

菇渣和鼠李糖脂联合强化苜蓿修复多环芳烃污染土壤

张晶^{1,2}, 林先贵^{1,2*}, 李烜桢^{1,3}, 尹睿^{1,2}

(1. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008; 2. 南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室, 南京 210008; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:采用植物生物量、多环芳烃含量、土壤微生物数量、土壤酶活性和土壤微生物功能多样性等多个指标,通过菇渣、鼠李糖脂和植物的单独及联合作用的盆栽试验,评价了苜蓿和鼠李糖脂联合强化苜蓿修复多环芳烃(PAHs)污染土壤的效果.结果表明,60 d内,苜蓿单独修复(AL)的降解率仅为14.43%,苜蓿、鼠李糖脂联合苜蓿修复(GZ + RH_{0.5} + AL和GZ + RH_{1.0} + AL)显著提高了PAHs降解率,达到了32.64%和36.95%,比AL处理提高了115.45%和156.06%.与AL相比,GZ + RH_{1.0} + AL对植物生物量提高程度最大,地上和地下生物量分别达到了1.05 g/盆和0.20 g/盆.在修复过程,GZ + RH_{1.0} + AL显著提高了土壤细菌和真菌的数量,分别达到了 31.37×10^6 CFU·g⁻¹和 5.86×10^6 CFU·g⁻¹,特别是多环芳烃降解菌数量达到了 39.57×10^5 MPN·g⁻¹,分别是对照(CK)和植物单独处理(AL)的29倍和4倍.就土壤脱氢酶活性而言,苜蓿和苜蓿联合作用(GZ + AL)处理的活性最高,GZ + RH_{0.5} + AL和GZ + RH_{1.0} + AL的活性次之,分别为90.57、67.56和21.02 μg/(g·d).此外,与对照(CK)相比,苜蓿、鼠李糖脂和苜蓿的联合作用(GZ + RH_{1.0} + AL)显著提高了土壤微生物群落的功能多样性.因此,苜蓿和鼠李糖脂联合强化苜蓿修复PAHs污染土壤达到了比较理想效果,大面积田间试验有待进一步验证该方法的可行性.

关键词:多环芳烃;土壤;植物修复;苜蓿;鼠李糖脂

中图分类号:X53 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)10-2431-08

Interactive Effect of Spent Mushroom Compost and Rhamnolipids to Enhance the Efficiency of Alfalfa Remediation of Aged PAHs Contaminated Soil

ZHANG Jing^{1,2}, LIN Xian-gui^{1,2}, LI Xuan-zhen^{1,3}, YIN Rui^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Joint Open Laboratory of Soil and the Environment, Institute of Soil Science and Hongkong Baptist University, Nanjing 210008, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of the most widespread organic pollutants, which distributed widely in soil and sediment. Pot experiment was conducted to improve efficiency of phytoremediation using alfalfa (*Medicago sativa* L.) in aged PAHs contaminated soil by introducing spent mushroom compost and rhamnolipids. Plant biomass, PAHs concentrations, number of soil microorganism, soil enzyme activity and soil microbial functional diversity were determined after 60 days of alfalfa growth. The results showed that within 60 days, removal ratio of PAHs in treatment of alfalfa alone (AL) reached to 14.43%, while removal ratio of PAHs in treatments of "GZ + RH_{0.5} + AL" and "GZ + RH_{1.0} + AL" reached to 32.64% and 36.95%, which were 115.45% and 156.06% higher than that of phytoremediation. Contrasted to the control, the treatment of "GZ + RH_{1.0} + AL" had more plant biomass than others, shoot and root dry weight were 1.05 g/pot and 0.20 g/pot, respectively. During the process of phytoremediation, the number of soil bacteria and fungi were greatly increased by "GZ + RH_{1.0} + AL" and reached to 31.37×10^6 CFU·g⁻¹ and 5.86×10^6 CFU·g⁻¹, especially the number of PAHs-degrading bacteria reached to 39.57×10^5 MPN·g⁻¹, which were 29 times more than control treatment and 4 times more than treatment of alfalfa alone (AL). Moreover, soil dehydrogenase activity and the functional diversity of soil microbial community were increased significantly by the treatment of "GZ + RH_{1.0} + AL", respectively. Therefore, interaction of spent mushroom compost and rhamnolipids to enhance the phytoremediation efficiency had satisfied results in removal aged PAHs from an agricultural soil, the feasibility of this method needed to be further proved by large-area scale field experiment.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); soil; phytoremediation; spent mushroom compost; rhamnolipids

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类广泛存在于土壤、沉积物等环境中的有机污染物,具有致癌、致畸和致突变性,并能在环境中持久存在,因此受到广泛的关注.近年来,长江、珠江三角洲和京津塘等经济发达地区和东北的老工业基地等,越来越多的农田土壤环境由于污

水灌溉和大气沉降等原因受到PAHs的严重污

收稿日期:2009-11-23;修订日期:2010-01-14

基金项目:国家自然科学基金项目(40801091);国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA061101)

作者简介:张晶(1979~),女,博士,助理研究员,主要研究方向为污染土壤生物修复技术,E-mail: zhangj79@issas.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: xglin@issas.ac.cn

染^[1,2]. 土壤 PAHs 污染不仅影响土壤生态系统的健康, 还通过食物链等多种途径影响人类的身体健康, 因此土壤 PAHs 污染受到政府和社会的广泛重视^[3], PAHs 污染土壤修复研究已成为国际土壤环境技术领域的研究重点.

