

焦化厂多环芳烃污染土壤的强化微生物修复研究

卢晓霞, 李秀丽, 马杰, 吴淑可, 陈超琪, 吴蔚

(北京大学城市与环境学院, 地表过程分析与模拟教育部重点实验室, 北京 100871)

摘要: 从北京焦化厂采集了多个多环芳烃(PAHs)污染土壤样品, 目的是从中分离出 PAHs 降解菌并确定其适宜的生存条件, 进行富集培养后, 应用于焦化厂污染土壤的强化微生物修复. 分别以美国 EPA 优先控制的 16 种 PAHs 中的一种为唯一碳源, 采用平板划线法对降解菌进行分离并通过基因分析方法确定其种属, 共获得 7 种 PAHs 降解菌, 这些菌混合在一起, 在适当的浓度条件下, 可对 16 种 2~6 环的 PAHs 进行降解. 在液体培养基中 16 种 PAHs 总浓度 ($\sum \text{PAH}_{16}$) 为 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 单一菌即可生长良好且具有降解活性, 但当 $\sum \text{PAH}_{16}$ 为 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 不论是单一菌还是混合菌(7 种 PAHs 降解菌), 其生长和活性均受到抑制. 针对北京焦化厂污染土壤, 设计了 5 组处理, 即对照(C)、添加营养物(N)、添加营养物和降解菌(N+B)、添加营养物和表面活性剂(N+S)、以及添加营养物、降解菌和表面活性剂(N+B+S). 经过 5 周的实验, 与 C 组相比, N+B 组 16 种 PAHs 的去除率平均提高了 32%, N+B+S 组 16 种 PAHs 的去除率平均提高了 46% (其中 10 种 4~6 环 PAHs 的去除率平均提高了 52%). 添加 PAHs 降解菌和表面活性剂可明显增强土壤中 PAHs 的降解. 本研究为北京焦化厂及其它焦化厂 PAHs 污染土壤的强化微生物修复提供了依据.

关键词: 焦化厂; 多环芳烃污染土壤; 多环芳烃降解菌; 微生物降解; 强化微生物修复

中图分类号: X172; X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)03-0864-06

Enhanced Bioremediation of Coking Plant Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

LU Xiao-xia, LI Xiu-li, MA Jie, WU Shu-ke, CHEN Chao-qi, WU Wei

(Laboratory for Earth Surface Processes, College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Soil samples contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were collected from Beijing Coking Plant. The purposes were to isolate PAHs degrading bacteria from the soils, determine their appropriate living condition, enrich them and apply them in the enhanced bioremediation of the contaminated soils. Using each of the 16 USEPA priority PAHs as the sole carbon source, PAHs degrading bacteria were isolated using the method of plate streaking and identified by genetic analysis. In total seven species of PAHs degrading bacteria were obtained. When mixed, these bacteria could degrade the 16 (2-6 cyclic) PAHs studied at appropriate concentrations. In the liquid medium, when the total concentration of the 16 PAHs ($\sum \text{PAH}_{16}$) was 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$, single bacteria could grow well and degrade the PAHs. However, when $\sum \text{PAH}_{16}$ was 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the growth and activity of either single PAHs degrading bacteria or a mixture of the seven PAHs degrading bacteria were inhibited. Aiming at the contaminated soils from Beijing coking plant, five treatments were performed, i. e., control (C), addition of nutrient (N), addition of nutrient and PAHs degrading bacteria (N+B), addition of nutrient and surfactant (N+S), addition of nutrient and PAHs degrading bacteria and surfactant (N+B+S). After five weeks of experiment, compared to the C treatment, the mean removal rate of the 16 PAHs in the N+B treatment was increased 32%, and the mean removal rate of the 16 PAHs in the N+B+S treatment was increased 46% (the mean removal rate of the 10 4-6 cyclic PAHs was increased 52%). The addition of PAHs degrading bacteria and surfactant could significantly enhance the degradation of PAHs in the soils. This study provides evidence for the enhanced bioremediation of PAHs contaminated soil for Beijing coking plant and other coking plants.

