

水稻土泥浆体系中多氯联苯的微生物厌氧脱氯*

杨 凯 姚笑颜 陈 晨 沈超峰** 秦智慧 黄荣浪

(浙江大学环境与资源学院环境保护研究所, 杭州 310058)

摘 要 考察了厌氧水稻土泥浆体系中高氯代多氯联苯混合物 Aroclor1260 的脱氯过程, 并对体系中的微生物群落结构变化进行分析. 结果表明: Aroclor1260 可在厌氧水稻土泥浆体系中发生脱氯, 经过 128 d, 总消减率达到 55.5%, 在泥浆体系中引入驯化的脱氯富集培养体反而使脱氯效果下降, 消减率为 46.9%. Aroclor1260 的主要脱氯过程发生在五、六、七氯联苯, 其中七氯联苯脱氯过程最显著, 五氯联苯作为脱氯产物有一定累积. 有机物厌氧发酵产生的 H_2 会被脱氯过程所消耗, 从而将体系中的氢分压维持在较低水平, 抑制产甲烷过程而保证脱氯过程的持续进行. 不同条件和培养方式驯化得到的微生物群落结构差异较大, 富集培养体引入可能导致其与原体系中脱氯相关菌群竞争, 从而改变体系原有菌群结构, 这可能是导致其脱氯效率下降的原因.

关键词 厌氧脱氯; 脱氯富集培养体; 电子供体; 变性梯度凝胶电泳; 微生物群落结构

文章编号 1001-9332(2015)10-3083-08 **中图分类号** X53 **文献标识码** A

Microbial anaerobic dechlorination of polychlorinated biphenyls in paddy soil slurry. YANG Kai, YAO Xiao-yan, CHEN Chen, SHEN Chao-feng, QIN Zhi-hui, HUANG Rong-lang (¹*Institute of Environmental Science and Technology, College of Environmental and Resource Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2015, 26(10): 3083–3090.

Abstract: We studied the dechlorination process of Aroclor1260, a high-chlorinated polychlorinated biphenyls (PCBs) mixture in an anaerobic paddy soil slurry, and further analyzed the related microbial community structures. The Aroclor1260 was reduced up to 55.5% in the natural paddy soil slurry in 128 days, and the reduction percentage dropped to 46.9% after inoculating the paddy soil slurry with a PCBs-dechlorination enrichment culture. The dechlorination mainly occurred in congeners of pentachlorobiphenyl, hexachlorobiphenyl, and specially, the heptachlorobiphenyl, with pentachlorobiphenyl accumulated as dechlorination intermediate. Hydrogen gas produced from fermentation of organic matters was maintained at a lower partial pressure due to its consumption during the dechlorination process, so that the methanogens was suppressed as well. The microbial community structure was significantly different between natural and inoculated paddy soils. Introducing the PCBs-dechlorination enrichment culture changed the local microbial community by the competition between the exogenous dechlorinators and the indigenous bacteria, overall decreasing the dechlorination activity.

Key words: anaerobic dechlorination; dechlorination enrichment culture; electron donor; DGGE; microbial community structure.

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)指联苯上的氢分别被 1~10 个氯原子于不同位点取代而形成的一类氯代芳香烃化合物, 由于其取代氯原子数量和位点的不同, 共多达 209 种同系物^[1]. 由于其

良好的抗热性、化学惰性、不易燃性、高介电常数等优点, 曾广泛应用于工业生产领域^[2]. 由于被发现具有明显的生物毒性和三致效应^[3], 到 20 世纪 80 年代初为止已在全球范围内被陆续禁止使用, 1995 年被列入《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》^[4] 首批控制污染物名单. 然而由于其环境持留性和迁移性, 目前仍是全球范围的有机污染物之一. 浙江省台州市部分地区由于对含多氯联苯电容器、变

* 国家自然科学基金项目(41271334, 21477110)和浙江省自然科学基金杰出青年基金项目(LR12D01001)资助.

** 通讯作者. E-mail: ysxzt@zju.edu.cn

2014-12-03 收稿, 2015-06-29 接受.

压器的不当处置导致 PCBs 污染严重.对该地区拆解点周边土壤的调查发现,其 PCBs 浓度高达非拆解区对照样品的数倍至数十倍^[5-6].环境中的 PCBs 通过不同途径汇入土壤,当其浓度累积至一定水平,对农作物的生长和农田生态系统均会产生较严重的影响^[7].此外,PCBs 还会通过食物链富集等途径进入人体,带来不同程度的健康风险.因此对于风险较高的 PCBs 污染土壤需要进行修复.

PCBs 污染土壤的修复技术主要包括生物修复和物理、化学等非生物修复两类.相比非生物修复方法,生物修复具有运行成本低、基本无二次污染等优点,具有广阔的应用前景,受到广泛的关注和研究^[8-10].但生物修复往往效率低、时间长,同时受外部因素影响大,因此多数生物修复技术仍处于试验室研究阶段.探索复杂土壤环境体系中 PCBs 生物降解的机理,通过不同手段提高 PCBs 污染土壤生物修复效率是当前的研究热点.研究表明,PCBs 中氯原子数<5 的低氯代同系物可有效地进行好氧降解,而氯原子数>4 的高氯代同系物则一般需要经过脱氯转化为低氯代后方可进行降解^[11],因此微生物厌氧脱氯-好氧降解的交替处理是对 PCBs 进行彻底矿化的有效途径.

