

土壤电动修复中电极切换对土壤微生物群落的影响

赵庆节, 沈根祥, 罗启仕, 刘芳, 梁丹涛, 顾海蓉

(上海市环境科学研究院, 上海 200233)

摘要:通过细菌计数和 Biolog 方法,研究了在 $3.0 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的电压梯度下,不同电场切换周期(24 h、5 h、10 min 和 1 min)对土壤微生物群落的影响。结果表明,电压梯度为 $3.0 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的电场作用能够促进土壤微生物的活性,但会轻微地降低土壤微生物功能多样性,电场切换不能改变这种电场对微生物群落的影响;长时间的电场处理下,电极反应对微生物数量和功能多样性损害严重,切换电场电极能有效消除电极效应,电场电极切换周期 $\leq 5 \text{ h}$ 时,可保护电极附近土壤微生物多样性,当切换周期 $\leq 10 \text{ min}$ 时,不仅可保护土壤微生物多样性,而且可以保护微生物数量。研究结果说明了电场电极切换能有效降低电极反应对微生物群落的影响,揭示了电场电极切换对土壤微生物群落影响的规律,为电场电极切换方法在污染土壤电动强化生物修复技术中的深化和应用提供理论依据。

关键词:电场;土壤修复;Biolog;微生物多样性

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)05-0937-04

Effect of Polarity Reversal of Electric Field on Soil Microbial Community

ZHAO Qing-jie, SHEN Gen-xiang, LUO Qi-shi, LIU Fang, LIANG Dan-tao, GU Hai-rong
(Shanghai Academy of Environmental Science, Shanghai 200233, China)

Abstract: Electrokinetic bioremediation is an important technique for contaminated soil remediation. However, the extreme environment induced by electrochemical reactions can adversely affect soil microbial activities, especially when the soil microbial community is exposed to a long-lasting electric field application. Electric field polarity reversal may be an effective way to minimize such effects. In this study, we examined the effects of different polarity reversal intervals (24 h, 5 h, 10 min and 1 min) in an electric field with an intensity of $3.0 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ on soil microbial communities using bacterial counts and Biolog assay. The results indicate that the application of the electric field could increase soil microbial biomass but decrease the diversity except near the electrodes. Decline of microbial diversity was mainly associated with the change in soil pH caused by electrochemical reactions during the electrokinetic remediation process. The polarity reversal intervals could reduce pH fluctuation in soils. The polarity reversal interval of $\leq 5 \text{ h}$ could minimize the adverse effects of the electric field on microbial diversity. Shorter polarity reversal ($\leq 10 \text{ min}$) could minimize the adverse effects on both the microbial diversity and biomass. Our results suggest that electric field polarity reversal is an effective method to minimize the adverse effects of electrochemical reactions on soil microbial community during electrokinetic bioremediation processes.

Keywords: electric field; soil remediation; Biolog; microbial diversity

土壤电动修复技术能够避免土壤异质性与低渗透性的限制^[1-2],有效增强原位生物修复过程,其不仅成功地应用于土壤重金属污染的治理^[3-4],也应用于有机污染物的治理^[5-6]。但电场的电极反应会严重影响修复效果。电极反应不仅会增加孔隙水的离子强度和导电性,增加系统的操作电压和能耗,而且会使电极附近土壤的 pH 发生剧烈变化。通过电场电极切换可以明显减弱电场电极反应,而且操作简单易行,对于土壤有机污染具有很好的处理效果。但要评价一种土壤修复技术的优劣,其对土壤微生物活性的影响是重要

指标,尤其是在有机污染修复中土壤微生物作用至关重要。研究表明^[7-8],电场作用会对土壤微生物群落造成间接和直接的影响。然而,电场电极切换作为电动修复技术中控制电极反应的有效手段,目前还没有其对土壤微生物群落的影响的相关报道。本文研究了在匀强电场作用中,电场电极切换对土壤微生物功能多样性和活性的变化,揭示电场电极切换对土壤微生物群落的影响规律,为受污染土壤电动强化生物修复技术的深化和应用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 土壤处理及采样

