

# 土壤有机污染生物修复技术影响因素的研究进展

沈定华 许昭怡 于 鑫 胡文勇

(南京大学环境学院 南京 210093)

**摘 要** 土壤有机污染的生物修复技术的论述很多, 本文则从对影响这些技术实施的因素进行综合评述, 例如污染物的性质、微生物自身特性等。

**关键词** 土壤; 污染; 生物修复; 影响因素

**中图分类号** X131.3

有毒有害污染物如果在人工环境中没有得到有效控制与去除, 会通过径流、潮汐、渗透等途径进入土壤和沉积层。这些有毒有害污染物中, 大部分是人工合成的化学品和石油及石油制成品, 它们经由食物链进入人体, 将直接危害人类的健康。对于已经被污染的生态环境, 必须应用生物技术等手段进行修复。

简单地讲, 生物修复技术 (Bioremediation) 是利用生物新陈代谢的方法将土壤、地下水和海洋中的有毒有害污染物吸收、转化或分解并从环境中去除。生物修复技术具有成本低、处理效果好以及对环境的二次污染小等优点, 被认为最有发展前景。但另一方面, 由于污染物的性质和污染现场的环境因素的差异, 往往在一个地点取得成功的修复技术在另一个地点不能达到预期的效果。因此, 研究人员在开发修复新技术的同时, 对生物修复的影响因素的确定与消除也开展了广泛的研究。本文从几个方面对这些因素进行综述。

## 1 污染物性质的影响

### 1.1 污染物的生物可降解性

土壤中的污染物种类繁多、性质各异, 其中相当一部分都是难生物降解的人工合成有机物和石油产品。它们的生物可降解性 (Biodegradability) 直接决定了修复手段的有效性。在生物降解评价实验过程中, 除了测定特定条件下化合物的减少量和生成物的增加量外, 通过测定微生物群落的生理指标来计算生物降解动力学参数是目前评价生物降解性中用得较多的方法<sup>[1]</sup>。

耗氧速率 (Oxygen uptake rate, OUR) 是指单位

时间内实验体系中溶解氧浓度的降低, 是表征微生物群落新陈代谢能力的一个重要指标。Kaja 等人已经在进入内源呼吸的活性污泥中加入取代酚类化合物, 使之成为微生物的唯一 C 源, 通过测定耗氧速率, 推导出米门公式中的基质消耗速率, 从而得到生物降解动力学参数<sup>[2]</sup>。微生物群落脱氢酶、过氧化物酶等酶学指标以及 ATP、DNA 含量的变化也可以用来评价某种有机物的降解特性。

研究人员开发了各种技术来测定单个有机物的生物降解性, 然而对有机化合物逐一进行试验, 显然是不可能的。将有机物的结构或者性质与其生物降解性联系起来的一种数学模型, 称为结构-生物降解性定量关系 (QSBR)。Banerjee 等利用纯菌株和自然水样研究氯酚、苯甲醚和间苯二酚的微生物降解性, 结果表明它们的二级降解速率常数 ( $K_b$ ) 随着正辛醇-水分配系数 ( $K_{ow}$ ) 的增加而降低, 相关性很好<sup>[3]</sup>。

一般说来, 结构简单的有机污染物比结构复杂的容易降解, 分子量小的有机物比分子量大的容易降解。芳香族有机物的生物降解性较脂肪族有机物差, 而且有机物所含苯环数目越多, 生物降解性越差<sup>[4]</sup>。

取代基的类型对有机物的生物降解性能也有很大的影响。羟基、氨基等的取代作用能够提高芳香烃的可降解性, 但氯取代基和硝基却会产生相反的影响。取代基的数量和相对位置也可造成芳香族有机物生物降解性能的差异。例如: 氯取代基数量越多, 芳香化合物的生物降解性越差; 邻位、间位、对位 3 种氯取代芳香化合物的生物降解性依次降低<sup>[4]</sup>。

