

垃圾渗滤液原位反硝化研究*

钟琦^{1,2} 张杰^{3,4} 李大平^{1**} 陶勇¹ 胡杰^{1,2} 王晓梅¹ 郭维强³ 何晓红¹

(¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041; ²中国科学院研究生院 北京 100049)

(³四川大学生命科学学院 成都 610041; ⁴山西师范大学生命科学学院 临汾 041004)

摘要 场外硝化-原位反硝化是垃圾填埋场氮管理的新途径. 本文利用垃圾柱模拟生物反应器填埋场, 研究了硝化渗滤液在填埋场内部的变迁及其对垃圾降解的影响. 结果表明, 硝化渗滤液回灌促进了填埋场垃圾降解, 回灌的总氧化态氮(TON)被完全还原, 反硝化为主要作用反应, 最大TON负荷为28.6 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹. 当负荷大于11.4 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹时, 垃圾产甲烷受到抑制, 抑制作用随负荷的增加而加强. 在此过程中, 反硝化逐渐代替产甲烷作用成为填埋场内垃圾降解的主要反应, 产生气体以氮气为主, 而非甲烷; 硝化渗滤液与垃圾的长期作用也改变了填埋场的菌群结构. 图5 表1 参18

关键词 渗滤液; 原位反硝化; 填埋场生物反应器; 甲烷抑制

CLC X705 : X172

In situ Denitrification of Landfill Leachate*

ZHONG Qi^{1,2}, ZHANG Jie^{3,4}, LI Daping^{1**}, TAO Yong¹, Hu Jie^{1,2}, WANG Xiaomei¹,

GUO Weiqiang³ & HE Xiaohong¹

(¹Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

(²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(³School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

(⁴School of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041004, Shanxi, China)

Abstract *Ex situ* nitrification and sequential *in situ* denitrification represent a novel approach to nitrogen removal. The variation in nitrified leachate and its effects on the decomposition of municipal solid waste (MSW) were studied in a lab-scale MSW column to which nitrified leachate was recirculated. The results suggested the decomposition of MSW was accelerated, complete reduction of total oxidized nitrogen (TON) was obtained with maximum TON load of 28.6 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹ and denitrification was the main reaction responsible. Methanogenesis inhibition was observed while TON load was over 11.4 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹, and the inhibition was enhanced with the increase of TON load. Denitrification gradually took over methanogenesis to become the main reaction responsible for decomposition of MSW, while nitrogen gas was generated instead. Additionally, owing to long term exposure of nitrified leachate to MSW, the bacterial structure of landfill was changed. Fig 5, Tab 1, Ref 18

Keywords leachate; *in-situ* denitrification; bioreactor landfill; methanogenesis inhibition

CLC X705 : X172

垃圾卫生填埋技术仍是我国乃至全世界垃圾处置的主要方法. 填埋过程中, 垃圾降解产生的有机、无机污染物混合降水形成垃圾渗滤液^[1]. 生物反应器填埋场技术的应用在一定程度上降低了渗滤液有机物浓度, 并加速了填埋场垃圾的降解和填埋场的稳定, 但由于氨氮在厌氧条件无转化途径, 在产生的渗滤液中大量积累^[2]. 场外硝化-原位反硝化是填埋场氮管理的一种思路^[3], 已在国外有工程应用^[4]. 场外硝化由于其高效率在国内外多有研究^[5], 并广泛应用于工程实践. 原位反硝化是将硝化渗滤液回灌至填埋场内, 以填埋场作为生物反应器, 利用场内丰富的碳源将总氧化态氮(TON)

还原.

本文作者利用垃圾柱模拟生物反应器填埋场, 研究了硝化渗滤液回灌对垃圾降解的影响和回灌的硝化渗滤液中TON对填埋场生物反应器产甲烷作用的影响, 并采用DGGE分析了硝化渗滤液回灌对垃圾填埋场菌群结构产生的影响.