Key words: coking plant; PAHs contaminated soil; PAHs degrading bacteria; biodegradation; enhanced bioremediation

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是焦化企业污染土壤中最常见的一类污染物^[1,2]. PAHs 为 2 个或 2 个以上芳环稠合在一起的一类化合物, 它们具有毒性, 有的甚至能够致癌 (5~6 环的 PAHs)^[3]. 为了保护生态系统和人体健康, 有必要对 PAHs 污染土壤进行修复. 可采用的修复方法包括物理法 (如土壤蒸汽浸提、热脱附)、化学法 (如化学氧化、土壤淋洗)、以及生物法 (如微生物

修复、植物修复), 其中利用微生物代谢活性去除污染物的微生物修复被认为是最经济有效且环境友好的一种方法^[4].

关于 PAHs 的微生物降解, 已有研究显示, 主要

收稿日期: 2010-03-26; 修订日期: 2010-05-25

基金项目: 北京市科学技术委员会重大项目 (D08040600360803); 国家自然科学基金项目 (40871214); 霍英东教育基金项目 (114043)

作者简介: 卢晓霞 (1972 ~), 女, 博士研究生, 副教授, 主要研究方向为污染环境修复, E-mail: luxx@urban.pku.edu.cn

有两类菌可降解 PAHs, 即细菌和真菌^[5]. PAHs 微生物降解的难易度取决于其化学结构的复杂性和降解酶的适应程度. 许多细菌可以 2~3 环 PAHs 为唯一碳源, 只有少数几种菌如红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)、鞘氨醇菌属 (*Sphingomonas* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium* sp.) 等可以 4 环 PAHs 为唯一碳源. 更高环(4 环以上) PAHs 多以共代谢的方式被降解^[6,7]. PAHs 的微生物降解受多种因素的影响, 包括微生物种类和数量、污染物的浓度、以及环境条件如温度、电子受体、营养盐、pH、含水率等. PAHs 的浓度对微生物降解有一定制约. 浓度过高, 会对微生物产生毒害作用; 浓度过低, 微生物细胞内完成反应的调节机制不易启动. 此外, PAHs 为强疏水性物质, 易被土壤颗粒吸附或被其它作用固定, 隔断了其与专性微生物和酶的直接接触^[8]. 在 PAHs 污染土壤的微生物修复中, 通常采用添加氧源、氮磷营养物、PAHs 降解菌、表面活性剂、共代谢底物等方法来强化修复效果^[9~12].

微生物修复成功与否在很大程度上取决于污染土壤的环境条件、污染物性状、以及微生物特征. 对于任何污染场地, 在工程化修复之前应对所选技术的可行性进行研究. 本研究目的是针对北京焦化厂 PAHs 污染土壤的现状, 从当地土著菌中分离出 PAHs 降解菌并确定其适宜的生存条件, 进行富集培养后, 应用于该地污染土壤的强化微生物修复. 应用聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术对所分离菌的纯度进行验证, 在 PAHs 降解菌的分离研究中是一个创新. 对污染土壤多种处理方式进行比较是本研究的特色. 研究成果对北京焦化厂及其它焦化厂 PAHs 污染土壤的修复具有指导意义.

1 材料与方法

1.1 土壤采集与分析

实验土壤采自位于北京市东南郊垡头地区的北京焦化厂. 该厂于 1958 年建成、2006 年停产, 在 48 a 的生产过程中, 造成了严重的土壤环境污染, 其中 PAHs 是土壤中主要的一类污染物. 采集了两类土样: 一是表层污染土壤, 因其微生物量较多, 本研究中用于 PAHs 降解菌的筛选与分离; 一是深层污染土壤(地面以下 6~8.7 m), 因其浓度较低而范围较大, 本研究中用于污染土壤的强化微生物修复实验. 深层土壤通过工程钻机打孔取样获得.

对土样的理化性质和微生物数量进行了分析. 根据常规方法对土壤的理化性质如有效氮、有效磷、总有机碳、pH 和含水量等进行测定. 采用气相色谱-质谱法测定土壤中的 PAHs 类型与含量^[13]. 采用最可然数法测定土壤中的异养微生物数量.

