李 岩,李 成,张小雪,等.番茄秸秆固定化芽孢杆菌 M1对3环PAHs 污染老化土壤修复效果[J]. 农业资源与环境学报, 2019, 36(6): 806-813. LI Yan, LI Cheng, ZHANG Xiao-xue, et al. Remediation effects of 3-ring PAH-contaminated soil by immobilized *Bacillus* sp. M1 with tomato straw in coal mining area[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2019, 36(6): 806-813.

番茄秸秆固定化芽孢杆菌 M1 对3环 PAHs 污染老化土壤修复效果

李 岩¹,李 成¹,张小雪¹,冯 煊¹,王 伟¹,冯圣东¹,宁国辉¹,王小敏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 071001; 2.河北省农田生态环境重点实验室,河北保定 071001)

摘 要:为探讨固定化微生物对煤矿区 3 环 PAHs 污染老化土壤的修复效果,以番茄秸秆为固定化载体材料,通过"吸附-包埋-交 联法"形成了固定化芽孢杆菌微球,并采用土培试验对煤矿区土壤 3 环 PAHs 去除进行研究。结果表明,游离芽孢杆菌 M1 对煤矿 区污染老化土壤单体芴(Flu)、菲(Phe)和蔥(Anth)的去除随接菌量的增加先升高后降低。在接菌量为 1%、10%、20%(体积质量 比)的游离芽孢杆菌处理中,10%处理(B2M1)对土壤 Phe的去除率最高,为21.35%。不同接菌量的固定化芽孢杆菌 M1 微球处理 对 3 种 PAHs 的去除率显著高于微球基质处理,其中,接菌量 20% 的固定化芽孢杆菌处理(X3M1)对土壤 Flu 的去除率最高,达 95.25%,比不含 M1 菌株的番茄秸秆微球基质处理(X3)提高了 12.03 个百分点。对比分析扣除微球基质后的固定化 M1 与添加同 等菌量的游离 M1 去除结果看出,经固定化后的菌株 M1 比游离菌 M1 显著促进了对煤矿区污染老化土壤 3 环 PAHs 的去除,不同接 菌量对单体 Flu 和 Anth 去除率为72.17%~75.52% 和 8.97%~28.88%,分别比游离菌增加了 64.10~72.31 个百分点和 8.13~15.24 个百 分点,单体 Phe 1% 接菌量处理比游离菌提高了 5.07 个百分点。从土壤酶活性看,土壤过氧化氢酶活性在固定化 M1 三种剂量处理 下均显著高于微球基质和游离菌 M1 处理,随剂量增加依次是游离菌处理的 1.16、1.23 倍和 1.20 倍,是微球基质处理的 1.28、1.19 倍和 1.16 倍,与3 环 PAHs 的去除率规律相一致,而固定化 M1 处理多酚氧化酶、过氧化物酶和纤维素酶活性相对于游离菌处理有 不同程度的降低。综上,固定化芽孢杆菌 M1 对土壤 3 环 PAHs 去除具有显著促进作用,为煤矿区 PAHs 污染老化土壤原位修复的 应用提供了重要技术参数与支撑。

关键词:番茄秸秆;游离菌;固定化;芽孢杆菌;3环PAHs;土壤酶活性 **中图分类号:**X53;S154.3 **文献标志码:**A **文章编号:**2095-6819(2019)06-0806-08 **doi**: 10.13254/j.jare.2018.0225

Remediation effects of 3-ring PAH-contaminated soil by immobilized *Bacillus* sp. M1 with tomato straw in coal mining area

LI Yan¹, LI Cheng¹, ZHANG Xiao-xue¹, FENG Xuan¹, WANG Wei¹, FENG Sheng-dong¹, NING Guo-hui¹, WANG Xiao-min¹, YANG Zhixin^{1,2*}

(1. School of Resources and Environmental Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 2. Hebei Key Laboratory of Farmland Ecological Environment, Baoding 071001, China)

Abstract: Tomato stalks were used as carrier materials to prepare immobilized *Bacillus* sp. M1 microspheres by an adsorption-embeddedcross-linking method in this study. The remediation effects of 3-ring Polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)-contaminated soil on these microspheres in a coal mining area were evaluated through soil incubation experiments. The results indicated that the removal of 3-ring PAHs(Flu, Phe, and Anth) by free M1 first increased and then decreased as the bacteria levels increased in PAH-contaminated soil in the

收稿日期:2018-09-06 录用日期:2018-12-09

作者简介:李 岩(1993—),女,河北石家庄人,硕士研究生,从事环境质量评价与监控研究。E-mail:610903898@qq.com

^{*}通信作者:杨志新 E-mail:yangzhixin@126.com

基金项目:现代农业产业技术体系河北省创新团队建设项目;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) Project supported: Modern Agricultural Industrial Technology System of Hebei Province Innovation Team Construction; Hebei Provincial Department of

