

接种白腐菌堆肥修复五氯酚污染的土壤

蒋晓云, 曾光明*, 黄丹莲, 陈洋, 陈鑫, 黄国和

(湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082)

摘要: 采用 4 组堆肥装置 A、B、C、D, 分别往五氯酚污染土壤中加入外来菌、加入固定化黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、加入游离黄孢原毛平革菌及暴露在空气中不做任何处理。对其进行对比研究, 探讨了利用堆肥的方法对五氯酚污染土壤进行生物修复的可行性。结果说明, 添加黄孢原毛平革菌进行堆肥修复其效果要好于不加菌的效果, 经过 60d 的堆肥, PCP 基本得到降解, 降解率都达到了 94% 以上, 其中固定化菌又优于游离菌, 固定化菌在第 9d 对 PCP 的降解率就达到了 50%。此外, 通过分析种子发芽率、有机质、微生物量碳等多项指标可以看出各组堆肥的腐熟情况都比较理想, 为黄孢原毛平革菌降解五氯酚的过程提供了良好的外部环境, 使土壤修复与堆肥能较好地结合起来。

关键词: 白腐菌; 五氯酚; 土壤修复; 堆肥; 固定化

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)12-2553-05

Remediation of Pentachlorophenol-Contaminated Soil by Composting with Inoculation of White Rot Fungi

JIANG Xiao-yun, ZENG Guang-ming, HUANG Dan-lian, CHEN Yang, CHEN Xin, HUANG Guo-he

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: In the experiment four parallel beakers A, B, C, D were adopted, among which A was without any inoculum, B was added with the inocula of immobilized *Phanerochaete chrysosporium*, C was inoculated with non-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*, and D was only with pentachlorophenol (PCP)-contaminated soils open to air. By contrastive analyses, the feasibility of applying composting to the bioremediation of the PCP-contaminated soil was discussed. It can be seen from the experimental results that composting with inocula was better than that without inoculation and after 60d composting, more than 94% PCP in the compost was degraded; meanwhile the effect by immobilized fungi was better than that by non-immobilized one. From the experimental data it shows that the PCP degradation achieved 50% on 9d by immobilized fungi. What's more, shown by indicators of germination index, volatile solids, microbial carbon activity and other factors, the compost were mature and of no hazard to plant at the end, which provided the benign environment for the *Phanerochaete chrysosporium* to degrade the PCP so that the bioremediation and composting could be combined together.

Key words: white rot fungi; pentachlorophenol (PCP); soil remediation; composting; immobilization

五氯酚(pentachlorophenol, PCP)经常用作杀虫剂、木材防腐剂、消毒剂等,使得大面积的土壤以及湖泊水体的沉积物遭到污染,同时它又是具有致畸、致癌、致突变毒性的“三致”污染物,因此一直倍受关注^[1,2]。对于这一类的有机污染物质的处理,目前生物修复因其成本低效率高而得到广泛应用,其中堆肥处理作为生物修复技术的一种新型可选技术,不仅可以处理有毒有害物质,还可以实现固体有机废物的无害化、资源化,同时堆肥产品又为农家提供了优质的有机肥料,所以堆肥处理具有环境保护和经济效益的双重意义^[3]。白腐真菌这种担子菌类由于其独特的胞外酶系统及降解污染物的非专一性、彻底性、广谱性及适于固液 2 种基质等特点被广泛应用于诸如五氯酚的有机污染物质的处理中^[4]。

近年来国内外针对五氯酚的降解做了大量研究,但以往研究主要集中于微生物如何降低五氯酚

的生物有效性从而降低其危害^[5,6]。对于接种固定化外源微生物堆制处理五氯酚污染土壤及其堆制时各种参数变化的系统研究较少。因此本研究通过接种固定化和游离白腐真菌采用堆肥对五氯酚污染的土壤进行了修复并探讨了堆制中各腐熟度参数的变化情况。