1.2 PAHs 降解菌的筛选、分离与鉴定

取焦化厂表层污染土壤, 接种到 LB 培养基中^[14], 培养 1 周. 然后分别以美国环保局优先控制的 16 种 PAHs(萘、苊烯、苊、芴、菲、蒽、荧蒽、芘、苯并蒽、蒽、苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、苯并[a]芘、茚并[1,2,3-cd]芘、二苯并蒽、苯并[ghi]芘)为唯一碳源, 按照平板划线法对不同 PAHs 降解菌进行分离. 培养一周后, 挑取单菌落到以相应 PAHs 为唯一碳源的液体培养基中, 培养数天后, 根据蛋白酶 K 法提取其 DNA^[15], 用细菌 16S rRNA 基因通用引物 (F27: 5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3', R1 492: 5'-TACGYTACCTTGTACGACT-3') 对提取的 DNA 进行 PCR^[10]. 配制 1.5% 琼脂糖凝胶, 取 3 μ L PCR 产物与 0.6 μ L 6 \times 缓冲液混合上样. 用 100 V 恒压电泳 40 min, 在凝胶成像系统中显像, 观测 DNA 产物, 目的片段约 1 500 bp.

为了验证分离的菌是否为纯菌, 通过 DGGE 对扩增产物进行分析. 扩增采用带 GC 夹的细菌 16S rRNA 基因通用引物 (F341: 5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3', R518: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). 在基因突变分析系统 (INGENYphorU System) 中, 将 DNA 扩增产物 40 μ L 和 6 \times 载样缓冲液 8 μ L 混匀后用 50 μ L 注射器注入孔道. 60 $^{\circ}$ C、100 V 高压预电泳 5 min, 然后打开循环水泵, 换成 60 $^{\circ}$ C、70 V 恒温恒压电泳 16 h 以上. 取出胶体浸入 3 L EB 染液中, 避光染色 45 min, 换至清水中避光脱色 20 min 后, 在凝胶成像系统观察 DNA 条带.

确定为纯的菌种, 取其 1 500 bp 的扩增产物进行测序. 所得结果与美国国立生物信息中心的基因库进行比对, 确定其种属.

1.3 PAHs 降解菌的富集培养

将不同 PAHs 降解菌按相同量混合在一起, 利用 7 L 发酵罐装置 (BIOTECH-7BG) 进行富集培养. 培养液体积为 3 L, 每升培养液包含如下组分: 1 g NH_4Cl 、0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 g 酵母膏、20 mL 1 mol/L 磷酸缓冲液、1 mL 微量元素贮备液、以及 2 mL 煤焦油(16 种 PAHs 总浓度约为 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 单种 PAHs 浓度约为

0.20 ~ 6.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 培养 2 周, 培养期间以 3 mL/min 的流量不断向罐内曝空气, 发酵罐搅拌器转速为 300 r/min. 定期取样测定培养液中 PAHs 的含量变化.

1.4 PAHs 降解菌对 PAHs 的耐受性

利用 20 mL 顶空瓶对单一菌(以微杆菌为代表)和混合菌(7 种 PAHs 降解菌)对 PAHs 的耐受性进行了研究. 顶空瓶中液体培养基的体积为 10 mL, 除 PAHs 含量不同之外, 其它组分同发酵罐中培养液. 对于单一菌, 设计了 2 个浓度水平, 即 16 种 PAHs 总浓度分别为 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (单种 PAHs 浓度分别为 0.01 ~ 5.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.22 ~ 29.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 对于混合菌, 16 种 PAHs 总浓度为 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (单种 PAHs 浓度约为 1.22 ~ 29.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 设置了一系列的顶空瓶(瓶口密封以防止 PAHs 挥发, 每周向瓶内注入 1 mL 空气), 常温振荡培养. 每 3 d 取 1 个顶空瓶, 用 15 mL 正己烷分 3 次对顶空瓶中的全部培养液进行萃取, 采用气相色谱-质谱仪法对萃取液(1 mL)进行测定.

1.5 污染土壤中 PAHs 的微生物降解

实验设置 1 个对照组和 4 个处理组, 每组设计 6 次采样, 每次采样取 2 个平行样, 具体如下.

对照组(C): 在小桶中加入 180 g 土, 用加样枪移取 14.76 mL 高纯水, 搅拌均匀, 然后平均分装在 12 个 150 mL 三角瓶中, 用铝箔密闭瓶口.

