

煤矿区土壤 FDA活性测定及优化

宋继华, 梁秋利

(神华(北京)遥感勘查有限责任公司, 北京 100083)

摘要: 针对煤矿区被污染土壤中微生物活性低、种群结构相对单一和污染物胁迫等特点, 对其土壤微生物的荧光素双醋酸酯 (FDA)活性测定的关键步骤进行探讨和优化。结果表明, 在煤矿区污染土壤的 FDA活性测定过程中, 培养时间选择 30 min符合活性反应线性范围并适宜试验测定, 以氯仿和甲醇 ($V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=2:1$)作为终止剂, 用量为 5 mL时可以经济、有效终止反应, 离心时间为 10 min时达到最大吸光值。以单位时间荧光素浓度来表征和规范 FDA活性的单位, 可为不同矿区土壤样品及污染土壤修复过程中的微生物活性测定与比较提供依据。矿区土壤 FDA活性较低, 仅为有机污染土壤生物修复反应土壤的 5%~10%, 可能对其生物修复产生一定制约, 应加强针对性调控。

关键词: 煤矿区土壤; FDA活性; 污染抑制; 测定优化

中图分类号: X53

文献标识码: A

文章编号: 1006-6772(2011)02-0074-04

煤矿区土壤污染评价及治理的类型主要集中在重金属、硫化物、氟化物及少量的放射性物质方面, 也有报道及研究开始涉及矿区土壤的有机污染^[1-3]。各种污染物对土壤微生物特性的影响直接关系到土壤的肥力、土壤基质风化与形成速度、土壤污染物去除速率等重要评价指标^[4-5], 受到越来越多的关注。

测定土壤微生物活性的方法有多种, 各种酶活性对应不同的污染物降解能力。在土壤酶和微生物活性测定中体现出各自的优势和适用性^[6-8]。与其他酶活性指标相比, 荧光素双醋酸酯 (Fluorescein Diacetate FDA)法测定的微生物活性为微生物总酶活性, 具有测定迅速、灵敏、测定方法简单的特点, 广泛应用于各种环境样本的分析, 如活性污泥^[9]、沉积生物膜、深海粘土^[10]和土壤^[11]等。由于应用对象的性质差别较大, FDA法具体操作步骤也各有差异。笔者着重针对煤矿区被污染土壤具有低微生物活性水平、污染物存在的干扰等特点, 从培养时间、FDA试剂用量、终止剂选择等方面入手, 重点

解决现行研究方法中终止手段缺乏、培养时间过长、活性单位不规范等问题。建立一套简便、有效、针对性强、规范的煤矿区污染土壤微生物活性测定的 FDA方法。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

供试土壤取自北京市某煤矿煤矸石堆积区, 置于密封袋中封好。运回实验室后于 4℃保存, 1周内分析土壤微生物数量、活性, 常温下其他基本理化性质参考土壤农业化学分析方法及文献[12-13]。

FDA(东京化成工业株式会社, 纯度 99.99%), 配制成 2 mg/mL FDA溶液(溶剂为丙酮); 终止剂为氯仿和甲醇混合液 ($V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=2:1$); 荧光素试剂(分析纯)购自北京化学试剂公司, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 煤矿区土壤 FDA活性测定

称取样品约 0.5 g于 100 mL锥形瓶中, 加入

收稿日期: 2010-12-21

作者简介: 宋继华(1964-)男, 陕西乾县人, 1988年毕业于西安科技大学, 高级工程师, 主要从事煤田地质、环境地质等研究工作。

15 mL磷酸缓冲液 (PH=7.6), 振荡混匀; 加入 2 mg/mL FDA溶液 0.2 mL启动反应, 于 30 °C下分别振荡培养 10 20 30 40 60 80 100 120 min, 通过反应体系上清液的吸光度与培养时间的线性关系确定适宜的培养时间。在达到优化的培养时间后, 立即加入 0.3 5 8 10 15 mL氯仿和甲醇 (V(氯仿):V(甲醇)=2:1)混合终止剂以终止反应, 充分振荡。通过比较静置 0 min和静置 10 min后 2个吸光度之间的相对误差, 以确定最佳的终止剂用量。

