

吴唯民, Jack Carley, David Watson 等. 2011. 地下水铀污染的原位微生物还原与固定: 在美国能源部田纳西橡树岭放射物污染现场的试验 [J]. 环境科学学报, 31(3): 449-459

Wu W M, Jack Carley, David Watson *et al.* 2011. Bioreduction and immobilization of uranium in situ: A case study at a USA Department of Energy radioactive waste site, Oak Ridge, Tennessee [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 31(3): 449-459

地下水铀污染的原位微生物还原与固定: 在美国能源部田纳西橡树岭放射物污染现场的试验

吴唯民^{1,*}, Jack Carley², David Watson², 顾宝华², Scott Brooks², Shelly D. Kelly³, Kenneth Kemner³, Joy D. van Nostrand⁴, 吴力游⁴, 许玫英⁵, 周集中⁴, 罗剑⁶, Erick Cardenas⁷, 黄家琪⁸, Matthew W. Fields⁸, Terence L Marsh⁷, James M. Tiedje⁷, Stefan J Green⁹, Joel E Koska⁹, Peter K. Kitanidis¹, Philip M. Jardine¹⁰, Craig S Criddle¹

1. 美国斯坦福大学土木与环境工程系, Stanford CA94305 USA

2. 美国橡树岭国家实验室环境科学部, Oak Ridge, TN37831, USA

3. 美国阿贡国家实验室生物科学部, Argonne IL 60439 USA

4. 美国俄克拉荷马大学植物与微生物学系, Norman, OK 73019, USA

5. 广东省微生物研究所, 广州 510070

6. 美国乔治亚理工学院土木与环境工程系, Atlanta GA 30332 USA

7. 美国密歇根州立大学微生物生态中心, East Lansing MI 48823 USA

8. 美国蒙大拿州立大学生物膜工程中心, Bozeman MT 59717 USA

9. 美国佛罗里达州立大学地球海洋大气科学系, Tallahassee, FL 32306 USA

10. 美国田纳西大学生物系统工程与土壤科学系, Knoxville, TN 37996, USA

收稿日期: 2010-12-08

录用日期: 2010-12-21

摘要: 总结了美国斯坦福大学和橡树岭国家实验室等在美国能源部田纳西州橡树岭综合试验基地进行的铀污染原位微生物修复阶段性试验结果. 本试验利用微生物以乙醇为电子供体还原地下水和沉积物中的六价铀为不溶解的四价铀, 使之原位固定化. 随后通过加入溶解氧和硝酸盐来试验微生物还原后的地下水层中还原固定态铀的稳定性. 通过预处理和长期间隔注入乙醇溶液, 地下水中铀浓度从 40~60 mg L⁻¹ 降至 0.03 mg L⁻¹ 以下, 达到了美国环保署饮用水的标准. 还原的四价铀主要以 U(IV)-Fe 复合物的形态存在. 结果表明, 固定化后的四价铀只有在厌氧条件下才是稳定的, 溶解氧和硝酸盐侵入地下水层后会使得固定化的四价铀重新氧化为溶解态的六价铀. 在试验过程中, 采用多种分子生物学方法检测了微生物种群的变化和与铀氧化还原反应有关的功能微生物. 本研究表明, 在维持试验系统无氧和无硝酸盐的条件下, 通过添加乙醇为电子供体可有效地促进地下水土壤中土著功能微生物的活性, 从而实现铀的原位还原固定与稳定.

关键词: 铀污染; 微生物还原; 原位生物修复; 地下水; 沉积物

文章编号: 0253-2468(2011)03-449-11

中图分类号: X523

文献标识码: A

Bioreduction and immobilization of uranium in situ: A case study at a USA Department of Energy radioactive waste site, Oak Ridge, Tennessee

WU Wein^{1,*}, Jack Carley², David Watson², GU Baohua², Scott Brooks², Shelly D. Kelly³, Kenneth Kemner³, Joy D. van Nostrand⁴, WU Liyou⁴, XU Meiyang⁵, ZHOU Jizhong⁴, LUO Jian⁶, Erick Cardenas⁷, Hwang

基金项目: 美国能源部科研项目 (No. DOE-AC05-00OR22725)

Supported by the US Department of Energy's Office of Science, Biological and Environmental Research Subsurface Biogeochemical Research Program. Oak Ridge National Laboratory is managed by UT-Battelle LLC for the U. S. Department of Energy under contract DE-AC05-00OR22725

作者简介: 吴唯民 (1948-), 男, 高级研究员 (博士), E-mail: weimin.wu@stanford.edu 电话: +1-650-724-5310 * 通讯作者 (责任作者)

Biography: WU Wein (1948-), male, senior research engineer (Ph.D.), E-mail: weimin.wu@stanford.edu, Tel: +1-650-724-5310;

* Corresponding author

Chiach⁸, Matthew W. Fields⁸, Terence L. Marsh⁷, James M. Tiedje⁷, Stefan J. Green⁹, Joel E. Kostka⁹, Peter K. Kitanidis¹, Philip M. Jardine¹⁰, Craig S. Criddle¹

1. Department of Civil & Environmental Engineering, Stanford University, Stanford, CA 94305, USA

2. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN 37831, USA

3. Biosciences Division, Argonne National Laboratory, Argonne, IL 60439, USA

4. Department of Botany and Microbiology, University of Oklahoma, Norman, OK 73019, USA

5. Guangdong Microbiology Institute, Guangzhou 510070

6. Department of Civil & Environmental Engineering, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA 30332, USA

7. Center for Microbial Ecology, Michigan State University, East Lansing, MI 48823, USA

8. Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, MT 59717, USA

9. Department of Earth, Ocean, and Atmospheric Science, Florida State University, Tallahassee, FL 32306, USA

10. Biosystems Engineering and Soil Science Department, the University of Tennessee, Knoxville, TN 37996, USA

Received 8 December 2010; accepted 21 December 2010

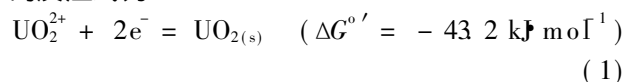
Abstract Bioremediation of uranium contaminated groundwater was tested by delivery of ethanol as an electron donor source to stimulate indigenous microbial bioactivity for reduction and immobilization of uranium in situ, followed by tests of stability of uranium sequestration in the bioreduced area via delivery of dissolved oxygen or nitrate at the US Department of Energy's Integrated Field Research Challenge site located at Oak Ridge, Tennessee, USA. After long term treatment that spanned years, uranium in groundwater was reduced from 40~60 mg·L⁻¹ to <0.03 mg·L⁻¹, below the USA EPA standard for drinking water. The bioreduced uranium was stable under anaerobic or anoxic conditions, but addition of DO and nitrate to the bioreduced zone caused uranium mobilization. The change in the microbial community and functional microorganisms related to uranium reduction and oxidation were characterized. The delivery of ethanol as electron donor stimulated the activities of indigenous microorganisms for reduction of U(VI) to U(IV). Results indicated that the immobilized U could be partially remobilized by DO and nitrate via microbial activity. An anoxic environmental condition without nitrate is essential to maintain the stability of bioreduced uranium.

Keywords uranium contamination; microbial reduction; in situ bioremediation; groundwater sediments

1 引言 (Introduction)

过去 70 年, 由于开采铀矿和加工浓缩铀的广泛开展造成了大量的土壤和地下水体的铀污染. 在被污染的地下水体中, 铀主要是以溶解态的六价铀 (U(VI))、铀酰 (UO₂²⁺) 或多种氢氧化双氧铀和碳酸铀酰盐化合物的形式存在. 这类形态的铀溶解度很高, 极易随地下水流动迁移, 从而造成大范围的污染. 铀对人体健康的危害主要表现在其重金属化学毒性和放射性辐射两种形式. 进入人体后的铀主要蓄积于肝脏、肾脏和骨骼中, 根据剂量大小, 可引起急性或慢性中毒, 诱发多种疾病, 引起肝脏损伤和诱发癌症 (池翠萍, 王仲文, 2002). 美国环保署的饮用水标准规定铀的最大浓度必须低于 0.03 mg·L⁻¹ (0.126 μmol·L⁻¹).

