

处理甲苯废气的生物滴滤池中微生物生态学研究*

李建军 陈进林 岑英华 孙国萍**

(广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

摘要 利用 PCR-DGGE 技术分析了处理甲苯废气的生物滴滤池生物多样性,结果表明:在运行过程中,随着生物滴滤池对甲苯去除能力的不断增加,填料当中的微生物种群也发生了明显的变化。在甲苯的选择压力下,随时间的迁延,微生物种类减少,优势种群的相对丰度增加,处于不同层面填料上的微生物分布也趋向于一致。

关键词 生物滴滤池,生物多样性,变性梯度凝胶电泳

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0638-04

Study of Microbial Ecology in Biotrickling Filter Used to Treat Waste Air Containing Toluene*

LI Jian-Jun CHEN Jin-Lin CEN Ying-Hua SUN Guo-Ping**

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

Abstract Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA was used to assess changes of biodiversity in a biotrickling filter used to treat waste air containing toluene. The results shown that along with gradually increase of removing capacity for toluene, microbial community structure in packing materials sampled from biotrickling filter also changed markedly over periods of experiment. Under selective pressure of toluene, the number of microbial species decreased but relative abundance of some predominant species increased, and microbial spatial location along the height of biotrickling filter tend to be identical.

Key words Biotrickling Filter, Biodiversity, DGGE

生物法治理污染空气始于 20 世纪 50 年代,最初是用土壤床来治理生活污水厂散发的恶臭气体^[1]。由于生物法治理废气具有经济、高效和环保的优点,目前已经拓展到对挥发性有机气体(VOC)的净化治理,并为众多学者和专家所注意,开展了大量有关工艺、填料以及影响处理效率的各种因素(如温度、pH、负荷等)等方面的应用研究^[2~4]。但是对其中微生物的研究尚不多见,经常出现由于微生物的过度生长而导致填料堵塞的情况^[5]。处理系统中微生物的生长受到各种环境因素的影响,因此,只有深入了解微生物的种群结构以及微生物与环境因素的相互作用关系,才能通过调整运行参数和改进工艺,控制微生物的适度生长,并保持相对

的稳定,从而提高生物法治理工业废气的效率和性能。本文借助分子生态学技术,对处理甲苯废气的生物滴滤池中的微生物学规律进行了研究。

1 材料与方法

1.1 生物滴滤池

生物滴滤池内径 15cm,填料高度为 100cm,成分为 1:3(V/V)的活性炭和陶粒,合成的甲苯废气从反应器上部进入,流量为 1.05m³/h。距离填料层顶部 16cm、37cm、58cm、79cm 处留有 4 个采样孔(标记为 1、2、3、4),反应器流程图见文献[6]。填料用石化厂活性污泥挂膜后通入低浓度甲苯废气进行驯化,定期补加不含碳源的无机盐溶液。分别于第 10d、

* 广东省重大科技攻关项目(No. 2005A30401002)

广东省科技攻关项目(No. 2005B10301029)

广州市科技攻关项目(No. 2004Z3-E0471)

** 通讯作者 Tel: 020-87684471, E-mail: jebitech@163.com

收稿日期: 2006-08-03, 修回日期: 2006-09-12

40d、70d(标记为 A、B、C)从各采样孔采集陶粒,置于-20℃冰箱保存,同时检测进气口、出气口及各采样孔甲苯气体浓度。

1.2 分析方法

甲苯气体浓度检测:由气相色谱仪(HP5890 II 型,具 FID 检测器和 HP3394 自动积分仪)检测。色谱柱:DB-5 型毛细管柱(7m×0.32mm);汽化室温度:180℃;柱温:50℃;检测器温度:180℃;载气:氮气;柱前压 60kPa。

总 DNA 提取 3 次从填料层的 4 个采样孔共采集 12 份样品,每份称量 5g 填料于 50mL 离心管中,按照文献[6]所述方法进行总 DNA 提取^[7]。

PCR 扩增:使用梯度 PCR 扩增仪(PTC200),用 16S rDNA 基因的 V3 区特异性引物^[8]扩增目的片段,扩增反应先于 94℃预变性 4min,然后按以下程序循环 30 次:94℃1min,43℃1min,72℃2min,最后在 72℃延伸 10min,产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

DGGE 采用 Dcode™突变检测系统(Bio-Rad)对 16S rDNA V3 区扩增片段进行 DGGE 分析,电泳所用聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10%,变性梯度为 30%~60%(尿素为 7mol/L,甲酰胺为 40%时的变性浓度为 100%)。使用电泳缓冲液为 1×TBE,每孔上样浓缩后的扩增产物 25μL。电泳条件为 60℃恒温下,100V 电泳 9h,然后用 EB 染色 30min,UVItrec 紫外凝胶成像系统(Cambridge,UK)观察,并用 UVIBAND(V.99)软件分析结果,用 Shannon-weiner 指数来反映生物多样性,计算公式如下^[8]: $H = - \sum P_i \log P_i$, P_i 为每一条带在所有条带中所占的比率。用相似性系数 C_s 来比较不同样品中微生物的群落结构,计算公式如下^[9]: $C_s = 100 \times 2j / (a + b)$, j 为两个样品中相同条带的数目, a 和 b 分别为两个样品可探测到的条带的数目, C_s 值介于 0~100 之间,0 表示没有相同的条带,而 100 表示两个样品完全相同。

