真菌对污染水稻土中苯并[a]芘共代谢降解研究*

刘世亮[1,2]　骆永明[2,3†]　吴龙华[2]　曹志洪[2,3]

(1 河南农业大学资源与环境学院,郑州　450002)

(2 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所),南京　210008)

(3 中国科学院研究生院,北京 100049)

摘　要　在恒温和恒定转速培养条件下,模拟生物泥浆反应器法,选择从石油污染土壤中分离出来的青霉菌、黑曲霉、白腐真菌等 3 种真菌,在添加不同浓度菲和邻苯二甲酸作为共存底物情况下,研究其对水稻土中苯并[a]芘(B[a]P)的共代谢降解。结果表明,未灭菌土壤对 B[a]P 有降解能力。当土壤中添加菲时,提高了 B[a]P 在土壤中的降解率,100 mg kg^{-1}浓度菲处理的降解率显著高于 200 mg kg^{-1}浓度菲处理,邻苯二甲酸对 B[a]P 降解影响不大。灭菌土壤中的 B[a]P 几乎没有降解。添加菲及邻苯二甲酸均促进了青霉菌对 B[a]P 的降解,其中菲浓度为 100 mg kg^{-1}处理效果最显著。与灭菌土壤相比,接种黑曲霉提高了 B[a]P 的降解率,但添加菲与邻苯二甲酸却均抑制了黑曲霉菌对 B[a]P 的降解。白腐真菌能有效地降解 B[a]P,但高浓度菲抑制了白腐真菌对 B[a]P 的降解,同时邻苯二甲酸对促进白腐真菌降解 B[a]P 的效果不明显。

关键词　多环芳烃(PAHs);共代谢降解;苯并[a]芘(B[a]P);真菌

中图分类号　X131.3　　**文献标识码**　A

多环芳烃(PAHs)为一类普遍存在于环境中的优先具毒有机污染物,具有致突变、致癌特征。美国环境保护署(EPA)已将 16 种 PAHs 列入优先控制有机污染物黑名单中[1],苯并[a]芘(B[a]P)是 PAHs 的典型代表种类之一。PAHs 因疏水性、辛醇水分配系数高,而易于从水生态系统向沉积层迁移,最终造成沉积层土壤的污染。目前普遍认为 PAHs 在土壤中是一类难降解有机物,具有较高的稳定性,生物可降解性随着苯环数和苯环密集程度增加而降低,尤其是四环以上的 PAHs 常以共代谢方式进行[2-3]。研究表明,通过几种微生物的一系列共代谢作用,可使某些特殊有机污染物彻底降解[4]。但是,土壤中微生物数量及种类众多,不同的微生物对 B[a]P 的降解能力不同。目前研究较多的是真菌对 B[a]P 等 PAHs 的降解[5-9],主要原因是真菌对环境中的污染物有较强的耐性,同时它又对环境变化有较强的适应能力。单个菌株对污染土壤的修复研究不仅涉及菌种的知识产权,同时能揭示分离得到的不同微生物对 B[a]P 等 PAHs 的降解特性。而这些具有降解 B[a]P 能力的微生物主要是从 PAHs 污染环境中或人工驯化过程中筛选出来的。目前,国内外对 PAHs 的共代谢降解的研究较少,开展经济高效的 PAHs 难降解有机污染物控制技术研究显得尤为重要[10]。本试验模拟 PAHs 污染土壤生物修复中的泥浆反应器法,引入我们自身从石油污染土壤中分离出的能降解 PAHs 的三种真菌,研究太湖地区水稻土中在培养条件下真菌对 B[a]P 在的共代谢降解过程,为 B[a]P 等 PAHs 污染土壤的真菌生物降解修复技术的形成和发展提供基础性资料。

* 国家自然科学基金重点项目(40432005)、河南省自然科学基金项目(0511031400)、国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB410810)和中国科学院知识创新项目(KSCX2 - YW - G053, CXTD - Z2005 - 4)联合资助

† 通讯作者, E-mail: ymluo@issas.ac.cn

作者简介:刘世亮(1970—),男,河南信阳人,博士,副教授,主要从事土壤污染生物修复与土壤化学研究。E-mail: shlliu70@163.com

收稿日期:2009 - 04 - 10;收到修改稿日期:2009 - 09 - 30

1　材料与方法

1.1　供试材料

1.1.1　土壤　　供试土壤采自江苏常熟中国科学院南京土壤研究所常熟农业生态实验站表土(0~20 cm),为河湖相沉积发育的潜育水耕土(俗名乌栅水稻土)。土壤风干后,过 2 mm 尼龙筛,室温存放。其理化性质如下:有机质 36.3 g kg^{-1},全氮 2.25 g kg^{-1},全磷(P_2O_5) 0.75 g kg^{-1},全钾(K_2O) 17.4 g kg^{-1},游离 $Fe_2O_3$16.25 g kg^{-1},阳离子交换量 21.6 cmol kg^{-1},pH(H_2O)7.8,并含痕量的 $CaCO_3$。土壤 B[a]P 含量为 0.043 mg kg^{-1}。