1 材料与方法

1.1 土壤堆料的准备

本研究的实验原料主要以土壤和城市垃圾的混

收稿日期: 2005-10-26; 修订日期: 2006-02-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2004AA644020); 国家杰出青年科学基金项目(50225926, 50425927); 教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划项目; 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20020532017)

作者简介: 蒋晓云(1978~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物技术、固体废物资源化等。

* 通讯联系人, zgming@hnu.cn

合物为基质. 其中土壤取自长沙市岳麓山; 城市生活垃圾取自长沙市岳麓区, 主要为厨余垃圾以及木屑、稻草和麸皮. 土壤经风干后过 2mm 筛, 稻草经风干后切断成 10~20mm. 调节堆样的含水率至 60%, C/N 约为 30:1, 这利于堆肥化的进行. 在各土壤堆料中加入五氯酚溶液, 模拟五氯酚污染的土壤并避光静置过夜以充分吸附. 其中加入的五氯酚 (PCP) 购于美国 ALD 公司, 为色谱纯.

1.2 孢子悬浮液及固定化菌的制备

实验选用的菌种为白腐真菌的典型菌种黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium* BKMF-1767), 购自武汉大学中国典型培养物中心. 4℃斜面保存的菌种转入 39℃培养箱, 生长 4~5d. 无菌条件下接种于含 15mL 固体生长培养基的培养皿, 39℃平板扩增. 6~8d 后将孢子无菌地转入灭菌蒸馏水中, 轻轻振荡, 使其充分分散, 制备成乳白色的孢子悬浮液, 其透光度约为 60% ($2 \times 10^6 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$), 并于 4℃下保存.

将以上菌体细胞 ($2 \times 10^6 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 加入到溶解好的海藻酸钠载体溶液 (质量分数为 3%) 中, 经过充分搅拌后制成均匀的混合液, 然后用玻璃注射器逐滴滴入成型剂 0.2 mol/L CaCl_2 溶液, 经过搅拌钙化一段时间 (18h), 形成直径为 2~2.5mm 均匀的固定化细胞珠体, 用无菌水冲洗多次后滤干, 置于 4℃冰箱中贮存、备用^[7].

1.3 实验方法

为了进行对比研究, 实验设置了 4 种不同的情况, 见表 1. 其中 A 组不接菌, B 组接种固定化黄孢原毛平革菌, C 组接种游离黄孢原毛平革菌, D 组只是向土壤中加入等量的五氯酚后静置暴露于空气中, 观察土壤在几乎没有微生物活动的情况下, 五氯酚含量的变化情况, 与 A 组一起作为对比. 堆制时间为 60d, 实验条件: 保持 30℃恒温, 定时强制通风供氧. 实验装置如图 1.

表 1 堆制系统各原料及用量

Table 1 Materials and concentrations in composting

序号	堆料	菌种	接入量 / $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	PCP 浓度 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
A	土壤, 厨余, 稻草, 麸皮, 木屑	无	0	100
B	土壤, 厨余, 稻草, 麸皮, 木屑	固定化黄孢菌	0.15	100
C	土壤, 厨余, 稻草, 麸皮, 木屑	游离黄孢菌	0.15	100
D	土壤	无	0	100

1.4 分析方法

在堆制前 30d, pH、含水率、有机质、总碳、总氮、

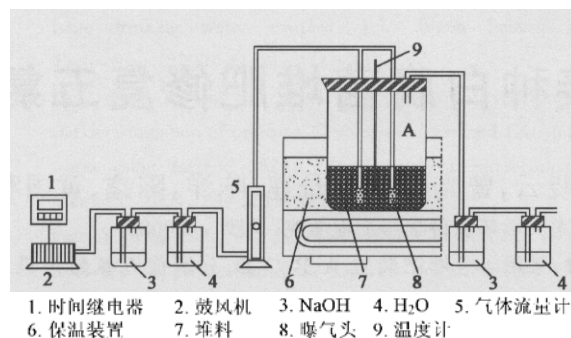


图 1 A 组反应器实验装置 (B, C 同 A)

Fig. 1 Schematic diagram of experimental apparatus A

(B and C are the same with A)

微生物量碳和五氯酚降解率均为每 3d 测 1 次, 发芽指数则每 6d 测 1 次. 堆肥时间共 60d, 于第 42、60d 再取样测定以上所有参数. 所有分析取样均采集 3 个平行样.