Lovey 等 (1991) 在 20 世纪 90 年代初期提出利用微生物以氢为电子供体将地下水环境中可溶性的六价铀转化为稳定的、溶解度很低的四价铀 (U(IV)), 进而防止其迁移扩散的设想. U(VI) 还原的反应式为:



然而, 由于受 pH 值和水中其它离子如碳酸根

的影响, 溶解性的 U(VI) 可能有多种复杂化合形态, 实际的反应比上式复杂得多, 半反应的 $\Delta G^{\circ'}$ 也不相同. 近十余年的实验室试验证实, 可以通过微生物或非生物的还原方法将溶解性的 U(VI) 还原成不溶性的 U(IV), 以晶质铀矿 (UO₂) 的形式沉淀出来 (Tabak *et al.*, 2005). 微生物学家们试验了用纯培养物或混合菌群来还原 U(VI), 发现多种有机物如乙醇、甲醇、乙酸、乳酸、葡萄糖以及氢气均可作为微生物还原铀的电子供体. 同时, 研究者们也进行了微生物还原 U(VI) 的土柱试验和现场原位固定试验 (Anderson *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2005; Istok *et al.*, 2004).

美国能源部在田纳西州橡树岭市的 Y-12 设施区有一处典型的铀污染区域, 著名的曼哈顿计划中的浓缩铀工程就是在这里进行的. Y-12 浓缩铀装置于 1943 年建成, 成功地分离出用于投放在日本广岛的原子弹的浓缩铀材料. 从 1951 年到 1983 年, Y-12 装置共排放了数千吨含有高浓度贫化铀 (U-238) 和硝酸的酸性废水到 S-3 废液坑中. 1983 年后, S-3 废液坑的废水经过加碱中和及原位生物脱氮处理后被抽干排出, 原址加土填埋后, 用混凝土复盖建成一座停车场. 但是, 原废液坑底层残留的污染物仍持续向地下水体渗透并沿着基岩迁移到更深更广

的范围, 形成一处高浓度的污染源 (图 1a). 为了评估现场原位固定化铀和其它放射性元素及金属的可能性, 2000年美国能源部在 Y-12 设施区建立了现场环境试验研究中心, 美国多所著名大学和科研机构的研究人员先后参与了中心的研究工作. 作者的研究组自 2001 年起在该中心的第三区开展研究工作. 这一区域的位置最靠近污染源 S-3 废液坑原址, 污染物浓度最高 (图 1a). 试验结果证实, 地下水体中污染铀的原位还原固定在厌氧条件下是可行的, 但溶解氧和硝酸盐是影响固定化后还原态铀的稳定性和生物修复效果的主要环境因素. 本文将报告 2001—2008 年在该区域的阶段性研究成果.

2 试验场地 (Test site)

田纳西州橡树岭试验中心的第三区的污染物主要分布在地表以下深度为 10~20 m 范围内的断层地质区内. 地下水在断层区间流动形成地下径流, 污染物随地下水由原 S-3 废液坑原址渗入地下水体后在径流区内迁移扩散, 逐步渗入非径流区的渗透性低的土壤和沉积物内积累浓缩. 在修复工作开始之前, 我们对该试验区域进行了地质、水文、包括地下水和沉积物在内的化学与微生物群落等方面的调查, 收集了污染区域大量的背景参数 (Phillips *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006a). 结果显示, 污染区主要集中在地下 11~16 m 深度范围内, 地下水 pH 为 3.4~3.6, 水中铀的浓度高达 $0.17 \sim 0.25 \text{ mmol L}^{-1}$ ($40 \sim 60 \text{ mg L}^{-1}$), 土壤沉积物中铀为 $200 \sim 700 \text{ mg kg}^{-1}$. 地下水中其余重要的溶解物有: 铝, 18 mmol L^{-1} ; 钙, 25 mmol L^{-1} ; 硝酸根, 130 mmol L^{-1} ; 硫酸根, $10 \sim 12 \text{ mmol L}^{-1}$. 污染地下水中的细菌总数小于 10 cell mL^{-1} . 在地下 11 m 以上, pH 逐步升至 6.0~6.2, 不存在铀污染. 地下水的温度变化范围在 12~21°C 之间.

通过溴化物追踪实验, 我们了解了地下水在污染区域的流向和流场 (Luo *et al.*, 2006), 并设计了由外部循环系统 (注水井 FW024 和抽水井 FW103) 和内部循环系统 (注水井 FW026 和抽水井 FW104) 组成的试验用的地下水井系统 (图 1b 和 1c). 通过向外部循环系统注入清洁水, 构建一个正压的外向流场, 形成一个保护网以阻止高浓度的污染物从外部渗透进入内部处理区. 内循环系统是微生物反应区, 通过将乙醇注入内循环系统作为电子供体, 促进地下土著微生物的生长, 从而还原 U (VI). 所有

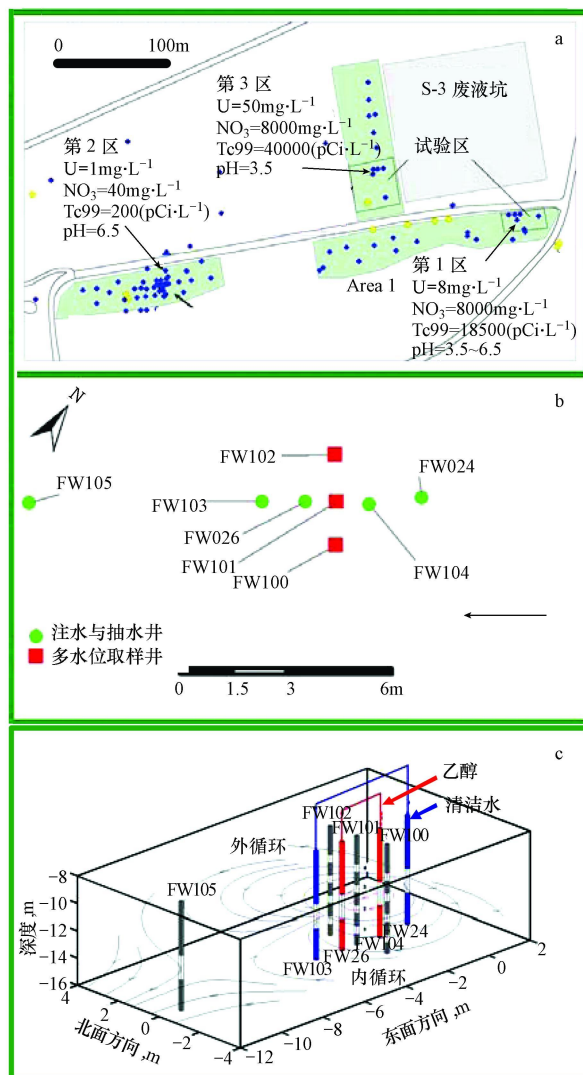


图 1 a 美国能源部橡树岭试验中心铀污染场址及污染物浓度分布; b 在第 3 区进行生物修复试验用的水井系统; c 第 3 区试验井系统的流场模拟

Fig 1 a Map of US DOE Oak Ridge site; b Well system for *in situ* bioremediation test in Area 3; c Hydrogeological model of well system

