

# 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,以期对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

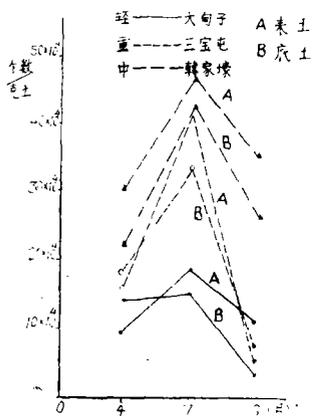


图1. 不同季节不同土层微生物数量变化曲线

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   | $15.95 \times 10^4$ | $10.5 \times 10^3$ | $26.0 \times 10^3$ |
|                  | 7月   | $42.34 \times 10^4$ | $31.0 \times 10^3$ | 0                  |
|                  | 9月   | $7.27 \times 10^4$  | 0                  | 0                  |
| 重度污染区底土          | 4月   | $18.63 \times 10^4$ | $35.0 \times 10^3$ | $35.0 \times 10^3$ |
|                  | 7月   | $34.65 \times 10^4$ | $52.7 \times 10^3$ | 0                  |
|                  | 9月   | $5.63 \times 10^4$  | 0                  | 0                  |
| 中度污染区表土          | 4月   | $30.78 \times 10^4$ | $28.0 \times 10^3$ | $7.0 \times 10^3$  |
|                  | 7月   | $46.34 \times 10^4$ | $10.9 \times 10^3$ | 0                  |
|                  | 9月   | $35.99 \times 10^4$ | 0                  | 0                  |
| 中度污染区底土          | 4月   | $22.07 \times 10^4$ | $42.0 \times 10^3$ | $56.0 \times 10^3$ |
|                  | 7月   | $42.25 \times 10^4$ | $31.3 \times 10^3$ | 0                  |
|                  | 9月   | $26.33 \times 10^4$ | 0                  | 0                  |
| 轻度污染区表土          | 4月   | $9.07 \times 10^4$  | $7.0 \times 10^3$  | $26.0 \times 10^3$ |
|                  | 7月   | $18.60 \times 10^4$ | $12.7 \times 10^3$ | 0                  |
|                  | 9月   | $10.62 \times 10^4$ | 0                  | 0                  |
| 轻度污染区底土          | 4月   | $14.06 \times 10^4$ | $12.8 \times 10^3$ | $64.0 \times 10^3$ |
|                  | 7月   | $15.6 \times 10^4$  | $16.6 \times 10^3$ | 0                  |
|                  | 9月   | $3.63 \times 10^4$  | 0                  | 0                  |
| 污 泥              | 4月   | $71.57 \times 10^4$ | $14.5 \times 10^3$ | $16.0 \times 10^3$ |
|                  | 7月   | $67.97 \times 10^4$ | $19.4 \times 10^3$ | 0                  |
|                  | 9月   | $13.95 \times 10^5$ | 0                  | 0                  |
| 对照土<br>(美人松森林土壤) | 7月   | $18.58 \times 10^3$ | $28.0 \times 10^3$ | 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, 也和中水夹带电厂中粉

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     | 葱     | 萤葱     | 苊      | 1,2苯丙葱 | 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

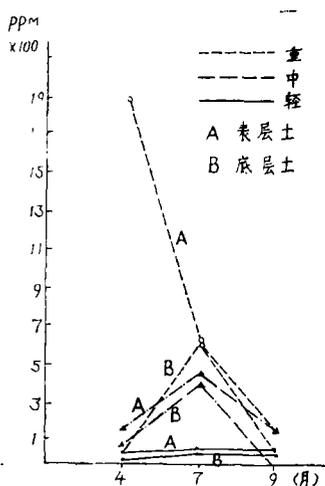
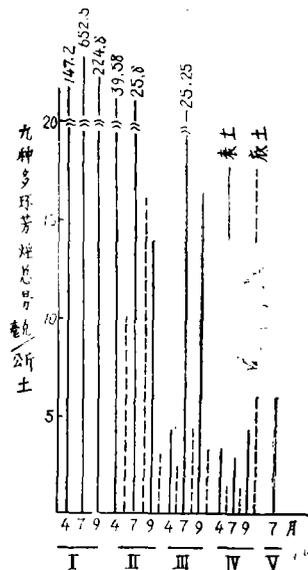
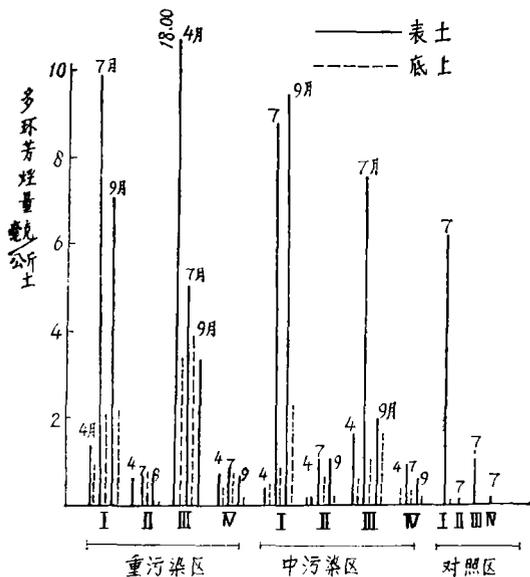


图2 荧光法测定PAH总量变化曲线



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