新鲜堆样用去离子水按水土比 1:10 (以干样重计) 浸提 1h 后, 用 Orion PHS-3C pH 计测定浸提液的 pH 值. 有机质采用灼烧减重法测定^[8]. 总氮检测采用的是凯氏定氮法 (buechi distillation unit B-324). 含水率、总碳等指标按常规方法分析.

种子发芽指数^[9]: 将取得的新鲜样品与水按 1:2 的比例混合振荡 1h, 上清液过滤后待用. 在洁净无菌的 9cm 培养皿中铺上滤纸, 在滤纸上均匀放置 20 颗水堇种子. 准确吸取 5mL 滤液于培养皿中, 25℃下于暗处培养 24h. 计算公式为: 发芽指数 = (样品发芽率 × 根长) / (空白发芽率 × 根长).

微生物量碳采用的是熏蒸提取法^[10,11], 土样经过熏蒸后其中大部分的微生物细胞被熏蒸杀死分解, 其细胞溶解将会释放出可溶性有机碳, 因此可以通过计算土壤在熏蒸和未熏蒸 2 种情况下产生的可浸提性有机碳的差值 E_C , 进而换算出土壤微生物量碳 $C_{MIC} = E_C / K_{EC}$ ($K_{EC} = 0.45$).

五氯酚的提取和分析采用改良的藏红 T 分光光度法^[12]. 取土样加 200mL 蒸馏水和 1mL 12 mol/L H_2SO_4 进行蒸馏, 收集馏出液, 取馏出液 100mL 至分液漏斗中, 加入藏红 T-硼酸盐缓冲液 5mL 显色, 再加入乙酸异戊酯 10mL 于分液漏斗进行萃取, 弃去水相, 加入无水硫酸钠, 置暗处 30min, 弃去最初流出的萃取液后, 直接放入 20mm 的比色皿中, 于 535nm 波长处测量乙酸异戊酯萃取液的吸光度. 根据绘制的吸光度, 对照五氯酚含量的校准曲线, 即可求得样品中五氯酚的含量.

2 结果与讨论

本研究主要的目的是讨论固定化和游离黄孢原毛平革菌对五氯酚降解效果及堆制中各种参数的变化,希望在经过近 2 个月的堆制后,堆料达到腐熟和稳定并基本消除 PCP 的毒害.由于几乎所有参数在作为腐熟标准时,都存在一些不足之处,因此采用多种分析方法测定多个指标,然后根据这些指标综合分析堆肥的腐熟状况,以此反映采用堆制法来修复污染土壤能否顺利进行.

2.1 一般物理化学指标

2.1.1 有机质(挥发性固体, VS)

有机质代表着堆肥中可被微生物利用的总能量,如过高和过低,都将不利于堆肥化的正常进行^[13].在适宜的条件下,堆肥初期的有机质含量比较高,微生物可以利用的能量很多,从而使堆体温度上升,随着微生物对有机质的消耗,其含量下降,因而抑制了微生物的活动,进而使堆料温度下降.由图 2 可看出,VS 随堆肥化的进行而逐渐下降.通常情况下,有机质经堆腐后都会降解 30% 以上,腐熟后其含量应低于 65%,A、B、C 都达到这一水平,同时 A 反应器中的 VS 要低于 B 和 C,这可能是由于 A 中的微生物活性比 B 和 C 的低.