我国是全球最大的稻米生产国^[12],面积广大的水稻土具有特殊的淹水-落干耕作制度,存在周期性的还原-氧化动态交替过程^[13].与其他类型土壤相比,明显的氧化还原条件差异可以满足高氯代 PCBs 同系物由厌氧脱氯至好氧降解的完全生物降解途径的微生物生境需求^[13],周期性的还原-氧化动态交替可在不同时期诱导与 PCBs 降解相关的厌氧或兼性厌氧、好氧微生物成为优势菌群^[14],推动 PCBs 微生物降解过程的持续进行.对典型高氯代同系物 PCB153 和低氯代同系物 PCB31 在水稻土淹水或落干处理下的降解过程研究表明,落干或休耕状态下的水稻土环境利于低氯代 PCBs 同系物的降解,而淹水状态下的水稻土环境有利于高氯代 PCBs 同系物的脱氯^[15].同时研究表明,台州地区实际污染土壤在序批式淹水-落干耕种模式下可在 180 d 的时间内降解 40%以上的 PCBs,降解量高出落干耕种模式 1 倍有余^[16].因此研究水稻土作为 PCBs 天然生物降解反应器具有实际意义.PCBs 的厌氧脱氯过程往往比较缓慢,但水稻土中高氯代 PCBs 等氯代有机物的自然脱氯现象已有一定的调查研究.早在 1988 年,已有研究者发现在水稻土淹水条件下存在厌氧或兼性厌氧微生物加速了六六六的降解,并呈

现出先还原脱氯再氧化脱 HCl 的现象^[17].对我国长江三角洲典型污染农田土壤的调查显示,某污染区水田中的高氯代 PCBs 残留率明显低于旱田和菜地,可能是被其中的厌氧微生物脱氯还原^[18].缺乏持续有效的电子供体可能是 PCBs 微生物厌氧脱氯速率比较缓慢的原因之一^[19].水稻土中的复杂有机物在淹水还原的厌氧环境中矿化可产生氢气、小分子有机酸等物质,可能被作为 PCBs 还原脱氯过程的电子供体.水稻土淹水条件下 PCBs 的厌氧脱氯机制尚需进一步的研究和明确.

由于 PCBs 厌氧脱氯菌的纯化分离较为困难,许多研究者从具有脱氯功能的富集培养体入手对其进行研究,而将富集培养体应用于实际的土壤 PCBs 修复则尚需进一步的研究和优化.本研究通过泥浆体系模拟水稻土淹水条件下的 PCBs 厌氧脱氯过程,考察厌氧环境下水稻土泥浆体系中典型高氯代 PCBs 混合物 Aroclor1260 的脱氯效果及脱氯富集培养体的添加对脱氯过程的影响,并对试验过程体系中的微生物群落变化进行初步分析,研究水稻土泥浆体系中 PCBs 的厌氧脱氯现象,为淹水条件下 PCBs 的厌氧脱氯机制研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土壤采自浙江省台州市水稻田,土壤类型为粉质粘土,PCBs 含量 $1.09\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,基本理化性质见表 1.将供试土壤自然风干约 24 h 后过 20 目筛待用.

1.2 试验设计

将风干后过筛的供试土壤约 250 g 加入自制的泥浆反应器中,如图 1 所示,添加约 70 g 有机肥(有机质含量 25.1%)和 600 mL 水.设置处理组如下:1)自然处理组(A):添加 10 mL 浓度约 $1000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Aroclor1260 母液;2)添加菌液组(B):添加 10 mL 的 Aroclor1260 母液和 70 mL 驯化的 PCBs 脱氯富集培养体(以浙江省台州市典型 PCBs 污染土壤为富集源,添加 Aroclor1260 进行批次驯化培养,平均

表 1 供试土壤基本性质
Table 1 Basic properties of test soil

PCBs 含量 PCBs concentration	pH	有机质含量 Organic matter content	砂粒 Sand	粉粒 Silt	粘粒 Clay
$1.09\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	5.91	8.5%	23.1%	47.4%	29.5%

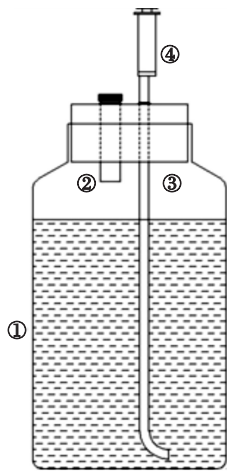


图1 水稻土泥浆反应器示意图
Fig.1 Sketch of paddy slurry reactor.
① 棕色广口瓶 Brown jar (1000 mL); ② 微电极通道 Channel for micro-sensors; ③ 取样管 Sampling tube; ④ 注射器 Syringe.

