

## 典型污染物包覆层中氯仿的沿程生物转化机制

刘 帅<sup>1</sup>, 邢志林<sup>1,2</sup>, 李 宸<sup>1</sup>, 张 浩<sup>1</sup>, 胡文庆<sup>1</sup>, 张丽杰<sup>1</sup>, 张云茹<sup>1</sup>, 赵天涛<sup>1,2\*</sup> (1.重庆理工大学化学化工学院,重庆 400054; 2.重庆大学城市建设与环境工程学院,重庆 400045)

**摘要:** 为明晰氯仿(CF)在包覆层中的降解过程,构建了模拟覆盖层系统(SLCS),并结合高通量测序技术首次系统分析了 CF 在 SLCS 中的沿程生物转化机制,结果表明,覆盖层可根据氧气含量分为有氧区(0~20cm)、缺氧区(20~40cm)和无氧区(>40cm)。高通量测序分析表明,有氧区的优势菌为甲烷氧化菌,其中 I 型菌 *Methylobacter*(甲基杆菌属)及 II 型菌 *Methylosinus*(甲基弯菌属)居多,缺氧区甲烷氧化菌的相对丰度为 13%左右,缺氧和无氧区中 *Anaeromyxobacter*(厌氧粘细菌属)成为了优势 CF 厌氧降解菌。CF 在有氧、缺氧和无氧条件下均有效降解。在缺氧和无氧区,CF 经厌氧还原脱氯转化为二氯甲烷,部分二氯甲烷在 *Dehalobacter*(脱卤素杆菌属)作用下产生乙酸盐、H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>。在有氧区,其余二氯甲烷通过甲烷氧化菌共代谢降解。改变进气口通量发现,SLCS 对甲烷的去除率与通量呈负相关关系( $R^2=0.80$ ),但甲烷氧化速率与通量呈正相关关系( $R^2=0.90$ )。与甲烷类似,SLCS 对 CF 的去除率与进气口通量呈负相关关系( $R^2=0.86$ ),但降解速率与进气口通量呈正相关关系( $R^2=0.89$ )。此外,进气口通量的增加对 CF 好氧共代谢降解的促进作用大于厌氧还原脱氯降解。该研究对氯代烃类污染物的降解提供了新的基础,对该类污染物的原位生物修复提供了理论依据。

**关键词:** 垃圾填埋场覆盖层; 氯仿; 还原脱氯; 好氧共代谢

中图分类号: X701 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2018)12-4581-10

**The biotransformation mechanism of chloroform in landfill cover.** LIU Shuai<sup>1</sup>, XING Zhi-lin<sup>1,2</sup>, LI Chen<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>1</sup>, HU Wen-qing<sup>1</sup>, ZHANG Li-jie<sup>1</sup>, ZHANG Yun-ru<sup>1</sup>, ZHAO Tian-tao<sup>1,2\*</sup> (1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China; 2.College of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China). *China Environmental Science*, 2018,38(12): 4581-4590

**Abstract:** It is important to deeply understanding the degradation mechanism of chloroform (CF) along the depth of a soil layer. In this study, the simulated landfill cover system (SLCS) was set up and biotransformation mechanism of CF was firstly investigated by the method of diversity sequencing. The results showed that the landfill cover was divided into three zones along the depth, aerobic zone (0~20cm), anoxic zone (20~40cm) and anaerobic zone (>40cm), based on the oxygen content. The analysis of diversity sequencing revealed that methanotrophs were dominant bacteria in aerobic zone, including type I methanotrophs *Methylobacter* and type II methanotrophs *Methylosinus*. While *Anaeromyxobacter* was the dominant bacteria for CF biodegradation by reductive dechlorination in anoxic and anaerobic zone. In addition, the relative abundance of methanotrophs in the anoxic zone was about 13%. These results suggested that CF was firstly degraded effectively in aerobic, anoxic and anaerobic zone. Previous studies reported that CF can be degraded into dichloromethane reductive dechlorination in the anoxic and anaerobic zone, and part of dichloromethane would be transformed into acetate, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> due to the activity of *Dehalobacter*, which agreed with this study. The metabolic product dichloromethane was then completely degraded by through co-metabolism by methanotrophs in aerobic and anoxic zone. Moreover, the relationship between biodegradation capacity and gas flux was also studied. With the change of inlet flux, there was a negative correlation between methane removal efficiency and flux ( $R^2=0.80$ ), while the positive correlation was found between methane biodegradation rate and flux ( $R^2=0.86$ ). Similarly, CF biodegradation efficiency decreased with increase of inlet gas flux ( $R^2=0.86$ ), while biodegradation rate increased with increase of inlet gas flux ( $R^2=0.89$ ). Therefore, aerobic co-metabolism contributed more in removal of CF than reductive dichlorination. These results provided theoretical basis for in situ bioremediation of chlorinated aliphatic hydrocarbons pollutants.

**Key words:** landfill cover; chloroform; reductive dechlorination; aerobic cometabolism

氯仿(CF)是一种重要的有机溶剂和产品中间体,被广泛应用于机械制造、电子元件清洗和化学化工等过程。由于 CF 的大规模生产和不当使用,造成了地下水、土壤和大气环境的严重污染。美国环保署曾对 39 个小城镇地下水进行检测,CF 检出率为 31%,是高检出率氯代烃之一<sup>[1]</sup>。德国 Bitterfeld 地区经过

近百年的化学工业发展,高达 25km<sup>2</sup> 的土壤和 2 亿 m<sup>3</sup> 的地下水遭受 CF 等氯代烃的严重污染<sup>[2]</sup>。我国

收稿日期: 2018-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41502328);重庆市科技项目(cstc2015jcyjB0015,cstc2015shmszx80006)

\* 责任作者,副教授, zhaott@cqu.edu.cn

“水中优先控制污染物”中 CF 排名第二<sup>[3]</sup>.此外,CF 作为大气中浓度最高的卤代烃<sup>[4]</sup>,其呼吸暴露途径带来的健康风险远大于皮肤接触途径带来的风险<sup>[5]</sup>,其“三致”(致癌、致畸、致突变)效应,严重威胁人类健康<sup>[6,7]</sup>.因此,如何有效控制 CF 类污染已引起环保领域的广泛关注.

填埋垃圾厌氧发酵产生的填埋气中除  $\text{CH}_4$  和  $\text{CO}_2$  外,还有超过 70 种的挥发性有机物(VOCs)<sup>[8-9]</sup>,CF 是浓度较高的 VOCs<sup>[9]</sup>,是大气氯代烃的重要污染源之一.填埋场覆盖层作为填埋垃圾和大气的界面,是典型的污染物包覆层,在减少填埋气向大气排放过程中扮演重要角色.如何通过深入认识氯代烃在污染场地中的生物转化机制强化原位修复能力是当前污染物降解研究中关注的重要课题.填埋场覆盖层作为复杂的次生环境,微生物多样性丰富,生长底物充足,污染物种类复杂,是研究 CF 转化机制的典型场地<sup>[10-12]</sup>.充分认识 CF 在填埋场覆盖层中的沿程生物转化机制对其他场地中 CF 的原位生物修复有重要指导价值.CF 可发生的生物降解途径包括好氧共代谢和厌氧还原脱氯<sup>[4]</sup>,由于  $\text{CH}_4$  等有机物生物氧化作用和空气扩散限制,填埋场覆盖层不同梯度微环境存在明显差异<sup>[13-14]</sup>,因而 CF 在不同梯度可能存在不同生物转化机制.然而,当前关于 CF 在填埋场覆盖层内的降解过程及转化机制还鲜有研究.