植物修复技术是近年来发展起来的一种主要用于清除环境中有毒污染物的绿色修复技术, 通过根际微生物的协同作用, 修复不同污染类型的土壤. 该方法具有投资低、操作简单、无二次污染以及可用于大面积的污染治理等优点^[4]. 但是, 由于土壤中 PAHs 的生物可利用性较低, 植物修复的效率在短期内往往有一定的局限. 表面活性剂可以有效促进 PAHs 类有机污染物从土壤颗粒上解吸, 从而有助于提高该类有机污染物的生物可利用率和降解速率^[5]. 与化学表面活性剂相比, 生物表面活性剂鼠李糖脂除具备表面活性剂的特性, 还具有环境友好、无二次污染等特点, 在环境修复领域具有很大的潜在应用前景^[6]. 菇渣多指栽培各种食用菌后剩下的固体废弃物, 其含有蛋白质、氨基酸、菌体蛋白、酶等可以再利用的成分, 特别是包括漆酶、木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶在内的丰富氧化还原酶资源, 为其在环境修复领域的广泛应用提供了有力支持^[7,8].

目前, 国内对植物修复 PAHs 污染土壤的强化方法, 主要集中在外源投加具有降解功能的微生物菌剂、使用化学表面活性剂、调整土壤 C/N 等措施^[9], 利用有机废弃物 $\bar{i}$ 和生物表面活性剂联合强化植物修复 PAHs 污染土壤鲜见报道. 本研究从有机废弃物资源化处理以及环境友好修复的角度, 利用双孢菇菇渣和鼠李糖脂联合强化植物修复 PAHs 污染农田土壤, 通过植物生物量、PAHs 含量、土壤酶活性、微生物数量和功能多样性等指标来综合评价其修复效果.

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土壤: 采自江苏无锡安镇由于多年化工废水 PAHs 污染的某农田, 多点采集表层土壤 (0 ~ 20 cm), 剔除植物根系、石砾等残留物, 过 2 mm 不锈钢筛, 充分混匀, 供盆栽试验用. 同时测定土壤基本理化性质: 土壤类型为黄棕壤, pH (土水比 1: 2.5) 6.1, 有机质 19.2 g·kg⁻¹, 全氮 1.3 g·kg⁻¹, 全磷 0.5 g·kg⁻¹, 全钾 14.2 g·kg⁻¹, 水解氮 78.4 mg·kg⁻¹, 速效磷 3.6 mg·kg⁻¹, 速效钾 86.0 mg·kg⁻¹. 供试土壤

检测出来 PAHs 组分 Σ 萘、菲、荧蒽、芘、苯并[a]蒽、蒽、苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、苯并[a]芘、二苯并[a, h]蒽、茚并[1,2,3-cd]芘和苯并[g, h, i]芘, PAHs 总量为 10.16 mg·kg⁻¹.

供试植物: 紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.), 种子购自江苏省农业科学院牧草研究所.

供试鼠李糖脂来源于铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的发酵液, 单鼠李糖脂及二鼠李糖脂浓度约为 4.3 g·L⁻¹.

供试 $\bar{i}$ 为双孢菇培养基废料, 由中国科学院河南封丘某食用菌生产基地提供, pH (H₂O) 8.47, 有机 C 697.08 g·kg⁻¹, 全 N 21.75 g·kg⁻¹, 全 P 4.61 g·kg⁻¹, 全 K 10.96 g·kg⁻¹, 有效 P 57.08 mg·kg⁻¹, 速效 K 670 mg·kg⁻¹.

二氯甲烷、正己烷、环己烷、乙腈等试剂均为 HPLC 级.

1.2 试验方法

试验处理 Σ : ①对照 (CK), 不做任何处理; ②紫花苜蓿 (AL); ③ $\bar{i}$ (GZ); ④鼠李糖脂 (0.5 倍 CMC 浓度, 125 mg/g) (RH_{0.5}); ⑤鼠李糖脂 (1 倍 CMC 浓度, 250 mg/g) (RH_{1.0}); ⑥ $\bar{i}$ + 紫花苜蓿 (GZ + AL); ⑦鼠李糖脂 (0.5 倍 CMC 浓度) + 紫花苜蓿 (RH_{0.5} + AL); ⑧鼠李糖脂 (1 倍 CMC 浓度) + 紫花苜蓿 (RH_{1.0} + AL); ⑨ $\bar{i}$ + 鼠李糖脂 (0.5 倍 CMC 浓度) + 紫花苜蓿 (GZ + RH_{0.5} + AL); ⑩菇渣 + 鼠李糖脂 (1 倍 CMC 浓度) + 紫花苜蓿 (GZ + RH_{1.0} + AL), 共 10 个处理, 每个处理 4 次重复. 试验采用上口直径 17 cm, 底面直径 12 cm, 高 14 cm 底部有孔的盆钵, $\bar{i}$ 按 3% (质量分数) 用量与土壤混合均匀, 鼠李糖脂分别按 125 mg/g 和 250 mg/g 与土壤混合均匀, 每盆装土 1.5 kg. 每盆播种 15 粒紫花苜蓿种子, 出苗 10 d 后间苗, 每盆留 10 株. 盆栽试验在温室中进行. 在培养 60 d 后取样. 每盆用小型不锈钢土钻随机采取 3 点, 组成混合土样. 将所采集的土壤样品分成 2 份, 一份土样于 4℃ 保存, 以供脱氢酶活性、细菌、真菌和 PAHs 降解菌数量的测定分析用, 另一份土样风干, 过 100 目筛, 供 PAHs 含量分析用.

1.3 测定项目及方法

(1) 植物生物量测定

植物生物量测定参见文献[10]的常压恒温干燥法.

