

垃圾场污染场地氧化还原带及其功能微生物的研究

周睿¹, 赵勇胜^{1*}, 朱治国¹, 孙艳¹, 周红玲², 花菲¹, 赵妍¹, 胡桂全¹

(1. 吉林大学环境与资源学院, 长春 130026; 2. 吉林省兴环环境技术服务有限公司, 长春 130021)

摘要: 通过室内模拟柱实验发现受渗滤液污染的场地存在着 4 个顺序氧化还原带, 依次为硫酸盐还原带、铁还原带、硝酸盐还原带和氧还原带, 范围分别为 0~27 cm、27~62 cm、47~74 cm、74~91 cm。各带中生物群落结构发生了明显的变化, 相应地以硫酸盐还原菌(SRB)、铁还原菌(IRB)和反硝化细菌(NRB)为优势菌群, 同时也存在其他作用的细菌。氧化还原带和功能微生物的分布说明各氧化还原带间并不存在严格的界限, 有一定的重叠现象。功能优势菌群的变化是氧化还原带更替的根本原因。

关键词: 渗滤液; 氧化还原带; 生物菌群; 硫酸盐还原菌; 铁还原菌; 硝酸盐还原菌

中图分类号: X53; X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3270-05

Redox Zones and Its Functional Bacteria in a Contaminated Landfill Site

ZHOU Rui¹, ZHAO Yong-sheng¹, ZHU Zhi-guo¹, SUN Yan¹, ZHOU Hong-ling², HUA Fei¹, ZHAO Yan¹, HU Gui-quan¹

(1. College of Environment and Resources, Jilin University, Changchun 130026, China; 2. Jilin Xinghuan Environmental Technology and Services Ltd., Changchun 130021, China)

Abstract: A column filled with sandy soil was constructed to investigate biogeochemical process of leachate polluted zones. Experimental results demonstrated that four sequent redox zones appeared in pollution plume. The zones can be named sulfate reduction zone, iron reduction zone, nitrate reduction zone and oxygen reduction zone, ranges of them were 0-27 cm, 27-62 cm, 47-74 cm, 74-91 cm. In the redox zones bacterial community structure changed, and the preponderant bacteria were sulfate reduction bacteria (SRB), iron reduction bacteria (IRB), nitrate reduction bacteria (NRB) correspondingly, however there were other bacteria in the redox zones. Distribution of redox zones and functional bacteria means that there is not a significant boundary between redox zones, moreover one redox zone overlaps others. Evolvement of functional bacterial community brings the redox zones substitute.

Key words: leachate; redox zones; bacterial community; sulfate reduction bacteria(SRB); iron reduction bacteria(IRB); nitrate reduction bacteria(NRB)

近年来,我国渗滤液污染地下水及土壤环境的问题越发突出并难以解决,因此垃圾渗滤液在地下环境中的迁移转化已成为研究的热点,但对其中的生物地球化学作用研究刚刚起步。

国外多位学者的研究表明,受渗滤液污染的场地存在着顺序氧化还原反应^[1,2],这与微生物利用电子受体的能力紧密相关。根据热力学原理,一般微生物对电子受体的利用顺序为: $O_2 > NO_3^- > Mn^{4+} > Fe^{3+} > SO_4^{2-} > CO_2$ ^[3,4],因此在污染源下游的污染晕中出现了顺序氧化还原带,依次为产甲烷带、硫酸盐还原带、铁还原带、锰还原带、硝酸盐还原带和氧还原带。可见,微生物作用对渗滤液污染晕的分布和污染物的自然衰减起着重要的作用,但目前对氧化还原带中微生物方面的研究报道极少。董军等^[5]通过研究验证了产甲烷带、铁还原带、硝酸盐还原带和氧还原带的存在。本研究通过柱实验模拟渗滤液污染晕中的氧化还原分带现象,并利用选择性培养基研究各氧化还原带中的功能微生物变化,旨在研究或证明:①在渗滤液污染场地中确实存在着顺序氧化还原带;②氧化还原带的分布特征;③氧化还原带的

更替与功能微生物的变化密切相关。以进一步明确渗滤液污染场地中顺序氧化还原带的形成机制,认识渗滤液污染晕中的生物地球化学作用。

1 材料与方法

1.1 实验装置和材料

1.1.1 模拟装置和材料

实验装置是 1 个长 95 cm、内径 7.2 cm 的有机玻璃柱(如图 1),实验土样取自长春市伊通河畔 20 cm 以下的砂土(扰动样)。实验用渗滤液取自长春市三道简易垃圾卫生填埋场,其基本性质见表 1。