受试土壤取自微生物丰富的浙江诸暨五泄国家森林公园内 5~30 cm 表层森林土壤。土壤经风干磨细

收稿日期:2008-07-22

作者简介:赵庆节(1976—),男,硕士,工程师,主要从事环境微生物学研究。E-mail:zhaoqj@saes.sh.cn

通讯作者:沈根祥 E-mail:shengx@saes.sh.cn

过 2 mm 筛后,加入适量去离子水,充分搅匀后逐层装入有机玻璃反应器(10 cm×5 cm×5 cm),在 0.1 kg·cm⁻² 压力下将土壤压实 12 h,用吸水纸吸去表层压出水,再插入板状高纯石墨电极(10 cm×5 cm×0.5 cm),用导线将阳极和阴极分别与电源的正极和负极相连,加盖密封反应器,施加 30 V 的恒定电压(即电压梯度为 3.0 V·cm⁻¹),分别间隔 24 h、5 h、10 min、1 min 进行阴阳两极切换,运行 48 h 试验结束,并分别在反应器的阳极、中部、阴极采样,测定土壤微生物群落功能多样性的变化特征。样品编号、试验条件及初始与结束时的极性如表 1 所示。

表 1 受试样品试验运行条件
Table 1 Test condition of the soil samples

土样编号	切换周期	取样点距阳极距离/cm	初始极性	结束极性
对照	不施加电场	—	—	—
A1	24 h	0.5	阴极	阳极
A2	24 h	5.0	中间	中间
A3	24 h	9.5	阳极	阴极
B1	5 h	0.5	阴极	阳极
B2	5 h	5.0	中间	中间
B3	5 h	9.5	阳极	阴极
C1	10 min	0.5	阴极	阳极
C2	10 min	5.0	中间	中间
C3	10 min	9.5	阳极	阴极
D1	1 min	0.5	阴极	阳极
D2	1 min	5.0	中间	中间
D3	1 min	9.5	阳极	阴极

1.2 微生物计数

采用平板计数法对土壤中的细菌进行计数^[9],以形成的菌落数(colony forming units,CFU)表示细菌数量。细菌计数采用添加放线菌酮作为真菌抑制剂的营养琼脂进行培养,其中营养琼脂制备方法为:蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 000 mL,121 ℃高压灭菌 15 min,冷却至 45~50 ℃加入 100 mg 放线菌酮,混匀,倒平板,冷却凝固备用。

1.3 Biolog 测定微生物功能多样性

根据微生物计数结果,将土壤样品稀释 1 000 倍后直接接种到 Biolog GN 微孔板中,每个孔接种 150 μL,置培养箱中 25 ℃ 培养 24 h。

1.4 数据处理方法

微生物总体活性采用 Biolog GN 微孔板反应平均吸光值(Average Well Color Development,AWCD)来表示,计算方法如下:

$$AWCD=[\sum(C-R)]/95$$

式中:*C* 是所测得 95 个反应孔的吸光值;*R* 是对照孔的吸光值。

土壤微生物群落功能多样性根据微孔吸光值计算得到的 Shannon–Wiener 指数(*H*)来表达,即:

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

式中:*P_i* 是第 *i* 孔的相对吸光值(*C*–*R*)与微孔板各孔相对吸光值总和的比值。

2 结果与讨论

2.1 不同电场切换频率下土壤细菌总数的变化

通过在计数培养基中添加真菌抑制剂的方法,采用平板计数测得了不同土壤样品中的细菌数量。图 1 是电场电极切换对细菌总数的影响。结果显示,无论切换周期长短,阳极土壤的细菌数量均低于其他位置的土壤;电场切换周期较短(1 min 和 10 min)的土壤细菌数量都高于不施加电场的土壤;在电场电极切换周期为 5 h 和 24 h 试验组中,阳极土壤细菌数量均低于不施加电场的土壤,阴极土壤和中部土壤的细菌数量则明显高于不施加电场的土壤。这说明电场作用下阳极土壤细菌数量会受到抑制,较高频率的电场切换有助于消除电场作用对阳极土壤细菌数量的影响,同时也表明合适的电场作用有助于促进土壤细菌生长。

2.2 不同电场切换频率下土壤微生物功能多样性变化

Biolog GN 微孔板是为革兰氏阴性菌快速鉴定设计的,根据菌种对 95 种不同碳源的利用图谱可以快速鉴定菌种。后来人们将 Biolog GN 微孔板用于微生物功能多样性分析并迅速成为最常用的手段^[10]。AWCD 和 Shannon–Wiener 指数(*H*)是人们用于表达微生物功能多样性分析结果的最常用指标。AWCD 用于表示微生物的平均活性,*H* 则指示了样品中微生物的丰富度和平均度。

