

生物整治技术进展

林 力 杨惠芳

(中国科学院微生物所, 北京 100080)

摘要 综述了对于污染位点的难降解污染物和生物外源性污染物进行降解的原理与技术进展. 生物整治的基本原理是对于具体的污染位点, 应根据有利于污染物毒性降低和生物可利用性增加以及微生物活性增加3个原则选择适当的治理措施. 文中述及的原位和非原位生物整治技术包括: 添加营养, 接种外源降解菌, 生物通气, 土地处理, 堆肥式处理, 生物堆层和泥浆技术. 还讨论了收集场地信息和评价治理效果的方法.

关键词 生物整治, 污染位点, 难降解污染物, 生物外源性污染物, 微生物, 生物可利用性, 微生物活性.

生物整治(Bioremediation)是利用生物处理系统中微生物的作用减少污染现场(contaminated site)有害物的浓度或使其完全无害化. 它是传统的生物处理方法的延伸, 其新颖之处在于它治理的对象是较大面积的污染. 由于现场环境的复杂多样, 产生了一些不同于治理点源污染的新的概念和技术措施.

生物整治最成功的例子是清除 Alaska Exxon valdez 的海岸石油污染(Hap P^[1]). 经过治理, 近百里海岸的环境质量获极大改进. 成功的例子还有 Hu Samuel S 和 Lumsden S (1993)^[2] 实施的现场原位治理石油烃污染的土壤和地下水, Semprini 和 Lewis (1995)^[3] 进行的生物整治含氯溶剂污染的地下水.

1 生物整治的原则

生物整治是一种利用微生物的代谢作用提高和扩大污染物降解速度和范围的治理环境污染的重要方法. 由于每个污染现场都有其特殊性, 治理时应采用的措施不同, 在选择这些治理措施时, 主要考虑的原则包括生物化学, 生物可利用性和生物活性3个方面^[4].

1.1 生物化学(biochemistry)

生物整治中的生物化学是指过程使污染物朝毒性降低的方向转化, 它对改善环境质量是有益的. 这是每一个污染现场能否应用生物整

治技术的首要标准. 以土壤中污染的烃为例, 烃的生物转化包括矿化(转化成 CO₂、碳酸盐、甲烷、无机盐和水), 形成降解烃的真菌和细菌的菌体, 土壤有机物及难降解的中间代谢产物. 在实际工作中, 常用毒性生物分析(toxicity bioassays)检测在降解过程中毒性是否下降, 用它代替繁冗的对具体代谢产物的化学分析.

Wang X 和 Bartha K (1990)^[5] 治理煤油污染的土壤, 用细菌发光抑制反应实验和植物生长实验分别检测污染物在土壤中的毒性, 结果表明, 土壤中的毒性已降低到污染前的水平. Caroquino M J 等(1992)^[6] 治理煤油污染的地下水, 也明显地去除了地下水中的有毒物.

污染位点的土壤和水长时间与污染物接触后, 可以在其中逐渐富集出一定数量的毒物降解菌, 当营养充分条件适宜时, 这些降解菌群的协同作用能将污染物逐步降解, 使其最终无害化. 然而, 对于某些难降解的和人工合成的生物外源性污染物, 需要接种高效降解菌.

广泛使用的除草剂氯乙异丙啉(Atrazine)是最常在土壤和地下水中被检出的农药污染物之一, 它的矿化过程主要由微生物完成. 它的降解进行得十分缓慢, 在土壤中其半衰期超过1a; 一般在农田中施用1a后, 它仅能被降解40%.

Nasser A (1994)^[7]从长期施用这种农药的土壤分离到一个混合微生物培养物,在液体培养中,7d内就可将0.56mmol/L的氯乙异丙嗪矿化96%,在土壤中,它可以使0.14mmol/L的该除草剂在25d内完全降解。145d后,它的中间产物羟基氯乙异丙嗪也在土壤中完全消失。同位素分析表明,在土壤中含有0.14mmol/L的氯乙异丙嗪。接种降解菌后,土壤中该农药的矿化速度比不接种提高了20倍。