2 个月进行一次传代,本研究采用第 3 代富集培养体,已检测其中 Aroclor1260 有明显消减现象);3) 灭菌对照组(CK):添加 10 mL 浓度约 1000 mg · L⁻¹ 的 Aroclor1260 母液,供试土壤和有机肥于 121 ℃ 连续湿热灭菌 3 次(每次间隔约 24 h);4) 自然对照组(MCK):不添加 Aroclor1260 母液.试验体系中 Aroclor1260 的添加方法为先在模拟反应器内添加 Aroclor1260 母液,待溶剂挥干后再添加土壤等其他介质,排除灭菌过程的影响.调节体系 pH 至 7.0 左右,将装置密封后于 30 ℃ 120 r · min⁻¹ 恒温振荡进行试验.试验共进行 128 d,分别于第 0、44、73、105、128 天采集泥浆样品.

1.3 分析方法

PCBs 分析方法:土壤样品经冷冻干燥 48 h 后,称取 3 g 于玻璃离心管内,加入回收率指示物十氯联苯(PCB209),平衡过夜.采用丙酮-正己烷提取液(体积比 1 : 1)30、20、20 mL 分 3 次超声提取 15 min 后,收集提取液于旋转蒸发仪上(34 ℃,320 mbar)浓缩,用 1 mL 浓硫酸磺化后,将有机相通过 Florisil 层析柱净化,并用 30 mL 丙酮-正己烷洗脱液(体积比 1 : 9)洗脱层析柱,收集提取液和洗脱液,在旋转蒸发仪上(37 ℃,280 mbar)浓缩,样品用正己烷定容至 10 mL.采用 Agilent 7890A-5975C 气质联用仪测定样品浓度,色谱条件:进样口温度 270 ℃,载气高纯氮气,不分流进样,柱箱温度 80 ℃,升温程序为始温 50 ℃ 保持 2 min,20 ℃ · min⁻¹ 升至 200 ℃ 保持 2 min,5 ℃ · min⁻¹ 升至 290 ℃ 保持 15 min;质谱离子源为电子轰击源(EI),电子能量 70 eV,离子源温

度 230 ℃,四极杆质量分析器温度 150 ℃,检测模式为全扫描模式(SCAN 模式)与选择离子模式(SIM 模式).PCBs 消减率=(试验后 PCBs 残留量-试验前 PCBs 残留量)/试验前 PCBs 残留量×100%.

氯离子含量测定方法:采用离子色谱法^[20]测定泥浆体系上清液中的氯离子含量.

H₂ 含量测定方法:采用 Unisense 穿刺氢电极(Unisense A/S Inc., DK)测定,微电极使用前极化 12 h 以使信号值接近 0 点,用无氧水和一定浓度氢标准溶液两点定标,由 Sensor Trace 软件(Unisense A/S Inc., DK)自动记录标线及测定,将氢电极直接伸入泥浆体系中测定 H₂ 含量.

微生物群落分析方法:采用 PowerSoil DNA Isolation Kit(MoBio Laboratories Inc., USA)提取土样微生物总 DNA,以 16S rRNA 基因通用引物对 F357-GC 和 R518 进行 PCR 扩增,对 PCR 扩增产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分离,8% 聚丙烯酰胺凝胶,变性剂浓度为 30%~50%,在 60 ℃,160 V 下电泳 6 h,所得图像用 Quantity One 4.6.2 软件(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)处理,计算戴斯系数和 Shannon 指数,割胶回收部分特异性条带,PCR 扩增后进行克隆测序,在 NCBI 数据库中使用 BLAST 比对工具寻找与所得克隆高度相似的序列,得到种属信息.

1.4 数据统计

数据采用 Microsoft Office Excel 2013(Microsoft Inc., USA)、SPSS 20.0(SPSS Inc., USA)、Origin 8.0(OriginLab Inc., USA)进行处理和统计分析.平均值采用独立样本 *T* 或 ANOVA 进行差异显著性分析.

2 结果与分析

2.1 水稻土泥浆体系中 Aroclor1260 总量的变化
不同处理下 Aroclor1260 的总量变化如图 2 所示,试验前后不同处理下水稻土泥浆体系中 Aroclor1260 的总量均有所消减.试验开始时 Aroclor1260 总量为 41.03 mg · kg⁻¹,经过 128 d 的试验过程,自然处理组(A)下降至 18.24 mg · kg⁻¹,消减率为 55.5%,添加菌液组(B)下降至 21.79 mg · kg⁻¹,消减率为 46.9%.脱氯富集培养体的引入未对 Aroclor1260 的消减产生促进作用,反而使其总消减率有一定的降低.

灭菌对照组(CK)中的 Aroclor1260 残留量在 128 d 的试验后下降至 30.62 mg · kg⁻¹,消减率为 25.4%.试验初期,其中的 Aroclor1260 总量发生消减

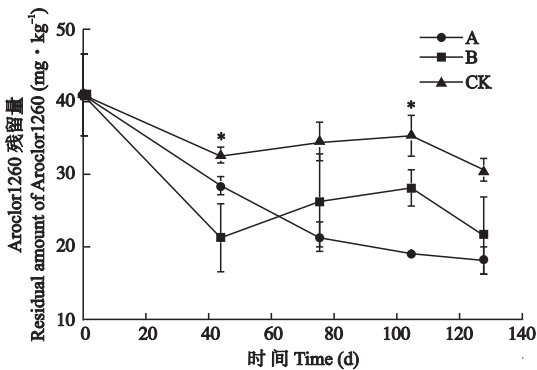


图2 不同处理下水稻土泥浆体系中 Aroclor1260 的总量变化

Fig.2 Variations of total Aroclor1260 in paddy soil slurry under different treatments.