(2) PAHs 的提取与测定

土壤 PAHs 提取采用索式提取法进行前处

理^[11]:称取 5 g 风干土样,用 60 mL 二氯甲烷在索式提取仪上提取 24 h. 然后在旋转蒸发仪上旋转蒸发至近干,再用 1 mL 环己烷溶解,溶解液通过正己烷活化的硅胶柱,用正己烷/二氯甲烷(1:1, 体积比)洗脱,收集洗脱液,用氮气吹至近干,最后用乙腈定容至 1 mL,高效液相色谱测定含量. HPLC 测试条件为:采用 Waters 2690 液相色谱仪以及荧光(Waters 2475)检测器和紫外(Waters 2996)检测器分析样品;色谱柱为 4.6 mm × 250 mm 烷基 C₁₈ PAHs 专用柱;流动相为色谱纯乙腈/水;流速为 1 mL/min;柱温为 30℃;进样量为 10 μ L.

(3) 土壤中脱氢酶活性的测定

采用三苯基四氮唑氯化物方法测定^[12].

(4) 土壤中细菌、真菌和 PAHs 降解菌的计数

采用平板稀释法^[12]. 细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基,真菌采用马丁氏培养基. PAHs 降解菌数量的测定,采用 MPN 方法^[13].

(5) 微生物功能多样性测定

采用 BIOLOG 的方法^[14],具体操作为:将 10 g 土样加入灭菌的 90 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0),在转速 70 r/min 振荡 30 min. 然后 10 倍系列稀释,将稀释至 10⁻³ 土壤悬液 150 μ L 接种到 BIOLOG 生态板的每一个孔中,最后将接种好的板放置 25℃ 的恒温培养箱中暗室培养,每隔 12 h 在波长为 590 nm 的 BIOLOG 读数器上读数,培养时间为 7 d.

土壤微生物的代谢活性用每孔平均吸光值变化率(average well color development, AWCD)来描述,计算公式如下:

$$AWCD = \frac{\sum (A_i - A_{A_1})}{31}$$

式中, A_i 为第 i 孔的相对吸光度, A_{A_1} 为 A_1 孔的相对吸光度培养 96 h 的数据用于计算土壤微生物功能多样性,计算公式如下.

Shannon-Wiener 多样性指数:

$$H' = - \sum P_i \cdot \ln P_i$$

Simpson 优势度指数:

$$D = 1 - \sum P_i^2$$

McIntosh 均匀度指数:

$$U = \sqrt{\sum n_i^2}$$

式中, P_i 为第 i 孔的相对吸光值与 0 平板相对吸光值总和的比率, n_i 是第 i 孔的相对吸光值.

1.4 数据处理

采用 Excel 2003 和 SPSS 16.0 处理作图和方差分析,并使用 Duncan's 新复极差法进行多重比较($p < 0.05$).

2 结果与分析

2.1 植物生物量

不同处理植物地上和地下生物量结果见表 1,分别在 0.32 ~ 1.05 g/盆和 0.13 ~ 0.27 g/盆. 单独添加 $\bar{\gamma}$ 或鼠李糖脂及其联合作用都不同程度显著地促进了植物茎叶干重的增加,其中以 $\bar{\gamma}$ 和鼠李糖脂联合作用(GZ + RH_{0.5} + AL 和 GZ + RH_{1.0} + AL)的提高程度最大,分别达到 0.84 g/盆和 1.05 g/盆,是 AL 处理的 2.63 倍与 3.28 倍. 对于地下部分而言, $\bar{\gamma}$ 单独作用对根生物量提高作用不明显,而鼠李糖脂在 0.5 倍 CMC 浓度(RH_{0.5} + AL)时,对根生物量提高作用最为明显,而其他处理影响并不显著.

表 1 不同处理植物生物量¹⁾

处理	茎叶干重 /g·pot ⁻¹	根干重 /g·pot ⁻¹	茎叶/根
AL	0.32 ± 0.03 a	0.18 ± 0.04 ab	1.85 ± 0.21 a
GZ + AL	0.56 ± 0.08 b	0.17 ± 0.03 a	4.56 ± 0.78 de
RH _{0.5} + AL	0.60 ± 0.05 b	0.24 ± 0.02 cd	2.47 ± 0.20 ab
RH _{1.0} + AL	0.68 ± 0.05 b	0.19 ± 0.03 abc	3.66 ± 0.30 cd
GZ + RH _{0.5} + AL	0.84 ± 0.10 c	0.27 ± 0.05 d	3.22 ± 0.48 bc
GZ + RH _{1.0} + AL	1.05 ± 0.12 d	0.20 ± 0.06 bc	5.64 ± 0.47 e

1) 表中数值为平均值 ± 标准差, $n = 4$; 同列数据字母不同,表示差异显著($p < 0.05$)

2.2 土壤多环芳烃含量变化

试验前后土壤中 15 种 PAHs 含量如表 2 所示,污染土壤 PAHs 本底浓度为 10.16 μ g/kg,其中低环(2 和 3 环)和高环(4、5 和 6 环) PAHs 分别占 PAHs 总量的 14.58% 和 85.42%. 种植苜蓿(AL) 60 d 后,土壤中 15 种 PAHs 总含量达到 8 693 μ g·kg⁻¹,降解率为 14.43%. 与对照(CK)相比,单独添加菇渣(GZ)和鼠李糖脂(RH_{0.5} 或 RH_{1.0})处理,土壤 15 种 PAHs 总量的降解率分别为 15.15% 和 11.56%,未达到显著性水平($p > 0.05$). 与单种植物处理(AL)相比, $\bar{\gamma}$ 、鼠李糖脂联合强化植物修复处理(GZ + RH_{0.5} + AL 和 GZ + RH_{1.0} + AL)的 PAHs 降解率分别达到了 32.64% 和 36.95%,修复效率提高了 115.45% 和 156.06%. 就 PAHs 的 15 种组分而言,