添加营养物组(N): 在小桶中加入 180 g 土, 用加样枪移取 13.66 mL 高纯水和 1.1 mL 营养液(0.126 mol/L NH_4Cl 和 0.012 6 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液), 搅拌均匀, 然后平均分装在 12 个 150 mL 三角瓶中, 用铝箔密闭瓶口.

添加营养物和降解菌组(N+B): 在小桶中加入

180 g 土, 用加样枪移取 13.66 mL 混合降解菌液和 1.1 mL 营养液, 搅拌均匀, 然后平均分装在 12 个 150 mL 三角瓶中, 用铝箔密闭瓶口.

添加营养物和表面活性剂组(N+S): 在小桶中加入 180 g 土, 用加样枪移取 13.66 mL 高纯水, 1.1 mL 营养液和 75 μL 吐温 80(非离子表面活性剂), 搅拌均匀, 然后平均分装在 12 个 150 mL 三角瓶中, 用铝箔密闭瓶口.

添加营养物、降解菌和表面活性剂组(N+B+S): 在小桶中加入 180 g 土, 用加样枪移取 13.66 mL 混合降解菌液, 1.1 mL 营养液和 75 μL 吐温 80, 搅拌均匀, 然后平均分装在 12 个 150 mL 三角瓶中, 用铝箔密闭瓶口.

将上述 60 个三角瓶装入纸箱中, 放在暗室避光培养. 每隔 1 周加水, 保持土壤含水率在 15% 左右. 每周从各组中取 1 次样(2 个三角瓶, 平行), 对三角瓶中的全部土壤进行 PAHs 的含量分析.

2 结果与讨论

2.1 焦化厂污染土壤的理化性质、PAHs 含量和微生物数量

土壤采样分 2 次进行. 第 1 次从北京焦化厂采了 6 个表层污染土壤样品, 并对其理化性质、PAHs 含量和微生物数量进行了分析. 第 2 次从北京焦化厂采了田字形 9 个钻孔点的垂直剖面样品(大多数钻孔点总取样深度为 13 m, 每 1m 取 1 个样), 对田字四角和中心的 5 个钻孔点的样品进行了理化性质和微生物数量分析. 取其中 6 个深度在 6 ~ 8.7 m 的样品(样品量较多且具有代表性)用于本研究中的强化微生物修复实验, 对其 PAHs 含量进行了测定. 结果见表 1.

表 1 污染土壤的理化性质、PAHs 含量和微生物数量

Table 1 Physicochemical property, PAHs concentration and microbial number of the contaminated soil

污染土壤	有效氮/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	有效磷/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	总有机碳/%	pH	PAH ₁₆ / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	微生物数/ $\text{个}\cdot\text{g}^{-1}$
表层 6 个样	16.3 ~ 179.4	0.58 ~ 2.55	2.0 ~ 15.9	4.5 ~ 8.2	122.1 ~ 791.2	10^8
深层 6 个样	12.9 ~ 107.9	0.05 ~ 7.74	0.10 ~ 1.11	6.2 ~ 6.8	58.0 ~ 400.3	10^7

不同类型的 PAHs(2 ~ 6 环)在污染土壤中均有检出, 且大多数浓度均在 10 mg/kg 以上, 在污染较严重的土壤中, 中高环的 PAHs 浓度均接近或高于 100 mg/kg . 总体上, 表层土壤中 PAHs 的含量高于深层土壤, 表层土壤中的微生物数量高于深层土壤. 表层土壤的 pH 值波动较大, 这与其受外界影响较

大有关. 个别样点总有机碳含量较高, 可能是样品中存在焦油渣. 据了解, 焦化厂的污染源有废气、废水和固体废物, 其中固体废物主要为焦化厂产生的焦油渣、焦尘等. 除 PAHs 外, 焦化厂污染土壤中通常还含有苯系物、挥发酚、杂环芳香烃、各类烷烃等物质. 本研究主要针对 PAHs 进行. 氮、磷是微生物生

长所必需的元素. 根据土壤的总有机碳和 PAHs 含量, 按照 C: N: P 为 100: 10: 1 计算^[16], 可知土壤中氮和磷营养物相对缺乏, 有碍 PAHs 的微生物降解.