### 1.2 污染物的生物可利用性

生物可利用性 (Bioavailability) 与生物降解性不同, 它指的是在多变的修复现场反应体系内有机污染物被微生物的同化或异化作用利用的数量大小。

低水溶性的物质, 例如石油和石油产品, 在土壤中形成独立的非水相 (Non-aqueous phase liquid, NAPL), 其与水相和固相的溶解平衡往往不遵守拉乌尔定律; 特别是它们不能被微生物直接利用, 而且容易产生生物毒害<sup>[5]</sup>。疏水性的污染物还容易被土壤颗粒吸附。目前的研究表明: 被吸附的污染物通常难以被微生物利用。因此当解吸所需的时间超过生物降解所需的时间时, 解吸速率便成为整个反应的限速步骤。许多研究者发现土壤被污染的时间越长, 越难以被修复<sup>[6,7]</sup>。这是因为随着污染时间的延长, 污染物逐渐扩散到一些极小的土壤微孔中, 这些微孔的内空隙比一般土壤微生物的体积长度要小, 阻挡了微生物的进入, 因而降低了污染物的生物可利用性。这就是所谓的微孔排斥作用。

为了消除非水相物质对修复效果的不利影响, 研究人员做了大量的工作。Reitsma和Watts等人发现土壤中的非水相物质与土壤中水相和固相之间的传质速率非常低, 他们用选择性氧化剂注射到污染土壤里, 使其与非水相物质反应, 增大土壤中三相间的传质速率, 使得修复工作变得比以前容易得多<sup>[8,9]</sup>。而Labare等人使用异位修复法, 将含非水相菲类化合物的土壤制成泥浆送入反应器, 增大了非水相物质转化率, 土壤中有机物降解的速率和程度都大大提高<sup>[10]</sup>。

由于表面活性剂能增大疏水性有机化合物的亲水能力, 因而近年来被广泛应用于改善土壤中非水相物质的生物可利用性。常用于污染土壤清洗修复的合成表面活性剂有: 非离子表面活性剂 (如乳化剂 (OP))、阴离子表面活性剂 (如十二烷基苯磺酸钠 (SLS))、阳离子表面活性剂 (如溴化十六烷基三甲铵 (CTMAB))。宋玉芳等<sup>[11]</sup>研究了吐温 80 (TW-80) 对土壤中多环芳烃降解的影响, 实验中发现, 凡是投加吐温 80 的土壤中, 其表面和土壤空隙中布满了微生物菌落, 表明了表面活性剂促进了微生物对多环芳烃的利用; 进一步的研究发现, 当投加吐温 80 浓度不同时, 土壤表面微生物优势菌落不同, 原因可能在于不同微生物群落对土壤环境因子改变的竞争适应关系。

由微生物、植物或动物产生的天然表面活性剂

称为生物表面活性剂 (Biosurfactants), 它们通常比合成表面活性剂的化学结构更为复杂, 单个分子占据更大的空间, 因而临界胶束浓度 (CMC) 较低, 清除土壤有机污染物效果较好。而且生物表面活性剂更易降解, 对生态系统很少有毒害作用。McCray 等人投加一种生物表面活性剂 Dirhamnolipid 对被石油污染的土壤进行辅助修复, 结果发现污染物的水溶性大大提高<sup>[6]</sup>, 而 Deziel 发现微生物在降解多环芳烃萘和菲过程中自身能产生以糖脂形式 (鼠李糖脂混合物) 存在的生物表面活性剂, 促进多环芳烃的降解和微生物的生长<sup>[12]</sup>。

## 2 微生物特性的影响

作为修复工具的微生物, 其来源、营养水平和生长环境也是影响生物修复过程的主要因素。

### 2.1 微生物的来源

总的说来, 可以用于生物修复的微生物大致可以分为两大类: 自然选择的微生物和基因工程菌 (Genetically engineered microorganisms, GEM)。