1 材料与方法

1.1 渗滤液及垃圾性质

垃圾渗滤液和垃圾采自成都市固体废弃物处置场, 该场已投入运行15 a. 文中所用渗滤液原液采自渗滤液收集坝底, 硝化渗滤液是经实验室硝化反应器处理的渗滤液. 水质情况如表1所示.

1.2 生物反应器填埋场

以一个有机玻璃柱内装垃圾模拟生物反应器填埋场(标记为柱D). 另一个同样的柱子用作对照(标记为柱C). 柱子总容积7 L (内径9 cm, 高110 cm), 以有机玻璃法兰盘上下密封.

收稿日期: 2008-03-11 接受日期: 2008-06-23

*国家高技术研究发展计划(863)项目(Nos. 2007AA06Z324, 2006AA05Z103)资助 Supported by the National High-tech Research and Development Program of China (863 Program Nos. 2007AA06Z324, 2006AA05Z103)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: lidp@cib.ac.cn)

表1 硝化渗滤液和渗滤液原液水质

Table 1 Characteristics of nitrified leachate and raw leachate

水质参数 Component	硝化渗滤液 Nitrified leachate	渗滤液原液 Raw leachate
pH	7.7~7.8	7.7~7.8
NH_4^+-N ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	<10	1900~2100
TON ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	2000~2200	0
COD ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	1500~1800	14000~16000

柱内装填两层不同成分的垃圾: 上层厚30 cm, 为1 a的垃圾; 下层厚70 cm, 为10 a的垃圾, 垃圾总重5 kg. 垃圾装柱前破碎成最大粒径3 cm的颗粒.

每周从柱顶部向柱D加入100~500 mL的硝化渗滤液, 硝化渗滤液水质如表1所示. 同时在第1~25周向柱C加入同体积的自来水, 自第26周起柱C进水替以渗滤液原液, 原液水质如表1所示. 同时从两个柱子的底部排出产生的渗滤液. 排出的渗滤液分析pH、碱度、氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮、COD等值. 每天测量柱子产生的气体组成(O_2 、 N_2 、 CH_4 和 CO_2)及体积.

1.3 生物反应器填埋场菌群结构分析

1.3.1 DNA提取纯化及PCR 上述实验结束后, 分别取两个垃圾柱出水, 13 000 r/min 离心10 min, 收集淤泥. 将其通过淤泥细菌组DNA快速提取试剂盒(离心柱型, 北京百泰克公司)提取细菌基因组DNA. 使用16S rDNA V3区通用引物(GC-357f [5'-C GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGG GGG CCT ACG GGA GGC AGC AG-3', 下划线表示GC夹子] 和518r [5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'])^[6], 按照以下条件进行PCR: 94 °C预变性2 min; 94 °C变性45 s, 65 °C退火35 s, 72 °C延伸45 s, 30~35个循环; 最后72 °C延伸10 min. 采用标准的琼脂糖凝胶电泳(1%胶浓度, 1×TAE电泳缓冲液)在160 V、30 min的电泳条件下, 对初始PCR产物进行检测.

1.3.2 变性梯度凝胶电泳(DGGE) 将上述的PCR产物进行DGGE分析(DGGE电泳仪使用Bio-rad DCode™ system). 8%的聚丙烯酰胺凝胶(1.5 mm厚, 16×16 cm), 变性剂(100%的变性剂为7 mol/L的尿素和40%的去离子甲酰胺)范围30%~60%. 实验条件: 温度60 °C, 电压80 V, 电泳时间6 h. 电泳结束后, 溴乙锭染色15 min, 在凝胶成像系统中照相. 切割可见的DGGE凝胶条带, 分别加入50 μL 无菌水, 再次使用前述方法对其重新进行V3区扩增. PCR产物在上海生工生物工程公司完成序列测定. 测序结果在美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中进行序列比对.