注水井和抽水井的直径均为 10.2 cm, 井深为 14.6 m. 在 11.28 m 和 13.77 m 之间有 2.5 m 的隔筛带供水或抽水. 此外, 我们还安装了三口多水位取样井 (FW100, FW101 和 FW102) 用于监测水文地质化学参数和微生物种群的变化. 每口取样井由 7 口不同深度的直径为 1.9 cm 的独立井管组成. 在本研究中, 主要对位于地下水径流区的 FW101-2 (深度 13.7 m), FW101-3 (12.2 m), FW102-2 (13.7 m) 和 FW102-3 (12.2 m) 进行日常监测. 选择上述井管的原因是溴化物追踪实验显示这些取

样井管与注水井 FW 104 之间直接相连, 溴化物回收率高 (Luo *et al.*, 2006, 2007). 内部循环和外部循环系统的循环流量均为 $0.45 \text{ L} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. 注入外循环注水井 FW 024 的清洁水的流量为 $0.7 \sim 0.9 \text{ L} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. 清洁水是由自来水和用生物脱氮流化床去除硝酸盐再过滤后的地下水共同混合而成 (Hwang *et al.*, 2006). 在以上条件下模拟的地下水流场见图 1c (Luo *et al.*, 2007).

3 试验设计与分析方法 (Experiment design and analytical methods)

3.1 试验设计

在现场试验之前, 从 2001 年起我们先采用污染区的沉积物和地下水进行了实验室微生物试管试验和土柱试验. 用沉积物的微生物试管试验发现, 与乙酸、乳酸相比, 乙醇作为电子供体从液相中去除铀的效果更好 (Wu *et al.*, 2006b). 土柱试验表明用乙醇可以通过微生物的作用还原与固定沉积物中的铀 (Gu *et al.*, 2005). 现场试验的准备工作包括钻井和安装地面设施始于 2002 年夏季. 为了确定地下水的流场和注水井与抽水井及监测井之间的水力相关性, 我们于 2002 年 11 月 3 日至 5 日进行了用溴化物为示踪剂的追踪试验 (Wu *et al.*, 2006a). 生物修复的试验研究于 2003 年 8 月 23 日开始到 2008 年 12 月 19 日结束, 历时近 5 年 4 个月. 主要的试验项目包括:

(1) 试验区预处理 (第 1~136 天). 预处理的目的是为与还原 U(VI) 相关的功能微生物创造一个有利的生长环境. 我们首先将用 HCl 调整 pH 至 4.3~4.5 的自来水注入试验区、冲洗试验区含水层以去除高浓度的硝酸盐和铝离子, 然后注入 pH 调至 6.0~6.3 的处理后的地下水和自来水的混合液以提高地下水的 pH 值. 我们从处理区下游的 FW 105 井 (图 1b) 抽取地下水, 经过地上的水处理系统去除硝酸盐和大部分铀后用于回注 (Wu *et al.*, 2006a; Hwang *et al.*, 2006).

(2) 用乙醇为电子供体还原 U(VI) (第 137~688 天). 从第 137 天 (2004 年 1 月 7 日) 起, 我们将乙醇注入反应区. 注入方法是使用自来水稀释后 COD 为 $6.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工业乙醇溶液通过内循环系统注入 FW 104 井 (图 1c). 循环水的乙醇浓度为 $1.2 \sim 1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 此阶段每周注入乙醇溶液 3d 平均每周注入量为 163 g (以 COD 计). 在运行初期, 注入外循环水系统的清水溶解氧 (DO) 浓度为 7~9

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 从第 638d 起, 我们开始向清水储罐中添加 Na_2SO_3 ($0.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 以去除 DO. 此后, 注水中的 DO 接近零, 反应区不再受 DO 的影响.

(3) 评估缺氧/厌氧条件下还原固定后铀的稳定性 (第 713~754 天). 试验开始后, 停止向内部循环水系统中注入乙醇溶液, 但保持其它运行方式不变.

(4) 恢复注入乙醇, 进一步还原反应区 (第 755~805 天). 在此期间, 反应区维持厌氧条件, 每周注入乙醇 2d.

(5) 溶解氧对反应区的影响 (第 806~884 天). 在此期间, 停止向反应区注入乙醇. 在外部循环水中加入 DO 浓度为 $8 \sim 9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的清洁水, 待其渗入内部循环反应区后, 观察反应区内还原态铀的稳定性.

(6) 静止流场试验 (第 885~1397 天). 在此期间, 我们先往反应区内注入乙醇溶液, 然后停止向外循环系统注入清洁水和内外循环系统的水力循环, 观察外部污染水能否在自然水位条件下侵入反应区. 试验结束后, 恢复内外循环系统的水力循环和注入乙醇.

(7) 往反应区加入硝酸盐的影响 (第 1398~1419 天). 在此期间, 我们通过 FW 104 向内部循环系统中投加硝酸盐和 NaBr 的混合液, 研究硝酸盐的转化及其对还原固定化后的 U(IV) 的影响.

(8) 评估外部污染地下水侵入的影响 (第 1420~1496 天). 通过外部污染的、含硝酸盐的地下水侵入试验来观察相应的地质化学变化.

(9) 还原被氧化的反应区 (第 1497~1578 天). 恢复每周 2d 向反应区注入乙醇溶液、再次还原被氧化的反应区.

3.2 分析方法

实验室用的化学试剂为分析纯. 现场用的化学试剂为工业纯. 调节 pH 值的 K_2CO_3 浓度 (50%, 质量分数) 和 HCl (20%, 质量分数) 溶液由 Dycho 公司提供. 工业乙醇含乙醇 88.12%, 甲醇 4.65%, 和水份 7.23%, 购自 Aper 酒精及化学公司. 化学需氧量 (COD), 硫化物, 亚硝酸盐和 Fe^{2+} 的检测采用 Hach DR 2000 分光光度计 (Hach 化学公司). NO_3^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} 等的浓度用 Dionex DX-120 离子色谱仪测定, 色谱柱为 IonPac 公司的 AS14 型色谱柱.

Al, Ca, Fe, Mn, Mg, U 和 K 等金属元素采用

Perkin Elmer ELAN 6100型电感耦合等离子体质谱仪检测. 沉积物中的二价铁含量是用 10% 盐酸提取后、检测溶液中的 Fe^{2+} 浓度再计算出来的. 乙醇和乙酸的检测采用 5890 HP 气相色谱仪. 沉积物样品中铀的氧化态和化合物结构分别用 X 射线吸收近边结构谱 (XANES) 和扩展 X 射线吸收精细结构 (EXAFS) 的方法在阿岗国家实验室测定 (Kelly *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2006b).

地下水和沉积物中的微生物总数采用最大可能数法 (MPN) 测定. 微生物群落的组成与功能基因组成分别采用 16S rRNA 基因克隆文库技术和基因芯片技术进行分析 (Cardenas *et al.*, 2008; He *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2009; Xun *et al.*, 2010).