为了在受污染的环境中生存, 细菌之间可发生水平基因转移或细菌染色体内的基因重排、突变和复制, 以形成能够降解有机污染物的优势菌, 从而充分利用有机污染物作为生长基质或者共代谢有机污染物。这些经过恶劣条件自然选择幸存下来的微生物, 一般可以在污染现场找到, 被称为“土著菌”。当土著菌生长速度太慢、代谢活性不高, 或者由于污染物的高浓度和高毒性而造成土著菌数量下降甚至灭绝的时候, 需要接种一些“外来菌”。

随着生物化学及其相关学科的发展, 人们开始用更微观的方法在分子水平上研究微生物在环境工程中的应用, 即通过基因工程促进细菌的遗传进化以满足生物修复工程的需要。其主要手段有:

2.1.1 转移质粒构建质粒菌株 某一菌株仅局限于分解某一种化合物, 污染现场通常含有多种污染物, 因此有必要扩展某一特定菌株的分解范围。最直接的方法是通过接合作用或电穿孔将携带降解性基因的非自我转移性质粒转入受体菌株细胞内, 扩大受体菌株的底物谱。Chakrabarty 等人在 20 世纪 70 年代首先构建成功含有多种降解功能的细菌菌株。他们使用不同的质粒来构建分解石油中的一系列碳氢化合物的菌株, 即采用连续杂交法将降解芳烃、萜烯和多环芳烃的几个质粒经接合转移到一株能降解脂肪烃的假单胞菌上, 该菌株被称为

“Superbug”, 因为它的代谢能力远远高于其他菌株<sup>[13]</sup>。

**2.1.2 基因重组与诱变** 基因重组是首先从环境中筛选出具降解功能的菌株, 再从具有降解功能的菌株中分离出降解靶标污染物的功能性基因片段, 克隆进合适的载体, 转入受体菌内, 使受体菌获得新的降解表型, 标记筛选出转化成功的细胞。研究表明, 能降解甲苯的 *P. putida* 中的某些菌株也能够降解三氯乙烯。研究人员将这个基因片段移入大肠杆菌中进行表达, 基因重组后的大肠杆菌可以降解三氯乙烯<sup>[14]</sup>。

基因诱变则是改变编码一个或多个氨基酸的碱基序列, 扩大酶的降解谱, 提高酶的降解活力。

基因工程菌在实际应用中存在的问题主要集中在存活、繁殖及降解活性的保持和生态安全性方面, 这些都影响了它的修复效果。Yuhei 等人发现不管在实验室还是在污染现场, 基因工程菌在基质利用上总是竞争不过土著微生物 (特别在贫营养的现场), 因而存活时间不长; 而且一旦食物链中的上层捕食者如微型动物破坏了修复现场脆弱的生态平衡, 基因工程菌则不象土著菌那样容易恢复生长<sup>[15]</sup>。

在生态安全性方面, 早在 1985 年, Brill 就对基因工程菌用于农业和环境工程的安全性表示了关切, 他认为基因工程菌的引入势必会带来基因污染<sup>[16]</sup>。

虽然这些问题还没有得到很好的解决, 但基因工程菌降解能力强、降解谱广, 它的应用前景是很乐观的。

## 2.2 微生物的营养水平

土壤中的 N、P 水平是限制微生物活性的重要因素。为了使污染物得到最大程度的降解, 适当添加营养物显得尤为重要。例如添加酵母膏或酵母废液可以明显地促进石油烃类化合物的降解<sup>[17]</sup>。加入 N 和磷酸盐能明显地促进土壤中石油的生物降解作用, 尤其是在适当的 C:N:P 比例下。目前使用的营养盐种类很多, 如铵盐、磷酸盐或聚磷酸盐、酿造废液和尿素等。营养盐的浓度和比例通常要经过实验确定。微生物的活性除了受到营养的限制以外, 对电子受体的需求也是影响其生长繁殖的一个重要因素。最终电子受体的种类与浓度也极大地影响降解的速率与程度。最终电子受体主要可以分为以下 3 类: 溶解氧、有机物分解的中间产物和无机酸根 ( $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  等)<sup>[18,19]</sup>。已知的研究表明, 好氧条

