 mg·kg⁻¹)的 30 d 降解率为 54.2%. 各环数多环芳烃的环糊精可提取量的变化很好地解释了以上两种不同类型土壤中多环芳烃降解的差异机制. 焦化厂土壤和污灌区土壤中多环芳烃的 30 d 降解量和环糊精的提取量具有相关性,可用环糊精提取量预测微生物降解多环芳烃的情况.

参 考 文 献

[1] 王新,李培军,宋守志,等. 固定化微生物对土壤中多环芳烃的降解[J]. 东北大学学报:自然科学版,2005,26(8):783-786
[2] 王晓光,巩宗强,图影,等. 应用脂肪酸甲酯淋洗去除土壤中多环芳烃[J]. 环境化学,2010,29(1):12-17
[3] 刘廷凤,何欢,孙成,等. 农药企业棕地土壤中多环芳烃的分布特征[J]. 环境化学,2011,30(8):1456-1461
[4] 王学军,任丽然,戴永宁,等. 天津市不同土地利用类型土壤中多环芳烃的含量特征[J]. 地理研究,2003,22(3):360-366
[5] Li X J, Li P J, Lin X, et al. Spatial distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils from typical oil-sewage irrigation area, Northeast China[J]. Environ Monitor Assess, 2008, 143(1/3): 257-265
[6] Mallavarapu M, Balasubramanian R, KadiyalaV, et al. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective[J]. Environ Inter, 2011, 37(8): 1362-1375
[7] 张杰,刘永生,冯家勋,等. PAHs 降解菌 ZL5 分离鉴定及其降解质粒[J]. 应用与环境生物学报, 2003,9(4):433-435

- [8] Acevedo F, Pizzul L, Castillo M D, et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracophyllum discolor*[J]. J Hazard Mater, 2011, 185(1):212-219
- [9] Dandie C E, Weber J, Aleer S, et al. Assessment of five bioaccessibility assays for predicting the efficacy of petroleum hydrocarbon biodegradation in aged contaminated soils[J]. Chemosphere, 2010, 81(9): 1061-1068
- [10] Papadopoulos A, Reid B J, Semple K T. Prediction of microbial accessibility of carbon-14-phenanthrene in soil in the presence of pyrene or benzo[a]pyrene using an aqueous cyclodextrin extraction technique[J]. J Environ Qual, 2007, 36(5): 1385-1391
- [11] Ceniglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Biodegradation, 1992, 3:351-368
- [12] 陈来国,冉勇. 多环芳烃生物修复中的表面活性剂[J]. 生态环境, 2004,13(1):88-91
- [13] Stokes J D, Wilkinson A, Reid B J, et al. Prediction of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in contaminated soils using an hydroxypropyl- β -cyclodextrin extraction technique[J]. Environ Toxicol Chem, 2005, 24:1325-1330
- [14] Papadopoulos A, Paton G I, Reid B J, et al. Prediction of PAH biodegradation in field contaminated soils using a cyclodextrin extraction technique[J]. J Environ Monit, 2007,9:516-522
- [15] Hickman Z A, Swindell A L, Allan I J, et al. Assessing biodegradation potential of PAHs in complex multi-contaminant matrices[J]. Environ Pollut, 2008,156:1041-1045

Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial and agricultural soils by immobilized *Mucor* sp. and their bioavailability assessment

LIU Dan^{1,2} GONG Zongqiang^{1*} JIN Jinghua³ LI Xiaojun¹ TAI Peidong¹ LI Peijun¹

(1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, 110016, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China;

3. Environmental Protection Research Institute of Light Industry, Beijing, 100089, China)

ABSTRACT

In order to test the feasibility of microbial remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), immobilized *Mucor* sp. was employed to remediate PAH contaminated industrial and agricultural soils, and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) was used to assess microbial availability of PAHs. Relationships between PAH degradation in 30 days and HPCD extractable amounts of PAHs in coking plant soil (CPS) and waste water irrigation area soil (WIAS) were also analyzed. In 30 days, 77.6% of total PAH was degraded in CPS, and 54.2% of total PAH was degraded in WIAS. PAH degradation in CPS and WIAS was rather different. Good correlations were observed between PAH degradation in 30 days and HPCD extractable amounts of PAHs in both CPS and WIAS. Mechanism for the difference between individual rings of PAH degradation in CPS and WIAS is explained by the HPCD extractable amounts of individual rings of PAHs, demonstrating that PAH degradation in these soils can be predicted by using HPCD extractable amounts of PAHs.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), soil, degradation, hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD), bioavailability, *Mucor* sp.