1.4 分析方法

氨氮采用纳氏试剂光度法测定; 亚硝酸盐氮采用N-(1-奈基)-乙二胺光度法测定; 硝酸盐氮采用紫外分光光度法测定; COD采用重铬酸钾法测定; pH采用玻璃电极法测定; 碱度采用电位滴定法测定^[7].

气体体积用排水置换法测量. 气体组成(O_2 、 N_2 、 CH_4 和 CO_2)利用气相色谱(GC1690型, 浙江科晓公司)测量. 气相色谱装备热导检测器(TCD), 连以3 m×3 mm不锈钢柱子(TDX-01, 80/100目)作色谱柱. 氦气作载气(30 mL/min). 进样

口、炉箱、检测器操作温度分别为60 °C、30 °C和80 °C.

2 结果与分析

2.1 原位反硝化

在约250 d的实验中, 柱D出水未检测出硝酸盐和亚硝酸盐, 表明TON被完全还原. 垃圾柱所排出的渗滤液中COD和氨氮浓度如图1所示. 厌氧条件下TON转化的主要途径有反硝化、异化硝酸盐还原为氨(DNRA)和厌氧氨氧化(ANAMMOX). 柱D所产生氮气的氮总量占进水硝化液中氮总量的75%以上, 这表明反硝化是TON去除的主要途径. 在前25周柱C以自来水为进水时, 柱D出水氨氮较柱C平均高120 mg/L, 说明在柱D中, ANAMMOX可能发生, 而DNRA并不是其中的主要反应. 但自第26周起, 柱C以渗滤液原液为进水时, 出水氨氮增高. 那是因为是在厌氧条件下对加入的氨氮消耗和代谢途径, 造成了氨氮的积累. 起始时, 柱D和柱C出水COD都高达6 000 mg/L, 并逐渐下降, 柱D出水COD下降速度高于柱C. 直到实验结束时, 排出的渗滤液COD渐降低至2 000 mg/L, 显示了生物反应器填埋场有突出的有机物去除能力.

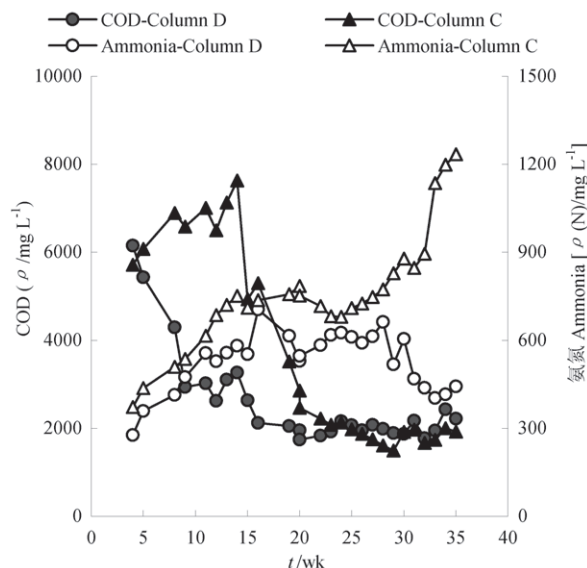


图1 垃圾柱出水氨氮和COD
Fig. 1 Effluent ammonia and COD of both MSW columns

2.2 产甲烷抑制

实验过程中, 通过增加硝化渗滤液的量, TON负荷逐渐增加, 负荷变化如图2所示. 每周氮气及甲烷的产量如图3所示. 柱D氮气周产量随TON负荷增加逐渐从130 mL到910 mL. 1~10周TON负荷为5.71 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹时, 柱D甲烷产量几乎与柱C相当. 但当TON负荷大于14.3 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹时, 柱D甲烷产量低于柱C, 并且产甲烷抑制程度随TON负荷增加而增强. 当TON负荷为14.3 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹时, 柱D甲烷产量较柱C低25.3%, 当TON负荷为28.6 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹时, 较柱C产量低57.7%.

