

环毛蚓在高羊茅修复土壤菲污染过程中的作用

潘声旺^{1,2}, 魏世强², 袁馨², 曹生宪²

1. 成都大学环境科学与工程研究所, 四川 成都 610106; 2. 西南大学资源环境学院, 重庆 400715

摘要: 为了解土壤动物在植物修复多环芳烃类化合物过程中的作用, 采用盆栽试验法, 对比研究了蚯蚓(*Pheretima* sp.)活动对高羊茅(*Festuca arundinacea*)修复土壤菲污染的影响效应以及各种生物、非生物因子在植物修复菲污染过程中的作用。结果显示, 在 20.05~322.06 mg·kg⁻¹ 菲污染水平范围内, 与相同污染水平下无蚯蚓作用的菲污染土壤中生长的植株相比, 蚯蚓活动促进修复植物高羊茅的生长: 试验期间(72 d), 修复植物的单株生物量增加 9.74%~21.53%, 根冠比增加 17.26%~21.44%。添加蚯蚓 72 d 后, 种植高羊茅的菲污染土壤中, 菲的去除率高达 61.70%~88.78%, 其平均去除率(77.38%)比无蚯蚓活动的土壤-植物系统中的(68.36%)提高了 9.02%, 比无植物生长的对照组土壤(22.57%)提高 54.81%。各种生物(如植物代谢、植物积累、动物积累、微生物降解、植物-微生物交互作用等)、非生物(如渗滤、吸附、光解、挥发等)因子中, 植物-微生物交互作用对菲去除的平均贡献率(47.81%)最为突出, 比无蚯蚓活动时(42.08%)提高 5.73%。说明蚯蚓活动可强化土壤-植物系统对土壤菲污染的修复作用。

关键词: 植物修复; 多环芳烃; 菲; 高羊茅; 蚯蚓

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2010) 03-0594-05

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是环境中普遍存在的持久性有机污染物, 主要源于火山喷发、森林火灾等自然过程及石油化工、燃煤等人类活动。在我国, 部分土壤 PAHs 含量已达到 10²~10⁴ μg·kg⁻¹, 交通干线、厂矿和城郊附近甚至高达 10⁶ μg·kg⁻¹[1]。因多数 PAHs 具有较强的“三致”效应, 严重影响人类健康和环境安全, 修复土壤 PAHs 污染已成为环境领域的焦点问题。

与其它修复方法相比, 植物修复投资少、效益高、环境友好, 发展潜力巨大。该技术起步较晚, 多数研究仅限于修复植物的筛选[2]或修复效应的比较[3], 在环境因素对修复效果的影响方面, 尤其是土壤动物(如蚯蚓、线虫等)对根际修复的强化作用研究尚少。事实上, 蚯蚓活动不仅能改善土壤的理化性质、活化微生物生理活性[4], 还能促进修复植物的生长[5]。因 PAHs 的生物降解主要是在好氧条件下进行的[6], 蚯蚓活动引发的根际土壤理化性质、生态功能的改变, 尤其是通气状态的改善, 能否对植物修复产生促进作用等相关研究鲜见报道。本研究拟以环毛蚓(*Pheretima* sp.)、高羊茅(*Festuca arundinacea*)为试验材料, 对比研究蚯蚓活动对土壤-植物系统中 PAHs 去除效果的影响, 以期为 PAHs 污染土壤的生态修复提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤

紫色土, 采自旱地表层。理化性质: 有机质: 22.3 g·kg⁻¹, CEC: 27.4 cmol·kg⁻¹, pH 7.19, 速效 N、P、K 分别为 114.6、24.7、94.8 mg·kg⁻¹。

1.1.2 植物

以 2 周龄高羊茅为试验材料。种子经双氧水处理后, 无菌条件下催芽、培养 2 w 备用。

1.1.3 蚯蚓

人工培育的环毛蚓, 培育方法如下: 风干的牛粪经脱氨、灭菌(虫)后, 重新碾碎, 以 60 g·kg⁻¹(干质量比)的比率与未污染的试验土壤充分混合后, 分装于底部有滤孔的瓷盆中。母蚓经双氧水浸润后, 均匀添加到培养盆中, 在(20±2) °C、40%田间持水量下室内培育 30 d 后, 选择同等大小(鲜质量: 0.5~0.6 g; 体长: 7~8 cm)、无环带个体待用。