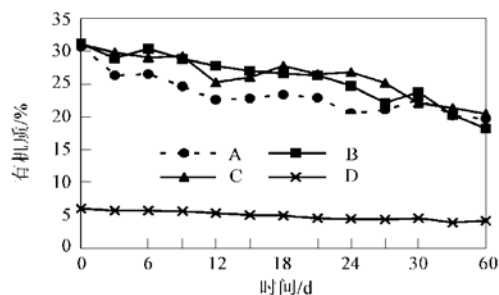


图 2 有机质含量变化曲线

Fig. 2 Change of VS content

2.1.2 pH

真菌活动的最佳 pH 值为 5.5~8.0,好氧堆肥适宜温度一般在 6~9 之间,且腐熟的堆肥一般呈弱碱性,pH 值在 8~9 左右.本实验中的 pH 都在 6~8 之间,因此无需调整.从图 3 可以看出在堆肥初期,pH 值略有下降,这可能是由于堆肥物产生了有机酸,它有利于微生物生存繁殖,随后 pH 逐渐上升,这可能是由于有氨气等碱性物质产生.

2.1.3 碳氮比(C/N)

碳和氮的变化是堆肥的基本特征之一.C/N 是

最常用的评价堆肥腐熟度的参数.堆肥初期的 C/N 值一般在 25~30 比较合适,有利于微生物的正常生长繁殖和有机物的快速降解.随着堆肥的进行,C/N 值呈减小的趋势,当 C/N 值减少到 20 以下时,认为堆肥基本上达到腐熟^[14],而 Morel 等^[15]认为 C/N 小于 20 只是堆肥腐熟的必要条件,建议采用: $T = \frac{\text{终点 C/N}}{\text{初始 C/N}}$ 评价腐熟度.认为当 T 值小于 0.6 时堆肥达到腐熟.从图 4 可以看出 3 组堆料碳氮比都达到了 20 以下, T 值小于 0.6 的标准,表明都已经基本腐熟.

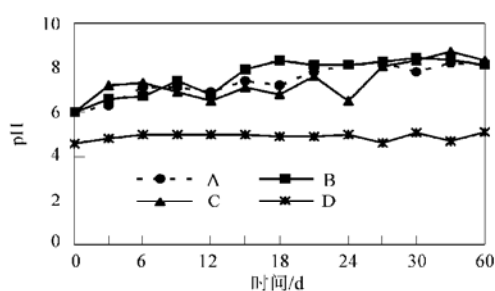


图 3 pH 值变化曲线

Fig. 3 Change of pH

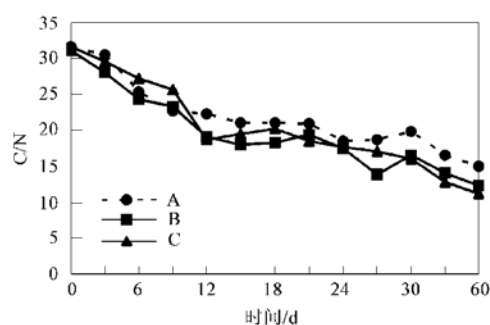


图 4 碳氮比变化曲线

Fig. 4 Change of C/N

2.2 生物学指标

堆肥过程是一个生物过程,堆料中微生物的活性变化及堆肥对植物生长的影响可用以评价堆肥腐熟度,常用的指标主要有种子发芽率、生物活性等.

种子发芽指数是最能直接反映堆肥生物毒性的参数之一^[16].未腐熟的堆肥含有植物毒性物质,对植物的生长产生抑制作用,同时五氯酚浓度越高,对植物的生长产生的抑制作用也会越强.因此,可用堆肥和土壤混合物中植物的生长状况来评价堆料的生物毒害性和腐熟度.有报道^[17]认为当发芽指数 GI 大于 80% 时可认为堆肥腐熟,已基本消除植物毒

性^[18,19].从图5中可以看出,A、B、C、D都呈上升趋势,并在12d左右,A、B、C的GI都大于80%,说明堆料基本进入腐熟,植物毒性物质的抑制作用也减小,这应该与PCP的降解有关,因为黄孢原毛平革菌能有效地降解PCP,在降解过程中生成无害的中间物质,并且土壤中的PCP及其中间产物五氯苯甲醚(PCA)都能很容易地矿化^[20].