据此,本研究以垃圾填埋场覆盖层为典型污染物包覆层,CF 为典型 VOCs,建立模拟覆盖层系统(SLCS).其主要目的是(1)考察不同工况下填埋气的分布特性;确定 SLCS 中的  $\text{CH}_4$  氧化能力和 CF 降解能力;(2)明晰 CF 在 SLCS 不同梯度的主要降解方式(厌氧还原脱氯和好氧共代谢等);(3)研究降解过程中土壤理化性质的变化及其变化的原因;(4)探究降解过程中相关微生物的群落结构、相对丰度与  $\text{CH}_4$  氧化、CF 降解间的关系,系统分析 CF 在覆盖层中的生物转化机制.本文可为如何通过污染物包覆层经济有效地减少有害物质的排放提供理论指导,并为污染物的原位生物修复提供优化策略.

## 1 材料与方法

### 1.1 垃圾填埋场覆盖土

研究采用真实生活垃圾填埋场覆盖土,取自重

庆南岸区长生桥生活垃圾填埋场(29°35'N, 106°33'E),占地  $69.14 \times 104 \text{m}^2$ ,库容  $12 \times 106 \text{m}^3$ ,使用期限超过 20a<sup>[15]</sup>.覆盖土均采集垃圾填埋场覆盖层表面 10cm 以下的自然土壤,手工去除石头和植物等大颗粒后,将土壤通过 4mm 筛网筛分,留下粒径较小的土壤.充分混合土壤,并用去离子水调节含水率为 15%.原始覆盖土初始含水率为 10%,pH 值为 7.35,有机质含量为  $15.9 \text{g/kg}_{\text{soil}}$ ;总碳、总磷和总氮含量分别为 12.9、0.542 和  $0.7 \text{g/kg}_{\text{soil}}$ ;硝态氮和氨态氮含量分别为 45.1 和  $256.2 \text{g/kg}_{\text{soil}}$ <sup>[16]</sup>.

### 1.2 模拟覆盖层构建与运行

SLCS 结构如图 1 所示.以 PVC 材料建立反应柱,柱高 100cm,内径 30cm.柱体侧方设置取样口(气体和土壤),第一个取样口距离底端 5cm,沿柱体向上每隔 15cm 设置一个取样口,共 6 个.反应柱上下两端通过法兰盘垫橡胶圈密封,下端设置 1 个开口用于填埋气( $\text{CH}_4$ 、 $\text{CO}_2$  和 CF)进入,上端设置两个开口用于空气通入及尾气排放.反应柱底端铺设铁丝网,装填 5cm 高的粗砂粒,再次铺设同直径铁丝网,该层用于提供覆盖土支撑及均匀分布填埋气.覆盖土层装填高度为 75cm,顶部预留 20cm 高的气相空间.

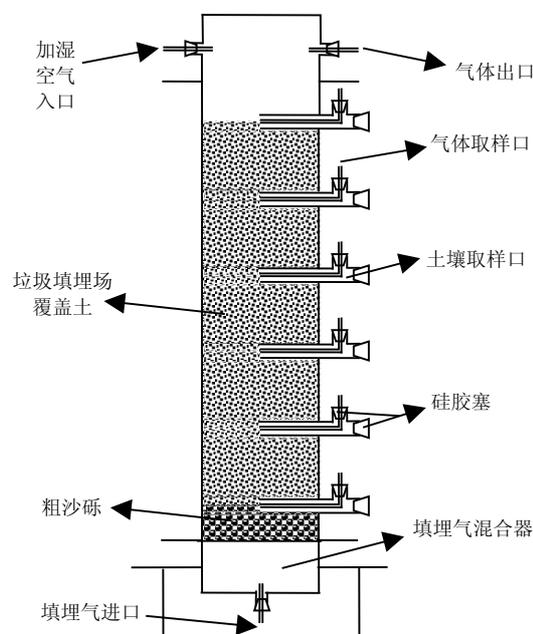


图 1 模拟覆盖层系统示意

Fig.1 The schematic of structure of the simulated landfill cover system

基于实际垃圾填埋场覆盖土构建了 2 组 SLCS,以经叠氮化钠灭菌( $0.13 \text{mg/g}_{\text{dried soil}}$ )<sup>[17]</sup>的覆盖土为

生物介质,CH<sub>4</sub>、CO<sub>2</sub> 和 CF 混合气为模拟填埋气的运行系统为对照组;以活性覆盖土为生物介质,CH<sub>4</sub>、CO<sub>2</sub> 和 CF 混合气为模拟填埋气的运行系统为实验组,2 个系统反应条件相同,CF 浓度相同.CH<sub>4</sub> 和 CO<sub>2</sub> 混合气(体积比 1:1)携带 CF 由 SLCS 底部向上扩散,空气由顶部经去离子水加湿后通入 SLCS.CF 初始浓度按照填埋气中痕量气体浓度范围进行选择<sup>[18]</sup>,保持 CF 浓度不变,增加入口流量,SLCS 基本参数如表 1 所示.连续监测不同深度 CH<sub>4</sub>、O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> 和 CF 浓度,持续 51d.

表 1 模拟覆盖层系统基本参数

Table 1 Basic parameters of the study of the simulated landfill cover system

时间(d)	进口流量 (mL/min)	气体通量 [m <sup>3</sup> /(m <sup>2</sup> ·d)]	甲烷通量 [g/(m <sup>2</sup> ·d)]	氯仿通量 [g/(m <sup>2</sup> ·d)]	氯仿体积 比(V/V%)	氯仿流量 (μg/L)
1~15	15	0.306	109.2	0.447	0.0275	1467
16~30	30	0.612	218.4	0.893	0.0275	1467
31~45	45	0.918	327.6	1.340	0.0275	1467
46~48	60	1.223	436.8	1.787	0.0275	1467
49~51	75	1.529	546.0	2.233	0.0275	1467

### 1.3 分析检测

系统运行过程中每天对模拟覆盖层中所有梯度填埋气进行取样分析,利用微型吸气泵(DC12-24V, 0.5L/min)将气体收集于 50mL 集气袋中,每个梯度每次取 2 个平行样,用 1mL 气密性进样针(安捷伦)进行实时检测.气体流量采用质量流量计(D07,上海七星华创)控制,出口流量采用皂膜流量计监测.每隔 15d 对各个梯度覆盖土进行取样,用于土壤理化性质和微生物多样性分析.

