

均匀电场下两株多环芳烃降解菌在土壤中的迁移及电动注入

许伟,王翠苹,张志远,刘海滨,孙红文*

(南开大学环境污染过程与基准教育部重点实验室,天津 300071)

摘要 采用电动注入装置,研究了枯草芽孢杆菌和白腐真菌在均匀电场作用下在土壤中的迁移特征,以及这两种微生物电动注入的效果。结果表明,枯草芽孢杆菌和白腐真菌可通过电泳和电渗两种作用在电场下迁移,电泳起主导作用,微生物向阳极迁移为主。在所研究土壤中,微生物的迁移速率分别为:枯草芽孢杆菌 $13.5 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$,白腐真菌 $18.0 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。采用循环混合电解液可使土壤中 pH 值保持中性,有利于提高微生物的存活。相比于定期变换电场方向,保持电场单向运行可使微生物在土壤中分布更均匀。

关键词 电动注入;微生物迁移;pH 值变化;电动生物修复

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2011)01-0060-05

The Movement and Electric Injection of Two Strains of Microorganism in Soils Under Uniform Electric Field

XU Wei, WANG Cui-ping, ZHANG Zhi-yuan, LIU Hai-bin, SUN Hong-wen*

(MOE Key Laboratory on Pollution Processes and Environmental Criteria, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Active microorganisms are the primary factor controlling the efficiency of bioremediation of sites contaminated by organic pollutants. Electrokinetic provides a new way to inject microorganisms into target sites. In this study, the movement of *Bacillus subtilis* and *Phanerochaete chrysosporium* in a soil under uniform electric field and the electric injection of the two microorganisms were studied. The two microorganisms could be transported effectively into the soil by the electrokinetic injection. They moved in electric field driven by both electroosmosis and electrophoresis. The electroosmotic flow rate was $26 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ under voltage gradient of $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$. The two microorganisms migrated mainly to anode driven by electrophoresis. The migration velocities were $13.5 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ to the anode and $7.5 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ to the cathode for *B. subtilis* in the studied soil, and $18.0 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ to the anode and $9 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ to the cathode for *P. chrysosporium*. Compared to changing the electric direction, keeping the electric field in the same direction led a more even distribution of the microorganisms. With the circulation pattern, the acidity and alkalinity generated by electrolysis of water molecule in electrode solutions were neutralized, thus pH in soil did not change dramatically, ranging between 7.0 and 7.6 in the tested soil. The neutral pH provide a suitable condition for the survival of microorganisms. This study provides necessary data for the set-up of electrokinetic bioremediation for sites contaminated by organic pollutants.

Keywords electric injection; microorganism movement; pH value variation; electrokinetic bioremediation

微生物修复技术具有环境友好、成本低、可使有机污染物矿化为水和二氧化碳、不产生二次污染等优点,一直备受学术界和修复产业界的青睐^[1]。但是,微生物技术修复土壤中持久性有机污染物存在着一些难以克服的障碍,其中,特效微生物是影响生物修复速率的重要因素,往往需加入活性微生物进行生物强

化^[2]。而微生物在土壤中的吸附、沉降阻止或延迟了微生物的运移^[3]。传统方法是通过水力作用将外源微生物注入,这种方式注入的微生物通常集中于注入点的局部位置,引起微生物在局部疯长,容易堵塞土壤孔隙,使强化过程失败^[4]。

电动修复技术是一种新型原位修复技术,其基本原理是施加微弱直流电场,利用各种电动力学效应(电迁移、电渗析和电泳)使土壤孔隙中的水分子、无机离子、有机分子和微生物细胞定向运动^[5-8]。将电动力学与生物修复技术相结合^[9-10],可以解决一些制约微生物修复效率的瓶颈问题,有效引入微生物,提高

收稿日期 2010-06-09

基金项目 国家高技术研究发展计划(863)项目(2008AA06Z333)

作者简介 许伟,男,博士研究生,主要从事土壤环境化学研究。

E-mail xwei76@tom.com

* 通讯作者 孙红文 E-mail sunhongwen@nankai.edu.cn

其利用效率。

多环芳烃是土壤中常见的持久性有机污染物之一,许多研究表明^[11-13],芽孢杆菌属和白腐菌属具有降解多环芳烃的功能。如苏丹等^[11]从石油污染土壤分离的芽孢杆菌对芘和苯并芘都有很好的降解效果。王翠苹等^[13]研究发现白腐真菌——黄孢原毛皮革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)通过分泌特殊酶对多环芳烃具有高效降解功能。此外,Field等^[14]分离出8株具有降解多环芳烃能力的白腐真菌。本论文研究了两株多环芳烃降解活性菌,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和白腐真菌(*P. chrysosporium*)在均匀电场中的运移规律和电动注入微生物技术,以期建立电动-微生物修复多环芳烃污染土壤的新技术。