1.1.2 供试培养基

硫酸盐还原菌(SRB)培养基: NaCl 5 g, 含结晶水的 $MgSO_4$ 2 g, Na_2SO_4 1 g, NH_4Cl 1 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgCl_2$ 0.1 g, $(NH_4)_2FeSO_4$ 0.1 g, 70% 的乳酸钠溶液

收稿日期: 2007-11-20; 修订日期: 2008-01-21

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418505); 国家自然科学基金项目(504778009)

作者简介: 周睿(1980~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为水土污染的控制与治理, E-mail: zhouruijlu@163.com

* 通讯联系人, E-mail: zhaoyongsheng@jlu.edu.cn

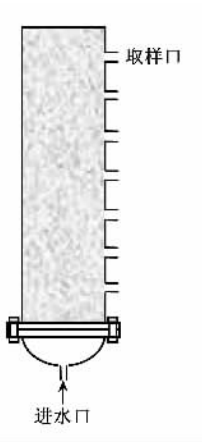


图 1 实验装置示意

Fig.1 Schematic diagram of experiment equipment

表 1 渗滤液的基本性质/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Table 1 Properties of landfill leachate/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

pH	Eh/ $\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$	COD	Fe^{3+}	Fe^{2+}	NH_4^+-N	NO_3^-	NO_2^-	SO_4^{2-}	DO	Cl^-
6.97	-253.6	17 200	85.96	196.09	1 690.26	1.97	0.92	6 724.2	0	3 349

1.2 实验方法

(1)氧化还原带模拟方法 将砂土风干后过 2 mm 筛,装入装置内,压实使其密度为 1.51 g/cm^3 ,总填充高度为 91 cm.进水方式由下至上,控制流速为 7 cm/d .在侧部各取样口取样,同时监测水中 HCO_3^- 、 DO 、 NO_2^- 、 Fe^{2+} 、 S^{2-} 的浓度^[6],取样口分别距进水口 10、22、34、46、60、72、84 cm.反应至第 18 d 停止进水.

(2)细菌分离培养方法 分别取 10、44、60、84 cm 处的土样 1 g,加入 50 mL 无菌水,混合均匀作为菌液.SRB 和 IRB 的分离培养方法采用大试管厌氧培养法:将 1 mL 菌液加入试管中,而后加入培养基盛满试管,用瓶塞盖紧,后用凡士林涂满瓶口周围并用锡纸包紧,在 36°C 下培养.SRB 培养一段时间后在试管中应出现黑色沉淀,打开试管后把浸有 AgNO_3 液体的试纸条置于瓶口,试纸应该变黑.IRB 培养一段时间后试管中的黄色应褪去,这是因为 Fe^{3+} 被还原为 Fe^{2+} .再用含琼脂 2% 的培养基采用厌氧叠皿培养法分离纯化,然后挑取单菌落扩大培养.最后通过革兰氏染色,显微观察得到细菌形态图片.NRB 的培养方法采用平板涂布法和叠皿夹层培养法^[7]在好氧和厌氧条件下同时分离培养,培养基均采用含琼脂 1.5% 的溴百里酚蓝培养基,在 36°C 下培养 24 h.发生硝酸盐还原后培养基的 pH 升高,

5 mL,溶于 1 L 蒸馏水中,调节 pH 为 7.2.
铁还原菌 (IRB) 培养基: NaCl 10 g, MgCl_2 4 g, CaCl_2 1.5 g, KCl 5 g, KH_2PO_4 2 g, NH_4Cl 2.5 g, 柠檬酸铁 6 g, 微量元素溶液 1 mL, 溶于 1 L 蒸馏水中, 调节 pH 为 7.68. 其中微量元素溶液的配制为: MoO_3 4 mg, $\text{ZnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 28 mg, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 mg, H_3BO_3 4 mg, $\text{MnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 mg, $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 mg, 溶于 1 L 蒸馏水中.
硝酸盐还原菌 (NRB) 培养基 (溴百里酚蓝培养基): KNO_3 1 g, KH_2PO_4 0.1 g, FeCl_2 0.5 g, CaCl_2 0.2 g, MgSO_4 1 g, 柠檬酸钠 8.5 g, BTB (1%) 溶于酒精 5 mL, 溶于 1 L 蒸馏水中, 调节 pH 为 7.0~7.3.