CH<sub>4</sub>、O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 采用气相色谱(川仪 SC-6000A)测定,色谱条件:不锈钢色谱柱 TDX8-12-25 2m,进样口温度、柱温以及检测器(TCD)温度分别为 120、90 和 120℃,氮气为载气,载气流速为 25mL/min,进样量 0.5mL.

CF 采用气相色谱(川仪 SC-3000B),色谱条件:不锈钢色谱柱 GDX-104 2m;进样器温度、柱温和检测器(ECD)温度分别为 120、80 和 200℃;氮气为载气,载气流速为 40mL/min;尾吹风速为 10mL/min;进样量:0.1mL;基流补偿 0.00nA.

氯离子通过抽提液抽提离子色谱分析(色谱条件:色谱柱 Dionex AG9-HC 2mm 保护柱,Dionex

AS9-HC 2m 分离柱),详细方法参见文献<sup>[19]</sup>.有机质采用元素分析仪(开元仪器 5E-CHN2200)进行分析;覆盖土含水率通过土样烘干(105℃)前后质量差进行衡算.

### 1.4 DNA 提取与高通量测序

用 Mobio PowerSoil® DNA Isolation Kit 提取土壤样品中微生物总基因组 DNA,并利用 Mobio PowerClean® DNA Clean-Up Kit 完成对 DNA 的纯化.纯化后的 DNA 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测.

对 16S DNA 高变区序列进行测序,测序区域为 V3+V4.使用 Trimmomatic、FLASH 软件对 Miseq 测序数据进行处理获得干净数据:1)过滤 read 尾部质量值 20 以下的碱基.设置 50bp 的窗口,如果窗口内的平均值低于 20bp.从窗口开始截去后端碱基,过滤质控后 50bp 以下的 read;2)根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将成对 reads 拼接(merge)成一条序列,最小 overlap 长度为 10bp;3)拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.2,筛选不符合序列;4)检测序列末端 box 序列,最小错配数为 0 将起始端包括 box 的序列进行反向互补,并去除 box;5)检测序列上的 barcode 并区分样品,barcode 错配数为 0,最大引物错配数为 2.

数据误差和相关性采用 SPSS Statistics 21 软件分析,多样性数据采用 i-sanger 平台(<http://www.i-sanger.com/>)分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 模拟覆盖层的稳态运行及填埋气的梯度分布

实际填埋场关于甲烷氧化的研究中发现填埋气在覆盖层不同深度的浓度差异很大,生物降解和对流扩散是影响气体分布的主要原因<sup>[20]</sup>,系统运行期间,实验组 SLCS 显示出稳定的活性.

实验组生物气浓度随时间变化的梯度分布如图 2 所示,每一层气体梯度变化明显且保持稳定,说明 SLCS 稳定运行,每一层的 CO<sub>2</sub> 浓度高于 CH<sub>4</sub> 浓度,表明有 CO<sub>2</sub> 的产生.O<sub>2</sub> 浓度随深度的增加而下降,15cm 处有少量 O<sub>2</sub> 检出,30cm 处偶有微量 O<sub>2</sub> 检出(图 2C),SLCS 可按此分为有氧区(0~20cm)、缺氧区(20~40cm)和无氧区(>40cm),与文献报道中覆盖层分区相符<sup>[9]</sup>.CH<sub>4</sub>、O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> 和 N<sub>2</sub> 浓度随深度变化的

代表性分布如图3所示.图3B为对照组CH<sub>4</sub>、O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>浓度分布,O<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>浓度分布表明空气贯穿整个SLCS,CH<sub>4</sub>和CO<sub>2</sub>的浓度分布几乎相同.实验组(图3A)CH<sub>4</sub>向上扩散时浓度明显减小,与CH<sub>4</sub>相比,CO<sub>2</sub>向上扩散时浓度减小的趋势并不明显,印证

了有CO<sub>2</sub>产生. SLCS中O<sub>2</sub>的去除,CH<sub>4</sub>的减小和CO<sub>2</sub>的增加进一步证明了SLCS中的CH<sub>4</sub>氧化.通过比较实验组和对照组的气体分布图,可知CH<sub>4</sub>氧化过程对覆盖层内气体分布影响显著,CH<sub>4</sub>氧化使得SLCS产生无氧区,O<sub>2</sub>消耗使覆盖层无氧区上移.

