

• 环境生物技术 •

典型功能层带-填埋场覆盖层中四氯化碳代谢机制及功能微生态响应

王永琼¹, 邢志林¹, 陈尚洁¹, 苏夏¹, 曹昆¹, 曹露丹¹, 廖书书¹, 董朗朗¹, 艾铄², 赵天涛¹

1 重庆理工大学 化学化工学院, 重庆 400054

2 重庆士继生态环境科技有限公司, 重庆 404100

王永琼, 邢志林, 陈尚洁, 苏夏, 曹昆, 曹露丹, 廖书书, 董朗朗, 艾铄, 赵天涛. 典型功能层带-填埋场覆盖层中四氯化碳代谢机制及功能微生态响应. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1874-1888.

WANG YQ, XING ZL, CHEN SJ, SU X, CAO K, CAO LD, LIAO SS, DONG LL, AI S, ZHAO TT. Transformation mechanism of carbon tetrachloride and the associated micro-ecology in landfill cover, a typical functional layer zone. Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1874-1888.

摘要: 垃圾填埋场是四氯化碳 (carbon tetrachloride, CT) 污染的重要来源, 明晰覆盖层功能层带中 CT 的转化机制对其污染控制尤为重要。本研究通过构建模拟覆盖层系统, 开展了 CT 沿程生物降解及微生态研究。覆盖层理化特性分析表明, 长期生物氧化使覆盖层形成了稳定存在的厌氧层 (>45 cm)、缺氧层 (15–45 cm) 和好氧层 (0–15 cm) 功能层带, 各特征层带氧化还原电位、微生物群落结构差异显著, 为 CT 降解提供了生物资源和有利条件。降解结果显示, CT 在厌氧层和缺氧层脱氯产生氯仿 (chloroform, CF) 和二氯甲烷 (dichloromethane, DCM) 及氯离子 (Cl⁻), 副产物在 30 cm 处浓度最大, 好氧层中 CF 和 DCM 迅速发生好氧降解; CT 降解速率为 13.2–103.6 μg/(m²·d), 随填埋气通量增大而增大。多样性测序结果表明, 不同层带功能菌属差异显著, 中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium*) 为好氧层 CT 潜在降解菌属, 硫杆菌 (*Thiobacillus*) 和间孢囊菌 (*Intrasporangium*) 为厌氧层和缺氧层潜在功能菌属; 覆盖土中 6 种脱氯菌属和 18 种甲烷氧化菌分别负责 CT 厌氧转化和 CF 与 DCM 的好氧降解, 缺氧层可同时发生厌氧脱氯和好氧转化过程。降解机理分析可知, 通过调控手段实现包气带的厌氧层-缺氧层-好氧层稳定存在对全氯代烃的无害化去除十分重要, 增大缺氧层范围可强化全氯代烃去除。研究结果为填埋场中氯代污染物的去除提供了理论指导。

关键词: 填埋场覆盖层; 特征功能层带; 四氯化碳; 缺氧区; 功能微生物

Received: July 26, 2021; **Accepted:** January 17, 2022; **Published online:** January 19, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (51978117); Research Initiated Project of Chongqing University of Technology (2019ZD72); Innovation and Entrepreneurship Training Program of Chongqing (2020CX019); Graduate Innovation Fund of Chongqing University of Technology (clgyx 20203092)

Corresponding author: XING Zhilin. E-mail: xingzhilin@cqut.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (51978117); 重庆理工大学科研启动项目 (2019ZD72); 重庆市创新创业训练项目 (2020CX019); 重庆理工大学研究生创新基金 (clgyx 20203092)

Transformation mechanism of carbon tetrachloride and the associated micro-ecology in landfill cover, a typical functional layer zone

WANG Yongqiong¹, XING Zhilin¹, CHEN Shangjie¹, SU Xia¹, CAO Kun¹, CAO Ludan¹, LIAO Shushu¹, DONG Langlang¹, AI Shuo², ZHAO Tiantao¹

¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China

² Chongqing Shiji Ecological Environment Technology Co., Ltd., Chongqing 404100, China

Abstract: Landfill is one of the important sources of carbon tetrachloride (CT) pollution, and it is important to understand the degradation mechanism of CT in landfill cover for better control. In this study, a simulated landfill cover system was set up, and the biotransformation mechanism of CT and the associated micro-ecology were investigated. The results showed that three stable functional zones along the depth, i.e., aerobic zone (0–15 cm), anoxic zone (15–45 cm) and anaerobic zone (>45 cm), were generated because of long-term biological oxidation in landfill cover. There were significant differences in redox condition and microbial community structure in each zone, which provided microbial resources and favorable conditions for CT degradation. The results of biodegradation indicated that dechlorination of CT produced chloroform (CF), dichloromethane (DCM) and Cl⁻ in anaerobic and anoxic zones. The highest concentration of dechlorination products occurred at 30 cm, which were degraded rapidly in aerobic zone. In addition, CT degradation rate was 13.2–103.6 μg/(m²·d), which decreased with the increase of landfill gas flux. The analysis of diversity sequencing revealed that *Mesorhizobium*, *Thiobacillus* and *Intrasporangium* were potential CT-degraders in aerobic, anaerobic and anoxic zone, respectively. Moreover, six species of dechlorination bacteria and eighteen species of methanotrophs were also responsible for anaerobic transformation of CT and aerobic degradation of CF and DCM, respectively. Interestingly, anaerobic dechlorination and aerobic transformation occurred simultaneously in the anoxic zone in landfill cover. Furthermore, analysis of degradation mechanism suggested that generation of stable anaerobic-anoxic-aerobic zone by regulation was very important for the harmless removal of full halogenated hydrocarbon in vadose zone, and the increase of anoxic zone scale enhanced their removal. These results provide theoretical guidance for the removal of chlorinated pollutants in landfills.

Keywords: landfill cover; function layer zone; carbon tetrachloride; hypoxic zone; functional microorganism

四氯化碳 (carbon tetrachloride, CT) 作为脱脂剂、干洗剂和有机溶剂等在工业中被广泛使用^[1-2], 由于处理、处置不当, 通过非法排放、

倾倒、泄漏等途径导致其在大气、土壤和地下水中大量存在^[2]。CT 持久性强, 水溶性低, 非生物水解半衰期可达 7 000 年^[3], 这导致其在环

境中不断积累^[4]。国际和国内环境保护机构均将 CT 列入优先控制污染物名单^[5-6]，其“三致”效应、遗传毒性和生态破坏性，给自然环境和人类健康带来严重威胁^[7]。CT 污染的有效控制和去除已引起生物降解领域的广泛关注。

CT 污染来源广泛，垃圾填埋场中含氯有机物的分解产生大量氯代烃，可持续释放几十上百年，填埋场周边大气中 CT 检出率高达 90%，无序填埋气排放已成为 CT 污染的重要来源之一^[8]。当前，填埋场温室气体生物甲烷 (CH₄) 减排研究已取得显著成效，但还无有效措施用于 CT 等氯代有机物的污染控制^[8]。覆盖土在填埋气长期驯化作用下，衍生了各种复杂的功能微生物^[9]，为 CT 降解提供了丰富的生物资源；同时，覆盖层中气体逆向扩散和生物氧化形成了相对稳定的厌氧区、缺氧区和好氧区，为 CT 转化提供了有利的氧化还原条件。作为污染源和大气的重要界面，填埋场覆盖层是典型的污染物控制功能层带。研究表明，CT 迁移至覆盖层中可迅速扩散，并快速达到吸附平衡，且覆盖土对 CT 的吸附速率远大于降解速率，生物降解已成为 CT 去除的限速步骤^[10]。当前 CT 的生物降解主要关注单一氧化还原特性下的转化过程，因此，明晰 CT 在覆盖层中的迁移转化规律，强化生物降解是 CT 污染控制的关键，相关研究还未见报道。

CT 生物降解受氧化还原特性的显著影响，易在厌氧条件下还原，好氧转化极难发生^[11]。CT 厌氧降解菌主要包括梭菌属 (*Clostridium*)、脱卤素杆菌属 (*Dehalobacter*)、脱亚硫酸菌属 (*Desulfitobacterium*)、脱硫杆菌属 (*Desulfobacterium*) 等^[9]，这些菌株可将 CT 还原为低氯取代烃，由于厌氧脱氯速率缓慢及完全脱氯菌株缺乏，该过程往往造成 CF 和 DCM 等有毒副产物的大量积累^[12]。覆盖层中研究最多的功能菌株为甲烷氧化