使溴百里酚蓝指示剂变成蓝色,因此在 NRB 周围应出现蓝色晕圈.观察菌落生长状态,并采用 MPN 法计数.

2 结果与分析

2.1 氧化还原带的分布规律

从图 2 可以看出, DO 、 NO_2^- 、 Fe^{2+} 、 S^{2-} 在柱中不同位置处浓度有明显的变化, NO_2^- 和 Fe^{2+} 都呈现先增大后减小的趋势, 分别在 44 cm 和 60 cm 处出现峰值, 而硫化物的浓度自进水口呈现逐渐减小的趋势, 溶解氧呈现逐渐增大的趋势. 在实验过程中 HCO_3^- 的浓度变化不明显, 未在图中显示. 在环境中 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 SO_4^{2-} 作为电子受体在一系列生物地球化学作用下被还原为 NO_2^- 、 Fe^{2+} 、 S^{2-} , 因此根据最终电子受体及其还原产物分布特点和浓度变化的规律, 将柱中整个过程划分为 4 个顺序氧化还原带, 即硫酸盐还原带、铁还原带、硝酸盐还原带和氧还原带. 这与董军等^[5]的研究结果略有不同, 原因是本实验条件下难以形成严格厌氧的环境, 不适于产甲烷作用的发生, 故在实验过程中未发现产甲烷带. 各带范围依次为 0~27 cm、27~62 cm、47~74 cm、74~91 cm. 从图 2 还可以看出, 各氧化还原带间存在一定的重叠, 这与国外的场地研究结果类似^[8]. 在各带中都同时存在 2 种或 2 种以上电子受体的还原产物. 如

图 2 所示,在 40 cm 位置不仅富集了大量的 Fe^{2+} 离子,同时也有 NO_2^- 和 S^{2-} 生成;在 60 cm 处出现了 NO_2^- 、 Fe^{2+} 、 S^{2-} 共存的现象;在其他位置均可见多种还原产物共存的现象.这说明在顺序氧化还原反应中并不是一种电子受体被耗尽才发生另一种氧化还原反应,而是当某种电子受体低于一定限值时就可能开始了下一种电子受体的还原.也就是说在氧化还原带重叠的地方可能共存着 2 种或多种功能微生物,

它们利用不同的电子受体维持着各自的生命活动,即在同一位置可能同时发生 2 种或 2 种以上的生物氧化还原反应.例如 28 cm 处,可能 SRB 和 IRB 共存,但 28 cm 下,当可被 IRB 利用的 Fe^{3+} 被消耗到一定浓度以下时,IRB 的竞争能力开始下降,而能够利用 SO_4^{2-} 的微生物不断繁殖,进而形成了优势种群的更替和氧化还原带的演变.

2.2 各带中功能菌群结构确定

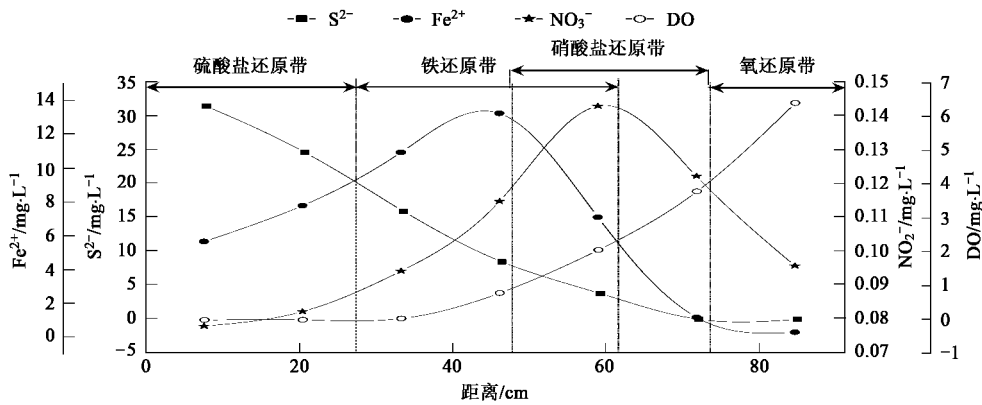


图 2 氧化还原带分布

Fig. 2 Distribution of redox zones

垃圾渗滤液中含有大量的有机物质, COD 高达 $17\,200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 为微生物的生长繁殖提供了充足的碳源和能源, 创造了生长的基本条件. 同时渗滤液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 的含量也很高, 三氮总量接近 $1\,700\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 为微生物的生长提供了充足的氮源. 有研究者曾在渗滤液污染场地中检测到 SRB、IRB 和 NRB 的存在^[9, 10]. 另外在渗滤液污染晕中大量存在着 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 SO_4^{2-} 等电子受体, 它们的还原产物呈带状分布, 因此推测在渗滤液污染晕的氧化还原带中可能同时存在着微生物的带状分布.