常被用作木材防腐剂的五氯酚(PCP)是一种难降解的芳香烃。Colores和Gregory M (1995)^[8]分离到的细菌,在液体培养中能降解浓度为300mg/L的PCP。研究者还确定了该菌在土壤中降解PCP的能力,在土壤中,该菌能完全矿化300,600,900和1200 $\mu\text{g/g}$ 的PCP,PCP浓度升至1500 $\mu\text{g/g}$ 时,该菌不再能对其矿化。该菌能矿化高浓度的PCP,表明了它在生物整治中应用的前景。

Relley L (1995)^[9]报道了一株能降解高分子量多环芳烃(PAH)的菌株,该菌株能在培养6d后,将一个菲、蒽、芘和苯并芘的混合物去除74%。

Brazil G M等(1995)^[10]报道了用遗传工程菌降解土壤中的多氯联苯,他们将多氯联苯降解基因转入假单胞菌中,使其变为能利用多氯联苯作为唯一碳源生长的菌株。现场实验表明,这株遗传工程菌在土壤中竞争生存良好,能长期在污染的土壤中存在。多氯联苯在制冷剂和大负荷电器设备中大量应用,是人工合成的毒性最高的材料之一,无法自然分解。这一研究结果为生物整治多氯联苯提供了又一可能途径。

Kim Sang Yong(1994)^[11]将混合的烃降解菌固定化,用于治理烃污染的土壤,也取得了良好的效果。

Erickson L Z D等(1995)^[12]运用植物和细菌共同组成的生态系统有效地去除多环芳烃的污染。发现高等植物可提供微生物生长的碳源和能源,根系周围好氧菌数量多,水溶性差的芳香烃,如菲、蒽以及三氯乙烯在根系旁能被迅速

降解。他们还发现,根周围渗出液的存在,能提高降解微生物的活性。

利用微生物产生的酶处理难降解物的研究也有报道,Eyadi和Selloul R. R(1995)^[13]报道了过氧化氢酶用于橄榄油废水脱色。

微生物的广泛适应性和代谢的多样性,为它们降解有毒物提供了广泛的可能,遗传工程菌、固定化细胞、酶制剂等不同生物技术的运用,有利于微生物发挥作用,降解微生物的研究是生物整治技术的基础。对其深入研究将拓宽生物整治技术应用的范围。

1.2 生物可利用性(bioavailability)

生物整治中的生物可利用性,是指在污染的土壤和水体中释放污染物的形式特点。这些特点影响微生物对污染物的吸收和代谢,从而影响生物降解的速度。

污染物的物理化学特点决定它的生物可利用性。如低水溶性物质形成独立的非水相,该相因毒性太大,不能直接生物降解。疏水的污染物,如石油烃,PCBs和某些疏水性强的化合物极易吸附到水中的固体上,化合物运动减少,降低了其可利用性。利用表面活性剂提高污染物的生物可利用性,也已被广泛研究。Fu M H和Alexander M(1995)^[14]报道了表活剂能提高非水相中的烃化物的生物降解。加入Triton X-100增加了菲矿化速度和程度。Aronstein B N等(1993)^[15]的研究表明,非离子表活剂能提高土壤中菲和联苯的降解程度。他们的研究还试图证明,低浓度的表活剂能促进污染位点疏水污染物的降解,却不会移动到地下水层引起新的污染。

影响生物可利用性的因素还有:地表下的不均一性,水力传导性,污染物的分布特性和初始污染物的数量。腐植质类物质也影响生物可利用性。土壤聚集成块减慢污染物的扩散,打碎土块则能加快毒物的降解。

Mc Fariand M J等(1994)^[16]用化合物的质量平衡方法研究了PCP去除、矿化、挥发和残余代谢产物在生物降解活跃的土壤中的变化。当PCP负荷在10mg/kg至80mg/kg范围

内处理45d后,去除率为93%至26%。通过估计PCP在土壤孔隙水中的水溶性,该研究者建立了一个简单的生物化学模型,借以估计被PCP污染了的土壤的生物处理能力。该模型界定了生物整治能被实际应用的环境条件,为现场治理提供了依据。

1.3 生物活性(bioactivity)