菌，其可以 CH₄ 为底物共代谢降解 DCM、CF 等低氯取代烃^[13-15]，是间接去除 CT 的功能微生物。CT 降解过程覆盖层中功能菌属的组成及分布也是需要关注的重点，相关信息还十分有限。

因此，本研究构建模拟填埋场覆盖层系统，开展 CT 的生物降解研究。通过连续分析氧气 (O₂) 浓度梯度变化，明晰厌氧-缺氧-好氧功能层带的分布规律；改变填埋气通量及 CT 浓度，探明 CT 整体降解能力及变化规律；通过 CT 脱氯产物 CF 和 DCM 的梯度分布，考察 CT 厌氧脱氯-好氧转化降解的机理；利用多样性测序手段，探究覆盖层微生物群落结构特征，明确厌氧脱氯及好氧降解功能菌株的沿程分布规律；最后基于 CT 降解特性推演其在覆盖层中的沿程降解机制图。研究成果可补充和完善复杂环境中 CT 的转化机制及环境微生态信息，对环境土壤包气带中 CT 的原位生物降解具有重要的指导价值。

1 材料与方法

1.1 垃圾填埋场覆盖土

本研究使用的覆盖土均取自重庆长生桥生活垃圾填埋场 (29°35'N, 106°33'E)，填埋场面积为 69.14×10⁴ m²，库容为 12×10⁶ m³，使用超过 20 年^[7,12]。覆盖土取自覆盖层以下 10–30 cm 土样，去除砾石、木棒等大颗粒后，将土壤过 4 mm 筛网，将筛后土壤充分混合后，调节含水量约为 15%。覆盖土理化性质参见文献^[16]。

1.2 模拟填埋场覆盖层构建与运行

模拟覆盖层装置如图 1 所示。覆盖层柱高 100 cm，内径 30 cm，材料为聚氯乙烯 (polyvinyl chloride, PVC)。覆盖层侧方设置 6 个气体和土壤取样口，间隔为 15 cm。覆盖层两端利用法兰盘垫橡胶圈进行密封，CH₄、CO₂ 和 CT 混合气体通过下端开口通入，顶端通入空气并进行尾气

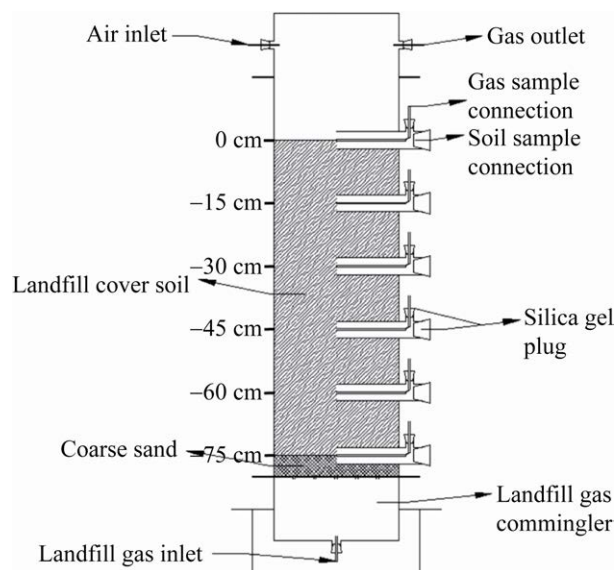


图 1 覆盖层系统示意图

Figure 1 Schematic diagram of landfill cover.

排放。覆盖层底端装填 5 cm 的粗砂粒，并布设与内径相同的铁丝网，用于提高填埋气均匀度。覆盖土自然装填，总高度为 75 cm。

利用覆盖土构建 2 套覆盖层系统，分别为对照组和实验组，对照组中覆盖土经叠氮化钠 (NaN_3) 灭菌 ($0.13 \text{ mg/g}_{\text{dried soil}}$)^[17]，其余条件与实验组相同。系统运行过程中，体积比为 1:1 的 CH_4 和 CO_2 混合气吹扫气相 CT 由底部通入覆盖层，空气经加湿后在顶部通入。根据实际填埋场填埋气中非甲烷类有机物浓度设置 CT 初始浓度^[18]，通入的填埋气基本参数如表 1 所示。运行过程中连续监测不同梯度填埋气浓度，

持续时间 50 d。

1.3 分析检测

CH_4 、 O_2 和 CO_2 利用气相色谱 (重庆川仪自动化股份有限公司, SC-6000A) 测定, 色谱条件: 不锈钢色谱柱 TDX8-12-25 2 m, 进样口温度、柱温以及检测器 (thermal conductivity detector, TCD) 温度分别为 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $120 \text{ }^\circ\text{C}$, 氮气 (N_2) 为载气, 载气流速为 25 mL/min , 进样量为 0.5 mL ^[7]。

氯代烃利用气相色谱 (重庆川仪自动化股份有限公司, SC-3000B) 测定, 色谱条件: 不锈钢色谱柱 GDX-104 2 m; 进样器温度、柱温和检测器 (electron capture detector, ECD) 温度分别为 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $200 \text{ }^\circ\text{C}$; N_2 为载气, 载气流速为 40 mL/min ; 尾吹流速为 10 mL/min ; 进样量: 0.1 mL ; 基流补偿为 0.00 nA ^[7]。

氯离子 (Cl^-) 检测方法参见文献[19]; 有机质采用元素分析仪分析; 含水量通过土样烘干 ($105 \text{ }^\circ\text{C}$) 前后质量差进行测定^[7]。

1.4 覆盖土微生物 DNA 提取与多样性测序

覆盖土微生物总 DNA 提取与多样性测序参照文献[7], 测序数据经拼接质控, 优化数据及 OTU 聚类等上传美吉生物 i-singer 平台 (<http://www.i-singer.com>), 并进行在线分析。

1.5 数据分析

$$\text{CH}_4 \text{ 去除率 } \eta_{\text{CH}_4} = \frac{Q_{\text{inlet}} \cdot c_{\text{CH}_4, \text{inlet}} - Q_{\text{outlet}} \cdot c_{\text{CH}_4, \text{outlet}}}{Q_{\text{inlet}} \cdot c_{\text{CH}_4, \text{inlet}}}$$

表 1 填埋气基本参数

Table 1 Basic parameters of landfill gas

No.	Time (d)	Gas flux ($\text{m}^3/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$)	Inlet flow (mL/min)	CT flux ($\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$)	Methane flux ($\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$)	CT volume ratio (V/V , %)
A	1-10	0.204 1	10	0.052 1	72.82	0.003 71
B	11-20	0.408 2	20	0.103 3	145.62	0.003 71
C	21-30	0.612 1	30	0.155 3	218.43	0.003 71
D	31-40	0.816 4	40	0.206 2	291.24	0.003 71
E	41-50	1.020 3	50	0.258 3	364.04	0.003 71

其中 Q_{inlet} 为填埋气进口流量, $c_{\text{CH}_4, \text{inlet}}$ 为进口 CH_4 浓度, Q_{outlet} 为出口填埋气流量, $c_{\text{CH}_4, \text{outlet}}$ 为出口 CH_4 浓度。

$$\text{CH}_4 \text{ 降解速率 } V_{\text{CH}_4} = \frac{(Q_{\text{inlet}} \cdot c_{\text{CH}_4, \text{inlet}} - Q_{\text{outlet}} \cdot c_{\text{CH}_4, \text{outlet}})}{S}$$

其中 S 为模拟覆盖层横截面积。

$$\text{氯代烃降解率 } \eta_{\text{CT}} = \frac{Q_{\text{inlet}} \cdot c_{\text{CT}, \text{inlet}} - Q_{\text{outlet}} \cdot c_{\text{CT}, \text{outlet}}}{Q_{\text{inlet}} \cdot c_{\text{CT}, \text{inlet}}}$$