DNA 回收测序:选择凝胶上丰度较高、变化较为明显的条带回收后作为模板再扩增,扩增产物送上海博亚生物公司测序,所测序列输入 GenBank 比对,选取相似性较高的同源序列,利用 Phylip 软件包中的邻位连接法构建系统发育树。

2 结果与讨论

生物滴滤池接种污泥后需要一定的时间驯化

才能达到对目标污染物有稳定的去除效果,表 1 是不同时期生物滴滤池中位于不同高度的填料层对甲苯的去除结果,可以看出,随着甲苯浓度的升高和运行时间的延长,生物滴滤池对甲苯的去除能力逐渐增加,1 个月以后,甲苯的出气浓度已降低至 0.019mg/m³,当浓度继续升高时,虽然整个填料层对甲苯的去除负荷和去除能力都在升高,但甲苯的出气浓度有所增加。

表 1 生物滴滤池对甲苯的去除

采样时间 (d)	进气浓度 (mg/m ³)	1 (mg/m ³)	2 (mg/m ³)	3 (mg/m ³)	4 (mg/m ³)	出气浓度 (mg/m ³)	去除能力 (g/m ³ ·h)
A(10)	0.960					0.528	15
B(40)	1.700	0.649	0.304	0.090	0.019	0.019	121
C(70)	4.221	2.459	1.998	1.573	1.331	1.137	180

在 70d 的试验期间,填料当中的微生物组成随时间的迁延发生了明显的变化,Shannon 指数由开始阶段的 1.2 左右降低到最后的 1.0 左右(表 2)。Shannon 指数是反映出群落丰度和均匀度的综合指标,与物种数目的多少以及不同物种在群落中所占的比例有关。DGGE 技术由于可以将一个碱基差异的 DNA 片段分开,因此,每一个条带基本上可以代表一种物种,条带的亮度表示物种的相对数量。由图 1 可以看出,第 3 次采集的样品中丰度较高的微生物种类在数目上明显减少,只有 4、5、6、10 条带在 3 个样品中共同出现,其中条带 4、6、10 亮度减弱,而条带 5 则明显增强,由原来的弱势种群发展为优势种群,而条带 1、2、8、9 和 11 则逐渐消失,其中条带 1 和 2 为原来的优势种群。

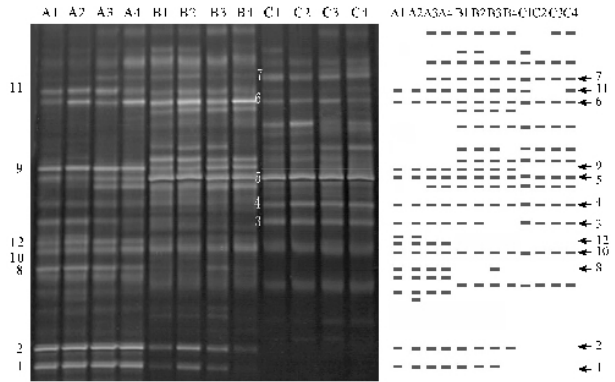


图 1 生物滴滤池不同样品的 DGGE 指纹图谱

在填料不同层面所采集的样品中微生物的种类和数量差异不大,Shannon 指数也比较接近。通过

计算相似性系数(C_s 值)发现(表 3):不同日期同一位置的样品相似性系数发生了较大的变化,A 样品同 B、C 样品的相似性较低,如 A1 同 B1 和 C1 的 C_s 值分别为 54 和 43,但 B、C 样品的相似性较高,如 B1 和 C1 为 85,说明在生物滴滤池运行过程中,其内部的微生物的群落结构逐渐趋于一致。同一天的不同位置的样品的相似性系数很高,第 10d 的 4 个样

表 2 各样品 Shannon 指数

样品	Shannon 指数
A1	1.206
A2	1.197
A3	1.225
A4	1.226
B1	0.887
B2	1.046
B3	1.105
B4	1.064
C1	1.014
C2	1.023
C3	1.020
C4	0.921

表 3 各样品的相似性系数(C_s)

C_s 系数	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3
A1	100										
A2	97	100									
A3	82	76	100								
A4	82	76	100	100							
B1	54	53	76	76	100						
B2	55	53	76	76	100	100					
B3	50	55	74	74	92	92	100				
B4	41	47	69	69	88	88	91	100			
C1	43	44	58	58	85	85	75	76	100		
C2	38	37	55	55	77	77	73	74	92	100	
C3	37	36	60	60	81	81	77	79	89	96	100
C4	36	43	65	65	85	85	82	83	93	92	96

品之间的相似性稍低,而第 40d 和 70d 的 C_s 逐渐增加,达到 88 以上,微生物的种类和分布十分相似。出现这种结果的原因可能是第 10d 生物滴滤池处于驯化初期,微生物群落结构尚未发生明显变化,第

