

镰刀菌—淀粉—苜蓿对煤矿区污染土壤 HMW—PAHs 的修复

张丽秀¹, 李岩¹, 李橙², 赵欧亚^{1,3}, 石维¹, 冯圣东¹, 杨志新¹

(1. 河北农业大学资源与环境科学学院, 河北省农田生态环境重点实验室, 河北保定 071000;

2. 河北省环境科学研究院, 石家庄 050051; 3. 河北省农林科学院, 石家庄 050051)

摘要:以煤矿区高环芳烃(HMW—PAHs)污染农田土壤为研究对象,通过添加淀粉且接种菌株 ZHH2 (*Fusarium* sp.)的苜蓿盆栽试验,研究苜蓿单一处理、ZHH2—苜蓿 2 因素处理和 ZHH2—淀粉—苜蓿 3 因素处理对污染土壤 5 环、6 环 HMW—PAHs 的修复效果。结果表明:苜蓿单一处理(M)对 6 种 HMW—PAHs 单体(BbF、BkF、BaP、InP、DbA 和 BghiP)的去除率为 4.22%~45.01%;不同接菌剂量与苜蓿 2 因素处理对 HMW—PAHs 的降解作用有明显差异,其中 H₁+M、H₂+M 对 6 种 HMW—PAHs 单体的去除率分别为 11.01%~45.30%和 15.20%~43.58%,与苜蓿单一处理相比,BkF 的去除率分别提高了 1.62 倍和 2.60 倍,其他单体差异不显著。H₃+M 对 HMW—PAHs 的去除却表现出显著抑制作用。在 2 因素基础上,进一步添加不同剂量淀粉的 3 因素处理(D₁+H₁+M、D₁+H₂+M、D₁+H₃+M、D₂+H₁+M、D₂+H₂+M 和 D₂+H₃+M)强化了对 6 种 HMW—PAHs 的修复效果,在所有 3 因素处理中,对 BbF、BkF、BaP、InP、DbA 和 BghiP 的去除率以 D₁+H₂+M 处理为最高,分别为 28.87%、54.59%、47.04%、65.91%、66.42%、71.88%,比 H₂+M 处理分别提高了 0.46、2.59、1.71、1.15、0.52、1.37 倍(P<0.05),但是与 D₁+H₁+M 对各个 HMW—PAHs 单体的去除效果差异不显著。因此,淀粉(0.25 g/kg)—ZHH2(0.1 g/kg)—苜蓿处理成为了修复该煤矿区农田污染土壤的优势组合。

关键词:农田土壤;高环芳烃污染;紫花苜蓿;镰刀菌;淀粉

中图分类号:X173;X53

文献标识码:A

文章编号:1009-2242(2017)05-0350-06

DOI:10.13870/j.cnki.stbcxb.2017.05.055

Study on Remediation of HMW-PAHs Contaminated Soil by *Fusarium* sp. - Starch-Alfalfa in Coal Mine Area

ZHANG Lixiu¹, LI Yan¹, LI Cheng², ZHAO Ouya^{1,3},

SHI Wei¹, FENG Shengdong¹, YANG Zhixin¹

(1. College of Resources and Environment Science, Agricultural University of Hebei, Key Laboratory for Farmland Eco-environment of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. Hebei Provincial Academy of Environmental Sciences, Shijiazhuang 050051; 3. Hebei Academy of Agriculture and Forestry, Shijiazhuang 050051)

Abstract: The pot experiment was conducted to investigate how alfalfa, *Fusarium* sp. ZHH2, starch as well as their combination of different size could remove high molecular weight PAHs (HMW—PAHs) in agricultural soil in a coal mine area. The results showed that the removal rate of 6 types of individual HMW—PAHs (BbF, BkF, BaP, DbA, InP and BghiP) was in the range of 4.22%~45.01% in alfalfa treatment (M). There were significant differences among the combined treatments using different inoculum size of ZHH2 and alfalfa (H₁+M, H₂+M, H₃+M) for the degradation of HMW—PAHs. And the range of removal rates of 6 types of HMW—PAHs were 11.01%~45.30% and 15.20%~43.58% for treatment H₁+M and H₂+M, respectively. Compared with M treatment, the removal rates of BkF in treatment H₁+M and H₂+M increased by 1.62 times and 2.60 times respectively, whereas the other PAHs had no significant difference. However, compared to treatment M, H₃+M treatment had a significant negative effect on the removal of HMW—PAHs. On the basis of H and M combination, starch of different size was added to improve the removal of these HMW—PAHs in soil. Further, the effect of the three factors treatments (D₁+H₁+M,