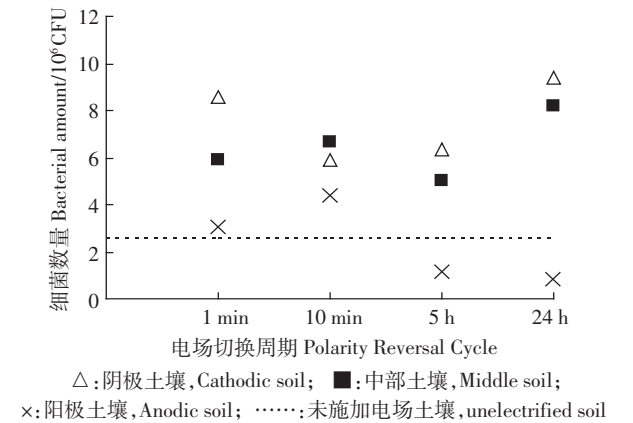


图 1 电场电极切换对细菌总数的影响

Figure 1 Effect of polarity reversal on the bacterial counts in soil

图 2 是在不同电场电极切换周期条件下的土壤微生物功能多样性分析结果。(a)图反映了不同电场切换周期对 AWCD 的影响,由(a)图可见,在不同电场切换周期下,除切换周期为 24 h 的阳极土壤外,所有电场处理土壤的 AWCD 值都高于不施加电场处理的土壤,说明这些受电场作用的土壤微生物活性提高了。这个结果与细菌总数测定的结果基本一致,证明了适当的电场切换有助于消除电极反应对土壤微生物的影响,使电场对微生物的刺激作用得到了体现。切换周期 5 h 的阳极土壤细菌数量出现明显下降而 AWCD 没有出现相同现象,说明 5 h 切换周期内的电场作用虽然减少了阳极土壤微生物的数量,但并没有对微生物活性造成大的伤害,只要提供适当的生长条件,土壤微生物仍然能够快速生长繁殖;切换周期为 24 h 的阳极土壤不仅细菌数量减少,而且 AWCD 也剧烈下降至几乎为零,说明在 24 h 切换周期内电场作用大大削减了阳极土壤微生物数量,而且抑制了微生物活性,使其生长繁殖能力大大降低。

(b)图是不同电场切换周期对微生物多样性指数 H 的影响。由于 Biolog 测定得到的切换周期 24 h 的阳极土壤的微孔板吸光值全部接近于零, H 值的计算也

没有意义,因此在图中省略了。由图可见,电场作用的土壤 H 值均小于不施加电场的土壤,电场切换周期为 24 h 的阴极土壤的 H 值下降尤为显著。这说明电场作用虽然可以刺激土壤微生物的活性,但是会导致土壤微生物功能多样性的降低;周期小于 5 h 的电场电极切换可以避免电极附近微生物多样性显著下降。

2.3 电场电极切换对土壤微生物群落影响机理分析

2.3.1 电场电极切换对电场中部土壤微生物群落的作用

在电场电极切换试验中,电场中部土壤的微生物受电场电极反应和迁移作用影响较小,因此此处微生物群落的变化基本上受电场直接作用影响。电场能影响细胞膜磷脂的定位,电场过强时能造成细胞膜不可逆穿透,甚至直接氧化细胞组分^[1]。Alshawabkeh 等^[12]报道,电场为 $1.14 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 时,在最初 24 h 能够刺激好氧细菌,24 h 后继续施加电场则阻碍好氧细菌生长。电场能够改变细胞膜的通透性,也可能造成微生物细胞启动相关应激机制,从而刺激微生物活性或者抑制某些功能。Luo 等^[13]研究发现,通过苯酚降解细菌溶液的电流高于 40 mA 时,细胞的表面电荷、疏水性和细胞形状均发生了明显变化。另外,电场作用可以加强土壤中营养物质的流动,提高微生物细胞与营养物质的传质水平,从而增强微生物的活性和生长速度。

