

多环芳烃在灌溉土壤中的 自净和微生物效应

刘期松、杨桂芬、张春桂、许华夏、姜晴楠

(中国科学院林业土壤研究所)

一、前言

污水灌溉既为农业提供水肥资源,又是污水净化的手段。在自然净化中微生物起着重要的作用。C.B.Kincannon (1977)、R.L.Raymond等(1976)、Stanley W.Watson(1977)作过有关石油降解工作。作者研究过石油污水灌区和水系中微生物生态和降解油的生物种群(1981、1982、1983)。结果表明,烷烃75天内降解较快,芳烃降解较慢,多数芳烃粘附沉积于底部,这部份芳烃多为致癌物质。

目前国内外对石油污染物的研究,多限于总油量的消长。对多环芳烃组分和致癌性芳烃动态研究尚属少见。为了阐明农田自净和残留物的影响,我们研究了季节变化,迁移规律,微生物生态效应,多环芳烃输入、输出和残留物,以期为石油废水灌田的问题和改进提供依据和方法。

二、材料和方法

(一) 土壤样品采样地点:

1. **重污染区。**抚顺三宝屯四队水稻田,砂质土,污水灌溉30年以上;
2. **中污染区。**沈阳深井子公社韩家壕兴隆三队,壤土,污水灌溉15—20年;
3. **轻污染区。**沈阳汪家公社大甸子大道东,轻质壤土,灌溉15年;
4. **污泥。**采自抚顺三宝屯渠首闸门以上,底部沉积污泥;
5. **对照土。**采自中国科学院长白山定位站,美人松林带下,土质为森林土壤。

采样层次:表土层0—10厘米,底土层20—35厘米

采样时间:第一次4月初,泡田,翻耕前;第二次7月中,水稻生长期;第三次9月末停灌后,水稻成熟期。对照土仅7月采一次样。

(二) 试剂和设备:

1. **溶剂。**均为分析纯,使用前经重蒸馏。
2. **滤纸筒。**粗滤纸,用二氯甲烷回流2—3小时,晾干,叠成筒。
3. **柱层析。**吸附剂为硅胶60—80目,中性氧化铝70目以上,二者140—160℃活化4—6小时。装柱,取层析柱一支,内径为2厘米,高15厘米,上口呈圆筒漏斗形。柱底部塞少许脱脂棉,然后装入9厘米活性硅胶,上面覆盖2厘米高的活性氧化铝,装柱时轻轻震动,使柱均匀致密,在顶部再装25克无水硫酸钠。

4. **薄层层析。**取10克200目以上硅胶,用约25毫升无水乙醇调成糊状,作成8.5×13厘米的层析6—7块,置于室温下风干4小时。

5. 仪器。日本产日立635型高压液相色谱仪和日制电算记录荧光分光光度计。

(三) 方法包括:

1. 微生物分离和鉴定。细菌使用肉汁胨培养基, 真菌和放线菌使用Chaper培养基进行分离和计数。挑取优势菌落进行纯化, 纯化后的菌株进行鉴定。

2. 土壤中多环芳烃 (PAH) 的分离和测定:

(1) 土样处理。取土壤1—2公斤放在暗处阴干, 粉碎, 过筛, 取0.25毫米直径的土粒备用。

(2) PAH的提取和分离。称取20克土样, 装于滤纸筒内, 将滤纸筒置于索氏提取器内, 接收瓶盛有120毫升二氯甲烷于50—55℃的水浴上回流, 提取6—7小时。然后浓缩至粘稠状, 将二氯甲烷挥发尽, 所得提取物用沸程30—60℃石油醚溶解。溶解物移到层析柱中, 先用石油醚洗脱烷烃弃掉, 再改用1:3的甲醇:三氯甲烷混合液洗脱芳烃。洗脱液接收在50毫升烧杯中, 浓缩至稠状。

将所得上述的总PAH洗脱物置于5毫升容量瓶中, 用1:3的甲醇:三氯甲烷混合液溶解, 并定容至刻度。取溶解液2.5毫升置小烧杯中浓缩至稠状, 加0.5毫升丙酮溶解, 点样于薄层层析板上, 用9:1苯:乙醇展开, 将PAH层析带刮下, 置于小柱内, 用二氯甲烷洗脱。洗脱液在浓缩瓶中浓缩至粘稠状, 加0.5毫升苯溶解, 用高压液相色谱仪器测定PAH组分及含量。另取2.5毫升溶解液浓缩至稠状, 用环己烷定容至5毫升, 用荧光分光光度计测定PAH总量。