其中 $c_{\text{CT}, \text{inlet}}$ 为进口 CT 浓度, $c_{\text{CT}, \text{outlet}}$ 为出口 CT 浓度。

$$\text{CT 降解速率 } \eta_{\text{CT}} = \frac{Q_{\text{inlet}} \cdot c_{\text{CT}, \text{inlet}} - Q_{\text{outlet}} \cdot c_{\text{CT}, \text{outlet}}}{S}$$

2 结果与分析

2.1 填埋场覆盖层好氧-缺氧-厌氧层带分布

填埋场覆盖层作为连接填埋垃圾和大气的界面, 是控制填埋气向大气逸散的最后屏障^[9]。填埋气和空气逆向扩散及生物氧化作用, 使覆盖土中氧化还原特性、理化性质和微生物群落结构在沿程上呈现梯度变化, 促进覆盖层形成不同特征功能层带。覆盖层中不同深度 O_2 浓度随时间的变化如图 2 所示。覆盖土表面与大气

相连, 由于填埋气作用, O_2 浓度比大气浓度略低, 表面以下至 15 cm 处 O_2 浓度较低, 约为 2%, 覆盖土表面以下 30 cm 处偶有 O_2 检出, 覆盖土表面以下 45 cm 及更深处几乎无 O_2 检出。因此, 根据 O_2 分布情况可将覆盖层划分为好氧层 (0–15 cm)、缺氧层 (15–45 cm) 和厌氧层 (>45 cm) 3 个特征层带, 以往研究中常将包气带分为好氧和厌氧区^[8]。

不同气体浓度随覆盖层深度分布情况如图 3 所示。对照组中覆盖土无生物活性, CH_4 和 CO_2 浓度曲线几乎重合 (图 3A)。实验组各深度处 CO_2 浓度高于 CH_4 , O_2 浓度低于对照组, 表明 CH_4 发生生物氧化产生 CO_2 (图 3B)。此外, N_2 和对照组 O_2 浓度分布表明空气可扩散至整个覆盖层。对照组中 O_2 在整个覆盖层系统中均有检出, 而实验组中在 45 cm 以下已无检出, 表明持续氧化覆盖层形成了稳定的厌氧区及特征功能层带, 为 CT 的生物转化提供了有利的条件。

覆盖土理化性质时空变化如图 4 所示。pH 值变化范围为 7.05–7.56, 好氧层 pH 最低, 随反应进行逐渐降低 (图 4A); 含水量变化范围为 14.5%–18.8%, CH_4 生物氧化产生水, 导致好氧

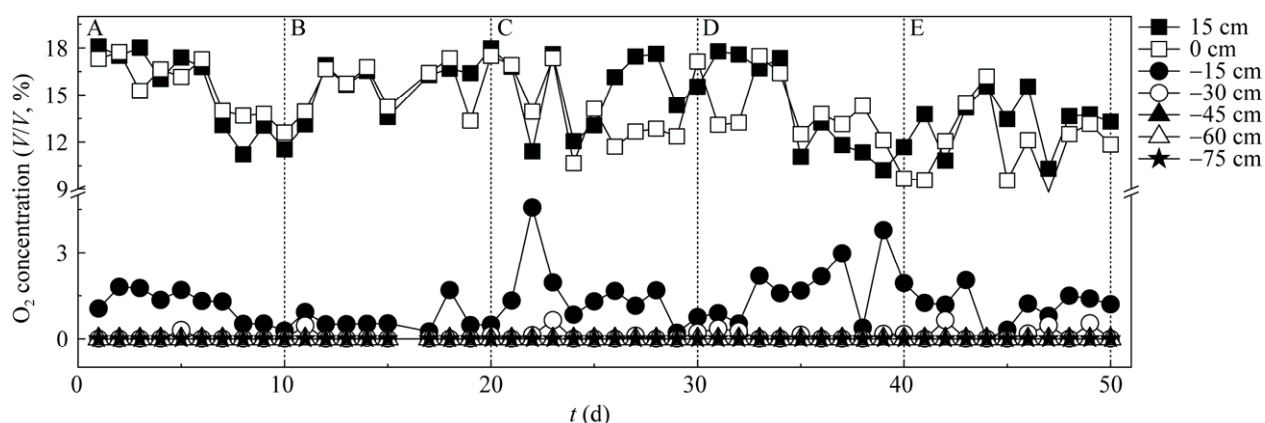


图 2 覆盖层不同深度 O_2 浓度随时间的变化图

Figure 2 The profile of oxygen concentration at different depths in landfill cover.

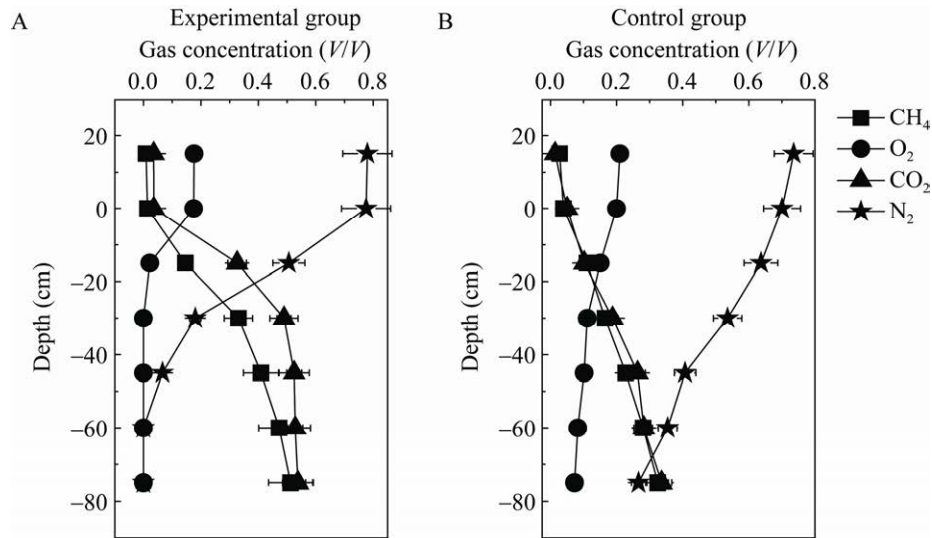


图3 覆盖层中 CH_4 、 O_2 、 CO_2 和 N_2 浓度的平均分布 A: 实验组; B: 对照组

Figure 3 Average distribution of CH_4 , O_2 , CO_2 and N_2 concentrations at different depth of landfill cover. (A) The experimental group. (B) The control group.

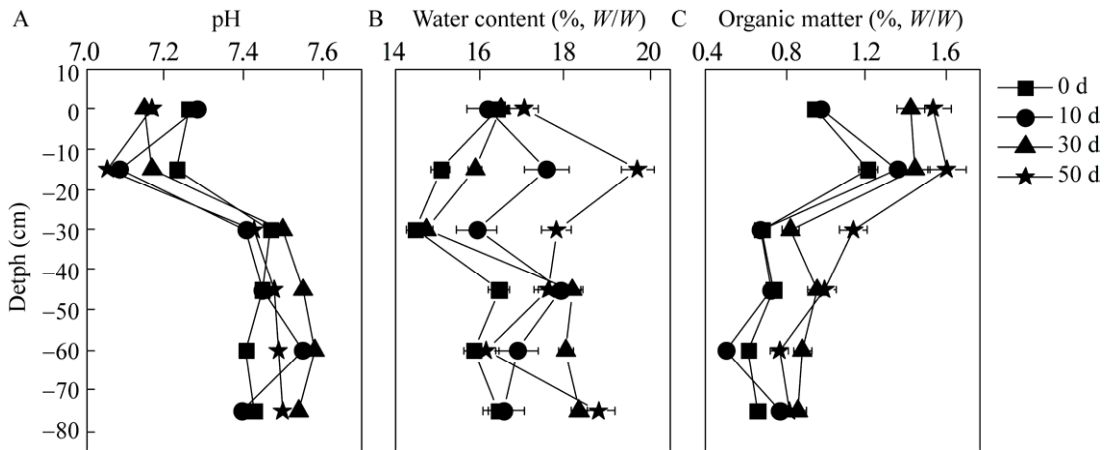


图4 覆盖土 pH (A)、含水率 (B) 和有机质含量 (C) 的时空变化

Figure 4 Spatial and temporal distribution of pH (A), moisture content (B) and organic content (C) in landfill cover.