收稿日期:2017-04-02

资助项目:河北省人力资源和社会保障厅项目(C2013003022);河北省教育厅项目(Z2013058)

第一作者:张丽秀(1992—),女,在读硕士研究生,主要从事环境质量评价与监控研究。E-mail:2457116753@qq.com

通信作者:杨志新(1969—),女,博导,教授,主要从事生态、环境质量评价与监控研究。E-mail:yangzhixin@126.com

D₁ + H₂ + M, D₁ + H₃ + M, D₂ + H₁ + M, D₂ + H₂ + M and D₂ + H₃ + M) on HMW-PAHs removal was analyzed. The results showed that the removal rates of BbF, BkF, BaP, InP, DbA and BghiP in the D₁ + H₂ + M treatment were the highest among all treatments of three factor combinations, which were 28.87%, 54.59%, 47.04%, 65.91%, 66.42%, and 71.88% respectively. And there was no significant difference between D₁ + H₁ + M and D₁ + H₂ + M in the removal of each HMW-PAH. Compared with H₂ + M treatment, the removal rate in the D₁ + H₂ + M treatment increased significantly by 0.46, 2.59, 1.71, 1.15, 0.52, and 1.37 times, respectively ($P < 0.05$). Therefore, the combination of *Fusarium* sp. ZHH2, starch and alfalfa offers a suitable alternative for phytoremediation of aged PAH-contaminated soil in coal mining areas, with a recommended inoculation size of 0.5 g *Fusarium* sp. ZHH2, 0.25 g starch per kg soil with the growth of alfalfa.

Keywords: farmland soil; *Fusarium* sp. ZHH2; alfalfa; starch; high molecular weight PAHs

多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类性质稳定的持久性有机污染物, 分子结构由 2 个或 2 个以上的苯环以角状、线状或簇状形式连接而成^[1], 具有致癌、致畸、致突变的性质, 是美国环境保护署优先控制的污染物。其中 4 环及 4 环以上的高环芳烃 (High molecule weight, HMW-PAHs) 生物毒性较高, 由于水溶性低、脂溶性高更不易被降解, 造成较大的环境风险^[2]。环境中 PAHs 的来源主要包括 2 个方面, 一是森林火灾和火山爆发等自然来源, 二是煤、石油化石燃料的不完全燃烧等人为来源, 其中人为源是主要来源^[3]。本课题组前期调查结果表明, 某煤矿区农田土壤因煤矸石堆积、炼钢厂、焦化厂的冶炼工作长期受 PAHs 污染 (总量达 1042.31 μg/kg), 其中 5~6 环 HMW-PAHs 含量占 30%~48%^[4], 这些 PAHs 一旦进入土壤就会吸附到有机质上, 长期赋存在土壤中, 并可以通过口腔、皮肤、食物链等途径进入人体, 进而危及人类健康^[5], 因此对煤矿区农田污染土壤的修复刻不容缓。

微生物修复是研究最为广泛和深入的一种修复方式, 已筛选出多株 PAHs 专性降解菌^[6], 在人为污染土壤的修复应用中取得了良好的修复效果^[7-8], 但微生物对 PAHs 长期污染土壤的修复效果并不理想^[9]。为了加强微生物对 PAHs 的降解性能, 很多学者通过添加不同剂量、不同种类的外加碳源如葡萄糖、蔗糖、淀粉、水杨酸、邻苯二甲酸及琥珀酸钠等措施来提高微生物降解 PAHs 的效果^[7,10], 或是采用植物-微生物联合修复技术以达到较高的修复效果^[11-13]。其中根系发达的黑麦草、无芒雀麦、紫花苜蓿是修复 PAHs 的常见植物^[14-15], 对老化污染土壤中 5 环、6 环 HMW-PAHs 的修复效果达 6.3%~26.6%^[16-18]。但是, 在植物-微生物联合修复 PAHs 污染土壤的已有研究中, 对添加不同剂量菌种联合植物修复老化污染土壤中 HMW-PAHs 的报道并未检索到, 并且通过添加淀粉强化植物-微生物联合修