2.2 PAHs 降解菌的分离与富集

分别以萘 (NAP)、蒽 (ANY)、芘 (ANE)、芴 (FLE)、菲 (PHE)、蒽 (ANT)、荧蒽 (FLA)、芘 (PYR)、苯并蒽 (BaA)、蒽 (CHR)、苯并 [b] 荧蒽 (BbF)、苯并 [k] 荧蒽 (BkF)、苯并 [a] 芘 (BaP)、茚并 [1, 2, 3-cd] 芘 (IcdP)、二苯并蒽 (DahA)、苯并 [ghi] 芘 (BghiP) 为唯一碳源, 经过多次平板划线, 从表层污染土壤中分离出 7 种 PAHs 降解菌, 即赤红球菌 (*Rhodococcus* sp.)、微杆菌 (*Microbacterium* sp.)、苍白杆菌 (*Ochrobactrum* sp.)、博特氏菌 (*Bordetella* sp.)、黏质沙雷氏菌 (*Serratia* sp.)、鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium* sp.) 和假黄色单胞菌属 (*Pseudoxanthomonas* sp.). 同一种菌可以不同 PAHs 为生长基质, 例如, 分别以 BaP、BbF 和 BkF 为唯一碳源, 均可从污染土壤中分离得到微杆菌. 另一方面, 同一 PAH 可以被不同的菌降解, 例如, 以 BbF 为唯一碳源, 可分离得到赤红球菌、微杆菌和鞘氨醇杆菌. 关于这些菌对 PAHs 的降解, 也有一些报道^[17-21].

越来越多的研究表明, PAHs 降解菌群的作用强于单一 PAHs 降解菌^[22]. 因此, 本研究中将所得 7 种 PAHs 降解菌混合在一起, 利用发酵罐进行富集培养, 以煤焦油作为碳源, 考察混合的 PAHs 降解菌对培养液中 PAHs 的降解情况, 结果见图 1. 在为期 2 周的培养中, 除 NAP、ANY 和 ANE 外, 其它 PAHs 在培养液中的浓度都经历了一个先上升后降低的过程. 在培养初期, 煤焦油浮在水面, 而发酵罐的取样管口是通向底部, 因此测定的 PAHs 偏低. 随着菌体的生长和代谢, 可能产生一些具有表面活性的分泌物, 使煤焦油发生乳化, 在水中的分布均匀, 因而测

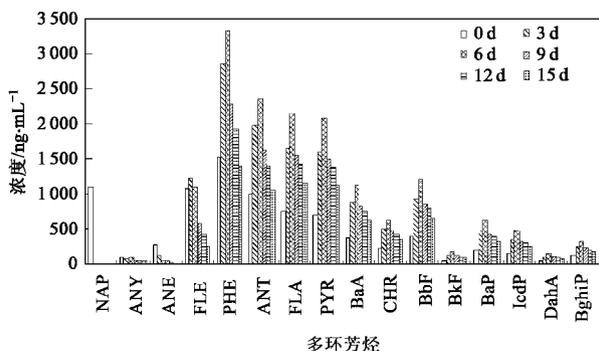


图 1 发酵罐培养液中 PAHs 随时间的变化

Fig. 1 Change of PAHs concentrations over time in the fermentor

定的 PAHs 浓度升高. 例如, Nayaka 等^[23]报道假黄色单胞菌可产生生物表面活性剂. 随着菌量的进一步增多及其代谢活性的增强, 对各种 (2 ~ 6 环) PAHs 的降解增多, 使得 PAHs 浓度逐渐降低. 培养后期, PAHs 降解菌的数量约为 10^5 个/mL.

2.3 PAHs 降解菌对 PAHs 的耐受性

以微杆菌为代表, 通过摇瓶实验, 研究了单一菌对 PAHs 的耐受性. 在培养液中 16 种 PAHs 初始总量为 $17 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的条件下, 经过 21 d 的培养, 微杆菌对 2 ~ 3 环的 PAHs (NAP、ANY、ANE、FLE、PHE 和 ANT) 有明显降解, 去除率分别为 75%、52%、58%、49%、26% 和 72%. 除 BkF 外, 其它 4 ~ 6 环的 PAHs 均无明显降解. 这表明当低环和高环的 PAHs 共存时, 微杆菌优先利用低环的 PAHs.

