

农药污染土壤的生物强化修复技术研究进展^①

高寒, 陈娟*, 王沛芳, 王超

(浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 河海大学, 南京 210098)

摘要: 生物强化作为一种新型、高效的生物修复技术在污染治理中具有独特优势。针对目前土壤农药污染现状, 本文介绍了土壤微生物修复方法中的生物强化技术的概念及内涵, 探讨了在污染土壤环境中影响生物强化修复效率的生物及非生物因素, 重点阐述了生物强化技术在 4 大类农药(有机氯类、有机磷类、拟除虫菊酯类杀虫剂和三嗪类除草剂)污染土壤修复中的研究进展及应用实例, 并提出生物强化技术面临的问题和未来研究方向。

关键词: 农田土壤; 农药污染; 生物强化; 修复

中图分类号: X53 **文献标识码:** A

自 20 世纪 90 年代开始, 农药使用量在全球范围内呈快速上升趋势。1991 年, 我国农药使用总量(商品量, 下同)为 76.53 万 t, 2013 年迅速增长到 180.19 万 t, 增长了 135.5%, 年均增长率高达 7.4%。在农药使用量快速增长的同时, 中国农药的施用强度也在不断增加。截至 2013 年, 我国单位面积农药施用量是世界平均水平的 2.5 倍^[1]。据统计, 农田中施用的农药量仅有 30% 左右附着在农作物上, 其余都扩散到土壤和大气中, 导致土壤中农药残留量增加, 造成严重的农田土壤农药污染^[2]。有机氯类农药是一种具有难降解性、高生物累积性、半挥发性和高毒性的持久性有机污染物。尽管有机氯类农药在大多数国家已禁止使用, 但其高历史残留仍是亟待解决的环境问题。有机磷类、拟除虫菊酯类农药应用广泛, 且因与土壤有较强的结合能力而极易在土壤中残留。有机磷类农药在土壤的结合残留高达 26%~80%, 而拟除虫菊酯类农药的结合残留量达 36%~54%。近年来, 除草剂需求量增大, 约占农药产量比重的 1/3^[3]。这些农药的大量生产、不合理施用和滥用所造成的土壤污染问题日益凸显, 进而影响农产品品质和人类健康^[4]。随着人们对农产品安全和品质需求的提升, 土壤农药污染的治理与修复已受到广泛重视, 对经济型、高效型农药污染土壤修复技术的研究已成为环境科学领域的研

究热点。

目前, 农药污染土壤的修复方法主要有物理法、化学法和生物法等^[5-6]。尽管物理法和化学法具有周期短、修复效率高等优点, 但工程量较大、费用高、易产生二次污染, 且对于低残留的农药污染土壤适用性差, 很难大规模应用到实际污染土壤治理中^[7]。而生物修复因具有经济低耗、适用范围广、无二次污染、对环境扰动性小等优点在农药污染土壤治理中具有巨大应用潜力^[8]。其中, 生物强化作为一种新兴的生物修复技术在污染治理中具有改善环境修复能力、高效降解污染物、提高处理负荷等优势^[9-10]。本文介绍生物强化技术的概念及内涵, 探讨影响生物强化修复效率的环境因素, 阐述生物强化技术在 4 大类农药(有机氯类、有机磷类、拟除虫菊酯类杀虫剂和三嗪类除草剂)污染土壤修复中的研究进展, 并提出生物强化技术面临的问题和进一步研究的方向。

1 生物强化技术的概念及内涵

生物强化技术是向特定环境体系中(例如土壤、活性污泥、沉积物、水体等)投加功能微生物, 用来去除有机污染物的一项新型生物修复技术。该技术基于微生物可利用有机污染物作为生长所需物质, 将具有特定功能的微生物投入传统生物处理系统中, 从而

基金项目: 国家自然科学基金委创新群体项目(51421006)、国家自然科学基金重点项目(41430751)、国家自然科学基金面上项目(51779077)、国家自然科学基金重大研究计划培育项目(91747104)、中央高校科研基本业务费项目(2016B04014)、湖泊与环境国家重点实验室开放基金项目(2016SKL013)、国家重点研发计划项目(2018YFC0407604)、江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(201710294007Y)资助。

* 通讯作者(chenjuanmn@hhu.edu.cn)

作者简介: 高寒(1996—), 男, 天津人, 硕士研究生, 主要从事污染土壤修复研究。E-mail: 13622177209@163.com

增加功能微生物的生物量、强化有机物降解能力、提高降解速率,最终达到去除某一特定环境中难降解有机污染物的目的^[11]。一般适用于污染区域内土著微生物群代谢能力不足以降解目标污染物或者土著微生物群无法降解目标污染物等情况^[9-10]。针对如今农田土壤的农药污染问题,生物强化技术可通过向土壤环境中投放经过筛选的、对目标污染物具有高效降解能力的细菌、真菌或其菌群来增强土壤环境体系对污染物的代谢潜力^[12]。

适合应用于生物强化技术的菌种应满足以下条件:降解效率高、扩繁速度快、易培养、对高浓度污染物具有强耐受性并可以在多种环境条件下生存^[10,13-14]。高效降解菌种主要有 3 种来源:土著菌种、外来菌种和基因工程菌种。土著菌种修复方法是从受污染的环境中分离得到对某种污染物具有降解能力的微生物,经富集培养后重新投放入同一地域,相比原始土著微生物,此类菌种对污染物的降解能力显著提高^[15]。外来菌种修复方法是当土著菌群无法良好发挥作用时,将其他地域中的高效降解菌种引入到待修复区域并使其发挥作用^[16]。基因工程菌修复方法主要是通过质粒转化、基因重组和原生质体融合 3 种方法构建具有特异性降解能力的功能菌种。相比普通菌种,此类菌种的污染修复能力、对污染环境的耐受能力均明显提高^[17]。