4 结果与讨论 (Results and discussion)

4.1 微生物原位还原六价铀为四价铀

经预处理后, 反应区地下水中的硝酸盐浓度从 100 mmol L^{-1} 降至 1.0 mmol L^{-1} , 铀浓度从 $40 \sim 60 \text{ mg L}^{-1}$ 降至 1.0 mg L^{-1} , pH 升至 6.0 左右, 达到了预期的冲洗稀释和升高 pH 值的目的. 地下水水质分析结果显示, 注入乙醇溶液后, 微生物的反应过程可以分成 3 个阶段. 第一阶段的反应主要是原位反硝化, 使硝酸盐浓度从 1.0 mmol L^{-1} 进一步降至 0.1 mmol L^{-1} 以下; 第二阶段反应是 $Fe(III)$ 还原反应, 随后再出现硫酸盐和 $U(VI)$ 还原反应, 地下水中溶解性铀的浓度从 1.0 降至 0.1 mg L^{-1} ; 第三阶段从第 638 天起, 由于控制了溶解氧从外循环系统侵入到内部反应区, 加速了 $U(VI)$ 还原生成 $U(IV)$. 这三阶段的详细叙述请参见文献 (Wu *et al.*, 2006b; 2007). 在反应初期 (第 138~184 天), 硝酸盐浓度下降而硫酸盐与铀的浓度保持不变. 当硝酸盐浓度下降至 0.1 mmol L^{-1} 时, 在监测井地下水中开始检测出硫化物, 证明硫酸盐还原反应已经开始, $U(VI)$ 还原反应也随之出现. 在第三阶段, 地下水中 COD、硫化物和铀的浓度随乙醇注入时间变化如图 2 所示. 随着乙醇的注入, 监测井中的 COD 开始上升 (图 2a), 硫化物的浓度随着硫酸盐的还原也呈升高趋势 (图 2b). 第三阶段由于生成了大量的硫化物, Fe^{2+} 的浓度维持在相对低的 0.02 mmol L^{-1} 范围. 在监测井地下水中, 发现乙酸为乙醇降解的唯一中间产物, 反应为:



$$(\Delta G^{\circ'} = -149.84 \text{ kJ mol}^{-1}) \quad (2)$$

乙醇降解过程中产生的电子可用于多种还原反应包括还原 $U(VI)$, 生成物乙酸也能作为电子供体进一步被氧化为 CO_2 或在产甲烷条件下转化为甲烷. 由于持续的微生物还原反应, 监测井地下水中的铀浓度一直低于注水井中铀的浓度 (图 2c). 当注入乙醇时, 监测井水中的铀浓度进一步降低. 停止注入乙醇时, 铀浓度有所回升.

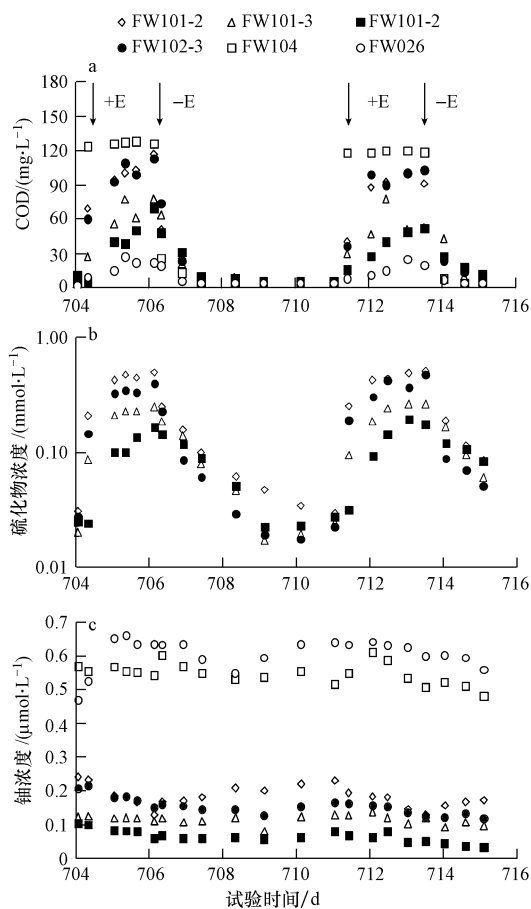


图 2 注入乙醇过程中地下水成份的变化 (a: COD 浓度; b: 硫化物浓度; c: 铀浓度; +E=添加乙醇; -E=停止添加乙醇)

Fig. 2 Change in geochemistry during ethanol injection (a: COD concentration; b: sulfide; c: uranium; +E: ethanol injection; -E: stop ethanol injection)

按照每周 2d 的频率反复加入乙醇后, 地下水中的铀浓度变得越来越低. 在与注水井 FW 104 相通的径流区内, 地下水中的铀浓度降低到了美国环保署的饮用水标准以下 ($< 0.03 \text{ mg L}^{-1}$). 监测井管 FW 102-3 和 FW 101-3 地下水中的铀浓度分别在第 615 天和 640 天达到了饮用水标准. 在此同时, 当加入乙醇时, FW 101-2 和 FW 102-3 的铀浓度低于饮用

水标准;但在停止加入乙醇时,铀浓度有所回升.此后,经过长期注入乙醇,所有监测井中的铀浓度都降低到 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下.图 3 为试验前(2002年11月)和生物修复试验后(2007年1月30日)地下

14.5m 深度范围内地下水中 pH、硝酸盐浓度和铀浓度的变化.图 4 为生物修复试验前后地下水中铀浓度的竖向分布变化.生物修复后径流区铀浓度为修复前的 $1/1000$ 左右.

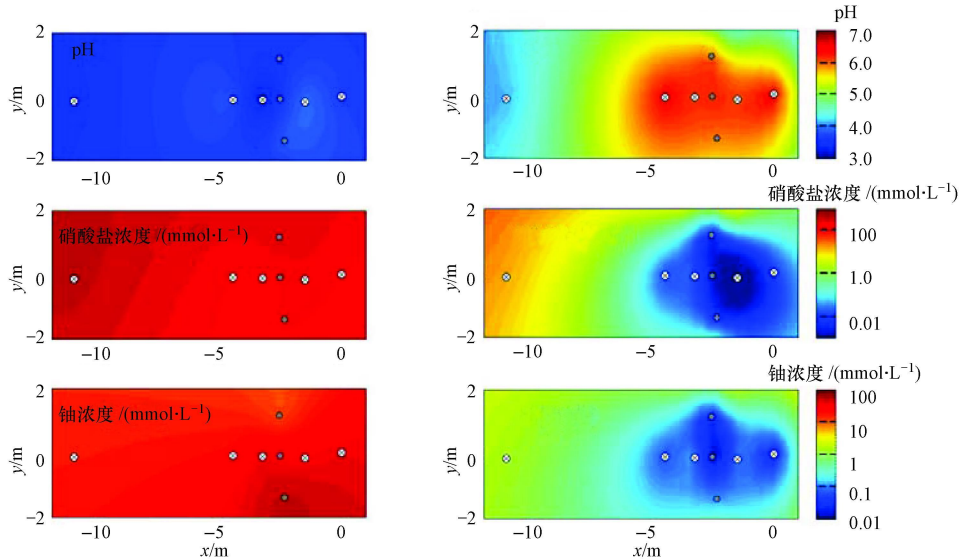


图 3 地下 14.5m 处的 pH、硝酸盐浓度和铀浓度的分布(生物修复前(左图);生物修复后(右图))

Fig. 3 The pH, nitrate and uranium in groundwater at 14.5m below ground (Left: before bioremediation test; Right: after bioremediation test)