70d 甲苯由于进气浓度较高,在填料不同高度都有一个较高的选择压力,使得微生物的分布也趋于一致,第 40d 浓度适中,甲苯沿着填料高度逐步地被去除,在不同的高度甲苯的选择压力不完全一样,微生物群落结构相似性稍低于第 70d 的各样品。

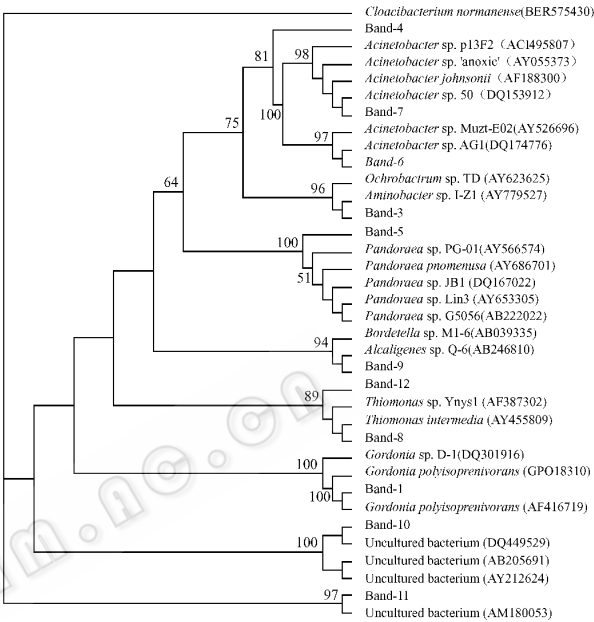


图 2 生物滴滤池中主要微生物种群的系统发育关系

生物滴滤池中的主要微生物菌种的系统发育关系(图 2)表明,在反应器运行的后期所出现的主要微生物种群系统发育关系较为接近,与不同类型的紫细菌聚在一起。其中条带 5 为优势菌种,与之聚为一类的菌均为芳香族化合物的降解菌,如 *Pandoraea* sp. PG-01 是从一序批式反应器中分离得到的降解苯酚的菌株^[11],而 *Pandoraea* sp. JB1 则是从苯系物(苯、甲苯、乙苯等)污染的土壤中分离得到的降解菌株^[12],条带 5 与这些菌的同源序列的相似性都为 98%,说明反应器中甲苯作为最重要的因素,决定着填料生物膜的微生物种群结构。在驯化初期的主要微生物种类较多,系统发育关系较远,分为几个不同的类群,除了与紫细菌相似性高的一些类群外,条带 1 还与革兰氏阳性的放线菌聚在一起。

以上结果说明在滴滤池运行过程中微生物的种类和数量都发生了变化,这是由于随着滴滤池进气甲苯浓度的不断升高和负荷的增加,只有能够利用甲苯作为碳源生长的微生物种群才能不断的增殖,从而在生物膜中占据优势。微生物种类虽然减

少,但是对甲苯废气的去除能力却逐渐增强,由第 10d 的 $15\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$ 增加到第 40d 的 $121\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$ 和第 70d 的 $180\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$ 。因此,甲苯作为一种主要的选择性压力,决定着构成生物膜的微生物种群结构,随着对微生物不断地选择和淘汰,使得能够降解甲苯的微生物逐渐成为优势种群,能最终保持丰度较高、相对稳定的状态,从而维持着生物滴滤池高效的甲苯处理性能。

接种填料的活性污泥来自处理石油加工废水的活性污泥,由于微生物群落组成较为复杂,其中甲苯降解菌不一定是优势种群,这从条带 5 的显著增强和原来较亮的条带 1 和 2 的消失就可以看出。因此,在挂膜驯化阶段如能针对性地接种甲苯降解菌,可以大大地缩短生物滴滤池启动和调试所需的时间。

参考文献

[1] Pomeroy R D. US Patent , 1957 , 2.793.096.

- [2] Lu C , Lin M R , Chu C. *Advances in Environmental Research* , 2002 , **6** 99 ~ 106.
- [3] Vinage I , von Rohr , Ph R. *Bioprocess Biosyst Eng* , 2003 , **26** : 75 ~ 82.
- [4] Sukesan S , Watwood M E. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1997 , **48** : 671 ~ 676.
- [5] Huub H J , Cox , Marc A , *et al* . *Current Opinion in Biotechnology* , 1998 , **9** 256 ~ 262.
- [6] Zhou J , Bruns M A , Tiedje J M. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** : 316 ~ 322.
- [7] Muyzer G , de Waal E C , Uitterlinden A G. *Appl Environ Microbiol* , 1993 , **59** 695 ~ 700.
- [8] Nübel U , Garcia-Pichel F , Kühl M G , *et al* . *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** : 422 ~ 430.
- [9] Li C , Moe W M. *Environ Biotech* , 2004 , **64** 568 ~ 575.
- [10] Jiang H L , Tay J H , Maszenan A M , *et al* . *Appl Environ Microbiol* , 2004 , **70** 6767 ~ 6775.
- [12] Witzig R , Junca H , Hecht H J , *et al* . *Appl Environ Microbiol* , 2006 , **72** 3504 ~ 3514.