现有的农药高效降解菌大都是从受农药污染的土壤、污泥或是废水中分离,再经富集培养以后获得的,分析菌种的降解性能后,将其引入待修复区域(图 1)。在降解菌实际应用时,通常以菌剂形式投加到待修复环境中。这种降解菌剂是将多种降解菌按特定比例混合制成的粒状或粉末状固体,其中还含有无机营养物可供降解菌生长与增殖^[18]。在降解菌剂施用后,所含的降解菌种可以将有机污染物降解、转化、降低毒性,同时降解菌不断增殖,进而提高其降解能力^[19]。这种修复方法效率高、二次污染程度小,具有广阔的应用前景。近年来,基于高效降解菌的生物强化技术已被应用于多种农药污染土壤的修复中,包括有机氯类农药、有机磷类农药、拟除虫菊酯类农药、三嗪类除草剂等。

2 生物强化技术修复农药污染土壤的影响因素

在生物强化技术实际应用于农药污染土壤修复时,多种因素可影响其修复效果。这些影响因素主要分为两类:生物因素和非生物因素,具体包括降解菌接

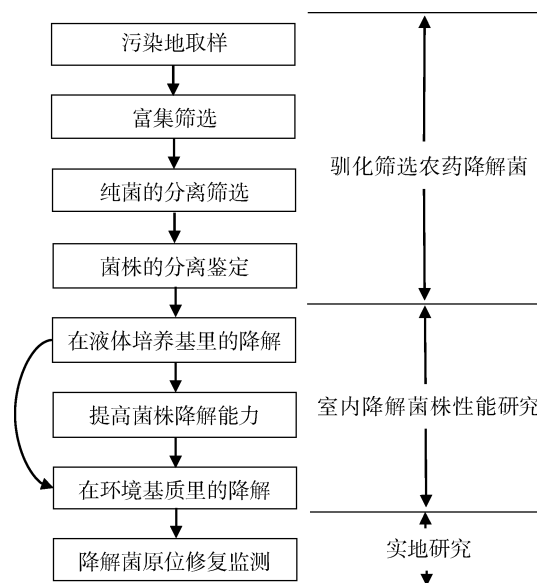


图 1 农药污染地生物强化降解菌筛选应用流程
Fig. 1 Screening of pesticide-degrading microorganisms for bioaugmentation of contaminated sites

种量^[20-22]、温度^[20,23]、土壤水分^[24-25]、土壤 pH^[20,26-27]、土壤有机物含量^[20,28]及初始农药含量^[29]等。

在生物因素方面,降解菌的接种量是最重要的影响因素之一。将外源降解菌加入到待修复土壤中后,土著菌与其竞争营养物质,导致土壤中降解菌数量下降^[21]。接种量不足会降低降解菌的降解效率,而过量接种则造成菌株浪费和成本提高。因此,确定适宜的降解菌接种量是生物强化技术应用的关键。已有研究发现,当降解菌接种量小于 10^4 cells/g 土时,仅有少量降解菌在初始营养竞争中存活并在农药降解中发挥作用^[29]。Singh 等人^[30]分离得到有机磷农药毒死蜱降解菌 *Enterobacter* sp., 在毒死蜱初始含量为 35 mg/kg 土情况下,当该降解菌的接种量高于 10^5 cells/g 土时,毒死蜱降解迅速、效果明显;当接种量低于 10^3 cells/g 土时并无降解效果。Karpouzias 和 Walker^[20]在研究 *Pseudomonas putida* epl 降解有机磷农药灭线磷时发现,在农药初始含量为 10 mg/kg 土情况下,当接种量为 10^6 cells/g 土时,仅需 4 d 即可将灭线磷完全降解;当接种量为 10^5 或 10^4 cells/g 土时,灭线磷的降解速率明显下降;当接种量为 10^3 cells/g 土时,降解菌并没有发挥有效的降解作用。王光利等人^[22]研究 *Pigmentiphaga* sp. strain D-2 对新型杀虫剂啉虫脒污染土壤的修复效果时发现,在农药初始含量为 50 mg/kg 情况下,当接种量为 2×10^5 cfu/g 或 2×10^6 cfu/g 时,啉虫脒的完全降解需要 7 d 时间;但接种量为 2×10^8 cfu/g 时,仅需 3 d 啉虫脒的降解率就可达 97.8%。综上,在考虑经济因素的基础上,目前普遍认为实现农药污染物

高效降解的最佳接种量为 $(10^6 \sim 10^{10})$ cells/g 土^[20, 22, 30]。

在非生物因素方面, 土壤 pH 不仅影响污染土壤中农药的稳定性, 还会影响降解菌的活性和降解效率^[31-32]。洪源范等人^[27]在研究甲氰菊酯降解菌 *Sphingomonas* sp. JQL4-5 时发现, 当初始农药含量为 20 mg/kg 土时, 在酸性土壤中(pH 3.5 ~ 4.5)该菌株生长受到低 pH 抑制, 其生物强化作用很弱; 在中性土壤中(pH 6.5 ~ 7.5)生物强化效果最佳, 如 pH 为 7.5 时甲氰菊酯在第 12 天时被完全降解; 碱性环境下甲氰菊酯易分解, 在 pH 8.5、9.5 的土壤中, 由于其自身分解的影响, 生物强化效果在 6 d 后开始下降。Li 等人^[33]研究了不同土壤 pH 条件下降解菌 *Sphingomonas* sp. Dsp-2 的生物强化效果, 发现降解菌在 pH 4.8 和 pH 8.7 的土壤中对毒死蜱(初始含量 100 mg/kg 土)的 7.0 d 降解率分别为 58.1% 和 98.7%。在另一项关于毒死蜱降解的研究中, Yang 等人^[34]向毒死蜱初始含量为 100 mg/kg 的土壤中加入毒死蜱降解菌 *Stenotrophomonas* sp. YC-1, 在 pH 从 4.3 增加到 7.0 的过程中毒死蜱的降解率逐渐提高; 当 pH 7.0 ~ 8.4 时, 毒死蜱降解率并无明显变化。以上研究表明, 相比低 pH 的酸性土壤, 中性或弱碱性土壤更有利于农药降解菌发挥降解作用, 这可能是因为偏酸性土壤环境会降低一些微生物(尤其是细菌)的活性^[35]。