Human Resources and Social Security(C2013003022);Hebei Provincial Department of Education(Z2013058)

coal mining area. Treatment with 10% (B2M1) showed the highest removal rate of Phe, which was 21.35%, among 1%, 10%, and 20% (volume by mass) treatment with free M1. The removal rate of the three types of PAHs by the immobilized M1 microspheres was significantly higher than that by the microsphere matrix. In the tomato stalk-immobilized M1 microsphere matrix (X3) without M1, with the removal rate increase of 12.03%. In contrast, for immobilized M1 following the subtraction of microsphere matrix with free M1, except for the 10% and 20% Phe inoculation treatment, immobilized M1 significantly promoted the removal of 3-ring PAHs. The removal rates of Flu and Anth after different inoculation treatments were 72.17%~75.52% and 8.97%~28.88%, respectively, over that of free M1, showing increases of 64.10%~72.31% and 8.13%~15.24%. Phe was higher of 5.07% at the 1% inoculation level as compared with free M1. The catalase activity of immobilized M1 was significantly higher than that of the microsphere matrix and free M1 at different doses as bacteria levels increased. Values were 1.16-, 1.23-, and 1.20-fold higher than those of free M1 and 1.28-, 1.19- and 1.16-fold higher than those of the microsphere matrix. The change in catalase activity was consistent with the removal rate of 3-ring PAHs. Compared with free bacteria, the polyphenol oxidase, peroxidase, and cellulase enzyme activities of immobilized M1 were reduced to varying degrees. In summary, immobilized *Bacillus* sp. M1 significantly affected the removal of soil 3-ring PAHs. The results of the present study provide important technical parameters for and support the application of *in situ* remediation of PAH-contaminated aging soil in coal mining areas.

Keywords: tomato straw; free bacteria; immobilized bacteria; Bacillus sp.; 3-ring PAHs; soil enzyme activity

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是广泛存在于环境中的一大类有机污染物,是煤矿区 土壤主要污染物之一。煤炭的开采及资源利用具有 外部负效应,煤矿的开采、运输等一系列过程会产生 大量的PAHs¹¹⁻³¹,其由于疏水性强、稳定性强而长期 吸附在土壤颗粒中难以降解。刘静静¹⁴¹调查发现某 采矿区土壤中不同采样点16种PAHs含量值从53.6 ng·g⁻¹到5642.3 ng·g⁻¹分布不等,均值为1541.1 ng· g⁻¹,本课题组前期调查也发现,某煤矿区农田土壤长 期受PAHs污染,总量达1042.31 μg·kg⁻¹。可以看 出,煤矿区及其附近土壤PAHs污染问题日益突出。 PAHs具有"三致"效应,土壤中的PAHs可通过食物链 进入人体,严重危害人类健康。因此,通过采取强化 措施修复煤矿区老化污染土壤迫在眉睫。

微生物降解是去除环境中 PAHs 的最有效手 段^[5],具有污染少、成效高、成本低等优点。目前,研 究者发现的降解菌种类繁多^[6],但是,仅添加游离微 生物存在菌种易流失、微生物密度低^[7]、易与土著菌 形成恶性竞争^[8]等弊端。因此,固定化微生物技术作 为一种绿色高效的修复技术受到了越来越多研究者 的关注^[9-10]。李婧^[11]的研究表明在无机盐培养基质 中,固定化微生物比游离态微生物显著提高了对芘的 去除效率,5d后对芘的去除率高达98.2%,在相对较 短的时间内达到了极高的去除率。王鑫等^[6]在人为 添加污染源的土壤中加入固定化芽孢杆菌(*Bacillus* sp. SB02),培养42d后对苯并[a]芘(BaP)的去除率为 33.0%。目前,研究者多集中于培养基或人为添加污 染土壤情况下研究固定化微生物对PAHs的降解,而

对于原土污染,尤其煤矿区污染老化土壤研究相对较 少。此外,固定化载体材料的选择也是固定化微生物 的关键因素,农业废弃秸秆作为低成本吸附剂受到广 泛的关注,其在土壤中易被生物降解,且来源广泛,不 仅对土壤结构无害,而且可以改善土壤理化性质,在 土壤修复中是一种较为理想的土壤调理剂和微生物 的载体。近年来,已有很多固定化研究将葡萄秸秆1121 和玉米秸秆^四作为微生物的载体,但对于蔬菜秸秆作 为微生物载体修复土壤污染的研究鲜见报道。基于 此,本研究以河北某典型煤矿区3环PAHs污染土壤 为研究对象,以课题组前期筛选的芽孢杆菌 M1 为降 解菌,选用番茄秸秆为固定化载体,采用"吸附-包 埋-交联法"研究固定化M1对该区土壤3环PAHs修 复效果的影响,并确定固定化M1的最佳接菌量,分析 土壤酶活性的变化,以期为原位土壤3环PAHs的修 复技术应用提供理论依据,同时为农作物秸秆的资源 化利用开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤:为河北省某典型煤矿区长期受PAHs 污染的老化农田土壤,土壤类型潮褐土,质地壤土。 采集表层0~10 cm的污染土壤,避光风干后,过1 mm 筛。混合均匀,在4℃的冰箱内保藏备用,其基本化 学性质见表1。5种3环PAHs总含量占土壤16种 PAHs总含量的24.67%,其中5种3环PAHs单体苊 (Acy)、二氢苊(Ace)、芴(Flu)、菲(Phe)和蒽(Anth)的 含量分别为25.29、50.08、240.66、585.45 μg·kg⁻¹和