反硝化将硝酸盐还原成氮气, 这个过程中亚硝酸盐、一氧化氮(NO)和氧化亚氮(N₂O)作为反应的中间产物, 视反硝化菌的不同种类, 也可作为反硝化的底物. 研究表明, 以上氮氧化物均可抑制产甲烷作用. Tugtas等研究了硝酸盐、

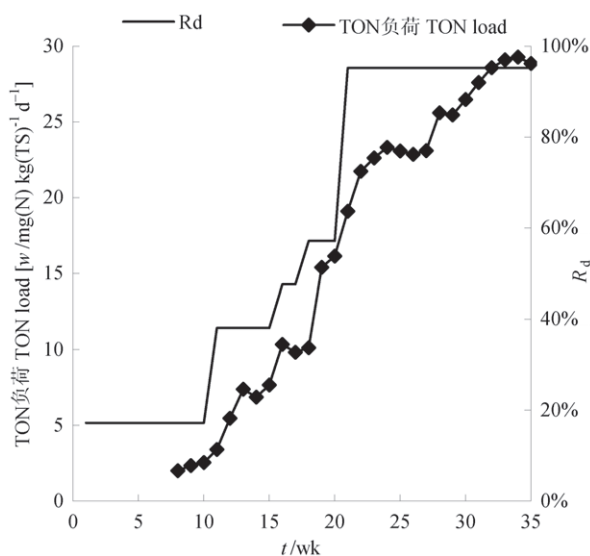


图2 柱D TON负荷及反硝化对垃圾降解的贡献率(R_d)
Fig. 2 TON load and the contribution (R_d) of denitrification to MSW decomposition in column D

亚硝酸盐、NO和 N_2O 对产甲烷作用的抑制^[8]。在10 mg(N)/L和30 mg(N)/L硝酸盐培养基和0.02 mg(N)/L液相NO培养基中,同步反硝化产甲烷,而其他的培养基中当氮氧化物加入时,产甲烷立即中止。除500 mg(N)/L亚硝酸盐和0.8 mg(N)/L液相NO培养基外,在氮氧化物完全还原后产甲烷恢复。El-Mahrouki 和 Watson-Craik研究表明,这种抑制作用和氮氧化物的浓度相关,加入到垃圾中的硝酸盐浓度越高,产甲烷恢复需要的时间也越长^[9]。Burton和Watson-Craik在他们的研究中也得到相似的结果^[10]。在El-Mahrouki 和 Watson-Craik的研究中,在1 000 mg(N)/L硝酸盐加入时,经24 d的培养仍未恢复产甲烷。但在Jokela等进行的原位反硝化实验室小试研究中,并未发现TON对产甲烷的抑制,因为实验中的TON负荷相对要小得多^[11]。本文中的TON负荷为5.7~28.6 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹,介于两者之间。柱D的甲烷产量随TON负荷增加而降低。当TON负荷介于5.7~11.4 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹时,柱D甲烷产量是柱C的90%~98%。此时,TON对甲烷的抑制作用不明显。然

而,在第21~25周,TON负荷为28.6 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹时,甲烷产量为对照的40%~54%。自21周起,虽然TON负荷保持不变,但甲烷产量持续降低。直到实验结束时,甲烷产量仅相当于对照的2.5% (其中有柱C添加渗滤液原液刺激了柱C产甲烷的原因),相当于第21周柱D周产气量的19.6%。这是氮氧化物对垃圾产甲烷长期抑制作用加强了对产甲烷作用抑制的结果,因为产甲烷菌同反硝化菌的长期竞争引起了垃圾中菌群结构的变化^[8]。下文将通过DGGE分析两柱的菌群结构验证此推断。