在本研究 $3.0 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电场梯度条件下,电场的致死效应可能是导致耐受性较差的微生物死亡,从而使电场中部土壤微生物多样性降低的重要原因;而电场对微生物细胞的刺激作用以及对传质水平的改变可能是土壤微生物功能多样性下降却数量上升的原因。电场中部土壤微生物数量和 AWCD 均高于不施加电场的土壤,而 Shannon-Wiener 指数均低于不施加电场的土壤,而且彼此间没有显著差异,表明电场电极切换不能改变电场对土壤微生物的直接致死效应和刺激作用,因此也不能改变电场对中部土壤微生物群落结构的影响。

2.3.2 电场电极切换对电极附近土壤微生物群落的作用

在电场两极,电场电极切换频率不同,土壤微生物群落数量和多样性差异显著,说明电极切换对电场电极附近土壤微生物群落结构具有显著影响。在电场两极,除了会受到和中部土壤相同的电场作用外,土壤微生物结构和活性还会受到电场极化反应和迁移效应的影响。电场极化反应会使电极附近土壤出现酸化和碱化现象。Lear 等^[9]研究表明,在电场施加方向恒定的条件下,土壤微生物群落结构和活性的变化主要是由土壤 pH 值的变化引起的。图 3 是试验结束时受

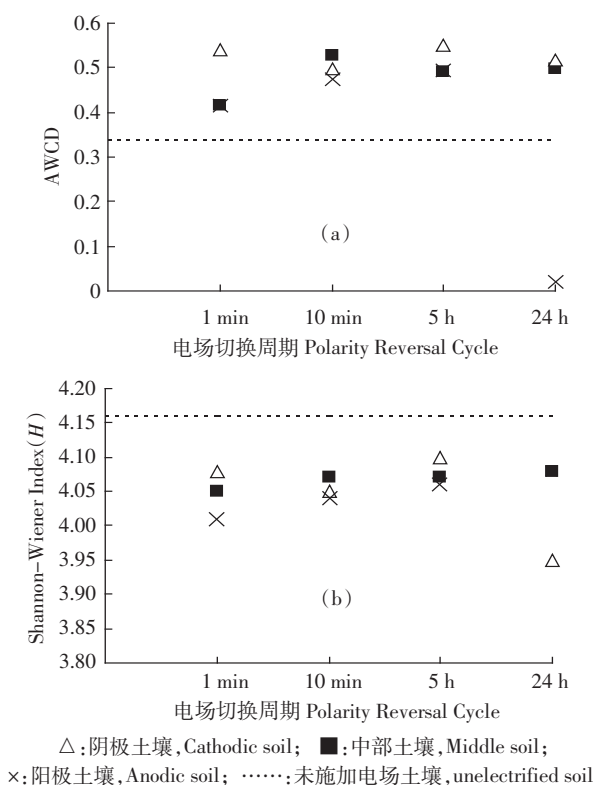


图 2 电场电极切换对土壤微生物功能多样性的影响

Figure 2 Effects of polarity reversal on soil microbial functional diversity

试土壤的 pH 值。如图所示,在电场切换周期为 1 min 和 10 min 的试验组中,pH 值没有显著的变化,呈弱酸性。当电场切换周期为 5 h 和 24 h 时,土壤 pH 发生了显著变化,阳极 pH 降低至 4 以下,阴极 pH 则上升至 8 左右。研究结果表明,电场电极切换周期只要 ≤ 10 min 即可有效减小电极附近土壤 pH 波动,从而消除电极反应造成的 pH 对微生物数量的影响,而切换周期 ≤ 5 h 即可达到保护微生物多样性的效果。