将已终止反应并振荡后的混合液转移至 10 mL离心管中, 在 2000 r/min转速下离心 3 5 8 10 12 15 min, 取上清液在 490 nm处测吸光度 D(λ)。以吸光度较大, 反应效果明显为标准来优化离心时间。

1.2.2 FDA活性表示方法标准化

分别吸取 0.1 mg/mL荧光素钠标准溶液 1 2 3 4 5 6 mL加入 50 mL容量瓶中, 分别稀释至 50 mL, 摇匀后得到 2 4 6 8 10 12 μg/mL的溶液, 于 490 nm处测定各溶液的吸光度, 绘制荧光素标准曲线, 对 D(λ)与荧光素浓度的关系进行拟合, 可得其换算公式为:

$$C_f = 8.0583 \times D(\lambda) + 0.646 \quad (1)$$

式中, C_f 和 $D(\lambda)$ 分别为荧光素质量浓度 (μg/mL)和吸光度。

将式(1)计算所得荧光素质量浓度根据 FDA活性测定的培养时间、体系体积等参数换算为文献中常用的荧光素量标准表示方法, 测定与计算基准为干土, 计算公式为:

$$U_{FDA} = \frac{C_f \times V}{m \times t} \quad (2)$$

式中, U_{FDA} 为土壤 FDA活性 (μg荧光素/(g·min), 以干土计); V 为 FDA测定体系总体积, mL; m 为土壤样品重量, g; t 为培养时间, min。

2 实验结果与讨论

2.1 培养时间的选择

选取 8个不同培养时间进行试验以确定最佳反应时间, 图 1为不同反应时间对微生物活性的影响。

由图 1可知, 10~30 min时吸光度与培养时间成直线关系, 说明反应的初始阶段符合吸光度与培养时间呈线性的酶活反应速率关系; 40 min后可能由于酶的合成作用吸光度明显增长; 在 120 min时吸光度略下降, 可能是由于底物量的限制。选择培养时间在微生物活性的线性范围内, 确定适宜的培

养时间为 30 min。

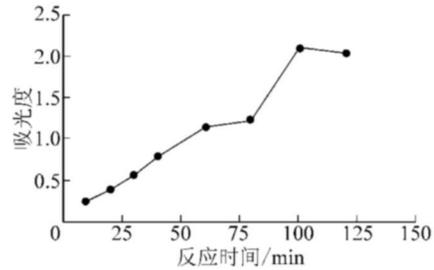


图 1 不同反应时间对微生物活性的影响

2.2 终止剂选择及用量确定

底泥及土壤微生物 FDA活性测定中常用的终止剂有丙酮^[14]、氯仿与甲醇^[15], 其他活性测定时常用的终止剂还有甲醛^[16]、浓硫酸等, 但甲醛和浓硫酸会使荧光素发生淬灭, 丙酮则会使波峰发生较大偏移, 而氯仿和甲醇则没有此类负面影响, 因此选用氯仿和甲醇 (V(氯仿):V(甲醇)=2:1)作为实验用终止剂。已有研究中没有指出终止剂准确用量, 因此本着既能有效终止反应又能尽量节省药剂的原则进行试验, 确定合理的终止剂用量, 选取了 6个不同剂量进行实验, 表 1为终止剂用量与吸光度关系。

表 1 终止剂用量与吸光度关系

D(λ)	终止剂体积/mL					
	0	3	5	8	10	15
反应 0 min	1.21	0.777	0.537	0.521	0.53	0.545
反应 10 min	1.14	0.731	0.516	0.53	0.535	0.543
相对误差/%	-6	-6	-4	2	1	-0.40

若静置前后吸光值相对误差的绝对值小于 5%, 即认为反应终止。由表 1可知, 5 8 10 15 mL都能有效终止反应, 但出于经济考虑, 最终选择 5 mL做为最佳的终止剂用量。

