

用微生物对六六六污染土壤进行生物修复的初步试验研究

刘继芳¹, 逢焕成², 严慧峻³, 张鸿雁³

(1. 中国农业科学院办公室, 北京 100081; 2. 中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京 100081;
3. 北京丹路生物工程有限责任公司, 北京 100081)

摘要: 采用田间采集土样、室内培养的方法, 进行了在含有一定浓度六六六的土壤中添加特别筛选的 B I 细菌进行降解等初步试验。研究结果表明, 蓖麻籽粕对 B I 细菌数量扩增有较好的促进作用; 30 d 是试验条件下外加 B I 细菌生长的最旺盛期, B I 细菌对六六六降解效果最好的时期可能是试验进行后的 30 d 左右; 试验进行的 30 d 内, 六六六浓度 1 ~ 6 mg · kg⁻¹ 范围内的土壤, 对 B I 细菌的数量扩增没有太大的抑制作用, 六六六浓度达到和大于 18 mg · kg⁻¹ 时, 对 B I 细菌产生了非常显著的毒害作用, 12 ~ 18 mg · kg⁻¹ 是本试验条件下 B I 数量扩增的临界范围值; 土壤中加 1 ~ 6 mg · kg⁻¹ 六六六, 并没有对外加 B I 菌液的土壤过氧化氢酶活性产生明显的抑制, 较低含量范围内的六六六似乎有刺激添加 B I 菌液土壤中的过氧化氢酶活性的作用; 初步试验的结果表明加入 B I 细菌对土壤中污染物六六六的降解有较明显的效果。

关键词: 生物修复; 微生物; 六六六; 降解

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 – 2043(2003)06 – 0677 – 04

Primary Study on Biomediation of Contaminated Soil with Hexachlorocyclohexane (BHC) by Microorganisms

LIU Ji-fang¹, PANG Huan-cheng², YAN Hui-jun³, ZHANG Hong-yan³

(1. The Academic Office of The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Soils and Fertilizers Institute, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Beijing Danlu Bioengineering Ltd., Beijing 100081, China)

Abstract: The primary experiment of adding B I bacteria to a soil polluted by BHC, a very difficultly degraded organic hydrocarbon insecticide, indicated that castor bean – cake was the best material for reproduction of B I bacteria among a few substances used in the experiment. The number of B I bacteria added in soil increased to a vivid period after 30 days, when possibly was a very good period for BHC degradation after B I bacteria added to the soil. On the other hand, it has been indicated that B I bacteria were not inhibited remarkably during the first 30 days at concentration of 1 ~ 6 mg · kg⁻¹ for BHC added to the soil. But the bacteria exhibited a remarkable inhibition while the BHC' content was higher than 18 mg · kg⁻¹. It may presumed that BHC' content of 12 ~ 18 mg · kg⁻¹ was a critical value for B I bacteria reproduction. No effect on catalase activity was found in the soil receiving B I bacteria while BHC' content was among 1 ~ 6 mg · kg⁻¹, and even BHC with low content seemed to excite some catalase activity. It is suggested that B I bacteria degrade BHC remained in soil effectively.

Keywords: bioremediation; hexachlorocyclohexane (BHC); microorganism; degradation

含有氯的农药对大多数生物体而言是最复杂、最具有毒性以致最难以代谢的化学物质。六六六(又称六氯化苯或六氯环己烷)是一种广谱有机氯杀虫剂, 具有胃毒、触杀和熏蒸 3 种作用方式, 用以防治蝗虫、稻螟虫、小麦吸浆虫等农业害虫和蚊、蝇、臭虫等卫生

害虫, 效力强而持久。但由于其对环境的污染严重, 已被禁止使用。六六六毒性高, 施用过六六六的土壤, 其污染在短时间内不能快速消除。在重视清洁生产和无公害食品的今天, 如何采取有效手段加速土壤污染消除的进程, 已引起生产者、科学家及社会的普遍关注。在众多的含氯农药中, 六六六具有环状结构, 被认为是较难降解的一种农药。

国外, 自 20 世纪 70 年代以来, 尝试研究用微生物

物对土壤污染物进行降解^[1~3], 80 年代后, 分子生物技术和手段已广泛地应用到了对环境中可降解微生物及降解机理方面的研究, Michigan 州立大学的 James Tiedje 的实验室, 首次从污染的河泥中分离出了具有脱氯功能的厌氧微生物, 后来命名为蒂氏脱硫念珠菌, 后来又提出了还原脱氯反应与微生物的能量代谢是结合在一起的理论^[2]。由于含氯有机物在好氧条件下很难分解, 厌氧还原脱氯就为此类化合物在自然条件下的分解提供了一条途径, 也为人们对微生物代谢途径的了解增加了认识。据报道, 六六六在渍水土壤中, 100 d 内大部分能被微生物降解, 而在非渍水的湿润土壤中的降解则要慢得多^[4]。