1.1.2　供试试剂　　菲(Phenanthrene,PHE)纯度 >97%,为德国 Fluka 公司产品;苯并[a]芘(Benzo[a]Pyrene,B[a]P)纯度≥97%,为美国 Sigma 公司产品;邻苯二甲酸(Phthalic acid,分析纯)。

实验过程中所用有机试剂乙腈和环己环为美国 Sigma 公司产品,为色谱纯级;二氯甲烷、正己环为分析纯试剂,使用前均经过二次蒸馏以保证其纯度。

1.1.3　供试真菌菌株　　实验用微生物为实验室从石油污染土壤(由江苏扬子石化长期受原油污染区采得)中分离出,并经液体培养证明能降解多环芳烃,经鉴定微生物种类分别为青霉菌、黑曲霉、白腐真菌。分离的菌种鉴定过程如下:

首先按照常规的真菌稀释平板计数分离法对石油污染土壤中的微生物进行分离,将平板上生长旺盛的丝状真菌进行纯化,最后挑到含有低浓度 PAHs 的马丁氏培养基平板上进行生长,在含有 PAHs 培养基上能正常生长的菌种说明它们能分解 PAHs。然后对这些菌种从菌落形状、菌丝形态、菌丝结构、孢子形状、孢子类型及孢子颜色等形态性状和丝状真菌的生理性状等对真菌进行分类和鉴定,初步鉴定结果为青霉菌、黑曲霉、白腐真菌。

1.2　实验设计

1.2.1　真菌培养　　取盛有 100 ml 经 121℃高温灭菌的马丁氏液体培养基的 250 ml 三角瓶 20 个,青霉菌、黑曲霉、白腐真菌各接种 4 瓶,25℃下摇床培养,待真菌在三角瓶中形成菌团后备用。另外 8 瓶为不接菌的备用马丁氏液体培养基。

1.2.2　实验方案与土壤接菌　　取 20 个 500 ml 三角瓶,每个瓶内装 60 g 过 2 mm 的供试水稻土。然后取盛有土壤的 16 个瓶子于高温灭菌锅内在 121℃高温灭菌 40 min 后待用,另有 4 个盛土的瓶子不灭菌。然后按每 kg 风干土壤加入 50 mg B[a]P 的量,在无菌室里以无菌操作向土壤中加入溶于丙酮的 B[a]P 溶液,同时按表 1 的设计加入共存底物,振荡混匀。

待丙酮完全挥发后按表 1 加入培养好的微生物菌种,其中 1~4 号三角瓶接入青霉菌,5~8 号三角瓶接入黑曲霉,9~12 号三角瓶接入白腐真菌,13~16 号三角瓶为不接菌灭菌土壤,17~20 号三角瓶为不接菌不灭菌土壤。不接种菌的处理,同样加入相同量的真菌培养基。具体实验方案见表 1。

待真菌在 250 ml 三角瓶中形成菌团,在无菌条件下将其倒入盛供试土壤的 500 ml 三角瓶中,振荡混匀形成泥浆并于恒温 25℃下进行培养,此时刻记为零时(即试验开始),在培养的第 0,7,14,21,28,35 d 用移液管吸取泥浆样品取样。

本文选择菲及邻苯二甲酸加入量主要在参考前人研究基础上进行。巩宗强等[7]研究表明,菲浓度为 150 mg kg^{-1}及邻苯二甲酸浓度为 300 mg kg^{-1}时促进了部分真菌对 B[a]P 的共代谢降解。

1.3　样品处理及分析测定方法

1.3.1　土壤样品采集与处理　　泥浆样品放入玻璃离心管中,以 4 000 r min^{-1}的速度离心 5~10 min。以往的实验证明液相中多环芳烃含量很少,可以忽略不计[11],故该实验只进行离心后土壤样品的分析。离心后的土壤样品放于黑暗处进行自然风干,干燥后的土样研磨过 1 mm 筛,放入冰箱内(4℃)备用。