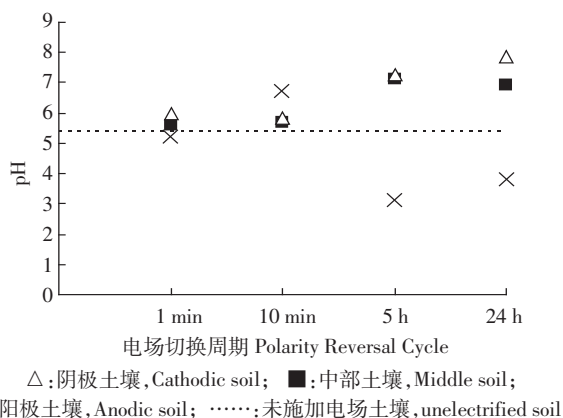


图 3 电场电极切换对土壤 pH 值的影响

Figure 3 Effect of polarity reversal on soil pH

在电场作用下,微生物细胞会发生电泳迁移。决定微生物细胞电泳方向和速度的细胞表面电荷与土壤 pH 有关。在酸性土壤中,细胞表面带正电荷;碱性土壤中,细胞表面带负电荷;中性土壤中,大部分微生物细胞表面都带负电荷。在电场作用下,通常正极附近土壤为酸性,因此微生物细胞带正电荷,微生物向负极移动;负极的情况则恰好相反。这可能也是导致电场电极附近微生物数量和多样性越低的原因。电极切换使得微生物细胞在一定区域内进行往复运动;并且降低了电极附近土壤的 pH 变化,从而使微生物细胞表面电荷降低,使得微生物细胞的迁移能力下降。因此电极切换改变了电场中微生物的迁移有可能是降低电场对微生物群落影响的原因之一。

3 结论

(1)在 $3.0 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的电场梯度下,电场会对少数土壤微生物具有致死效应,而对存活的微生物具有刺激作用,从而降低土壤微生物多样性,增加微生物活性,电场电极切换不能改变这种电场作用直接引起的土壤微生物群落结构变化。

(2)电场电极反应是导致土壤电动修复中微生物群落结构剧烈变化的主要原因,电极切换可以有效地减小电极反应对土壤微生物群落的影响。

(3)电场电极切换能有效降低电极反应对微生物群落的影响,当切换周期 ≤ 5 h 时,可保护电极附近土壤微生物多样性;当切换周期 ≤ 10 min 时,不仅可保护土壤微生物多样性,而且可以保护微生物数量。

参考文献:

- [1] Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies[J]. *Bioresour Technol*, 2000, 74:63-67.
- [2] Borch T, Ambus P, Laturnus F, et al. Biodegradation of chlorinated solvents in a water unsaturated topsoil[J]. *Chemosphere*, 2003, 51(2):143-152.
- [3] Acar Y B, Alshawabkeh A N. Principle of electrokinetic remediation[J]. *Environmental Science and Technology*, 1993, 27(13):2638-2647.
- [4] 钱暑强, 金卫华, 刘 铮. 从土壤中去除 Cu^{2+} 的电修复过程[J]. *化工学报*, 2002, 53(3):236-240.
QIAN Shu-qiang, JIN Wei-hua, LIU Zheng. Removal of Cu^{2+} from clay by electroremediation[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*, 2002, 53(3):236-240.
- [5] Jose-Luis Niqui-Arroyo, Marisa Bueno-Montes, Rosa Posada-Baquero, et al. Electrokinetic enhancement of phenanthrene biodegradation in creosote-polluted clay soil[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 142:326-332.
- [6] Ahmet Karagunduz, Aras Gezer, Gulden Karasuloglu. Surfactant enhanced electrokinetic remediation of DDT from soils[J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 385: 1-11.
- [7] 徐 泉, 黄星发, 程炯佳, 等. 电动力学及其联用技术降解污染土壤中持久性有机污染物的研究进展[J]. *环境科学*, 2006, 27(11):2363-2368.
XU Quan, HUANG Xing-fa, CHENG Jiong-jia, et al. Progress on electrokinetic remediation and its combined methods for POPs from contaminated soils[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(11):2363-2368.
- [8] 沈根祥, 周海花, 罗启仕, 等. 直流电场对根际土壤微生物群落的影响及其机理[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(3):920-925.
SHEN Gen-xiang, ZHOU Hai-hua, LUO Qi-shi, et al. The effects of direct fields on rhizospheric soil microbial communities and their mechanisms[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(3):920-925.
- [9] Lear G, Harbottle M J, et al. The effect of electrokinetics on soil microbial communities[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36:1751-1760.
- [10] Page M M, Page C L. Electroremediation of contaminated soils[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2002, 128(3):208-219.
- [11] Juliet Preston-Mafham, Lynne Boddy, Peter F Randerson. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles a critique[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42: 1-14.
- [12] Drees K P, Abbaszadegan M, Maiera R M. Comparative electrochemical inactivation of bacteria and bacteriophage[J]. *Water Research*, 2003, 37:2291-2300.
- [13] Alshawabkeh A N, Maillacheruvu K. Electrochemical and biogeochemical interactions under DC electric fields[C]//Physicochemical Groundwater Remediation. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001:73-90.
- [14] Luo Q S, Wang H, Zhang X H, et al. Effect of direct electric current on the cell surface properties of phenol-degrading bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1):423-427.