植物单独修复仅能促进低环 PAHs(萘和菲)含量的降低,对高环 PAHs(荧蒹除外)并无显著降低。 $\bar{i}$ 单独修复能明显促进土壤中萘、菲、荧蒹和苯并(a)芘含量降低($p < 0.05$)。鼠李糖脂单独修复可不同程度降低土壤中 PAHs 各组分含量,但均未达到显著性水平($p > 0.05$)。 $\bar{i}$ 、鼠李糖脂联合强

化苜蓿修复(GZ + RH_{0.5} + AL 和 GZ + RH_{1.0} + AL)除能明显促进萘、菲等低环 PAHs 降解,还能明显促进土壤中荧蒹、芘、苯并[a]蒽、苯并[b]荧蒹、苯并[a]芘、二苯并[a,h]蒽、茚并[1,2,3-cd]芘和苯并[g,h,i]芘等大多数高环 PAHs 降解($p < 0.05$)。

表 2 不同处理土壤多环芳烃含量¹⁾/μg·kg⁻¹Table 2 Soil PAHs concentrations in different treatments/μg·kg⁻¹

PAHs 组分	本底 PAHs	60 d 后 PAHs 含量				
		CK	AL	GZ	GZ + AL	RH _{0.5}
萘	ND	ND	ND	ND	ND	ND
芘	960 ± 87a	704 ± 47ab	512 ± 22cd	670 ± 16bc	560 ± 43cd	344 ± 29c
芴	ND	ND	ND	ND	ND	ND
菲	521 ± 39a	508 ± 33a	441 ± 45b	478 ± 36b	308 ± 21c	488 ± 20ab
蒽	ND	ND	ND	ND	ND	ND
荧蒽	1 434 ± 106a	1 312 ± 57ab	1 148 ± 77b	1 204 ± 113b	1 191 ± 121b	1 340 ± 37ab
芘	1 318 ± 122a	1 280 ± 134ab	1 234 ± 99ab	1 212 ± 59ab	1 172 ± 96cd	1 262 ± 143ab
苯并(a)蒽	890 ± 57a	859 ± 67a	802 ± 72ab	776 ± 65ab	682 ± 58b	824 ± 55ab
蒾	720 ± 24a	698 ± 58a	668 ± 61ab	664 ± 34ab	604 ± 37abc	674 ± 34ab
苯并(b)荧蒽	1 350 ± 89a	1 321 ± 101a	1 261 ± 87ab	1 256 ± 65ab	1 016 ± 69c	1 285 ± 29ab
苯并(k)荧蒽	403 ± 37a	380 ± 12a	342 ± 32a	351 ± 18a	313 ± 42a	371 ± 21a
苯并(a)芘	759 ± 45a	747 ± 45a	682 ± 73ab	560 ± 43bc	448 ± 26c	711 ± 68a
二苯并(a,h)蒽	198 ± 14a	189 ± 19ab	166 ± 11abc	165 ± 14abc	147 ± 10bc	180 ± 42ab
苯并(g,h,i)芘	1 370 ± 143ab	152 ± 98ab	1 245 ± 45ab	1 189 ± 231abc	1 008 ± 54bc	1 294 ± 119ab
茚并(1,2,3-cd)芘	236 ± 22a	219 ± 13a	192 ± 16a	195 ± 22a	180 ± 32a	212 ± 16a
PAHs 总量	10 159 ± 208a	9579 ± 301a	8 693 ± 251b	8 620 ± 287b	7 701 ± 143cd	8 985 ± 389ab

PAHs 组分	本底 PAHs	60 d 后 PAHs 含量				
		RH _{0.5} + AL	RH _{1.0}	RH _{1.0} + AL	GZ + RH _{0.5} + AL	GZ + RH _{1.0} + AL
萘	ND	ND	ND	ND	ND	ND
芘	960 ± 87a	220 ± 18d	464 ± 37cd	349 ± 10c	243 ± 21d	232 ± 16d
芴	ND	ND	ND	ND	ND	ND
菲	521 ± 39a	312 ± 21c	456 ± 39b	368 ± 31bc	188 ± 13d	194 ± 18d
蒽	ND	ND	ND	ND	ND	ND
荧蒽	1 434 ± 106a	1 288 ± 102ab	1 352 ± 98ab	1 296 ± 108ab	1 056 ± 90c	940 ± 76c
芘	1 318 ± 122a	1 144 ± 65cd	1 188 ± 114cd	1 016 ± 87cd	887 ± 108cd	832 ± 101d
苯并(a)蒽	890 ± 57a	692 ± 33b	798 ± 49ab	712 ± 66b	618 ± 44b	584 ± 47b
蒾	720 ± 24a	584 ± 45abc	636 ± 91ab	598 ± 50abc	551 ± 24bc	480 ± 34c
苯并(b)荧蒽	1 350 ± 89a	1 177 ± 98b	1 280 ± 36ab	1 192 ± 39b	974 ± 57bc	947 ± 55c
苯并(k)荧蒽	403 ± 37a	329 ± 23a	368 ± 87a	321 ± 22a	322 ± 43a	310 ± 24a
苯并(a)芘	759 ± 45a	652 ± 34ab	690 ± 54ab	594 ± 27bc	401 ± 30c	348 ± 43d
二苯并(a,h)蒽	198 ± 14a	161 ± 14abc	198 ± 19ab	165 ± 16abc	155 ± 12abc	142 ± 10bc
苯并(g,h,i)芘	1 370 ± 143ab	1 183 ± 87abc	1 281 ± 123ab	1 136 ± 134abc	1 089 ± 67bc	923 ± 66c
茚并(1,2,3-cd)芘	236 ± 22a	194 ± 19a	204 ± 32a	181 ± 11a	179 ± 21a	172 ± 15a
PAHs 总量	10 159 ± 208a	7 936 ± 201c	8 915 ± 341ab	7 928 ± 483cd	6 843 ± 233d	6 405 ± 198f