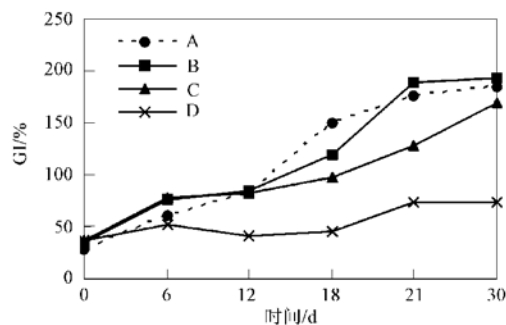


图5 种子发芽指数变化曲线
Fig. 5 Change of germination index

微生物量碳能间接反映微生物的活性(图6).A、B、C在堆肥初期出现了一个比较高的峰,表明堆肥初期微生物量增长迅速,此外B与C出峰的时间存在一个差值,C比B要晚一些,这可能是由于固定化技术的应用使得B中的微生物的活性强于C中的微生物.到了堆肥中期出现了第2个稍小的峰,表明微生物量在堆肥中期出现了增长的现象,但由于中期的碳源等营养源已被消耗一部分,进而抑制了微生物的活动,形成了稍小的峰.堆肥后期,微生物量碳均处于下降状态,这可能是由于微生物可利用的碳源已基本耗尽.

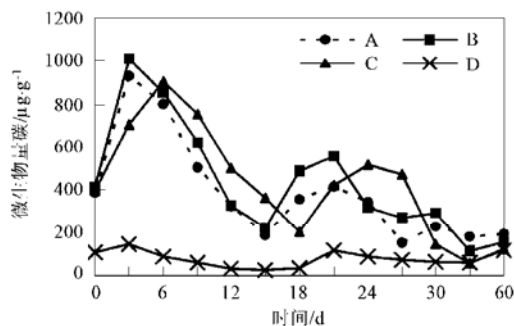


图6 微生物量碳变化曲线
Fig. 6 Change of microbial biomass carbon

2.3 五氯酚降解情况

从图7可以看出B中五氯酚的降解速率最快,表明固定化有利于黄孢原毛平革菌对五氯酚的降

解,这是因为采用的固定化载体能较好地保护菌体,减轻了高负荷的污染物的冲击,能更好地保持微生物活性;相比之下,C中游离态的黄孢原毛平革菌也起到了不错的降解效果,但降解周期晚于固定化菌;A反映的是在没有接外来菌种条件下五氯酚的降解情况,表明土壤中的土著微生物也具有一定的降解五氯酚的能力,虽然在初期A的降解效果比C稍好,但其整体的降解效果比接种了黄孢原毛平革菌的B和C都要差;此外,D中的PCP也有一定程度的降低,这是因为它直接暴露在空气中,发生了光降解^[21].

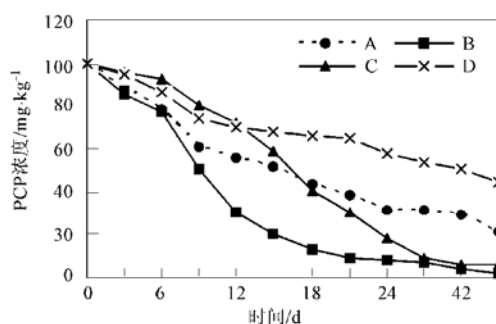


图7 五氯酚含量变化曲线
Fig. 7 Degradation of PCP

3 结论

(1) 用堆肥来进行五氯酚污染土壤进行修复是可行的;添加黄孢原毛平革菌能加速五氯酚的降解,且固定化菌的效果好于游离菌.

(2) 本实验中经过60d的堆制,各项腐熟度指标均达到了腐熟的标准,基本消除了对植物的毒害作用,因此采用堆制法来修复污染土壤具有一定的可行性.