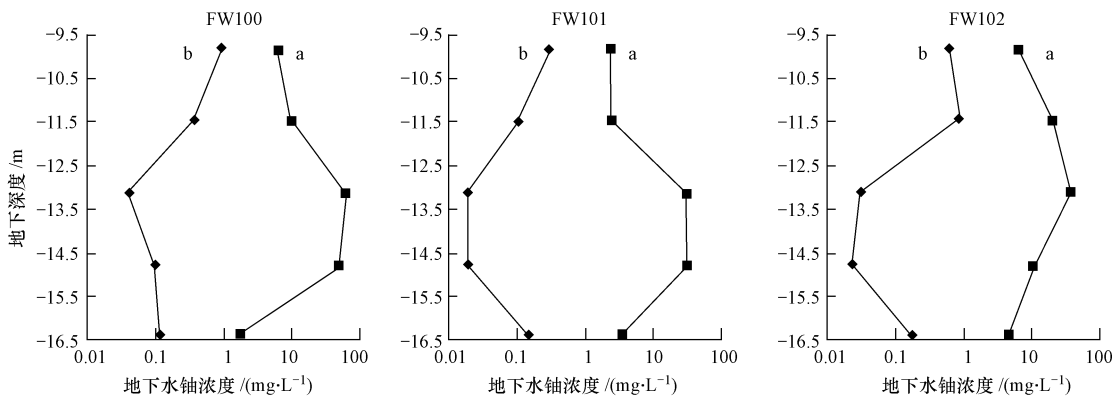


图 4 生物修复以前(a)和以后(b)地下水铀浓度在多层次监测井中的竖向分布

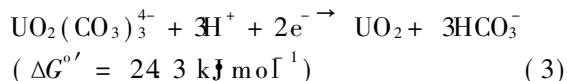
Fig. 4 Uranium concentrations in multiple level sampling wells before and after bioremediation test. A = before; B = after

以上结果证明,注入乙醇促进了原位反硝化反应、Fe(III)还原反应、硫酸盐还原反应、和 U(VI)还原反应. U(VI)还原反应在 Fe(III)还原反应之后出现,与硫酸盐还原反应几乎同时进行.随着 U(VI)还原反应的进行,处理区沉积物的颜色由黄褐色变为暗绿色直至黑色.用 XANES 分析发现,在生物修复之前,沉积物样品中检测不到 U(IV).加入乙醇 121 天后,在注水井内沉积物样品中首先发现 U(IV)成份,而 398 天后在监测井 FW101-2 内沉积物样品中也发现 U(IV)成份 (Wu *et al.*, 2006b).由

于生物还原反应,反应区沉积物中的铀最终约有 80% 转变为 U(IV) (Wu *et al.*, 2007, 2010).

在生物还原之前(2002年11月),XANES 显示沉积物中所有的六价铀都是以铀酰 (UO_2^{2+}) 的形式存在的,其中大部分的铀酰是磷酸盐复合物和碳酸盐复合物,少部分是氢氧化双氧铀化合物(图 5 (1)~(3)).生物修复之后(2007年1月),沉积物样品 60%~80% 的铀转化成还原态的 U(IV),残余的 U(VI)主要是磷酸铀酰盐复合物,说明碳酸铀酰复合物容易被还原转化成 U(IV),而磷酸盐复合物

由于溶解度低故反应较难. 实验室静止试验表明, 在温度为 4°C 的条件下, 生物反应很慢, 磷酸铀酰复合物转化为碳酸铀酰复合物. 因此, 有可能磷酸铀酰首先转化为碳酸铀酰后再被还原. 碳酸铀酰复合物的还原反应式如下:



反应热动力学分析显示, 该反应属于吸能过程, 提供高能的电子供体和维持较低的碳酸根离子浓度有利于反应进行.

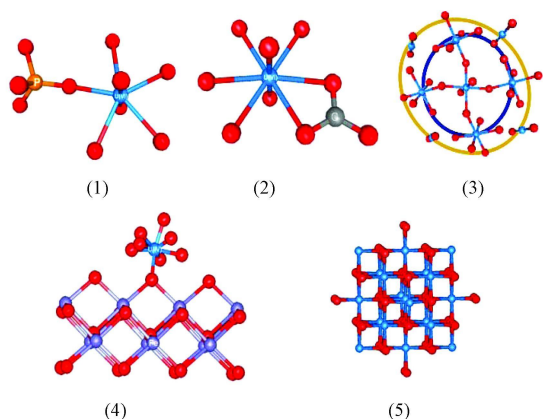


图 5 地下沉积物样品中的铀化合物 (1. 磷酸铀酰; 2. 碳酸铀酰; 3. β -氢氧化双氧铀; 4. 含铁的四价铀复合物; 5. 晶质铀矿)

Fig 5 Uranium speciation in the sediment samples (1. uranyl phosphate; 2. uranyl carbonate; 3. β -uranyl hydroxide; 4. U(IV)-Fe complex; 5. uraninite)

EXAFS 分析发现, 在试验现场沉积物样品中测出的还原的 U(IV) 并非在微生物纯培养物中报道的纳米尺寸的晶质铀矿晶体 (Suzuki *et al.*, 2002), 而是在此之前从未发现的含铁氧化物的四价铀复合物 (图 5(4)). 这说明 U(VI) 的还原反应涉及到铁氧化物, 现场的生物地质化学反应和产物远远比实验室观察的结果复杂.

4.2 影响固定化铀稳定性的因素

4.2.1 固定化铀在无氧和缺氧条件下的稳定性

当地下水中的铀浓度降至 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以后, 我们进一步研究了还原固定后的铀在无氧条件下的稳定性. 从第 713 到 754 天, 我们停止向试验区添加乙醇, 但仍然维持无氧状态. 在此期间, 多水位取样井中铀浓度轻微上升, 但是远低于注水井 FW 104 中铀的浓度, 而硫酸盐的浓度在 10 天之内达到了与注水井相同的浓度. 这一现象表明在无氧条件下, 尽管没有添加电子供体, U(IV) 在 41d 内仍然能够保持

稳定 (Wu *et al.*, 2007). 此后, 我们进行了一项长达 3 年的实验室微生态试管试验, 进一步证实了不添加有机物电子供体, 取自上述四口监测井管中的沉积物中还原态 U(IV) 在厌氧条件下能一直保持稳定, 水相中的铀浓度一直低于 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.2.2 溶解氧 (DO) 对生物还原后的四价铀的氧化

向反应区加入 DO 的试验 (第 806~884 天) 表明, DO 会将 U(IV) 氧化成 U(VI) 重新释放出来, 从而升高地下水中的铀浓度 (图 6). 加入 DO 后, 对不同位置的监测井管中地下水铀浓度影响不一样. 在靠近注水井 FW 104 的 FW 101-2 中, 铀浓度上升最快而且峰值最高; 而离注水井稍远的监测井 FW 102-3 中铀浓度上升较慢, 峰值浓度也较低. 在试验过程中, FW 101-2 和 FW 102-3 两口井中的铀浓度上升后超过了注水井中铀的浓度 (图 6b). 这显然是由于沉积物中的 U(IV) 被 DO 氧化成 U(VI) 后溶解到地下水中. 地下水从注水井 FW 104 流到这两口井的平均迁移时间较短 (2.9 和 3.7 h), 故此 DO 影响较大. 平均迁移时间较长 (17.9 h) 的 FW 101-3 中也检测到铀浓度的上升现象, 但是并没有超过注水井中铀的浓度, 在地理位置最远的 FW 102-2 中几

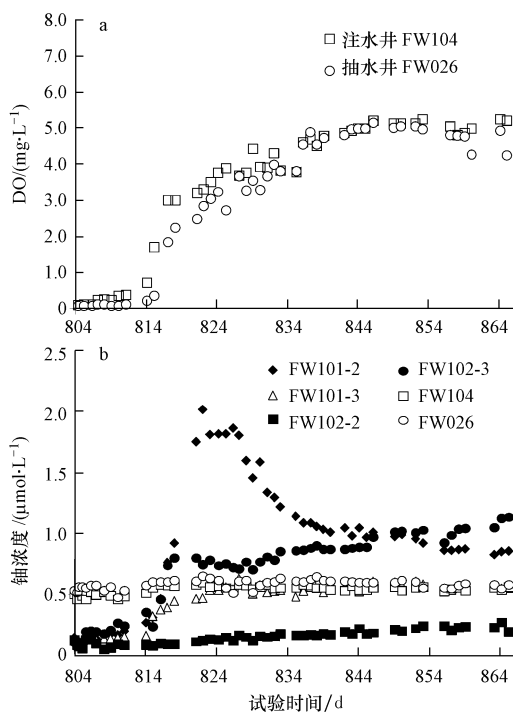


图 6 溶解氧对生物反应区铀浓度的影响 (a. 溶解氧浓度在注水井与抽水井中的变化; b. 铀浓度在监测井中的变化)

Fig 6 Effect of introduction of DO on uranium concentration (a. Change in DO in injection and extraction wells; b. Change in uranium concentrations in subsurface)

乎没有产生反弹现象(图 6b). 这一结果表明 DO 只是对注水井口附近区域有较大影响, 对注水井较远的区域影响有限. 这可能是因为 DO 随地下水流经反应区逐渐被区内的还原性物质耗尽的缘故.