除土壤 pH 以外, 土壤温度、含水量、有机物含量等非生物因素也会影响污染土壤的生物强化效率。在温度方面, Hong 等人^[21]发现有机磷农药杀螟松降解菌 *Burkholderia* sp. FDS-1 在 30℃ 时其降解效果最佳, 在 20℃ 以及 40℃ 时降解速率相对较低(初始农药含量为 50 mg/kg 土)。Karpouzas 和 Walker^[20]对降解菌 *Pseudomonas putida* epI 降解灭线磷的研究结果表明, 初始农药含量 10 mg/kg 土情况下, 相比温度为 5℃ 时, 该降解菌在 20℃ 或 35℃ 时对灭线磷的降解速率显著提高。一般认为利用降解菌进行的生物强化修复最佳温度范围为 25 ~ 35℃, 这是由于在此温度范围内最适宜微生物活动, 温度过高或过低微生物活性均会下降, 影响降解菌发挥作用^[36]。在土壤含水量方面, Singh 等人^[30]研究降解菌 *Enterobacter* sp. 降解毒死蜱时发现, 在农药初始含量为 35 mg/kg 土情况下, 当土壤含水量低于 30% 时, 农药降解速率缓慢; 当土壤含水量高于 40% 时, 农药降解效果较好, 此时若增加含水量, 农药降解效果无显著变化。石利利等人^[25]选用含水量为 50% 以及 150% 的两种土壤, 研究 *Plesiomonas* sp. DLL-1 对甲基对硫磷农药(初始含量为 45 mg/kg 土)的降解效果, 结果发现 24 h

后两种土壤中甲基对硫磷的降解率均高于 95%, 表明高含水量有利于提高生物强化效率。在土壤有机物含量方面, Karpouzas 和 Walker^[20]研究发现, 在初始农药含量为 10 mg/kg 土情况下, 当土壤有机物含量较低时, 降解菌 *Pseudomonas putida* epI 对灭线磷的降解速率较快; 而降解速率随有机物含量增高而下降。这可能是由于低有机质土壤对有机物的吸附能力较低, 有利于提高农药的生物可利用性; 反之, 高有机质土壤吸附能力较强, 农药的生物可利用性低, 降低了降解菌对农药的生物去除效率。

在实际应用中, 生物强化技术大多将农药降解菌制成降解菌剂, 将其大面积喷洒于农田土壤中。此方法既无法保证降解菌在原位修复中的生物活性, 也无法将菌剂在待修复区域固定, 对农药的去除效率具有一定影响。侯少锋^[37]研究溴氰菊酯降解菌剂原位修复效果时发现, 溴氰菊酯的田间残留虽比室内试验低, 但喷洒菌剂后其降解率远低于室内试验结果, 推测为天气等环境因素所致。因此菌剂固定装置的设计与应用在农药污染土壤的原位修复中显得尤为重要。

此外, 生物强化修复时所添加的降解菌有时仅能将农药降解成中间产物, 并不能完全将其矿化, 中间产物具有毒性且会抑制降解菌的生长, 降低其降解效率, 成为影响生物强化的另一重要因素^[38]。为解决这一问题, 一方面可采用连续生物强化的方法, 即根据特定农药污染物的降解途径, 重复多次接种降解菌; 另一方面可将高效降解菌固定于某些特定的载体材料上, 以提高降解菌应对变化环境的能力, 提高引入降解菌的生存能力和降解活性^[39-40]。

3 生物强化技术在农药污染土壤修复中的应用

3.1 有机氯农药污染土壤的生物强化技术研究

有机氯农药是一种毒性高、残留度高、对环境危害大的持久性有机污染物。虽然很多国家已经禁用此类农药, 但由于其化学性质稳定、半衰期较长, 这类农药在土壤中被广泛检出, 对自然环境、动植物乃至人类健康具有潜在威胁, 因此其修复技术备受关注。

滴滴涕(DDT)是一种被禁用多年, 但在环境中仍有高残留度的有机氯农药, 其化学名称为双对氯苯基三氯乙烷^[41]。对 DDT 污染土壤的修复一直是研究热点和难点, 近年来人们尝试利用生物强化修复方法来降低其环境残留。Fang 等人^[23]将 DDT 降解菌 *Sphingobacterium* sp. strain D-6 接种于污染土壤中, 60 d 后土壤中 o,p'-DDT 和 p,p'-DDT 含量分别为

0.014 和 0.007 mg/kg, 明显低于未接种土壤的 o,p'-DDT (0.021 mg/kg 土壤)和 p,p'-DDT 含量(0.009 mg/kg)。此外, Purnomo 等人^[42]研究了真菌对 DDT 的降解能力, 发现 3 种褐腐真菌 *Gloeophyllum trabeum*、*Daedalea dickinsii* 和 *Fomitopsis pinicola* 引入经灭菌的 DDT 污染土壤后, DDT 的降解率分别为 41%、15% 和 9%; 而在未经灭菌的另一实验组中 *G. trabeum*、*D. dickinsii* 和 *F. pinicola* 对于 DDT 的去除率分别为 43%、32% 和 29%, 这说明引入的真菌与土著降解菌可协同增强生物强化的修复效果。潘淑颖等人^[43]研究表明对 DDT 具高耐受性的 *Sphingobacterium* sp. 和白腐真菌在不加入有机质时, 21 d 后对 DDT 的降解率均达到 83%(DDT 初始含量为 220.3 mg/kg); 在向土壤中加入有机质后, 白腐真菌降解 DDT 的效果更加显著并表现出较好的环境适应性, 说明土壤有机质含量是影响白腐真菌对 DDT 降解效率的重要因素。