三、结果与讨论

(一) 石油污染区的微生物活性和优势群

按不同季节, 土壤层次和污染程度分析了土壤中的细菌、真菌和放线菌的活细胞数和优势种群, 结果见表1。从表1中可以看出:

1. 在刚解冻初期(4月初), 细菌的数目除中度污染区表土的细菌高于底土外, 其他污染区底土中的细菌略高于表土; 真菌的数目, 除重污染区表土中的菌数高于底土外, 其余各区底土中的菌数高于表土; 放线菌的数目, 各区均是底土高于表土中的菌数。这表明土壤解冻时, 表土中的微生物仍然受到昼夜温差的影响, 一冻一融对细菌有较大损伤。而中度污染区的细菌和重度污染区的真菌表土高于底土的菌数, 这是由于中度污染区是壤土和重度污染区是砂土, 含水较少, 含油较多, 冻结不坚实的缘故。

7月和9月土壤中细菌数均是表土高于底土, 反映了土壤表层有较高的温度和足够的养分、水分, 增强了微生物的活性。

2. 采样时间一致, 不同污染区的同一土层中显著地出现了细菌数量的变化(见图1)。中污染区大于重污染区, 大于轻污染区, 它反映了石油污水中油作为微生物的基质, 也反映了重污染区油对微生物的抑制。

3. 同一污染区, 同一土层, 随着采样时间的变化, 土壤中微生物的数量(或活性)和类群亦不一样, 细菌的数量是7月(高温)高于4月和9月。而放线菌和真菌的数量是4月多于7月和9月, 这是由于水稻田中7月污灌量增大, 抑制了真菌和放线菌的生长, 数量逐渐减少, 放线菌9月份极少。从重、中、轻污染区土壤和污泥及对照土的细菌数量比较, 污泥>重、中、轻污灌区>对照区(长白山保护区森林

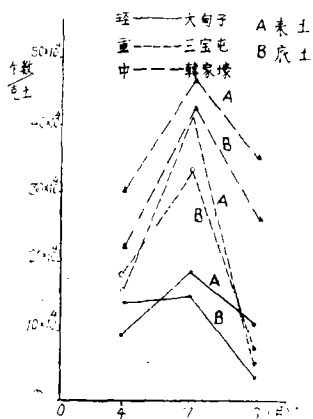


图1. 不同季节不同土层微生物数量变化曲线

土), 污灌区的优势微生物类群。研究中发现, 细菌中以芽孢杆菌占优势, 其次是假单胞、黄单胞、气单胞、邻单胞、不动杆菌属及短杆菌属; 真菌多系青霉和曲霉; 放线菌以链霉菌占优势。

表1 重、中、轻石油污染区水稻土中不同季节不同土层的中微生物数量

土壤样品	采样时间	微生物数量 (菌数/1克土)		
		细 菌	真 菌	放 线 菌
重度污染区表土	4月	15.95×10^4	10.5×10^3	26.0×10^3
	7月	42.34×10^4	31.0×10^3	0
	9月	7.27×10^4	0	0
重度污染区底土	4月	18.63×10^4	35.0×10^3	35.0×10^3
	7月	34.65×10^4	52.7×10^3	0
	9月	5.63×10^4	0	0
中度污染区表土	4月	30.78×10^4	28.0×10^3	7.0×10^3
	7月	46.34×10^4	10.9×10^3	0
	9月	35.99×10^4	0	0
中度污染区底土	4月	22.07×10^4	42.0×10^3	56.0×10^3
	7月	42.25×10^4	31.3×10^3	0
	9月	26.33×10^4	0	0
轻度污染区表土	4月	9.07×10^4	7.0×10^3	26.0×10^3
	7月	18.60×10^4	12.7×10^3	0
	9月	10.62×10^4	0	0
轻度污染区底土	4月	14.06×10^4	12.8×10^3	64.0×10^3
	7月	15.6×10^4	16.6×10^3	0
	9月	3.63×10^4	0	0
污 泥	4月	71.57×10^4	14.5×10^3	16.0×10^3
	7月	67.97×10^4	19.4×10^3	0
	9月	13.95×10^5	0	0
对照土 (美人松森林土壤)	7月	18.58×10^3	28.0×10^3	0

