

黑麦草对土壤中苯并[a]芘动态变化的影响*

克强^{1,2} 骆永明¹ 刘世亮¹ 宋 静¹ 吴龙华¹ 邢维芹¹ 李振高¹

(1 中国科学院南京土壤研究所土壤和环境生物修复研究中心, 南京 210008)

(2 南京工程学院, 南京 210013)

陶 澍

(北京大学环境学院, 北京 100871)

摘 要 本文通过盆栽试验初步研究了黑麦草(*Lolium multiflorum Lam*)对污染土壤中多环芳烃苯并[a]芘动态变化的影响。盆栽试验设计 3 种苯并[a]芘处理浓度, 分别为 1、10、100 mg kg⁻¹。将苗龄为 1 周的黑麦草移植于受苯并[a]芘污染的土壤中, 同时设置有相同的苯并[a]芘处理浓度但不种植物的对照试验。试验在 20 m³ 的控温、控光的生长室内进行, 土壤湿度维持在田间持水量的 60%。通过 120 d 的温室盆栽试验, 观察到土壤中苯并[a]芘的可提取浓度随着时间逐渐减少, 种植黑麦草加快了土壤中可提取态苯并[a]芘浓度的下降。在 1、10、100 mg kg⁻¹ 苯并[a]芘处理浓度下, 黑麦草生长的土壤中苯并[a]芘的减少率分别达 82.3%、74.0% 和 55.9%。结果还显示, 随盆栽时间的延长, 黑麦草根圈土壤中多酚氧化酶含量提高, 这可能根圈土壤中可提取态苯并[a]芘含量降低有关。黑麦草的地上部可以积累苯并[a]芘, 变幅在 0.06~3.60 mg kg⁻¹。初步认为, 土壤具有缓解苯并[a]芘污染的自然本能, 促进黑麦草生长, 增强土壤多酚氧化酶活性, 可提高黑麦草对苯并[a]芘污染土壤的修复能力。

关键词 生物修复; 黑麦草; 多环芳烃; 土壤可提取态苯并[a]芘; 多酚氧化酶

中图分类号 X171.5

文献标识码 A

苯并[a]芘是五环结构的多环芳烃, 有很强的致癌性, Ames 实验阳性, 能够导致染色体畸变, 染色体交换, 无序的 DNA 合成^[1]。因此, 苯并[a]芘被美国环保局列入优先控制有毒有机污染物的黑名单^[2]。它通过石油开采与运输过程中的泄漏、含油污水灌溉、燃煤和汽车尾气的排放及大气飘尘的沉降等途径, 进入地表而污染土壤。

20 世纪 80 年代初期, 谢重阁^[3]等的测定结果表明: 我国石油污灌的沈抚灌渠中渣油苯并[a]芘的含量高达 29~30 mg kg⁻¹。一些多环芳烃污染区附近的土壤中苯并[a]芘的含量可高达 28~82 mg kg⁻¹^[4]。自然状况下土壤中的苯并[a]芘难以降解。Grosser 等^[5]研究发现添加¹⁴C 的苯并[a]芘在 225 d 的试验期间内 3 种土壤的降解率为 4%~25%。植物根际土壤与非根际土壤比较研究表明, 植物可以促进根际土壤中多环芳烃、杀虫剂、除草剂的降解^[6]。Binrt

等^[7]报道, 黑麦草能促进根际土壤中菲等多环芳烃的降解, 在经过 6 个月老化的土壤中多环芳烃降解率低于未经老化的土壤中的降解率。Banks 等^[8]发现酥油草根际土壤可以促进苯并[a]芘的降解, 在 6 个月后其降解率可以达到 1/2 以上。可见, 黑麦草等植物对土壤中多环芳烃的降解具有促进作用, 从而影响其在土壤环境中的归宿。但是, 综观研究现状, 对于黑麦草根际土壤中如苯并[a]芘等多环芳烃的动态变化及其化学和生物学成因尚不清楚。从微生物学角度, 这种变化是否与能参与芳香族类化合物分解转化的多酚氧化酶活性变化有关? 黑麦草植物能否积累苯并[a]芘? 以及其是否具有有机污染土壤生物修复意义? 对此国内外都还认识不多。如何促进土壤中这类有毒持久性有机污染物的快速化学锁定或生物降解, 减少其毒害性已成为倍受关注的研究课题。