在 16 种 PAHs 初始总量为 $166 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的条件下, 在 21 d 的培养期间, 16 种 PAHs 均无明显降解, 且没有观察到微杆菌的生长, 这表明高浓度的 PAHs 毒性大, 抑制了降解菌的生长和活性. 同样地, 在 16 种 PAHs 初始总量为 $166 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的条件下, 混合菌的生长和活性也受到了抑制. 经过 21 d 的培养, 除 NAP 外, 其它 PAHs 均无明显降解.

2.4 PAHs 污染土壤的强化微生物修复

土壤中的 PAHs 以多种形态存在, 如水溶态、结合态、纯相态等, 其中对生物有效的主要为水溶态和弱结合态. PAHs 的 $\lg K_{oc}$ 为 2.4 ~ 7.0 (平均 4.7)^[24], 根据土壤中 PAHs 总量 (58.0 ~ 400.3 mg/kg, 平均 229.15 mg/kg) 和土壤总有机碳含量 (0.10% ~ 1.11%, 平均 0.61%), 按照公式 $K_d = K_{oc} \times f_{oc} = c_{\text{土壤}}/c_{\text{水}}$ 可大致估算土壤水相中 PAHs 总量约为 $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$, 远低于对降解菌的致毒浓度水平.

土壤中有机污染物的微生物降解受多种因素影响, 如水分含量、氮磷营养物含量、氧含量、降解菌数量、以及污染物的生物有效性等. 设计了 5 组实验, 分别为对照组 (C)、添加营养物组 (N)、添加营养物和降解菌 (N + B)、添加营养物和表面活性剂 (N + S)、以及添加营养物、降解菌和表面活性剂 (N + B + S). 实验进行了 5 周, 每周取 1 次样, 共计 6 次 (包括初始时的取样). 降解菌为分离所得 7 种 PAHs 降解菌的混合物, 表面活性剂为吐温 80. 实验期间通过定期加水保持土壤含水率在 15% 左右.

由于实验土壤是由采自 6 个点的土样混合而成 (其中 4 个土样为砂质土, 2 个土样为黏质土), 导

致 PAHs 在各个组的分布不够均匀,不同时间测定结果的波动较大. 尽管如此,在整个实验期间,不同组之间显示了较明显的差异,且这种差异在不同种类的 PAHs 中都有体现. 图 2 给出了不同组中 ANY (3 环)、PYR (4 环)、BbF (5 环) 和 BghiP (6 环) 去除

率随时间的变化. 总体上,在添加了降解菌的组中,各类 PAHs 的去除率比未添加降解菌的组中高. 表面活性剂的加入,进一步提高了各类(尤其是高环) PAHs 的降解,其原因可能是表面活性剂提高了土壤中 PAHs 的生物有效性. 这与文献报道的结果一致^[25,26].