生物活性是指在各种生物治理技术中微生物的代谢活性,采用适当的措施改善生物活性,可以使生物降解达到最快速度和最彻底程度。在现场治理中,影响生物活性的诸多因子往往较难控制,生物活性因此难以达到最大值。需要调整的环境因子主要为电子受体,为使好氧菌良好的生长,常用的补充供氧方法主要是:土壤耕耘,直接充氧和注入 H_2O_2 以释放游离氧。在缺氧条件下,可以向水体投加硝酸盐和碳酸盐。这些化合物不仅可以作为替代的电子受体,在水体中其溶解性又高于氧,因而它们能比氧更有效地提高降解菌的生物活性。

固体产氧剂也可用来提供游离氧。Davis-Hoover等(1995)^[17]在一个水力穿透性很差的淤泥粘土层用丙(撑)二醇制造了一个人为的污染环境,又在该地同时施用产氧剂——过碳酸钠BOU肥料的缓释胶囊和一定量的砂子,经过处理,该土层的水力传导性有了提高;同时观察到微生物的数量增加了10-100倍,其活性也有了很大的增强。污染物丙(撑)二醇的浓度也随之明显降低。

为了有效补充氮和磷营养,有利降解菌的繁殖,Alain Ladousse和Bernard Trawier(1991)^[18]开发出一种亲油的肥料,这种肥料的胶囊中不仅含有氮和磷营养,还有易降解的碳源,实验室和现场的大量实验均证明,即使在寒冷天气,施用该肥料也能极大增加烃降解菌的数量,从而增加烃降解的速度和程度。这种肥料还能降低石油的粘性,增加其可利用性。

在使用厌氧菌进行降解时,需要去除环境中存在的氧,常使用繁殖好氧菌消耗氧的办法。Funk S B等(1995)^[19]报道了他们对土壤中污染的TNT降解的详细研究。将磷酸盐缓冲液

与含淀粉的营养一起混入污染的土壤,经过一段时间后,一个严格厌氧的、降解TNT的细菌菌群被建立。温度和pH强烈影响TNT从污染的土壤中溶出的速度,从而影响生物降解活性。

2 生物整治的技术方法

为了治理土壤和水体中的污染,发展了几种原位(in-situ)和非原位(ex-situ)治理技术。

2.1 土壤和地下水的原位(in-situ)治理方法

(1)向土壤和地下水接入外源的污染降解菌,同时提供这些细菌生长所需营养。Cutright等(1994)^[20]使用3种补充的营养液与*Mycobacterium* sp.一起注入土壤中,已取得良好的效果。

(2)定期向地下水投加 H_2O_2 和营养,以满足污染环境中已经存在的降解菌生长的需要,以便使土著的降解菌能通过代谢将污染物彻底矿化成 CO_2 和水。Kaempfer P(1993)^[21]向石油污染的地下水和土壤中连续注入适量的氮、磷营养和 NO_3^- , O_2 及 H_2O_2 等电子受体,经过2d的运转后,对土壤和水中的样品进行微生物和化学分析。随着实验时间的延长,采集到的样品中的菌量有所增加,分离到的细菌多于70个种,其中大多为烃降解细菌。

(3)原位-非原位结合治理方法 用水冲洗土壤中的污染物,并将含有该污染物的废水引入附近的生物反应器中,通过连续供应营养、氧和接种降解菌将污染物去除。

(4)生物通气方法(Bioventing) 生物通气方法是一种强迫氧化生物降解方法。在待治理的土壤上打至少2口井,安装鼓风机和抽真空机,将空气强排入土壤中,然后抽出,土壤中的挥发性毒物也随之去除。在通入空气时,加入一定量的 NH_3 气,可以为土壤中的降解菌提供氮素营养。Enning Zhou等(1995)^[22]研究了降解石油烃所需的氮素营养,他们发现当C·N比分别为50·1,18·1和8·1时降解速度明显不同。当污染物浓度为1700mg/L时,C·N比为18·1,完成降解需耗时70d,补充充氧后,降解时间缩短为20d,但氮量补充太多(1.8·1)则几乎阻止了

生物降解. Gruiz 等(1995)^[23]将生物通气与应用高效降解菌相结合,运转2月后,土壤中的污染物浓度明显下降,土壤中的细菌数量增加了10倍以上.同时观察到,在实验运转期间,CO₂产生量提高了10倍以上,表明污染物矿化作用相当活跃;实验停止1个月后,CO₂产生量才逐步下降.挥发性石油烃的量,在实验开始的最初2d最高,随后开始连续下降,2月后已降到可检出水平之下,土壤中其它种类污染物的浓度,也已降到很低水平.