* 国家自然科学基金重点项目(40031010)、国家重点基础研究发展规划项目(2002CB410809/10)、中国科学院知识创新工程项目(KZCX3-SW-429)和土壤与环境联合开放研究实验室项目资助

- 通讯作者: ymluo@issas.ac.cn

作者简介: 丁克强(1968~), 男, 博士, 主要从事土壤有机污染物生物修复方面的研究

收稿日期: 2003-04-21; 收到修改稿日期: 2003-11-30

本文在对较易降解的三环多环芳烃菲的生物修复初步研究^[9]的基础上, 选择较难降解的五环多环芳烃苯并[a]芘作为研究对象, 进行了盆栽试验, 动态监测了不同苯并[a]芘浓度处理下黑麦草地上部及其根际土壤中苯并[a]芘、多酚氧化酶含量的变化趋势, 并对其动态变化的可能驱动因素及根际生物修复潜力作了初步探讨, 以期土壤中多环芳烃等持久性有机污染物的生物修复技术原理发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤 供试土壤采自中国科学院南京土壤研究所常熟农业生态实验站的潜育水耕人为土^[10], 俗名为乌栅土。土壤风干后过 2 mm 尼龙筛, 其理化性质如下: pH 7.8, 有机质 36.3 g kg⁻¹, 全氮 2.25 g kg⁻¹, 全磷 0.75 g kg⁻¹, 全钾 17.4 g kg⁻¹, 阳离子交换量 215.9 mmol kg⁻¹, 试验土壤中 B[a]P 浓度低于岛津 10A-HPLC 荧光检测器的检测限, 未被测出。

1.1.2 植物 黑麦草(*Lolium multiflorum* Lam)

1.1.3 化学品 苯并[a]芘(Benzo[a]pyrene, 简称 B[a]P) 纯度 > 97%, 美国 Sigma 公司产品。

1.2 研究方法

1.2.1 土壤处理 试验设计 3 种处理, 苯并[a]芘浓度为 1、10、100 mg kg⁻¹ (分别表示低、中、高 3 种污染程度)。为了使供盆栽试验用的模拟污染土壤得到充分均匀, 试验采取如下三个步骤将苯并[a]芘与土壤混合: (1) 每一浓度处理都先用 200 ml 丙酮溶解试验所需要的苯并[a]芘, 然后分别加入到 100.0 g 土壤中, 充分搅拌均匀, 为第一母体污染土壤; (2) 待第一母体污染土壤中丙酮挥发干后, 再分别加入到 3 份 900.0 g 土壤中, 充分搅拌, 放置 1 d, 为第二母体污染土壤; (3) 然后将第二母体污染土壤再分别加入到另外 3 份预先称好的土壤中, 使苯并[a]芘浓度达到上述三种试验处理要求, 在干净的塑料袋内放置于 15 d, 期间每天混合 1 次, 最后分装到带有底盘的塑料盆(上缘直径为 8 cm, 底面直径 5 cm, 高 7 cm) 中, 每盆装 100.0 g 土壤(烘干计), 放置 1 周后使用。

1.2.2 盆栽试验 在 20 m³ 的控温、控光的生长室里进行为期 120 d 的盆栽试验。调节各处理的土壤湿度, 使土壤田间持水量保持为 60%, 每盆种植

苗龄为 1 周的黑麦草 10 株。同时设置对照处理: 有相同的苯并[a]芘处理浓度但不种植物, 以及不加苯并[a]芘但种植物或不种植物处理。每一处理重复 4 次。在盆栽期间, 在移栽后 10、20、30、60、90 和 120 d 分批取盆、采集土壤和植物样品, 供土壤和植物苯并[a]芘和多酚氧化酶动态分析用; 同时通过每天称重将盆栽土壤水分维持在田间持水量的 60%, 生长室内的日间温度为 25℃, 夜间温度 20℃, 光照强度为 4 500~7 300 lx。