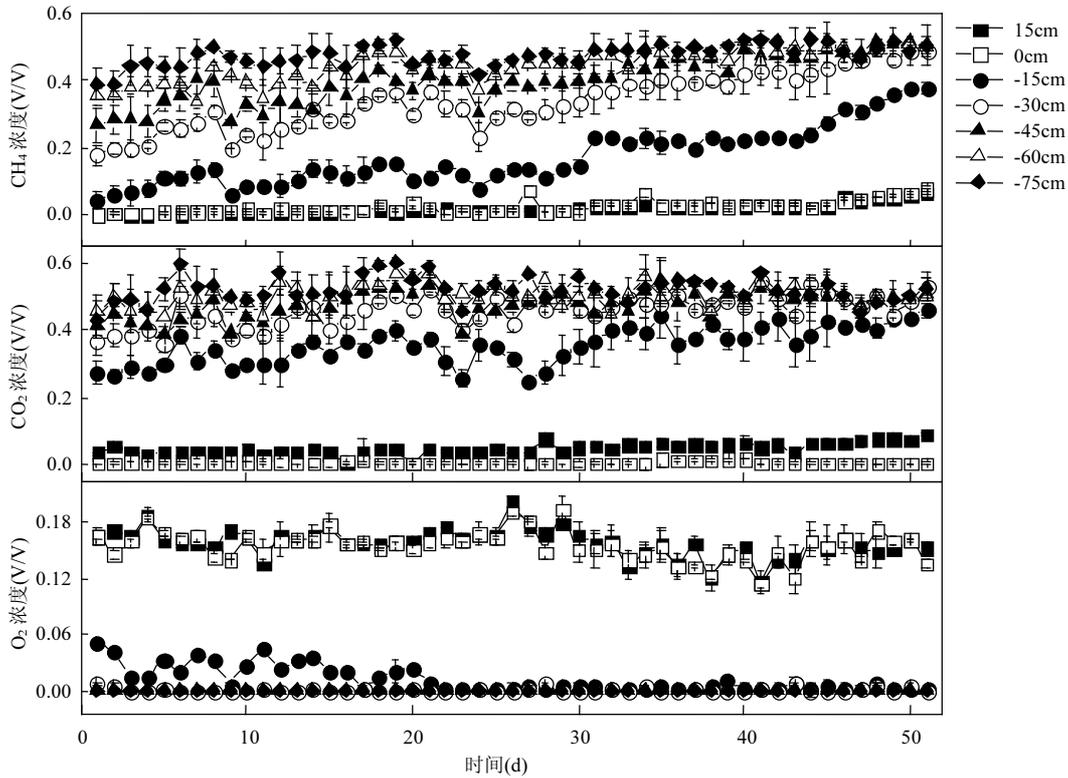


图2 实验组生物气浓度随时间变化的梯度分布

Fig.2 Distribution of biogas concentration over time in the experimental group

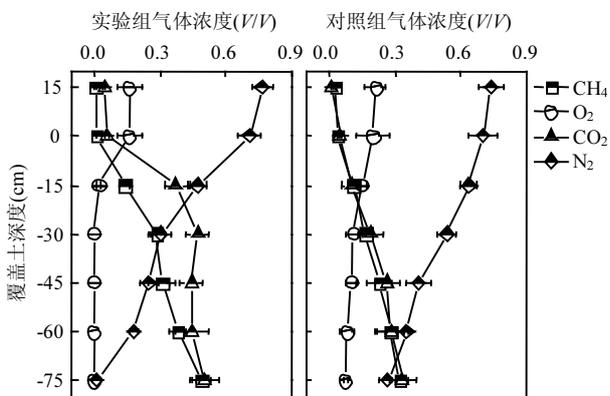


图3 CH<sub>4</sub>、O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>浓度随深度变化的代表性分布 (气体通量 0.306m<sup>3</sup>/(m<sup>2</sup>·d))

Fig.3 Representative concentration distribution of CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and N<sub>2</sub> with the change of depth (gas flux 0.306m<sup>3</sup>/(m<sup>2</sup>·d))

实验过程中,同时检测了CF及其脱氯产物相对浓度的梯度分布.在SLCS下部出现低浓度的二氯甲烷(DCM,6.6~57.5μg/L),表明CF部分厌氧还原脱氯,从而导致DCM累积.SLCS中CF和DCM的梯度变化如图4所示.从DCM的浓度曲线可知,在SLCS表面下方30~45cm处,DCM浓度最大,累积的DCM最多,15~30cm处DCM浓度迅速下降,表明在SLCS上部DCM迅速氧化.此外,已有研究表明,低氯取代的氯代烃难以进行厌氧还原脱氯降解,易以好氧共代谢或直接氧化的方式降解<sup>[21]</sup>,所以DCM在无氧区和缺氧区累积,并在有氧区迅速降解.因此,高氯取代烃在无氧和缺氧条件下还原脱氯降解产生低氯取代烃,所产生的低氯取代烃在有氧条件下迅速降解,是高氯取代烃降解的良好途径.

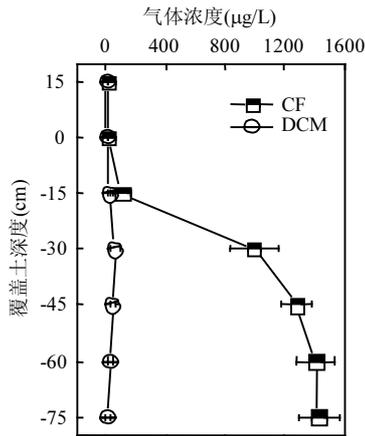


图4 氯仿和二氯甲烷浓度随深度变化(气体通量  $0.306\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ )

Fig.4 Chloroform and dichloromethane concentration change with the depth of landfill cover soil (gas flux  $0.306\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ )

## 2.2 不同通量条件下甲烷和氯仿降解情况

系统运行期间,SLCS 对  $\text{CH}_4$  的去除率为 24.3%~88.7%,氧化速率为  $48.9\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})\sim 161.7\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ ,这与已报道 CF 在 SLCS 中的  $\text{CH}_4$  去除率 56~64%及氧化速率  $146\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ 相当<sup>[22]</sup>. SLCS 对  $\text{CH}_4$  的去除率和氧化速率随进气口通量的变化关系如图 5 所示.在实验设置的进气口通量条件下 ( $0.306\sim 1.529\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ ),SLCS 对  $\text{CH}_4$  的去除率与通量呈负相关关系( $R^2=0.80$ ),但  $\text{CH}_4$  氧化速率与通量呈正相关关系( $R^2=0.90$ ).这是因为随着通量的增加,填埋气在 SLCS 中的停留时间逐渐减小,导致  $\text{CH}_4$  去除效率逐渐减小.但同时,进气口通量的增大导致单位时间内 SLCS 的  $\text{CH}_4$  氧化总量逐渐增大,从而  $\text{CH}_4$  氧化速率增大.整个实验运行期间,SLCS 对 CF 的去除率为 11.5%~83.6%,降解速率为  $0.168\sim 0.486\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ .SLCS 对 CF 的去除率和降解速率随进气口通量的变化关系如图 6 所示.在实验设置的进气口通量条件下,SLCS 对 CF 的去除率与进气口通量呈负相关关系( $R^2=0.86$ ),但降解速率与进气口通量呈正相关关系( $R^2=0.89$ ).由以上分析可知,实验条件下, $\text{CH}_4$  去除率、氧化速率和 CF 去除率、降解速率随进气口通量变化的正负相关性一致,原因是  $\text{CH}_4$  氧化过程产生的单加氧酶可共代谢降解 CF,且在 SLCS 中 CF 的好氧共代谢降解占主要部分.随着进气口通量的增加,好氧甲烷氧化总量增大,厌氧区增加,对 CF 好氧共代谢和厌氧还原脱氯降解均有促进作用.

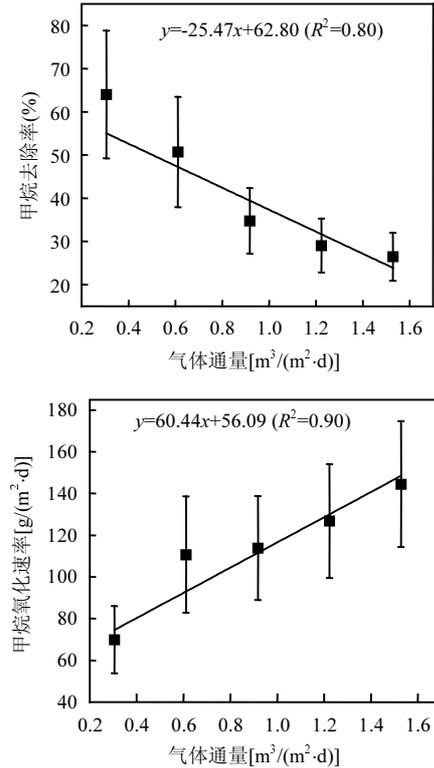


图5 甲烷的去除率和氧化速率随进气口通量的变化  
Fig.5 The removal rate and oxidation rate of methane with the change of inlet flux