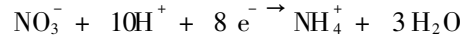
DO 氧化 U(IV) 为 U(VI) 的反应可能主要是无机化学氧化反应, 但微生物催化的反应也不能忽略. 例如, 亚铁氧化细菌中的氧化亚铁硫杆菌 (*Thiobacillus* spp.) 在 DO 存在时, 可以氧化 Fe(II) 和 U(IV) (Beller 2005). 试验后, 再次注入乙醇, 还原反应区.

4.2.3 微生物利用硝酸盐氧化还原后的四价铀
在静止流场的 3 次试验中, 我们发现监测井 FW101-2 中的铀浓度随着硝酸盐浓度的升高而上升. 为了确认硝酸盐对 U(IV) 的生物氧化反应, 从第 1398 到 1403 天, 我们经注水井 FW104 向内循环系统中连续注入硝酸钾与氯化钠的混合溶液 (摩尔浓度比为 2:638). 当硝酸盐被微生物利用后, 硝酸盐的去除率可通过测定地下水中残余的硝酸盐浓度与注水中的硝酸盐、氯化物的摩尔浓度比率计算出来. 加

入硝酸盐后, 在所有检测井中都检测到了硝酸盐 (图 7a), 其浓度的升高与氯化物的回收率和平均迁移时间相关, 平均迁移时间短的 FW101-2 和 FW102-3 的浓度较高. 据计算, FW101-2 和 FW102-3 中的硝酸盐的去除率为 40% 而 FW102-2 达 80%. 被去除的硝酸盐部分还原成了亚硝酸盐, 另一部分被还原为铵 (图 7b 和图 7c).



$$(\Delta G^{\circ'} = -83.3 \text{ kJ mol}^{-1}) \quad (4)$$



$$(\Delta G^{\circ'} = -306.8 \text{ kJ mol}^{-1}) \quad (5)$$

这两个反应都需要外加电子供体. 在本试验中, 因未注入乙醇溶液, 电子供体应来源于沉积物中的 Fe(II)、硫化物、死细胞和腐殖酸类物质. 根据硝酸盐与氯化物的比率计算, 加入反应区的硝态氮的 16% 转化成了亚硝态氮, 至少 7% 的硝态氮成为铵态氮. 实际生成的铵态氮可能要超过 7%, 因为沉积物中的伊利石对铵有很强的吸附性.

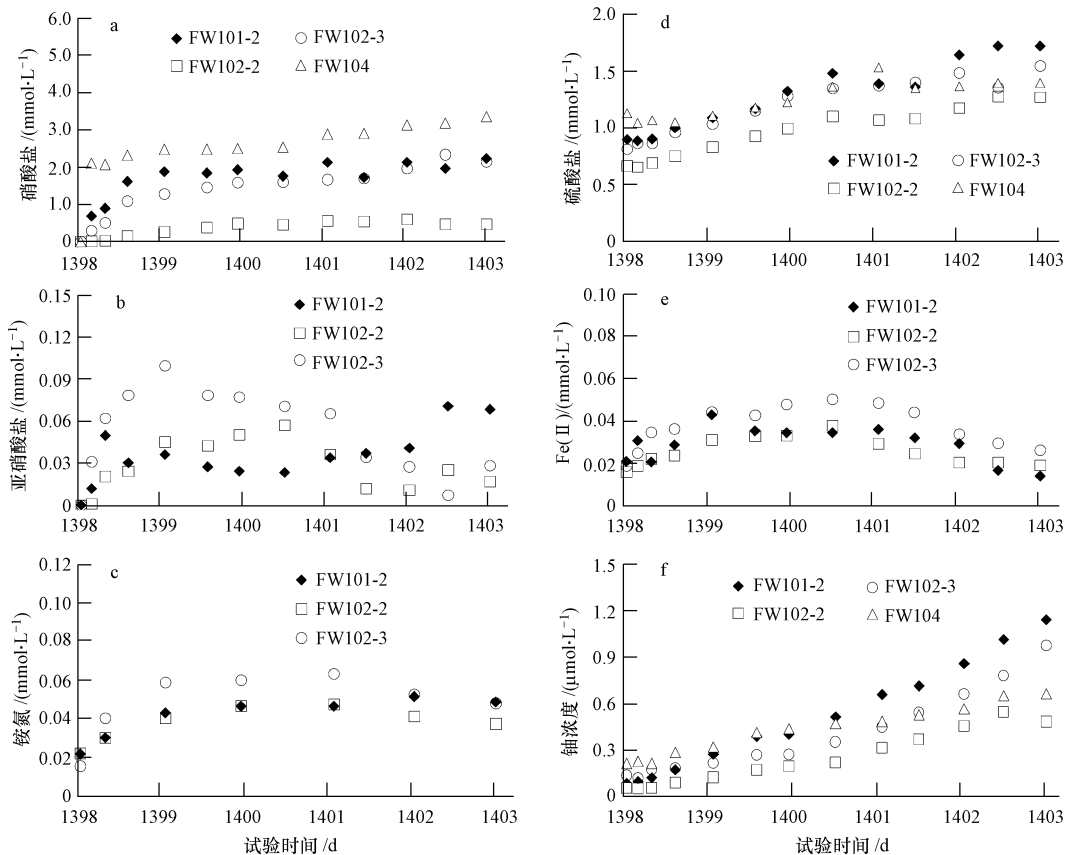
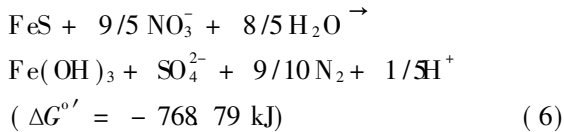


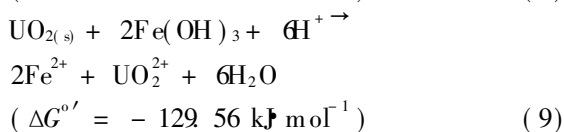
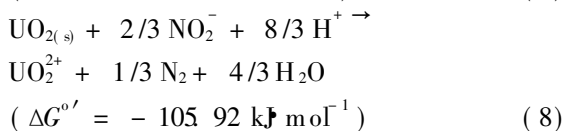
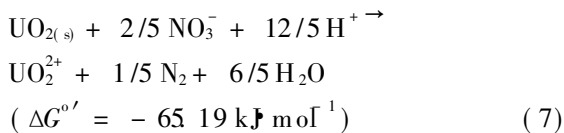
图 7 通过向试验区加入硝酸盐后监测井中离子浓度的变化 (a 硝酸盐; b 亚硝酸盐; c 铵盐; d 硫酸盐; e Fe(II); f U(VI))

Fig. 7 Geochemical effects of controlled nitrate addition (Days 1398 to 1403) (a nitrate; b nitrite; c ammonium; d sulfate; e Fe(II); f U(VI))