和缺氧层含水量逐渐增加 (图 4B); 覆盖土中有机质含量为 0.62%–1.63%, 好氧层含量最高, 随时间变化各层的有机质含量均呈增加趋势, 表明各层均有 CH_4 生物氧化活性, 且好氧层 CH_4 生物氧化活性显著高于其他层带 (图 4C)。覆盖层 15 cm 处含水量和有机质含量最高, 表明其 CH_4 氧化活性最大。

另外, 从微生物多样性角度进一步考察了特征层带的分布, 如图 5 所示, 主坐标分析 PCoA 表明不同梯度微生物多样性差异显著, 基于微生物群落组成可将覆盖层分为 4 个层带, 厌氧区 (45–70 cm) 微生物群落组成十分接近, 好氧区和缺氧区微生物群落结构差异较大。随时间变化, 相同梯度微生物多样性较小, 表明了

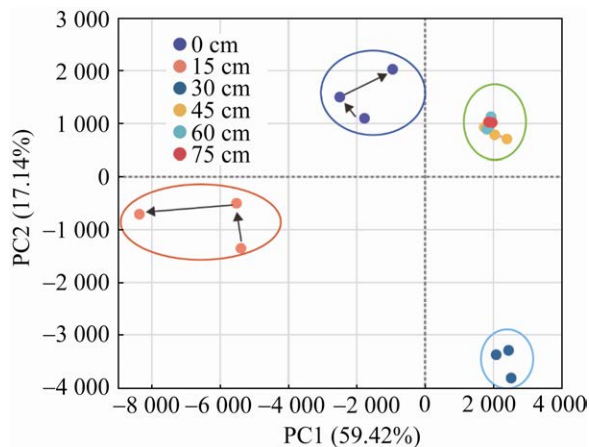


图5 覆盖层 OTU 水平微生物群落结构的 PCoA 图
Figure 5 PCoA diagram of microbial community structure at the OTU level.

各层带微生物功能可维持稳定。基于氧浓度、理化性质及微生物群落结构可知,覆盖层形成了稳定的具有不同功能生物氧化活性的特征层带。

2.2 覆盖层中 CH_4 氧化和 CT 降解情况

CT 及代谢产物浓度在覆盖层中不同梯度的分布情况如图 6 所示。灭菌土壤中无 CF 和 DCM 检出 (图 6B), 实验组中厌氧层和缺氧层均可脱氯产生 CF 和 DCM。30 cm 处 CF 和 DCM

浓度达到最大值, 表明厌氧区和缺氧区均发生 CT 的还原脱氯 (图 6A)。表层几乎无 CF 和 DCM 检出, 表明 CF 和 DCM 在好氧层迅速发生降解。CT 降解可产生 Cl^- [10], 对照组中 Cl^- 浓度几乎无变化 (图 6D), 活性土壤中 Cl^- 浓度随反应时间而增大, 厌氧层和缺氧层的 Cl^- 含量高于好氧层 (图 6C), 表明 CT 在缺氧层和厌氧层中发生脱卤反应。CT 在有氧条件下难以生物转化; 其脱卤产物 CF 可在缺氧和厌氧层继续脱氯产生 Cl^- , 也可在好氧层被甲烷氧化菌降解产生 Cl^- ; 而 CF 脱氯产物 DCM 难以进行厌氧还原脱氯降解, 只能在好氧层被降解产生 Cl^- [9,20]。因此, 高氯取代烃依次通过厌氧脱氯和好氧化是其去除的有效途径。

CT 在覆盖土中降解率为 9.9%–79.8%, 降解速率变化范围为 13.2–103.6 $\mu\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ 。CT 降解能力随填埋气通量变化关系如图 7 所示。在实验通量条件下, CT 降解率随通量变化线性减小 ($R^2=0.961$), 降解速率随通量变化线性增大 ($R^2=0.933$)。目前还未有报道表明甲烷氧化菌可共代谢降解 CT, 但其脱氯产物 CF 和 DCM

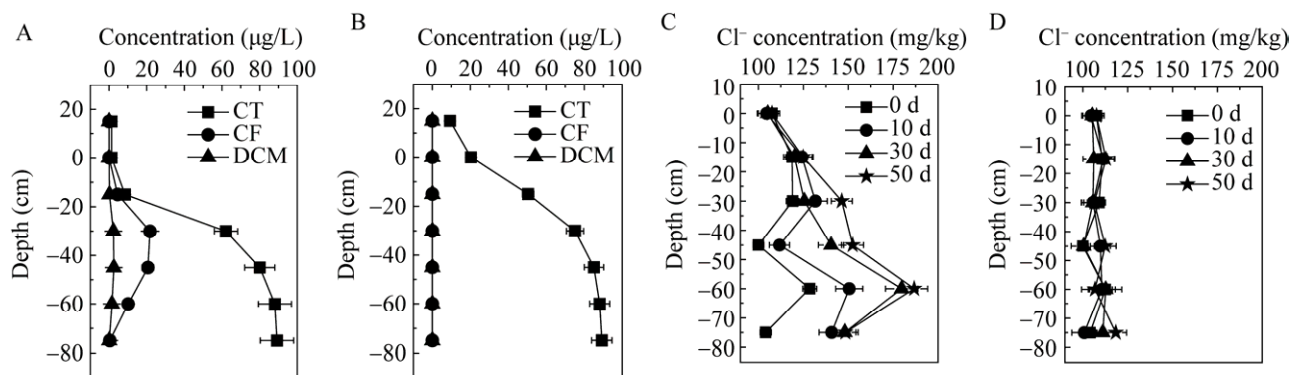


图 6 CT 及其脱氯产物在覆盖层中的分布图 A: 实验组氯代烃分布; B: 对照组氯代烃分布; C: 实验组氯离子分布; D: 对照组氯离子分布

Figure 6 Distribution of CT and its dechlorination products in landfill cover. The distribution of chloroalkanes in the experimental group (A) and in the control group (B), the distribution of Cl^- in the experimental group (C) and in the control group (D).