农1 洪风土壤本平化子住灰					
 Table 1 Basic chemical properties of the tested soil					
速效钾	速效磷	速效氮	有机质		
Available	Available	Available	Organic	nН	
potassium/	phosphorus/	nitrogen/	matter/	pm	
 mg∙kg⁻¹	mg∙kg⁻¹	mg∙kg ⁻¹	g•kg ⁻¹		
75.27	43.93	71.41	26.67	7.85	

供学上摘甘卡化兴姓氏

105.52 μg·kg⁻¹,由于 Acy 和 Ace 含量低,故本研究中 仅考虑 Flu、Phe 和 Anth 三种3环 PAHs。

供试菌种:本课题组前期从煤矸石中筛选出一株 对上述5种3环PAHs具有高效降解作用的菌株,经鉴 定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株,命名为M1,本研究利 用此菌株对供试土壤中的3环PAHs进行修复研究。

供试载体:番茄秸秆于廊坊永清蔬菜基地采集, 洗净秸秆,105℃烘箱中杀青30min,然后60℃烘 干,粉碎过1mm筛,121℃灭菌20min,制成载体材 料备用。

1.2 试验方案

1.2.1 菌悬液制备

从平板上挑取一株 M1 单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基中,在 30 ℃、150 r·min⁻¹的恒温摇床中振 荡培养 24 h,按体积分数 1% 接种到新的 LB 液体培养 基中,同样条件下培养 24 h,使 M1 处于对数生长期后 期,作为菌悬液备用。利用平板稀释法对菌悬液计 数,活菌数约为 2.2×10⁹ cfu·mL⁻¹。

1.2.2 固定化芽孢杆菌 M1 微球的制备

以番茄秸秆为载体,海藻酸钠(SA)和聚乙烯醇 (PVA)为包埋材料,硼酸和氯化钙为交联剂制备固定 化芽孢杆菌 M1。将新鲜、干燥的番茄秸秆粉碎后过 1 mm筛,灭菌。按优化配比含量称取番茄秸秆放入 锥形瓶中,再次灭菌后备用,降温后向其中加入20 mL芽孢杆菌 M1 菌悬液,再加入 20 mL灭菌水,在摇 床上培养3h。将10%的聚乙烯醇和0.5%的海藻酸 钠混合,加入60mL蒸馏水浸泡过夜,次日高温灭菌, 冷却至40℃左右后加入上述混合物,用无菌水定容 至100 mL,搅拌均匀,采用蠕动泵,从20 cm高处将其 缓慢匀速滴加到磁力搅拌器上的盛有 pH 6.7 左右 2% 氯化钙饱和硼酸溶液中(用Na₂CO₃调 pH),-20 ℃下 保存24h,再在4℃保存12h。用灭菌的去离子水冲 洗3次,制成番茄秸秆材料固定化芽孢杆菌 M1 微球 (简称固定化M1微球,计数获得活菌数3.75×10⁸ cfu· g⁻¹),另外,在上述过程中不添加 M1 菌悬液制备成微 球基质,保存于4℃冰箱中用于土培试验。

1.2.3 固定化M1微球降解污染土壤PAHs的土培试验

选取20 cm(上缘直径)×12 cm(底面直径)×14 cm (高)的盆钵30个。称取1.5 kg风干土放入每个盆钵 中,共设置10个处理,其中,游离菌M1处理3个,接菌 量水平依次为M1菌悬液体积与土壤质量比为1%、 10% 和 20%, 使土壤添加的 M1 活菌数达 3.75×10°、 3.75×10¹⁰ cfu·kg⁻¹和7.5×10¹⁰ cfu·kg⁻¹;固定化M1 微球 处理3个,固定化M1微球添加量与土壤质量比分别 为1%、10%和20%,与土壤混合均匀,使土壤M1活菌 数分别与对应的游离菌 M1 处理水平保持一致,分别 达3.75×10°、3.75×10¹⁰ cfu·kg⁻¹和7.5×10¹⁰ cfu·kg⁻¹;微 球基质处理3个,微球基质添加量与土壤质量比分别 为1%、10%和20%,未添加M1菌株。同时,以不添加 微球和游离菌的土壤为空白对照,每个处理3个重 复,共30盆,详见表2。土培试验于河北农业大学温 室大棚中进行,调节水分含量为田间持水量的60%, 每两日补水一次,每次补相同水量,4个月后采集土 壤样品。