复 PAHs 的研究也未见报道。

综上, 本研究利用课题组前期筛选的高环芳烃高效降解菌 ZHH2 (*Fusarium* sp.) 并结合紫花苜蓿, 以淀粉为外加碳源, 针对不同淀粉添加量和不同降解菌接种剂量 2 个变量因素, 开展镰刀菌属 ZHH2 (*Fusarium* sp.)、淀粉联合紫花苜蓿进行煤矿区农田污染土壤高环芳烃的盆栽修复试验, 寻找高效修复 5~6 环 PAHs 的最佳组合, 为煤矿区污染土壤的修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤: 采自某典型煤矿区域内的农田污染场地, 且该煤矿区内分布着焦化厂和钢铁厂等生产企业, 属于 PAHs 长期污染老化土壤。取农田 0—10 cm 的表层污染土壤, 布袋封装, 带回实验室, 进行自然避光风干, 研磨, 过 2 mm 筛, 混合均匀后, 在 4 ℃ 的冰箱内保藏备用。土壤类型为褐土, 其基本理化性质为: pH 7.46, 速效钾含量 27.13 mg/kg, 速效磷含量 60.74 mg/kg, 有机质含量 39.49 g/kg, 全氮含量 0.21 g/kg, 全磷含量 0.463 g/kg, 且该土壤中 6 种 HMW-PAHs 单体含量和总量见表 1, 其中 6 种 HMW-PAHs 含量是 16 种 PAHs 总量的 48%。

表 1 污染场地土壤 6 种高环芳烃含量

化学品全称	缩写	含量(干土)/(μg · kg ⁻¹)
苯并[b]荧蒹	BbF	398.87
苯并[k]荧蒹	BkF	180.72
苯并[a]芘	BaP	257.84
二苯并[a,h]蒽	DbA	46.15
苯并[g,h,i]芘	BghiP	346.00
茚并[1,2,3-cd]芘	InP	252.81
6 种 HMW-PAHs 总量	Σ6 PAHs	1478.39
16 种 PAHs 总量	Σ16 PAHs	3112.43

供试植物: 紫花苜蓿, 购于北京正道生态科技有限公司, 为国产杂交品种。

供试菌种: 前期从煤矿区农田土壤中筛选得到的

高环芳烃高效降解真菌(镰刀菌属 ZHH2(*Fusarium* sp.)),保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC No. 9316)。

供试淀粉:可溶性淀粉,纯度≥98%,购于保定万科试剂有限公司

有机试剂:替代物(氘代三联苯、4-溴-2-氟联苯);有机溶剂(丙酮、二氯甲烷、正己烷);内标物质(氘代苕、氘代菲、氘代屈、氘代芘等均为色谱纯,购于北京百灵威试剂公司)。

1.2 试验设计

菌液制备:将 ZHH2 接种于高氏一号培养基中,在 30 ℃ 培养箱中培养 7 d,然后在无菌状态下的超净台里加入无菌水刮取培养基表层菌丝,将菌丝放置于离心管中,以 4 000 r/min 离心 10 min,去掉上层水溶液后称重,再向离心管中添加定量无菌水,漩涡震荡,使菌丝在水溶液中分布均匀。

紫花苜蓿育苗:苜蓿种子经 3%过氧化氢溶液消毒 20 min,用蒸馏水洗净后浸泡于烧杯中 16 h,在培养皿上放入吸足水的滤纸,将浸泡后的种子平摊在滤纸上,并覆盖 1 张滤纸,放入恒温培养箱中(25 ℃)育苗。

盆栽试验:为了更接近煤矿区污染土壤修复的实际应用,本研究采用未灭菌的老化土壤进行盆栽试验,盆钵尺寸(盆底直径×盆口直径×盆高)10 cm×15 cm×12 cm,每盆装入老化土壤 1.25 kg,并于 2014 年 5 月上旬将紫花苜蓿幼苗定量移栽至盆钵中,待紫花苜蓿长到 10 cm 高,定苗 3 株/盆。盆栽试验于河北农业大学光照温室进行,室温控制在白天 25~30 ℃,夜晚 10~15 ℃。保持土壤田间持水量 60%,待紫花苜蓿生长 2 个月后,添加不同量的降解菌 ZHH2 和淀粉,添加方案见表 2,继续培养 90 d 后,收获牧草。试验共设计 11 组处理,每组处理设置 3 个重复。

表 2 盆栽试验方案设计

编号	处理	接种量/ (g·kg ⁻¹)	淀粉/ (g·kg ⁻¹)	紫花 苜蓿
1	CK	0	0	不种植苜蓿
2	M	0	0	种植苜蓿
3	H ₁ +M	0.1	0	种植苜蓿
4	H ₂ +M	0.5	0	种植苜蓿
5	H ₃ +M	1.0	0	种植苜蓿
6	D ₁ +H ₁ +M	0.1	0.25	种植苜蓿
7	D ₁ +H ₂ +M	0.5	0.25	种植苜蓿
8	D ₁ +H ₃ +M	1.0	0.25	种植苜蓿
9	D ₂ +H ₁ +M	0.1	1.00	种植苜蓿
10	D ₂ +H ₂ +M	0.5	1.00	种植苜蓿
11	D ₂ +H ₃ +M	1.0	1.00	种植苜蓿