2.3 垃圾的降解

反硝化消耗有机碳源,反硝化过程中消耗的COD: NO_x^- -N比率随有机碳源种类和反硝化的不同而各异^[5, 12]。根据彭永祯等的计算,每消耗1 g COD用于亚硝酸盐反硝化和产甲烷就要分别产生173 mL N_2 和388 mL CH_4 (30 °C)^[13],即柱D和柱C中通过反硝化和产甲烷所去除的有机物理论上可以通过气体产量来表征。本文研究中加入到柱D的TON中85%~90%为亚硝酸盐,假设所有TON均为亚硝酸盐,两个柱中去除的COD量根据公式1和2计算得出,如图4所示。

$$COD_d = \frac{1000 \times V_m}{388} + \frac{1000 \times V_n}{173} \quad (1)$$

$$COD_c = \frac{1000 \times V_c}{388} \quad (2)$$

$$R_d = \frac{1000 \times V_n}{173 \times COD_d} \times 100\% \quad (3)$$

其中, V_m 、 V_n 和 V_c 分别代表柱D甲烷产量、柱D氮气产量和柱C甲烷产量。 COD_d 和 COD_c 分别是柱D和柱C中垃圾降解当量。 R_d 是柱D降解垃圾中反硝化的贡献比率。

起初,两柱中的垃圾降解量基本相当。但它们的产气效率和垃圾降解效率都逐渐下降时,柱D中通过反硝化降解的垃圾占垃圾降解量的比率(通过公式3计算)随TON负荷的增加而升高。直到第25周,柱D中垃圾降解量是柱C的194%,其中约77%是通过反硝化去除的。柱C以渗滤液原液为进水后,柱C产气量激增。然而,从对照此后的出水COD浓度和所加入的渗滤液原液COD浓度对比可知,柱C甲烷产量的增加并非是因为柱C中垃圾降解加速,而应归功于所加入的渗滤液

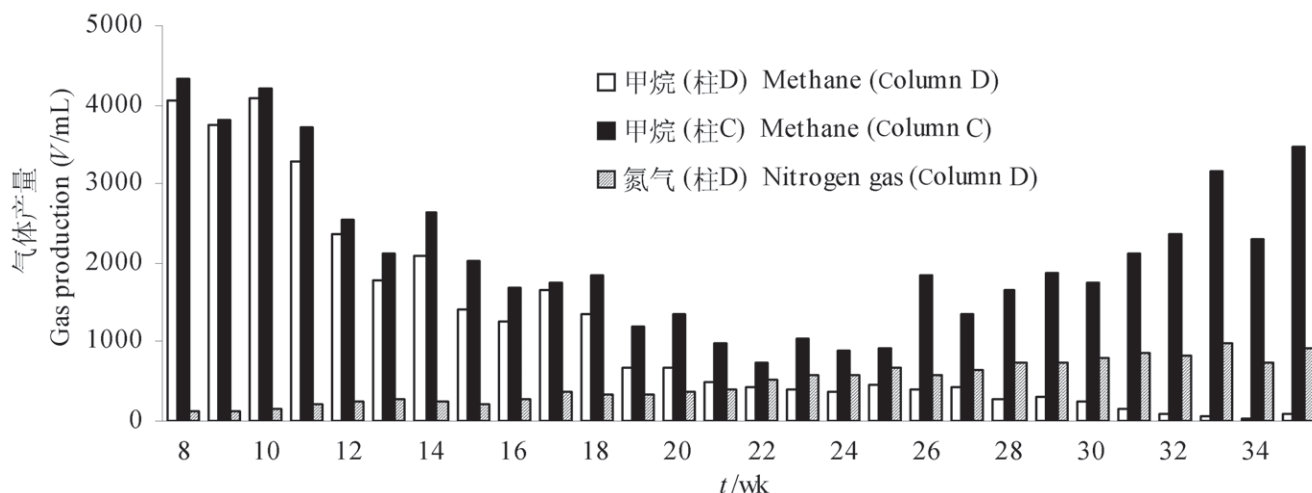


图3 垃圾柱氮气和甲烷周产量
Fig. 3 Weekly production of nitrogen gas and methane from both MSW columns