1 材料与方法

1.1 受试土壤

取自南开花园,属潮土。风干磨细过2mm筛后,储存待用,其主要性质见表1。

1.2 试验装置

试验所用的电动装置示意图见图1。电动装置的土壤室为内径10cm、长20cm的有机玻璃柱,两侧的电极室具有同样的内径,长7cm,电极为石墨电极。电极室和反应器中间由过滤板和两层滤纸相隔。电极室上端设置出气孔,可以使电极反应产生的气体逸出电极室。阳极电解液和阴极电解液从电极室流入蓄水池中充分混合再由蠕动泵打入电极室完成循环。

1.3 土壤灭菌和菌液制备

取适量受试土壤,湿热(121℃,2h)和干热(105℃,6h)交替灭菌3次,冷至室温后使用。

用牛肉膏蛋白胨培养基和土豆培养基分别培养枯草芽孢杆菌和白腐真菌,进入生长指数期,离心浓缩,加入磷酸盐缓冲溶液,制成菌悬液。利用分光光度计(SP-2000UV,上海光谱仪器有限公司)在600nm处测定其光密度并用菌落计数法测定细菌数,其具体分析方法见1.5和1.6。

1.4 电渗流的测定

取灭菌土壤,按其饱和含水率为75%的比例加入

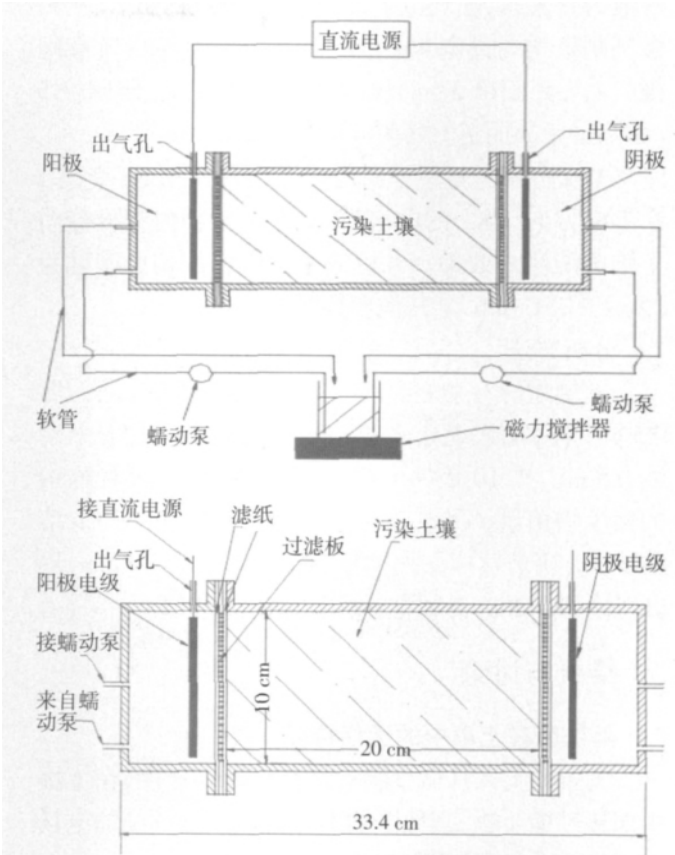


图1 电动注入装置示意图

Figure 1 Schematic diagram of electric injection

无菌水,充分搅匀后,逐层装入有机玻璃反应器,压实,吸去表层压出水。采用单向电极运行方式,电压梯度采用 $1\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$,电解液为自来水,阳极液进行循环,保持液面的水平高度,阴极室下端进水口封闭,测量阴极室中间位置出水口的流量^[15]。