甲烷生物氧化过程产生生物质、 $\text{CO}_2$  和水,CF 降解最终产物为无机氯,通过监测生物氧化过程覆盖土理化性质时空变化可进一步评估覆盖土的生物氧化能力.覆盖土 pH 值、有机质、含水率和  $\text{Cl}^-$  含量随深度的变化如图 7 所示.模拟覆盖层中 pH 值变化范围为 6.86~7.60,整体呈弱碱性,SLCS 表层 pH 值较低,SLCS 表面 30cm 以下 pH 值基本保持不变(图 7A),其原因是 SLCS 表层  $\text{CH}_4$  氧化产生  $\text{CO}_2$ ,而  $\text{CO}_2$  为酸性气体.随着系统的连续运行,SLCS 各梯度有机质含量均有所增加,SLCS 表面下方 15cm 左右有机质增长最快且含量最高(图 7B).生物质是  $\text{CH}_4$  生物氧化的产物,有机质的积累证明了微生物的活性,SLCS 表面下方 15cm 左右有机质增长最快且含量最高表明此处  $\text{CH}_4$  氧化活性最高,因此共代谢降解 CF 产生的  $\text{Cl}^-$  含量最高(图 7D).水也是  $\text{CH}_4$  生物氧化的产物,但含水率最高处为 SLCS 表面下方 30cm 处而非  $\text{CH}_4$  氧化速率最快的 15cm 处(图 7C),其原因是顶部空气的通入带走了 SLCS 中的大量水分.从  $\text{Cl}^-$  含量随深度的变化(图 7D)中可看出无氧区  $\text{Cl}^-$  含量随时间增加和通量增大缓慢上升,有氧区  $\text{Cl}^-$  含量随时间

增加和通量增大迅速上升,其原因是SLCS中好氧共代谢降解活性远大于厌氧还原脱氯降解活性.因此

实验设置条件下,随着进气口通量的增加对CF好氧共代谢降解的促进作用大于厌氧还原脱氯降解.

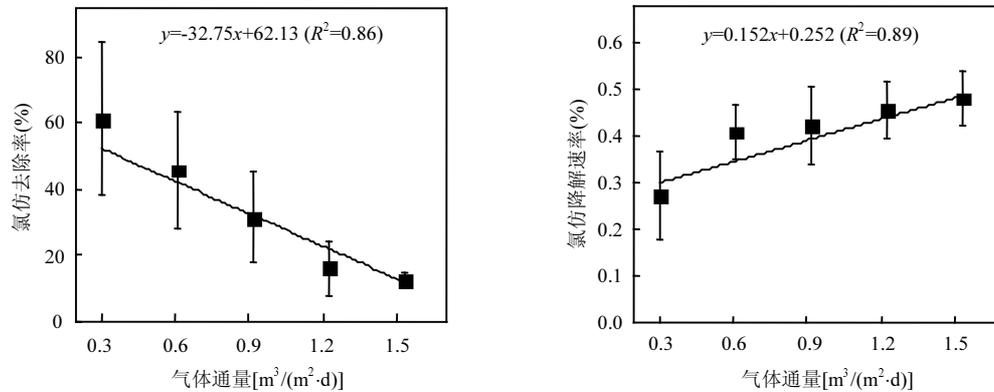


图6 氯仿的去除率和降解速率随进气口通量的变化

Fig.6 The removal rate and degradation rate of chloroform with the change of inlet flux

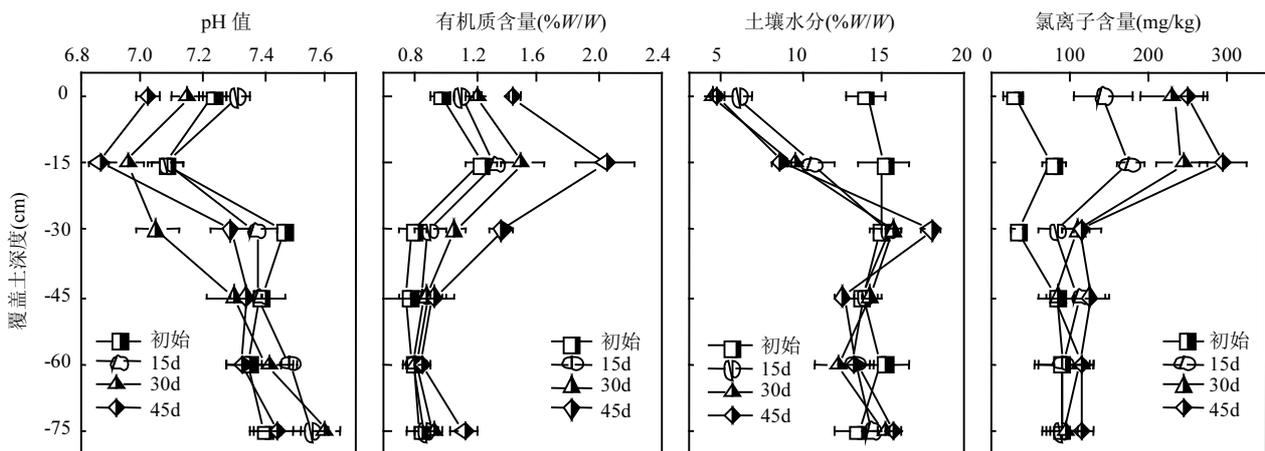


图7 覆盖土 pH 值、有机质、含水率和  $\text{Cl}^-$  含量随深度变化

Fig.7 The pH, organic matter, moisture content and  $\text{Cl}^-$  content change with the depth of landfill cover soil

### 2.3 微生物群落结构变化

有氧条件下,CF 可通过甲烷氧化菌共代谢降解.SLCS 中不同梯度甲烷氧化菌的相对丰度如图 8 所示,总土样中共检测到 9 种属水平的甲烷氧化菌,分别为 *Methylobacter*(甲基杆菌属)、*Methylosinus*(甲基弯菌属)、*Methylocaldum*(甲基暖菌属)、*unclassified\_o\_Methylococcales*(甲基球菌目)、*norank\_f\_Methylobacteriaceae*(甲基杆菌科)、*norank\_f\_Methylophilaceae*(嗜甲基菌科)、*Methylomicrobium*(甲基微菌属)、*Methylocystis*(甲基孢囊菌属)和 *Methylohalomonas*(甲基盐单胞菌属),

其中优势甲烷氧化菌为 *Methylobacter*、*Methylosinus* 和 *Methylocaldum*.有氧区甲烷氧化菌的相对丰度高达 22%,缺氧区甲烷氧化菌的相对丰度为 13%左右,无氧区甲烷氧化菌的相对丰度为 4%左右,甲烷氧化菌在有氧区和缺氧区的相对丰度显著高于无氧区.SLCS 表面下方 15cm 处甲烷氧化菌的相对丰度最高,从微生物的角度说明此处甲烷氧化速率最快.*Methylobacter* 是属于 *Methylococcaceae*(甲基球菌科)的 I 型甲烷氧化菌<sup>[23]</sup>,*Methylobacter* 的相对丰度随 SLCS 运行时间的推移逐渐降低,而 SLCS 下方 30cm 处的 *Methylobacter* 相对丰度基本保持不变

(10%左右),说明 *Methylobacter* 更适合在缺氧区生长。*Methylosinus* 是属于 *Methylocystaceae*(甲基孢囊菌科)的 II 型甲烷氧化菌<sup>[23]</sup>,SLCS 表面下方 0~15cm 处 *Methylosinus* 的相对丰度随 SLCS 运行时间的推移逐渐增加,说明 *Methylosinus* 更适合在有氧区生长.氧气

浓度是影响甲烷生物氧化的重要因素, I 型甲烷氧化菌 *Methylobacter* 适合在  $CH_4/O_2$  比较高的缺氧区生长, II 型甲烷氧化菌 *Methylosinus* 适合在  $CH_4/O_2$  比较低的有氧区生长,认清适合不同情况的甲烷氧化菌,对减少  $CH_4$  和 CF 等有害物质的排放意义重大.

