

张雪娜, 贾海滨, 李 橙, 等. 添加淀粉和通气对固定化 *Fusarium.sp* 修复煤矿区老化污染土壤 HMW-PAHs 的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(9):1709–1716.

ZHANG Xue-na, JIA Hai-bin, LI Cheng, et al. Effect of starch and aeration on addition on degradation of HMW-PAHs by immobilized *Fusarium. sp* in a polluted and aged soil of a coal mining area[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(9):1709–1716.

添加淀粉和通气对固定化 *Fusarium.sp* 修复煤矿区老化污染土壤 HMW-PAHs 的影响

张雪娜¹, 贾海滨¹, 李 橙³, 王 伟¹, 张丽秀¹, 冯圣东^{1*}, 杨志新^{1,2*}

(1.河北农业大学资源与环境科学学院, 河北 保定 071000; 2.河北省农田生态环境重点实验室, 河北 保定 071000; 3.河北省环境科学研究院, 石家庄 050000)

摘 要: 为了提高 *Fusarium.sp* 对 PAHs 的修复效果, 在典型煤矿区老化污染土壤中添加淀粉和通气, 经为期 60 d 的土壤培养试验, 研究玉米秸秆固定化 *Fusarium.sp* 对土壤 10 种 HMW-PAHs 的修复效果及不同处理下土壤中酶活性变化规律。结果表明: HMW-PAHs (High molecular weight-PAHs) 总量去除率表现为固定化菌剂+淀粉+通气处理(J+D+O, 29.19%) $\approx$ 固定化菌剂+淀粉处理(J+D, 25.89%) > 固定化菌剂处理(J, 16.54%); 4 环、5 环和 6 环 PAHs 去除率在 J+D+O 和 J+D 两组处理间的差异均不显著, 且与 J 处理相比均有显著提高($P < 0.05$); 三组处理对单个 HMW-PAH 的去除率分别为 9.12%~21.73%、17.93%~43.12%、24.34%~35.79%, J+D+O 和 J+D 处理对单个 HMW-PAH 的修复效果均有显著促进作用, 其中, 对 BkF 的去除增幅最大, 分别增加了 68.09%、63.78%。从酶活性规律看, 土壤过氧化氢酶活性呈 CK>J>J+D>J+D+O ($P < 0.05$) 的规律, 且与 10 种 PAHs 单体的去除率呈显著或极显著负相关; 土壤木质素过氧化物酶活性却与 Chry、BkF、InP、DbA、BghiP 去除率呈显著正相关。综上所述, 不同处理对单个 PAHs 的去除具有其选择性, 且添加淀粉的两处理均显著提高了土壤中 HMW-PAHs 的修复效果。

关键词: 典型煤矿区; HMW-PAHs; 固定化 *Fusarium.sp*; 淀粉; 通气; 土壤酶活性

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2016)09-1709-08 doi:10.11654/jaes.2016-0596

Effect of starch and aeration addition on degradation of HMW-PAHs by immobilized *Fusarium. sp* in a polluted and aged soil of a coal mining area

ZHANG Xue-na¹, JIA Hai-bin¹, LI Cheng³, WANG Wei¹, ZHANG Li-xiu¹, FENG Sheng-dong^{1*}, YANG Zhi-xin^{1,2*}

(1.College of Resource and Environment Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China; 2.Key laboratory for Farm Land Eco-environment, Baoding 071000, China; 3.Hebei Institute of Environmental Science, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: The soil incubation experiment was performed to study the effect of starch and aeration addition on HMW-PAHs degradation by *Fusarium.sp* in polluted and aged soil of a coal mining area. After 60 days incubation, the degradation rate of 10 HMW-PAHs as well as the change rule of soil enzyme activities were analyzed. The results showed that the treatments were in the following order in terms of Σ 10 HMW-PAHs degradation rate: immobilized *Fusarium.sp* + starch + aeration (J+D+O, 29.19%) $\approx$ immobilized *Fusarium.sp* + starch (J+D, 25.89%) > immobilized *Fusarium.sp* (J, 16.54%). There was no significant difference between J+D+O and J+D for the degradation of Σ 4-rings, Σ 5-ring and Σ 6-ring PAHs, but their degradation rates were higher than J significantly ($P < 0.05$). The degradation range of 10 individual HMW-PAHs were 9.12%~21.73%, 17.93%~43.12%, 24.34%~35.79% in J, J+D and J+D+O treatments respectively. The results demonstrated that far higher degradation rates of the 10 individual HMW PAHs were achieved in J+D+O and J+D treatments than those in J

收稿日期: 2016-04-28

基金项目: 河北省教育厅项目(Z2013058); 863 专项(2012AA101403-3)

作者简介: 张雪娜(1990—), 女, 河北廊坊人, 硕士生, 主要从事环境质量评价与监控研究。E-mail: 815798846@qq.com

* 通信作者: 杨志新 E-mail: yangzhixin@126.com; 冯圣东 E-mail: fengshengdong@126.com

treatment, but there was no significant difference between J+D+O and J+D. The removal rates of BkF presented the highest increase extent in the two treatments and increased 68.09%, 63.78% respectively. In addition, the treatments were in the following order in terms of catalase enzyme activities: CK>J>J+D>J+D+O ($P<0.05$). We found that there were significant ($P<0.05$) linear negative correlation between the removal rates of the 10 individual HMW-PAHs and catalase activity in soil. However, the degradation rate of Chry, BkF, InP, DbA, BghiP had significant ($P<0.05$) linear positive correlation with lignin peroxidase activity. In conclusion, the individual PAH was removed by different treatments selectively, and the degradation rate were significantly improved by adding starch.