1.1.4 化学品

菲(Phe, phenanthrene)是燃油和汽车尾气排放 PAHs 的标志物, 检出限较高。拟以菲为 PAHs 代表物(Fluka 公司提供, 纯度 > 98%)。

1.2 试验方法

盆栽试验在温室内进行, 试验周期 72 d。土壤风干后, 过 3 mm 筛。适量菲用丙酮溶解后, 均匀洒在土壤表层。丙酮挥发后, 反复搅拌、混匀, 制成 6 个水平(T₀—T₅)。40%田间持水量下平衡 1 w 后, 质量分数分别为: 0(T₀)、20.05(T₁)、40.88(T₂)、81.05(T₃)、161.44(T₄)、322.06(T₅) mg·kg⁻¹。试验分 A、B 两组。

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD87B10-05); 国家 863 项目(2006AA10Z427)

作者简介: 潘声旺(1973 年生), 男, 博士, 主要研究方向为污染生态学。E-mail: panwang@swu.edu.cn

收稿日期: 2010-01-25

A 组设计 4 个处理、重复 5 次。①处理 1 (CK₁): 土壤中加入 0.1%NaN₃(抑制微生物活性)^[7],无植物; ②处理 2 (CK₂): 无植物、无 NaN₃; ③处理 3 (TR₃): 种植物、加 0.1%NaN₃; ④处理 4 (TR₄): 种植物、无 NaN₃。土壤装盆后(每盆 2 kg),除 CK₁、CK₂ 外,每盆移栽并保留植物幼苗 12 株。试验期间,白天室温维持在 25 ℃,350 μmol·(m²·s)⁻¹光照强度下持续光照 16 h,夜间室温控制在 12 ℃左右;田间持水量维持在 40%(称重补水法)。

B 组:除每盆添加 8 条蚯蚓外,试验设计、试验条件与 A 组相同,没有额外投加食物。试验期间,T₁—T₅ 水平处理 2(CK₂)中蚯蚓体重较初始引入时减轻 15.03%,但与无污染的 T₀(13.38%)间差异不显著($n=40, p>0.05$);其他处理中的生长状况与 CK₂ 类似,说明试验条件适合蚯蚓生长。

13 样品测定与质量控制

土壤、植物组织中菲的净化方法参考文献[8]。蚯蚓组织中菲的净化参照 Johnson^[9],略有改进:蚯蚓经去离子水培养 12 h 后,转移到活化硅胶中埋置 48 h,待排尽体内杂质后,洗净、用滤纸吸干、称重。液氮真空干燥、碾碎。与 3 倍重量的无水硫酸钠混合,用正己烷索氏提取 12 h;将提取液浓缩后,经 GPC 进一步去除少量油脂残余。滤液经旋转蒸发器蒸干后甲醇定容,过 0.22 μm 孔径滤膜后待测。

经上述前处理后,HPLC(Waters600)测定,DAD 检测器(λ=246 nm)、流动相为甲醇加水(甲醇与水的体积比为 83:17)。在此条件下,检出限为 54.2 pg·L⁻¹,土壤中菲的加标(外标法、下同)回收率为

95.9%($n=7$, RSD<5.5%)、植物组织为 94.9%($n=7$, RSD<4.7%)、蚯蚓组织为 91.9%($n=7$, RSD<5.5%)。

1.4 数据处理

用 SPSS13.0 进行 Duncan's 多重比较。菲的去除率(R)计算式为: $R=(C_0-C_i) \times 100\% / C_0$, C_0 为初始添加量, C_i 为残留量。去除因子 i 对菲去除的贡献率(T_i ,即因子 i 对菲的实际去除量与初始添加量百分比)计算式为: $T_i = R_i \times 100\% / (W \times C_0)$,其中, R_i 为因子 i 对菲的实际去除量, W 为土壤质量。理论上,所有生物、非生物因子的贡献率之和等于去除率 R 。

2 结果与讨论

2.1 蚯蚓活动对植物生长的影响

图 1 表明,T₁—T₅ 范围内,高羊茅在非污染土壤中能够正常生长。无蚯蚓活动时单株生物量、根冠比与 T₀ 水平(2.98 g、0.067)间差异不显著($n=60, P>0.05$)。添加蚯蚓后,单株生物量较同一污染水平 A 组间增加 9.74%~21.53%(平均值 $m=16.37\%$),其中,T₁—T₄ 水平的生物量与 A 组差异显著($n=60, P<0.05$);根冠比增加 17.26%~21.44%($m=19.67\%$),与同一污染水平 A 组间差异显著($n=60, P<0.05$)。说明蚯蚓活动能促进菲污染环境中植物的生长。