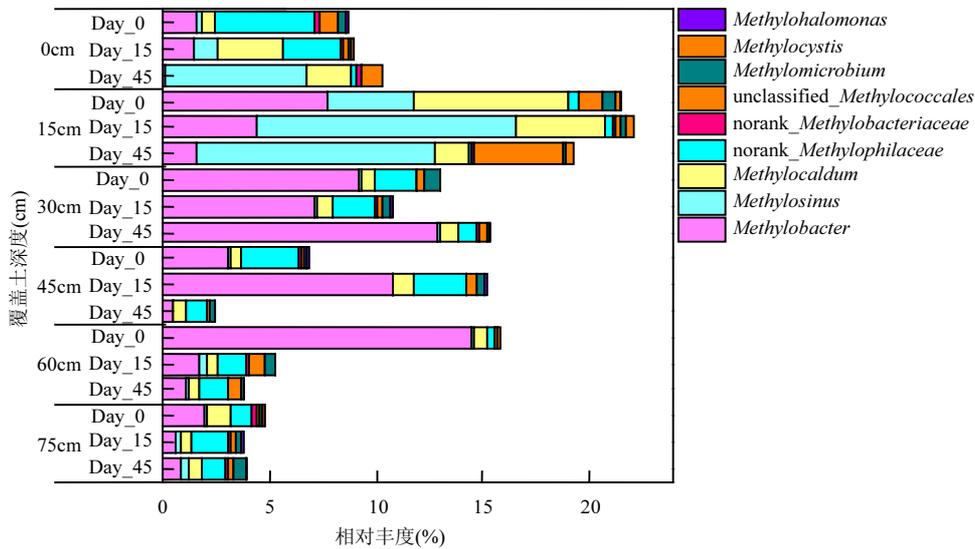


图 8 模拟覆盖层系统中不同梯度甲烷氧化菌的相对丰度

Fig.8 Relative abundance of methane oxidizing bacteria in different depths of the simulated landfill cover system

Day\_0, Day\_15 和 Day\_45 分别表示初始,第 15 和 45d 覆盖土的微生物群落结构

表 2 氯仿厌氧降解菌属

Table 2 Anaerobic degrading bacteria of chloroform on genus level

门	氯仿厌氧降解菌属	参考文献
Firmicutes	<i>Desulfobacterium</i>	[25]
	<i>Dehalobacter</i>	[28]
	<i>Desulfitobacterium</i>	[30]
	<i>Clostridium</i>	[27]
Proteobacteria	<i>Anaeromyxobacter</i>	[31]
	<i>Geobacter</i>	[32]
	<i>Enterobacter</i>	[33]
Chloroflexi	<i>Dehalococcoides</i>	[34]
	<i>Dehalogenimonas</i>	[35]
Acidobacteria	<i>Acetobacterium</i>	[25]

无氧条件下,CF 主要通过产甲烷菌、硫酸盐还原菌、发酵菌和脱卤呼吸菌降解<sup>[24-28]</sup>.已报道的可厌氧降解氯代烃的菌属如表 2 所示,分别属于 *Firmicutes*(厚壁菌门)、*Proteobacteria*(变形菌门)、*Chloroflexi*(绿弯菌门)和 *Acidobacteria*(酸杆菌门),最主要的为 *Firmicutes* 和 *Proteobacteria*,其中 *Dehalococcoides*(脱卤拟球菌属)、*Dehalobacter*(脱卤

素杆菌属)和 *Dehalogenimonas*(脱卤菌属)被认为是对有机卤化物呼吸至关重要且功能多样的菌属<sup>[29]</sup>. SLCS 中不同梯度厌氧降解菌的相对丰度如图 9 所示,SLCS 中共检测到 5 个属,相对丰度从大到小依次为 *Anaeromyxobacter*(厌氧粘细菌属)、*Dehalobacter*、*Clostridium*(梭菌属)、*Desulfobacterium*(脱硫杆菌属)和 *Geobacter*(地杆菌属).优势厌氧降解菌为 *Anaeromyxobacter*,其相对丰度在 SLCS 表面以下 30cm 处最大且持续增加,30cm 以下其相对丰度也较高,表明 *Anaeromyxobacter* 更适合在缺氧区生长,且对 CF 厌氧降解贡献率最大。*Dehalobacter* 是 SLCS 中增长幅度最大的菌属,且是 3 种重要的有机卤化物呼吸菌之一,随着时间的推移其相对丰度可能持续增加.SLCS 表面 30cm 处,*Dehalobacter* 相对丰度最大,且显著高于其他区域,表明 *Dehalobacter* 更适合在缺氧区生长.因此,*Anaeromyxobacter* 是 SLCS 中的优势 CF 降解菌属,*Dehalobacter* 是 SLCS 中最具 CF 厌氧降解潜力的菌属,且这 2 种菌属都适合在缺氧区生长.

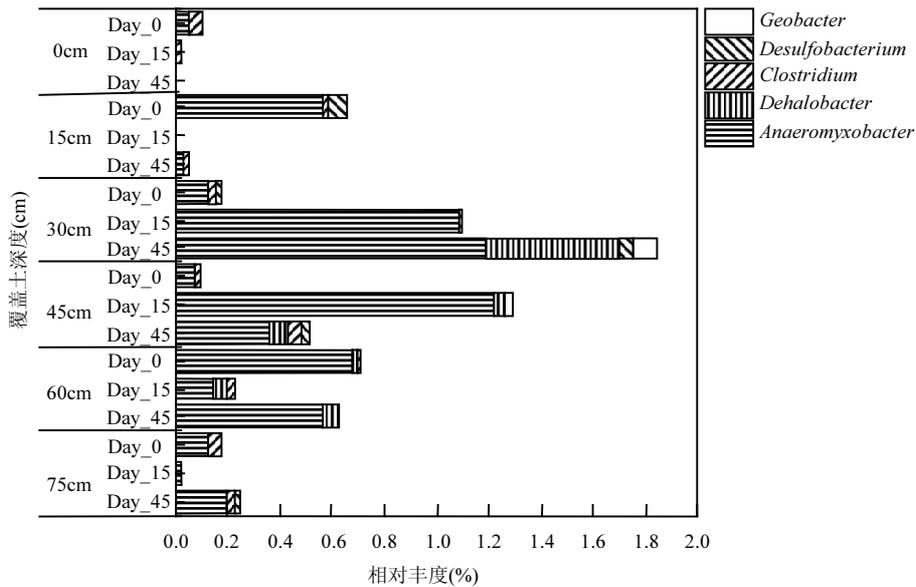


图 9 模拟覆盖层系统中不同深度厌氧降解菌的相对丰度

Fig.9 Relative abundance of anaerobic degrading bacteria in different depths of the simulated landfill cover system