1.3.2　土壤样品 B[a]P 分析测定　　参照文献[12]的测定方法。先称取 1.0 g 土壤样品,置于 50 ml 带盖玻璃离心管中,加入 10 ml 二氯甲烷萃取液,将其置于超声水浴锅(KQ5200)中连续超声提取 2 h,在提取过程中保证水温不超过 40℃以防止二氯甲烷挥发(每 0.5 h 换 1 次水)。超声提取后,于离心机中以 3 500 r min^{-1}离心 5 min。吸上清液 5 ml 于茄形瓶中,在 40℃温度下于旋转蒸发器中旋转浓缩至干,向茄形瓶中加入 2 ml 环己烷溶液溶解瓶中物质。

称 1.0 g 于 300℃下处理 2 h 的干燥硅胶于小烧杯中,加 10 ml 正己烷浸泡 15 min,然后装硅胶柱。由茄形瓶中吸 0.5 ml 溶解的环己烷溶液进行过柱,并用 1∶1 正己烷和二氯甲烷混合液洗脱,用刻度试管先接 1 ml 洗脱液弃去,然后接 2 ml 洗脱液于刻度试管中,用高纯氮气吹干。最后向刻度试管中

加 2 ml 乙腈溶解,在高效液色谱仪上测定。

高效液相色谱(HPLC)操作条件:岛津高效液相色谱仪(LC-10ATvp SHIMADZU),荧光检测器(RF-10AXL),C18 烷基硅胶反相色谱柱,柱温 30℃,流动相为乙腈/水(体积比) = 90/10,流速 0.5 ml min^{-1},进样量 20 μl,检测波长:290 nm。

表 1 实验设计方案

Table 1 Designing of the experiment

实验序号 No.	引入的真菌种类 Strains of fungi	共存底物 Co-substrates	共存底物加入量 Inoculation rate(mg kg^{-1})
1	青霉菌 *Penicillium*	—	—
2	青霉菌 *Penicillium*	菲 Phenanthrene	100
3	青霉菌 *Penicillium*	菲 Phenanthrene	200
4	青霉菌 *Penicillium*	邻苯二甲酸 Phthalic acid	300
5	黑曲霉 *Aspergillus niger*	—	—
6	黑曲霉 *Aspergillus niger*	菲 Phenanthrene	100
7	黑曲霉 *Aspergillus niger*	菲 Phenanthrene	200
8	黑曲霉 *Aspergillus niger*	邻苯二甲酸 Phthalic acid	300
9	白腐真菌 White-rot fungus	—	—
10	白腐真菌 White-rot fungus	菲 Phenanthrene	100
11	白腐真菌 White-rot fungus	菲 Phenanthrene	200
12	白腐真菌 White-rot fungus	邻苯二甲酸 phthalic acid	300
13	灭菌土壤 Sterilized soil	—	—
14	灭菌土壤 Sterilized soil	菲 Phenanthrene	100
15	灭菌土壤 Sterilized soil	菲 Phenanthrene	200
16	灭菌土壤 Sterilized soil	邻苯二甲酸 Phthalic acid	300
17	不灭菌土壤 Not sterilized soil	—	—
18	不灭菌土壤 Not sterilized soil	菲 Phenanthrene	100
19	不灭菌土壤 Not sterilized soil	菲 Phenanthrene	200
20	不灭菌土壤 Not sterilized soil	邻苯二甲酸 Phthalic acid	300

1.4 方法回收率试验

称取 5.0 g 土壤置于 25 ml 玻璃离心管中,加入配制好的 B[a]P 丙酮溶液,同时进行本底空白试验,重复 4 次。将上述样品置于暗处,待有机溶剂挥发至干后进行样品的提取,B[a]P 的回收率参照文献[12]的方法测定。

2 结果与分析

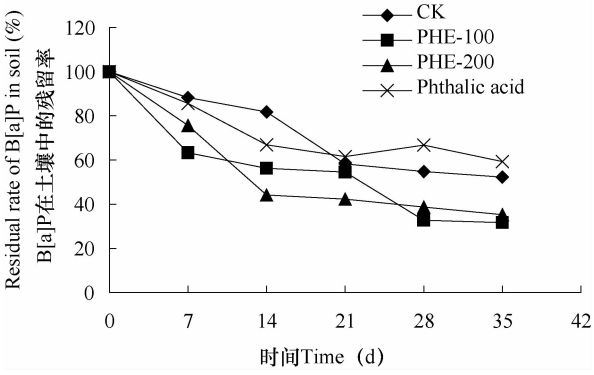
2.1 方法回收率

为了评价方法的准确度,选用了试验用土壤,按上述方法测定土壤本底以及加入 B[a]P 丙酮溶液后土壤中 B[a]P 的含量。方法回收率实验结果表明,土壤样品 B[a]P 的回收率为 86.90(±2.92)%,所以此方法适合 B[a]P 测定的要求。