(二) 石油污灌区PAH的分布和变化

在不同程度的石油污灌区, 不同季节、不同深度的土层中PAH的分布和变化的分析结果见表2。

从图2中可以看出, 同一污染区, 在各个季节中, PAH总量的变化是表土中的PAH总量均大于底土, 其原因在于土壤有吸附作用, 使一些污染物累积于土壤表层, 用高压液相色谱测得PAH含有9种已知组分, 如联苯、蒽、菲、葱、芘, 1,2苯丙葱、萤葱、BeP、BaP, 其他组分没有标准物质未鉴定。

图3和图4表明, 重、中、轻计9种PAH的总量和组分在各个季节中的变化。总量的变化规律是: 表土中的PAH > 底土中的, 对照区低于污灌区, 大于轻污染区, 渠底污泥中的PAH > 重污染区 > 中污染区 > 轻污染区。PAH的迁移规律与石油污水的流程有关, 也和水中夹带电厂中粉

煤灰有关。渠首底泥中含PAH最多,其次是重污染区和中污染区,而轻污染区则较少。由于6、7月份是灌溉高峰季节,其PAH含量亦高。到9月末停灌,PAH的含量在渠首,重污染区和中污染区有明显的下降,而轻污染区由于上游田块的排水,出现了累积,用萤光法测得的PAH总量,其中包含极其复杂的其他PAH组分,但总的趋势与9种鉴定的PAH的消长相似。从PAH动态表明,

表2 污染区不同季节不同深度土壤中多环芳烃(PAH)的输出输入和残留量(毫克/公斤)

土样	采样时间	PAH总量	PAH 组 份									9种PAH组分总量	
			联苯	萘	菲	蒽	萤蒽	苊	1,2苯丙蒽	BeP	BaP		
重度污染区	表土	4月	—	1.25	4.00	3.63	0.20	18.00	7.00	0.75	4.25	0.50	39.58
		7月	631.98	9.83	1.10	1.00	痕量	4.9	1.93	0.85	5.50	0.69	25.8
		9月	189.00	7.04	1.28	0.55	0.02	3.30	0.37	0.63	0.24	0.59	14.02
	底土	4月	65.12	0.80	2.43	0.90	0.03	3.30	1.43	0.25	0.95	0.10	10.19
		7月	602.95	2.00	5.90	0.50	痕量	3.85	2.00	0.65	0.85	0.70	16.45
		9月	70.35	2.14	0.45	0.27	痕量	0.2	痕量	0.04	0.04	痕量	3.14
中度污染区	表土	4月	192.5	0.28	1.07	0.55	0.008	1.59	0.38	0.08	0.07	”	4.03
		7月	486.00	8.68	3.85	0.70	痕量	7.40	1.98	0.78	0.83	1.03	25.25
		9月	185.00	9.38	0.60	1.02	0.041	2.11	0.47	0.49	1.11	0.98	16.20
	底土	4月	90.96	0.44	0.50	0.32	0.008	0.55	0.12	0.20	0.38	0.05	2.57
		7月	471.82	0.87	1.45	0.19	痕量	0.99	痕量	0.22	0.35	0.56	4.63
		9月	—	2.35	0.27	0.47	痕量	0.16	痕量	0.06	0.086	痕量	2.92
轻度污染区	表土	4月	64.00	0.39	0.60	0.50	0.014	0.97	0.25	0.04	0.08	0.08	3.004
		7月	93.82	2.12	—	0.22	痕量	0.30	0.06	0.06	0.10	0.12	2.98
		9月	80.05	4.10	—	0.14	—	0.26	0.16	0.05	0.09	痕量	4.80
	底土	4月	—	0.38	0.20	0.25	0.06	0.14	0.08	0.01	0.11	0.08	1.31
		7月	66.00	1.13	—	0.28	痕量	0.57	—	0.06	0.098	痕量	2.14
		9月	70.14	4.36	0.81	0.25	0.08	0.60	痕量	0.03	0.08	痕量	6.21
污泥	* 4月	181.92	60.00	675.00	52.50	10.00	400.00	200.00	15.00	27.50	32.50	1,472.5	
	** 7月	709.95	72.50	15.00	35.00	痕量	367.50	935.00	17.00	33.00	17.50	1,492.5	
	* 9月	1103.35	95.00	—	9.6	3.20	63.00	22.00	8.00	5.00	19.00	224.8	
对照土	7月	66.29	5.10	痕量	0.45	痕量	1.05	0.115	0.0137	痕量	痕量	6.73	