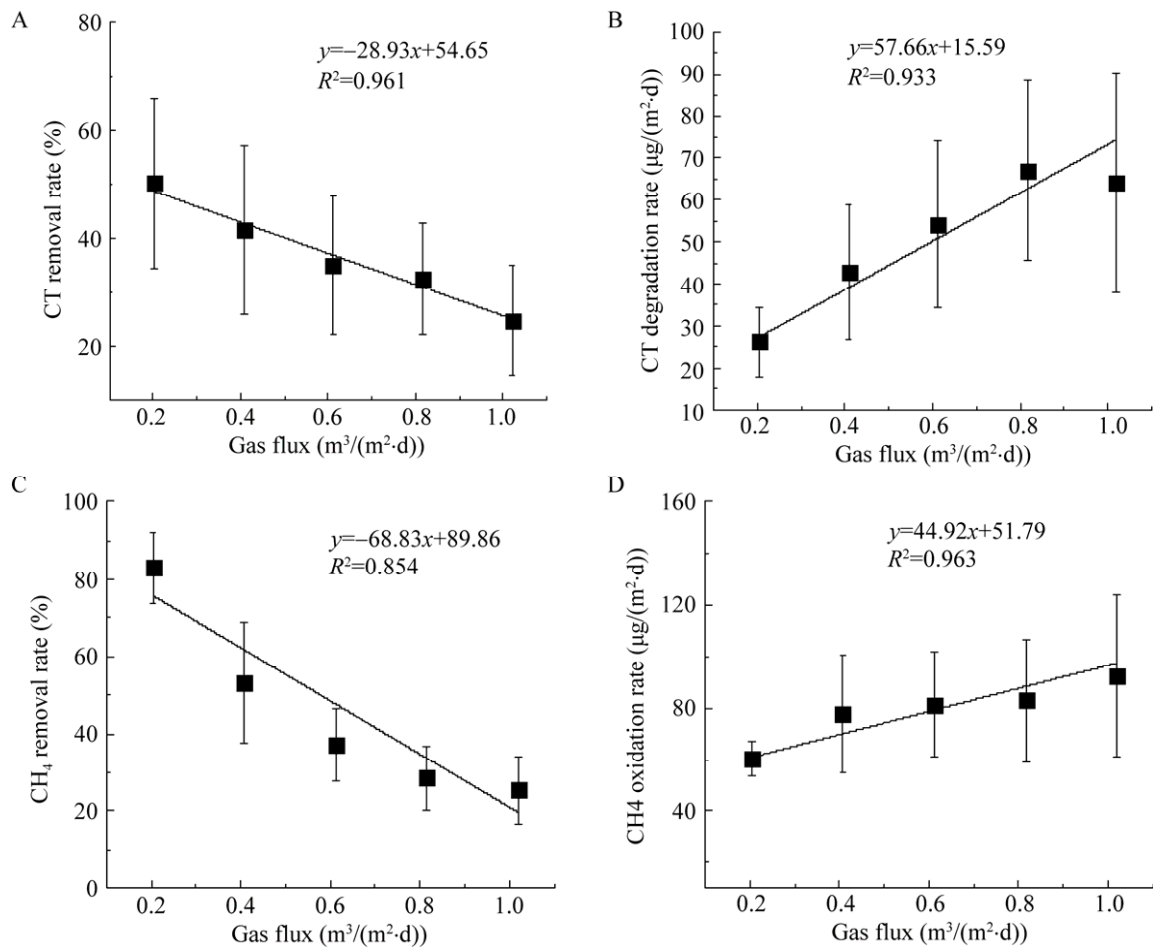


图 7 覆盖层 CH_4 和 CT 降解率和降解速率随通量的变化关系图

Figure 7 The degradation efficiency and the degradation rate of CH_4 and CT with the change of inlet flux.

可被共代谢降解^[9,14,21]。 CH_4 在覆盖层中的降解率为 10.5%–96.5%，降解速率变化范围为 52.0–148.8 $\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{d})$ 。 CH_4 降解率随进气口通量增大而逐渐减小 ($R^2=0.854$)，降解速率随通量增大线性增大 ($R^2=0.963$)。随通量增大，气体在覆盖层中停留时间逐渐减小， CH_4 和 CT 降解率减小。但同时，通量增加使单位时间内 CH_4 和 CT 降解总量增大，因此， CH_4 和 CT 降解速率增大。

2.3 覆盖层中功能层带的特征微生物分析

对覆盖层中好氧层、缺氧层和厌氧层 3 个特征层带的优势菌属进行分析，其平均丰度

结果如图 8 所示。覆盖层各层带微生物群落组成差异显著，表层土壤优势菌属为慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium*) (11.3%)、藤黄色单胞菌属 (*Luteimonas*) (3.7%)、甲基暖菌属 (*Methylocaldum*) (5.2%)、甲基孢囊菌 (unclassified *Methylocystaceae*) (5.1%)，而 15 cm 覆盖土尽管也为有氧区，但该处优势菌属 (*Mesorhizobium*) (18.2%) 和 (*Luteimonas*) (17.76%) 丰度显著增高，此外 *Singulisphaera* (10.7%)、unclassified *Methylocystaceae* (6.0%) 和嗜盐多孔菌 (*Haloactinopolyspora*) (5.6%) 也成为了优势菌属。30 cm 覆盖土长期处于缺氧区，特征菌属十分明显，为厌氧绳菌

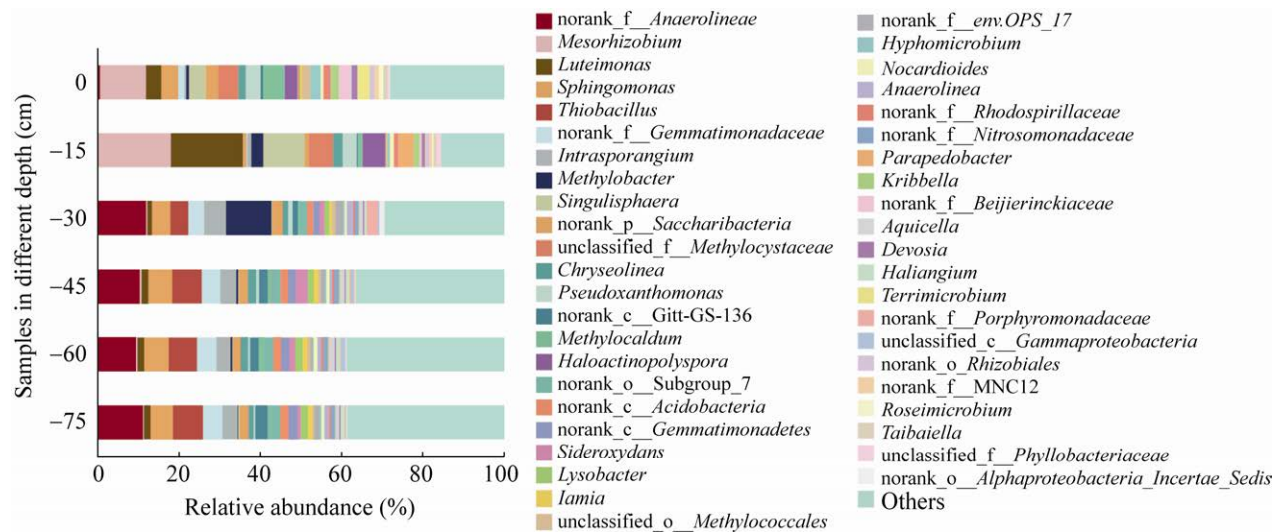


图 8 覆盖层中属水平上微生物群落结构平均分布

Figure 8 Average distribution of community abundance with depth at the genus level in landfill cover.

(*norank_Anaerolineae*) (12.0%) 和甲基杆菌属 (*Methylobacter*) (11.1%), 研究表明 *Methylobacter* 菌属在低氧气条件下易被富集^[8], 是适用于缺氧区生物转化的功能菌株。>45 cm 处覆盖土长期处于厌氧区, 微生物群落组成十分相似, 优势菌属为 *norank_Anaerolineae* (9.5%–11.2%)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*) (5.6%–6.1%)、硫杆菌 (*Thiobacillus*) (7.0%–7.3%)、芽单胞菌 (*norank_Gemmatimonadaceae*) (4.6%–4.8%) 和间胞囊菌 (*Intrasporangium*) (3.5%–3.8%), 好氧区和缺氧区优势菌属差异较大。这些菌属中一些已被证明具有 CT 降解能力, Sato 等^[22]发现百脉根根瘤菌 (*Mesorhizobium loti*) MAFF303099 是具有氯代烷烃脱卤酶基因的微生物; Myers 等^[23]发现 *Thiobacillus* 是具有氯代烃还原功能的菌属; 此外, Yoshikawa 等^[24]发现 *Intrasporangium* 可利用 DCM 作为底物, 因此可间接促进覆盖层中 CT 降解。其他微生物在 CT 降解的功能还未有报道, 需进一步开展研究, 具有不同功能菌群为 CT 降解提供了稳定的生物资源。

如表 2 所示, CT 降解功能菌主要有变形菌

门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和酸杆菌门 (Acidobacteria), 其中 Proteobacteria 和 Firmicutes 微生物较多。*Dehalobacter*、*Clostridium*、*Desulfitobacterium*、*Desulfobacterium* 和穆尔氏菌属 (*Moorella*) 属于 Firmicutes, 除 *Dehalobacter* 外, 这些菌属脱氯产物为 CF 和 DCM。地杆菌属 (*Geobacter*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和希瓦氏菌属 (*Shewanella*) 属于 Proteobacteria, 其脱氯产物为 CF。Acidobacteria 中的醋杆菌属 (*Acetobacterium*) 脱氯产物为 CF 和 DCM。本研究的覆盖层中 CT 厌氧降解微生物相对丰度如图 9A 所示。缺氧层和厌氧层丰度显著高于好氧层, 共有 6 种功能菌被检出, 其中 *Pseudomonas* (0.008 6%–0.319%) 和 *Desulfobacterium* (0–0.352%) 丰度较高, 此外, 还有 *Geobacter* (0–0.258%) 和 *Clostridium* (0–0.108%), 而 *Escherichia* (0–0.011%) 和 *Shewanella* (0–0.002 3%) 丰度很低, 只在个别样品中偶有检出。不同菌属对 CT 具有不同转化途径, Lewis 等^[25]发现 *Pseudomonas* sp. strain KC 通过硫和氧取代将 CT 转化为 CO₂ 和非挥发