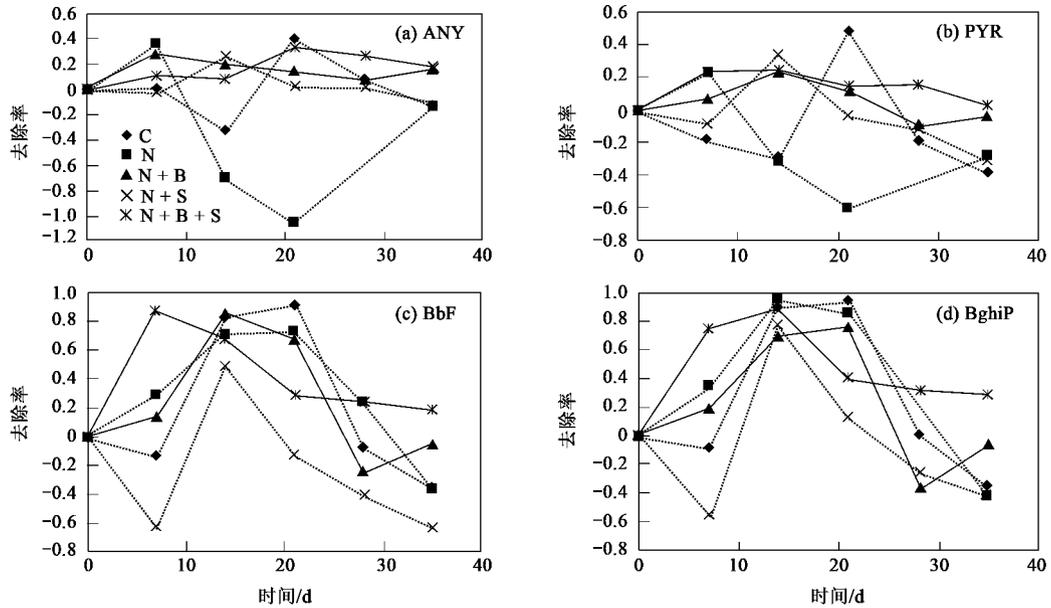


图 2 不同组中各类 PAHs 去除率随时间的变化

Fig. 2 Change of removal rates of various PAHs over time in different treatments

为了进一步比较不同组中不同 PAHs 去除率的差别,计算了各处理组相对于对照组的去除率增量(文中定义为“相对去除率”). 图 3 为实验 5 周后,各处理组中 16 种 PAHs 相对于对照组中的去除率.

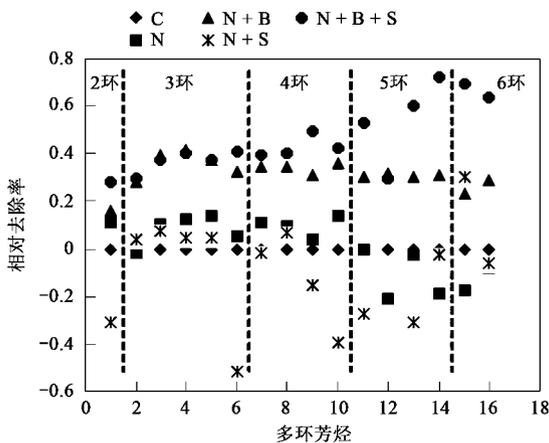


图 3 各处理组中 16 种 PAHs 相对于对照组中的去除率

Fig. 3 Relative removal rates of various PAHs in different treatments

可以看出,添加营养物,促进了土壤中 PAHs 的降解,但仅限于中低环的 PAHs. 降解菌的添加明显提高了土壤中各类 PAHs 的去除率,与对照相比,去除率平均提高了 32% (低环和高环 PAHs 的去除率提高幅度基本相同). 在添加了降解菌和表面活性剂的情况下,PAHs 的去除率进一步提高(与对照相比,去除率平均提高了 46%),尤其是高环 PAHs 的去除率提高幅度较大(与对照相比,10 种 4~6 环 PAHs 的去除率平均提高了 52%). 在添加营养物和表面活性剂的组中,土壤中某些(尤其是高环的) PAHs 浓度上升,相应地,其相对去除率表现为负值. 可见,吐温 80 对土壤中 PAHs 有良好的脱附作用.

3 结论

(1) 北京焦化厂污染土壤中 PAHs 含量高达数百 mg/kg,其中约有一半是 4~6 环具有致癌性的物质. 表层土壤中 PAHs 含量较深层土壤中高,表层土壤中异养微生物数量也较深层土壤中多. 土壤中氮磷营养物质含量较低,不能满足 PAHs 降解菌的需要.

(2)从北京焦化厂表层污染土壤中分离得到 7 种 PAHs 降解菌,分别为微杆菌、赤红球菌、苍白杆菌、博特氏菌、假黄色单胞菌、黏质沙雷氏菌、以及鞘氨醇杆菌属。这 7 种 PAHs 降解菌混合在一起,在适当浓度条件下,可降解 2~6 环的各类 PAHs。当培养液中 16 种多环芳烃总浓度为 166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,则抑制了降解菌的生长和活性。

(3)改善污染土壤的营养条件、添加 PAHs 降解菌和表面活性剂吐温 80,对污染土壤中 PAHs 的微生物降解有明显的强化作用,可在 5 周内使实验土壤中 16 种 PAHs 的去除率平均提高 46%,其中 10 种 4~6 环 PAHs 的去除率平均提高 52%。

致谢:土壤样品的采集得到中国科学院地理科学与资源研究所和北京市勘察设计研究院有关人员的帮助,在此作者向他们表示感谢。

参考文献:

[1] 冯嫣,吕永龙,焦文涛,等.北京市某废弃焦化厂不同车间土壤中多环芳烃(PAHs)的分布特征及风险评价[J].生态毒理学学报,2009,4(3):399-407.