Keywords: a coal mining area; HMW-PAHs; immobilized *Fusarium.sp*; starch; aeration; soil enzyme activity

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是由两个或两个以上苯环组成的一类化合物,具有致癌、致畸、致突变的性质^[1-2],是美国环境保护署优先控制的持久性有机污染物^[3],其中4环及4环以上的高环PAHs(High molecular weight-PAHs, HMW-PAHs),因疏水性、亲脂性、稳定性更强,不易被去除^[4-5],最终会通过食物链和其他暴露途径对人体产生威胁^[6]。环境中绝大多数的PAHs积累于土壤中^[7],煤矿区、焦化厂区及其影响的农田土壤范围是典型的多环芳烃污染场地^[8],如本课题组前期对河北省某煤矿区农田土壤中PAHs进行生态风险评估发现,89%土壤存在生态风险^[9],10种HMW-PAHs总含量为3 392.77 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,而一般污染农田土壤中以低环PAHs积累为主^[10]。目前许多研究主要集中于土壤中PAHs的含量分布、来源、迁移转化特征以及PAHs的物化性质与其环境行为间的关系、风险评价等方面,对煤矿区附近土壤中PAHs污染修复的研究较少^[11],煤矿区农田污染土壤的修复迫在眉睫。

目前,环境友好的微生物修复是土壤中PAHs修复的主要途径之一。在真菌修复中,关于白腐真菌的研究报道较为深入^[12-13],而镰刀属真菌(*Fusarium.sp*)修复PAHs老化污染土壤仅见零星报道^[14]。本课题组前期在煤矿区污染土壤中筛选出的*Fusarium.sp*培养7 d对无机盐溶液BaP、BkF、DbA、BghiP、InP单个PAH的去除率均达38%以上,证实了它是具有去除HMW-PAHs潜力的菌株。微生物固定化技术是一种有效的土壤修复技术,能够显著增强微生物的环境适应能力和污染物去除能力,极大地提高污染土壤修复效果^[15-17],Su等^[16]证实固定化的真菌对环境具有更强

适应能力和更快的反应启动速度。此外,许多学者已证实,通过外加碳源如水杨酸、邻苯二甲酸、邻苯二酚、矿物油、葡萄糖等可提高微生物对PAHs的去除效果^[18-22],而大分子淀粉的作用影响研究尚少^[23]。课题组前期发现,添加淀粉可显著促进*Fusarium.sp*对无机盐溶液中HMW-PAHs的去除,1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 淀粉使*Fusarium.sp*对其去除率达到了83.07%,该菌株在淀粉外加碳源的条件下效果卓越。

本研究针对通过淀粉强化固定化*Fusarium.sp*修复煤矿区老化HMW-PAHs污染土壤是否也能达到较为理想的效果,以及其降解效果与前人研究的对PAHs去除相关的土壤酶活性是否有关等问题^[24-26],以河北某典型煤矿区长期污染的农田土壤为研究对象,利用玉米秸秆载体材料将*Fusarium.sp* ZH-H2固定化,在添加淀粉并伴随通气措施下,研究该菌剂对污染土壤HMW-PAHs的修复效果以及土壤酶活性变化规律,以期对煤矿区农田土壤HMW-PAHs的修复提供理论依据及技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

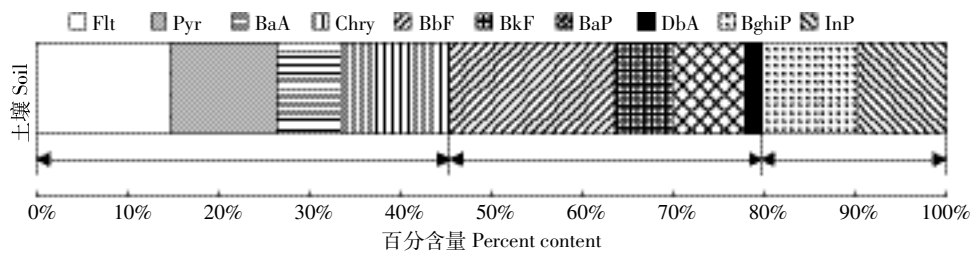
试验用土取自河北某典型煤矿区周边农田,阴干后过2 mm筛,4℃冰箱内保藏待用。其基本性质见表1,10种HMW-PAHs总含量为3 392.77 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,各PAHs含量比例如图1所示。

供试菌株ZH-H2(*Fusarium.sp*)为本课题组前期在煤矿区农田土壤中筛选的HMW-PAHs高效去除菌。保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;保藏号:CGMCC No.9316,已申请专利

表1 土壤基本理化性质

Table 1 The basic physical and chemical properties of soil

类型 Type	速效氮 Available nitrogen/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	速效磷 Available phosphorus/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	速效钾 Available potassium/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	有机质 Organic matter/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	pH
褐土	1.171	60.47	27.13	39.49	7.46