1.3 样品采集与处理

盆栽试验培养结束后,将盆栽培养土壤混合均匀

并过 1 mm 筛,冷冻保存,测定 6 种 HMW-PAHs 含量。

1.4 测定项目与方法

土壤 PAHs 测定指标:BbF、BkF、BaP、DbA、BghiP、InP。

利用索氏提取方法提取土壤 PAHs:称取 20 g 土壤样品及 10 g 无水硫酸钠,混合均匀后,加入 20 μL 替代物(20 μg/mL 氘代三联苯与 4-溴-2-氟联苯),用 100 mL 提取剂(丙酮与正己烷体积比 1:1)索氏提取 12 h。并经过干燥、浓缩、净化、再次浓缩后用正己烷定容至 1 mL,待测^[19-20]。

气相色谱-质谱法(GC-MS (Aglient 7890/5975c))测定 PAHs 含量:采用程序升温方法,起始温度为 80 ℃,保持 2 min;以 10 ℃/min 上升到 140 ℃,保持 3 min;再以 10 ℃/min 上升到 210 ℃保持 3 min;最后以 5 ℃/min 上升到 290 ℃保持 3 min。进样口温度为 280 ℃,进样量为 1 μL,不分流进样,流速为 1.1 mL/min,离子源温度 230 ℃,四极杆温度 150 ℃^[19-21]。

质量保证与质量控制:每批次提取装置中均设置至少 20%的随机重复样品;替代物回收率,氘代三联苯与 4-溴-2-氟联苯 2 种替代物质最后回收率控制在 70%~130%^[19]。

1.5 数据处理

土壤 PAHs 的去除率(R)=(C₀-C_i)/C₀×100%,式中:C₀为盆栽试验结束后对照组处理中土壤 PAHs 含量(μg/kg);C_i为各处理 PAHs 残留含量(μg/kg)。

试验数据采用 Excel、SPSS 17.0 对数据进行统计分析整理。

2 结果与分析

2.1 苜蓿单因素对煤矿区污染土壤 HMW-PAHs 修复效果的影响

由图 1 可知,苜蓿单因素处理对 5~6 环 HMW-PAHs 均有一定的降解效果,其对 Σ6 PAHs 的去除率达 27%,对 BbF、BkF、BaP、InP、DbA 和 BghiP 的去除率分别为 16.82%,4.22%,16.03%,39.68%,45.01%,41.69%。

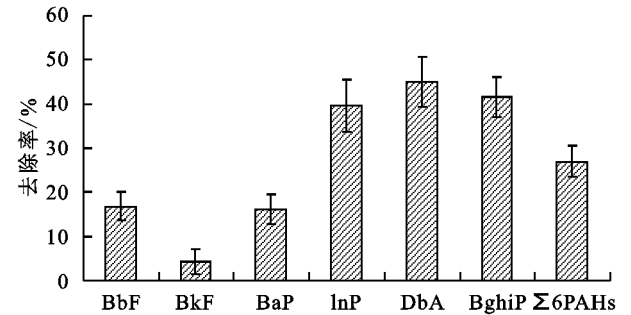


图 1 苜蓿对土壤 5、6 环 PAHs 单体及其总量的修复效果

2.2 ZHH2-苜蓿 2 因素对煤矿区污染土壤 HMW-PAHs 修复效果的影响

由图 2 可知,接种 ZHH2 菌丝量 0.1 g/kg 与苜蓿组合处理(H_1+M)对 BkF 的去除率为 11.08%,与 M 单因素处理相比(图 1),去除效果提高了 162%,提高显著;对 BbF、InP、BgHiP、BaP、DbA 的去除率分别为 20.56%,37.97%,37.40%,16.14%,45.30%,与单因素处理相比有增有减,但差异均不显著。

接种 ZHH2 菌丝量 0.5 g/kg 与苜蓿 2 因素处理(H_2+M)对 BkF 的去除率为 15.20%,与 M 单因素处理相比提高了 260%,去除效果显著增加($P < 0.05$);InP、BgHiP 去除率在 H_2+M 处理中显著降低,分别比单因素处理降低了 22.90%,11.37%($P < 0.05$);对 BbF、BaP、DbA 的去除率分别为 19.81%,17.33%,43.58%,与单因素差异不显著。