2.2 B[a]P 在未灭菌土壤中的共代谢降解

土壤中存在数以亿计的不同种类的微生物,而且不同微生物种类对不同的环境条件胁迫有着不同的适应能力,对于土壤中受到 B[a]P 及菲这类多环芳烃污染物的胁迫时也不例外。由图 1 可见,自然土壤(未灭菌土壤)中 B[a]P 含量下降较快,残留率较低,可能有较强的降解能力。实验结束时不加共代谢底物的对照处理中 B[a]P 的下降率(由 100% 减去残留率% 所得)达 47.8%,其中在实验前 14 d 为 18.3%,后 21 d 内为 29.5%,这可能是由于自然土壤中的微生物对外来 B[a]P 的胁迫需要一段时间的驯化,一些微生物对 B[a]P 的胁迫适应以后才会更有效地去除土壤中的 B[a]P。同时可以看出,当同样的土壤环境中存在生物可利用或降解性较高的菲时,土壤中 B[a]P 含量减少更快,残留率进一步降低,降解能力提高。35 d 时菲浓度为

100 mg kg^{-1}、200 mg kg^{-1}处理的土壤中 B[a]P 下降率分别达到 68.4% 和 64.8%,明显地高于对照(单加 B[a]P)处理的下降率,说明对自然土壤而言微生物共代谢降解是一种重要的生物修复途径,菲是 B[a]P 生物降解修复的有效共代谢底物。但邻苯二甲酸的处理在 35 d 时 B[a]P 的降解率只有 40.8%,可能是由于高浓度的邻苯二甲酸(300 mg kg^{-1})抑制了微生物数量及活性。



注:CK:无 B[a]P 共代谢底物;PHE-100:B[a]P 共代谢底物菲浓度为 100 mg kg^{-1};PHE-200:B[a]P 共代谢底物菲浓度为 200 mg kg^{-1};Phthalic acid:B[a]P 共代谢底物为邻苯二甲酸。下同. Note: CK: no B[a]P co-metabolic substrate; PHE-100: B[a]P co-metabolic substrate is 100 mg kg^{-1} phenanthrene; PHE-200: B[a]P co-metabolic substrate is 200 mg kg^{-1} phenanthrene; phthalic acid: B[a]P co-metabolic substrate is phthalic acid. The same below

图 1　B[a]P 在未灭菌水稻土壤中的共代谢降解

Fig. 1　Co-metabolic degradation of B[a]P in an unsterilized paddy soil

2.3　B[a]P 在灭菌土壤中的共代谢降解

从图 2 中可见,土壤经灭菌以后土壤中的 B[a]P几乎没有减少,减少量显著地低于非灭菌土壤(图 1)。同时,共存低分子量多环芳烃菲及邻苯二甲酸对在土壤中 B[a]P 的残留量也没有显著影响($p>0.05$),这进一步证明微生物在降解 B[a]P 中所起到的作用。可见,土壤中多环芳烃以及其他高分子有机污染物主要是在微生物的作用下减少的,没有微生物的参与,短期内很难在土壤中转化。

2.4　青霉菌对土壤中 B[a]P 的共代谢降解

从图 3 可以看出青霉菌对水稻土中 B[a]P 有降解能力,经过 35 d 的作用,有 15.4% 的 B[a]P 被降解。当向土壤加入菲作为初级底物时,B[a]P 的降解率明显提高,在 35 d 时菲浓度为 100 mg kg^{-1} 和 200 mg kg^{-1}的 B[a]P 的降解率分别为 55.4% 和 42.4%。对于共代谢底物菲浓度为 100 mg kg^{-1}时,在试验前 21 d B[a]P 的降解率为 39.5%,而后 14 d 中为 15.9%。据测定,菲在前 21 d 内降解率已达 80%,因此实验后期只有较少的菲降解。这说明在实验前期,青霉菌同时参与了菲和 B[a]P 两种 PAHs 的降解[7],但主要是利用三环的菲作为生长基质,而对 B[a]P 的利用较少,但在后期,因为菲大幅度减少,以及菲所诱导产物的降解酶更有助于 B[a]P 的降解转化,所以对 B[a]P 的利用率增大。这也说明当菲和 B[a]P 共存时,在初始阶段青霉菌先降解生物易降解的菲,并从中获取了降解 B[a]P 的能量[13],因而提高了 B[a]P 的降解率。而对于菲 200 mg kg^{-1}处理中,B[a]P 的降解速率在整个实验期间均比较平稳,与菲 100 mg kg^{-1}处理不同,不存在后期降解较快的现象,其主要原因为较高浓度的菲抑制了青霉菌的生长。由图 3 还可以看出,与对照比较,邻苯二甲酸的加入对 B[a]P 的降解影响很小,说明邻苯二甲酸不是供试水稻土中 B[a]P 的有效的共代谢降解底物,可能是由于本研究设置邻苯二甲酸浓度过高(300 mg kg^{-1})所引起的,但具体原因有待进一步研究才能揭示。