2.2 土壤和地下水的非原位治理方法

(1) 土地处理技术(land-farming) 在不泄漏的平台上,铺上石子和砂子,将污染的土壤以15-30cm的厚度平铺其上并淋撒营养和水,定期翻动充氧,以满足土壤中微生物生长的需要.处理过程中流出的渗出液,淋漓回该土壤上,以便彻底清除污染物. Pope D F 和 Mattes E (1993)^[24]对土地处理技术进行了深入研究,内容涉及 pH 控制,翻动操作,湿度调节和营养要求等.

焦油是一种含有芳烃的石油烃类混合物,它是强烈的致癌物. Hyzy 等(1995)^[25]成功地将焦油在2个池塘中用土地处理技术进行处理,处理土壤的规模达到40000m³,处理过程中微生物生长活跃,每g土壤中的菌数高达10⁹个,土壤中的 PAH 浓度从1000mg/L 降至100mg/L.

(2) 堆肥式处理(composting piles) 与上述土地处理技术不同的是,土壤中直接掺入了能提高处理效果的支撑材料,如: 树叉、稻草、粪肥等,提高了通气保水能力. 该技术简单易行,受到普遍重视. Lin Jianer L 等(1995)^[26]研究了在堆肥式处理装置中投加菌种和营养的方法. 他们将降解菌和菌体生长所需营养包埋于 PVA 胶囊中或用聚氨基甲酸酯固定; 稠化剂和吸附剂有时也同时被包埋或固定. 这些菌体和添加剂固定化后,掺入待处理的土堆中,避免了流失,明显提高了生物降解效率.

(3) 生物堆层(biopiles) 该技术不同于土地处理技术的是在堆起的土层中铺有管道,提

供氧气和水. 有时水中还添加营养并接种污染物降解菌. 通常土壤被整齐地堆成条块,便于收集产生的渗出液,避免再次污染处理现场底下的土壤. 有报道用该方法在工业规模处理烃污染的土壤,90d内能将严重污染烃的土壤去除90%(Stefanoff(1995)^[27]).

(4) 泥浆技术(Slurry Techniques) 在一个反应器里,将土壤与3-9倍的水混合使其呈泥浆状,同时加入营养并在充氧条件下剧烈搅拌进行处理. Puskas K 等(1995)^[28]使用泥浆技术处理油污染的土壤在5-10d内能将油污土壤中的总可提取物降解,但是该方法对去除多环芳烃不理想,40d后仍有4环以上的多环芳香化合物存在.

将表面活性剂应用到泥浆技术中,提高了疏水性石油烃在泥浆水相中的溶解度,从而提高了土壤中菲的矿化程度和速度(Fu M H 和 Alexander M (1995)^[14]).

3 场地信息和治理效果评价

3.1 场地信息

收集的场地信息主要包括污染物的化学特点和场地具有的化学、物理和微生物特点,它们是:土壤和地下水的特点,如土壤结构、pH值、可利用的营养、竞争性碳源、土壤孔隙度、渗透度、密度、有机物、溶解氧、氧还电位、金属以及微生物种群总量及降解菌的数量. 污染物的特点,如所有组分的浓度及其溶解浓度,它们在土壤环境中的分布及其生物或非生物的降解速度.

在现场生物降解能完成的主要条件为:有机物或其代谢物是以一种溶解的方式存在,有足够的营养供应维持降解菌的生化过程以及温度适宜.

3.2 治理效果评价

进行有效的监测应考虑降解过程的特殊性,样品的代表性,并选用合适的检测方法. 要分别确定生物和非生物降解. 测量污染物代谢终产物CO₂产生量,是简便的测定污染物生物可降解性的方法(Shen 和 Jyunkai(1994)^[29]).