在基因工程菌方面, Gao 等人^[44]从土著 DDT 降解菌 *Sphingobacterium* sp. D-6 中提取调控降解效率的质粒 pDOD, 转化 *E. coli* TG1, 重组构建特异性降解 DDT 的基因工程菌 *E. coli* TG1 (pDOD); 将 *E. coli* TG1 (pDOD)接种于污染土壤 210 d 后, DDT 去除率达到 50.7%(初始农药含量为 0.6 mg/kg), 而在未接种的土壤中去除率仅为 16.2%(初始农药含量为 0.8 mg/kg); 同时, 土壤中微生物丰度在接种基因工程菌第 15 天时为 2×10^4 cfu/g 土, 而在第 210 天后增长至 4×10^7 cfu/g 土。这说明利用基因重组技术制备基因工程菌在修复 DDT 污染土壤中可发挥重要作用。

另一类环境残留量较高的有机氯农药是六六六(HCH)及其异构体, HCH 的化学名称为六氯环己烷。我国曾大规模使用 HCH 作为杀虫剂, 对农田土壤环境造成大面积污染。虽然我国已于 1983 年禁止生产 HCH, 但由于其高毒性、化学性质稳定、难降解等特点, 目前我国部分区域农田土壤中的 HCH 残留量依然很高, 是土壤农药污染修复的重要方面。工业生产的 HCH(t-HCH)中主要包含 α 、 β 、 γ 、 δ 四种异构体, 其中 α -HCH 占 67%~70%、 β -HCH 占 5%~6%、 γ -HCH 占 13%~15%、 δ -HCH 占 6%^[45]。Garg 等人^[46]驯化获得可降解 t-HCH 的菌群, 该菌群的优势菌种为 *Sphingobium* sp. UM1、*Sphingobium* lucknowense F2、*Sphingobium* chinhatense IP26、*Sphingobium* sp. HDIPO4 和 *Sphingobium* indicum B90A。在将该降解菌群加入受 t-HCH 污染的灭菌土壤(初始含量为 5 mg/g)30 d 后, t-HCH 的去除率达到 65%; 而在未灭菌的土壤中接种该菌群 30 d 后, t-HCH 的去除率达

到 62%。

在 HCH 的 4 种异构体中, γ -HCH 是有机氯农药林丹的主要成分。与 DDT 和六六六相同, 林丹作为毒性较高的持久性有机污染物, 已被多个国家限制或禁止使用, 但其环境残留问题同样非常严重^[47]。Abhilash 等人^[48]从生长于受林丹污染土壤的植物根际分离得到 *Kocuria rhizophila*、*Microbacterium resistens*、*Staphylococcus equorum*、*Staphylococcus cohnii* spp. *urealyticus*, 这 4 个菌株可以用来提高土壤微生物对林丹的分解代谢能力, 用林丹含量为 5、50、100 mg/kg 的污染土壤来模拟低、中、高程度污染, 发现 *S. cohnii* spp. *urealyticus* 加入 45 d 后对林丹含量为 5、50 mg/kg 土壤的降解率分别达 100% 和 70%。Boltner 等人^[49]研究表明 *Sphingomonas* spp. 可有效提高土壤中林丹降解率, 这是由于该属细菌可以生长于植物根部并参与植物的根际修复。植物根部所释放的分泌物可促进细菌生长和代谢活性, 从而提高农药污染修复效果。

除上述农药外, 生物强化技术还应用于有机氯农药硫丹的污染土壤修复中。Odukkathil 和 Vasudevan^[50]利用可产生表面活性剂的 3 株细菌(*Bordetella petrii* I GV 34、*B. petrii* II GV 36 和 *Achromobacter xyloxydans* GV 47)组成的菌群修复受硫丹污染的土壤(α -硫丹和 β -硫丹初始含量分别为 0.6~3.4 mg/g 和 0.3~3.1 mg/g), 结果发现污染土壤中 α -硫丹和 β -硫丹在 25 d 后被完全去除。另一研究中, Arshad 等人^[51]发现在土壤匀浆中接种硫丹降解菌 *Pseudomonas aeruginosa* 可大大提高环境中硫丹的去除率。

3.2 有机磷农药污染土壤的生物强化技术研究

由于 20 世纪有机氯农药的使用在多个国家地区受到限制, 随着农药的不断发展, 有机磷农药逐步进入市场, 并成为现今使用最广泛的农药品种。

毒死蜱是使用较广泛的有机磷农药。在利用生物强化技术修复毒死蜱污染土壤方面, Yang 等人^[52]发现菌株 *Stenotrophomonas* sp. YC-1 可以毒死蜱作为唯一碳源和磷源, 将毒死蜱水解为 3,5,6-三氯吡啶-2-酚(TCP); 将该菌株接种于毒死蜱初始含量为 100 mg/kg 的土壤 15 d 后, 毒死蜱去除率达到 100%, 然而在未接种降解菌的对照组土壤中降解率仅为 24%。Li 等人^[33]研究了毒死蜱降解菌 *Sphingomonas* sp. Dsp-2 的生物修复效果, 发现在毒死蜱含量为 100 mg/kg 的土壤中接种该降解菌 7 d 后毒死蜱去除率达 90%, 30 d 后达 98%。Lakshmi 等人^[53]筛选获得 4 株可降解毒死蜱的细菌(*Pseudomonas fluorescens*, *Brucella melitensis*,

Bacillus subtilis 和 *P. aeruginosa*), 将他们分别接种于毒死蜱含量为 50 mg/kg 的土壤中, 30 d 后毒死蜱去除率为 85%~92%, 而在未接种的对照组土壤中, 毒死蜱 30 d 去除率仅为 34%; 在这 4 株降解菌中, 只有 *P. aeruginosa* 可以在 20 d 内将部分毒死蜱分解为中间产物 TCP, 并且能够在 30 d 内将 TCP 完全降解。