筛选分离具有特殊降解功能的环境微生物, 用分子探针监测它们在不同环境中的分布, 以及与其他种类微生物之间的关系是目前对污染物进行微生物降解研究的重点之一^[5]。许多科研人员从世界各地的不同环境中分离出了能分解不同种类氯代有机物的微生物。本文用从多个供试微生物中筛选出来的 B I 细菌, 在非渍水土壤条件下进行六六六的生物降解试验, 探索在好氧条件下六六六微生物降解的可能性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验土壤取自北京怀柔县, 土壤全氮含量为 0.097%, 土壤有机质为 1.64%, 土壤 pH 8.61, 试验用 B I 菌液由北京丹路生物工程有限责任公司提供, B I 菌液 pH 7.46, H₂O₂ 酶活性 0.1470 0.1 mol · L⁻¹ KMnO₄ mL · g⁻¹, 有机氯农药为 6% 六六六。

1.2 试验处理

1.2.1 B I 细菌数量快速扩增生长因子试验

选取生物素 V_H、芝麻饼等添加剂作为 B I 细菌的数量快速扩增试验因子, 培养基加添加剂灭菌后, 各处理加入每毫升含 10 亿个 B I 细菌的菌液 5 mL。上摇床, 设定转速为 180 r · min⁻¹, 温度为 30 ℃, 培养 48 h, 然后进行镜检, 用平板计数法测定 B I 细菌数量。试验分 8 个处理、4 次重复。处理如下:

- I. B I 细菌 + 培养基;
- II. B I 细菌 + 培养基 + V_H (1 mg · kg⁻¹);
- III. B I 细菌 + 培养基 + V_H (10 mg · kg⁻¹);
- IV. B I 细菌 + 培养基 + V_H (50 mg · kg⁻¹);
- V. B I 细菌 + 培养基 + 1% 芝麻饼;
- VI. B I 细菌 + 培养基 + 1% 荞麦粉;
- VII. B I 细菌 + 培养基 + 1% 蓖麻籽粕;

VIII. B I 细菌 + 培养基 + 0.1% 辣椒粉。

1.2.2 六六六对 B I 细菌存活影响的试验

模拟北京地区主要土壤的理化条件, 控制 pH 8.61、温度 28 ℃、土壤水分 18%, 试验土壤进行灭菌处理(杂菌数 <10⁵ 个 · g⁻¹)。

设定添加不同剂量六六六分别为 1、6、12、18、24 mg · kg⁻¹, 按上述条件进行培养, 分别在 15、30、45、60 d 后取样测定存活的优势菌株和过氧化氢酶的活性。每个处理 4 次重复, 处理中 B I 菌液的 B I 细菌含量为 10 亿个 · mL⁻¹。具体处理如下:

- I. 100 g 土 + 21 mL 无离子水;
- II. 100 g 土 + 21 mL 培养基;
- III. 100 g 土 + 21 mL 菌液;
- IV. 100 g 土 + 21 mL 菌液 + 1 mg · kg⁻¹ 六六六;
- V. 100 g 土 + 21 mL 菌液 + 6 mg · kg⁻¹ 六六六;
- VI. 100 g 土 + 21 mL 菌液 + 12 mg · kg⁻¹ 六六六;
- VII. 100 g 土 + 21 mL 菌液 + 18 mg · kg⁻¹ 六六六;
- VIII. 100 g 土 + 21 mL 菌液 + 24 mg · kg⁻¹ 六六六。

1.2.3 B I 细菌对六六六降解的试验

在 pH8.35 的灭菌土壤中, 分别加入 0.5、1、3 mg · kg⁻¹ 六六六, 再加入每毫升 10 亿个 B I 细菌的菌液 21 mL。控制温度为 30 ℃, 水分含量为 18% ~ 20%。30 d 后取土, 测定六六六的降解率。试验为 6 个处理, 4 次重复:

- 100 g 土 + 0.5 mg · kg⁻¹ 六六六 + 21 mL 水;
- 100 g 土 + 0.5 mg · kg⁻¹ 六六六 + 21 mL B I 菌液;
- 100 g 土 + 1 mg · kg⁻¹ 六六六 + 21 mL 水;
- 100 g 土 + 1 mg · kg⁻¹ 六六六 + 21 mL B I 菌液;
- 100 g 土 + 3 mg · kg⁻¹ 六六六 + 21 mL 水;
- 100 g 土 + 3 mg · kg⁻¹ 六六六 + 21 mL B I 菌液。

2 结果和讨论

2.1 培养物质对 B I 细菌生长的影响

为寻求加速 B I 细菌快速繁殖生长因子和提高土壤过氧化氢酶活性, 提高土壤有机氯污染降解的速率, 选取了化学试剂生物素(V_H), 农副产品芝麻粕、荞麦皮、蓖麻籽粕和辣椒粕 5 种物质进行初步试验, 它们对 BI 细菌数量扩增的影响试验结果见表 1 和图1。

从表 1 的结果看出, 以处理 I (B I + 培养基) 为对照处理, 其 B I 细菌数量为 1.21 × 10⁷ 个 · g⁻¹。处理 II [B I + V_H (1 mg · kg⁻¹)], B I 细菌 3.99 × 10⁷ 个 · g⁻¹, 是对照处理的 3.29 倍。处理 III [B I + V_H (10 mg · kg⁻¹)] 和处理 IV [B I + V_H (50 mg · kg⁻¹)], B I 细菌数

表 1 不同培养物质对 B I 细菌数量的影响(个·g⁻¹)

Table 1 The effects of different materials on the number of B Ibacteria

处理	重复				平均
	1	2	3	4	
I. B I+培养基(CK)	4.43×10 ⁶	1.98×10 ⁷	1.01×10 ⁷	1.41×10 ⁷	1.21×10 ⁷
II. B I+V _H (1 mg·kg ⁻¹)	3.18×10 ⁷	4.80×10 ⁷	4.38×10 ⁷	3.60×10 ⁷	3.99×10 ⁷
III. B I+V _H (10 mg·kg ⁻¹)	4.53×10 ⁶	5.85×10 ⁶	5.64×10 ⁶	4.74×10 ⁶	5.19×10 ⁶
IV. B I+V _H (50 mg·kg ⁻¹)	9.00×10 ⁵	2.08×10 ⁶	1.99×10 ⁶	9.90×10 ⁵	1.49×10 ⁶
V. B I+1% (芝麻饼)*	—	—	—	—	—
VI. B I+1% (荞麦皮)	2.53×10 ⁷	1.68×10 ⁷	1.89×10 ⁷	2.33×10 ⁷	2.11×10 ⁷
VII. B I+1% (蓖麻子粕)	4.30×10 ⁸	2.73×10 ⁸	3.43×10 ⁸	3.61×10 ⁸	3.52×10 ⁸
VIII. B I+0.1% (辣椒粕)	5.15×10 ⁷	5.28×10 ⁷	5.18×10 ⁷	5.26×10 ⁷	5.22×10 ⁷

注:在 10⁻⁴ 培养皿上检测不到 B I 细菌。

量分别为 5.19×10⁶ 个·g⁻¹、1.49×10⁶ 个·g⁻¹,均小于对照,说明加入 10 mg·kg⁻¹, 50 mg·kg⁻¹ V_H 抑制了 B I 细菌的生长繁殖。处理 V [(B I+1% 芝麻粕)],在稀释度 10⁻⁴ 培养皿上检测不到 B I 细菌,表明试验用芝麻粕也抑制了 B I 细菌生长。处理 VI[(B I+1% 荞麦皮)],B I 细菌数量为 2.11×10⁷ 个·g⁻¹,优于对照,为其 1.74 倍。处理 VII [(B I+1% 蓖麻子粕)]的 B I 细菌数量为 3.52×10⁸ 个·g⁻¹,是对照的 29 倍。处理 VIII [(B I+0.1% 辣椒粕)]的 B I 细菌为 5.22×10⁷ 个·g⁻¹,是对照的 4.31 倍。

综上所述,添加的培养物质对 B I 数量扩增的影响顺序为 VII> VIII> II> VI> I> III> IV> V, 农副产品蓖麻子粕能促进 B I 细菌的快速繁殖生长,在试验处理中效果最好。

当然,本试验研究只是初步的,蓖麻子粕添加的浓度会不会影响到 B I 数量扩增,其他几个添加物处理的初步实验结果不如蓖麻子粕的效果好,是否与添加浓度有关等等还需要做进一步的深入研究。