渗滤液中的有机污染物主要在厌氧区域的硫酸盐还原带、铁还原带和硝酸盐还原带降解^[11], 因此重点研究 SRB、IRB、NRB 在各带中的分布变化. 在柱中 10、44、60、84 cm 位置取样, 分别对应硫酸盐还原带、铁还原带、硝酸盐还原带、氧还原带中 S^{2-} 、 Fe^{2+} 、 NO_2^- 和 DO 含量最高点, 标注为 1、2、3、4 号样, 分析各样中细菌种类的变化及其分布规律.

2.2.1 SRB 的分布变化及形态特征

硫酸盐还原菌(SRB), 是指一类具有能把硫酸盐、亚硫酸盐、硫代硫酸盐等硫化物以及元素硫还原形成硫化氢生理特性的细菌的统称, 它的一个重要

的生理特点就是能够利用硫酸盐作为电子受体, 将其还原为 H_2S , 同时利用有机物为碳源和能源, 为细菌提供电子以满足微生物生长需要^[12].

采用大试管厌氧培养法培养 2 周后, 4 支试管出现明显不同的现象. 1 号试管出现了大量的沉淀, 打开试管有浓烈的 H_2S 气味, 把浸有 AgNO_3 液体的试纸条置于瓶口, 试纸迅速从边缘向内变黑, 证明有大量的 H_2S 生成, 并有大量硫酸盐还原菌繁殖出来. 2 号试管中有 H_2S 气味, 并能使浸有 AgNO_3 液体的试纸条缓慢变黑, 3 号、4 号样品无 H_2S 气味, 也不能使浸有 AgNO_3 液体的试纸条变黑. 此时测定各试管中 S^{2-} 的浓度依次为 46.01、4.26、0、0 mg/L. 可见, 在 1 号试管中存在很强的 SRB 还原作用, 2 号中也有 SRB 作用, 而 3、4 号样品中检测不到 SRB 的作用. 说明在硫酸盐还原带中主要以 SRB 作为优势菌群发挥硫酸盐还原的功能.

进一步通过分离纯化和扩大培养, 得到 2 株 SRB, 1 株呈杆状, 革兰氏染色阴性; 另 1 株呈小球状, 革兰氏染色呈阳性. 显微镜观察细菌形态如图 3、图 4 所示.