2.3 离心时间的优化

选取了 6个不同的离心时间进行实验, 图 2为不同离心时间对微生物活性的影响。

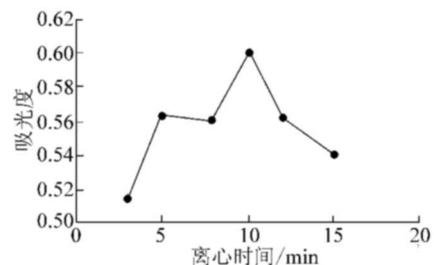


图 2 不同离心时间对微生物活性的影响

由图 2 可以看出, 在 10 min 时所测得的吸光值最大, 反应效果最明显, 因此优化后的离心时间为 10 min。

2.4 FDA活性换算及煤矿区土壤 FDA活性测定

文献中常用生成物荧光素的量来表示 FDA 活性 [10-11, 17], 以便于不同土壤样品及研究阶段的相互比较。将本研究测定的煤矿区污染土壤样品的吸光度值, 根据标准曲线公式及 FDA 活性计算公式换算为生成物荧光素的量来表示, 即以 μg 荧光素 / ($\text{g} \cdot \text{min}$) (以干土计) 为单位。图 3 为煤矿区土壤样品的 FDA 活性。

煤矿区土壤的 FDA 活性分布在 2~4 μg 荧光素 / ($\text{g} \cdot \text{min}$), 大部分土壤样品的酶活性则集中于 2.5~3.3 μg 荧光素 / ($\text{g} \cdot \text{min}$)。与一般高肥力土壤和反应器中活性较高土壤相比, 其活性水平较低, 仅为有机污染土壤生物修复反应器中 FDA 活性的 5%~10% [17]。对其进行生物修复时有必要针对煤矿区土壤的特点针对性采取添加刺激微生物增殖的营养物、调控 pH 值等措施, 全面提高土壤肥力, 促进微生物活性的提高。

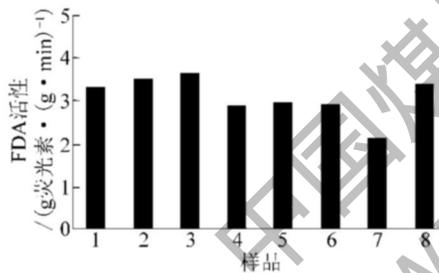


图 3 煤矿区土壤样品的 FDA 活性

3 结 语

(1) 研究针对煤矿区被污染土壤中微生物活性低、种群结构相对单一和污染物胁迫等特点, 构建起了适合煤矿区污染土壤的微生物荧光素双醋酸脂 (FDA) 活性方法。

(2) 以 μg 荧光素 / ($\text{g} \cdot \text{min}$) (以干土计) 为单位用荧光素的量来表征和规范矿区土壤 FDA 活性, 可对矿区不同土壤及生物修复过程中的微生物活性进行比较, 为矿区土壤的活性表征和生物修复可行性评价及生物修复效应预测提供依据。

(3) 煤矿区污染土壤 FDA 活性较低, 仅为一般有机污染土壤生物修复反应器土壤的 5%~10%, 可能会对其生物修复产生一定制约, 应加强针对性

调控, 以提高 FDA 活性, 提高煤矿区有机污染物的生物有效性。

参考文献:

- [1] 毕银丽, 全文智, 柳博会. 煤矸石堆放的环境问题及其生物综合治理对策 [J]. 金属矿山, 2005(12): 61-64
- [2] Querol X, Izquierdo M, Monfort E, et al. Environmental characterization of burnt coal gangue banks at Yangquan Shanxi Province, China [J]. International Journal of Coal Geology 2008 75(2): 93-104
- [3] 杨策, 钟宁宁, 王新伟, 等. 煤矿区表层土壤中饱和烃污染物的组成与分布 [J]. 土壤学报, 2007 44(4): 629-636
- [4] Bopathy R. Factors limiting bioremediation technologies [J]. Bioresource technology 2000 74(1): 63-67
- [5] 陈怀满. 环境土壤学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005 54-58
- [6] 吴义锋, 吕锡武, 仲兆平, 等. 河渠特定生态岸坡基质酶活性及细菌种群的动态特征 [J]. 化工学报, 2009 60(11): 2897-2902
- [7] Daniel Ufer, Peter M Huck. Measurement of Biomass Activity in Drinking Water Bifilters Using a Respirimetric Method [J]. Water Research 2001 35(6): 1469-1477
- [8] 白宇, 张杰, 陈淑芳, 等. 生物滤池反冲洗过程中生物量和生物活性的分析 [J]. 化工学报, 2004 55(10): 1690-1695
- [9] Fontvieille D A, Outaguerouine A, Thevenot D R. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: application to activated sludges [J]. Environmental Technology 1992 13(6): 531-540
- [10] Gumprecht R, Gerlach H, Nehrkorn A. FDA hydrolysis and resazurin reduction as a measure of microbial activity in sediments from the southeast Atlantic [J]. Microbial Processes 1995 49(1-4): 189-199
- [11] Adam G, Duncan H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils [J]. Soil Biology and Biochemistry 2001 33(7-8): 943-951
- [12] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1999 13-165
- [13] 贾建丽, 刘莹, 李广贺, 等. 油田区土壤石油污染特性及理化性质关系 [J]. 化工学报, 2009 60(3): 726-732
- [14] 刘海芳, 马军辉, 金辽, 等. 水稻土 FDA 水解酶活性的测定方法及应用 [J]. 土壤学报, 2009 6(2): 365

-367.

- [15] 陈嫣, 李广贺, 张旭, 等. 石油污染土壤植物根际微生物环境与降解效应[J]. 清华大学学报, 2005 45(6): 784-787.
- [16] 周恢, 左永, 赵怀颖, 等. MBR中污泥脱氢酶活性测定方法的改进[J]. 中国环保产业, 2006(12): 31-33
- [17] 戴冬娟. 载体强化油污土壤生物修复效应与机制研究[D]. 北京: 清华大学, 2005

Determination and optimization of FDA activity on coal mining area soils

SONG Jihua, LIANG Qili

(ShenHua(Beijing)Remote Sensing&Geo-Engineering Co., Ltd., Beijing 100085 China)

Abstract: The key steps parameters of microbial fluorescein d acetate (FDA) activity measurement method is discussed and optimized according to the low microbial activity unitary population structure and the stress due to the contamination by metal and organic matter in coal mining area. The microbial cultivation and analysis indicate that the absorbency is directly related to the cultivation time and 30 min is determined combined the liner discipline and pentose reaction. The volume of chloroform and methanol ratio is 2:1 mixing stopping agent (5 mL) is selected to terminate the reaction rapidly effectively and economically. The following centrifugal experiment of stopped reaction system show that the maximum absorbency is obtained after centrifuged for 10 min. At last the FDA activity is determined as the concentration of fluoresceine converted by specification curve which could provide convenient microbial activity comparing way and reference to soil samples in different coal mining areas as well as the remediation of polluted soil layer. The analyzing results show that FDA activity in coal mining area is just only 5% ~ 10% of the high activity ones, so the coal mine should strength regulate and control.

Key words: coal mining area soils, FDA activity, contamination control, determination and optimization

(上接第 70 页)

Application of CAST for coal mine sewage treatment

ZHANG Aiqing

(Department of Environmental Protection, Datong Coal Mine Group Co., Ltd., Datong 037003 China)

Abstract: In order to improve the environment of mining area, provide CAST based on sewage discharge features. Industrial wastewater which is up to standard and most coal mine sewage are disposed by CAST process. Adding combined reagent in main reaction area is the best way to satisfy the disposal requirement. The results indicate that this process can reduce the consumption of small scale sewage treatment plant, have a better adaptive ability to change of effluent quality and quantity. The effluent contains little sludge with good water quality which can be used in industry and the benefits are obvious.

Key words: CAST, coal mine sewage, mine area