1.5 电动注入微生物

取灭菌土壤,按其饱和含水率为75%的比例加入无菌水,充分搅匀后,逐层装入有机玻璃反应器,压实,吸去表层压出水。在反应器中部取出体积为 $1\text{ cm}\times 9\text{ cm}\times (3.0\sim 3.5)\text{ cm}$ 的土壤,填入相同体积灭菌石英砂,用微量移液管在石英砂区每隔0.5cm加入 $\text{OD}_{600}=1(2.8\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1})$ 的菌液50 μL ,考察两种微生物在电场下由土壤中部向两侧的运移规律。试验采用单向电极运行方式,电压梯度采用 $1\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$,电

表1 受试土壤的主要性质

Table 1 Major characteristics of the tested soils

土壤	有机质/%	pH	粒径分布/%					质地
			<0.005 mm	0.005~0.01 mm	0.01~0.05 mm	0.05~0.25 mm	0.25~1 mm	
潮土	3.6	6.4	34	14	25	19	8	粘壤土

解液为自来水,循环电解液流速为 $800 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 。从阳极到阴极均匀设定 4 个取样点,分别为 A_0 (紧靠阳极)、 A_1 (距阳极 5 cm)、 C_1 (距阳极 15 cm,距阴极 5 cm)、 C_0 (紧靠阴极),每隔 4 h 取样 1 次。

本文分别考察了单向运行(EK_1)和每 12 h 变换 1 次电极方向(EK_2)的电动模式下,微生物由电极液向土壤中的注入效果。电极液中微生物的初始密度为 $2.8\times 10^8 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。其他参数同上。

1.6 分析方法

土壤中微生物的测定采用平板菌落计数法,取 0.5 g 土样,加入无菌水 4.5 mL,振荡 10 min,取上清液 0.5 mL,按 10 倍梯度稀释,测定 0.2 mL 稀释样中的微生物菌量。另取 2 g 土样,加入 0.01 mL CaCl_2 溶液 5 mL,用玻璃棒剧烈搅拌 1~2 min,静置 30 min,用 pH 计(CHN868,奥利龙)测定上清液 pH 值。

2 结果与讨论

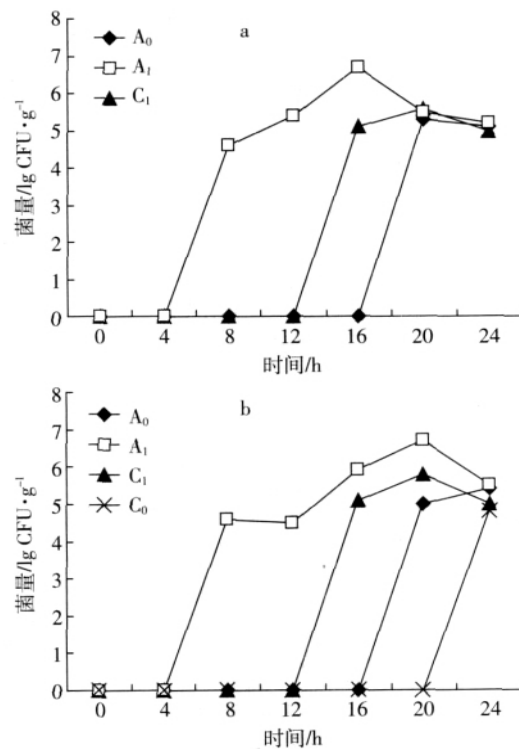
2.1 两株菌在土壤中的运移特征

为了研究两株微生物的运移方向和速度,在土壤中部接种微生物,其他区域不含该微生物。施加电场后,微生物的运移情况如图 2 所示。

土壤中枯草芽孢杆菌初始菌量为 $8.3 \text{ lg CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 。由图 2a 可以看出,枯草芽孢杆菌向阳极迁移的速率要比向阴极迁移的速率快,并且其向阳极迁移的数量也远大于向阴极迁移的量,枯草芽孢杆菌在 20 h 后到达阳极,而试验过程中在阴极附近(C_0)处并没有观察到枯草芽孢杆菌。细菌表面通常带负电荷,在电场中能以电泳方式向阳极运动,同时也能被电渗流拖向阴极^[6]。由试验数据可以计算出,枯草芽孢杆菌向阳极迁移的速率为 $13.5 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$,向阴极迁移的速率为 $7.5 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ 。因此枯草芽孢杆菌在土壤中的迁移,电泳起到更主要的作用。DeFlaun 等^[17]研究了表面带负电荷的细菌在直流电场作用下,在中性溶液中的电动迁移,结果表明,在 $5 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电场下,洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)G4 在电场作用下向阳极迁移的速率大约为 $36 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$,电泳对其迁移起主要作用。