1) 表中数值为平均值 ± 标准差, $n = 4$; ND 表示未检出; 同行数据字母不同, 表示差异显著($p < 0.05$)

2.3 土壤微生物主要类群的数量变化

表 3 显示了不同处理中土壤微生物数量情况, 其中细菌数量为 $1.25 \times 10^6 \sim 31.37 \times 10^6$ CFU·g⁻¹, 真菌数量为 $1.32 \times 10^3 \sim 8.09 \times 10^3$ CFU·g⁻¹, PAHs 降解菌数量为 $1.36 \times 10^5 \sim 39.58 \times 10^5$ MPN·g⁻¹. 与对照(CK)相比, $\bar{i}$ (GZ)、鼠李糖脂(RH_{0.5})和植物(AL)的单独处理都不同程度增加了土壤细菌和

真菌数量,但未达到显著性水平($p > 0.05$). 相对而言,RH_{0.5} + AL、RH_{1.0} + AL、GZ + RH_{1.0} + AL 处理显著刺激了细菌和真菌数量增长,其中 GZ + RH_{1.0} + AL 处理细菌数量最多,达到了 31.37×10^6 CFU·g⁻¹,是对照的 25.1 倍;RH_{1.0} + AL 真菌数量最多,达到了 8.09×10^3 CFU·g⁻¹,是对照的 2.6 倍. 菇渣和植物分别可以有效提高 PAHs 降解菌数量,而

鼠李糖脂单独作用对 PAHs 降解菌数量的影响并不明显,但是, *β*- 和鼠李糖脂与植物的联合作用则显著提高了 PAHs 降解菌的数量,最多可达 39.57×10^5 MPN·g⁻¹,分别是对照(CK)和植物(AL)单独处理的 29 倍和 4 倍.

表 3 不同处理土壤微生物数量¹⁾

Table 3 Number of soil microorganism in different treatments			
处理	细菌 $\times 10^6$ /CFU·g ⁻¹	真菌 $\times 10^3$ /CFU·g ⁻¹	多环芳烃降解菌 $\times 10^5$ /MPN·g ⁻¹
CK	1.25 ± 0.78a	3.15 ± 0.07ab	1.36 ± 0.17a
AL	3.44 ± 1.19a	3.11 ± 0.95ab	9.91 ± 0.24e
GZ	4.48 ± 0.32a	1.33 ± 0.51a	4.42 ± 0.05b
GZ + AL	7.39 ± 1.18ab	1.81 ± 0.37ab	10.64 ± 0.91ef
RH _{0.5}	1.85 ± 0.03a	3.66 ± 0.24bc	2.61 ± 0.24ab
RH _{0.5} + AL	24.69 ± 1.45c	5.31 ± 0.38cd	22.94 ± 6.93f
RH _{1.0}	7.42 ± 2.13ab	6.47 ± 1.05de	3.86 ± 0.11b
RH _{1.0} + AL	14.92 ± 1.64b	8.09 ± 0.40e	2.74 ± 0.23ab
GZ + RH _{0.5} + AL	14.99 ± 0.53b	2.46 ± 0.12ab	26.51 ± 4.81f
GZ + RH _{1.0} + AL	31.37 ± 3.83c	5.86 ± 1.33d	39.57 ± 2.29h

1) 表中数值为平均值 ± 标准差, n = 4; 同列数据字母不同, 表示差异显著 ($p < 0.05$)

2.4 土壤脱氢酶活性变化

各处理土壤脱氢酶活性结果见图 1. 对照处理的土壤脱氢酶活性(以 TPF 计,下同)仅为 1.80 μg/(g·d),与对照(CK)相比,单独添加 *β*- 和鼠李糖脂以及苜蓿单独作用的脱氢酶活性虽然有不同程度提高,但并未达到显著水平($p > 0.05$). 在不同处理中, *β*- 和苜蓿联合作用(GZ + AL)的脱氢酶活性最高,达到了 88.83 μg/(g·d),其次为 *β*- 和鼠李糖脂和苜蓿联合作用(GZ + RH_{0.5} + AL 和 GZ + RH_{1.0} + AL), 分别为 61.56 μg/(g·d) 和 21.02 μg/(g·d).

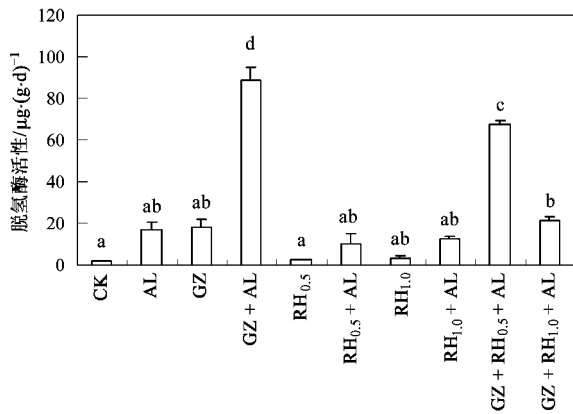


图 1 各处理土壤脱氢酶活性

Fig. 1 Soil dehydrogenase activity in different treatments

2.5 土壤微生物群落功能多样性变化

平均吸光值变化率(AWCD)值反映了土壤微生物利用碳源的整体能力及微生物的代谢活性,是评价利用单一碳源能力的一个重要指标. 从图 2 可以看出,各处理微生物 AWCD 值随培养时间的延长而增加,其中 GZ + AL、GZ + RH_{0.5} + AL 和 GZ + RH_{1.0} + AL 这 3 个处理的 AWCD 值明显高于对照(CK)和单独添加鼠李糖脂(RH_{0.5})处理,表明这 3 个处理明显提高了土壤微生物利用碳源的整体能力,这与土壤脱氢酶活性结果相一致.