甲基对硫磷作为另一种常用的有机磷农药, 如何利用生物强化技术对其污染土壤进行修复也是目前关注的问题。Wang 等人^[54]研究发现相比未接种降解菌的对照组, 将甲基对硫磷降解菌 *Pseudomonas* sp. strain WBC-3 接种于污染土壤后(甲基对硫磷初始含量为 0.536 mg/g), 甲基对硫磷仅用 13 d 即可完全降解, 降解效率显著提高, 表明利用生物强化技术接种特异性降解菌对于去除甲基对硫磷具有重要作用。赵倩等人^[55]研究生物强化技术在竹林土壤中对甲基对硫磷的应用效果, 土壤中甲基对硫磷初始含量为 15 mg/kg, 接种降解菌 *Plesiomonas* sp. DLL-1 5 d 后表层土壤中甲基对硫磷的去除率为 88.6%, 而 10 d 后去除率达到 98.8%; 该结果表明 *Plesiomonas* sp. DLL-1 可有效降解甲基对硫磷, 但该菌株去除农药速率随时间明显减缓, 这可能是由于在后期低含量农药残留时, 降解菌优先利用土壤中其他有机物作为能源生长, 进而导致农药去除速率降低。

针对有机磷农药杀螟硫磷, 人们也对其污染土壤进行了生物强化修复效果的评估。Hong 等人^[21]将杀螟硫磷降解菌 *Burkholderia* sp. FDS-1 接种于受该农药污染的土壤中(农药初始含量为 50 mg/kg), 发现降解菌接种量对土壤中杀螟硫磷的去除效果影响较大, 确定较为合适的接种量为 2×10^6 cfu/g 土, 在此接种量下 3 d 内可将 97.6% 的杀螟硫磷转化为其主要代谢产物 3-甲基-4-硝基苯酚(MNP), 并在 15 d 内将 MNP 降解完全; 而未接种降解菌的对照组土壤在 15 d 内仅有 30.4% 的杀螟硫磷被去除, 且其大部分被转化为中间产物 MNP。

此外, 生物强化技术在实际应用时经常出现降解菌存活率低、降解活性差等情况, 为解决这一问题, 人们尝试将植物修复与微生物修复相结合, 以提高降解菌的丰度和活性。例如, Yang 等人^[56]在修复毒死蜱污染土壤时发现, 在接种毒死蜱降解菌 *Alcaligenes faecalis* DSP3 的土壤中种植甘蓝或黑麦草, 可显著加快毒死蜱降解, 当在毒死蜱初始含量为 50 mg/kg 的污染土壤中种植甘蓝时, 接种降解菌 *Alcaligenes faecalis* DSP3, 12 d 后毒死蜱被完全降解, 而未种植物土壤中仅有 22% 的毒死蜱被降解。

3.3 拟除虫菊酯类农药污染土壤的生物强化技术研究

拟除虫菊酯类农药具有高度疏水性, 可与土壤颗粒及有机物紧密结合, 容易下渗对地下水造成污染^[57]。氯氰菊酯、甲氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯和联苯菊酯都属于拟除虫菊酯类农药, 对土壤中这几种农药的生物强化去除技术研究进展做如下介绍。

Akbar 等人^[58]研究发现在氯氰菊酯含量为 200 mg/kg 的土壤中接种降解菌 *Acinetobacter calcoaceticus* MCm5、*Brevibacillus parabrevis* FCm9 或 *Sphingomonas* sp. RCm6, 接种量为 1×10^7 cells/g 土的情况下, 在第 42 天土壤中氯氰菊酯总去除率为 90%~100%; 而对于未接种降解菌的对照组土壤, 第 42 天的去除率仅为 44%。Akbar 等人^[59]的研究结果表明, *Bacillus megaterium* JCM2、*O. anthropi* JCM1 和 *Rhodococcus* sp. 3 株细菌对土壤中氯氰菊酯也具有高效降解能力。

Chen 等人^[60]研究了降解菌 *Bacillus* sp. DG-02 对受甲氰菊酯污染土壤的生物强化效果, 发现该降解菌可显著提高土壤中甲氰菊酯的去除率; 当土壤中甲氰菊酯初始含量为 50 mg/kg 时, 利用生物强化技术可将甲氰菊酯在土壤中的半衰期从 37.1 d 缩短至 5.4 d。此外, Hong 等人^[61]将编码甲基对硫磷水解酶的 *mpd* 基因转入甲氰菊酯降解菌 *Sphingobium* sp. JQL4-5 的染色体中, 构建基因工程菌, 结果表明该工程菌对甲氰菊酯与甲基对硫磷均具有降解作用。

在溴氰菊酯的生物强化应用方面, Cycoń 等人^[62]利用两株 *Serratia marcescens*(DeI-1 和 DEI-2)去除土壤中溴氰菊酯, 发现在接种两种降解菌的土壤中, 农药降解率均大幅提升(溴氰菊酯初始含量为 100 mg/kg); 试验结束时, 接种 DeI-1 和 DEI-2 的土壤中, 溴氰菊酯的去除率分别为 61%~82% 和 70%~92%, 而未接种降解菌的对照组中溴氰菊酯去除率为 41.8%~59.8%。这项研究表明 *Serratia marcescens* 在溴氰菊酯的生物强化去除中具有应用潜力。

Chen 等人^[63]发现利用降解菌 *Stenotrophomonas* sp. ZS-S-01 的生物强化技术是去除土壤中氰戊菊酯及其水解产物 3-苯氧基苯甲酸的有效方法, 其试验结果表明, 向污染土壤(初始含量为 50 mg/kg)中接种该降解菌 9 d 后氰戊菊酯的去除率为 93.4%, 未接种的对照组中降解率仅为 28.7%; 同时, 接种降解菌的土壤中氰戊菊酯的水解产物 3-苯氧基苯甲酸在 10 d 内去除率达 81.4%, 而对照组中只有 9.7%。