白腐真菌在土壤中初始菌量为 $8.2 \text{ lg CFU}\cdot\text{g}^{-1}$,白腐真菌在电场中的运移如图 2b 所示。由于白腐真菌表面也是带有负电荷,所以和枯草芽孢杆菌一样,在电场中可以电泳方式向阳极运动,同时也能被电渗流拖向阴极,其向阳极迁移的数量也远大于向阴极迁移的数量。由试验结果推算出白腐真菌在此试验条件下向阳极运动的速率为 $18 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$,向阴极迁移的速率为 9

$\text{cm}\cdot\text{d}^{-1}$ 。由此可见,白腐真菌比枯草芽孢杆菌在土壤中以电泳方式向阳极运动速率要快得多,这可能与两种微生物性质有关。两种微生物向阳极迁移的速率和量要比向阴极迁移的大,这可能是由于在粘土中微生物电泳迁移比电渗流对微生物拖拽起更主要作用。微生物向阳极迁移的速率和数量与电渗流的流速有关^[16],经过 48 h 监测,电渗流累积流量为 52 mL,可以得出在电压梯度为 $1 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 时,电渗流流速为 $26 \text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$ 。而 Schmidt 等^[18]研究了在一种粘土中,在 $0.27 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 的电压梯度下,电渗流的流速为 $30 \text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$ 。可见,电渗流不仅取决于电压梯度,还受到土壤类别和性质的影响。



A_0 、 A_1 、 C_1 、 C_0 分别为紧靠阳极、距阳极 5 cm、15 cm、紧靠阴极

图 2 枯草芽孢杆菌(a)与白腐真菌(b)在土壤中的迁移

Figure 2 The migration of *Bacillus subtilis* (a) and *Phanerochaete chrysosporium* (b) in soil

2.2 电动注入微生物

本研究组的前期研究表明,相比于单项运行,定期变换电极方向可使营养盐分布更均匀(另文发表)。因此,为了建立协调统一的营养盐与微生物一体化电动注入技术,本文对不改变电极方向(EK_1)以及定期变换电极方向(EK_2)这两种电动注入微生物方式进行了比较研究(图 3)。