件在大多数情况下有利于大多数污染物的生物降解。为增加修复现场的溶解氧, 可以采用一些工程措施, 例如: 用鼓风机向地下送氧; 通过管道添加一些能够快速释放氧原子的“产氧剂”, 如双氧水和过氧化钙(但在这种情况下, 一定要考虑“产氧剂”的生物毒性和环境遗留问题); 另外, 维持较低的水分浓度以及对土壤进行适度的耕作, 也可以使溶解氧维持在一个较高的水平上<sup>[20]</sup>。

一些在好氧条件下难以降解的化合物, 例如多氯联苯 (PCBs), 却在厌氧环境中可以降解。 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、铁离子和锰离子等都可以加入以作为电子受体加快降解速率, 尤其是在比较贫瘠的土壤中<sup>[21,22]</sup>。Mihelcic 研究发现, 多环芳烃 (PAH) 能在反硝化环境中更好地降解。因此向反应体系中加入硝酸盐以促进反硝化过程的发生, PAH 的降解速率与好氧环境中相比将大大提高。但值得注意的是, 在这种情况下必须考虑对地下水中的硝酸盐浓度的限制, 因为它们本身就是污染物<sup>[23]</sup>。

在添加营养物和电子受体的同时, 一定要注意它们的环境遗留问题。另外, 一些复杂的水文地质因素会使得添加物流失。Wrenn 等人用示踪物研究了受石油污染的特拉华湾海滩的修复现场, 发现潮汐、波浪以及地下水流带走了大量人工添加的营养物, 影响了土壤中微生物的正常生长<sup>[24]</sup>。

## 2.3 微生物的生长环境

有些微生物群会形成以特殊营养物为纽带的相互联系。例如, 诺卡氏菌能够单独氧化环己烷, 但必须有假单胞菌为其提供生长因子。如果环己烷是唯一的 C 源, 这两种细菌必须混合进行培养。有些微生物群则通过消耗抑制性产物而相互联系。这种关系的典型例子是, 甲烷菌产生的甲烷对假单胞菌的生长有抑制作用, 而生丝微菌属 (*Curtobacterium*) 则可以利用甲烷, 从而消除了对假单胞菌的抑制, 促进了其对有毒有害污染物的降解<sup>[25]</sup>。另外, 有些情况下, 微生物共代谢作用也不容忽视。共代谢是指微生物只有在初级能源物质存在时才能通过其诱导酶系完成降解。据报道, 一株洋葱假单胞菌 (*P. cepacia* G4) 以甲苯作为生长基质时可以对三氯乙烯共代谢降解<sup>[26]</sup>。还有研究表明, 某些微生物能共代谢氯代芳香类化合物。例如, 某些能分解苯酚或甲苯的微生物也具有分解二氯乙烯或三氯乙烯的能力。究其原因, 是因为微生物本身不能利用含氯化物, 因此要有其他能被微生物代谢的 C 源和能源

物质时才能生长<sup>[20]</sup>。

#### 2.4 植物修复以及微生物与植物的协同作用

修复现场的植被对修复效果也有着很大的影响。植物可释放一些物质到土壤中,刺激根区微生物的活性。例如 Fletcher 等<sup>[27]</sup>报导,桑树、桑橙树和苹果树被人们用来刺激能降解多氯联苯(PCB)和多环芳烃(PAH)的微生物生长,它们的根际产物包含黄酮类化合物和氧杂萘邻酮。研究表明:植物根区微生物生物量明显比空白土壤中大,这些增加的微生物能增加土壤中有有机物质的降解<sup>[28]</sup>。植物还能改善土壤的通气条件,阻止有机物向地下水扩散。不仅如此,植物释放到土壤中的酶系统还能直接或间接降解不能被细菌单独转化的有机物。例如杂交杨树对 TCE(三氯乙烯)的修复结果的研究表明,杂交杨树可有效吸收 TCE,并且可把它降解成三氯乙醇、氯代酮,最后降解成二氧化碳。因此有研究人员认为,最好、最迅速的筛选接种微生物的地点应该在污染现场植物的根区<sup>[29,30]</sup>。