1.2.3 土壤和植物样品处理及苯并[a]芘的提取与测定 试验中采集的土壤样品经风干后, 采用超声法提取苯并[a]芘^[11]; 植物样品经过 80℃ 烘干至恒重后, 也按文献[11]中的方法处理。提取液中的苯并[a]芘浓度用岛津 10A-HPLC 荧光检测器测定; 本试验中的苯并[a]芘的回收率为 82.4%~85.2%。

1.2.4 土壤多酚氧化酶活性的测定 土壤多酚氧化酶用比色法测定^[12]。

1.2.5 数据处理 本文所列结果为 4 次重复的平均值, 数据经方差分析, 用新复极差法作多重比较。

2 结果分析

2.1 土壤中可提取态苯并[a]芘浓度的变化

如图 1 所示, 随着盆栽时间延长, 土壤中可提取态的苯并[a]芘浓度逐渐减少, 在低、中、高 3 个浓度处理的盆栽中, 都在 10 d 内迅速降低, 随后减少变慢, 趋于平缓。

同时, 观察到黑麦草可以促进土壤中可提取态苯并[a]芘含量的减少(图 1)。在低浓度的处理中, 除 90 d 外, 在其它各时间有植物生长的土壤中可提取态苯并[a]芘浓度明显低于无植物生长的($p < 0.05$)。在中浓度的处理中, 在 120 d 时有植物生长的与无植物生长的之间的差异达极显著($p < 0.01$)。在高浓度的处理中, 在 30~120 d 期间有植物生长的土壤可提取苯并[a]芘的浓度明显低于无植物生长的($p < 0.05$)。

2.2 污染土壤中多酚氧化酶活性的变化

本研究中的土壤多酚氧化酶的动态变化是通过有植物生长的土壤多酚氧化酶活性值与无植物生长的土壤多酚氧化酶活性值的差值表示, 以说明植物生长对多酚氧化酶活性的影响作用。如图 2 所示, 所有处理中有植物与无植物的酶活性差值都大于零。可见, 无论在对照还是在苯并[a]芘处理下黑麦草都能够增强土壤中多酚氧化酶的活性; 与不加苯