在生物强化应用中大都使用细菌作为降解菌, 实际上, 真菌对去除环境中农药残留也具有一定的作

用。研究表明,真菌对农药的去除能力主要来源于其木质素降解酶,因此真菌可以对众多农药或毒剂产生非常有效的降解作用^[64]。Chen 等人^[65]对真菌 *Candida pelliculosa* ZS-02 生物强化修复联苯菊酯污染土壤的研究结果表明,在初始污染物含量为 50 mg/kg 的土壤中,接种该真菌 10 d 后联苯菊酯的去除率达 75%;而未接种该真菌的对照组土壤中,联苯菊酯的降解率仅为 8.4%,这充分说明某些真菌在生物强化去除农药中可发挥重要作用。

3.4 三嗪类除草剂污染土壤的生物强化技术研究

目前已有多项利用生物强化技术去除土壤中三嗪类除草剂的研究。Morgante 等人^[66]研究三嗪类除草剂西玛津降解菌 *Pseudomonas* sp. strain MHP41 的生物强化效果,结果表明,在未被污染的土壤中,加入 10 mg/kg 西玛津并接种降解菌,28 d 后西玛津去除率达 89%;而未接种降解菌的对照组土壤中西玛津去除率仅为 55%。对于长期污染土壤,降解菌的接种使土壤中所含西玛津的去除速率显著增加,同时改变了土壤中原有微生物的群落结构。Wan 等人^[67]研究利用生物强化技术将西玛津降解菌 *Arthrobacter* sp. SD1 加入西玛津初始含量为 100 mg/kg 的土壤后发现,降解菌 SD1 的加入显著提高了 6 d 内土壤中西玛津的去除率,但这种生物强化去除效率受土壤营养水平的影响,如过高的无机氮水平会抑制降解菌对西玛津的降解效果。Guo 等人^[68]利用 *Arthrobacter* sp. SD1 研究尿素对生物强化去除西玛津的影响时发现,低含量尿素(200 mg/kg)可提高西玛津的降解率,但当尿素含量高达 1 000 mg/kg 时会抑制生物强化进程。

针对除草剂阿特拉津污染土壤的生物修复技术研究表明,生物强化技术与生物刺激技术相结合可以更好去除土壤中农药污染残留。生物刺激是指向微生物生存环境中添加适合剂量的营养物质,以为微生物创造良好环境条件,提高微生物的代谢能力,最终加快微生物对目标污染物的去除速率^[69]。Lima 等人^[70]的研究表明,当土壤中添加的阿特拉津含量为其推荐施用剂量的 200 倍时,单独利用生物强化技术可在 8 d 内去除污染土壤中 79% 的阿特拉津;而将生物强化与生物刺激技术结合,向土壤环境中额外添加 4.8 mg/kg 的柠檬酸盐时,阿特拉津去除率提高到 87%。这说明生物强化与生物刺激相结合可有效提高修复效率。Wang 等人^[71]研究发现降解菌 *Arthrobacter* sp. strain DAT1 可高效去除农田土壤中阿特拉津残留,向初始污染含量 400 mg/kg 的土壤中接种该降解菌 3 d 后阿特拉津去除率达 90%。此外,Wang 等人^[71]还利

用末端限制性片段长度多态性分析技术(TRFLP)监测阿特拉津污染土壤中接种菌的活性及代谢潜能,同时利用荧光定量 PCR 技术监测降解基因 *trzN*、*atzB* 和 *atzC* 的表达,结果表明降解基因丰度及降解菌 *Arthrobacter* sp. strain DAT1 的相对丰度随生物强化的处理时间延长呈连续增长趋势。

除上述两种三嗪类除草剂外,Silva 等人^[72]已将细菌 *Arthrobacter aurescens* TC1 成功应用于除草剂特丁津污染土壤的修复中,结果表明,将 *Arthrobacter aurescens* TC1 接种于特丁津含量为 3.8 mg/kg 的土壤后,污染土壤中的特丁津可在 3 d 内快速降解,其去除率达 95%;而未接种降解菌的土壤中特丁津在第 14 天的残留量仍高达 70%。

4 结语

随着农业需求的快速增长,农药施用量大大增加,我国农田土壤受农药污染也随之日益加重,如不及时治理修复,残留于土壤中的农药会随土壤下渗水进入地下水,造成更为严重的水体污染,对生态系统和人类健康造成潜在危害。治理土壤农药污染在进行源头控制、低毒性替代品研发以及常规物理化学法修复时,应充分发挥生物强化技术在污染土壤修复中的优势,使生物强化技术与其他修复方法有效结合,提高生物强化对农药污染的去除效率,改善土壤环境质量。综合现有研究成果和不足,未来对生物强化修复技术的研究可在以下方面展开:提高降解菌对农药的降解能力,驯化分离或利用基因工程构建广谱性降解菌,使其在多种农药污染的土壤环境中发挥修复作用。目前降解菌向土壤中的投加方法多为直接喷洒法,此方法存在很多弊端,既不能准确控制降解菌投加位置也无法保证降解菌在土壤环境中的代谢活性。为解决这一技术弊端,可通过设计研究菌剂固定装置,将降解菌有效固定于待修复区域,提高其环境适应能力。将生物强化技术与其他修复方法相结合以提高修复效率。例如,向土壤中添加适合的营养物质或采用植物-微生物联合修复方法,为微生物提供稳定的生存条件,加强土著降解菌与外来降解菌种的代谢能力,激发微生物对农药的降解潜能,提高其对重污染区域的修复能力。重点研究生物强化原位修复土壤污染的实际应用方法,促使其大范围推广使用,并使其市场化、商品化等。

参考文献:

- [1] 陈晓明,王程龙,薄瑞,等.中国农药使用现状及对策建议[J].农药科学与管理,2016,37(2):4-8

- [2] 仲维科, 郝骥, 孙梅心, 等. 我国食品的农药污染问题[J]. 农药, 2000, 1(7): 1-4
- [3] 苏少泉. 加入 WTO 后我国农业与除草剂发展[J]. 现代化农业, 2003, 291(10): 4-6
- [4] 谢慧, 朱鲁生, 谭梅英. 吡虫啉在土壤中的降解动态及对土壤微生物的影响[J]. 土壤学报, 2016, 53(1): 232-240
- [5] 李顺鹏, 蒋建东. 农药污染土壤的微生物修复研究进展[J]. 土壤, 2004, 36(6): 577-583
- [6] 李亚平, 胡艳芳, 杨凡昌, 等. 拟除虫菊酯类农药光降解的研究进展[J]. 土壤, 2015, 47(1): 14-19
- [7] 赵玲, 滕应, 骆永明. 中国农田土壤农药污染现状和防控对策[J]. 土壤, 2017, 49(3): 417-427
- [8] 倪妮, 宋洋, 王芳, 等. 多环芳烃污染土壤生物联合强化修复研究进展[J]. 土壤学报, 2016, 53(3): 561-571
- [9] 吕华. 生物强化技术在环境修复中的应用进展[J]. 北方环境, 2011, 23(6): 48-49
- [10] Mrozik A, Piotrowska-Seget Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds[J]. Microbiological Research, 2010, 165(5): 363-375
- [11] 徐军祥, 杨翔华, 姚秀清, 等. 生物强化技术处理难降解有机污染物的研究进展[J]. 化工环保, 2007, 27(2): 129-134
- [12] Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review[J]. Bioresource Technology, 2000, 72(2): 169-183
- [13] Singer A C, Gast C J V D, Thompson I P. Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(2): 74-77
- [14] Thompson I P, Gast C J V D, Ciric L, et al. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(7): 909-915
- [15] 孙炜, 熊振湖, 刘春, 等. 生物强化及在环境污染生物治理中的新进展[J]. 天津城市建设学院学报, 2006, 12(1): 50-54
- [16] Semrany S, Favier L, Djelal H, et al. Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of bio-refractory organic compounds (Bio-ROCs) [J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 69(51): 75-86
- [17] 王悦. 基因工程菌生物强化性能及土著降解菌特性研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2013
- [18] 文娅, 赵国柱, 周传斌, 等. 生态工程领域微生物菌剂研究进展[J]. 生态学报, 2011, 31(20): 6287-6294
- [19] 滕应, 骆永明, 李振高. 污染土壤的微生物修复原理与技术进展[J]. 土壤, 2007, 39(4): 497-502
- [20] Karpouzias D G, Walker A. Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epl to degrade ethoprophos in soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32(11/12): 1753-1762
- [21] Hong Q, Zhang Z, Hong Y, et al. A microcosm study on bioremediation of fenitrothion-contaminated soil using *Burkholderia* sp. FDS-1[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 59(1): 55-61
- [22] 王光利, 张辉, 熊明华, 等. 降解菌 *Pigmentiphaga* sp. strain D-2 对吡虫脒污染土壤的生物修复作用[J]. 环境工程学报, 2014, 8(2): 775-781
- [23] Fang H, Dong B, Yan H, et al. Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 184(1/2/3): 281-289
- [24] Schroll R, Becher H H, Dörfner U, et al. Quantifying the effect of soil moisture on the aerobic microbial mineralization of selected pesticides in different soils[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(10): 3305-3312
- [25] 石利利, 林玉锁, 徐亦钢, 等. DLL-1 菌在土壤中对甲基对硫磷农药的降解性能与影响因素研究[J]. 环境科学学报, 2001, 21(5): 597-600
- [26] Grundmann S, Fuss R, Schmid M, et al. Application of microbial hot spots enhances pesticide degradation in soils[J]. Chemosphere, 2007, 68(3): 511-517
- [27] 洪源范, 洪青, 沈雨佳, 等. 甲氧菊酯降解菌 *Sphingomonas* sp. JQL4-5 对污染土壤的生物修复[J]. 环境科学, 2007, 28(5): 1121-1125
- [28] Cycoń M, Żmijowska A, Wójcik M, et al. Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils[J]. Journal of Environmental Management, 2013, 117: 7-16
- [29] Ramadan M A, Eltayeb O M, Alexander M. Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(5): 1392-1396
- [30] Singh B K, Walker A, Wright D J. Bioremediation potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: Influence of different environmental conditions. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38(9): 2682-2693
- [31] Drufovka K, Danevčič T, Trebše P, et al. Microorganisms trigger chemical degradation of diazinon[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(3): 293-296
- [32] Cycoń M, Wójcik M, Piotrowskaseget Z. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil[J]. Chemosphere, 2009, 76(4): 494-501
- [33] Li X H, He J A, Li S P. Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the *mpd* gene[J]. Research in Microbiology, 2007, 158(2): 143-149
- [34] Yang C, Liu N, Guo X, et al. Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 265(1): 118-125
- [35] Singh B K, Walker A, Morgan J A, et al. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium FEMS microbiology letters. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5198-206