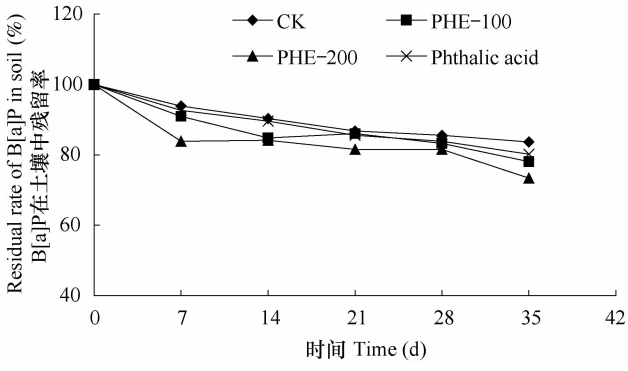


图 2　在灭菌水稻土壤中 B[a]P 的共代谢降解

Fig. 2　Co-metabolic degradation of B[a]P in a sterilized paddy soil

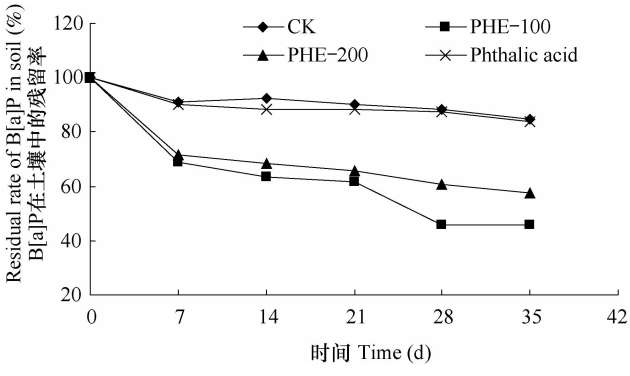


图 3　青霉菌对水稻土中 B[a]P 的降解

Fig. 3　Effect of *Penicillium* on B[a]P degradation in a paddy soil

2.5 黑曲霉对土壤中 B[a]P 的共代谢降解

黑曲霉对 B[a]P 有较强的降解能力(图 4)。与青霉菌不同,经过 35 d 的培养试验,没有共代谢底物存在的对照处理中 B[a]P 的降解率可达 73.4%。然而,当土壤中有菲和邻苯二甲酸作为共存底物时,B[a]P 的降解均受到了抑制。经 35 d 的培养,菲 100 mg kg^{-1}、菲 200 mg kg^{-1}、邻苯二甲酸 300 mg kg^{-1}三个处理中 B[a]P 降解率明显地低于没有共代谢底物存在的对照处理。从降解格局上来看,与青霉菌一样,黑曲霉对 B[a]P 的降解有时段性,前 21 d 的降解率达 70% 左右,而后 14 d 的仅为 4%。当菲作为共存底物时,B[a]P 的降解率较低,菲浓度为 100 mg kg^{-1}及 200 mg kg^{-1}时 B[a]P 的最后降解率分别为 31.9%、29.4%。邻苯二甲酸作为共存底物时 B[a]P 的最后降解率为 25.5%,说明当环境中存在高浓度的菲和邻苯二甲酸时,黑曲霉的生长受到抑制,从而减弱土壤中 B[a]P 的降解。