2.2 六六六对 B I 细菌存活的影响

2.2.1 六六六对 B I 细菌存活的影响

为研究 B I 细菌在不同六六六浓度下的生存能力,设计了含有 1、6、12、18、24 mg·kg⁻¹ 六六六的土壤,考察 B I 细菌在其中的变化,并观察时间对 B I 细菌存活的影响。不同处理在 15、30、45、60 d 时的 B I 数量试验结果见表 2。

由表 2 可见,培养 15 d 的土样中,不加 B I 细菌的 I(土+水)、II(土+培养液)两处理,B I 细菌数量级为 10⁶ 个,均小于 III、IV、V、VI(土+B I、土+B I 分别加 0、1、6、12 mg·kg⁻¹ 六六六)4 个处理,而 VII、VIII(土+B I 分别加 18、24 mg·kg⁻¹ 六六六)两处理中,B I 细菌数量小于不加 B I 细菌的 I(土+水)、II(土+培养液)两个对照处理。说明培养 15 d 的各处理,以加 B I 菌液不加农药处理的 B I 细菌(处理 III)数量最多,加 1~12 mg·kg⁻¹ 六六六的处理,随农药量增加,B I 细菌数量减少。而加 18~24 mg·kg⁻¹ 六六六处理,抑制了 B I 细菌的生长。

试验进行到 30 d 时,各处理间的相对差异趋势与 15 d 时相似。

以上初步试验结果表明本试验条件下,试验进行的 30 d 内,B I 细菌在六六六浓度 0~12 mg·kg⁻¹ 范围内的数量扩增受到一定影响,虽然影响的程度随着农药用量的加大而提高,但总体上受抑制的程度不明显;六六六浓度达到和大于 18 mg·kg⁻¹ 时,对 B I 细菌产生了非常显著的毒害作用,12~18 mg·kg⁻¹ 是本试验条件下 B I 数量扩增的临界范围值。

另外,加 1 mg·kg⁻¹ 六六六处理 IV(相当于每 hm² 施 2.55 kg 的浓度为 6% 的六六六)和 6 mg·kg⁻¹ 六六六处理 V(相当于每 hm² 施 15.3 kg 的六六六),B I 细菌数量高于不加 B I 菌液处理的数十倍,说明在加 1~6 mg·kg⁻¹ 六六六的土壤中,对外加 B I 细菌生

表 2 六六六浓度对 B I 细菌数量的影响(个·g⁻¹)

Table 2 The effects of BHC contents on the number of B Ibacteria (个·g⁻¹)

培养时间 /d	处理*							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
15	6.91×10 ⁶	7.28×10 ⁶	8.27×10 ⁸	1.56×10 ⁸	1.17×10 ⁸	6.50×10 ⁷	1.05×10 ⁶	1.10×10 ⁶
30	1.93×10 ⁷	2.58×10 ⁷	9.42×10 ⁹	8.05×10 ⁸	5.20×10 ⁸	1.56×10 ⁸	8.91×10 ⁷	3.13×10 ⁷
45	9.27×10 ⁶	6.21×10 ⁷	1.41×10 ⁸	6.65×10 ⁷	7.11×10 ⁷	6.06×10 ⁷	6.02×10 ⁷	5.18×10 ⁷
60	7.55×10 ⁶	1.23×10 ⁷	7.31×10 ⁷	5.59×10 ⁷	7.37×10 ⁷	6.63×10 ⁷	6.35×10 ⁷	2.18×10 ⁷

长繁殖未产生太大影响。

试验进行到 45 d 时,各处理中只有处理Ⅲ(土 + B I + 0 mg · kg⁻¹ 六六六)的 B I 细菌数量明显高于处理Ⅱ(土 + 培养液),试验到 60 d 时,只有处理 I(土 + 水)的 B I 细菌数量较低,其他各处理土样中 B I 细菌数量差别不大。说明随着培养时间的延长,B I 细菌生长受六六六的抑制程度增大,也可能是由于共 B I 细菌繁殖所需营养物质不够所致。

从时间分布上看,30 d 是各处理在试验进行的 60 d 时间里 B I 细菌生长的最旺盛期。加 B I 菌液的各处理,30 d 时的 B I 细菌的存活量是培养 15 d 的 2.4 倍(处理Ⅵ)~85 倍(处理Ⅶ)。B I 细菌对六六六降解效果最好的时期可能是试验进行后的 30 d 左右。