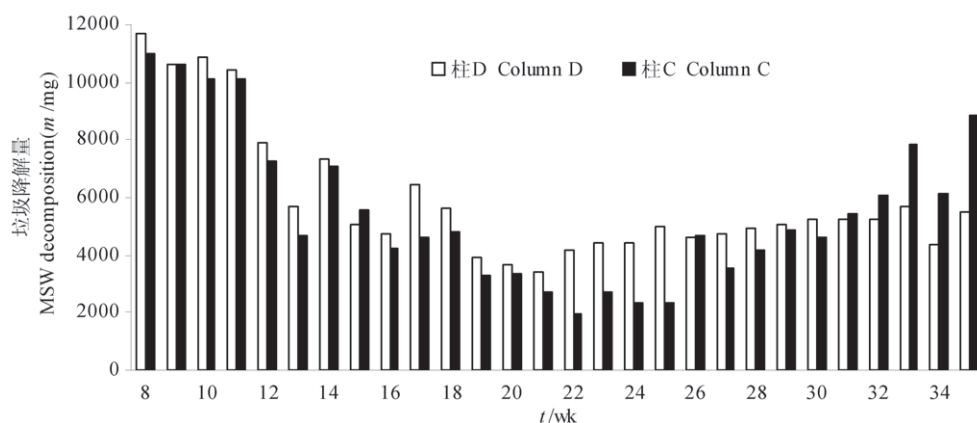


图4 每周填埋场生物反应器内垃圾降解量
Fig. 4 Weekly MSW decompositions in both columns

原液中有机的降解. 在Lei等^[14]的研究中, 以老龄垃圾做生物反应器中也得到如此高的COD去除效率. 另一方面, 柱D垃圾降解速率继续保持不变, 而反硝化对其贡献程度逐渐突出. 到实验末期, 反硝化对垃圾降解的贡献率超过了95%. 综上, 尽管对产甲烷的抑制, 硝化液回灌加速了填埋场垃圾的降解, 还控制了温室气体甲烷的排放.

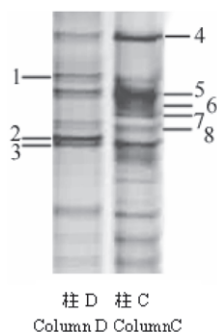


图5 两垃圾柱中菌群的DGGE图谱

Fig. 5 DGGE profiles of bacterial community in both MSW columns

2.4 硝化渗滤液回灌对生物反应器填埋场菌群结构的影响

一般认为, 在DGGE图谱上, 每一条带代表某类群特定的微生物, 且亮度相对大的条带代表样品中的优势微生物. 如图5所示, 对比柱D和柱C的条带可以看出, 两个柱中的条带存在明显差异, 硝化渗滤液的回灌对填埋场的菌群结果产生了一定的影响.

比对结果显示, 条带3~8分别与在厌氧生物反应器、垃圾填埋场^[15]、石油污染土壤和产甲烷污泥等厌氧条件下生长的长链脂肪酸降解菌(条带7和8)^[16]、蛋白降解菌(条带5)^[17]和芳香烃及多氯联苯代谢菌(条带6), 及在厌氧生物反应器和高盐、温泉和火山等极端条件下生长的产甲烷菌(条带3和4)^[18]具有96%~100%的相似性. 条带1、2与反硝化假单胞菌属具有97%~99%的相似性.

通过对比两垃圾柱的菌群结构发现, 经过长时间回灌硝化渗滤液, 柱D的菌群结构发生了一些变化: 柱D中与产甲烷菌相似的厌氧菌减少, 而同时因为长时间TON的供给, 柱D中反硝化菌较无TON回灌的柱C大为增加.