2.2 蚯蚓活动对土壤中菲去除的影响

表 1 显示,添加蚯蚓的土壤-植物系统(TR₄)中菲的残留量明显低于同一污染水平 A 组:试验结束时,B 组土壤中菲残留量与种植高羊茅的 A 组(TR₄)间差异显著($n=5, p<0.05$);与无高羊茅生长的 A 组(CK₂)间差异极显著($n=5, P<0.01$)。说明蚯蚓活动

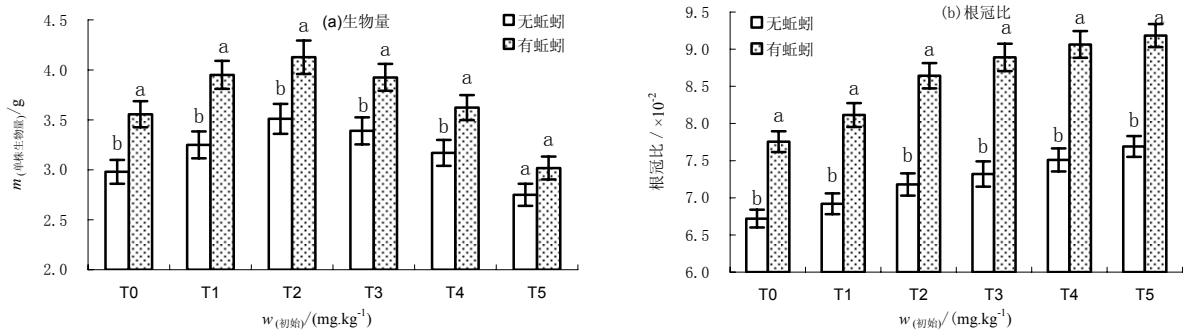


图1 不同污染水平下高羊茅的生长状况

Fig.1 Biomass of plants grown in spiked soils with different pollution levels

表 1 不同处理条件下土壤中菲的残留量

Table 1 Residual Phe in soils and its dissipation rates under different treatment conditions

处理	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
A 组处理 2	14.02±0.49 ^{Aa}	30.21±0.84 ^{Aa}	62.40±1.64 ^{Aa}	130.86±2.92 ^{Aa}	274.62±3.91 ^{Aa}
A 组处理 4	3.35±0.21 ^{Bb}	9.88±0.44 ^{Bb}	25.22±0.92 ^{Bb}	64.56±1.81 ^{Bb}	148.73±3.37 ^{Bc}
B 组处理 4	2.25±0.23 ^{Bc}	5.95±0.61 ^{Bc}	15.81±1.42 ^{Bc}	47.71±3.44 ^{Bc}	123.34±5.98 ^{Bc}

同列数据后不同大、小写字母表明Duncan's多重比较差异极显著($P<0.01$)或显著($P<0.05$)

促进了土壤中菲的去除。

根据土壤中菲的残留量(C_t),可推算其去除情况。结果显示,土壤-植物系统中的去除率普遍高于其它处理: T_1 — T_5 范围内,B组土壤(TR_4)中菲的平均去除率高达77.38%(61.70%~88.78%);无蚯蚓作用的A组(TR_4)平均去除率高达68.36%(53.82%~83.28%),而无植物对照组(CK_2)仅为22.57%(14.73%~30.08%)。

相同处理条件下,同一污染水平A、B组土壤中菲的去除率差异反映了蚯蚓活动对菲污染修复效果的影响程度(图2)。可以看出,不同污染水平下,蚯蚓活动对菲去除的强化程度也不一样:中度污染(T_3)时强化程度最高(11.64%),重污染(T_5)时次之(7.89%),低污染(T_1)时仅为5.51%。这可能与低污染环境菲的生物可利用性较低、重污染时微生物受污染物的毒害、降解活性被抑制有关。