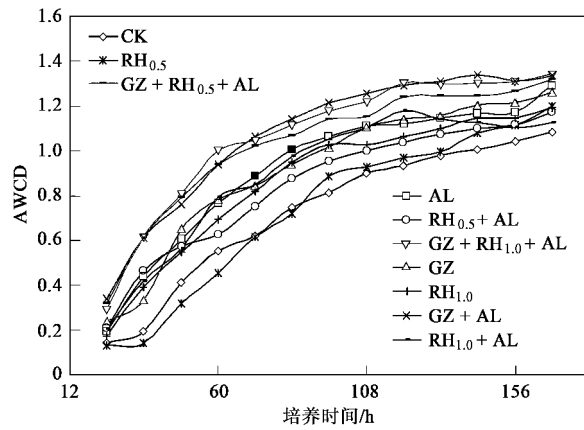


图 2 各处理土壤微生物群落 AWCD 变化

Fig. 2 AWCD of soil microbial community in different treatments

表 4 显示了 96 h 时的 AWCD 和不同多样性指数结果. 为了进一步确定不同处理对土壤微生物群落的影响,本试验从功能多样性的 Shannon 指数、Simpson 指数和 McIntosh 指数,反映了土壤微生物群落丰富度、优势度以及均匀度变化. 不同多样性指数反映土壤微生物群落功能多样性的不同侧面. Shannon 指数是研究群落物种及其个体数和分布均匀程度的综合指标,是目前应用最广的群落多样性指数之一. Shannon 指数受群落物种丰富度影响较大. Simpson 指数较多反映了群落中最常见的物种,而 McIntosh 指数则是度量群落物种均一性的指标. Shannon 指数的顺序为: GZ + RH_{0.5} + AL > GZ + RH_{1.0} + AL > GZ + AL > RH_{0.5} + AL > RH_{1.0} + AL > RH_{1.0} > GZ > AL > RH_{0.5} > CK; Simpson 指数的顺序为: GZ + RH_{0.5} + AL > GZ + RH_{1.0} + AL > GZ + AL > RH_{1.0} + AL > AL > GZ > RH_{0.5} + AL > RH_{0.5} > CK; McIntosh 指数的顺序为: GZ + AL > GZ + RH_{1.0} + AL > GZ + RH_{0.5} + AL > RH_{1.0} + AL > AL > RH_{1.0} > GZ > RH_{0.5} + AL > RH_{0.5} > CK. 其中, GZ

+ AL、GZ + RH_{0.5} + AL 和 GZ + RH_{1.0} + AL 这 3 个处理的 Shannon、Simpson 和 McIntosh 指数都分别较对照 (CK) 和苜蓿单独处理 (AL) 高, 而 RH_{0.5} 处理的

多样性指数变化并不明显, 说明单独添加鼠李糖脂在一定浓度范围内对土壤微生物群落的功能多样性影响不大。

表 4 各处理土壤微生物群落的 AWCD 值和多样性指数¹⁾

Table 4 AWCD and diversity index of soil microbial community in different treatments

处理	AWCD	Shannon 指数	Simpson 指数	McIntosh 指数
CK	0.553 7 ± 0.091 3ab	3.143 0 ± 0.138 1a	0.953 2 ± 0.006 6a	24.977 0 ± 3.289 6a
AL	0.765 6 ± 0.089 1bc	3.289 9 ± 0.088 2b	0.961 0 ± 0.004 1bc	30.320 2 ± 2.944 3cd
GZ	0.781 8 ± 0.021 8bc	3.291 0 ± 0.032 7b	0.960 9 ± 0.001 1bc	29.721 3 ± 0.181 5bcd
GZ + AL	0.937 2 ± 0.078 9c	3.334 7 ± 0.030 6b	0.963 2 ± 0.001 1c	32.959 4 ± 1.108 2d
RH _{0.5}	0.455 1 ± 0.026 3a	3.152 4 ± 0.094 4a	0.954 0 ± 0.004 3ab	26.163 5 ± 0.845 4ab
RH _{0.5} + AL	0.625 7 ± 0.049 5ab	3.334 4 ± 0.068 5b	0.957 9 ± 0.006 3abc	28.756 2 ± 2.525 2ab
RH _{1.0}	0.691 4 ± 0.077 8b	3.293 9 ± 0.061 1b	0.960 9 ± 0.003 1bc	29.911 9 ± 0.789 4bcd
RH _{1.0} + AL	0.793 2 ± 0.128 0bc	3.332 4 ± 0.026 8b	0.962 7 ± 0.001 6c	30.702 2 ± 2.167 8cd
GZ + RH _{0.5} + AL	0.939 9 ± 0.069 1c	3.353 1 ± 0.020 5b	0.963 8 ± 0.000 5c	32.203 4 ± 1.390 9cd
GZ + RH _{1.0} + AL	0.998 5 ± 0.001 2c	3.342 7 ± 0.037 0b	0.963 4 ± 0.001 8c	32.615 8 ± 0.611 6cd

1) 表中数值为 96 h 结果, 即平均值 ± 标准差, $n=4$; 同列数据字母不同, 表示差异显著 ($p < 0.05$)