在现场工作中,主要监测的生态过程包括特殊污染物降解的选择压,导致微生物生长和最终产物生成的污染物矿化和脱毒作用,共代谢转化反应,营养及电子供体浓度和细菌生理状态的变化。

生物整治(Bioremediation)是近年才频频出现在生化处理专业刊物上的一个新词,它的内容和技术方法还在不断发展中,我国这方面可结合我国国情,加以改进并逐步发展起来,生物整治技术将在我国生物净化方面发挥作用。

参 考 文 献

- Hap P et al. Environ. Sci. Technol., 1991, **25**: 372
- Hu Samuel S and Lumsden S. Ind Waste Conf., 1994(pub., 1995) 49th, 1945
- Semprini and Lewis. Environ. Health Perspect Suppl.
- James W B and William W H. Trends in Biotechnology, 1993, **11**: 327
- Wang X and Bartha K. Soil Biol. Biochem., 1990, **22**: 501
- Caroquino M J et al. Bull Environ. Contam. Toxicol., 1992, **49**: 224
- Nasser A et al. Biodegradation, 1994, **5**: 29
- Colores et al. Appl. Biochem. Biotechnol., 1995, **54**: 271
- Relley L. J. Soil Contam., 1995, **4**: 772
- Brazil G M et al. Appl. Environ. Microb., 1995, **61**(5): 1946
- Kim Sang Yong. Avail. Univ. Microfilms Int, Order No. DA From Diss Abstr Int, B 1995, **56**(2): 959
- Erickson et al. Thermochem. Acta. 1995, **2250**(2): 353
- Eyadi and Selloul R R. Appl. Water Environ. Microbiol., 1995, **61**(3): 1098
- Fu M H and Alexander M. Appl. Microb. Biotechnol., 1995, **43**(3): 551
- Aronstein B N et al. Appl. Microb. Biotechnol., 1993, **39**(3): 386
- Mc Fariand M J et al. Hazard Waste. Hazard Mater., 1994, **11**(4): 479
- Davis-Hoover et al. ASTM Spec. Publ. STP 1995, **1235**: 233
- Alain Ladousse and Bernard Trawier. 1991 Oil Spill Conf. Ameri. Petrol. Inst., Washington D C: 1991: 571
- Funk S B et al. ASTM Spec. Tech. Publ., 1995, STP **1235**: 177
- Cutright et al. Fresenius Environ. Bull., 1994, **3**(7): 400
- Kaempfer P. Microb. Ecol., 1993, **26**(2): 161
- Enning Zhou. Biodegradation, 1995, **6**: 127
- Gruiz et al. J. Soil Contam., 1995, **4**(2): 163
- Pope D F and Matters E. Environment Regulations and Technology Report. 1993, EPA/600/R-93/164 Order No. PB94-107927
- Hyzy et al. ASTM Spec. Tech. Publ., 1995, STP **1235**: 61.
- Lin Jianer et al. PCT Int Appl. WO 9508513(C1. CO2 F3/12), 30 Mar 1995, US appl. 126474, 24 Sept. 1993
- Stefanoff et al. Environ. Prog., 1995, **14**(2): 104
- Puskas K et al. Environ. Int., 1995, **21**(4): 413
- Shen Jyunkai. Avail. Univ. Microfilms Int. Order No. DA 9511530 From Diss Abs. Int B1995, **55**(12): 5268

(上接第63页)

去沉淀,取适当体积的滤液按实验方法显色测定,结果见表1。

参 考 文 献

- 章道昆,萨燕平.化学试剂,1985,7(5):288-290
- 徐其亨,阮琼.分析化学,1988,16(4):351-352
- 王海涛,李强,徐其亨.化学通报,1995,(2):41-42
- 杨元,黄安模,王文华.分析化学,1995,23(5):615
- 曹秋娥,徐其亨.云南化工,1996,(2):35-36
- 杨文荣,李琼,徐其亨,王海涛.分析化学,1996,24(2):243
- 武汉大学等编.分析化学(第3版).北京:高等教育出版社,1995:252
- 教委.显色剂在光度分析中的应用.上海:上海科技出版社,1988:407-409

stability.