由于植物大大增强了修复效果,近年来向修复现场引入适当的植物成为了生物修复的热门方法。植物修复是利用植物的生长吸收、转化有机污染物的一种修复方式。植物修复有机污染有 3 种机制:

直接吸收并在植物组织中积累非植物毒性的代谢物; 释放促进生物化学反应的酶; 强化根际(根-土壤界面)的矿化作用<sup>[28~30]</sup>。

### 3 其他环境因素的影响

修复工程的现场气象因素,如温度、风速、常年风向、大气湿度和降水情况等;水文地质因素,如不渗水层与含水层的深度、地下水位(要考虑季节因素)和地下水流类型与特点、地面冻土深度以及洪水频度等等,都对一个修复工程起着重要的作用。

### 4 结 语

生物修复技术是一门方兴未艾的污染治理技术,近年来得到了迅速的发展。目前,国外在生物修复技术的应用及影响因素方面开展了广泛的研究,取得了一定的进展。我国在这方面的研究尚处于起步阶段。今后的研究将向以下几个方面发展:(1) 由于许多有机污染物,特别是持久性有机污染物(POPs)在土壤中的生物降解机理还没有完全明了,可以加强对它们的生物降解性与生物可利用性的研究;(2) 以分子生物学手段修饰高效降解菌来

增强微生物的降解能力,扩大降解范围;(3) 电子受体与营养物的共同作用。

#### 参考文献

- 1 张晓健,黄霞,林金海. 农药废水有机物生物降解性能及难降解有机物治理对策. 环境科学学报, 1995, 15 (1): 114 ~ 119
- 2 Orupöld Kaja, Maširin Aleksei, Tenno Toomas. Estimation of biodegradation parameters of phenolic compounds on activated sludge by respirometry. Chemosphere, 2001, 44: 1273 ~ 1280
- 3 Banerjee S. Development of a general kinetic model for biodegradation and its application to chlorophenols and related compounds. Environ. S.T., 1984, 18: 416 ~ 424
- 4 Arcangeli, Jean-Pierre, Arvin Erik. Biodegradation rates of aromatic contaminants in biofilm reactors. Water Science and Technology, 1995, 31: 117 ~ 128
- 5 McCray John E, Bai Guiyun, Maier Raina, et al. Biosurfactant-enhanced solubilization of NAPL mixtures. Journal of Contaminant Hydrology, 2001,48: 45 ~ 68
- 6 Killham K. Effect of substrate location in soil pore-water regime on carbon turnover. Soil Biol. Biochem., 1993, 25: 57 ~ 62
- 7 Saripalli K P, Rao PSC, Annable MD. Determination of specific NAPL-water interfacial areas of residual NAPLs in porous media using the interfacial tracers technique. Journal of Contaminant Hydrology, 1998, 30: 375 ~ 391
- 8 Reitsma S, Dai QL. Reaction-enhanced mass transfer and transport from non-aqueous phase liquid source zones. Journal of Contaminant Hydrology, 2001, 49: 49 ~ 66
- 9 Watts Richard J, Stanton Patrick C. Mineralization of sorbed and NAPL-phase hexadecane by catalyzed hydrogen peroxide. Water Research, 1999, 33: 1405 ~ 1414
- 10 Labare, Michael P, Alexander Martin. Enhanced mineralization of organic compounds in nonaqueous-phase liquids. Environmental Toxicology and Chemistry, 1995, 14: 257 ~ 265
- 11 宋玉芳,孙铁珩,许华夏. 表面活性剂TW-80对土壤中多环芳烃生物降解的影响. 应用生态学报, 1999, 10: 230 ~ 232
- 12 Deziele PG. Biosurfactant production by a soil Pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 1908 ~ 1912