* $P<0.05$. 下同 The same below.

可能是由于灭菌不彻底导致部分菌群复苏或吸附、挥发等非生物原因造成.因此在 44 d 时向灭菌对照组添加 NaN_3 (终浓度 0.2%) 加强抑菌作用.试验过程中,自然处理组 (A) 和添加菌液组 (B) 的 Aroclor1260 总量显著低于灭菌对照组 (CK),证实试验过程中 Aroclor1260 的主要消减来自于微生物作用.

2.2 水稻土泥浆体系中各氯代 PCBs 同系物的变化

不同处理下水稻土泥浆体系中各氯代 PCBs 同系物的变化如图 3 所示.Aroclor1260 中的主要 PCBs 同系物集中在五、六、七氯联苯,其初始含量分别为

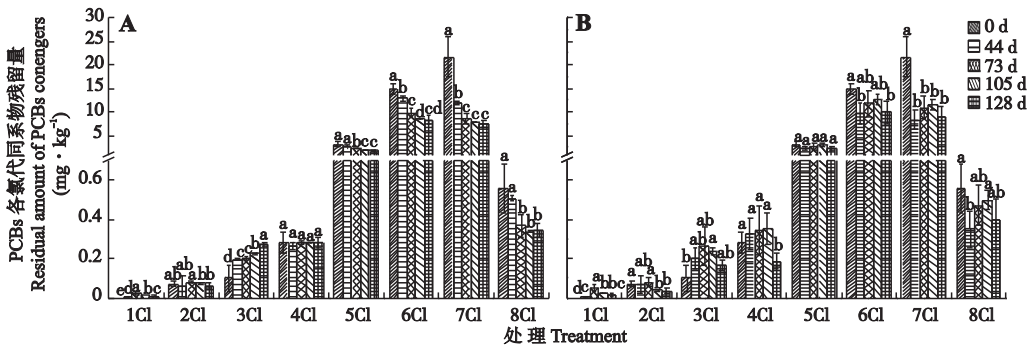


图3 不同处理下水稻土泥浆体系中各氯代 PCBs 同系物的变化

Fig.3 Variations of concentrations of PCBs congeners in paddy soil slurry under different treatments.

不同字母表示不同时期差异显著 ($P<0.05$) Different letters meant significant difference among times at 0.05 level.

表2 不同处理下水稻土泥浆体系中五、六、七氯联苯的总消减情况

Table 2 Total reduction of Penta-, Hexa-, Hepta-PCBs in paddy soil under different treatments

处理 Treat- ment	五氯联苯 Pentachlorobiphenyl		六氯联苯 Hexachlorobiphenyl		七氯联苯 Heptachlorobiphenyl	
	总消减量 Reduction amount	总消减率 Reduction rate	总消减量 Reduction amount	总消减率 Reduction rate	总消减量 Reduction amount	总消减率 Reduction rate
	($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	(%)	($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	(%)	($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	(%)
A	1.45	46.0	6.61	44.4	14.06	64.9
B	0.92	29.2	5.02	33.7	12.79	59.0

7.7%、36.6%和 53.2%,五、六、七氯联苯的总消减情况如表 2 所示.图 3 显示,不同处理下 5~8 氯代 PCBs 含量在试验过程中总体呈现下降趋势,与 Aroclor1260 总量的变化趋势基本相同,1~4 氯代 PCBs 含量较低,且有一定的累积趋势,可以证实脱氯活动的发生.表 2 显示,自然处理组 (A) 中不同氯代 PCBs 的消减高于添加菌液组 (B),且不同处理下消减量大小关系均为七氯联苯>六氯联苯>五氯联苯.

2.3 水稻土泥浆体系中氯离子含量的变化

测定试验前后不同处理下水稻土泥浆体系上清液中的氯离子含量,结果如图 4 所示.试验开始时自然处理组 (A) 中的氯离子含量为 $704.94 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,添加菌液组 (B) 中的氯离子含量则达到 $1094.86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.脱氯富集培养体在驯化过程中所用的培养基中含有大量氯盐^[21],试验开始时一次性添加使体系中的氯离子含量显著高于自然处理组 (A).128 d 时不同处理下水稻土泥浆体系上清液中的氯离子含量均有显著升高,证实脱氯过程的发生.自然处理组 (A) 中的氯离子含量升高了 $85.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,与试验开始时相比升高 12.2%,添加菌液组 (B) 中氯离子含量升高了 $67.63 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,与试验开始时相比升高 6.2%.自然处理组 (A) 中氯离子含量的升高高于添加菌液组 (B),结果与不同处理下 Aroclor1260 的脱氯效果相符,进一步证明脱氯富集培养体的引入使