单向施加电场(EK_1)运行 16 h 后,在距阳极 10

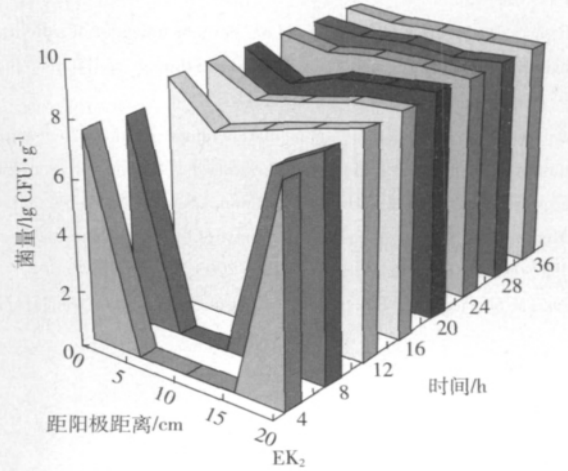
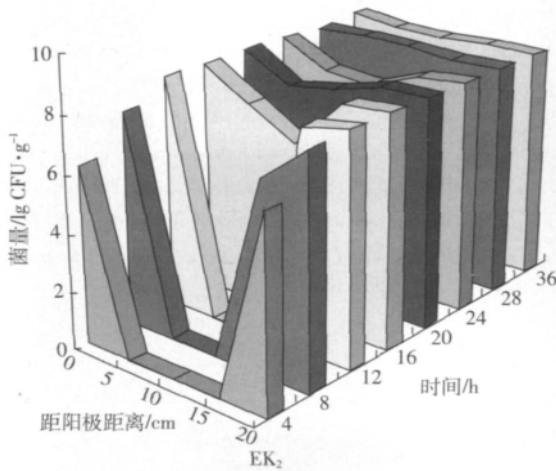
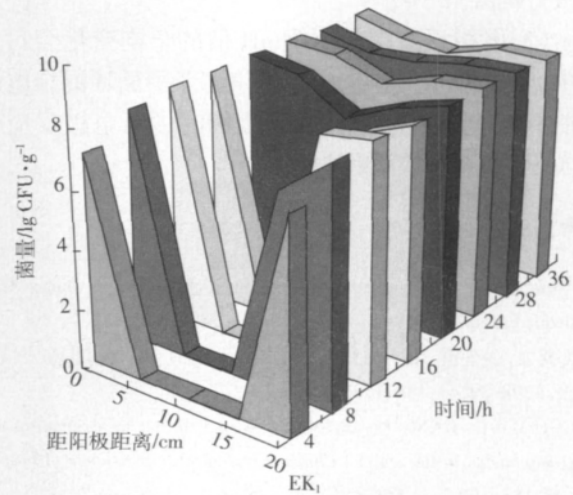
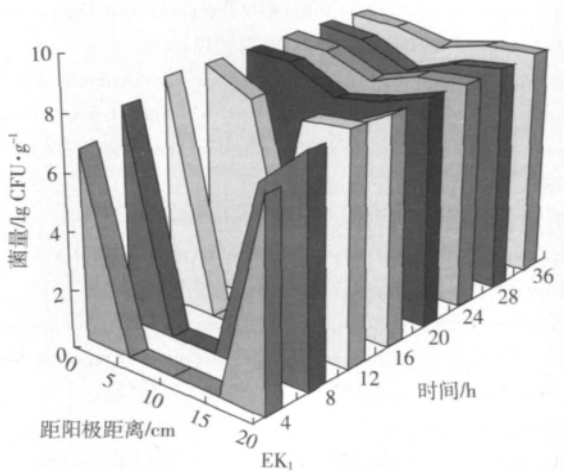
cm处可以检测有枯草芽孢杆菌出现,此时枯草芽孢杆菌存在于潮土的各处(图3)。试验运行36h后,潮土中各处所含细菌量大体相同,约为 1.1×10^8 CFU·g⁻¹。在试验EK₂(每12h变换电极方向1次)中,运行20h后才在距阳极10cm处检测出枯草芽孢杆菌,运行36h后,在距阳极附近和阴极附近的土壤中细菌的含量大约相同,约为 1.0×10^8 CFU·g⁻¹,在距阳极10cm处土壤中细菌的含量略低,约为 3.5×10^7 CFU·g⁻¹。可见,EK₁注入细菌效果要比EK₂好,这可能是由于EK₂试验中不断改变电极的方向,从而改变了细菌迁移的方向,使其运动反复,降低了其迁移的效率。

白腐真菌在电场单向运行(EK₁)12h后,在距阳极10cm处可以检测出白腐真菌,此时白腐真菌存在于潮土的各处(图4)。试验运行36h后,潮土靠近两极处含菌量约为 1.25×10^8 CFU·g⁻¹,在距阳极10cm处土壤的含菌量为 1.0×10^8 CFU·g⁻¹。在试验EK₂中,

运行12h后在距阳极10cm处也可以检测出白腐真菌,运行36h后,在距阳极附近和阴极附近的土壤中细菌的含量大致相同,约为 1.12×10^8 CFU·g⁻¹,在距阳极10cm处土壤中白腐真菌的含量约为 4.07×10^7 CFU·g⁻¹。同样,EK₁注入白腐真菌的效果要比EK₂好。

2.3 pH值变化

在试验过程中阳极和阴极会发生水电解反应,分别产生H⁺和OH⁻,而电极反应产生的H⁺和OH⁻会通过电迁移方式分别向阳极和阴极运动,在土壤中形成酸性迁移带和碱性迁移带^[19]。大部分微生物可以在pH值为5~9环境下生存,最佳生长的pH值为6.5~7.5,另外细菌表面电荷、电渗析流和土壤性质等都会随土壤pH值的变化而改变^[17]。因此,土壤pH值的变化在电动注入微生物过程中就显得尤为重要。在本研究中采用循环混合电解液的方法来控制土壤中pH值的变化,在整个试验过程中监测得到的pH值范围



EK₁:单向运行;EK₂:每12h变换1次电极方向

EK₁:单向运行;EK₂:每12h变换1次电极方向

图3 电动注入枯草芽孢杆菌

图4 电动注入白腐真菌

Figure 3 Electric injection of *Bacillus subtilis*

Figure 4 Electric injection of *Phanerochaete chrysosporium*

在 7.0~7.6 之间。因此,在本研究中土壤中的 pH 值变化不会对微生物的生存和土壤的性质等产生较大的影响。

3 结论

(1)均匀电场能有效促进枯草芽孢杆菌和白腐真菌在土壤中的运移。在电压梯度为 $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 时,枯草芽孢杆菌在所研究土壤中向阳极和阴极的迁移速率分别为 $13.5 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $7.5 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$;白腐真菌向阳极和阴极的迁移速率分别为 $18 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $9 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。在电场作用下,枯草芽孢杆菌和白腐真菌主要通过电泳方式向阳极迁移,同时还受到向阴极的电渗流影响,电泳起主要的作用。