1.3 土壤指标及其测定方法

1.3.1 土壤 PAHs

土壤基本理化性质测定指标及方法:速效钾、速 效磷、速效氮、有机质和pH,采用土壤农化常规分析 法^[13]。

土壤 PAHs测定指标及其分析方法:3种 PAHs分 别为 Flu、Phe和 Anth。3种 PAHs经索氏提取、氮吹浓 缩、硅胶柱净化以及再次浓缩定容等过程后进行上机 测定,通过气相色谱-质谱法(GC-MS, Aglient 7890/ 5975c)测定样品^[14]。其中,GC-MS仪器起始温度为 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℃,不分流进样,进样量为1 μL,流速为1.1 mL·min⁻¹,离子源温度230℃,四极杆温度150℃^[15-16]。

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;氘代三联苯与4-溴-2氟 联苯两种替代物质的回收率控制在70%~130%^[15]。

1.3.2 土壤酶活性

土壤多酚氧化酶活性采用碘量滴定法,并以用于 滴定相当于1g土壤滤液所消耗的0.01 mol·L⁻¹ I₂的毫 升数(mL)表示^[17];过氧化氢酶活性以20 min后1g土 壤的0.02 mol·L⁻¹ KMnO₄的毫升数(mL)表示^[17];过氧 化物酶活性以1g土壤消耗的0.01 mol·L⁻¹ I₂标准液的 毫升数(mL)表示^[17];纤维素酶活性以72 h后 10 g土

Table 2 Soil culture test plan for immobilized M1 to repair contaminated soil					
处理编号 Treatment Number	处理 Treatments	微球添加量 Microsphere addition(W/W)/%	菌悬液添加量 Bacterial suspension dosage (V/m)/%	接菌量 Amount of inoculation/ cfu•kg ⁻¹	
СК	空白对照	0	0	0	
X1	1%番茄秸秆微球基质对照	1	0	0	
B1M1	1%游离芽孢杆菌	0	1	3.75×10°	
X1M1	1%番茄秸秆固定化芽孢杆菌	1	—	3.75×10°	
X2	10%番茄秸秆微球基质对照	10	0	0	
B2M1	10%游离芽孢杆菌	0	10	3.75×10 ¹⁰	
X2M1	10%番茄秸秆固定化芽孢杆菌	10	—	3.75×10 ¹⁰	
X3	20%番茄秸秆微球基质对照	20	0	0	
B3M1	20%游离芽孢杆菌	0	20	7.5×10 ¹⁰	
X3M1	20%番茄秸秆固定化芽孢杆菌	20	—	7.5×10 ¹⁰	

表2 固定化 M1 修复污染土壤的土培试验方案

壤生成葡萄糖的毫克数(mg)表示[17]。

1.4 数据统计分析

土壤 PAHs 去除率(R)=($C_0 - C_1$)/ C_0 ×100%

式中:C₀为对照土壤PAHs含量;C₁为土壤PAHs残留 含量。

试验数据均采用 SPSS 17.0 软件进行显著性分 析,主要采用在P<0.05显著水平上的LSD和Duncan 检验方法进行检验,Excel 2003软件制图。

结果与分析 2

2.1 游离菌 M1 接菌量对 3 环 PAHs 污染老化土壤修 复效果的影响

M1不同接菌量处理对污染老化土壤3种PAHs 单体的去除效果见图1。结果表明,M1接菌量为1% (B1M1)时,Flu、Phe和Anth的去除率分别为4.61%、 8.12% 和 9.02%; 接菌量为 10% (B2M1)时, 3种 PAHs 的去除率为13.03%~21.35%,其中Phe的去除率最 高;接菌量为20%(B3M1)时,3种PAHs的去除率为-0.15%~9.68%,仍以Phe单体去除率为最高。三种处 理的去除效果表明,Flu和Anth的去除率在不同处理 间的大小顺次为B2M1>B1M1>B3M1,Phe的去除率大 小顺次为B2M1>B3M1≈B1M1,均以B2M1的去除效果 表现最为突出。可见,3种PAHs单体的去除率均随 接菌量增加呈先升高后降低的趋势,且在接菌量10% 时Phe单体去除率达到最大值21.35%。

进一步对与游离菌M1降解有关的四种土壤酶活 性进行差异性分析(表3)发现,土壤多酚氧化酶活性 随剂量增加呈先升高后降低的趋势,这与对多环芳烃 的去除率变化结果一致,其中B2M1处理酶活性最





图1 游离菌 M1 接菌量对污染老化土壤3环 PAHs 单体去除率的影响



高,显著高于 B3M1 处理和 CK 对照,分别提高了 14.39% 和17.93%, 但与 B1M1 处理无显著性差异; 纤 维素酶活性在 B1M1 处理下酶活性最高,但与 B3M1 处理差异不显著,显著高于B2M1处理和CK对照,分 别是 B2M1 和 CK 的 1.55 倍和 1.89 倍; 不同处理下过 氧化氢酶、过氧化物酶活性无显著差异,但不同处理 下过氧化氢酶活性均高于对照处理,而过氧化物酶活 性无显著差异。故考虑多酚氧化酶活性和过氧化氢 酶活性可能与PAHs的降解有关。