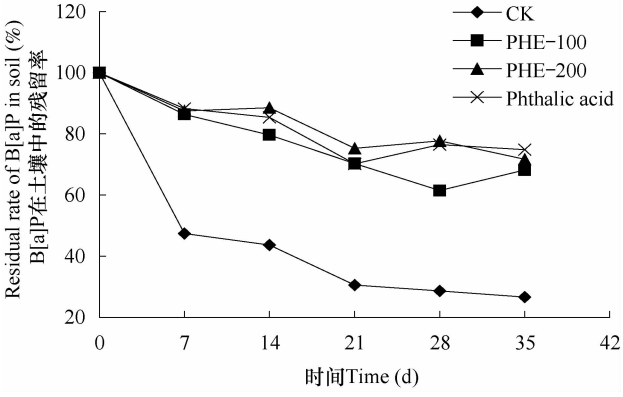


图 4 黑曲霉对水稻土中 B[a]P 的降解

Fig. 4 Effect of *Aspergillus niger* on B[a]P degradation in a paddy soil

2.6 白腐真菌对土壤中 B[a]P 的共代谢降解

白腐真菌对 B[a]P 有降解能力(图 5)。经过 35 d 的试验,对照处理内 B[a]P 的降解率达 51.4%,但在试验的前 14 d 降解率只有 12.5%,说明白腐真菌对 B[a]P 的降解需要一个驯化适应阶段;当菲与 B[a]P 共存时,与黑曲霉的情况不同,土壤中 B[a]P 的降解率在不同菲浓度间有较大差异,菲浓度为 100 mg kg^{-1}土壤中 B[a]P 的最终降解率达 61.2%,前 21 d 内仅为 22.8%,说明白腐真菌在生长前期主要是利用菲作为碳源和能源,而后期利用 B[a]P 作为代谢底物才提高白腐真菌对 B[a]P 的降解能力,同时也说明菲是白腐真菌降解 B[a]P 的有效共代谢底物。但是有高浓度菲(200 mg kg^{-1})存在时,土壤中 B[a]P 的降解率明显地低于其他三个处理,并且随时间变化不大,这可能是由于高浓度菲对白腐真菌产生毒害或此时白腐真菌降解的主要是菲而不是 B[a]P,高浓度菲限制了 B[a]P 的降解。当 300 mg kg^{-1}邻苯二甲酸与 B[a]P 共处时,B[a]P 的最终降解率为 37.9%,明显地高于菲 200 mg kg^{-1}的处理,但又显著地低于对照的处理和低浓度菲的处理,邻苯二甲酸不是白腐真菌在水稻土中降解 B[a]P 时的最佳共代谢底物。

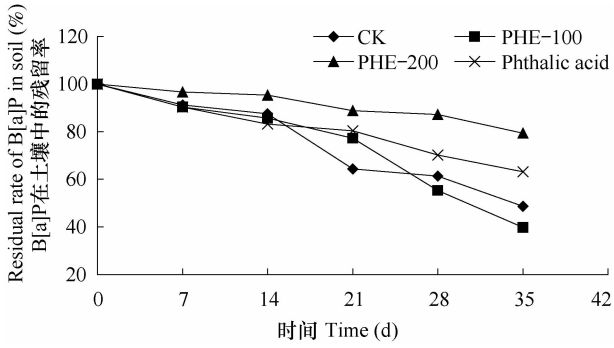


图 5 白腐真菌对水稻土中 B[a]P 的降解

Fig. 5 Effect of white-rot fungus on B[a]P degradation in a paddy soil

3 讨 论

Carolyn 和 Olli[13] 研究了堆肥对土壤中菲与荧蒽的降解,表明土著微生物对外加的 PAHs 有较强的降解能力,并表明微生物对高分子量 PAHs 的降解主要是通过共代谢降解进行的,在实验的初始阶段微生物有一段时间的适应驯化期。Kanaly 等[14] 也曾报道过其他底物对土壤中 B[a]P 的降解的促进和抑制作用,他们认为用土壤微生物是不能单独处理 B[a]P 的。当将 B[a]P 和原油混合处理时,B[a]P 有 40% 被矿化,但是加入原油以后 B[a]P 仍有 14 d 的滞后降解阶段。经过进一步实验他们认为原油中不仅包含能加速 B[a]P 矿化降解的初级底物,同时包含了竞争性抑制因子。Bauer 和 Capone[15] 报道了将含蒽泥浆预暴露于苯或蒽可以促进蒽的矿化,预暴露于萘提高了菲的初始降解,但未影响蒽的降解。他认为将沉积物暴露于某种多环芳烃能增加微生物降解这种多环芳烃甚至其他多环芳烃的能力。他提出,由于某些多环芳烃及其代谢产物结构相似,能降解某些多环芳烃的微生物内可能存在着功能类似的加氧酶系或降解途径。

Hwang 和 Cutright[16] 进行了菲对经老化处理及新鲜加入芘在土壤中的共代谢降解试验,发现当两者单独处理时,二者的降解率无论在新鲜土还是在经老化处理土壤中的降解率均稍低于二者共存的环境中,说明二者在微生物的降解过程中是相辅相成的。巩宗强等[7] 研究表明,B[a]P 进入土壤用菲预处理后,B[a]P 在泥浆中的降解未出现滞后阶段,降解率也明显提高。用蒽对土壤进行预处理后,B[a]P 的降解未受到明显影响,且蒽自身的降解也很缓慢。

本研究表明,B[a]P 在土壤中的减少主要是在土壤微生物的作用下进行的,土壤经过高温灭菌后,土壤中 B[a]P 的降解率显著地低于不灭菌土,而不论共代谢底物是否存在,其降解趋势相似。同时可以看出,有共代谢底物低环 PAHs 菲存在时,明显增加了 B[a]P 的降解(见图 1 和图 2)。