3 讨论

在污染修复过程, $\bar{i}$ 和鼠李糖脂的单独和联合处理可不同程度提高植物生物量, 有利于缓解土壤污染给植物本身带来的负面影响, 此外, 植物生长速度的加快有利于根系分泌物含量的增加, 间接地刺激了土壤与污染降解密切相关的微生物数量增加。这是因为, 一方面, $\bar{i}$ 中含有大量的有机质和氮、磷、钾、钙、镁、硫等植物生长所必需的多种营养元素, 特别是其产生的腐殖酸有机胶体可使土壤团粒结构增加, 改善土壤特性, 疏松土壤, 增加透气性, 这些为植物生长提供了良好的土壤环境, 从而有利于植物的生长^[15]。另一方面, 有研究表明鼠李糖脂在一定浓度范围内可以促进植物生长, 最佳浓度为 0.5 倍 CMC 浓度^[16]。鼠李糖脂促进植物生长的机制至今仍未研究清楚, 一个可能的机制是: 表面活性剂增加了细胞膜的通透性, 它的两亲性使之能与膜中成分的亲水和亲脂基团相互作用, 从而改变膜的结构和透性, 促使植物吸收更多的养分^[17]。 $\bar{i}$ 和鼠李糖脂两者的协同作用, 可能更利于植物生长。

土壤微生物在有机类污染物转化和降解过程起到了极其重要的作用。研究表明, 土壤微生物数量、脱氢酶活性与 PAHs 降解率显著正相关^[18,19]。脱氢酶是土壤中重要的氧化还原酶, 主要参与 PAHs 加氧化后形成中间产物转-二聚氢脱氢生成儿茶酚的过程, 其活性的大小间接反映土壤对有机化合物降解能力的强弱。土壤微生物群落功能多样性代表土壤微生物对碳源底物的利用情况, 反映了土壤微生物

物群落的整体代谢活性。土壤微生物的代谢活性越高, 对污染物的转化和降解速率也就越快。在 $\bar{i}$ 和鼠李糖脂联合强化苜蓿修复 PAHs 污染土壤过程, 刺激土壤微生物数量的增加, 提高微生物种群的整体代谢活力, 有利于污染物的降解^[18,20]。其主要原因可能为: 植物根系释放分泌物中含有糖类、氨基酸和小分子有机酸等, 可作为 PAHs 类有机污染物降解的共代谢底物。 $\bar{i}$ 中的养分因子刺激了土壤微生物数量的增加^[21,22], 此外, 也与 $\bar{i}$ 中含有一定数量的微生物有关^[23,24]。

由于土壤中 PAHs 的生物可利用性较低, 植物修复的效率在短期内往往有一定的局限。在本研究中, 60 d 内单独植物修复的 PAHs 降解率仅为 14.43%。单独添加 $\bar{i}$ (GZ) 和鼠李糖脂 (RH_{0.5} 或 RH_{1.0}) 处理, 土壤 15 种 PAHs 总量的降解率分别为 15.15% 和 11.56%。单独菇渣修复效率有限, 可能归结于菇渣中与 PAHs 降解相关的微生物数量较少, 需要有一个预诱导过程^[24]。单独鼠李糖脂修复也存在着同样的问题, 虽然其可有效促进 PAHs 类有机污染物从土壤颗粒上解吸, 但是因为土壤中没有足够多的 PAHs 降解菌, PAHs 降解率也不会显著提高。 $\bar{i}$ 、鼠李糖单独添加以及苜蓿单独修复相比, $\bar{i}$ 、鼠李糖和植物联合的联合作用有效提高土壤 PAHs 降解率。 $\bar{i}$ 中含有丰富的养分因子和有机质, 例如氮、磷、钾等, 不仅可直接有效刺激土壤微生物数量的增加^[25], 还可通过促进植物生长, 提高植物根系分泌物含量, 间接刺激微生物数量的增加, 通过共代谢途径降解 PAHs 类有机污染物^[4]。

此外, *ι* 中还含有漆酶、木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶等氧化还原酶系, 这些酶系可有效降解 PAHs 类污染物. Lau 等^[7] 研究发现, 室温下用 1% 的 *ι* 处理 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PAHs, 对萘的降解率为 82%, 对菲的降解率达 59%. 还有研究者发现, *ι* 对杂酚油污染土壤具有较好的生物修复效果, 其中, 对 16 种 PAHs 总降解率达 86%, 其中三环 PAHs 降解率 89%, 四环 PAHs 降解率 87%, 五环 PAHs 降解率 48%^[8]. 同时, 鼠李糖脂促进 PAHs 类有机污染物从土壤颗粒上解吸, 从而有助于提高该类有机污染物的生物可利用率和降解速率^[6]. 最后, 在 *ι*、鼠李糖脂联合强化苜蓿修复过程, *ι* 中的水溶性有机物和生物表面活性剂鼠李糖脂之间也可能具有协同作用. 王良梅等^[26] 发现表面活性剂和水溶性有机物都可促进污染土壤中菲、芘的解吸, 当两者同时加入时, 菲、芘解吸率是对照的 2.55 ~ 3.12 倍(菲)和 7.61 ~ 9.61 倍(芘), 两者之间存在协同效应.

4 结论

(1) 盆栽试验证明, 利用双孢菇菇渣和鼠李糖脂联合强化苜蓿修复 PAHs 污染农田土壤, 具有良好的修复效果. 表现在: ①可减少 PAHs 对苜蓿的毒害, 促进生长, 增加其生物量; ②促进了低环 PAHs 降解的同时, 高环 PAHs 含量也明显降低; ③强化植物修复过程, 土壤脱氢酶活性和土壤微生物群落功能多样性显著提高.

(2) 修复机制主要为, 通过植物根际作用和菇渣中的养分因子刺激土壤微生物数量的增加, 通过鼠李糖脂促进 PAHs 从土壤颗粒上解吸, 从而有助于提高 PAHs 的生物可利用率和降解率. 此外, *ι* 中的漆酶等氧化还原酶系直接降解 PAHs. 这几个方面相互作用, 相互促进, 共同通过微生物和生化机制有效提高土壤 PAHs 的降解.