性产物,无中间产物 CF 生成; Maithreepala 等^[26]发现硫还原地杆菌 (*Geobacter sulfurreducens*) 可利用蒽醌-2,6-二磺酸酯为电子供体将 CT 还原; Galli 等^[27]研究了 *Clostridium* sp. 对 CT 的生物转化, *Clostridium* 能够将 CT 还原为 CF, CF 进一步转化为 DCM; Gorby 等^[28]证明, *Shewanella* 可以还原结构铁 (III) 氧化物,从而将 CT 还原为 CF。此外,条件发生改变,同一菌属的 CT 转化特性也可能发生变化, Criddle 等^[29]研究大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K-12 对 CT 的还原脱卤实验发现,氧浓度为 1% 时,CT 直接转化为 CO₂; 在厌氧含富马酸条件下,CT 转化为 CO₂、CF 和非挥发性组分。CT 在覆盖层中的厌氧降解可能是这些微生物共同作用的结果。

厌氧降解副产物 CF 和 DCM 可通过共代谢发生转化,共代谢功能菌株在不同梯度的组成及丰度如图 9B 所示。甲烷氧化菌属水平上共检测有 18 种甲烷氧化菌, *Methylocaldum*、*unclassified_Methylocystaceae* 和 *Methylobacter* 为优势菌属。甲烷氧化菌在好氧层和缺氧层的丰度显著高于厌氧层。随反应进行, *unclassified_Methylocystaceae* 在好氧层成为优势菌株,而 I 型

甲烷氧化菌 (*Methylobacter*) 在缺氧层成为优势菌株。可以推测, *unclassified_f_Methylocystaceae* 喜欢在含低浓度 CH₄, 高浓度 O₂ 的好氧层生长, 而 *Methylobacter* 适宜在含高浓度 CH₄, 低浓度 O₂ 的缺氧层生长, 也有研究发现 *Methylobacter* 在低浓度 CH₄ 和高浓度 O₂ 环境中生长良好^[30]。因此, 复杂环境中功能菌株的生长受多种因素影响, 研究其与多种环境因子的相关关系对工程实践具有重要意义。当前还未见关于甲烷氧化菌共代谢降解 CT 的研究报道, 甲烷氧化菌通过好氧共代谢降解 CF 和 DCM 的研究已被广泛报道^[9,13-15]。30 cm 处既有高丰度的厌氧菌又有高丰度的甲烷氧化菌, 表明该层带同时具有氯代烃厌氧脱氯和好氧降解能力。

2.4 覆盖层特征层带中的生物降解机制推演

CT 在覆盖土特征层带中降解机制如图 10 所示。填埋气迁移过程经过厌氧层、缺氧层和好氧层, 厌氧层中, CT 在厌氧菌 *Desulfobacterium*、*Geobacter* 和 *Pseudomonas* 等的作用下脱氯为 CF, CF 在 *Clostridium* 和 *Desulfobacterium* 等作用下继续脱氯为 DCM。好氧层中 CT 无降解, 其脱氯产物 CF 和 DCM 可被甲烷氧化菌

表 2 CT 降解微生物及相应脱氯产物

Table 2 CT degrading bacteria and corresponding dechlorination products

Phylum	Genus	Products of dechlorinating	References
Firmicutes	<i>Clostridium</i>	CF, DCM	[27]
	<i>Dehalobacter</i>	Uncertain	[31]
	<i>Desulfobacterium</i>	CF, DCM	[32]
	<i>Acetobacterium</i>	CF, DCM	[33-34]
	<i>Moorella</i>	CF, DCM	[35]
Proteobacteria	<i>Klebsiella</i>	CF	[36]
	<i>Geobacter</i>	CF	[27]
	<i>Escherichia</i>	CF	[30]
	<i>Pseudomonas</i>	CF	[37-38]
	<i>Shewanella</i>	CF	[39]
Acidobacteria	<i>Acetobacterium</i>	CF, DCM	[27,30,33-39]

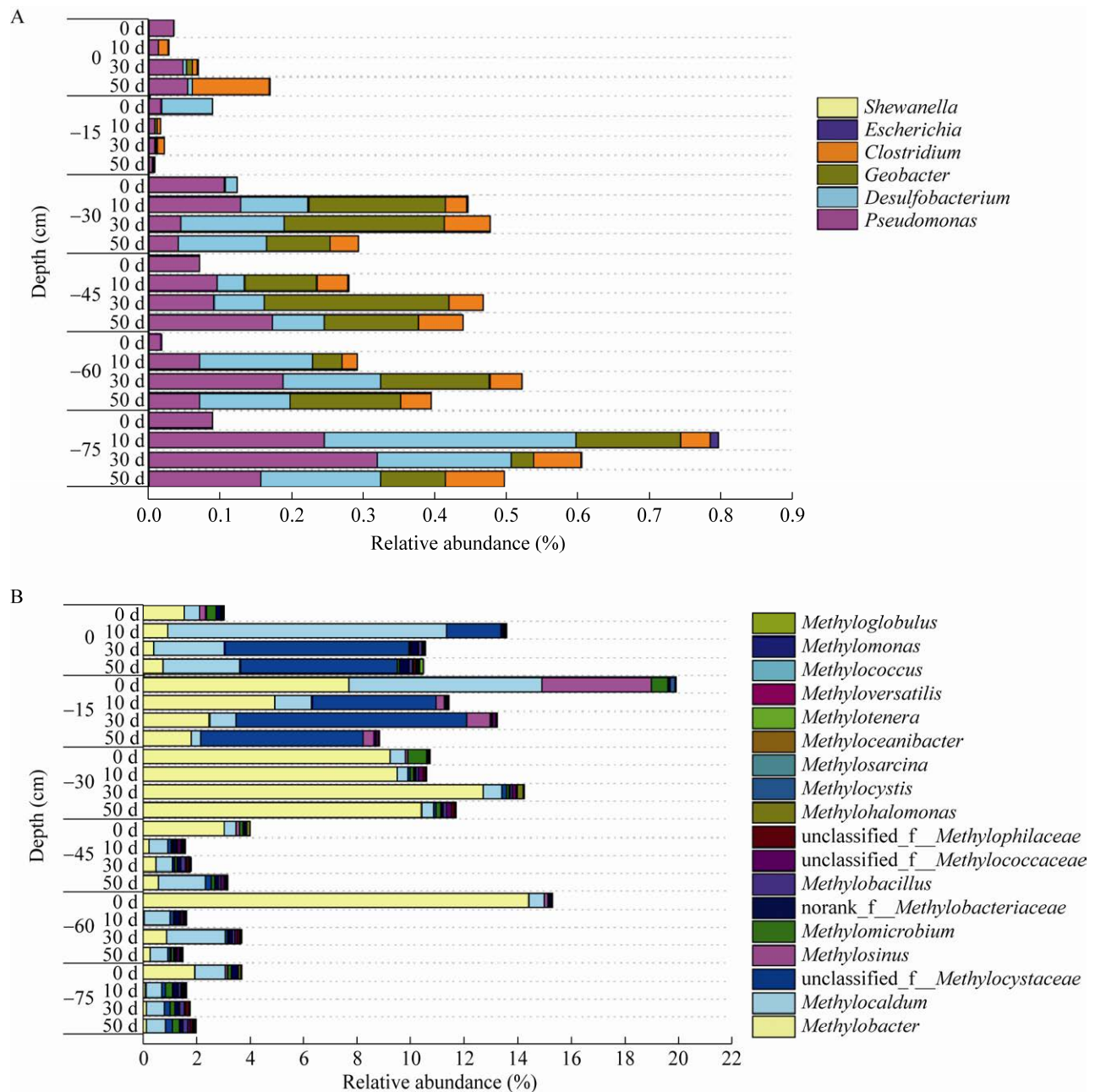


图9 覆盖层中CT厌氧降解菌(A)和甲烷氧化菌(B)时空分布

Figure 9 Distribution of CT anaerobic degrading bacteria (A) and methanotrophs (B) in landfill cover.