(2)电动注入能有效地将两种微生物输送到土壤中,加强了生物原位修复中微生物迁移性,其中采用单向电极运行时微生物的输送效果比 12 h 变换 1 次电极方向要好一些。

(3)电极反应引起土壤 pH 值的急剧变化会对土壤中微生物的生存产生不利影响,采用循环混合电解液能有效控制在电动注入微生物时由于电极反应引起的土壤 pH 值变化问题。

参考文献:

- [1] Alexander M. Biodegradation and bioremediation[M]. San Diego: Academic Press, 1999.
- [2] 郭笃发,姜爱霞. 微生物在土壤中的迁移及其影响机制[J]. 土壤通报, 1998, 29(4): 188-190.
GUO Du-fa, JIANG Ai-xia. Migration and impact mechanism of microorganisms in the soil[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 1998, 29(4): 188-190.
- [3] Ripp S, Nivens D E, Werner C, et al. Vertical transport of a field-released genetically engineered microorganism through soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 1873-1877.
- [4] Kaufman A K. Selection of bioremediation for site cleanup: Decision factors[M]//Flathman P E, Jerger D E, Exner J H. Bioremediation-Field Experience. Lewis Publishers, Boca Raton, USA, 1994: 51-57.
- [5] Musso G. Transport phenomena in electrokinetic soil remediation[J]. *Mathematical and Computer Modelling*, 2003, 37: 589-594.
- [6] Page M M, Page C L. Electroremediation of contaminated soils[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2002, 128: 208-219.
- [7] Acar Y B, Alshawabkeh A N. Principles of electrokinetic remediation[J]. *Environmental Science & Technology*, 1993, 27: 2638-2647.
- [8] Betts W B. The potential of dielectrophoresis for the real-time detection of microorganisms in foods[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1995, 6: 51-58.
- [9] Wick L Y, Shi L, Harms H. Electro-bioremediation of hydrophobic organic soil-contaminants: A review of fundamental interactions[J]. *Electrochimica Acta*, 2007, 52: 3441-3448.
- [10] Saichek R E, Reddy K R. Electrokinetically enhanced remediation of hydrophobic organic compounds in soils: A review [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2005, 35: 115-192.
- [11] 苏丹,李培军,王鑫,等. 3 株细菌对土壤中萘和苯并芘的降解及其动力学[J]. 环境科学, 2007, 28(4): 913-917.
SU Dan, LI Pei-jun, WANG Xin, et al. Degradation and kinetics of pyrene and benzo[a] pyrene by three bacteria in contaminated soil[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(4): 913-917.
- [12] 周贤涛,吴娟,林鹿. 白腐菌对芳香族化合物的降解途径[J]. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(12): 1-8.
ZHOU Xian-tao, WU Juan, LIN Lu. Biodegradation pathway of aromatic compounds by white rot fungus[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2002, 3(12): 1-8.
- [13] Wang C P, Sun H W, Li J M, et al. Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils[J]. *Chemosphere*, 2009, 77(6): 733-738.
- [14] Fidle J A, De Jong E, Costa G F. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(8): 2219-2226.
- [15] Kim S S, Han S J. Application of an enhanced electrokinetic ion injection system to bioremediation[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 2003, 146: 365-377.
- [16] Virkutyte J, Sillanpää M, Latostenmaa P. Electrokinetic soil remediation-critical overview[J]. *The Science of the Total Environment*, 2002, 289: 97-121.
- [17] DeFlaun M F, Condee C W. Electrokinetic transport of bacteria[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 1997, 55: 263-277.
- [18] Schmidt C A B, Barbosa M C, Almeida M S S. A laboratory feasibility study on electrokinetic injection of nutrients on an organic, tropical, clayey soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 143: 655-661.
- [19] Acar Y B, Alshawabkeh A N. Electrokinetic remediation: Theoretical model [J]. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 1996, 122: 186-196.