4 环 PAHs: 荧蒽(Flt)、芘(Pyr)、苯并(a)蒽(BaA)、蒽(Chry); 5 环 PAHs: 苯并(b)荧蒽(BbF)、苯并(k)荧蒽(BkF)、苯并(a)芘(BaP)、二苯并(a,n)蒽(DbA); 6 环 PAHs: 苯并(ghi)芘(BghiP)、茚并(1,2,3-cd)芘(InP), 总计 10 种 HMW-PAHs
4-ring PAHs: Flt, Pyr, BaA, Chry; 5-ring PAHs: BbF, BkF, BaP, DbA; 6-ring PAHs: BghiP, InP

图 1 土壤中单个 PAH 在 Σ 10 种 PAHs 的百分含量

Figure 1 The proportion of individual PAHs content in total

(专利号:201410432336.5)。

供试载体玉米秸秆,取自河北省保定市,将其洗净,杀青 30 min(105 ℃),阴干粉碎,过 1 mm 筛,并分别与草炭土按 1:2 混合均匀,121 ℃灭菌 20 min,备用。

有机试剂丙酮、二氯甲烷、氘代三联苯(替代物),4 溴-2 氟联苯(替代物)、氘代芘(内标物质)等均购于北京百灵威试剂公司。

1.2 样品制备

菌种培养:从斜面挑取一株 ZH-H2 菌接入高氏一号固体培养基的培养皿中,培养皿用封口膜封口,在 30 ℃恒温培养箱中培养 7 d。用无菌水反复冲洗吹打菌落,菌液经灭菌的 4 层纱布过滤后,得到孢子悬浮液,再用灭菌水调节孢子的数量为 1.25×10^7 cfu·mL⁻¹,作为原液备用。取出 5 mL 原液放入 20 mL 高氏一号液体培养基中,摇床培养 2 d 得到菌丝悬液。

载体菌剂制备:分别称取 1.1 中制备的秸秆材料 90 g 放入 500 mL 锥形瓶(共 9 瓶)。于 121 ℃高温高压灭菌 20 min,降温后分别加入上述菌液,并适当补充无菌水,在 30 ℃、150 r·min⁻¹ 摇床条件下培养 3 h,即得到固定化 ZH-H2 的玉米载体材料,用于土壤培养试验。

1.3 试验方案

采用上口直径 13 cm,底面直径 9 cm,高 11 cm 的试验用塑料钵钵,土壤培养试验处理见表 2。试验设置 3 个处理,每个处理 3 个重复,共 12 个钵钵。取 210 g 阴干土放入每个钵钵中,依据表 2 处理方案按 3:7 质量比向土壤中添加灭菌载体材料和玉米秸秆固定化 ZH-H2 载体材料,淀粉添加量为 5 g·kg⁻¹,充分混合后调节水分含量为田间持水量的 60%,将钵钵置于 30 ℃恒温培养箱中培养。每 2 d 补水一次,通气时间设定在灌水以后,由空气压缩机注入,输气管平铺

于土壤中,由土壤的体积质量、孔隙度和体积含水率计算注入空气量,通气量系数为 0.05,以 2 d 为一个通气周期,60 d 后采集土壤样品。将每盆土壤混合均匀后采用四分法分取样品,一半土壤样品过 1 mm 筛,密封,置于 4 ℃冰箱中保存,用于测定 PAHs 的残留量;另一半自然阴干后过 1 mm 筛,用于测定土壤酶活性。

表 2 土壤 HMW-PAHs 去除的试验方案

Table 2 The treatments of HMW-PAHs degradation in soil

处理	编号	土壤与固定化载体比(W/W)
土壤对照	CK	
土壤+固定化菌剂	J	7:3
土壤+固定化菌剂+淀粉	J+D	
土壤+固定化菌剂+淀粉+通气	J+D+O	

1.4 样品的测定指标及方法

土壤基本理化性质采用土壤农化常规分析法^[27]。

HMW-PAHs 指标测定及分析方法:Flt、Pyr、BaA、Chry、BbF、BkF、BaP、DbA、BghiP、InP,总计 10 种 HMW-PAHs。采用超声-索氏联合提取法提取,称取土壤样品 20 g 及 10 g 无水硫酸钠,混合均匀后,加入替代物(20 μg·mL⁻¹ 氘代三联苯与 4-溴-2 氟联苯) 20 μL,用丙酮与正己烷体积比 1:1 的提取剂超声提取 30 min,索氏水浴温度 70 ℃提取 12 h,经过干燥、浓缩、净化、再次浓缩定容,通过气相色谱-质谱法(GC-MS,Aglient 7890/5975c)测定样品^[28]。GC-MS 程序升温步骤:起始温度为 80 ℃,保持 2 min;以 10 ℃·min⁻¹ 上升到 140 ℃,保持 3 min;再以 10 ℃·min⁻¹ 上升到 210 ℃保持 3 min;最后以 5 ℃·min⁻¹ 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⁻¹,离子源温度 230 ℃,四

极杆温度 150 ℃^[28]。

土壤酶活性测定指标及分析方法:土壤过氧化氢酶活性采用高锰酸钾滴定法测定,以 20 min 每克土壤消耗 0.1 mol·L⁻¹ KMnO₄ 的毫升数表示;土壤木质素过氧化物酶活性以每分钟使 1 μmol 黎芦醇氧化成黎芦醛所需的酶量为一个酶活力单位(U)表示,黎芦醛的摩尔吸光系数 $\epsilon=9300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ^[29]。