参考文献:

- [1] Valerie B, Louise D, Rejean S. A simple method to evaluate the concentration of pentachlorophenol degraders in contaminated soils[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, **184**: 261~ 264.
- [2] Diana C, Javier B, Araceli T. Pentachlorophenol tolerance and removal by *Rhizopus nigricans* in solid-state culture [J]. Process Biochemistry, 2002, **37**: 881~ 884.
- [3] 田霖,杨凤林,柳丽芬,等.堆肥技术处理有机污染土壤的研究进展[J].环境污染治理技术与设备,2002, **3**(12): 31~ 37.
- [4] 蒋晓云,曾光明,黄国和,等.白腐菌的研究进展及其在重金属修复中的展望[J].中国生物工程杂志,2005, **25**(增刊): 118~ 121.
- [5] Monika W, Kirsty S H, Boyd W, et al. Laboratory trials on the bioremediation of aged pentachlorophenol residues [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2005, **55**: 121~ 130.

- [6] Marja T, Merja L, Pekka O, *et al.* Mineralization and conversion of pentachlorophenol (PCP) in soil inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor* [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31**: 65~ 74.
- [7] Arica M Y, Kacar Y, Oemer G. Entrapment of white rot fungi *Trametes versicolor* in Caralginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution[J]. *Bioresource Technology*, 2000, **80**: 122.
- [8] Huang D L, Zeng G M, Hu T J, *et al.* Preliminary study on the application of *Phanerochaete Chrysosporium* in composting of lignin waste. [A]. *Proceedings of EnerEnv' 2003 Conference* [C]. China: Changsha, 2003. 907~ 912.
- [9] Ahtiainen J, Valo R, Jakrvinen M, *et al.* Microbial Toxicity Tests and Chemical Analysis as Monitoring Parameters at Composting of Creosote-Contaminated Soil[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002, **53**: 323~ 329.
- [10] Vance E D, Brooks P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, **19**(6): 703~ 707.
- [11] Anderson T H, Joergensen R G. Relationship between SIR and FE estimates of microbial biomass C in deciduous forest soils at different pH [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1997, **29**: 1033~ 1042.
- [12] 吴坤, 徐淑霞, 陈红歌, 等. 土壤中五氯酚的测定及其生物降解研究[J]. *河南农业科学*, 2003, **5**: 30~ 33.
- [13] William H S, Margolis Z P, Janonis B A. High altitude sludge composting [J]. *Biocycle*, 1992, **8**: 68~ 71.
- [14] Garcia C, Costa H F, Ayuso M. Evaluation of the maturity of municipal waste compost using simple chemical parameters[J]. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.*, 1992, **23**(13-14): 1501~ 1512.
- [15] Morel T L, Colin F, Germon J. Methods for the evaluation of the maturity of municipal refuse compost [J]. *Composting of Agricultural and Other Wastes*, 1985, 56~ 72.
- [16] Mathur S P, Dinel H, Owen G, *et al.* Determination of compost maturity. Optical density of water extracts of compost as a reflection of their maturity[J]. *Biol. Agr. Hort.*, 1993, **10**: 65~ 108.
- [17] Zucconi F, Forte M, Monaco A, *et al.* Biological evaluation of compost maturity[J]. *Biocycle*, 1981, **22**: 27~ 29.
- [18] Tiquia S M, Tam N F. Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge [J]. *Bioresource Technology*, 1998, **65**: 43~ 49.
- [19] Wang W J, Dalal R C, Moody P W, *et al.* Relationships of soil respiration to microbial biomass, substrate availability and clay content[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, **35**: 273~ 284.
- [20] Namhyun C, Steven D A. Degradation of pentachlorophenol in soil by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 1995, **41**: 177~ 183.
- [21] Paola P, Pierre P, Chantal G. Phototransformations of solid pentachlorophenol [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1998, **119**: 137~ 142.