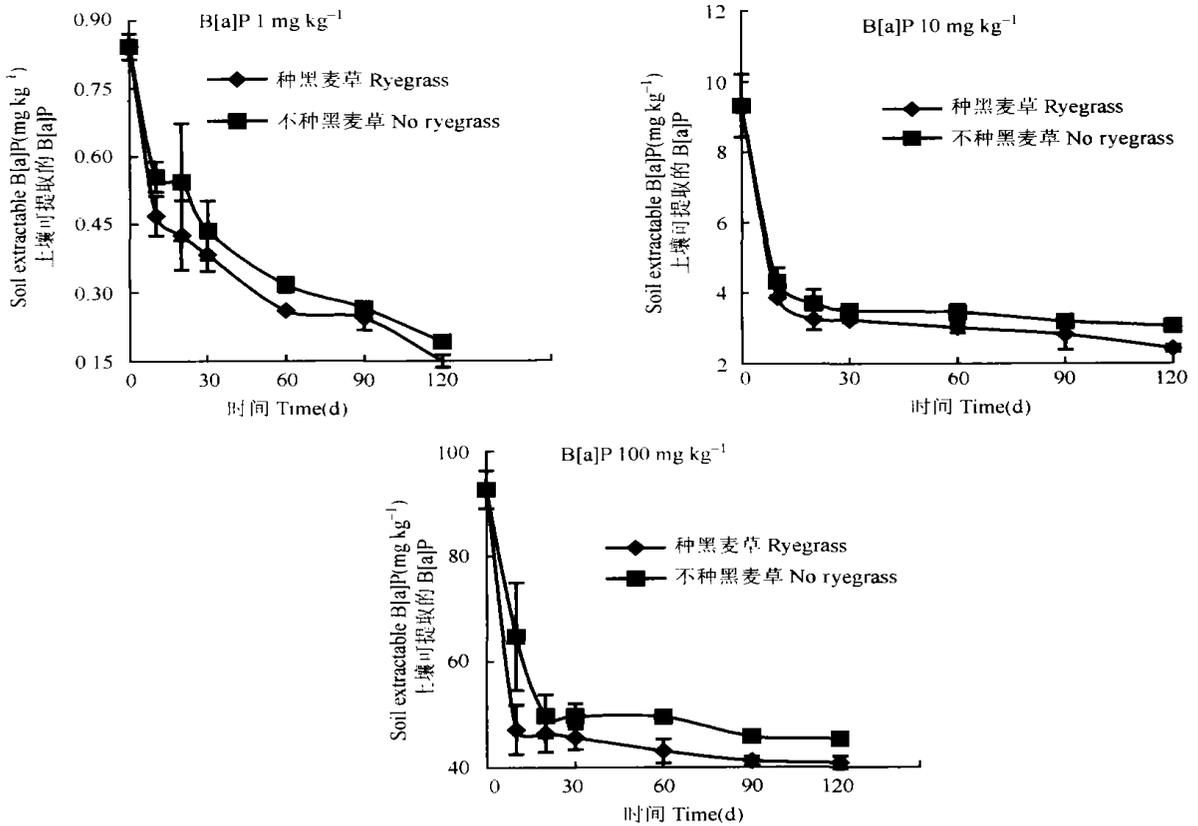


图 1 黑麦草对污染土壤中可提取态苯并[a]芘浓度动态变化的影响
Fig 1 Dynamics in extractable B[a]P in soil with and without growth of ryegrass plants

并[a]芘的土壤中多酚氧化酶活性的差值比较, 从 60 d 以后, 受苯并[a]芘处理的土壤中多酚氧化酶活性的差值都高于对照。在试验期间, 3 种不同 B[a]P 浓度处理土壤的酶活差值呈动态变化, 在 30 d 到 60 d

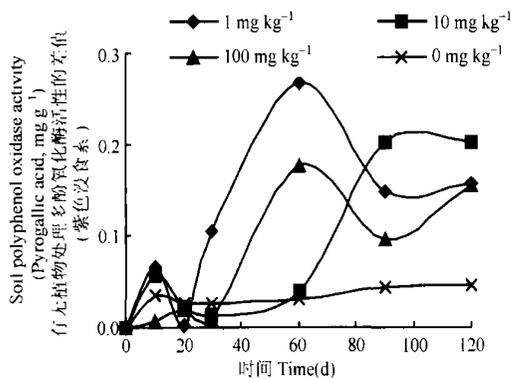


图 2 黑麦草对苯并[a]芘污染土壤中多酚氧化酶活性差值动态的影响
Fig 2 Effect of ryegrass on polyphenol oxidase activities* in B[a]P-contaminated soil

* Data shown in this figure were the difference in soil polyphenol oxidase activities between the treatments with and without ryegrass plants

期间, 酶活差值大小的顺序为 1 mg kg^{-1} 的处理 $>$ 100 mg kg^{-1} 的处理 $>$ 10 mg kg^{-1} 的处理 $>$ 对照; 在 90 d 以后, 酶活差值大小的总体顺序为 10 mg kg^{-1} 的处理 $>$ 1 mg kg^{-1} 的处理 $>$ 100 mg kg^{-1} 的处理 $>$ 对照。土壤中多酚氧化酶活性的动态变化可能受到土壤中苯并[a]芘含量及其动态变化的影响。

2.3 黑麦草植株体内苯并[a]芘含量的变化

黑麦草地上部体内可积累苯并[a]芘, 其含量的动态变化如图 3 所示。在 10d 时, 低浓度处理中黑麦草地上部的含量为 1.27 mg kg^{-1} , 中、高浓度处理的含量为 3.41 和 3.60 mg kg^{-1} 。随着时间的延长, 黑麦草地上部的含量都有减少的趋势, 到试验结束时, 低、中、高浓度处理的黑麦草地上部的含量分别降到 0.67 mg kg^{-1} 、 0.06 mg kg^{-1} 和 0.13 mg kg^{-1} 。

2.4 黑麦草生物量的动态变化

图 4 显示了试验土壤上黑麦草地上部分鲜重的动态变化。在植物生长 10~90 d 期间, 3 种苯并[a]芘浓度处理间无显著差异。在生长 120 d 收获时, 3 种浓度和对照之间仍没有达到显著水平 ($p > 0.05$)。