- [36] 李晓亮, 秦智伟, 侯利园, 等. 土壤环境因素对残留农药降解的影响[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(4): 132–135
- [37] 侯少锋. 溴氰菊酯降解菌剂的制备与应用[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016
- [38] Megharaj M, Ramakrishnan B, Venkateswarlu K, et al. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective[J]. Environment International, 2011, 37(8): 1362–1375
- [39] Colla T S, Chen J W, Enggiap G, et al. Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(4): 2592–2602
- [40] Saez J M, Benimeli C S, Amoroso M J. Lindane removal by pure and mixed cultures of immobilized actinobacteria[J]. Chemosphere, 2012, 89(8): 982–987
- [41] 潘淑颖. 土壤中有有机氯农药 DDT 原位降解研究[D]. 济南: 山东大学, 2009
- [42] Purnomo A S, Mori T, Takagi K, et al. Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(5): 691–695
- [43] 潘淑颖, 马光辉, 常勇, 等. 土壤中 DDT 的微生物修复研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(3): 1058–1060
- [44] Gao C M, Jin X, Ren J, et al. Bioaugmentation of DDT-contaminated soil by dissemination of the catabolic plasmid pDOD[J]. Journal of Environmental Sciences, 2015, 27: 42–50
- [45] Kumari R, Subudhi S, Suar M, et al. Cloning and characterization of *lin* genes responsible for the degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonas paucimobilis* strain B90[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6021–6028
- [46] Garg N, Lata P, Jit S, et al. Laboratory and field scale bioremediation of hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soils by means of bioaugmentation and biostimulation[J]. Biodegradation, 2016, 27(2/3): 179–193
- [47] Salam J A. Remediation of lindane from environment - An overview[J]. Springer Berlin Heidelberg, 2012: 55(1): 350–363
- [48] Abhilash P C, Srivastava S, Singh N. Comparative bioremediation potential of four rhizospheric microbial species against lindane[J]. Chemosphere, 2011, 82(1): 56–63
- [49] Boltner D, Patricia G, Jesus M, et al. Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*[J]. Microbial Biotechnology, 2008, 1(1): 87–93
- [50] Odukkathil G, Vasudevan N. Residues of endosulfan in surface and subsurface agricultural soil and its bioremediation[J]. Journal of Environmental Management, 2016, 165: 72–80
- [51] Arshad M, Hussain S, Saleem M. Optimization of environmental parameters for biodegradation of alpha and beta endosulfan in soil slurry by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(2): 364–370
- [52] Yang C, Liu N, Guo X, et al. Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 265(1): 118–125
- [53] Lakshmi C V, Kumar M, Khanna S. Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(2): 204–209
- [54] Wang L, Chi X Q, Zhang J J, et al. Bioaugmentation of a methyl parathion contaminated soil with *Pseudomonas* sp. strain WBC-3[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 87(1): 116–121
- [55] 赵倩, 陈双林, 叶雪均, 等. 竹林土壤中甲基对硫磷降解菌的降解效果及其与土壤物理特性的关系[J]. 环境工程学报, 2009, 3(7): 1325–1328
- [56] Yang L, Zhao Y, Zhang B, et al. Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 251(1): 67–73
- [57] Oudou H C, Hansen H C B. Sorption of lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate to quartz, corundum, kaolinite and montmorillonite[J]. Chemosphere, 2002, 49(10): 1285–1294
- [58] Akbar S, Sultan S, Kertesz M. Determination of cypermethrin degradation potential of soil bacteria along with plant growth-promoting characteristics[J]. Current Microbiology, 2015, 70(1): 75–84
- [59] Akbar S, Sultan S, Kertesz M. Bacterial community analysis of cypermethrin enrichment cultures and bioremediation of cypermethrin contaminated soils[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(7): 819–829
- [60] Chen S H, Zhang C, Deng Y, et al. Fenpropathrin biodegradation pathway in *Bacillus* sp. DG-02 and its potential for bioremediation of pyrethroid-contaminated soils[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(10): 2147–2157
- [61] Hong Y F, Zhou J, Hong Q, et al. Characterization of a fenpropathrin-degrading strain and construction of a genetically engineered microorganism for simultaneous degradation of methyl parathion and fenpropathrin[J]. Journal of Environmental Management, 2010, 91(11): 2295–2300
- [62] Cycoń M, Żmijowska A, Piotrowska-Seget Z. Enhancement of deltamethrin degradation by soil bioaugmentation with two different strains of *Serratia marcescens*[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2014, 11(5): 1305–1316
- [63] Chen S H, Yang L, Hu M, et al. Biodegradation of fenvalerate and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Stenotrophomonas* sp. strain ZS-S-01 and its use in bioremediation of contaminated soils[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(2): 755–767

- [64] Rhodes C J. Applications of bioremediation and phytoremediation[J]. Science Progress, 2013, 96(4): 417-427
- [65] Chen S H, Luo J, Hu M, et al. Microbial detoxification of bifenthrin by a novel yeast and its potential for contaminated soils treatment[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30862
- [66] Morgante V, Lopezlopez A, Flores C, et al. Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 71(1): 114-126
- [67] Wan R, Yang Y, Sun W, et al. Simazine biodegradation and community structures of ammonia-oxidizing microorganisms in bioaugmented soil: Impact of ammonia and nitrate nitrogen sources[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(4): 3175-3181
- [68] Guo Q W, Wan R, Xie S G. Simazine degradation in bioaugmented soil: Urea impact and response of ammonia-oxidizing bacteria and other soil bacterial communities[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(1): 337-343
- [69] Morillo E, Villaverde J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils[J]. Science of the Total Environment, 2017, 586: 576-597
- [70] Lima D, Viana P, Andre S, et al. Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: The effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches[J]. Chemosphere, 2009, 74(2): 187-192
- [71] Wang Q F, Xie S G, Hu R. Bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. strain DAT1 for remediation of heavily atrazine-contaminated soil[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 77: 63-67
- [72] Silva V P, Matilde M S, Carla M, et al. Evaluation of *Arthrobacter aurescens* strain TC1 as bioaugmentation bacterium in soils contaminated with the herbicidal substance terbutylazine[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144978

Bioaugmentation Remediation of Pesticide-contaminated Soil: A Review

GAO Han, CHEN Juan*, WANG Peifang, WANG Chao

(Key Laboratory of Integrated Regulation and Resource Development on Shallow Lakes of Ministry of Education, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: Bioaugmentation, a new and efficient bioremediation technology, has unique advantages in the treatment of contaminated soils. In view of the current situation of pesticides-contaminated soils, this paper introduces the bioaugmentation and its application in degrading pesticides and analyzes the biotic and abiotic factors that influence bioaugmentation. Special attention is paid to research progresses and application of bioaugmentation in the remediation of the soils contaminated by organochlorinated, organophosphorus, pyrethroids and triazine pesticides. The countermeasures to the problems of bioaugmentation as well as the further research direction are put forward.

Key words: Farmland soil; Pesticide contamination; Bioaugmentation; Remediation