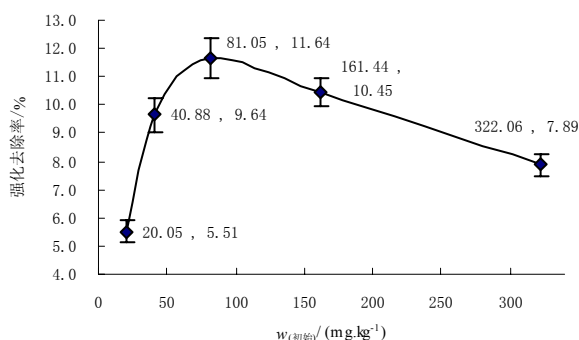


图2 不同污染水平下菲的强化去除差异

Fig.2 Enhanced Phe dissipation rates of soils with different pollution levels

2.3 蚯蚓活动对植物富集菲的影响

基于土壤残留量、植物组织积累量,可推算菲在根系、茎叶部的浓缩系数(RCFs or SCFs)(图3)。总体上,菲在植物组织中积累量随初始添加量的增加而增大,浓缩系数随添加量的增大而减小;相同污染水平下,有蚯蚓活动时的积累量低于无蚯蚓时,且根部大于茎叶部。如在 T_1 — T_5 范围内,无蚯蚓作用时根系、茎叶部的积累量为36.68(15.14~68.12)、9.34(4.21~16.28) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,有蚯蚓活动时分别为32.26(13.86~60.04)、8.37(3.79~14.41) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;无蚯蚓时RCFs、SCFs为1.88(0.45~4.51)、0.50(0.10~1.26),有蚯蚓时分别为2.53(0.49~6.16)、0.68(0.12~1.69)。

2.4 蚯蚓对菲去除的强化途径

土壤中菲的去除主要源于各种生物(如植物代谢、积累、微生物降解、植物-微生物交互作用等)、非生物(如渗滤、吸附、光解、挥发等)因素^[8]。如

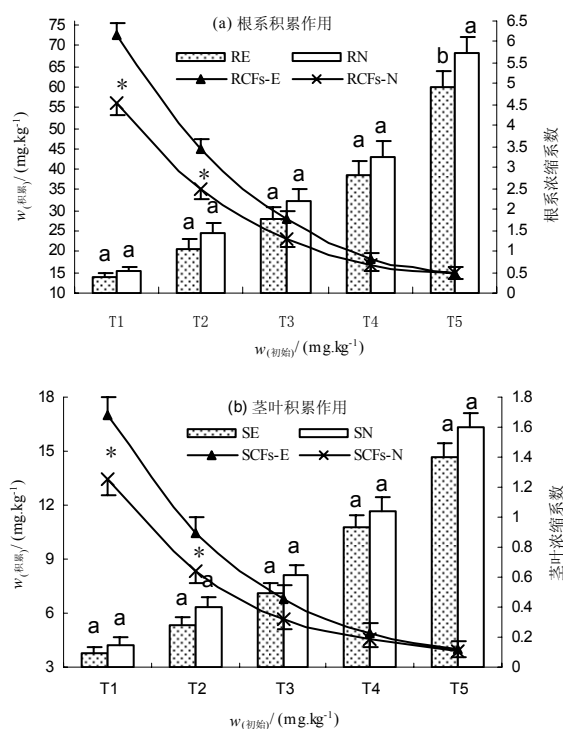


图3 植物组织对菲的积累作用

Fig.3 Phe in plant as a function of Phe concentrations in soils

RE、SE和RN、SN分别代表有蚯蚓和无蚯蚓时根系、茎叶部的菲积累量,RCFs-E、SCFs-E和RCFs-N、SCFs-N代表相应的浓缩系数,同一污染水平上不同字母表示差异显著。

果用 T_a 、 T_d 、 T_c 、 T_m 、 T_{pm} 代表非生物损失、植物代谢、积累、微生物降解、植物-微生物交互作用在菲去除过程中的贡献,用 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 代表无蚯蚓时 CK_1 、 CK_2 、 TR_3 、 TR_4 中菲的表观去除率,在不考虑因子间交互作用的情况下,则有:

$$R_1 = T_a$$

$$R_2 = T_a + T_m$$

$$R_3 = T_a + T_c + T_d$$

$$R_4 = T_a + T_c + T_d + T_m + T_{pm}$$

B组土壤中,因蚯蚓组织对菲的直接吸收作用以及蚯蚓活动对各种生物、非生物因子可能产生的强化去除作用,则有:

$$\Delta R_1 = T_a^e + T_e$$

$$\Delta R_2 = T_a^e + T_m^e + T_e$$

$$\Delta R_3 = T_a^e + T_c^e + T_d^e + T_e$$

$$\Delta R_4 = T_a^e + T_c^e + T_d^e + T_m^e + T_{pm}^e + T_e$$

式中: ΔR_1 、 ΔR_2 、 ΔR_3 、 ΔR_4 分别代表添加蚯蚓后 CK_1 、 CK_2 、 TR_3 、 TR_4 中菲的去除率与相同条件下A组土壤中去除率的变化量; T_a^e 、 T_c^e 、 T_d^e 、 T_m^e 、 T_{pm}^e 代表蚯蚓活动引起的 T_a 、 T_c 、 T_d 、 T_m 、 T_{pm} 变化量, T_e 代表蚯蚓组织的吸收作用对菲的去除贡献。结合土壤、蚯蚓组织、植物组织中菲含量,可推出各修复因子在菲去除过程中的贡献率(表2)。