致谢: 感谢南京农业大学的占新华老师赠予的鼠李糖脂铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*).

参考文献:

- [1] Zhang Y X, Tao S, Cao J, *et al.* Emission of polycyclic aromatic hydrocarbon in China by country [J]. *Environ Sci Technol*, 2007, **41**: 683-687.
- [2] 王静, 朱利中, 沈学优. 某焦化厂空气中 PAHs 的污染现状及健康风险评价 [J]. *环境科学*, 2003, **24**(1): 135-138.
- [3] Ma L L. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface soils from outskirts of Beijing, China [J]. *Chemosphere*, 2005, **58**: 1355-1363.
- [4] Parrish Z D, Banks M K, Schwab A P. Effectiveness of phytoremediation as a secondary treatment for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in composted soil [J]. *Int J Phytoremediation*, 2004, **6**(2): 119-137.
- [5] 朱利中, 冯少良. 混合表面活性剂对多环芳烃的增溶作用及机理 [J]. *环境科学学报*, 2002, **22**(6): 774-778.
- [6] 郭利果, 苏荣国, 梁生康, 等. 鼠李糖脂生物表面活性剂对多环芳烃的增溶作用 [J]. *环境化学*, 2009, **28**(4): 510-514.
- [7] Lau K L, Tsang Y Y, Chiu S W. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples [J]. *Chemosphere*, 2003, **52**: 1539-1546.
- [8] Trejo-Hernandez M R, Lopez-Munguia A, Ramirez R Q. Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds [J]. *Process Biochemistry*, 2001, **36**: 635-639.
- [9] Huang X D, El-alawi Y, Penrose D M, *et al.* A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils [J]. *Environ Pollut*, 2004, **130**(3): 465-476.
- [10] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000. 302-304.
- [11] Joner E J, Hirmann D, Szolar O H, *et al.* Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment [J]. *Environ Pollut*, 2004, **128**: 429-435.
- [12] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [13] Wrenn B A, Venosa A D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure [J]. *Can J Microbiol*, 1996, **42**(3): 252-258.
- [14] Scutter M, Dick R. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates [J]. *Soil Biol Biochem*, 2001, **36**: 1576-1596.
- [15] 时连辉, 张志国, 刘登民, 等. *ι* 和泥炭基质理化特性比较及其调节 [J]. *农业工程学报*, 2008, **24**(4): 199-203.
- [16] Zhu L Z, Zhang M. Effect of rhamnolipids on the uptake of PAHs by ryegrass [J]. *Environ Pollut*, 2008, **156**: 46-52.
- [17] Mohamed T, Juan A O, Inmaculada G R. Production of xyloglucanolytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus* [J]. *Mycologia*, 2002, **94**: 404-410.
- [18] 范淑秀, 李培军, 巩宗强, 等. 苜蓿对多环芳烃菲污染土壤的修复作用研究 [J]. *环境科学*, 2007, **28**(9): 2080-2084.
- [19] 邹德勋, 骆永明, 滕应, 等. 多环芳烃长期污染土壤的微生物强化修复初步研究 [J]. *土壤*, 2006, **38**(5): 652-656.
- [20] Jeremy A R, Pdero J A, Jerald L S. Benzo [a] pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation [J]. *Environ Pollut*, 2005, **136**(3): 477-484.
- [21] Perez-Piqueres A, Edel-Hermann V, Alabouvette C, *et al.* Response of soil microbial communities to compost amendments [J]. *Soil Biol Biochem*, 2006, **38**: 460-470.

- [22] Arslan E I, Obek E, Kirbag S, *et al.* Determination of the effect of compost on soil microorganisms[J]. *Int J Sci Technol*, 2008, **3**(2): 151-159.
- [23] Adams J D, Frostick L E. Investigating microbial activity in compost using mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivation as an experimental system [J]. *Bioresour Technol*, 2008, **99**(5): 1097-1102.
- [24] Reid B J, Fermor T R, Semple K T. Induction of PAH-catabolism in mushroom compost and its use in the biodegradation of soil-associated phenanthrene [J]. *Environ Pollut*, 2002, **118**(1): 65-73.
- [25] Johnson C R, Scow K M. Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils [J]. *Biodegradation*, 1999, **10**: 43-50.
- [26] 王良梅, 孙成. 表面活性剂及 DOM 对土壤中菲、芘解吸行为的影响因子初探[J]. *生态环境*, 2007, **16**(4): 1108-1112.

关于反对个别作者一稿两投行为的联合声明

为保证所发表论文的首创性和学术严谨性,《环境科学》、《中国环境科学》、《环境科学学报》编辑部和《Journal of Environmental Sciences》编辑部特发表如下联合声明。

我们明确反对个别作者的一稿两投或变相一稿两投行为。自即日起,我们各刊在接受作者投稿时,要求论文全体作者就所投稿件作出以下承诺(附在投稿上):

1) 来稿所报道的研究成果均系全体作者的原创性研究成果,文中报道的研究成果(含图、表中数据的全部或部分)未曾发表亦未曾投其它科技期刊。

2) 在接到所投期刊编辑部关于稿件处理结果之前,所投稿件的全部或部分内容不再投其它科技期刊。

我们将认真对待作者所作的上述承诺,并建立信息共享机制,对违背上述承诺的作者(※ 在文中署名的全体作者)采取联合行动。

净化学术环境、促进学术繁荣是学术期刊作者和编者的共同责任。我们衷心地希望广大作者能够了解我们的上述立场和做法,并积极宣传和配合。

《环境科学》编辑部

《中国环境科学》编辑部

《环境科学学报》编辑部

《Journal of Environmental Sciences》编辑部