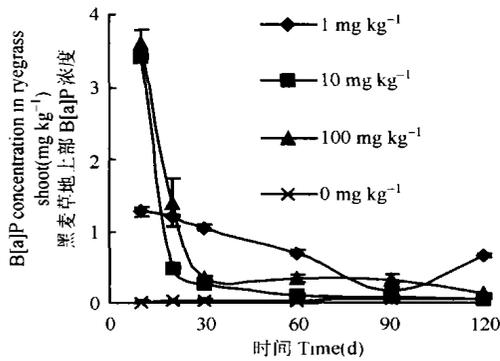


图3 黑麦草地上部中苯并[a]芘浓度的动态变化

Fig. 3 Dynamics in B[a]P concentrations in shoots of the ryegrass plants

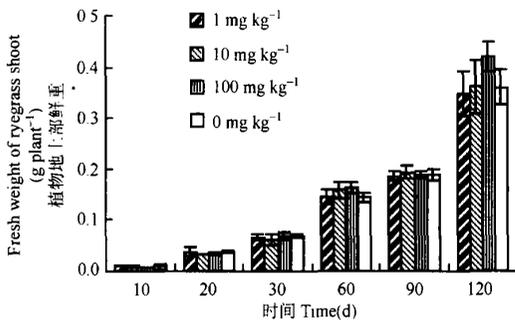


图4 苯并[a]芘污染土壤上黑麦草地上部生物量的动态变化

Fig. 4 Changes in shoot biomass of ryegrass grown on soil contaminated with different concentration of B[a]P

这说明黑麦草对土壤中多环芳烃苯并[a]芘的毒性有较强的忍耐力。

3 讨论

在本试验条件下, 未种植物的土壤中可提取态苯并[a]芘的含量减少(图1), 这与我们对三环芳烃菲污染土壤的研究结果相似^[9]。这可能主要是由于土壤中土著微生物对苯并[a]芘的降解所致。不过, 对前期(播种后10天内)的土壤可提取态苯并[a]芘浓度快速下降, 也可能与土壤中有有机物质的吸持、锁定有关。虽然对于生物降解和化学吸附这两种作用的贡献大小及其相关机制尚待进一步探明, 但是可提取态苯并[a]芘含量的大幅度减少已表明土壤具有对五环芳烃苯并[a]芘污染的自然削减与修复功能。

种植黑麦草后, 土壤中可提取态苯并[a]芘含量进一步减少(图1)。历时120 d的盆栽试验期间,

低、中、高3种苯并[a]芘处理浓度下, 种植物的土壤中苯并[a]芘可提取率低于不种植物的, 前者最终减少率分别达82.3%、74.0%、55.9%, 后者最终减少率分别是77.2%、67.2%、51.0%。有黑麦草植物生长的土壤中酶活性明显高于无植物生长的(图2), 说明这种植物提高了土壤中多酚氧化酶和可降解微生物的活性, 形成了更有利的可降解苯并[a]芘的根际修复环境。一般而言, 有机污染物的降解是在土壤酶的参与下进行的, 有关的酶参与C、N、P、S等物质的循环中^[13, 14]。多酚氧化酶是土壤中重要的氧化还原酶, 能够参与芳香族类化合物的分解转化过程^[12]。联系图1与图2, 不难看出根际土壤多酚氧化酶活性随时间提高而土壤可提取态苯并[a]芘浓度随时间降低的趋势。在本试验条件下, 多酚氧化酶有可能参与了土壤中苯并[a]芘的分解转化过程, 其活性的提高加速了苯并[a]芘这种有机污染物的降解, 从而提高了多环芳烃污染土壤的生物修复能力。对于这种酶如何促进土壤中苯并[a]芘降解的内在机制还有待探索。