加入硝酸盐后监测井中的硫酸盐、 Fe^{2+} 以及铀浓度的变化如图 7d、7e 和 7f 所示。 Fe^{2+} 的浓度开始略有增加. 这可能是由于沉积物中的 FeS 被氧化成单质硫, 使 Fe^{2+} 从还原性沉积物中释放出来. 经过一段时间后, Fe^{2+} 的浓度开始下降, 这是因为 $\text{Fe}(\text{II})$ 被进一步氧化成了 $\text{Fe}(\text{III})$. 在此期间, 硫酸盐浓度逐渐上升, 表明单质硫可能被进一步氧化成硫酸盐 (图 7d). 总的反应为:



在存在硝酸盐和亚硝酸盐的情况下, 地下水硫化物的浓度降至检测灵敏度以下. 加入硝酸盐后, 地下水中铀的浓度开始增加, 监测井 FW 101-2 和 FW 102-3 中的铀浓度后来超过注入井 FW 104 的铀浓度 (图 7f). 实验室研究表明, 在不存在微生物的条件下, 硝酸盐并不能将 $\text{U}(\text{IV})$ 氧化成 $\text{U}(\text{VI})$ (Senko *et al.*, 2005). 当存在铁还原微生物例如土杆菌 (*Geobacter* spp) 或亚铁氧化菌 *Thiobacillus* spp 时, 它们可以利用硝酸盐或生成的亚硝酸盐将 $\text{U}(\text{IV})$ 氧化成 $\text{U}(\text{VI})$ (Senko *et al.*, 2005; Beller 2005); 微生物还可以作为媒介促进生成的 $\text{Fe}(\text{III})$ 氧化 $\text{U}(\text{IV})$ 成 $\text{U}(\text{VI})$ (Senko *et al.*, 2002, 2005). 反应如下:



这次试验后, 通过外部污染的、含硝酸盐的地下水侵入对处理区进行了长达 76d 的氧化实验 (第 1420~1496 天), 进一步证实了存在通过微生物利用硝酸盐氧化 $\text{U}(\text{IV})$ 为 $\text{U}(\text{VI})$ 的反应 (Wu *et al.* 2010). 长期运行数据也显示氧化后生成的铀酰可以被 $\text{Fe}(\text{III})$ 化合物大量吸附固定, 而不是以溶解性的铀酰进入地下水, 表明含铁富有的沉积物氧化后有可能通过吸附作用固定一部分氧化态的铀酰.

4.3 微生物群落与铀的还原及其稳定性的关系

微生物群落分析表明, 乙醇注入反应区地下水

层后, 促进了土著反硝化菌、硫酸盐还原菌和铁还原菌等功能微生物的生长. 在生物修复之前, 地下水中只有检测出极少量的反硝化菌 ($< 10 \text{ cells L}^{-1}$), 沉积物样品中的微生物数量太少以致于无法提取其 DNA. 在生物修复之后, 用 MPN 法计数沉积物样品中反硝化菌、硫酸盐还原菌和铁还原菌, 结果均达到 $10^7 \sim 10^8 \text{ g}^{-1}$ (干重). 16S rDNA 克隆文库的分析结果显示, 地下水和沉积物可能参与还原 $\text{U}(\text{VI})$ 反应的微生物包括硫酸盐还原菌中的脱硫弧菌 (*Desulfovibrio*), *Desulfoprosinus*, 脱硫肠状菌 (*Desulfotomaculum*) 和铁还原菌中的土杆菌和 *Anaeromyxobacter* (Cardenas *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2009). 铁还原菌中的优势种还有土丝菌 (*Geothrix*). 不过迄今为止尚不知此菌能否还原 $\text{U}(\text{VI})$. 上述微生物在生物修复过程可以直接还原以及通过其代谢产物 $\text{Fe}(\text{II})$ 和 $\text{S}(\text{II})$ 的还原性产物间接还原地下水和沉积物中的 $\text{U}(\text{VI})$. 同时, 沉积物样品还发现存在亚铁氧化菌 *Thiobacillus* spp (Cardenas *et al.*, 2008), 其数量在硝酸盐再氧化试验开始后明显上升. 克隆文库分析还表明, 还原菌脱硫弧菌、土杆菌, *Anaeromyxobacter* 和 *Shewanella*, 以及其它菌如红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas* spp) 和假单胞菌 (*Pseudomonas* spp) 都大量存在于试验区的内循环系统中, 其功能基因的数量和丰富度与内循环中的平均水力停留时间、pH 和地下水中硫化物含量直接相关 (Xu *et al.*, 2010). 这些结果显示地下水生态系统中的土著微生物群落在生物修复试验中被成功地用乙醇作为电子供体激活并进行还原铀的生物反应. 试验结果也表明, 群落的结构和功能受地质化学参数和水力条件所制约, 在一定条件下可以控制.

基于微阵列的基因芯片技术分析表明, 在初始的 6 个月内地下水中铀浓度的降低与铁氧化菌的细胞色素 C 的含量以及脱硫弧菌和土杆菌种群数量呈明显的正相关 (He *et al.*, 2007). 当铀浓度降到较低水平后, 地下水中的铀浓度不再与细胞色素 C 的含量相关 (van Nostrand *et al.*, 2009). 研究还表明由于乙醇的注入, 试验区内循环系统的微生物群落组成与外循环系统相比显著不同, 其功能基因的数量、多样性和丰富度都远高于外循环系统 (Xu *et al.*, 2010).

铁还原微生物包括土杆菌和 *Anaeromyxobacter* spp, 和亚铁氧化菌 *Thiobacillus* spp 在硝酸盐存在

条件下能氧化 U(IV)为 U(VI). 这些细菌能以 U(IV)为电子供体通过反硝化作用将硝酸盐还原为 N₂气并释放 U(VI). 试验表明硫酸盐还原菌则不能利用硝酸盐氧化 U(IV).

4.4 影响铀污染生物修复的生物地球化学因素

橡树岭试验中心的生物地球化学因素对地下水和沉积物中铀的稳定性有很大影响 (Wu *et al.*, 2010). 在污染区的沉积物中含有 3% ~ 5% 的铁, 地下水含有不同浓度的硫酸盐 (0.5 ~ 100 mmol L⁻¹), 硝酸盐 (约 120 mmol L⁻¹) 和 Ca²⁺ (0.5 ~ 2 mmol L⁻¹). 它们在很大程度上影响铀的生物修复及铀生成物的稳定性. 根据本研究的结果, 在 pH 6.0 ~ 6.5, Ca²⁺ 浓度为 0.5 ~ 1.5 mmol L⁻¹ 和 HCO₃⁻ 浓度为 0.5 ~ 2 mmol L⁻¹ 的情况下, 沉积物中的还原后 U(IV) 相当稳定, 地下水中的铀浓度可以维持在 < 0.03 mg L⁻¹ 的低水平. 铁还原菌和硫酸盐还原菌产生的还原产物, 如 Fe(II) 和硫化物等有利于转化 U(VI) 成 U(IV) 和维持还原态的 U(IV) 的稳定. 往地下水层中添加乙醇或其它有机物电子供体可以促进反硝化作用, 促进 Fe(III) 和硫酸盐的还原, 同时促进 U(VI) 的还原. 在还原后的地下水层内, 还原态的 U(IV) 可能由于渗入溶解氧而被直接氧化或者被相关的酶氧化成 U(VI); 在存在硝酸盐的情况下, 微生物可能氧化 U(IV) 成 U(VI). 还原后的地下水层被微生物再氧化后, 生成的 Fe(III) 化合物具有很高的表面活性, 能够吸附 U(VI). 除乙醇外, 我们发现复杂的电子供体如油酸和植物油也可以将 U(VI) 还原成 U(IV) (Zhang *et al.*, 2010). 在生物修复反应过程中会有少量的甲烷产生, 而过量产甲烷会影响 U(VI) 的还原反应.