气相色谱仪-质谱仪联用,气相色谱仪为安捷伦 7890,质谱仪为美国 HP5975 系列。

回收率和检测限的测定参考 EPA 标准方法。回收率采用土壤基质加标法,氘代三联苯与 4-溴-2 氟联苯回收率控制在 70%~130%,同时设置样品的 20% 进行平行提取试验^[28,30]。

1.5 数据统计分析

HMW-PAHs 的去除率(R_s)=(C_0-C_t)/ $C_0\times 100\%$

式中: C_0 为对照土壤 HMW-PAHs 的含量; C_t 为土壤中 HMW-PAHs 的残留含量(相对去除率)。

本论文数据采用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

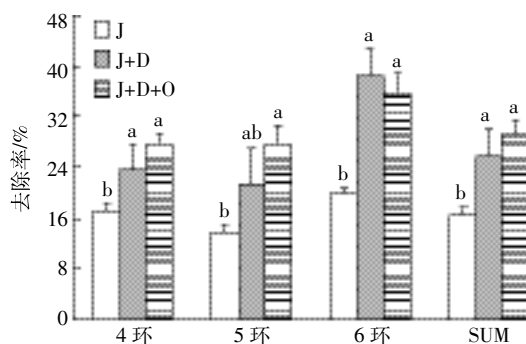
2 结果与分析

2.1 淀粉和通气促进固定化 ZH-H2 菌剂修复土壤 HMW-PAHs 的研究

2.1.1 ZH-H2 菌剂修复土壤 HMW-PAHs 总量

在不同处理条件下,固定化 ZH-H2 菌剂对土壤 10 种 HMW-PAHs 总量及不同环数成分的去除效果见图 2。HMW-PAHs 总量去除率在 J+D 和 J+D+O 处理间差异不显著($P>0.05$),分别为 25.89% 和 29.19%,但均显著高于处理 J (16.54%),分别提高了 56.5%、76.0%,说明添加淀粉能够显著促进固定化 ZH-H2 菌剂对土壤中 10 种 HMW-PAHs 总量的去除,而增加空气对其去除影响并不显著。

比较不同环数的去除率可知(图 2),在 J+D 和 J+D+O 两组处理下,6 环 PAHs 总量的去除率均高于 4 环和 5 环,分别为 38.31% 和 35.73%,J 处理下不同环数之间的去除效果差异不显著。另外,各环在 J+D+O 和 J+D 两组处理间的差异均不显著,且与 J 处理相比均有显著提高($P<0.05$),J+D+O 与 J 相比,4 环、5 环和 6 环 PAHs 去除率分别提高了 61%、100% 和 80%,去除效果提高显著;J+D 与 J 相比分别提高了 39.34%、54.89% 和 92.81%,去除效果提高显著。可见,添加淀粉并伴随通气条件对 5 环 PAHs 总量的去除提高最突出,而只添加淀粉处理对 6 环 PAHs 总量的



同一环数 PAHs 柱状图上不同小写字母表示不同处理下 PAHs 去除率差异显著($P<0.05$),下同

Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) among different treatments. The same below

图 2 不同措施下固定化 ZH-H2 菌剂对土壤总量及不同环数 PAHs 的去除效果

Figure 2 The degradation of the total PAHs and the PAHs with different rings in soil by immobilized ZH-H2 in the different treatments

去除提高更明显。

2.1.2 ZH-H2 菌剂修复土壤单个 HMW-PAH

如图 3 所示,在 J 处理下,单个 PAH 去除率范围为 9.12%~21.73%。经检验,BaA 的去除效果最佳,去除率达 21.73%;其次为 Flt、Pry、Chry、DbA、InP 和 BghiP;BkF 和 BaP 的去除效果最差,去除率为 9.12%、11.66%。但与课题组前期向老化污染土壤中添加 0.1 g·kg⁻¹ 游离菌相比,ZH-H2 对 BbF、BkF、BaP、InP、DbA、BghiP 的去除率 (5.49%、8.46%、0.35%、6.75%、5.79%、7.06%) 分别提高了 1.94、0.08、32.32、1.29、2.60、1.66 倍,对 PAHs 的去除效果显著。这说明在该矿区长期污染的老化土壤中添加该固定化菌剂对 10 种单个 HMW-PAHs 均有不同程度的去除潜力且比游离菌对老化污染土壤的修复效果高。在 J+D 处理下,10 种 HMW-PAHs 去除率范围为 17.93%~43.12%。经检验,在 10 种 PAHs 中,各 PAH 的去除效果由大到小依次为 InP (43.12%)>DbA、BghiP (31.56%、33.92%)>BaA (30.60%)>Flt、Pry、Chry、BkF、BaP>BbF (17.93%)。在 J+D+O 处理下,10 种单个 PAH 去除率范围为 24.34%~35.81%,其中 BaA、BghiP、InP 的去除率显著高于其他 7 种 HMW-PAHs,分别为 35.81%、35.67%、35.79%。与 J 处理相比,J+D 处理下 Flt、Chry、BkF、BaP、DbA、BghiP、InP 7 种 HMW-PAHs 的去除率显著提高,其中 BkF 的增幅最大,增加了 63.78%,表明添加淀粉对不同种类 HMW-PAHs 的去除促进作用有