2.2.2 六六六对过氧化氢酶活性的影响

各处理在试验进行 60 d 期间的不同时期,土壤中过氧化氢酶的测定结果见表 3。

表 3 六六六浓度对过氧化氢酶活性的影响(H₂O₂ 酶活性 0.1 mol · L⁻¹ KMnO₄ mL · g⁻¹)
Table 3 The effects of BHC contents on catalase activity (0.1mol · L⁻¹ KMnO₄ mL · g⁻¹)

试验时间 /d	处理*							
	I	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	V	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ
15	0.7789	0.8744	0.9045	0.8794	0.8291	0.7889	0.8899	0.8744
30	0.7286	0.8744	0.8844	0.9548	0.9144	0.8643	0.8040	0.8593
45	0.7323	0.8838	0.8636	0.8282	0.9646	0.7222	0.9393	0.8080
60	0.8374	0.9947	0.9947	1.0455	1.0911	0.8526	0.9693	0.9896

积的水)六六六的自然降解率分别为 59.50%、32.28%、49.12%,加 B I 菌液处理土壤中,六六六的降解率分别为 74.68%、51.25%、67.11%,分别比对照提高了 15.18%、18.97%、17.99%。可见 B I 细菌对土壤中污染物六六六有较明显的降解作用。

3 结论

(1) 初步试验的结果表明,蓖麻籽粕能较好地促进 B I 细菌数量扩增,是一种促进 B I 细菌繁殖的增效剂。

(2) 从时间分布上看,30 d 是 B I 细菌繁殖的最旺盛期,B I 细菌对六六六降解效果最好的时期可能是试验进行后的 30 d 左右。

(3) 本试验条件下,试验进行的 30 d 内,在六六六浓度 0~12 mg · kg⁻¹ 范围内 B I 细菌的数量扩增受到一定影响,虽然影响的程度随着农药用量的加大影响而提高,但总体上受抑制的程度不明显。其中加 1~6 mg · kg⁻¹ 六六六的土壤,对外加 B I 细菌生长繁殖未产生太大影响。

(4) 六六六浓度达到和大于 18 mg · kg⁻¹ 时,对

表 3 表明,试验进行到 15 d 时,以处理Ⅲ(土 + B I + 0 mg · kg⁻¹ 六六六)的过氧化氢酶活性最高为 0.9045 0.1 mol · L⁻¹ KMnO₄ mL · g⁻¹。加 1~12 mg · kg⁻¹ 六六六处理中,以加 1 mg · kg⁻¹ 六六六处理过氧化氢酶活性高于其他两处理,为 0.8794 0.1 mol · L⁻¹ KMnO₄ mL · g⁻¹。

试验进行到 30 d 和 60 d 时,加 1 mg · kg⁻¹ 和 6 mg · kg⁻¹ 六六六的处理Ⅳ和 V 比加 I(土 + 水)和Ⅱ(土 + 培养液)二处理的过氧化氢酶活性高。看出土壤中加 1~6 mg · kg⁻¹ 六六六农药,并没有对土壤过氧化氢酶活性产生大的抑制,较低含量范围内的六六六似乎有刺激添加 B I 菌液土壤中过氧化氢酶活性的作用。

2.3 B I 细菌对六六六降解率的影响

试验的结果是,试验进行 30 d 后添加 0.5、1、3 mg · kg⁻¹ 六六六的各处理,对照(加与 B I 菌液等体

B I 细菌产生了非常显著的毒害作用,12~18 mg · kg⁻¹ 是本试验条件下 B I 数量扩增的临界范围值。

(5) 土壤中加 1~6 mg · kg⁻¹ 六六六农药,并没有对外加 B I 菌液的土壤过氧化氢酶活性产生明显的抑制,较低含量的六六六似乎有刺激添加 B I 菌液土壤中过氧化氢酶活性的作用。

(6) 初步试验的结果表明 B I 细菌对土壤中污染物六六六有较明显的降解作用。

参考文献:

[1] Gibson DT. (ed.) Microbial Degradation of organic compounds[M]. Marces Dekker, Inc, New York, USA. 1984, 535.
[2] Omenn GS. (ed.) Environmental biotechnology: reducing risks from environmental chemicals through biotechnology[M]. Plenum Press, New York, USA. 1988. 505.
[3] Young LY. Cemiglia CE. (eds.) Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals[M]. John Wiley and Sons, Inc, New York, USA. 1995. 654.
[4] 育如,杨启银. 污染物的降解与环境的生物修复[J]. 环境保护, 2001, (1): 16~18.
[5] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Review, 1995, 59: 143~169.