黑麦草可吸收苯并[a]芘(图3), 黑麦草对苯并[a]芘的吸收可能是土壤中可提取态苯并[a]芘含量减少的部分原因。蔡全英等^[15]在施用污泥的水稻土上种植通菜研究中亦得出, 通菜中的 Σ PAHs的含量在0.41~5.40 mg kg⁻¹, 通菜地上部中的含量大于根系中的含量。苯并[a]芘的强疏水性影响其在植物体内的迁移, 体内的部分苯并[a]芘随着植物的生长发育及其代谢能力的增强有可能被转化为中间代谢产物^[16]。这可能是本试验中黑麦草地上部的苯并[a]芘含量表现出没有随植物生长时间延续而提高的原因, 这也可能是在不同的外加剂量下黑麦草地上部中苯并[a]芘浓度在不同生长期差异的原因。植物能够吸收PAHs的现象已有一些报道, 例如: Edwards^[16]研究了生长在营养液中开花和结实期的矮菜豆对¹⁴C-葱的吸收和迁移。结果表明, 矮菜豆能够从根部吸收葱, 并转移葱及其代谢物到其他植物组织器官。土壤溶液中PAHs可以穿过根皮层进入木质部, 通过根毛细胞的作用累积于植物茎, 或通过运输作用达到叶部并积累^[17, 18]。本试验中黑麦草地上部体内多环芳烃的存在是否通过植物根系吸收、传递的结果, 尚需进一步验证。揭示苯并[a]芘的植物吸收、体内运输和代谢机制, 同时提出能够提高多环芳烃在植物体内累积量的途径, 将有助于毒害有机物污染土壤植物修复技术的发展。

黑麦草地上部分生物量的动态变化(图4)显

示,黑麦草能够在高达 100 kg mg^{-1} 苯并[a]芘浓度的“急性污染”的土壤中正常生长,表明这种植物对土壤中多环芳烃苯并[a]芘的毒性有较强的忍耐力,是一种有潜力的适合多环芳烃等有机污染土壤修复的植物。

4 结论

不同苯并[a]芘浓度处理的土壤中苯并[a]芘的可提取态浓度随着时间延长逐渐降低,并且在黑麦草植物生长的土壤中苯并[a]芘含量进一步减少。土壤具有一定的自然修复苯并[a]芘污染的功能,黑麦草表现出具有强化修复苯并[a]芘污染土壤的作用。这种修复作用可能与种植黑麦草后根际土壤中多酚氧化酶活性提高有关。黑麦草地上部可积累少量苯并[a]芘,其本身对土壤苯并[a]芘污染有净化作用。黑麦草对土壤中苯并[a]芘的强化修复作用与土壤苯并[a]芘污染程度和植物生长期有关。黑麦草的生长没有受到高浓度(100 mg kg^{-1})苯并[a]芘污染的影响。因此,增加黑麦草产量,增强根际土壤多酚氧化酶活性,将是一条能提高苯并[a]芘污染土壤植物修复能力的有效途径。