5 结论 (Conclusions)

1) 橡树岭铀污染生物修复的试验表明, 以乙醇为电子供体能够促进土著微生物将 U(VI) 转化为 U(IV) 从而将铀原位固定. U(VI) 的还原反应发生在反硝化反应和 Fe(III) 还原之后, 与硫酸盐的还原反应几乎同时出现. 地下水中铀浓度最终达到了美国环保署的饮用水标准 (< 0.03 mg L⁻¹). 沉积物中大约 70% ~ 80% 的 U(VI) 被转化成 U(IV), 主要以 U(VI) - Fe 氧化物的复合物形式存在, 而非晶质铀矿晶体.

2) 在厌氧或缺氧条件下, 生物还原与固定的 U(IV) 可以持续保持稳定状况. 溶解氧渗入地下水层

后, 可以将还原态的 U(IV) 氧化成 U(VI) 并释放到地下水中. 在微生物的作用下, 硝酸盐可以通过微生物活性还原成亚硝酸盐和铵盐, 同时将 U(IV) 氧化成 U(VI). 铁化合物的存在, 可以加速硝酸盐对 U(IV) 的氧化过程. 橡树岭实验基地化学条件对生物还原和铀的还位固定有很大影响.

3) 微生物群落分析结果显示, 加入乙醇可以促进土著微生物的生长, 对反硝化、Fe(III) 还原和硫酸盐还原均有显著效果. 与 U(VI) 还原有关的微生物包括脱硫弧菌、*Desulfosporosinus* spp、*Anaeromyxobacter* spp 和土杆菌. 与硝酸盐氧化 U(IV) 成 U(VI) 有关的微生物有土杆菌和 *Anaeromyxobacter* spp, 亚铁氧化菌 *Thiobacillus* spp 也能利用硝酸盐氧化 U(IV). 生物芯片分析结果揭示了在反应初期和反应后期以及不同地点位置的功能微生物群落的变化和差异.

致谢 (Acknowledgment): 参与本研究项目还有以下人员: S. Carol O. A. Cipka 博士, M. Fienen 博士, M. E. Gentile 博士, T. Gentry 博士, M. Ginder-Vogel 博士, S. Fendorf 博士, R. E. Hickey 博士, J. Nymann 博士, K. Love, T. Melhorn, R. Rajan 博士, 颜慧, 尹香萍 和 D. Wagner 感谢哈尔滨工业大学高崇洋在稿件准备过程中的帮助.

参考文献 (References):

- Anderson R T, Vrionis H A, Ortiz-Bernad I *et al.* 2003. Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (10): 5884-5891
- Beller H R. 2005. Anaerobic nitrate-dependent oxidation of U(IV) oxides/minerals by the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans* [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (4): 2170-2174
- Cardenas E, Wu W M, Leigh M B, *et al.* 2008. Microbial communities in contaminated sediments associated with bioremediation of uranium submicromolar levels [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (12): 3718-3729
- 池翠萍, 王仲文. 2002. 贫铀武器对人体健康的影响 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 22(2): 137-139
- Gu B, Wu W M, Fields M W, *et al.* 2005. Bioreduction of uranium in a contaminated soil column [J]. *Environmental Science & Technology* 39 (13): 4841-4847
- He Z, Gentry T J, Schadt C W, *et al.* 2007. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biological, ecological and environmental processes [J]. *The MSE Journal* 1 (1): 78-91
- Hwang C, Wu W M, Gentry T, *et al.* 2006. Changes in bacterial community structure correlate with initial operating conditions of a field-scale denitrifying fluidized bed reactor [J]. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology, 71(5): 748-760
- Hwang C, Wu W M, Gentry T, *et al*. 2009 Bacterial community succession during in situ uranium bioremediation: spatial similarities along controlled flow paths [J]. *Environmental Science & Technology*, 43(1): 47-64
- Istok JD, Senko JM, Krumholz LR, *et al*. 2004 In situ bioreduction of technetium and uranium in a nitrate-contaminated aquifer [J]. *Environmental Science & Technology*, 38(2): 468-475
- Kelly S D, Kemner K M, Carley J, *et al*. 2008 Speciation of uranium within sediments before and after in situ bioreduction [J]. *Environmental Science & Technology*, 42(5): 1558-1564
- Lovley D R, Phillips E J P, Gorby Y, *et al*. 1991 Microbial reduction of uranium [J]. *Nature*, 350: 413-415
- Luo J, Wu W M, Fienen M N, *et al*. 2006 A nested-cell approach for in situ remediation [J]. *Groundwater*, 44(2): 266-274
- Luo J, Wu W M, Carley J, *et al*. 2007 Hydraulic performance analysis of a multiple injection-extraction well system [J]. *Journal of Hydrology*, 336(3/4): 294-302
- Phillips D H, Watson D B, Roh Y, *et al*. 2006 Distribution of uranium contamination in weathered fractured saprolite/shale and groundwater [J]. *Journal of Environmental Quality*, 35(5): 1715-1730
- Senko JM, Istok JD, Suflija J M, *et al*. 2002 In-situ evidence for uranium immobilization and remobilization [J]. *Environmental Science & Technology*, 36(7): 1491-1496
- Senko JM, Mohamed Y, Dewers T A, *et al*. 2005 Role for Fe(III) minerals in nitrate-dependent microbial U(VI) oxidation [J]. *Environmental Science & Technology*, 39(8): 2529-2536
- Suzuki Y, Kelly S D, Kemner K M, *et al*. 2002 Nanometre-size products of uranium bioreduction [J]. *Nature*, 419(6903): 134
- Tabak H H, Lens P, van Hullebusch E D, *et al*. 2005 Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides -1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport [J]. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 4(3): 115-156
- Van Nostrand J D, Wu W M, Wu L, *et al*. 2009 GeoChip-based analysis of functional microbial communities during the reoxidation of a bioreduced uranium contaminated aquifer [J]. *Environmental Microbiology*, 11(10): 2611-2626
- Wall JD, Krumholz LR. 2006 Uranium reduction [J]. *Annual Review of Microbiology*, 60(1): 149-166
- Wu W M, Carley J, Fienen M, *et al*. 2006 Pilot-scale in situ bioremediation of uranium in a highly contaminated aquifer 1: conditioning of a treatment zone [J]. *Environmental Science & Technology*, 40(12): 3978-3985
- Wu W M, Carley J, Gentry T, *et al*. 2006 Pilot-scale in situ bioremediation of uranium in a highly contaminated aquifer 2: U(VI) reduction and geochemical control of U(VI) bioavailability [J]. *Environmental Science & Technology*, 40(12): 3986-3995
- Wu W M, Carley J, Luo J. 2007. In situ bioreduction of uranium (VI) to submicromolar levels and reoxidation by dissolved oxygen [J]. *Environmental Science & Technology*, 41(6): 5716-5723
- Wu W M, Carley J, Green S, *et al*. 2010 Effects of nitrate on the stability of uranium in the bioreduced region of the subsurface [J]. *Environmental Science & Technology*, 44(13): 5104-5111
- Xu M, Wu W M, Wu L, *et al*. 2010 Responses of microbial community functional structures to pilot-scale uranium *in situ* bioremediation [J]. *The SME Journal*, 4(8): 1060-1070
- Zhang F, Wu W M, Parker J C, *et al*. 2010 Kinetic analysis and modeling of oleate and ethanol stimulated uranium (VI) bioreduction in contaminated sediments under sulfate reduction conditions [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1/3): 482-409