一定差异;J+D+O 处理中 10 种单个 HMW-PAHs 去除率比 J 处理均有显著增加,其中 BkF 的增幅最明显,增加了 68.09%。对比 J+D 和 J+D+O 处理不难发现,除 BbF 外,其余 9 种 PAHs 的去除率在两组处理之间差异均不显著,通气对单个 HMW-PAH 的修复未产生显著影响。

2.2 不同处理对土壤酶活性影响的研究

不同处理土壤酶活性的变化见表 3。J 处理下木质素过氧化物酶活性大于 CK,但未达到显著水平,J+D、J+D+O 处理下木质素过氧化物酶活性显著高于 CK 和 J,与 HMW-PAHs 总量去除率的结果一致,推测土壤 HMW-PAHs 的降解可能与该酶活性有关,过氧化氢酶活性大小顺次为 J+D+O<J+D<J<CK($P<0.05$)。同时,研究两种土壤酶活性与 PAHs 去除率的相关性(表 4)可以看出,土壤过氧化氢酶活性与 Chry、BkF、BaP、DbA、BghiP、InP 的去除率呈极显著负相关,与 Flt、BaA 的去除率呈显著负相关;土壤木质素过氧

表 3 不同处理下土壤酶活性的测定结果

Table 3 Soil enzymatic activities in different treatments

处理 Treatments	木质素过氧化物酶活性 peroxidase activity/U·mL ⁻¹	过氧化氢酶活性 Catalase activity/mL·g ⁻¹
CK	8.47±0.40b	2.90±0.45a
J	9.68±2.91b	2.21±0.25b
J+D	12.37±4.44a	1.45±0.06c
J+D+O	12.37±2.59a	0.89±0.12d

化物酶活性与 Chry、BkF、InP、DbA、BghiP 的去除率呈显著正相关。该结果进一步证实了该酶可能与镰刀真菌 ZH-H2 降解 HMW-PAHs 的效率有关。

3 讨论

向土壤中添加高效去除菌、高效去除菌载体或者其营养物质等共代谢底物来提高污染物去除效果的方法被称为生物强化^[31-32]。本研究采用生物强化的方法向 PAHs 长期污染土壤中添加玉米秸秆固定化

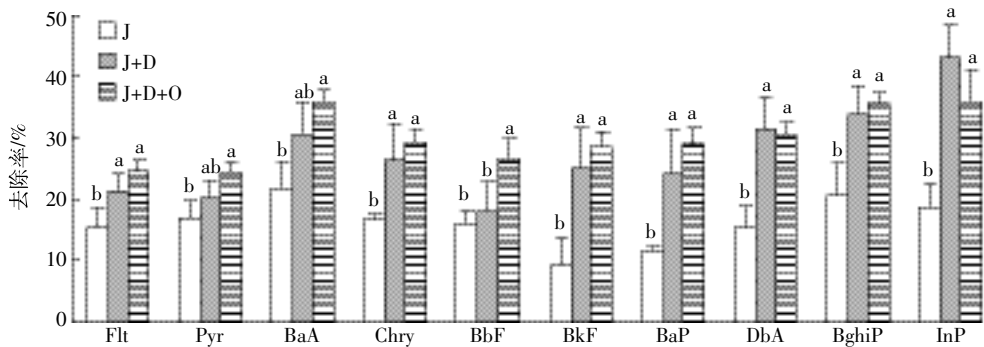


图 3 不同措施下固定化 ZH-H2 菌剂对土壤各 HMW-PAHs 的去除效果

Figure 3 The degradation of individual HMW-PAHs in soil by immobilized ZH-H2 in the different treatments

表 4 酶活性与各 HMW-PAHs 去除率的相关性分析

Table 4 The correlation analysis about the soil enzyme activity and the degradation of ten different HMW-PAHs

PAHs	过氧化氢酶活性线性方程 Catalase activity	相关系数 r Correlation coefficient	木质素过氧化物酶活性线性方程 Lignin peroxidase activity	相关系数 r Correlation coefficient
Flt	$y=-58.166x+148.16$	0.77*	$y=0.857x+10.42$	0.62
Pyr	$y=-41.378x+111.33$	0.65	$y=0.5464x+14.086$	0.47
BaA	$y=-90.912x+228.88$	0.67*	$y=1.154x+15.781$	0.46
Chry	$y=-97.622x+238.29$	0.90**	$y=1.3514x+8.1363$	0.68*
BbF	$y=-47.156x+123.7$	0.50	$y=0.3845x+15.686$	0.22
BkF	$y=-146.87x+343.27$	0.89**	$y=2.1085x-3.8788$	0.70*
BaP	$y=-126.08x+298.26$	0.88**	$y=1.7266x+1.2395$	0.65
DbA	$y=-134.19x+320.31$	0.89**	$y=1.9415x+2.9594$	0.70*
BghiP	$y=-112.8x+277.69$	0.88**	$y=1.6487x+10.726$	0.70*
InP	$y=-180.65x+428.98$	0.92**	$y=2.6118x+1.7874$	0.73*