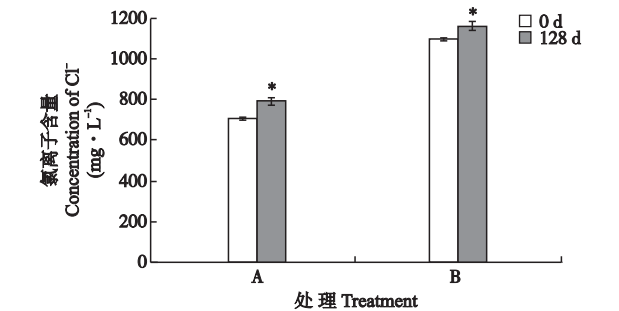


图 4 不同处理下水稻土泥浆体系上清液中的氯离子含量变化

Fig.4 Variations of Cl⁻ concentrations in supernatant of paddy soil slurry under different treatments.

* *P*<0.05.

体系的脱氯效果下降.

2.4 水稻土泥浆体系中 H₂ 含量的变化

不同处理下水稻土泥浆体系中 H₂ 的含量变化如图 5 所示.本研 究所得到的 H₂ 含量为水稻土泥浆体系中的 H₂ 净产量,即 H₂ 净产量=矿化过程产生的 H₂ 量-厌氧环境下被消耗的 H₂ 量.试验前期水稻土泥浆体系中的 H₂ 净产量随时间的延长而增加,试验中后期逐渐降低并开始趋于平缓.在整体的试验过程中,自然处理组(A)中的 H₂ 净产量始终低于自然对照组(MCK).

2.5 水稻土泥浆体系中微生物群落结构变化

不同处理下水稻土泥浆体系中微生物的总 DNA 以 16S rRNA 基因通用引物对进行 PCR 扩增后的 DGGE 图谱如图 6 所示.图 6 显示,自然处理组(A)与添加菌液组(B)之间的微生物群落结构差别较大.自然处理组(A)各时间点样品的条带组成较为相似,而条带亮度逐渐加深,说明试验过程诱导了与脱氯过程相关的微生物群落产生并逐渐趋于稳定.添加菌液组(B)的微生物群落组成变化较大,可能和外来菌与土著菌间的竞争有关.

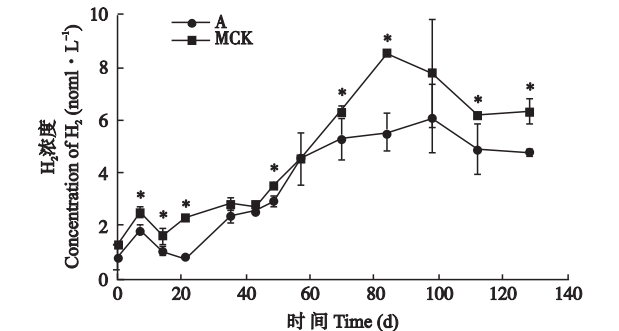


图 5 不同处理下水稻土泥浆体系中的 H₂ 含量变化

Fig.5 Variations of H₂ concentrations in paddy soil slurry under different treatments.

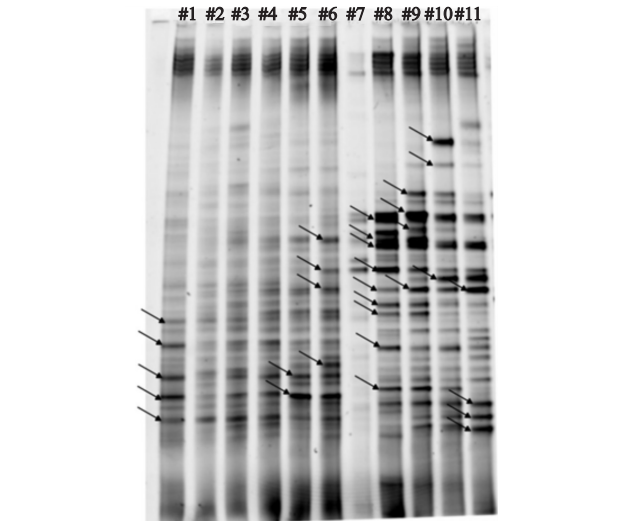


图 6 不同处理下水稻土泥浆体系中总细菌 DGGE 图谱

Fig.6 DGGE profiles of 16S rRNA fragments amplified from DNA extracted from soil bacteria community in paddy soil slurry under different treatments.

#1: 原始水稻土样品 The original paddy soil sample; #2~#6: 自然处理组第 15、44、73、105、128 天样品 Samples of natural treatment on 15, 44, 73, 105, 128 d; #7~#11: 添加菌液组第 15、44、73、105、128 天样品 Samples of adding-bacteria treatment on 15, 44, 73, 105, 128 d.

采用 Quantity One 4.6.2 对 DGGE 图谱进行分析,计算戴斯系数(Dice coefficient)分析各条带间的相似性,相似性矩阵如表 3 所示.相似性矩阵的最高及次高值分别为#5 和#6 的 83.4%及#10 和#11 的 76.6%,分别代表自然处理组(A)和添加菌液组(B) 105 d 和 128 d 样品的相似性,说明不同处理下水稻土泥浆体系中的微生物群落结构在试验后期均趋于稳定.15、44、73、105、128 d 时,自然处理组(A)和添加菌液组(B)的相似性分别为 57.0%、62.3%、51.6%、63.3%和 61.0%,相似性较低,两组处理间的微生物群落结构相差较大.