2.2 固定化 M1 剂量对 3 环 PAHs 污染老化土壤修复 效果的影响

图2反映了固定化M1微球不同剂量对污染老化 土壤3环PAHs的去除效果。由图2可知,随固定化 M1剂量增加,3种PAHs单体的去除率呈现出了不同

农业资源与环境学报·第36卷·第6期·卷终

表3 游离菌 M1 对土壤四种酶活性的影响

Table 3 Effect of free bacteria M1 on four enzyme activities in soil

处理 Treatments	过氧化氢酶 Catalase activity/mL•g⁻¹	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase activity/mL•g⁻¹	过氧化物酶 Peroxidase activity/mL·g ⁻¹	纤维素酶 Cellulase activity/mg·10 g ⁻¹
СК	0.28±0.01a	15.84±1.48b	0.55±0.01a	$0.09 \pm 0.01 \mathrm{b}$
B1M1	0.32±0.04a	17.97±1.28ab	0.54±0.02a	0.17±0.01a
B2M1	0.30±0.01a	18.68±1.63a	0.54±0.00a	0.11±0.03b
B3M1	0.30±0.00a	16.33±0.94b	0.55±0.02a	0.16±0.01a

注:表中数值为平均值±标准偏差,同列不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)。下同。

Notes: Data in the table indicate mean of three replications \pm SD, the different lowercase letters in a column indicate significant differences among treatments at P < 0.05. The same below.





的变化规律。Phe的去除率随剂量增加先升后降,在 10%固定化M1剂量(X2M1)时达最高(50.88%),而 Flu和Anth的去除率却随剂量的增加先降后升,Flu在 20%固定化M1剂量(X3M1)时达最高(95.25%),Anth 在1%固定化M1剂量(X1M1)时达最高(68.39%)。经 LSD和Duncan统计检验(P<0.05),3种PAHs单体的去 除率在三种剂量处理之间差异不显著。

微球基质对污染老化土壤3环PAHs的去除效果如图2所示,随微球基质剂量增加,Flu、Phe和Anth的去除率呈现出相同的变化规律,均表现为20%微球基质剂量(X3)>10%微球基质剂量(X2)≈1%微球基质剂量(X1),在X3处理去除率达到最高,依次为85.02%、48.77%和64.89%。

对比微球基质和固定化 M1 微球发现, X1M1 处 理对 Flu、Phe 和 Anth 的去除率分别为 94.97%、 49.52% 和68.39%, 均显著高于 X1 处理, 比X1 分别提 高了 19.52、15.86个百分点和11.56个百分点, 说明固 定化 M1 微球不仅提升了 M1 的降解效果, 而且微球 基质对三种 PAHs 也具有一定的吸附效果; X2M1 处 理对 Flu、Phe 和 Anth 的去除率范围为 50.88%~ 94.87%, X2 处理对 Flu、Phe 和 Anth 的去除率范围为 48.77%~77.55%, X2M1 处理对 Flu、Phe 和 Anth 的去 除率分别是 X2 基质对照的 1.22、1.24 倍和 1.24 倍; 对 比 X3M1 处理和 X3 可知, 单体 Flu 的去除率表现为 X3M1>X3, 且差异显著; 单体 Phe、Anth 的去除率在 X3M1 与 X3 之间无显著差异。综上, 固定化 M1 微 球对 3 种 PAHs 具有较好的修复效果, 尤以对单体 Flu 的去除效果为最好, 且不同剂量下的去除率均超 过 94%。

进一步对比分析与PAHs降解有关的四种土壤 酶活性结果(表4)发现,在固定化M1微球剂量为1% 时,不同处理土壤过氧化氢酶活性变化具有显著差 异,表现为X1M1>X1>CK,这与对3种PAHs的去除率 表现相一致;多酚氧化酶活性表现为X1>CK>X1M1, 且具有显著差异;过氧化物酶活性表现为CK>X1≈ X1M1。在固定化M1微球剂量为10%处理下,过氧 化氢酶活性和多酚氧化酶活性均表现为X2M1>X2> CK;过氧化物酶活性表现为CK>X2>X2M1。在固定 化M1微球剂量为20%处理下,过氧化氢酶活性变化 与微球添加剂量为1%和10%时表现一致,多酚氧化 酶活性表现为X3>X3M1>CK,但X3M1与X3之间无 显著差异。不同处理的同一剂量下纤维素酶活性无