而从石油污染土壤中分离出来的三种株菌:青霉菌、黑曲菌和白腐真菌对土壤中 B[a]P 的代谢以及 B[a]P 在简单有机物存在下的共代谢情况不尽相同。

青霉菌在土壤中添加低浓度的菲有助于 B[a]P 的降解(图 3)。且当菲和 B[a]P 共存时,在初始阶段青霉菌先降解生物易降解的菲,并从中获取了降解 B[a]P 的能量,因而提高了 B[a]P 的降解率,但是较高浓度的菲抑制了真菌的生长。这与前述中 Hwang 和 Cutright[16] 的研究结果相一致。

黑曲霉菌对土壤中添加的 B[a]P 降解能力很强,在水稻土的降解率达到 74.4%,但向土壤中加入低分子量有机物菲或邻苯二甲酸时不同程度地降低了 B[a]P 在土壤中的降解率。这种添加简单有机物抑制高分子量 PAHs 降解的报道也曾有过。如 Yuan 等[11] 研究表明,PAHs 共代谢降解不仅受到温度、pH、PAHs 浓度的影响,同时不同简单有机碳源和能源均能影响微生物对其中 PAHs 的降解率。其中添加的醋酸盐、丙酮酸酯以及酵母浸膏对其降解不产生影响;而加入简单化合物如氨基酸和硫酸盐等与微生物密切相关的营养物质能显著地提高 PAHs 的降解率;低分子量 PAHs 菲的存在能显著地提高蒽、荧蒽、芘以及苯并[a]芘的降解。同样出现了加入部分简单有机物对高分子量 PAHs 出现抑制的现象[17,18]。William 和 Michael[19] 研究了对菲有降解能力的假单孢菌对萘、甲基萘以及芴的竞争性共代谢降解。结果表明,这种能以菲作为唯一碳源和能源的细菌,同样能以萘和甲基萘作为唯一碳源和能源进行生物降解。但不能以芴以及茚满作为碳源和能源对其进行降解;可是在与萘共存在的时候,细菌能正常生长,并能显著地降解芴和茚满。

白腐真菌对 PAHs 具有很强的降解能力[20-23],同时研究者认为,白腐真菌在对高分子量 PAHs 降解时需要低分子量 PAHs 做为共代谢底物。本研究表明,白腐真菌与水稻土中 B[a]P 与菲(浓度为 100 mg kg^{-1} 处理)有较好的共代谢关系。

4 结　论

太湖地区乌栅水稻土对 B[a]P 有自然降解能力,即自然土壤中的土著微生物在起作用。低分子量的 PAHs 菲能促进自然土壤中 B[a]P 的降解,100 mg kg^{-1} 浓度菲处理的效果较 200 mg kg^{-1} 的好,邻苯二甲酸对自然土壤中的 B[a]P 降解没有显著影响。

由三种真菌对土壤中 B[a]P 的共代谢降解格局可以看出,三种真菌代表了对 B[a]P 降解的三种不同类型:青霉菌对 B[a]P 的降解能力较弱,但当环境中存在简单有机物时,降解能力显著提高;黑曲霉对 B[a]P 的降解能力很强,但当环境中存在简单有机物时,反而抑制了黑曲霉对 B[a]P 的降解;白腐真菌对 B[a]P 有较强的降解能力,但对简单有机物的依赖性介于青霉菌和黑曲霉之间。低分子量 PAHs 菲在低浓度时是白腐真菌降解 B[a]P 的有效共代谢底物,但高浓度菲抑制了 B[a]P 的降解。且发现邻苯二甲酸不是白腐真菌在水稻土中降解 B[a]P 时的最佳共代谢底物。

参 考 文 献

[1] Keith L H, Telliard W A. Priority pollutants I. A perspective view. Environmental Science and Technology, 1979, 13: 416—423

[2] Heitkamp M A, Cerriglia C E. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55: 1 968—1 973

[3] Ingeborg D B, Richard B. Structure biodegradability relationship of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1986, 37: 490—495

[4] 王晓蓉编著. 环境化学. 南京:南京大学出版社, 1997. Wang X R. Environmental Chemistry (In Chinese). Nanjing: Nanjing University Press, 1997

[5] Field J A, Jong E D, Costa G F, et al. Biodegradation of PAH by new isolates of white rot fungi. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(7): 2 219—2 226

[6] Charlotte K, Gejlsbjerg B, Ekelund F, et al. Effects of sludge-amendment on mineralization of pyrene and microorganisms in sludge and soil. Chemosphere, 2001, 45: 625—634

[7] 巩宗强, 李培军, 王新, 等. 真菌对土壤中苯并[a]芘的共代谢降解. 环境科学研究, 2001, 14(6): 36—39. Gong Z Q, Li P J, Wang X, et a1. Cometabolic degradation of benzo[a]pyrene in the soil by the introduced fungi (In Chinese). Research of Environment Sciences, 2001, 14(6): 36—39