表 2 生物、非生物因子对去除菲的贡献率

Table 2 Contributions of biotic & abiotic factors to remediation of Phe in soils

项目	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
非生物损失	66.48±2.86 ^{Ad} (1.13)	60.12±2.44 ^{Ad} (1.84)	51.92±2.67 ^{ABd} (2.21)	43.44±2.34 ^{ABc} (1.45)	33.23±1.97 ^{Bc} (1.10)
微生物去除	234.33±5.19 ^{Ab} (12.54)	200.94±4.37 ^{ABb} (30.17)	178.23±4.61 ^{Bb} (37.48)*	146.04±3.92 ^{BCb} (34.42)*	114.14±3.41 ^{Cb} (18.73)
植物积累	5.37±0.62 ^{Ad} (-0.03)	3.85±0.45 ^{ABd} (-0.06)	2.38±0.43 ^{Bd} (-0.11)	1.76±0.37 ^{BCd} (-0.05)	1.16±0.24 ^{Cd} (-0.02)
植物代谢	61.06±2.86 ^{Ac} (6.75)	53.18±2.89 ^{ABc} (5.48)	32.56±2.14 ^{Bc} (3.86)	14.05±1.81 ^{Cd} (2.81)	9.86±0.91 ^{Dd} (1.71)
蚯蚓积累	0.82	0.65	0.57	0.43	0.33
植物-微生物交互作用	465.56±19.23 ^{Aa} (33.80)	440.22±18.21 ^{ABa} (58.20)*	423.71±16.51 ^{Ba} (72.19)*	394.81±17.43 ^{BCa} (65.34)*	379.81±12.31 ^{Ca} (56.97)*

同一列中大写字母或同一行中小写字母表示差异显著($P<0.05$)；括号中数据为添加蚯蚓后的变化值，*表示差异显著($P<0.05$)

与A组相比，蚯蚓活动使土壤-植物系统(TR₄)中菲的平均去除率提高9.02%，但蚯蚓组织积累部分仅占0.06%，说明蚯蚓的吸收作用并不是菲被强化去除的主要途径。试验期间，非生物性损失、植物代谢对菲去除的平均强化率仅为0.15%、0.41%，二者也不是强化效应的主要途径。相比之下，微生物降解、植物-微生物交互作用的贡献率变化较大，前者较A组(17.47%)提高2.67%，后者较A组(42.08%)提高5.73%，分别占强化去除部分的32.09%、68.95%。说明蚯蚓活动对植物修复土壤菲污染的强化效应主要是通过植物-微生物交互作用实现的。

尽管蚯蚓组织积累的非相当有限，但蚯蚓活动改善了土壤的理化性质、生态功能，尤其是通气状况的改善对促进菲的生物降解至关重要。Mallakin^[10]认为，对于具有较稳定 π 键结构的PAHs分子而言，充足的氧气供给不仅能促进PAHs的起始氧化过程，也能促进土壤中好氧微生物的生长、强化其降解活性。此外，蚯蚓活动对高羊茅生长的促进，尤其是对根系生长的促进作用，对扩大根际效应范围、强化植物-微生物交互作用也具有十分重要的作用。

值得注意的是，与相同污染水平的土壤-植物系统相比，添加蚯蚓后植物组织积累的非均有所降低，重污染时根系积累量明显低于A组，植物积累对菲去除的贡献率也略低于A组，这可能与蚯蚓活动促进了土壤中菲的去除、残留量较低、供根系吸收的非资源相对较少有关。该现象也说明，蚯蚓活动在一定程度上能减少修复植物对PAHs的积累，降低其生态风险。

3 结论

(1) 菲在 20.06~322.06 mg·kg⁻¹ 范围内，蚯蚓活动促进了菲污染土壤中高羊茅的生长。与相同污染水平下植株相比，单株生物量增加 9.74%~21.53%，