* 渠道的底部污泥; ** 渠道边采的污泥

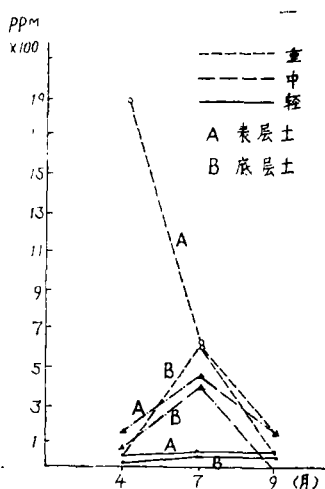
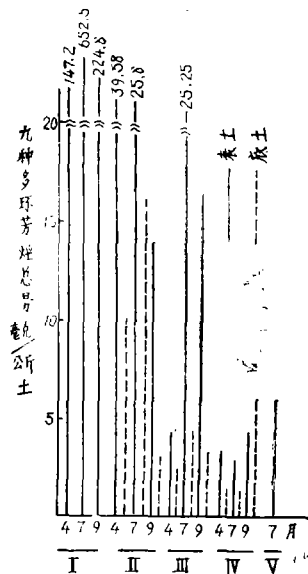
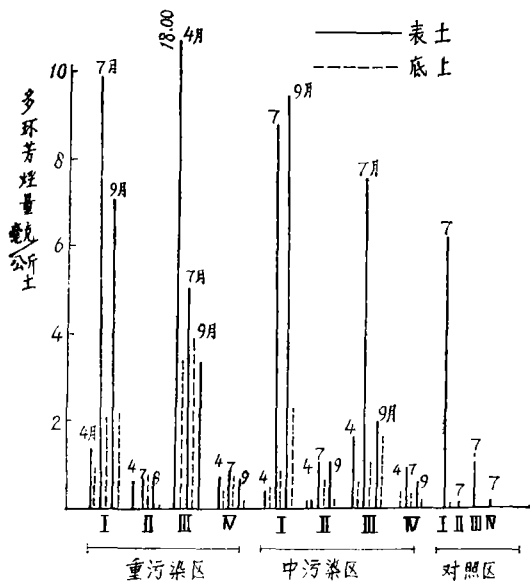


图2 荧光法测定PAH总量变化曲线



I—渠首污泥；II—重污染区；III—中污染区；IV—轻污染区；V—对照区

图3 污水灌区和对照区9种PAH的比较



I—联苯；II—BaP

III—萤蒽；IV—1,2苯丙蒽

图4 污染区和对照区4种PAH的变化比较

变化幅度。PAH在灌区的累积现状是渠首>重污染区>中污染区>轻污染区，9种PAH中以BaP，BeP和1,2苯丙蒽累积较少，其他组分较多。

4. 根据石油污水灌溉流程和PAH的动态，渠首和三宝屯重污染区累积的致癌性物质多，累积的原因是由于电厂粉煤灰和土壤的吸附，而土壤吸附至最大持留量并未随灌溉年月与日俱增。为了避免PAH累积于农田中，有必要在渠首建立大型吸附过滤工程，以改进石油污水水质和有效性。

由于土壤中理化和生物因子的作用而消减，并未随灌溉时间的长短，而与日俱增。

小结

1. 在石油污水灌溉区微生物的种群以细菌为主，真菌和放线菌较少。

2. 在低温季节沙土和壤土中含水少，微生物数量表土高于底土，高温季节（7、9月）表土中的微生物活性均较高。优势种群，细菌以芽孢杆菌属为主，其次是假单胞杆菌等，真菌以青霉属和曲霉属为主，放线菌以链霉菌属为主。这些菌属反映了石油污染区的微生物特征和生态组成。

3. 不同程度的石油污染区，土壤中的9种已知PAH和PAH总量，一般是表土高于底土，在灌溉高峰季节累积的更多。随着污水的停灌逐渐下降，一般底土中的PAH含量低于表土的