与 M 单因素相比,接种 ZHH2 菌丝量 1.0 g/kg 与苜蓿 2 因素处理(H_3+M)对 BbF、BaP、DbA、InP、BgHiP 的去除产生了显著的抑制作用,去除率为 0.88%~16.04%,分别比 M 处理降低了 15.93%,15.87%,29.18%,28.97%,32.21%,但对 BkF 的修复效果并未表现出明显差异。

经检验,不同处理对 $\Sigma 6$ PAHs 的去除率大小顺次为 $M(27.00\%) \approx H_1+M(26.36\%) \approx H_2+M(23.88\%) > H_3+M(5.91\%)$,M、 H_1+M 、 H_2+M 对 $\Sigma 6$ PAHs 的修复效果并没有显著性差异,而 H_3+M 处理却对 HMW-PAHs 的去除产生了显著的抑制作用。

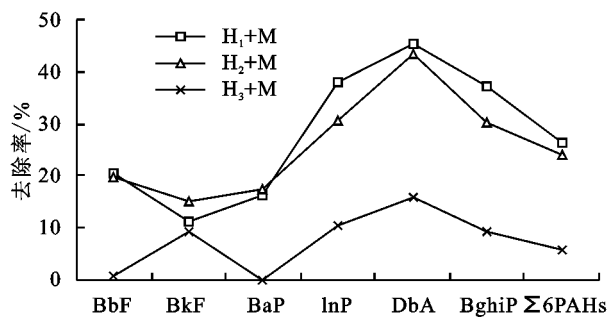


图 2 ZHH2-苜蓿组合对土壤 5、6 环 PAHs 单体及其总量的修复效果

2.3 淀粉-ZHH2-苜蓿 3 因素组合对煤矿区污染土壤 HMW-PAHs 修复效果的影响

由表 3 可知,在低淀粉添加量(0.25 g/kg)的 3 因素处理下, D_1+H_2+M 对各 PAHs 单体的去除率均最高,除 BbF 外,其他单体在不同接菌量处理下对 PAHs 的去除率差异不显著。在高淀粉添加量(1 g/kg)的 3 因素处理下,随接菌量增加,BbF 的去除率呈明显降低趋势, D_2+H_2+M 比 D_2+H_1+M 降低了 9.01%($P < 0.05$), D_2+H_3+M 比 D_2+H_2+M 降低了 3.40%;InP、BgHiP 的修复效果无显著性

差异,但随接菌量的增加,降解率呈升高趋势;BkF、DbA 的修复效果呈增加趋势,且 D_2+H_3+M 的修复效果显著高于 D_2+H_2+M 和 D_2+H_1+M ;而 BaP 的修复效果随接菌量增加降解率表现出先降低后升高的趋势,且 D_2+H_2+M 显著低于 D_2+H_1+M 和 D_2+H_3+M 。

进一步对淀粉-ZHH2-苜蓿 3 因素组合处理与 ZHH2-苜蓿 2 因素处理对煤矿区污染土壤的修复效果进行差异分析可知,在土壤接种 ZHH2 菌丝量 0.1 g/kg 的苜蓿处理下,除 BbF 外,其他单体均呈现了随淀粉添加量增加降解率先升后降的变化规律, D_1+H_1+M 处理的去除率表现最高。与 H_1+M 相比, D_1+H_1+M 处理显著提高了 BkF、BaP、InP 和 DbA、BgHiP 单体的修复效果,分别提高了 36.58%,29.20%,26.51%,20.13%,33.50%,但对 BbF 的修复效果提高并不显著; D_2+H_1+M 处理对 BbF 的修复效果提高了 31.00%,而对 BkF、BaP、InP 和 DbA、BgHiP 的去除却有不同程度的抑制作用,尤其对 DbA 影响显著,去除率减少了 28.00%。3 个处理对 $\Sigma 6$ PAHs 的去除率大小顺次为 $D_1+H_1+M(49.28\%) > D_2+H_1+M(21.37\%) \approx H_1+M(26.36\%)$ 。

D_1+H_2+M 、 D_2+H_2+M 与 H_2+M 相比, D_1+H_2+M 可显著提高 BbF、BkF、BaP、InP 和 DbA、BgHiP 的修复效果,分别提高了 9.06%,39.39%,29.71%,35.31%,22.84%,41.57%; D_2+H_2+M 处理下 InP、BgHiP 的修复效果提高了 5.67%和 3.38%,但未达到显著性水平,而 BkF、BaP、DbA 的修复效果显著性降低,分别降低了 6.94%,14.67%,25.56%,对 BbF 的修复效果无显著性变化;3 个处理对 $\Sigma 6$ PAHs 的去除率大小顺次为 $D_1+H_2+M(52.37\%) > H_2+M(23.88\%) \approx D_2+H_2+M(19.58\%)$ 。