[8] 李培军, 许华夏, 张春桂, 等. 污染土壤中苯并[a]芘的微生物降解. 环境污染治理技术与设备, 2001, 2(5): 37—40. Li P J, Xu H X, Zhang C G, et al. The degradation of B[a]P by microorganism in contaminated soil (In Chinese). Techniques and Equipment for Environmental pollution Control, 2001, 2(5): 37—40

[9] Cristina R M, Monica L S, Cecilia C M, et al. Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. Environmental Pollution, 2002, 117: 159—163

[10] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 等. 利用改进的生物反应器研究不同通气条件下土壤中菲的降解. 土壤学报, 2004, 41(1): 245—251. Ding K Q, Luo Y M, Liu S L, et al. Degradation of phenanthrene in soil at different aeration rates using modified biological reactor (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(1): 245—251

[11] Yuan S Y, Chang J S, Yen J H, et al. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. Chemosphere, 2001, 43: 273—278

[12] 宋玉芳, 区自清, 孙铁珩, 等. 土壤、植物样品中的多环芳烃(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, et al. Analytical method of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil and plant samples (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 1995, 6(1): 92—96

[13] Carolyn J C, Olli H T. Mineralization of phenanthrene and fluoranthene in yard waste compost. Environmental Pollution, 2003, 124: 81—91

[14] Kanaly R A, Bartha R. Co-metabolic mineralization of benzo[a]pyrene caused by hydrocarbon additions to soil. Environmental Toxicology Chemistry, 1999, 18(10): 2 186—2 190

[15] Bauer J E, Capone D G. Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on the degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments slurries. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(7): 1 649—1 655

[16] Hwang S, Cutright T J. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. Chemosphere, 2002, 47: 891—899

[17] Yuan S Y, Wei S H, Chang B V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. Chemosphere, 2000, 41: 1 463—1 468

[18] Deborah D R, Joanna M, Cerniglia C E. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 41: 1—7

[19] William T S, Michael D A. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalene, and fluroene by phenanthrene-degrading pseudomonads. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(1): 357—362

[20] Anderson B E, Welinder L, Olsson P A, et al. Growth of inoculated white-rot fungi and their interactions with the bacterial community in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, as measured by phospholipids fatty acids. Bioresource Technology, 2000, 73: 29—36

[21] Zheng Z G, Obbard J P. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 3—9

[22] Zheng Z G, Obbard J P. Removal of surfactant solubilized polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* in a rotation biological contactor reactor. Journal of Biotechnology, 2002, 96: 241—249

[23] Canet R, Birnstingl J G, Malcolm D G, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native micro flora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. Bioresource Technology, 2001, 76: 113—117

EFFECTS OF FUNGI ON CO-METABOLIC DEGRADATION OF BENZO[a]PYRENE IN PADDY SOIL

Liu Shiliang[1,2] Luo Yongming[2,3†] Wu Longhua[2] Cao Zhihong[2,3]

(1 *College of Resources and Environment*, *Henan Agricultural University*, *Zhengzhou* 450002, *China*)

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

(3 *Graduate University of the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract Simulated bioslurry remediation of PAHs contaminated soil was carried out. Three strains of fungi isolated from petroleum-contaminated soils were inoculated into paddy soils different in application rate of phenanthrene and phthalic acid, to investigate their effects of co-metabolic degradation of B[a]P therein. Results show that in natural soils, some native microorganisms were able to degrade B[a]P and addition of low molecular weight PAHs-phenanthrene increased, degradation rate of B[a]P in the soil. The effect was greater when the application rate of phenanthrene was

100 mg kg^{-1} than when it was 200 mg kg^{-1}. But the addition of phthalic acid did not show much effect. In sterilized soils, degradation of B[a]P in soils was hardly observed. However, inoculation of *Penicillium* stimulated degradation of B[a]P in all the three treatments, i. e. phenanthrene at 100 mg kg^{-1}, phenanthrene at 200 mg kg^{-} and phthalic acid, but only in the treatment of phenanthrene at 100 mg kg^{-1} the effect was significant. Inoculation of *Aspergillus niger* also showed similar effect, which, however, was inhibited by the presence of phenanthrene and phthalic acid in the soil. White-rot fungus could effectively degrade B[a]P, but high concentration of phenanthrene inhibited its effect in the soils, and phthalic acid was neither an optimal co-substrates of white-rot fungus in degrading B[a]P in paddy soils.

Key words　PAHs; Co-metabolic degradation; Benzo[a]pyrene; Fungus