[2] 刘大猛,王玮,李运勇.首钢焦化厂环境中多环芳烃分布赋存特征研究[J].环境科学学报,2004,24(4):746-749.

[3] Cerniglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Biodegradation, 1992, 3:351-368.

[4] Bamforth S M, Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons; current knowledge and future directions [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005, 80: 723-736.

[5] 丁克强,骆永明.多环芳烃污染土壤的生物修复[J].土壤,2001,4:169-178.

[6] 张银萍,王芳,杨兴伦,等.土壤中高环多环芳烃微生物降解的研究进展[J].微生物学通报,2010,37(2):280-288.

[7] Kanaly R A, Harayama S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(8):2059-2067.

[8] 安淼,周琪,李晖.土壤污染生物修复的影响因素[J].土壤与环境,2002,11(4):397-400.

[9] 程国玲,李培军,王凤友,等.多环芳烃污染土壤生物修复的强化方法[J].环境污染治理技术与设备,2005,6(6):1-6.

[10] Hamdi H, Benzarti S, Manusadzianas L, et al. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39:1926-1935.

[11] Mancera-Lopez M E, Esparza-Garcia F, Chavez-Gomez B, et al. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with

filamentous fungi [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 61:151-160.

[12] Jacques R J S, Okeke B C, Bento F M, et al. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil [J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 2637-2643.

[13] 崔艳红,朱雪梅,郭丽青.天津污灌区土壤中 PAHs 的提取、净化和测定[J].环境化学,2002,21(4):392-396.

[14] 萨姆布鲁克·J, 拉塞尔·D·W. 分子克隆实验指南[M].北京:化学工业出版社,2008.1595.

[15] 胡晓红,彭惠民,刘昕,等. PCR 及 Real-time PCR 评价细菌 DNA 提取方法[J].重庆医科大学学报,2008,33(2):15-158.

[16] 邢维芹,骆永明,李立平.影响土壤中 PAHs 降解的环境因素及促进降解的措施[J].土壤通报,2007,38(1):173-178.

[17] Wu Y R, He T T, Zhong M Q, et al. Isolation of marine benzo [a] pyrene-degrading *Ochrobacterium* sp. BAP5 and proteins characterization [J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21:1446-1451.

[18] Yuan S Y, Su L M, Chang B V. Biodegradation of phenanthrene and pyrene in compost-amended soil [J]. Journal of Environmental Science and Health, part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 2009, 44(7): 648-653.

[19] Hultgren J, Pizzul L, Castillo M P, et al. Degradation of PAH in a creosote-contaminated soil: A comparison between the effects of willows (*Salix viminalis*), wheat straw and a nonionic surfactant [J]. International Journal of Phytoremediation, 2010, 12(1):54-66.

[20] 王春明,李大平,王春莲.微杆菌 3-28 对萘、菲、蒽、芘的降解 [J].应用与环境生物学报,2009,15(3):361-366.

[21] Klankeo P, Nopcharoenkul W, Pinyakong O. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(6):488-495.

[22] 毛健,骆永明,腾应,等.高分子量多环芳烃污染土壤的菌群修复研究[J].土壤学报,2010,47(1):163-167.

[23] Nayaka A, Vijaykumar A M H, Karegoudar T B. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009, 63(1):73-79.

[24] 朴海善,陶澍,胡海英,等.有机化合物 K_{oc} 片段常数估算模型的误差与稳健性分析[J].环境科学,1999,20(4):28-32.

[25] 丁娟,罗坤,周娟,等.表面活性剂 Tween 80 和 β -环糊精对白腐菌降解多环芳烃的影响[J].南京大学学报(自然科学版),2007,43(5):561-566.

[26] 刘魏魏,尹睿,林先贵,等.生物表明活性剂-微生物强化紫花苜蓿修复多环芳烃污染土壤[J].环境科学,2010,31(4): 1079-1084.