- 13 瞿礼嘉, 顾红雅. 现代生物技术导论. 北京: 高等教育出版社, 1998, 190 ~ 198
- 14 Leahy Joseph G, Tracy Karen D, Eley Michael H. Degradation of mixtures of aromatic and chloroaliphatic hydrocarbons by aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43: 271 ~ 276
- 15 Inamori Yuhei, Murakami Kazuhito, Sato Ruka, et al. Interactions between gems and indigenous microorganisms in aquatic ecosystem. *Water Science and Technology*, 1996, 34: 397 ~ 405
- 16 Brill WJ. Safety concerns and genetic engineering in agriculture. *Science*, 1985, 227: 381 ~ 384
- 17 Atlas RM. Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 1995, 31: 178 ~ 182
- 18 Kao CM, et al. Intrinsic bioremediation of trichloroethylene and chlorobenzene: field and laboratory studies. *Journal of Hazardous Materials*, 1999, 69: 67 ~ 79
- 19 Middeldorp Peter JM, et al. Stimulation of reductive dechlorination for in situ bioremediation of a soil contaminated with chlorinated ethenes. *Water Science and Technology*, 1998, 37: 105 ~ 110
- 20 马文漪, 杨柳燕. 环境微生物工程. 南京: 南京大学出版社, 1996, 254 ~ 260
- 21 Caldwell Matthew E, Tanner Ralph S, Suflita, Joseph M. Microbial metabolism of benzene and the oxidation of ferrous iron under anaerobic conditions: Implications for bioremediation. *Anaerobe*, 1999, 5: 595 ~ 603
- 22 Ferguson JF, Pietari JMH. Anaerobic transformations and bioremediation of chlorinated solvents. *Environmental Pollution*, 2000, 107: 209 ~ 215
- 23 Mihelcic JR. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under denitrification condition in soil-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54: 1182 ~ 1187
- 24 Wrenn, Brian A, Suidan Makram T, Strohmeier Kevin L, et al. Influence of tide and waves on washout of dissolved nutrients from the bioremediation zone of a coarse-sand beach: Application in oil-spill bioremediation. *Spill Science & Technology Bulletin*, 1997, 4: 99 ~ 106
- 25 Little CD. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54, 4: 951 ~ 956
- 26 Shields, Malcolm S, Francesconi, Stephen C. Microbial degradation of trichloroethylene dichloroethylenes and aromatic pollutants. *Journal of Cleaner Production*, 1997, 5: 140
- 27 Fletcher JS, Hegde RS. Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation. *Chemosphere*, 1995, 31: 3009 ~ 3016
- 28 丁克强, 骆永明. 多环芳烃污染土壤的生物修复土壤, 2001, 33 (4): 169 ~ 178
- 29 桑伟莲, 孔繁翔. 植物修复研究进展. *环境科学进展*, 1999, 7: 39 ~ 44
- 30 易筱筠, 党志, 石林. 有机污染物污染土壤的植物修复. *农业环境保护*, 2002, 21: 477 ~ 479

## AFFECTING FACTORS IN BIOREMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED WITH ORGANIC MATTER

SHEN Ding-hua   XU Zhao-yi   YU Xin   HU Wen-yong

(School of the environment, Nanjing University, Nanjing 210093)

**Abstract** Bioremediation technology is widely discussed, while this paper presents a review on affecting factors in bioremediation of soils contaminated with organic matter. Many aspects are considered, including various properties of organic pollutants and microorganisms.

**Key words** Soil, Pollution, Bioremediation, Factors