3 结论

3.1 硝化液回灌至垃圾填埋场加速了填埋场垃圾的降解. 硝化液中的TON被完全还原, 反硝化是这个过程中的主要反应. 在一个适当的TON负荷下[本文中为大于11.4 mg(N) kg(TS)⁻¹ d⁻¹], 产甲烷被TON抑制, 这促成了垃圾填埋场温室气体甲烷的减排.

3.2 回灌的硝化渗滤液对垃圾填埋场的长期作用, 在一定程度上改变了填埋场内部的菌群结构, 使产甲烷菌等有机物降解菌减少, 而反硝化菌相对增加. 这表明长期回灌硝化渗滤液促使填埋场反硝化速率增加而产甲烷效率降低.

References

- Wisniewski J, Robert D, Surmacz-Gorska J, Miksch K, Weber JV. Landfill leachate treatment methods: A review. *Environ Chem Lett*, 2006, 4: 51~61
- Burton SAQ, Watson-Craik IA. Accelerated landfill refuse decomposition by recirculation of nitrified leachate. In: Christensen TH, Cossu R, Stegmann R eds. 7th International Waste Management and Landfill Symposium (Vol 1). Cagliari, Italy: Environmental Sanitary Engineering Centre, 4~8 October, 1999. 119~126
- Price GA, Barlaz MA, Hater GR. Nitrogen management in bioreactor landfills. *Waste Manage*, 2003, 23: 675~688
- Benson CH, Barlaz MA, Lane DT, Rowe JM. Practice review of five bioreactor/recirculation landfills. *Waste Manage*, 2007, 27: 13~29
- Ahn YH. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochem*, 2006, 41 (8): 1709~1721
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695~700
- 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社. 2002
- Tugtaz AE, Pavlostathis SG. Inhibitory effects of nitrogen oxides on a mixed methanogenic culture. *Biotechnol & Bioeng*, 2007, 96 (3): 444~455
- El-Mahrouki IML, Watson-Craik IA. The effects of nitrate and nitrate-supplemented leachate addition on methanogenesis from municipal solid

- waste. *J Chem Technol Biotechnol*, 2004, **79**: 842~850
- 10 Burton SAQ, Watson-Craik IA. Nitrogen balances during the accelerated decomposition of municipal solid waste. In: Mata-Alvarez J, Tilche A, Cecchi F eds. Proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste, Barcelona, Spain, 1999, **1**: 212~217
- 11 Jokela JPY, Kettunen RH, Sormunen KM, Rintala JA. Biological nitrogen removal from municipal landfill leachate: Low-cost nitrification in biofilters and laboratory scale in-situ denitrification. *Water Res*, 2002, **36** (16): 4079~4087
- 12 Payne WJ. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol Rev*, 1973, **37**: 409~452
- 13 Zhang SJ (张树军), Peng YZ (彭永臻), Zheng SW (郑淑文), Zeng W (曾薇), Zhou L (周利). Biological treatment of municipal landfill leachate. *J Harbin Inst Technol* (哈尔滨工业大学学报), 2006, **38** (6): 937~940
- 14 Lei YM, Shen ZM, Huang RH, Wang WH. Treatment of landfill leachate by combined aged-refuse bioreactor and electro-oxidation. *Water Res*, 2007, **41** (11): 2417~2426
- 15 Huang LN, Zhou H, Zhu S, Qu LH. Phylogenetic diversity of Bacteria in the leachate of a full-scale recirculating landfill. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, **50** (3): 175~183
- 16 Hatamoto M, Imachi H, Ohashi A, Harada H. Identification and cultivation of anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid-degrading microbes from mesophilic and thermophilic methanogenic sludge. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73** (4): 1332~1340
- 17 Tang YQ, Shigematsu T, Morimura S, Kida K. Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation. *J Biosci Bioeng*, 2005, **99** (2): 150~164
- 18 Chouari R, Le Paslier D, Daegelen P, Ginestet P, Weissenbach J, Sghir A. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ Microbiol*, 2005, **7** (8): 1104~1115