2.2.2 IRB 的分布变化及形态特征

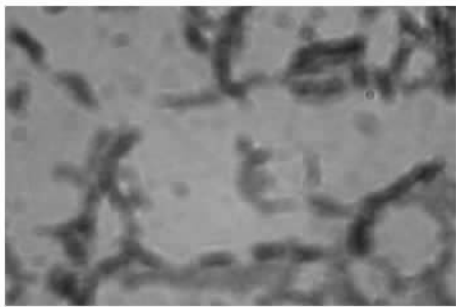


图 3 杆状 SRB 细胞形态
Fig.3 Cell modality of the bacilliform SRB

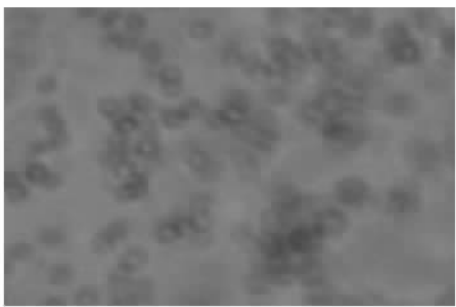


图 5 IRB 细胞形态
Fig.5 Cell modality of the IRB

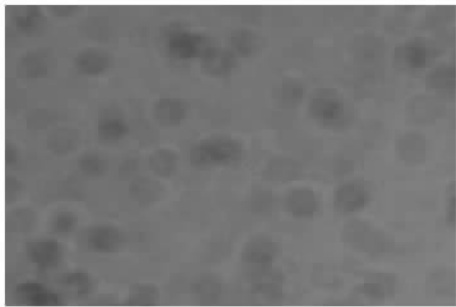


图 4 球状 SRB 细胞形态
Fig.4 Cell modality of the spheroid SRB

铁还原菌能够以 Fe^{3+} 为唯一的电子受体氧化多种有机物质,并从中获得能量而生长繁殖,同时将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} .采用大试管厌氧培养法培养 2 周后 4 支试管内现象不同.1 号试管内颜色基本不变,与原培养基颜色一致,呈现为 Fe^{3+} 的黄色.2 号试管中黄色基本褪去,无色透明,这说明 Fe^{3+} 已经被还原.3 号试管黄色没有完全褪去,上半部分无色透明,下半部分仍呈黄色,说明正处在 Fe^{3+} 被还原为 Fe^{2+} 的过程中,4 号试管中现象与 1 类似.可见 2 号试管中铁还原作用很强,IRB 生物量高,3 号样品也有 IRB 的作用,而 1、4 号样品中 IRB 的作用不明显.表明在铁还原带中 IRB 的作用最强,表现出很强的铁还原作用.

通过细菌分离和扩大培养,得到 1 株小球状 IRB,革兰氏染色呈阴性,细胞形态如图 5 所示.

2.2.3 NRB 的分布变化及形态特征

已有的研究表明,反硝化过程不仅能在缺氧条件下发生,在好氧条件下也能发生^[13].因此同时利用普通培养法和叠皿夹层培养法实验,研究好氧反硝化菌和厌氧反硝化菌在各带中的分布情况.

采用普通培养法好氧条件下培养 24 h 后 4 个培养皿内现象发生了变化.在菌落旁边出现了蓝色

晕圈.其中 3 号培养皿内的颜色变化最为明显,培养基整体呈现蓝色,说明有大量的 NRB 生长.而其他 3 个培养皿内虽然也都出现了蓝色晕圈,但 4 个皿内生长的菌落数量差异很大,1、2、3、4 号培养皿中菌落数量依次为 93、276、286、180.采用叠皿夹层法培养 24 h 后,4 个培养皿内也出现类似现象.4 个培养皿中菌落数量依次为 0、3、296、140.由此判断硝酸盐还原菌是一种兼氧菌,在硝酸盐还原带中大量存在成为功能优势菌.

通过分离纯化和扩大培养得到 2 株杆状 NRB,在培养基中的菌落分别呈蓝色和白色,称为蓝色 NRB 和白色 NRB,革兰氏染色均呈阴性,细菌形态如图 6、图 7 所示.

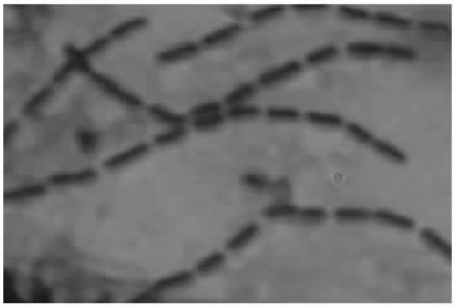


图 6 蓝色 NRB 细胞形态
Fig.6 Cell modality of the blue SRB

综上所述,在硫酸盐还原带、铁还原带和硝酸盐还原带中的功能优势菌群依次为 SRB、IRB 和 NRB.这正是因为微生物利用电子受体的顺序为 $\text{NO}_3^- > \text{Fe}^{3+} > \text{SO}_4^{2-}$,所以在污染晕中微生物首先利用 NO_3^- 作为电子受体大量繁殖,进而能够利用这种电子受体的硝酸盐还原菌成为了功能优势菌群.随着 NO_3^- 被不断消耗,硝酸盐还原菌可利用的电子受体数量减少,其生长繁殖受到限制,而能够利用 Fe^{3+} 的 IRB



图7 白色 NRB 细胞形态

Fig.7 Cell modality of the white SRB

繁殖,数量增加,在渗滤液污染环境中的功能越发明显,成为了功能优势菌群.当可利用的 Fe^{3+} 亦减少后,SRB 开始利用 SO_4^{2-} 作为电子受体不断繁殖成为新的功能优势菌群.在渗滤液污染的场地中,随着 NRB、IRB、SRB 作为微生物功能优势菌群的交替也就出现了电子受体 NO_3^- 、 Fe^{3+} 、 SO_4^{2-} 的顺序氧化还原反应,相应地在污染晕的前端至末端依次出现了硝酸盐还原带、铁还原带和硫酸盐还原带.这为污染物质在氧化还原带中的自然衰减情况和其中生物地球化学作用机制的研究奠定了基础.