计算 Shannon 指数代表微生物群落结构多样性,结果如表 4 所示.表 4 显示,不同处理组的 Shannon 指数随试验时间的延长而呈现升高的趋势.添加菌液组(B)在 15 d 时 Shannon 指数为 2.85,低于其他样品,是由于引入脱氯富集培养体使体系中的脱氯菌在一段时间内占据优势,此时的微生物群落多样性较低.随后,驯化的脱氯菌在与土著菌的竞争逐渐丧失优势,而土壤中的微生物群落结构较为复杂,因此其中的微生物群落结构多样性升高.随着脱氯活动的发生,自然处理组(A)中逐渐出现与脱氯相关的菌群,因此其 Shannon 指数也有一定的升高趋势.

将特异性条带割胶回收后克隆测序,选择的特

表 3 不同处理下水稻土泥浆体系中总细菌 DGGE 图谱相似性矩阵
Table 3 Similarity matrix of DGGE band patterns under different treatments (%)

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11
#1	100										
#2	76.1	100									
#3	65.4	69.4	100								
#4	65.2	68.7	52.8	100							
#5	63.2	63.1	68.2	61.7	100						
#6	66.9	70.2	75.4	60.7	83.4	100					
#7	56.3	57.0	61.1	46.2	56.0	60.0	100				
#8	56.8	57.1	62.3	52.7	60.1	66.8	59.2	100			
#9	54.3	62.3	64.5	51.6	60.3	64.3	70.5	62.7	100		
#10	52.1	57.7	70.3	43.6	63.3	63.6	62.4	57.6	68.1	100	
#11	52.8	59.0	65.2	45.9	58.3	61.0	54.5	53.2	59.3	76.6	100

#1: 原始水稻土样品 The original paddy soil sample; #2~#6: 自然处理组第 15、44、73、105、128 天样品 Samples of natural treatment on 15, 44, 73, 105, 128 d; #7~#11: 添加菌液组第 15、44、73、105、128 天样品 Samples of adding-bacteria treatment on 15, 44, 73, 105, 128 d.

表 4 不同处理下水稻土泥浆体系中总细菌 DGGE 图谱 Shannon 指数
Table 4 Shannon index of DGGE band patterns under different treatments

处理 Treatment	0 d	15 d	44 d	73 d	105 d	128 d
A	3.01	3.07	3.37	3.29	3.17	3.31
B		2.85	3.14	3.12	3.20	3.17

异性条带如图 6 所示.在回收测序的条带中,变形菌门(Proteobacteria)共有 12 条,占总克隆数的 44.4%,所占比例最大,其次为厚壁菌门(Firmicutes)(8 条,25.9%)和拟杆菌门(Bacteroidetes)(3 条,11.1%),另外还包括酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和绿菌门(Chlorobi)各 1 条.

3 讨 论

试验结果表明,厌氧环境下典型高氯代 PCBs 混合物 Aroclor1260 在水稻土泥浆体系中发生了脱氯活动(图 2、图 3),不同处理组的脱氯效果表现为自然处理组(A)优于添加菌液组(B)(图 2、图 3、表 2),说明脱氯富集培养体的引入未对 Aroclor1260 的脱氯产生促进作用,反而使其脱氯效果有一定的降低.试验初期,添加菌液组(B)的 Aroclor1260 总量在第 44 天达到最低,随后有一定波动,可能是由于一次性添加的富集培养体中菌体浓度较高,菌体对 PCBs 发生吸附作用,导致吸附于细胞内的 PCBs 未检测到.由于环境体系的变化,脱氯富集培养体中的微生物作为外来菌,在与泥浆体系中土著菌的竞争中逐渐丧失优势,菌体的死亡导致吸附的 PCBs 溶出,回到泥浆体系中,使添加菌液组(B)的 Aroclor1260 总量在试验中期出现暂时回升的现象.试验

后期,菌群结构趋于稳定,在 128 d 检测到总量的消减.自然处理组(A)的 Aroclor1260 残留量在试验过程中始终保持降低的趋势,在没有外来菌的竞争下,水稻土泥浆体系中土著菌的群落结构较为稳定,保持试验体系中 Aroclor1260 总量的持续消减.而在添加菌液组(B)中,由于菌群间的竞争作用,导致引入的外源脱氯微生物对水稻土泥浆体系中土著脱氯相关菌群造成冲击,因而脱氯富集培养体的引入反而降低了整个体系对 Aroclor1260 的脱氯效果.

PCBs 理论上共有 209 种同系物,分别被 1~10 个 Cl 原子于不同位点取代形成,而厌氧脱氯一般发生在氯原子数>4 的高氯代 PCBs 同系物中,低氯代 PCBs 则更倾向于开环降解^[10]. Aroclor1260 中的主要 PCBs 同系物集中在五、六、七氯联苯,氯代数高于 7 的同系物含量较低,因此七氯联苯主要呈现消减趋势,作为脱氯产物累积的含量较低,其消减量显著高于五、六氯联苯(表 2).五氯联苯作为六、七氯联苯的脱氯产物产生一定量的累积,因此试验过程中五氯联苯的总消减量低于六、七氯联苯.