Day\_0, Day\_15 and Day\_45 分别表示初始,第 15 和 45d 覆盖土的微生物群落结构

2.4 典型污染物覆盖层中氯仿的生物转化机制分析

CF 在有氧、缺氧和无氧条件下均能被降解,相应产生 CO<sub>2</sub> 和低氯取代物<sup>[4]</sup>.填埋气至下而上迁移的过程中,依次经过覆盖层的无氧区(>40cm)、缺氧区(40~20cm)和有氧区(20~0cm),CF 在覆盖层中的沿程生物降解机制如图 10 所示.填埋气中的 CF 由填埋垃圾产生,经过覆盖层的无氧区,在 *Anaeromyxobacter* 和 *Dehalobacter* 等脱氯细菌的作用下,还原脱氯产生 DCM,DCM 可在 *Dehalobacter* 的作用下进一步降解,产生乙酸盐、H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub><sup>[36]</sup>.CF 在有氧区主要通过 *Methylobacter*、*Methylosinus* 和

*Methylocaldum* 等甲烷氧化菌产生的甲烷单加氧酶(MMO)催化降解,形成三氯甲醇和碳酰氯等中间产物,并最终产生 CO<sub>2</sub> 和 HCl<sup>[4]</sup>.未经过 *Dehalobacter* 降解的 DCM,在有氧区通过甲烷氧化菌共代谢进一步降解,最终产生 CO<sub>2</sub> 和 HCl<sup>[37]</sup>.甲烷氧化菌在覆盖层表面下方 15cm 左右相对丰度最大(图 8),表明此处产生的甲烷单加氧酶(MMO)最多,降解产生的 Cl<sup>-</sup> 含量最高(图 7),对 CF 的降解贡献率最大.从覆盖层中的甲烷氧化菌和厌氧降解菌的相对丰度图(图 8 和图 9)可知,CF 在缺氧区中可同时发生有氧区和无氧区的反应,且 *Anaeromyxobacter* 和 *Dehalobacter* 等脱氯细菌更适合在缺氧区生长.

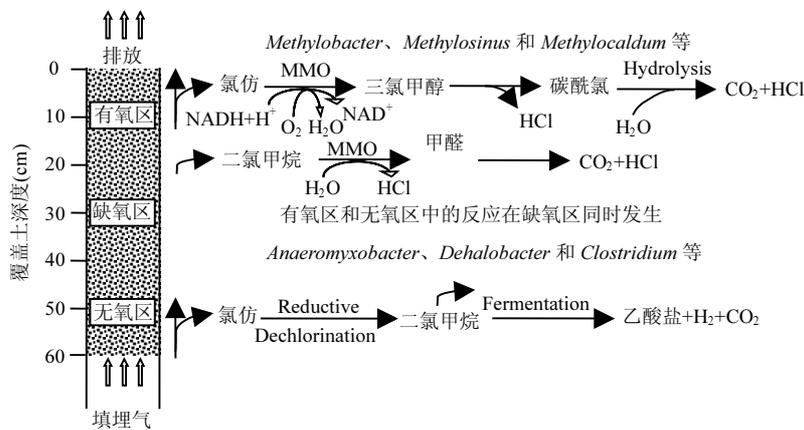


图 10 氯仿在覆盖层中的沿程生物降解机制示意

Fig.10 The schematic of the biodegradation mechanism of chloroform in the landfill cover

实际污染场地的修复往往非常复杂,氯代烃等 VOCs 污染场地的原位生物修复可基于 CF 在覆盖层中的生物转化机制进行.原位生物修复可分为生物强化和生物刺激,进行生物强化时可将 *Dehalobacter* 和 *Anaeromyxobacter* 等脱氯细菌投加到更适宜其生长的缺氧区,进行生物刺激时可将生长底物加入到更适合相应微生物生长的区域以充分利用生长底物.本研究可为如何通过污染物覆盖层经济有效地减少有害物质的排放提供理论指导,并为污染物的原位生物修复提供优化策略.未来需进一步认识此类污染物覆盖层中的功能微生物,探究其他种类 VOCs 在污染物覆盖层中的生物降解机制,并研究多种 VOCs 共存对微生物群落、CH<sub>4</sub> 氧化及其他有害物质降解的影响.

### 3 结论

3.1 CH<sub>4</sub> 氧化过程对 SLCS 内气体分布影响显著,SLCS 中最大 CH<sub>4</sub> 氧化发生在覆盖层表面下方 15cm 左右,此处甲烷氧化菌相对丰度最高(>20%),产生 MMO 最多,共代谢降解 CF 活性最强,产生的 Cl<sup>-</sup> 含量最高,为 293ug/kg<sub>soil</sub>,好氧共代谢是 CF 降解主要机制.

3.2 填埋气向上迁移过程中,经过无氧区(>40cm)、缺氧区(40~20cm)和有氧区(20~0cm).无氧区中 CF 还原脱氯产生 DCM,DCM 在 *Dehalobacter* 的作用下进一步降解,产生乙酸盐、H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>,有氧区中 CF 和 DCM 通过甲烷氧化菌共代谢降解,缺氧区中可同时发生还原脱氯和共代谢作用.

3.3 SLCS 的有氧区中优势菌为甲烷氧化菌,其中 I 型菌 *Methylobacter* 及 II 型菌 *Methylosinus* 为优势菌属,对 CF 好氧共代谢降解起重要作用;*Anaeromyxobacter* 是缺氧区和无氧区中优势菌属,对 CF 厌氧还原脱氯降解起重要作用.