Table 4 Effect of miniobilized wit on four enzyme activities in son				
处理	过氧化氢酶	多酚氧化酶	过氧化物酶 Peroxidase	纤维素酶
Treatments	Catalase activity/mL·g ⁻¹	Polyphenol oxidase activity/mL·g ⁻¹	activity/mL·g ⁻¹	Cellulase activity/mg \cdot 10 g ⁻¹
СК	$0.28 \pm 0.01 \mathrm{b}$	15.84±1.48c	0.55±0.01a	0.09±0.01ab
X1	$0.29 \pm 0.02 \mathrm{b}$	18.00±0.64a	$0.50 \pm 0.01 \mathrm{b}$	0.13±0.04a
X1M1	0.37±0.02a	12.77±1.74d	$0.50 \pm 0.02 \mathrm{b}$	0.10±0.01ab
X2	0.31±0.02b	17.74±0.70ab	$0.49\pm0.01\mathrm{bc}$	0.10 ± 0.03 ab
X2M1	0.37±0.01a	18.33±0.36a	$0.47 \pm 0.01 \mathrm{c}$	$0.08 \pm 0.03 \mathrm{b}$
X3	$0.31\pm0.02b$	17.64±0.50ab	$0.47 \pm 0.01 \mathrm{c}$	0.10±0.03ab
X3M1	0.36±0.03a	16.26±0.08bc	$0.47 \pm 0.01 \mathrm{c}$	0.12±0.02ab

表4 固定化M1对土壤四种酶活性的影响

Table 4 Effect of immobilized M1 on four enzyme activities in soil

显著差异。由此可见,随剂量增加,固定化芽孢杆菌 处理的过氧化氢酶活性依次是微球基质处理的1.28、 1.19倍和1.16倍,初步认为土壤过氧化氢酶和多酚氧 化酶可能参与了PAHs的降解过程,与游离菌的规律 较为一致。

2.3 固定化 M1 与游离菌 M1 对土壤 PAHs 修复效果对 比分析

表5反映了固定化M1扣除微球基质后对土壤3 环PAHs的去除率以及与游离菌的差异性检验结果。 结果表明,扣除微球基质后固定化M1微球对Flu、Phe 和Anth的去除率随接菌量增加均呈现出先升高后降 低的变化规律,皆在10%时去除率达到最高,依次为 77.13%、16.63%和28.89%,其中,对单体flu的去除效 果最好。与游离菌M1比较可知,在接菌量1%、10% 和20%时,经固定化后的M1对土壤Flu和Anth的去 除效果均显著高于游离菌M1,Flu去除率分别增加了 70.91、64.1个百分点和72.31个百分点(P<0.05),Anth 去除率分别提高13.83、15.24个百分点和8.13个百分 点,而对单体Phe的去除率仅在1%接菌量时得到了 显著提高,比游离菌显著提高5.07个百分点。可见, 降解菌株M1在固定化材料中去除PAHs的能力得到 了大幅提升。

由表3和表4可以发现,固定化M1和游离菌M1 对土壤酶活性的影响存在一定差异性。固定化M1处 理过氧化氢酶活性在不同剂量下均显著高于游离菌 M1,随剂量增加依次是游离菌M1处理的1.16、1.23 倍和1.20倍;多酚氧化酶活性则呈现出与过氧化氢酶 相反的规律,游离菌M1处理的多酚氧化酶活性高于 固定化M1处理,其中,B1M1处理显著高于X1M1处 理,其余两种剂量无显著差异;过氧化物酶活性与多 酚氧化酶规律相同,但不同剂量均具有显著差异。两 种处理下纤维素酶活性在不同剂量下也呈现出活性

表5 游离菌和扣除基质后固定化 M1 对土壤中3环 PAHs的 去除率(%)

Table 5 Removal rate of 3-ring PAHs in soil by free M1 and immobilized M1with deducted tomato straw microsphere matrix(%)

处理	芴	菲	蒽
Treatments	Flu	Phe	Anth
X1M1	75.52±2.96a	$13.19 \pm 1.15 \text{bc}$	22.85±4.77a
B1M1	4.61±1.06c	8.12±0.58d	$9.02 \pm 3.44 \mathrm{bc}$
X2M1	77.13±1.72a	$16.63 \pm 1.53 \mathrm{b}$	28.89±1.76a
B2M1	$13.03 \pm 3.37 \mathrm{b}$	21.35±5.45a	$13.65 \pm 3.66 b$
X3M1	72.17±4.21a	-1.63±1.36e	$8.97{\pm}4.64{\rm bc}$
B3M1	$-0.14 \pm 1.44c$	$9.68{\pm}0.72{\rm cd}$	0.84±0.60c

菌 M1高于固定化 XM1 的规律,但不同剂量无显著差异。可以推测,在固定化 M1 修复煤矿区污染老化农田土壤3环 PAHs的过程中,过氧化氢酶可能对 PAHs 降解具有较大促进作用。

3 讨论

本研究表明,游离芽孢杆菌 M1 接菌量为10% 时 对煤矿区污染老化土壤 3 种 PAHs 的去除率效果为 13.03%~21.35%,说明芽孢杆菌 M1 在原生污染土壤 中对多环芳烃具有一定降解能力。李凤梅等^[18]研 究也证实,筛选得到的七株菌株 B1~B7 对焦化厂污 染土壤多环芳烃总量的降解率在 26.1%~44.3% 之 间,降解效果较好,其中 B2 和 B4 分属假单胞菌属 和芽孢杆菌属。与本研究的菌株种类、接菌量和土 壤多环芳烃含量差异导致了土壤中 PAHs 的降解效 果存在不同。