D_1+H_3+M 、 D_2+H_3+M 与 H_3+M 相比, D_1+H_3+M 可显著提高 H_3+M 处理中 BbF、BkF、BaP、InP 和 DbA、BgHiP 的修复效果,分别提高了 10.68%,39.24%,40.48%,52.92%,48.96%,60.79%,修复效果显著提高;但与 H_3+M 处理相比, D_2+H_3+M 显著提高了 BbF、BaP、InP 和 DbA、BgHiP 的修复效果,分别增加了 13.71%,17.11%,31.80%,19.10%,33.05%,而对 BkF 修复效果只增加了 3.14%,提高不显著;3 个处理对 $\Sigma 6$ PAHs 的去除率大小为 $D_1+H_3+M(44.93\%) > D_2+H_3+M(25.83\%) > H_3+M(5.91\%)$ 。

综上,从经济成本和修复效果稳定性综合考虑,添加淀粉 0.25 g/kg 且接种 ZHH2 降解菌 0.1 g/kg 的苜蓿 3 因素处理(D_1+H_1+M)成为了适宜该煤矿区 HMW-PAHs 长期污染土壤修复的优势组合。

表 3 ZHH2—淀粉—紫花苜蓿 3 因素组合下各处理土壤中 HMW—PAHs 单体去除率 单位：%

处理	BbF	BkF	BaP	InP	DbA	BghiP
H ₁ + M	20.56A	11.08B	16.14B	37.97B	45.30B	37.40B
H ₂ + M	19.81B	15.20B	17.33B	30.60B	43.58B	30.32B
H ₃ + M	0.88B	9.17B	0.15C	10.50C	16.04C	9.49C
D ₁ + H ₁ + M	23.56Aa	47.65Aa	45.34Aa	64.49Aa	65.43Aa	70.90Aa
D ₁ + H ₂ + M	28.87Aa	54.59Aa	47.04Aa	65.91Aa	66.42Aa	71.88Aa
D ₁ + H ₃ + M	11.57Ab	48.42Aa	40.33Aa	63.42Aa	64.99Aa	70.28Aa
D ₂ + H ₁ + M	27.01Ba	5.12Bc	10.90Bb	27.90Bb	17.32Cc	31.11Bb
D ₂ + H ₂ + M	18.00Bb	8.25Cc	2.66Cc	36.27Bb	22.02Cc	33.70Bb
D ₂ + H ₃ + M	14.60Ab	12.32Bb	16.95Bb	42.31Bb	35.14Bb	42.53Bb

注：同列数据大写字母表示 H₁ + M、D₁ + H₁ + M 和 D₂ + H₁ + M 之间的差异性，H₂ + M、D₁ + H₂ + M 和 D₂ + H₂ + M 之间的差异性以及 H₃ + M、D₁ + H₃ + M 和 D₂ + H₃ + M 之间的差异性 ($P < 0.05$)；小写字母表示 3 因素处理之间的显著差异性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究证实,紫花苜蓿单因素处理对煤矿区长期污染土壤中 5 环、6 环 HMW—PAHs 表现出一定的修复效果,去除率达 27%。姚伦芳等^[22]、张晶等^[23]种植紫花苜蓿单一处理对未灭菌 PAHs 老化污染土壤 16 种 PAHs 的去除率分别为 17.02%和 14.43%,说明了紫花苜蓿对老化污染土壤能够表现出一定的降解效果,其原因可能与苜蓿对 PAHs 的直接吸收作用、土著微生物的作用及其根际分泌物的作用等因素有关。Fan 等^[24]已证实了土著微生物与根系分泌物对 PAHs 降解的相互作用。紫花苜蓿修复芘污染土壤 60 d 后的根际土壤细菌和真菌含量分别比非根际土壤高 5.0~7.5 和 1.8~2.3 倍,根际芘平均去除率比非根际高 6%。