注:*5%显著水平;**1%显著水平。

Fusarium.sp 修复 HMW-PAHs, 并结合添加淀粉以及通气措施来提高 HMW-PAHs 的修复效率。

与课题组前期向土壤中添加 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 游离菌的研究结果相比, ZH-H2 经固定化后显著促进了 PAHs 的去除。这可能是因为 ZH-H2 经固定化后单位体积介质中微生物的数量显著增加, 增加了 ZH-H2 与 PAHs 接触的机会; 或者是 ZH-H2 经固定化后微环境有利于屏蔽土著菌的竞争作用, 降低了污染物对 ZH-H2 的毒害作用, 使其可以保证高效的修复效果^[33]。另外, 过氧化氢酶分解土壤中过氧化氢, 是 H_2O_2 的解毒剂, 有利于防止过氧化氢对生物体的毒害作用, 可用作 PAHs 引起的氧化胁迫的生物标志物^[34]。本研究土壤过氧化氢酶活性随去除率升高而降低, 与王洪等^[35]研究得出的 PAHs 修复效果与过氧化氢酶活性呈负相关结论相一致, 可能是由于 PAHs 或者其中间代谢产物的毒性作用, 促使微生物固定化、添加淀粉等措施增强了对 ZH-H2 的保护作用, 导致土壤过氧化氢酶活性降低。

本研究中土培 60 d 后, 固定化 ZH-H2、固定化 ZH-H2-淀粉处理均能够显著促进固定化 *Fusarium.sp* 对 HMW-PAHs 污染农田土壤的修复。淀粉加强 HMW-PAHs 去除效果一方面归于淀粉基质可能改善了土壤微生物的营养条件, 利于固定化降解菌 ZH-H2 及土著微生物的生长^[36], 改变了微生物种群结构, 课题组前期已证实淀粉促进 *Fusarium.sp* 对 HMW-PAHs 降解的显著效果; 另一方面, 添加淀粉可能促进了固定化 ZH-H2 及土著微生物分泌一些关键的去酶^[37]。Wang^[38]已证实, *P. Chrysosporium* 分泌的木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶是土壤中 PAHs 去除的主要酶, 且其酶活性随着土壤有机质含量的提高而增加, *Collybia.sp* 和 *Rhizoctonia* 在土壤多环芳烃修复应用中产生木质素过氧化物酶^[39-40], 而且本研究中木质素过氧化物酶活性与 Chry、BkF、InP、DbA、BghiP 的去除率呈显著正相关。该结果进一步说明不同处理措施对土壤 HMW-PAHs 的去除影响可能与分泌的木质素过氧化物酶有关; 同时, 固定化 ZH-H2-淀粉处理中过氧化氢酶活性显著低于固定化 ZH-H2, 也可能是添加淀粉促进了对 ZH-H2 的保护作用。综合以上两方面因素认为, 添加淀粉可能是提升 HMW-PAHs 去除的主要原因。另外, 邹德勋等^[41]证明通气促进微生物生长, 提高了 PAHs 修复效果, 但 Teng^[23]等却得到了不同的结论, 他们发现在通气的处理中, BaP 的含量高于未通气处理。在本研究中, 通气措施

对 HMW-PAHs 修复的影响也不显著, 与 Teng 等的结论相符, 可见, 通气对不同菌种降解 PAHs 的影响差异较大。

在添加淀粉、淀粉-通气两组处理下, 6 环 PAHs 总量的去除率均高于 4 环和 5 环。一般来说, 随着 PAHs 环数的增加, 去除率因其生物可利用性降低而降低。孙铁珩等^[42]指出, PAHs 的难去除性与其分子量和环数呈正相关性, 与本研究结果相反, 不过有学者已证明淀粉能够增加 BaP 的水溶性^[43]。这可能是解释本研究结果的重要证据之一。另外, Olivier 等^[44]也发现, 镰刀菌属对 5 环、6 环 HMW-PAHs 的修复效果高于 4 环 PAHs, 与本研究结果一致。这可能与该菌种的去除特性有直接关系。

纵观国内外文献不难发现, 添加淀粉伴随通气与固定化 *Fusarium.sp* 菌剂相结合修复 HMW-PAHs 长期老化污染土壤中 10 种单体的研究尚未检索到相关文献。有学者已证实添加可溶性淀粉促进了土著微生物对 BaP 的去除效果^[20], 但尚未有添加淀粉与固定化 *Fusarium.sp* 菌剂相结合的方法用以修复 HMW-PAHs 长期污染老化土壤的研究。本研究证实了淀粉与固定化 *Fusarium.sp* 菌剂相结合措施对 6 环 PAHs 有较好的去除效果。

4 结论

(1) 添加淀粉能够显著促进固定化 ZH-H2 菌剂的降解能力, 而通气对其降解影响不大。

(2) 随着淀粉、通气调控因子的改变, 单个 HMW-PAH 的去除能力随之发生了改变。在 J+D+O 处理下固定化菌剂对 BaA、BghiP、InP 的修复效果最佳, 且对 6 环 PAHs 有较好的去除效果, 在 J+D 处理下对 InP 的去除最高。

(3) 不同处理土壤过氧化氢酶和木质素过氧化物酶活性可能影响对 HMW-PAHs 的去除。

参考文献:

- [1] Hunter R D, Ekunwe S I N, Dodor D E, et al. *Bacillus subtilis* is a potential degrader of Pyrene and Benzo[a]pyrene[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2005, 2(2): 267-271.
- [2] 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.
MAO Jian, LUO Yong-ming, TENG Ying, et al. Biodegradation of PAHs by *Paracoccus aminovorans* HPD-2 in contaminated soil[J]. *Soils*, 2009, 41(3): 448-453.
- [3] Benner B A, Bryner N P, Wise S A, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from the combustion of crude oil on water[J]. *Environ Sci*

- Technol*, 1990, 24: 1418-1427.
- [4] Shree N S, Rudra D T. Environmental bioremediation technologies[M]. Berlin: Springer, 2007: 409-443.
- [5] 罗 霖. 高效降解高分子量多环芳烃的混合菌剂的开发[D]. 北京: 轻工业环境保护研究所, 2013: 1-7.
- LUO Lin. Development of a mixed microbial-agent efficiently degrading High-molecular-weight-polycyclic-aromatic-hydrocarbons[D]. Beijing: Environmental Production Institute of Light Industry, 2013: 1-7.
- [6] 徐 莹. 高分子量多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及其降解特性研究[D]. 南京: 南京大学, 2014: 1-9.
- XU Ying. Isolation, identification and characteristics of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons degradation strains[D]. Nanjing: Nanjing University, 2014: 1-9.
- [7] Wild S R, Jones K C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the united kingdom environment: A preliminary source inventory and budget[J]. *Environ Pollut*, 1995, 88 (1): 91-108.
- [8] 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.
- LIU Da-meng, WANG Wei, LI Yun-yong. Distribution and occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons from the Shougang coking plant[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(4): 746-749.
- [9] 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.
- ZHAO Ou-ya, FENG Sheng-dong, SHI Wei, et al. A method for assessing the ecological risks due to the polycyclic aromatic hydrocarbons in the farming soil near coal mine area[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2015, 15(2): 352-358.
- [10] 肖春燕, 邵 超, 赵同谦, 等. 燃煤电厂附近农田土壤中多环芳烃的分布特征[J]. 环境科学学报, 2008, 28(8): 1579-1585.
- XIAO Chun-yan, TAI Chao, ZHAO Tong-qian, et al. Distribution characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the soil around the Jiaozuo Power Plant[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(8): 1579-1585.
- [11] 刘静静. 典型煤矿区土壤中烃类化合物的地球化学循环研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2014: 1-15.
- LIU Jing-jing. Geochemical cycling of hydrocarbon compounds in soil of typical coal mine district[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2014: 1-15.
- [12] Tony H, Risky A K. Fate and cometabolic degradation of benzo[a]pyrene by white-rot fungus *Armillaria* sp. F022[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 107: 314-318.
- [13] Andrzej M, Christian J, Aloys H. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase of *Trametes versicolor*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 22(5): 335-341.
- [14] Olivier P, Catherine R, Etienne V, et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2004, 54: 45-52.
- [15] 王 新, 李培军, 巩宗强, 等. 混合固定化酵母菌对苯并(a)芘污染土壤的修复[J]. 环境污染与防治, 2008, 30(1): 1-8.
- WANG Xin, LI Pei-jun, GONG Zong-qiang, et al. Remediation of soil contaminated with benzo(a)pyrene using mixed immobilized yeast strains[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2008, 30(1): 1-8.
- [16] Su D, Li P J, Wang X, et al. Biodegradation of benzo[a]pyrene in soil by immobilized fungus[J]. *Environmental Engineering Science*, 2008, 25(8): 1181-1188.
- [17] 王 新, 李培军, 巩宗强, 等. 莲藕状固定化真菌(镰刀菌)对土壤中菲、芘的降解[J]. 中国环境科学, 2002, 22(1): 44-47.
- WANG Xin, LI Pei-jun, GONG Zong-qiang, et al. The degradation of phenanthrene and pyrene in soil with the lotus-root form to immobilized *Fusarium* sp.[J]. *China Environmental Science*, 2002, 22(1): 44-47.
- [18] 吕雪峰, 王 坚. 污染土壤生物修复的共代谢机制研究进展[J]. 科技创新导报, 2013(3): 49-52.
- LÜ Xue-feng, WANG Jian. Recent advances in cometabolism mechanisms for bioremediation of contaminated soil[J]. *Science and Technology Innovation Herald*, 2013(3): 49-52.
- [19] Mahaffey W R, Gibson D T, Cerniglia C E. Bacterial oxidation of chemical carcinogens: Formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(10): 2415-2423.
- [20] Lun F Y, Ying T, Luo Y M, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Trichoderma reesei* FS10-C and effect of bioaugmentation on an aged PAH-contaminated soil[J]. *Bioremediation Journal*, 2015, 19(1): 9-11.
- [21] 温继伟. 白腐真菌 *Pseudotrametes gibbosa* 共代谢降解芘的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- WEN Ji-wei. Co-metabolic degradation of pyrene by white-rot fungus *Pseudotrametes gibbosa*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2011.
- [22] Tittle P C. Use of alternative growth substrates to enhance PAH degradation. In: R. E. Hincee(eds)[J]. *Bioremediation of Recalcitrant Organics*, 1995: 1-7.
- [23] Teng Y, Luo Y M, Li F P, 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: 167-178.
- [24] 周礼凯. 土壤酶学[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 107-240.
- ZHOU Li-kai. Soil enzymology[M]. Beijing: Science Press, 1987: 107-240.
- [25] 刘世亮, 骆永明, 丁克强, 等. 黑麦草对苯并[a]芘污染土壤的根际修复及其酶学机理研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2): 52632.
- LIU Shi-liang, LUO Yong-ming, DING Ke-qiang, et al. Rhizosphere remediation and its mechanism of benzo[a]pyrene-contaminated soil by growing ryegrass[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2): 52-63.
- [26] 蓝 靖. 木质素过氧化物酶对疏水性芳香化合物的高效降解及机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2008.
- LAN Jing. Studies on the degradation of hydrophobic aromatic compounds with lignin peroxidase and the related mechanism[D]. Jinan: Shandong University, 2008.
- [27] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 30-163.
- BAO Shi-dan. Soil analysis[M]. Beijing: Chinese Agricultural Press,