根冠比增加 17.26%~21.44%。

(2) 蚯蚓活动能强化高羊茅对菲污染土壤的修复效果。添加蚯蚓 72 d 后，土壤-植物系统中菲的平均去除率较无蚯蚓时提高 9.02%。

(3) 中度污染(81.05 mg·kg⁻¹)时蚯蚓活动对菲去除的强化效应最明显(11.54%)；相同污染水平下，积累于植物组织中的菲也略低于无蚯蚓活动时。

(4) 蚯蚓活动对植物修复菲污染的强化效应主要是通过植物-微生物交互作用实现的，其对菲的强化去除率(5.73%)占总强化部分的 68.95%。

参考文献：

[1] LI X H, MA L L, LIU S F, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon in urban soil from Beijing, China[J]. Journal of Environmental Sciences, 2006, 18(5): 944-950.

[2] LEE S H, LEE W S, LEE C H, et al. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes[J]. Journal Hazardous Materials, 2008, 153: 892-898.

[3] CHILD R, MILLER C D, LIANG Y, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates: their association with plant roots[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2007, 75(3): 655-663.

[4] SCHEU S. Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives[J]. Pedobiologia, 2003, 47: 846-856.

[5] ERIKSEN-HAMEL N S, WHALEN J K. Earthworms, soil mineral nitrogen and forage production in grass-based hayfields[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40: 1004-1010.

[6] BRAUNER J S, WIDDOWSON M A, NOVAK J T, et al. Biodegradation of a PAH mixture by native subsurface microbiota[J]. Bioremediation, 2002, 6(1): 9-24.

[7] GAO Y Z, ZHU L Z. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils[J]. Chemosphere, 2004, 55: 1169-1178.

[8] PAN Shengwang, WEI Shiqiang, YUAN Xin, et al. The removal and remediation of phenanthrene and pyrene in soil by mixed cropping of Al-

- falfa and Rape[J]. Agricultural Sciences in China, 2008, 7(11): 1355-1364.
- [9] JOHNSON D L, JONES K C, LANGDON C J, et al. Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2002, 34: 1363-1370.
- [10] MALLAKIN A, DIXON D G, GREENBERG B M. Pathway of anthracene modification under simulated solar radiation[J]. Chemosphere, 2000, 40: 1411-1435.

Roles of earthworm (*Pheretima sp.*) in *Festuca arundinacea* remedying of soils polluted by phenanthrene

PAN Shengwang^{1,2}, WEI Shiqiang², YUAN Xin², CAO Shengxian²

1. Environment Science and Engineering Institute of Chengdu University, Chengdu, 610106, China;

2. College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing, 400716, China

Abstract: To evaluate the contribution of the soil macrofauna on the dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rhizosphere soil, a pot experiment was carried out to investigate effect of earthworm (*Pheretima sp.*) on *Festuca arundinacea* remedying soils polluted by phenanthrene (Phe) in, and role of biotic & abiotic factors in the process of dissipation of Phe in soils was estimated. Results showed that earthworm activity promoted growth of *Festuca arundinacea*, whose biomass per plant was 9.74%~21.53% larger than those in the treatment without earthworm introduced in, and apparently increased its root/shoot ratio, which was 17.26%~21.44% greater than those in corresponding non-inoculated soils at initial concentrations of Phe ranging from 20.05 to 322.06 mg·kg⁻¹ seventy-two days after earthworm was introduced in. During the experiment, averagely 77.38% of Phe was removed from the soils planted grass, which was 9.02% greater than those without earthworm introduced in, and 54.81% greater than the loss in non-vegetated soils without earthworm. Among all possible pathways including both biotic factors (e.g., plant metabolism and accumulation, earthworm tissues accumulation, microbial degradation and plant-microbial interactions, etc) and abiotic factors (e.g., leaching, volatilization, photodegradation and irreversible sorption, etc), the plant-microbial interaction was proved to be the primary means of Phe degradation, either with or without earthworm activity, and its contribution to the removal of Phe in planted soils accounted for up to 47.81% of the total removal, which was 5.73% higher than those in corresponding soils without earthworm. Besides the accumulation of Phe in grass was found to be reduced by incubation of earthworm in soils, thus the ecological risks of Phe could be relieved. The findings suggested a feasible way for the establishment of high-efficient phytoremediation of soil PAHs pollution by introducing earthworms into the soil-plant system.

Key words: phytoremediation; PAHs; phenanthrene; *Festuca arundinacea*; earthworm