本研究以番茄秸秆为载体材料采用"吸附-包 埋-交联法"制备的固定化芽孢杆菌 M1 微球比游离 菌 M1降解污染老化土壤多环芳烃的效果有了大幅提 高。固定化 M1 不同剂量对 3 种 PAHs 的去除率均在 47%以上,最高达95.25%,而游离菌对3种PAHs的去 除率最高仅达21.35%。扣除微球基质后固定化M1 对3种PAHs的去除率显著高于游离菌,其中以单体 Flu最为突出,比游离菌最高增加72.31个百分点。李 婧等19以无机盐培养基为基质研究的固定化微生物 对芘的降解显著高于游离菌及微球基质,与本研究结 果相似。王新等四以人为添加污染土壤为基质研究 的添加固定化动胶杆菌(Zoologea sp.)对Pyr和BaP的 降解率分别为52.7%和37.5%,降解效果普遍高于游 离菌。固定化微生物对多环芳烃的降解效率之所以 高于游离菌,可能归因于固定化细胞颗粒的微环境有 利于屏蔽土壤中毒性物质的毒害作用、噬菌体的吞噬 和土著菌的恶性竞争[21],但对于微球基质对土壤中多 环芳烃的去除作用机理尚有待于进一步深入研究。 目前,本研究利用番茄秸秆作为固定化微生物材料为 修复土壤 PAHs 提供了新的途径,其他材料的固定化 也有待研究开发。

此外,本研究发现,固定化M1处理与游离菌处 理和微球基质对照处理相比显著提高了土壤过氧化 氢酶活性,这与固定化M1处理对3种PAHs的去除 效率最高的结果一致。推测过氧化氢酶在番茄秸秆 固定化芽孢杆菌 M1 修复煤矿区污染老化土壤处理 中具有重要作用。这与Liu等[22]得出的土壤过氧化 氢酶活性增加使PAHs去除率提高的研究结果相似。 张志远等[23]研究表明过氧化氢酶活性与 PAHs 降解 率的相关系数为0.781,在PAHs降解过程中作用较 大。而王洪等^[24]研究表明,加入固定化菌剂后,土壤 过氧化氢酶活性与多环芳烃去除率呈负相关,与本 实验结果相反,这可能与微生物种类和数量、土壤的 异质性以及根际微生物作用有关。因此,固定化微 生物对污染土壤进行修复时存在的降解菌与载体材 料间的交互作用等问题以及其他不确定性因素还有 待进一步深入研究。

4 结论

(1)游离菌 M1 接菌量处理对土壤 3 环 PAHs 单体的去除表现为随接菌量的增加先升后降的特征, 在接种 10% 游离芽孢杆菌时,对 Phe 的去除率最高为 21.35%。

(2)番茄秸秆固定化M1不同处理对3环PAHs的 去除显著高于微球基质对照和游离菌M1处理,其中, 对Flu单体的去除率最高,达95.25%。

(3)扣除微球基质后的固定化M1降解作用远高

于游离菌,以Flu单体表现最为突出,经固定化后的 M1处理的去除率比游离菌最高提高了72.31个百 分点。

(4)固定化M1处理对过氧化氢酶活性有显著促进作用,其酶活性显著高于微球基质和游离菌M1处理,与3环PAHs去除率规律相一致。

参考文献:

- [1] 刘增俊, 滕 应, 黄 标, 等. 长江三角洲典型地区农田土壤多环芳 经分布特征与源解析[J]. 土壤学报, 2010, 47(6):1110-1117.
 LIU Zeng - Jun, TENG Ying, HUANG Biao, et al. Distribution and sources analysis of PAHs in farmland soils in areas typical of the Yangtze River Delta, China[J]. Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(6):1110-1117.
- [2] Achten C, Hofmann T. Environmental impact of native polycyclic aromatic hydrocarbons from hard coals[J]. Groundwater, 2010, 15:5–18.
- [3] Ahrens M J, Morrisey D J. Biological effects of unburnt coal in the marine environment[J]. Oceanography and Marine Biology: An Annual Review, 2005, 43:69–122.
- [4] 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.
 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.
- [5] 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.
- [6] 王 鑫, 苏 丹, 李海波. 固定化微生物对土壤中苯并芘的降解[J].
 生态环境学报, 2011, 20(3):532-537.

WANG Xin, SU Dan, LI Hai-bo. Immobilization of combined bacteria and its degradation of benzo[a]pyrene in contaminated soil[J]. *Ecology* and Environmental Sciences, 2011, 20(3):532-537.

[7]郑 伟,周林成,徐艳艳,等.高性能载体材料的设计与制备及其固定化微生物处理污水研究进展[C].长沙:第七届中国功能材料及其应用学术会议,2010:185-189.