- 2000;30-163.
- [28] 赵欧亚. 淀粉和苜蓿促进煤矿区土壤高环 PAHs 污染的真菌修复研究[D]. 保定:河北农业大学, 2015:12-14.
- ZHAO Ou-ya. Study on enhancing fungi remediation of coal mine area soil contaminated with HMW-PAHs by starch and alfalfa[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2015:12-14.
- [29] 程晓滨. 裂褶菌 F17 锰过氧化物酶的分离纯化及其对偶氮染料脱色的研究[D]. 合肥:安徽大学, 2008:8-10.
- CHENG Xiao-bin. Purification of a new manganese peroxidase of the White-rot Fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of Azo Dyes by the enzyme[D]. Hefei: Anhui University, 2008:8-10.
- [30] EPA 8270d, Semivolatile organic compounds by gas chromatography-mass spectrometry[S]. United States Environmental Protection Agency. 1998.
- [31] Thompson I P, Van G C, Ciric L, et al. Bioaugmentation for bioremediation: The challenge of strain selection[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(7):909-915.
- [32] Seklemova E, Pavlova A, Kovacheva K. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: Field demonstration[J]. *Biodegradation*, 2001, 12(5):311-316.
- [33] 胡广军, 梁成华, 李培军, 等. 固定化微生物对多环芳烃污染土壤的降解[J]. 生态学杂志, 2008, 27(5):745-750.
- HU Guang-jun, LIANG Cheng-hua, LI Pei-jun, et al. Degradation of soil polycyclic aromatic hydrocarbons by immobilized microbes[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2008, 27(5):745-750.
- [34] Lionetto M G, Caricato R, Giordano M E, et al. Integrated use of biomarkers (acetyl cholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area[J]. *Marine Pollute Bulletin*, 2003, 46:324-330.
- [35] 王 洪, 李海波, 孙铁珩, 等. 生物修复 PAHs 污染土壤对酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 2011, 20(4):691-695.
- WANG Hong, LI Hai-bo, SUN Tie-heng, et al. Bioremediation of PAHs contaminated soil and its impacts on soil enzyme activity[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(4):691-695.
- [36] Ana-Maria R, Catherine R, Gheorghe S, et al. Synthesis of alkylated potato starch derivatives and their potential in the aqueous solubilization of benzo[a]pyrene[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 93(1):184-190.
- [37] 姜 岩, 杨 颖, 张贤明. 典型多环芳烃生物降解及转化机制的研究进展[J]. 石油学报(石油加工), 2014, 30(6):1137-1150.
- JIANG Yan, YANG Ying, ZHANG Xian-ming. Review on the biodegradation and conversion mechanisms of typical polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section)*, 2014, 30(6):1137-1150.
- [38] Wang C P, Sun H W, Li J M, et al. Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils[J]. *Chemosphere*, 2009, 77(6):733-738.
- [39] 许华夏, 李培军, 刘 宛, 等. 真菌细胞色素 P450 与多环芳烃浓度及降解率的相互关系 [J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(5):972-976.
- XU Hua-xia, LI Pei-jun, LIU Wan, et al. Interrelationship between Cytochrome P450 in fungi and contents and degradation rates of PAHs [J]. *Journal Agro-Environment Science*, 2004, 23(5):972-976.
- [40] McErlean, C, Marchant, R, Banat, I M. An evaluation of soil colonization of selected fungi and their production of ligninolytic enzymes for use in soil bioremediation applications[J]. *Anton Leeuw Int J G*, 2006, 90:147-158.
- [41] 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.
- ZOU De-xun, LUO Yong-ming, TENG Ying, et al. Enhanced microbial remediation of long-term polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) polluted soils[J]. *Soils*, 2006, 38(5):652-656.
- [42] 孙铁珩, 宋玉芳, 许华夏, 等. 植物法生物修复 PAHs 和矿物油污染土壤的调控研究[J]. 应用生态学报, 1999, 10(2):225-229.
- SUN Tie-heng, SONG Yu-fang, XU Hua-xia, et al. Plant bioremediation of PAHs and mineral oil contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1999, 10(2):225-229.
- [43] Ana-Maria R, Catherine R, Gheorghe S, et al. Synthesis of alkylated potato starch derivatives and their potential in the aqueous solubilization of benzo[a]pyrene[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 93(1):184-190.