#### 参考文献:

- [1] 陆 强,李 辉,林匡飞,等.上海浦东某氯代烃场地地下水污染现状调查 [J]. 环境科学学报, 2016,36(5):1730-1737.
- [2] Heidrich S, Weiss H, Kaschl A. Attenuation reactions in a multiple contaminated aquifer in Bitterfeld (Germany) [J]. Environmental Pollution, 2004,129(2):277-288.
- [3] 王 昭,石建省,张兆吉,等.我国“水中优先控制有机物”对地下水污染的预警性研究 [J]. 水资源保护, 2009,25(1):90-94.
- [4] Cappelletti M, Frascari D, Zannoni D, et al. Microbial degradation of chloroform [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2012,96(6): 1395-1409.
- [5] 韩 冰.地下水有机污染场地健康风险评估 [D]. 北京:中国地质大学(北京), 2006.
- [6] Harper DB. The global chloromethane cycle: biosynthesis, biodegradation and metabolic role [J]. Natural Product Reports, 2000,17(4):337-348.
- [7] 张启钧,吴 琳,刘明月,等.南京市机动车排放 VOCs 的污染特征与健康风险评估 [J]. 中国环境科学, 2016,36(10):3118-3125.
- [8] Wreford K A, Atwater J W, Lavkulich L M. The effects of moisture inputs on landfill gas production and composition and leachate characteristics at the Vancouver Landfill Site at Burns Bog [J]. Waste Management & Research, 2000,18(4):386-392.
- [9] 杨 旭,邢志林,张丽杰.填埋场氯代烃生物降解过程的机制转化与调控研究及展望 [J]. 微生物学报, 2017,57(4):468-479.
- [10] 郭 敏,何晶晶,吕 凡,等.垃圾填埋场覆土层 II 型甲烷氧化菌的群落结构 [J]. 中国环境科学, 2008,28(6):536-541.
- [11] Xing Z, Zhao T, Gao Y, et al. Real-time monitoring of methane oxidation in a simulated landfill cover soil and MiSeq pyrosequencing analysis of the related bacterial community structure. [J]. Waste Management, 2017,68(10):369-377.
- [12] 赵天涛,邢志林,张丽杰,等.氯代烯烃胁迫下菌群 SWA1 的降解活性及群落结构 [J]. 中国环境科学, 2017,37(12):4637-4648.
- [13] Scheutz C, Bogner J, Chanton JP, et al. Atmospheric emissions and attenuation of non-methane organic compounds in cover soils at a French landfill [J]. Waste Management, 2008,28(10):1892-1908.
- [14] Scheutz C, Mosbaek H, Kjeldsen P. Attenuation of methane and volatile organic compounds in landfill soil covers [J]. Journal of Environmental Quality, 2004,33(1):61-71.
- [15] 何 芝,赵天涛,邢志林,等.典型生活垃圾填埋场覆盖土微生物群落分析 [J]. 中国环境科学, 2015,35(12):3744-3753.
- [16] 赵天涛,杨 旭,邢志林,等.填埋场覆盖土对典型氯代烃的吸附特性 [J]. 中国环境科学, 2018,38(4):1403-1410.
- [17] Yao S, Xuan Z, Xiao-Meng W, et al. Evaluation of simultaneous biodegradation of methane and toluene in landfill covers [J]. Journal of Hazardous Materials, 2014,274(12):367-375.
- [18] Scheutz C, Kjeldsen P. Capacity for biodegradation of CFCs and HCFCs in a methane oxidative counter-gradient laboratory system simulating landfill soil covers [J]. Environmental Science & Technology, 2003,37(22):5143-5149.
- [19] 陈乐恬,牟世芬.离子色谱法测定土壤提取液中的磷酸根、硝酸根和硫酸根 [J]. 分析化学, 1981,11(2):88-92.
- [20] Scheutz C, Kjeldsen P. Environmental factors influencing attenuation of methane and hydrochlorofluorocarbons in landfill cover soils [J]. Soil Mechanics & Foundation Engineering, 2004,7(2):113-116.
- [21] 刘 帅,赵天涛,邢志林,等.氯代脂肪烃生物与非生物共促降解机制研究进展 [J]. 生物工程学报, 2018,34(4):510-524.
- [22] Scheutz C, Kjeldsen P. Biodegradation of trace gases in simulated landfill soil [J]. Journal of the Air & Waste Management Association, 2005,55(7):878-885.
- [23] 俞娟娟,王艳芬,张洪勋.好氧甲烷氧化菌生态学研究进展 [J]. 生态学报, 2013,33(21):6774-6785.
- [24] Bouwer E J, Mccarty P L. Transformations of 1- and 2-carbon

- halogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1983,45(4): 1286-1294.
- [25] Egli C, Tschan T, Scholtz R, et al. Transformation of tetrachloromethane to dichloromethane and carbon dioxide by *Acetobacterium woodii*. [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1988,54(11):2819-2824.
- [26] Shan H, Jr K H, Mykyteczuk N, et al. Anaerobic biotransformation of high concentrations of chloroform by an enrichment culture and two bacterial isolates [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2010, 76(19):6463-6469.
- [27] Gälli R, Mccarty P L. Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a *Clostridium* sp [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1989,55(4):837-844.
- [28] Grostern A, Duhamel M, Dworatzek S, et al. Chloroform respiration to dichloromethane by a *Dehalobacter* population [J]. *Environmental Microbiology*, 2010,12(4):1053-1060.
- [29] Nijenhuis I, Kuntze K. Anaerobic microbial dehalogenation of organohalides—state of the art and remediation strategies [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016,38(4):33-38.
- [30] Nonaka H, Keresztes G, Shinoda Y, et al. Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfotobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006,188(6):2262-2274.
- [31] Thomas S H, Wagner R D, Arakaki A K, et al. The mosaic genome of anaeromyxobacter dehalogenans strain 2CP-C suggests an aerobic common ancestor to the Delta-*Proteobacteria* [J]. *PloS one*, 2008, 3(5):2103-2115.
- [32] Wagner D D, Hug L A, Hatt J K, et al. Genomic determinants of organohalide-respiration in *Geobacter lovleyi*, an unusual member of the *Geobacteraceae* [J]. *Bmc Genomics*, 2012,13(1):1471-1488.
- [33] Sharma P K, Mccarty P L. Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to cis-1,2-dichloroethene [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1996,62(3):761-765.
- [34] Seshadri R, Adrian L, Fouts DE, et al. Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes* [J]. *Science*, 2005,307(5706):105-109.
- [35] Siddaramappa S, Challacombe J F, Delano S F, et al. Complete genome sequence of *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* type strain (BL-DC-9(T)) and comparison to "*Dehalococcoides*" strains [J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2012,6(2):251-264.
- [36] Lee M, Low A, Zemb O, et al. Complete chloroform dechlorination by organochlorine respiration and fermentation [J]. *Environmental Microbiology*, 2012,14(4):883-894.
- [37] Trotsenko Y A, Torgonskaya M L. The aerobic degradation of dichloromethane: Structural-functional aspects (a review) [J]. *Applied Biochemistry & Microbiology*, 2009,45(3):233-247.

**作者简介:** 刘 帅(1993-),男,重庆合川人,硕士,主要从事环境微生物多样性分析及污染控制研究.发表论文 4 篇.

## 《中国环境科学》2011~2014 年发表的论文中 20 篇入选“领跑者 5000”提名论文

《中国环境科学》2011~2014 年发表的论文中有 20 篇入选“精品期刊顶尖论文平台——领跑者 5000”提名论文。“领跑者 5000(F5000)”平台由中国科学技术信息研究所于 2013 年建设,旨在集中展示中国精品科技期刊上发表的最高端的学术研究成果,将与国际和国内重要检索系统链接,扩大论文影响.该平台将与汤森路透公司合作,拟利用 WOK 国际检索系统平台,与 SCI 数据库在同一平台内实现文献链接和国际引文检索,在更大范围内向世界科技同行展示和推广中国最重要的科研成果.提名论文均为 2011~2014 年在学科领域内被引率排名居前的论文.本次环境学科共有 65 篇文章入选“领跑者 5000”提名论文.