Methylocaldum、unclassified_*Methylocystaceae*和*Methylobacter*共代谢降解。CF可被甲烷单加氧酶催化为三氯甲醇和碳酰氯等,而后通过水解作用转化为HCl和 CO_2 ^[7,9,40];DCM催化为甲醛并最终转化为HCl和 CO_2 ^[21]。缺氧层中的

CT厌氧降解菌和甲烷氧化菌的相对丰度均较高,土壤含水率和有机质含量均有所增加,CT脱氯产物CF和DCM缓慢增加,CF浓度也逐渐升高,由此可知,缺氧层作为好氧层和厌氧层过渡带可同时发生好氧降解和厌氧脱氯反应。

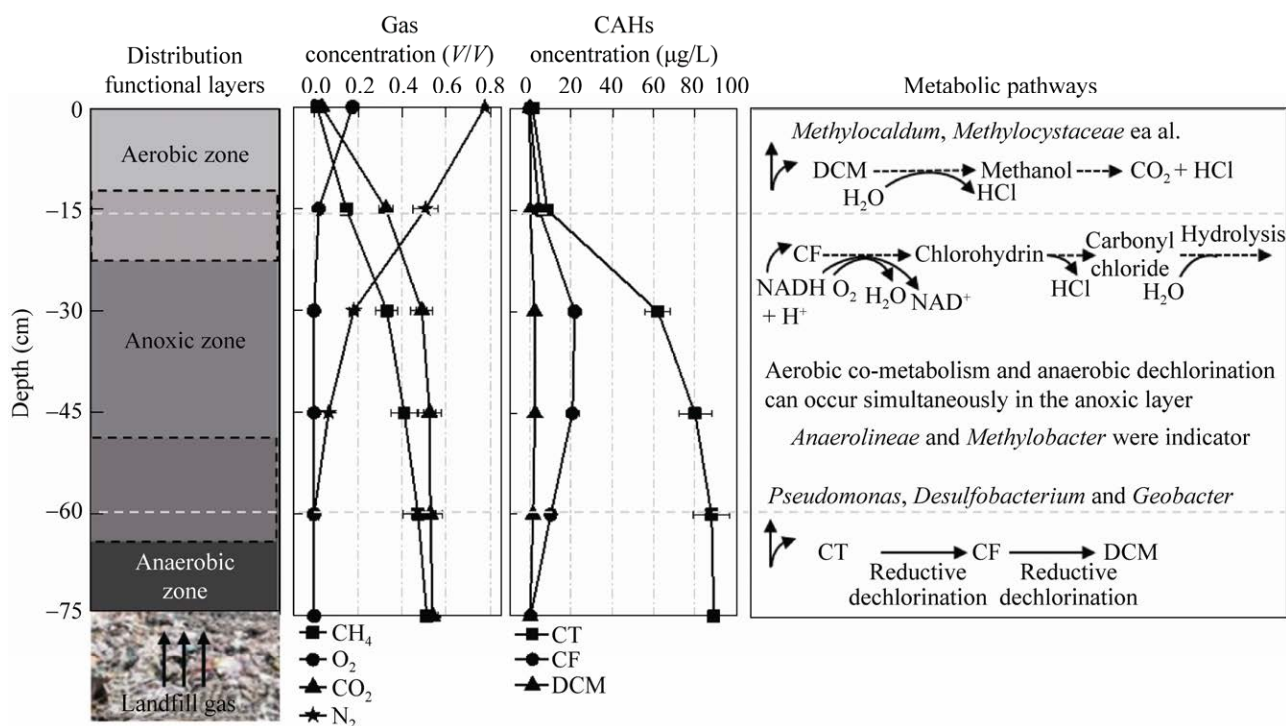


图 10 CT 在覆盖层层带中的生物降解示意图

Figure 10 Schematic diagram of the biodegradation mechanism of CT in landfill.

包气带在控制污染物向地下水和大气扩散中具有重要作用,明晰特征层带中 CT 的沿程转化机制对其原位修复具有重要指导价值^[41]。进行修复前,可基于层带中 CT 降解机制进行几方面考虑,首先将功能菌剂培养液注入到特征层带中,实现功能菌定殖;同时,通过注入营养液实现生物刺激,使功能菌快速增殖。全卤代烃难以发生好氧降解,厌氧降解过程难以实现完全脱氯,通过调控手段实现包气带的厌氧层-缺氧层-好氧层稳定存在对全氯代烃的无害化去除十分重要,脱氯作用和共代谢降解在缺氧层可同时发生,因此,调整曝气方式扩大缺氧层区间可强化该类污染物的降解。

3 结论

覆盖层中不同梯度 O₂、生物气、理化性质

及微生物群落组成分布差异显著,经生物氧化作用,形成了稳定的好氧层、缺氧层和厌氧层功能层带,为 CT 的生物转化提供了生物资源和有利条件。

CT 在厌氧层和缺氧层脱氯产生 CF 和 DCM 及 Cl⁻,副产物在 30 cm 处浓度最大。表层几乎无 CF 和 DCM 检出,表明好氧层 CF 和 DCM 迅速发生好氧降解。CT 降解率为 9.9%–79.8%,与通量呈负相关,降解速率范围为 13.2–103.6 μg/(m²·d),随通量增大而增大。

不同层带功能菌属差异显著, *Mesorhizobium* 为好氧层 CT 潜在降解菌属, *Thiobacillus* 和 *Intrasporangium* 为厌氧层和缺氧层潜在功能菌属;覆盖土中 6 种脱氯菌属 *Pseudomonas*、*Desulfobacterium*、*Geobacter* 等和 18 种甲烷氧化菌 unclassified_ *Methylocystaceae*、*Methylocaldum*、

Methylobacter 等分别负责 CT 厌氧转化和 CF、DCM 好氧降解, 厌氧脱氯微生物和共代谢降解微生物在缺氧层相对丰度均较高, 同时发生厌氧脱氯和好氧转化过程。

全卤代烃难以发生好氧降解, 厌氧降解过程难以实现完全脱氯, 如何通过调控手段实现包气带的厌氧层-缺氧层-好氧层稳定存在对全氯代烃的无害化去除十分重要, 此外, 氯代烃脱氯和共代谢降解在缺氧层可同时发生, 因此, 调整曝气方式扩大缺氧层区间可强化该类污染物的降解。