Study on Effects of Developing Touristry for Songshan Conservation Area. Song Xiujie and Zhao Tongrun (Beijing Municipal Research Academy of Environmental Protection, 100037): *Chin. J. Environ. Sci.*, **18**(3), 1997, pp. 57_ 59

In order to evaluate effect of touristry development for Songshan Conservation Area, the investigating site and monitoring water, quality which include surface and underground water, and atmospheric quality were carried out. It was found that the natural landscape of the conservation area was destroyed lightly because of trampling, picking and throwing by tourists and touristry facilities established, but quality of surface water and underground water are fit for National Standard. Atmospheric pollutants are fit for First National Standard. Need to strenthen management of the conservation area was suggested.

Key words: Songshan Conservation Area, environmental effect, touristry development, management.

Effect of Calcium on Cell Membrane Permeability in Acid Rain Stressed *Cucumis melo* Seedling. Zhou Qing and Huang Xiaohua et al. (Dept. of Biology Suzhou Railway Teachers College, Suzhou 215009): *Chin. J. Environ. Sci.*, **18**(3), 1997, pp. 60_ 61

The relationship of calcium to cell membrane permeability in acid rain stressed *Cucumis melo* seedling has been studied. Calcium obviously decreased cell membrane permeability and protected cell membrane from acid rain insult. Optimum protection effect is that *Cucumis melo* seedling is spraiend continuously two times (once every 24 hours) with concentration of 30mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ at the test conditions. The mechanism perhaps is calcium reagent stabilizing the structure of cell membrane of *Cucumis melo* and raising catalase activity.

Key words: *Cucumis melo* seedling, calcium, cell membrane permeability, acid rain stress.

Spectrophotometric Determination of Manganese with Diantipyryl-(P-Bromo)-Phenylmethane. Yin Jiayuan and Yang Guangyu et al. (Department of Chemistry, Yunnan University, Kunming 650091): *Chin. J. Environ. Sci.*, **18**(3), 1997, pp. 62_ 63

Diantipyryl-(p-bromo)-phenylmethane (DAPBM) was synthesized and identified. A highly sensitive spectrophotometric method has been developed for the determination of manganese with DAPBM. In the presence of Mn^{2+} , Mn^{3+} can reacts with DAPBM to form an orange and yellow product in phosphoric acid medium. The molar absorptivity is $1.28 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 480nm. Beer's law

is in keeping in the range of 0.1–0.9 $\mu\text{g}/25\text{ml}$. This method has been applied to the determination of manganese in food and water, the results are satisfised.

Key words: diantipyryl-(p-bromo)-phenylmethane, spectrophotometric, manganese.

Determination of CH_3SH in Air Using Capillary GC/FID. Wang Lizhong, Lu Yongsen et al. (Key State Lab. of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environ. Eng., Tongji University, Shanghai 200092), Wang Wenling (Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433): *Chin. J. Environ. Sci.*, **18**(3), 1997, pp. 64_ 66

The analytical procedure for methylmercaptan in air was investigated which involves four phases of sampling, low temperature concentration with liquid nitrogen, thermal separation and then capillary column GC/FID analysis. Under the conditions selected, a method linear range of 0.2–200 ng was obtained with a minimal detection limit of 0.2 ng. The recovery was about 92.6% with a relative standard deviation of 3.2%. This Procedure was applied to determine the concentration of methylmercaptan in the environmental air around a waste water plant and a polluted river successfully. The odour strength of the air at different sampling points was also calculated, and the distribution characteristic with methylmercaptan sounded reasonable.

Key words: methylmercaptan, GC/FID analysis, sampling, malodor.

Progresses of Bioremediation Studies and Applications. Lin Li and Yang Huifang (Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080): *Chin. J. Environ. Sci.* **18**(3), 1997, pp. 67_ 71

A review concerns principles and techniques on degradation of xenobiotics and recalcitrants in contaminated site. The basic principle of bioremediation that for special contaminated site different treatment techniques were selected on three factors which are decrease the toxicity of pollutants and increase the bioavailability of pollutants and the bioactivity of microorganisms. The recently advances at in-situ and ex-situ bioremediation techniques are involved in the paper which include adding nutrient, inoculate species, bioventing, land-farming, composting piles, biopiles and slurry techniques. The methods of collecting the site information and of evaluating treatment were discussed also.

Key words: bioremediation, contaminated site, xenobiotics, recalcitrants, microorganisms, bioavailability, bioactivity.

Advances in the Study of Remediation Methods of Heavy Metal-Contaminated Soil. Xia