镰刀菌 ZHH2 与苜蓿 2 因素处理与苜蓿单因素作用相比,土壤中 BkF 的修复效果显著提高,可能是接种适量的降解菌,增加了土壤中 5 环 PAHs 降解微生物的数量^[25],而 PAHs 降解菌的数量与 PAHs 的降解率呈显著正相关^[26];也可能是降解菌与紫花苜蓿联合作用时,ZHH2 提高了植物的生物量以及植物抗氧化的能力,达到保护植物根系的效果^[27-28];或者是接种降解菌后根际微生物的组成发生了改变,所以降解效果会与未接种降解菌 ZHH2 的处理出现差异。Wu 等^[29]研究表明接种丛枝菌根真菌在提高多环芳烃降解的同时也明显改变了植物根际微生物的组成。

淀粉—ZHH2—苜蓿 3 因素处理下土壤中 HMW—PAHs 修复效果远高于苜蓿单一处理和降解菌 ZHH2—苜蓿组合处理,低淀粉添加量(0.25 g/kg)—0.5 g/kg 降解菌 ZHH2—紫花苜蓿的 3 因素处理是该研究中修复高环芳烃的最佳组合,这可能是有以下几方面原因。一是淀粉起到表面活性剂的作用,其中间代谢产物环糊精通过对难降解有机污染物起到增溶效果,进而提高 PAHs 的修复效果。孙明明等^[30]已证明甲基 β -环糊精可以显著提高 PAHs

的降解率;二是淀粉作为外加碳源,为降解菌提供生物降解必需的辅酶 NADH、维生素和生长必需的营养物质,进而提高 PAHs 的修复效果。Teng 等^[10]在含有 77.9 $\mu\text{g/kg}$ BaP 自然污染土壤中每千克干土添加 1.0 g 淀粉后,土壤中细菌数量增加近 1 倍,真菌数量增加了约 3 倍,放线菌增加约 1~2 倍。三是淀粉的添加,激活或者促进土壤微生物分泌降解多环芳烃有关的酶。然而,接菌量相同时,低淀粉添加量(0.25 g/kg)下各处理显著高于高浓度淀粉添加量(1 g/kg)的各处理,这可能是由于过量的淀粉使得土壤中可提取态 PAHs 含量增加,紫花苜蓿受到毒迫作用同时土壤微生物活性降低,无法有效发挥添加高浓度淀粉的修复作用。张晶等^[23]研究表明高浓度的鼠李糖脂并没有发挥显著的促进作用,反而对个别单体具有抑制作用。还有可能是由于高浓度淀粉使土壤中土著微生物群落代谢能力增强,由于对养分的竞争作用抑制了降解菌株 ZHH2 的生长,进而降低了对 HMW—PAHs 修复效果。

4 结论

(1)苜蓿单因素处理对 6 种 HMW—PAHs 有不同程度的降解效果;不同剂量降解菌 ZHH2 与苜蓿 2 因素组合对 5~6 环 PAHs 总量的修复产生了不同的效果,低剂量 ZHH2—苜蓿 2 因素处理比苜蓿单因素有显著的促进作用,而高剂量 ZHH2—苜蓿 2 因素处理却产生了显著的抑制作用。

(2)淀粉—ZHH2—苜蓿 3 因素组合处理对污染农田土壤的修复效果显著高于苜蓿单因素处理和 ZHH2—苜蓿 2 因素组合处理,且以 D₁ + H₂ + M 处理表现最高,对各单体的去除率范围为 28.87%~71.88%。

(3)鉴于低剂量与高剂量淀粉的 3 因素处理之间差异并不显著,推荐在污染土壤中添加淀粉 0.25 g/kg、接种 ZHH2 菌剂量 0.1 g/kg 下种植紫花苜蓿(D₁ + H₁ + M 组合处理)作为该煤矿区污染土壤修复的优势组合模式。

参考文献:

- [1] 李贺. 土壤中高分子量多环芳烃污染微生物修复的问题及对策[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(3): 384-392.
- [2] 王慧, 周海燕, 黄勇, 等. 一株高环多环芳烃降解嗜盐菌 *Thalassospira* sp. 的分离及降解特性[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2015, 55(1): 87-92.
- [3] 郭雪, 毕春娟, 陈振楼, 等. 滴水湖及其水体交换区沉积物和土壤中 PAHs 的分布及生态风险评价[J]. 环境科学, 2014, 35(7): 2664-2671.
- [4] 赵欧亚, 冯圣东, 石维, 等. 煤矿区农田土壤多环芳烃生态风险评估方法比较[J]. 安全与环境学报, 2015, 15(2): 352-358.
- [5] 侯艳伟, 张又弛. 福建某钢铁厂区域表层土壤 PAHs 污染特征与风险分析[J]. 环境化学, 2012, 31(10): 1542-1548.
- [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] 刘世亮, 骆永明, 吴龙华, 等. 真菌对污染旱地红壤中苯并[a]芘共代谢降解研究[J]. 环境科学, 2010, 31(8): 1944-1950.
- [8] Erika W, Katarina B, Eija S, et al. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi from laboratory to field scale[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2014, 86(1): 238-247.
- [9] Potin O, Veignie E, Rafin C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAHs contaminated soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 51(1): 71-78.
- [10] Teng Y, Luo Y M, Ping L F, et al. Effects of soil amendment with different carbon sources and other factors on the bioremediation of an aged PAH-contaminated soil[J]. Biodegradation, 2010, 21(2): 167-178.
- [11] 赵媛媛, 张万坤, 马慧, 等. 降解菌 ZQ5 与紫茉莉对芘污染土壤的联合修复[J]. 环境工程学报, 2013, 7(7): 2752-2756.
- [12] 周妍, 滕应, 姚伦芳, 等. 植物-微生物联合对土壤不同粒径组分中 PAHs 的修复作用[J]. 土壤, 2015, 47(4): 711-718.
- [13] Mohammad M B, Roshanak R K, Ahmad J J. Effect of bioaugmentation to enhance phytoremediation for removal of phenanthrene and pyrene from soil with *Sorghum* and *Onobrychis sativa*[J]. Journal of Environmental Health Sciences and Engineering, 2014, 12(1): 24.
- [14] 张慧, 党志, 易筱筠, 等. 玉米修复芘污染土壤的初步研究[J]. 环境化学, 2010, 29(1): 29-34.
- [15] 常瑞雪. 污泥多环芳烃的植物修复效果及其影响机理研究[D]. 河北 保定: 河北农业大学, 2012.
- [16] 刘魏魏, 尹睿, 林先贵, 等. 生物表面活性剂强化微生物修复多环芳烃污染土壤的初探[J]. 土壤学报, 2010, 47(6): 1118-1125.
- [17] Fu D Q, Teng Y, Shen Y Y, et al. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons and microbial activity in a field soil planted with perennial ryegrass[J]. Frontiers of Environmental Science and Engineering, 2012, 6(3): 330-335.
- [18] 沈源源. 多环芳烃污染土壤的植物-微生物联合修复效应[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [19] 刘金巍, 安彩秀, 王磊, 等. 气相色谱-质谱联用法测定土壤中 16 种多环芳烃[J]. 岩矿测试, 2012, 31(2): 325-330.
- [20] 张志远, 王翠苹, 刘海滨. 可可毛色二孢菌对焦化厂土壤多环芳烃污染修复[J]. 环境科学, 2012, 33(8): 2832-2839.
- [21] 孙闰霞, 柯常亮, 林钦, 等. 超声提取/气相色谱-质谱法测定海洋生物中的多环芳烃[J]. 分析测试学报, 2013, 32(1): 57-63.
- [22] 姚伦芳, 滕应, 张晶, 等. 多环芳烃污染土壤的微生物-紫花苜蓿联合修复效应[J]. 生态环境学报, 2014, 23(5): 890-896.
- [23] 张晶, 林先贵, 李烜楨, 等. 菇渣和鼠李糖脂联合强化苜蓿修复多环芳烃污染土壤[J]. 环境科学, 2010, 31(10): 2431-2438.
- [24] Fan S X, Li P J, Gong Z Q, et al. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Chemosphere, 2008, 71(8): 1593-1598.
- [25] 毛健, 骆永明, 滕应, 等. 一株副球菌对污染土壤中多环芳烃的降解研究[J]. 土壤, 2009, 41(3): 448-453.
- [26] 刘魏魏, 尹睿, 林先贵, 等. 生物表面活性剂-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.
- [27] Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, et al. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses[J]. Chemosphere, 2010, 81(9): 1084-1090.
- [28] Debiane D, Garçon G, Verdin A, et al. Mycorrhizal alleviates benzo [a] pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model[J]. Phytochemistry, 2009, 70(11/12): 1421-1427.
- [29] Wu N Y, Zhang S Z, Huang H L, et al. Enhanced dissipation of phenanthrene in spiked soil by arbuscular mycorrhizal alfalfa combined with a non-ionic surfactant amendment[J]. Science of the Total Environment, 2008, 394(2/3): 230-236.
- [30] 孙明明, 滕应, 骆永明, 等. 甲基 β 环糊精对污染场地土壤中多环芳烃的异位增效洗脱修复研究[J]. 环境科学, 2013, 34(6): 2428-2435.