REFERENCES

- [1] Doherty RE. A history of the production and use of carbon tetrachloride, tetrachloroethylene, trichloroethylene and 1,1,1-trichloroethane in the United States: Part 1—historical background; carbon tetrachloride and tetrachloroethylene. *Environ Forensics*, 2000, 1(2): 69-81.
- [2] Kwon K, Shim H, Bae W, et al. Simultaneous biodegradation of carbon tetrachloride and trichloroethylene in a coupled anaerobic/aerobic biobarrier. *J Hazard Mater*, 2016, 313: 60-67.
- [3] Vogel TM, Criddle CS, McCarty PL. Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environ Sci Technol*, 1987, 21(8): 722-736.
- [4] Stroo HF, Ward CH. *In situ* Remediation of Chlorinated Solvent Plumes. New York: Springer New York, 2010.
- [5] 邢志林, 张云茹, 张丽杰. 氯代烃存在下覆盖层微生物甲烷氧化动力学. *重庆理工大学学报(自然科学)*, 2016, 30(6): 83-90.
Xing ZL, Zhang YR, Zhang LJ. Kinetics of methane oxidation by microorganism in landfill cover soil in the presence of chlorinated hydrocarbons. *J Chongqing Univer Tech (Nat Sci)*, 2016, 30(6): 83-90 (in Chinese).
- [6] 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. *水资源保护*, 2009, 25(1): 90-94.
Wang Z, Shi JS, Zhang ZJ, et al. Groundwater contamination risk assessment: a Chinese list of preferred controlled organic pollutants in water. *Water Resour Protec*, 2009, 25(1): 90-94 (in Chinese).
- [7] 刘帅, 邢志林, 李宸, 等. 典型污染物包气层中氯仿的沿程生物转化机制. *中国环境科学*, 2018, 38(12): 4581-4590.
Liu S, Xing ZL, Li C, et al. The biotransformation mechanism of chloroform in landfill cover. *China Environ Sci*, 2018, 38(12): 4581-4590 (in Chinese).
- [8] 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. *微生物学报*, 2017, 57(4): 468-479.
Yang X, Xing ZL, Zhang LJ. Advances in transformation and regulation biodegradation of chlorinated hydrocarbons in landfill. *Acta Microbiol Sin*, 2017, 57(4): 468-479 (in Chinese).
- [9] 刘帅. 氯代烷烃在垃圾填埋场覆盖层中的迁移转化及降解机制研究[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2019.
Liu S. Study on migration and degradation mechanism of chlorinated alkanes in landfill cover[D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [10] 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. *中国环境科学*, 2018, 38(4): 1403-1410.
Zhao TT, Yang X, Xing ZL, et al. Adsorption of chlorinated hydrocarbons in landfill cover soil. *China Environ Sci*, 2018, 38(4): 1403-1410 (in Chinese).
- [11] Penny C, Vuilleumier S, Bringel F. Microbial degradation of tetrachloromethane: mechanisms and perspectives for bioremediation. *FEMS Microbiol Ecol*, 2010, 74(2): 257-275.
- [12] Huang B, Lei C, Wei C, et al. Chlorinated volatile organic compounds (Cl-VOCs) in environment-sources, potential human health impacts, and current remediation technologies. *Environ Int*, 2014, 71: 118-138.
- [13] Zhng L, Xing Z, Gao Y. Degradation of trichloroethene and chloroform using methanotrophs isolated from landfills biocovers soil. *J Chem Pharm Res*, 2013, 5(11): 143-145.
- [14] Cappelletti M, Frascari D, Zannoni D, et al. Microbial degradation of chloroform. *Appl Microbiol Biot*, 2012, 96(6): 1395-1409.
- [15] Leisinger T, Bader R, Hermann R, et al. Microbes, enzymes and genes involved in dichloromethane utilization. *Biodegradation*, 1994, 5(3-4): 237-248.
- [16] 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. *中国环境科学*, 2015, 35(12):

- 3744-3753.
He Z, Zhao TT, Xing ZL, et al. Analysis of bacterial community composition in landfill cover soil. *China Environ Sci*, 2015, 35(12): 3744-3753 (in Chinese).
- [17] Su Y, Zhang X, Wei XM, et al. Evaluation of simultaneous biodegradation of methane and toluene in landfill covers. *J Hazard Mater*, 2014, 274(15): 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. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(22): 5143-5149.
- [19] 才凤, 贾宏新. 离子色谱法测定工业废水中甲酸根、乙酸根和氯离子. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(1): 219-222.
Cai F, Jia HX. Determination of formate, acetate and chloride in industrial wastewater by ion chromatography. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(1): 219-222 (in Chinese).
- [20] 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. *生物工程学报*, 2018, 34(4): 510-524.
Liu S, Zhao TT, Xing ZL, et al. Advances in biotic and abiotic mutual promoting mechanism for chlorinated aliphatic hydrocarbons degradation. *Chin J Biotech*, 2018, 34(4): 510-524 (in Chinese).
- [21] Trotsenko YA, Torgonskaya ML. The aerobic degradation of dichloromethane: structural-functional aspects: a review. *Appl Biochem Micro*, 2009, 45(3): 233-247.
- [22] Sato Y, Monincová M, Chaloupková R, et al. Two rhizobial strains, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, encode haloalkane dehalogenases with novel structures and substrate specificities. *Appl Environ Microb*, 2005, 71(8): 4372-4379.
- [23] Myers CR, Carstens BP, Antholine WE, et al. Chromium (VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Appl Microbiol*, 2010, 88(1): 98-106.
- [24] Yoshikawa M, Zhang M, Toyota K. Enhancement and biological characteristics related to aerobic biodegradation of toluene with co-existence of benzene. *Water Air Soil Poll*, 2016, 227(9): 1-11.
- [25] Lewis TA, Crawford RL. Transformation of carbon tetrachloride via sulfur and oxygen substitution by *Pseudomonas* sp. strain KC. *J Bacteriol*, 1995, 177(8): 2204-2208.
- [26] Maithreepala RA, Doong RA. Transformation of carbon tetrachloride by biogenic iron species in the presence of *Geobacter sulfurreducens* and electron shuttles. *J Hazard Mater*, 2009, 164(1): 337-344.
- [27] Gälli R, McCarty PL. Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a *Clostridium* sp.. *Appl Environ Microb*, 1989, 55(4): 837-844.
- [28] Gorby YA, Amonette SE, Fruchter JS. In proceedings of the 33rd hanford symposium on health and the environment. *In-situ* remediation: scientific basis for current and future technologies. Battelle Pacific Northwest Laboratories: Pasco, WA, 1994: 233-247.
- [29] Criddle CS, Dewitt JT, Mccarty PL. Reductive dehalogenation of carbon tetrachloride by *Escherichia coli* K-12. *Appl Environ Microb*, 1990, 56(11): 3247-3254.
- [30] Strong PJ, Xie S, Clarke WP. Methane as a resource: can the methanotrophs add value? *Environ Sci Technol*, 2015, 49(7): 4001-4018.
- [31] Maillard J, Schumacher W, Vazquez F, et al. Characterization of the corrinoid iron-sulfur protein tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *Appl Environ Microb*, 2003, 69(8): 4628-4638.
- [32] Gerritse J, Drzyzga O, Kloetstra G, et al. Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. *Appl Environ Microb*, 1999, 65(12): 5212-5221.
- [33] Egli C, Tschan T, Scholtz R, et al. Transformation of tetrachloromethane to dichloromethane and carbon dioxide by *Acetobacterium woodii*. *Appl Environ Microb*, 1988, 54(11): 2819-2824.
- [34] Stromeyer SA, Stumpf K, Cook AM, et al. Anaerobic degradation of tetrachloromethane by *Acetobacterium woodii*: separation of dechlorinative activities in cell extracts and roles for vitamin B₁₂ and other factors. *Biodegradation*, 1992, 3(1): 113-123.
- [35] Li XM, Zhou SG, Li FB, et al. Fe(III) oxide reduction and carbon tetrachloride dechlorination by a newly isolated *Klebsiella pneumoniae* strain L17. *J Appl Microbiol*, 2009, 106(1): 130-139.
- [36] Lewis TA, Cortese MS, Sebat JL, et al. A *Pseudomonas*

- stutzeri* gene cluster encoding the biosynthesis of the CCl₄-dechlorination agent pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid). *Environ Microbiol*, 2000, 2(4): 407-416.
- [37] Lewis TA, Paszczyński A, Gordon-Wylie SW, et al. Carbon tetrachloride dechlorination by the bacterial transition metal chelator pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid). *Environ Sci Technol*, 2001, 35(3): 552-559.
- [38] Gerlach R, Cunningham AB, Caccavo F. Dissimilatory iron-reducing bacteria can influence the reduction of carbon tetrachloride by iron metal. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(12): 2461-2464.
- [39] Hashsham SA, Freedman DL. Enhanced biotransformation of carbon tetrachloride by *Acetobacterium woodii* upon addition of hydroxocobalamin and fructose. *Appl Environ Microb*, 1999, 65(10): 4537-4542.
- [40] 邢志林, 张丽杰, 赵天涛. 专一营养与兼性甲烷氧化菌降解氯代烃的研究现状、动力学分析及展望. *生物工程学报*, 2014, 30(4): 531-544.
- Xing ZL, Zhang LJ, Zhao TT. Advances in degradation of chlorinated hydrocarbons by obligate and facultative methanotrophs. *Chin J Biotech*, 2014, 30(4): 531-544 (in Chinese).
- [41] 胡文庆, 邢志林, 赵天涛. 包气带中氯代烃运移特性及原位生物修复研究进展. *应用与环境生物学报*, 2022(3): 1-10.
- Hu WQ, Xing ZL, Zhao TT. Migration behavior and *in-situ* bioremediation of chlorinated hydrocarbon solvent in vadose zone: a review. *Chin J Appl Environ Biol*, 2022(3): 1-10.

(本文责编 郝丽芳)