厌氧环境中,复杂有机物在水解酸化菌和产氢产乙酸菌的作用下,被逐步分解为小分子有机酸以及 H₂、CO₂等,因此试验前期水稻土泥浆体系中的 H₂含量随时间延长而增加.水稻土泥浆体系中的厌氧消化和 PCBs 脱氯活动对 H₂等矿化产物的消耗使其含量在试验中后期逐渐降低(图 5).试验过程中,自然处理组(A)中的 H₂含量始终低于自然对照组(MCK).H₂是 PCBs 脱氯过程中可被脱氯菌利用的优质电子供体^[22-23],由于脱氯过程的发生和进行,自然处理组(A)中产生的 H₂被脱氯菌利用而消耗,试验中后期与自然对照组(MCK)间的 H₂含量差距进一步增大.当氢分压较高时,可能会刺激厌氧环境

下的嗜氢产甲烷菌的生长, 争夺脱氯过程所需的 H_2 而抑制脱氯过程的发生, 因此脱氯菌往往在较低的氢分压下更具有生存和反应的优势^[24-25]. 随着脱氯过程的发生, 自然处理组(A)中的脱氯微生物菌群逐渐稳定, 使水稻土泥浆体系中的 H_2 含量保持在较低水平以推动脱氯活动的持续进行.

脱氯富集培养体的引入使水稻土泥浆体系中的微生物群落结构发生较大的改变. 自然处理组(A)和添加菌液组(B)的微生物群落结构有较大差异(表3). 自然处理组(A)的 DGGE 图谱中各条带的组成相似且亮度逐渐加深, 试验过程诱导了与脱氯活动相关的菌群的产生并逐渐趋于稳定, 而添加菌液组(B)的条带则有较明显的差异, 可能和体系中外来菌和土著菌的竞争有关(图6). 对特异性条带的割胶回收克隆测序结果显示, 变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)所占比例达到总克隆数的80%, 该结果与已有的相关研究相近^[26], 说明这3类微生物种群在受PCBs污染的土壤微生物群落结构中具有重要地位, 可能对PCBs在土壤中的转化及微生物生态有重要影响. 在自然处理组(A)#6样品的条带中分别得到地杆菌属(*Geobacter*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、热单胞菌属(*Thermomonas*)克隆各1条. 地杆菌属(*Geobacter*)属于地杆菌科(Geobacteraceae), 是一类重要的异化Fe(Ⅲ)还原菌, 主要分布于Fe(Ⅲ)还原环境, 在 Fe^0 强化下的PCBs污染沉积物降解过程中会发生明显的变化^[27], 周期性的氧化还原状态变会对水稻土中的异化铁还原微生物群落结构产生影响. 伯克氏菌属(*Burkholderia*)中的LB400是PCBs的高效降解菌^[28], 在自然处理组中与其高度相似的特异性条带亮度逐渐增加, 说明可能有PCBs降解菌的存在. 不可培养的*Thermomonas* sp. 菌属在一些受PCBs污染的土壤中有过报道^[27]. 在添加菌液组(B)#8样品的条带中得到与专性脱氯菌o-17同属绿弯菌门(Chloroflexi)^[29]的克隆, 而后该条带的亮度有逐渐降低, 该菌群可能是富集培养体中与脱氯过程相关的菌群, 在水稻土泥浆体系中与土著菌的竞争逐渐丧失优势.

4 结 论

厌氧环境下典型高氯代PCBs混合物Aroclor1260可在水稻土泥浆体系中发生脱氯, 引入脱氯富集培养体后反而使脱氯效果下降, 可能和外来菌与土著菌的竞争有关. Aroclor1260的主要脱氯过

程发生在五、六、七氯联苯, 七氯联苯的脱氯过程最为显著, 五氯联苯作为脱氯产物的累积现象较显著. Aroclor1260脱氯过程的发生会消耗有机物厌氧发酵产生的 H_2 , 并将体系中的氢分压维持在较低水平以保证脱氯过程的持续进行. 脱氯过程中的微生物群落结构较为复杂, 不同体系中驯化得到的微生物群落结构差异较大, 富集培养体引入水稻土泥浆体系中可能导致其与体系原本存在的与脱氯相关的菌群竞争, 从而改变其群落结构.