另外,从以上现象还可看出,SRB、IRB 和 NRB 都不仅仅存在于各自占有优势的氧化还原带,还在邻近的带中存在.比如 IRB 不只在铁还原带中发挥作用,也在硝酸盐还原带中被检测到.因此并不是一种生物化学反应只在一个带中发生,也在相邻带中发生;也不是在一个带中只存在一种微生物的作用,而是共存着多种微生物的竞争.如果按照微生物的作用区域或它们还原电子受体的产物分布情况划分各氧化还原带的范围,则各氧化还原带之间应有一定的重叠.

3 结论

(1)最终电子受体及还原产物的分布情况说明,在渗滤液污染晕中确实存在顺序氧化还原带.在污染源的下流依次出现了硫酸盐还原带、铁还原带、硝酸盐还原带和氧还原带,这与前人的实验室模拟结果有所不同.

(2)在硫酸盐还原带、铁还原带和硝酸盐还原带中 SRB、IRB 和 NRB 分别作为各带的功能优势菌群,利用 SO_4^{2-} 、 Fe^{3+} 、 NO_3^- 为最终电子受体,将其还原为

S^{2-} 、 Fe^{2+} 、 NO_2^- , 因而出现了如图 2 所示的还原产物分布情况和各氧化还原带的更替,即功能优势菌群的变化是顺序氧化还原带出现的根本原因.

(3)无论从最终电子受体及还原产物的分布情况还是功能微生物作用的区域两方面来看,各氧化还原带之间并不应该存在严格的界限,而应该有一定的交叉重叠,这是垃圾场氧化还原带的分布特征.

参考文献:

- [1] Baedeker M J, Back W. Modern marine sediments as a natural analog to the chemically stressed environment of a landfill [J]. *Journal of Hydrology*, 1979, **43**(1-4): 393-414.
- [2] Lyngkilde J, Christensen T H. Redox zones of a landfill leachate pollution plume (Vejen, Denmark) [J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 1992, **10**(4): 273-289.
- [3] Christensen T H, Bjerg P L, Banwart S A, *et al.* Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes [J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2000, **45**(3-4): 165-241.
- [4] Ludvigsen L, Albrechtsen H J, Heron G, *et al.* Anaerobic microbial redox processes in a landfill leachate contaminated aquifer (Grindsted, Denmark) [J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 1998, **33**(3-4): 273-291.
- [5] 董军,赵勇胜,韩融,等.垃圾渗滤液污染羽在地下环境中的分带现象研究[J]. *环境科学*, 2006, **27**(9): 1901-1905.
- [6] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法[M].(第四版).北京:中国环境科学出版社, 2002.
- [7] 万海清,苏仕军,葛长海,等.一种分离培养硫酸盐还原菌的改进方法[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, **9**(5): 561-562.
- [8] Bjerg P L, Ruge K, Pedersen J K, *et al.* Distribution of redox-sensitive groundwater quality parameters downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark) [J]. *Environmental Science & Technology*, 1995, **29**(5): 1387-1394.
- [9] Tian Y J, Yang H, Li D T, *et al.* Molecular Analysis of Dominant Microbial Populations in Heavily and Slightly Polluted Aquifers by a Seaside Landfill [J]. *Tsinghua Science and Technology*, 2005, **10**(4): 517-522.
- [10] 张云,张胜,刘长礼,等.垃圾场环境中的微生态效应初探[J]. *地球学报*, 2004, **25**(6): 671-676.
- [11] Lyngkilde J, Christensen T H. Fate of organic contaminants in the redox zones of a landfill leachate pollution plume (Vejen, Denmark) [J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 1992, **10**(4): 291-307.
- [12] 陈涛,曹毅,伊芬芬,等.一株耐酸硫酸盐还原菌的分离筛选及生理特性研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2006, **43**(2): 451-457.
- [13] 周立祥,黄峰源,王世梅.好氧反硝化菌的分离及其在土壤氮素转化过程中的作用[J]. *土壤学报*, 2006, **43**(3): 430-435.