ZHENG Wei, ZHOU Lin-cheng, XU Yan-yan, et al. Research and design of high performance carrier materials and research progress of immobilized microbial wastewater treatment[C]. Changsha: The 7th national conference on functional material and applications, 2010: 185– 189.

[8] 钱林波, 元妙新, 陈宝梁. 固定化微生物技术修复 PAHs 污染土壤的 研究进展[J]. 环境科学, 2012, 33(5):1767-1776.

QIAN Lin-bo, YUAN Miao-xin, CHEN Bao-liang. Research progress about bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with immobilized microorganism technique[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(5):1767–1776.

[9] Cassidy M B, Lee H, Trevors J T. Environmental applications of immo-

bilized microbial cells: A review[J]. *Journal of Industrial Microbiology* & *Biotechnology*, 1996, 16(2):79–101.

[10] 司友斌, 彭 军. 固定化微生物技术及其在污染土壤修复中的应用[J]. 土壤, 2007, 39(5):673-676.

SI You-bin, PENG Jun. Advances in immobilized microorganism and its application in contaminated soil remediation[J]. *Soils*, 2007, 39 (5):673-676.

- [11] 李 婧.以玉米秸秆吸附-包埋-交联的复合固定化方法固定微生物处理芘的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2013.
 LI Jing. Removal of pyrene by immobilized microorganism using pread-sorption on corn stalk-embedding-crosslinking immobilization meth-
- [12] Garg U, Kaur M P, Jawa G K, et al. Removal of cadmium (II) from aqueous solutions by adsorption on agricultural waste biomass[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 154:1149–1157.

od[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013.

[13] 杨若明.环境中有毒有害化学物质的污染和监测[M].北京:中央 民族大学出版社,2001:126-128.

YANG Ruo-ming. Pollution and monitoring of toxic and hazardous chemicals in the environment[M]. Beijing: Central University for Nationalities Press, 2001:126-128.

 [14] 刘瑞民,王学军.土壤多环芳烃污染的地统计学研究进展[J].中国 环境监测,2004,20(4):61-66.
 LIU Rui-min, WANG Xue-jun. Review on the pollution research of

polycyclic aromatic hydrocarbons in soil using geostatistics[J]. *Envi*ronmental Monitoring in China, 2004, 20(4):61–66.

[15] 何计龙,夏慧丽,卢 亭. 气相色谱-质谱法测定土壤中的16种多 环芳烃[J]. 化工时刊, 2011, 25(8):23-28.
HE Ji-long, XIA Hui-li, LU Ting. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by gas chromatography-mass spectrometry

[J]. Chemical Industry Times, 2011, 25(8):23-28.
[16] 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.
SUN Run-xia, KE Chang-liang, LIN Qin, et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine organisms by ultrasonic extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(1):57-63.

[17] 关松荫. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京:农业出版社, 1986: 320-330.

GUAN Song-yin. Soil enzymes and their research methods[M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1986:320-330.

[18] 李凤梅, 郭书海, 张灿灿, 等. 多环芳烃降解菌的筛选及其在焦化 场地污染土壤修复中的应用[J]. 环境污染与防治, 2016, 38(4):1-5.

LI Feng-mei, GUO Shu-hai, ZHANG Can-can, et al. Isolation of PAHs degration bacteria and its application to mediation of polluted soil in coking site[J]. *Environmental Pollution Control*, 2016, 38(4): 1–5.

[19] 李 婧, 党 志, 郭楚玲, 等. 复合固定化法固定微生物去除芘[J].
 环境化学, 2012, 31(7):1036-1042.

LI Jing, DANG Zhi, GUO Chu-ling, et al. Removal of pyrene using immobilized microorganism[J]. *Environmental Chemistry*, 2012, 31 (7):1036-1042.

- [20] 王 新,李培军,宋守志,等.固定化微生物对土壤中多环芳烃的降解[J].东北大学学报(自然科学版),2006,27(10):1154-1156.
 WANG Xin, LI Pei-jun, SONG Shou-zhi, et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by immobilized microorganisms
 [J]. Journal of Northeastern University (Natural Science), 2006, 27 (10):1154-1156.
- [21] 王建龙. 生物固定化技术与水污染控制[M]. 北京:科学出版社, 2002:7-8.

WANG Jian-long. Bio-immobilization technology and water pollution control[M]. Beijing: China Science Press, 2002:7-8.

[22] Liu W, Wang S T, Zhang J, et al. Biochar influences the microbial community structure during tomato stalk composting with chicken manure[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 154:148–154.

[23] 张志远, 王翠苹, 刘海滨, 等. 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. ZHANG Zhi-yuan, WANG Cui-ping, LIU Hai-bin, et al. Bioremediation of PAHs contaminated soil from Beijing coking plant by *Lasiodiplodia theobromae*[J]. *Environmental Science*, 2012, 33(8): 2832-2839.

[24] 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 enzyme activity[J]. Ecology and Environment Sciences, 2011, 20(4):691-695.