参考文献

- [1] Borja J, Taleon DM, Aurensenia J, *et al.* Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry*, 2005, **40**: 1999-2013
- [2] Abraham WR, Nogales B, Golyshin PN, *et al.* Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, **5**: 246-253
- [3] Coglian VJ. Assessing the cancer risk from environmental PCBs. *Environmental Health Perspectives*, 1998, **106**: 317
- [4] United Nations Environment Programme. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants [EB/OL]. (2001-05-22) [2015-06-28]. <http://www.pops.int/documents/signature/signstatus.htm>
- [5] Shen C, Huang S, Wang Z, *et al.* Identification of Ah receptor agonists in soil of e-waste recycling sites from Taizhou area in China. *Environmental Science & Technology*, 2008, **42**: 49-55
- [6] Wong MH, Wu SC, Deng WJ, *et al.* Export of toxic chemicals: A review of the case of uncontrolled electronic-waste recycling. *Environmental Pollution*, 2007, **149**: 131-140
- [7] Xing GH, Wu SC, Wong MH. Dietary exposure to PCBs based on food consumption survey and food basket analysis at Taizhou, China: The World's major site for recycling transformers. *Chemosphere*, 2010, **81**: 1239-1244
- [8] Chen C (陈 晨), Cui J-L (崔静岚), Qin Z-H (秦智慧), *et al.* Research advances in microbial dechlorination of polychlorinated biphenyls. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2012, **23** (12): 3505-3513 (in Chinese)
- [9] Liu Y-Y (刘亚云), Chen G-Z (陈桂珠). Research advances in phytoremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2006, **17** (2): 325-330 (in Chinese)
- [10] Cui J-L (崔静岚), Chen C (陈 晨), Qin Z-H (秦智慧), *et al.* Biodegradation of organic pollutants by thermophiles and their applications: A review. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2012, **23** (11): 3218-3226 (in Chinese)
- [11] Field JA, Sierra-Alvarez R. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. *Environmental Pollution*, 2008, **155**: 1-12

- [12] Kögel-Knabner I, Amelung W, Cao Z, *et al.* Biogeochemistry of paddy soils. *Geoderma*, 2010, **157**: 1–14
- [13] Brune A, Frenzel P, Cypionka H. Life at the oxic-anoxic interface: Microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, **24**: 691–710
- [14] Liesack W, Schnell S, Revsbech NP. Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, **24**: 625–645
- [15] Chen C, Yang K, Yu C, *et al.* Polychlorinated biphenyls attenuation in soil from e-waste recycling area under flooded and dryland conditions. *Clean-Soil, Air, Water*, 2014, **43**: 584–591
- [16] Chen C, Yu C, Shen C, *et al.* Paddy field: A natural sequential anaerobic-aerobic bioreactor for polychlorinated biphenyls transformation. *Environmental Pollution*, 2014, **190**: 43–50
- [17] Zhang S-M (张水铭), Ma X-F (马杏法), An Q (安琼). Persistence and degradation of BHC in soil. *Acta Pedologica Sinica*(土壤学报), 1988, **25**(1): 81–87 (in Chinese)
- [18] Gao J (高 军). Distribution, Microbial Effects and Bioremediation of PCBs in Typical Polluted Agricultural Soils in the Yangtze River Delta. PhD Thesis. Hangzhou: Zhejiang University, 2005 (in Chinese)
- [19] Sowers KR, May HD. *In situ* treatment of PCBs by anaerobic microbial dechlorination in aquatic sediment: Are we there yet? *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, **24**: 482–488
- [20] Yang X-Q (杨小秋), Li H (李 航), Wan K (万 昆), *et al.* Determination of chloride in soil samples by ion chromatography after extracted with water. *Analytical Instrumentation* (分析仪器), 2013(3): 6–8 (in Chinese)
- [21] Baba D, Yasuta T, Yoshida N, *et al.* Anaerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls by a microbial consortium originated from uncontaminated paddy soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, **23**: 1627–1636
- [22] DeWeerd KA, Concannon F, Suflita JM. Relationship between hydrogen consumption, dehalogenation, and the reduction of sulfur oxyanions by *Desulfomonile tiedjei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**: 1929–1934
- [23] Sokol RC, Bethoney CM, Rhee G. Effect of hydrogen on the pathway and products of PCB dechlorination. *Chemosphere*, 1994, **29**: 1735–1742
- [24] Koenigsberg SS, Lapus A, Sandefur CA. Time-release electron donor technology for accelerated biological reductive dechlorination. Contaminated Soil 2000: Proceedings of the Seventh International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil. Leipzig, Germany, 2000: 968
- [25] Zuo J-E (左剑恶), Xiao J-H (肖晶华), Chen L-L (陈莉莉). A review on reductive dechlorination of chlorinated organic pollutants under anaerobic condition. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control* (环境污染治理技术与设备), 2003, **4**(6): 43–48 (in Chinese)
- [26] Chen L-T (陈立涛). Microbial Ecology of Contaminated Farmland around E-Waste Recycling Sites. Master Thesis. Hangzhou: Zhejiang University, 2007 (in Chinese)
- [27] Varadhan AS, Khodadoust AP, Brenner RC. Effect of biostimulation on the microbial community in PCB-contaminated sediments through periodic amendment of sediment with iron. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, **38**: 1691–1707
- [28] Bopp LH. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *Journal of Industrial Microbiology*, 1986, **1**: 23–29
- [29] Watts JEM, Fagervold SK, May HD, *et al.* A PCR-based specific assay reveals a population of bacteria within the *Chloroflexi* associated with the reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *Microbiology*, 2005, **151**: 2039–2046

作者简介 杨 凯,男,1990 年生,硕士研究生.主要从事土壤有机污染生物修复研究. E-mail: frederick0809@126.com

责任编辑 肖 红