参考文献

- [1] Park K S, Sim R C, Dupont R R, *et al.* Fate of PAH compounds in two soil types: Influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1990, 9: 187~ 195
- [2] Keith L H, Thlliard W A. Priority pollutants I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.*, 1979, 13: 416~ 423
- [3] 谢重阁. 环境中石油与苯并[a]芘的分析技术的研究. 高拯民主编. 土壤-植物系统污染生态研究. 北京: 中国科学技术出版社, 1986. 400~ 427. Xie C G. The analysis techniques of petroleum oil and benzo(a)pyrene in the environment. *In: Gao Z M. ed. Studies on Pollution Ecology of Soil-Plant Systems (In Chinese)*. Beijing: China Science and Technology Press, 1986. 400~ 427
- [4] 孟范平, 吴方正. 土壤的 PAHs 污染及其生物治理技术进展. 土壤学进展, 1995, 23(1): 32~ 44. Meng F P, Wu F Z. Progress in PAHs polluted soil and its bioremediation (In Chinese). *Progress in Soil Science*, 1995, 23(1): 32~ 44
- [5] Grosser R J, Washavsky D, Vestal J R. Indigenous and enhanced materialization of Pyrene, B[a]P and Carbazole in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57: 3 462~ 3 469
- [6] Gunther T, Domberger U, Fritsche W. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbon in soil. *Chemosphere*, 1996, 54: 2 549~ 2 555
- [7] Binet P, Poral J M, Leyval C. Dissipation of 3~ 6-ring polycyclic aromatic hydrocarbon in rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32: 2 011~ 2 017
- [8] Banks M K, Lee E, Schwab A P. Evaluation of dissipation mechanisms for B[a]P in the rhizosphere of tall fescue. *J. Environ. Qual.*, 1999, 28: 294~ 298
- [9] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 等. 黑麦草对菲污染土壤修复的初步研究. 土壤, 2002, 34(4): 233~ 236. Ding K Q, Luo Y M, Liu S L, *et al.* Remediation of phenanthrene-contaminated soil by growing *Lolium multiflorum Lam* (In Chinese). *Soils*, 2002, 34(4): 233~ 236
- [10] 龚子同编著. 中国土壤系统分类—理论·方法·实践. 北京: 科学出版社, 1999. 165~ 167. Gong Z T. ed. *Chinese Soil Taxonomy—Theory, Methodology and Application (In Chinese)*. Beijing: Science Press, 1999. 165~ 167
- [11] 宋玉芳, 区自清, 孙铁珩. 土壤、植物样品中多环芳烃(PAHs)分析方法研究. 应用生态学报, 1995, 6(1): 92~ 96. Song Y F, Ou Z Q, Sun T H. Analytical method of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil and plant samples (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1995, 6(1): 92~ 96
- [12] 关松荫编著. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1986. 323~ 328. Guan S Y. ed. *Soil Enzyme and Research Method (In Chinese)*. Beijing: Agricultural Press, 1986. 323~ 328
- [13] 杨万勤, 王开运. 土壤酶研究动态与展望. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5): 564~ 570. Yang W Q, Wang K Y. Advances on soil enzymology (In Chinese). *Appl. Environ. Biol.*, 2002, 8(5): 564~ 570
- [14] Samino F, Ginafreda L. Pesticide influence on soil enzymatic activities. *Chemosphere*, 2001, 45: 417~ 425
- [15] 蔡全英, 莫测辉, 王伯光, 等. 城市污泥和化肥对水稻土种植的通菜中多环芳烃(PAHs)的影响. 生态学报, 2002, 22(7): 1 091~ 1 097. Cai Q Y, Mo C H, Wang B G, *et al.* Effects of municipal sludges and chemical fertilizer on the occurrence of PAHs in *Ipomoea aquatic* grown in paddy soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(7): 1 091~ 1 097
- [16] Edwards N T. Uptake, translocation and metabolism of anthracene in bush bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 1986, 5: 659~ 665
- [17] April W, Sims R C. Evaluation of the prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*, 1990, 22: 253~ 265
- [18] Bell P E, James B R, Chaney R L. Heavy metal extractability in long-term sewage sludge and metal salt-amended soils. *J. Environ. Qual.*, 1991, 20: 481~ 486

DYNAMICS IN BENZO [a] PYRENE CONCENTRATIONS IN SOIL AS INFLUENCED BY RYEGRASS PLANTS

Ding Keqiang^{1,2} Luo Yongming¹ Liu Shiliang¹ Song Jing¹ Wu Longhua¹ Xing Weiqin¹ Li Zhengao¹

(1 Soil and Environment Bioremediation Research Centre, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 Nanjing Institute of Technology, Nanjing 210013, China)

Tao Shu

(College of Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Dynamics in Benzo[a] pyrene (B[a] P) concentrations in soil as influenced by ryegrass plants (*Lolium multiflorum* Lam) were studied in a greenhouse experiment. During the 120 days of plant growth, the extractable B[a] P concentrations in the soils decreased with time and were much less in soil grown with ryegrass plants. In the planted soil with application rate of B[a] P 1, 10, 100 mg kg⁻¹ soil, B[a] P biodegradability amounted to 82. 3%, 74. 0% and 55. 9%, respectively. The planted soil had higher activity of polyphenoloxidase as compared with the unplanted soil. B[a] P concentrations in the plants ranged from 0. 06 to 3. 60 mg kg⁻¹ and declined with the increasing number of days of plant growth. Ryegrass enhanced rhizo- degradation of B[a] P in the contaminated soil. Increase in ryegrass growth and polyphenoloxidase activity in the rhizosphere soil can improve the bioremediation capability of of B[a] P contaminated soil by ryegrass plants.

Key words Bioremediation; Soil extractable B[a] P; PAHs; Polyphenoloxidase; Ryegrass