

兼性厌氧菌群对湖滨带底泥有机污染物的降解效应*

张蕊^{1,2} 曹蓉¹ 叶春^{2#} 李春华²

(1. 河北工程大学城市建设学院, 河北 邯郸 056038; 2. 中国环境科学研究院, 北京 100012)

摘要 研究了兼性厌氧菌群不同接种量(1%(体积分数,下同)、5%、10%、20%、50%)下对太湖湖滨带底泥有机污染物的降解效果及微生物群落结构的影响。结果表明,与对照组相比,接种兼性厌氧菌群能显著提高总有机碳(TOC)、TN的降解率且降解率高,但是TP的降解率波动较大。补充实验证明接种菌液中大量的有机碳、氮源会引起样品中初始浓度升高,建议在使用接种菌液前进行3次无菌水冲洗。综合考虑接种兼性厌氧菌群对湖滨带底泥有机污染物的降解效果,确定其最佳接种量为10%。另外,接种兼性厌氧菌群后其菌群数量和菌活性都有显著提高而严格好氧菌、严格厌氧菌数量均无显著变化;第0天,微生物在接种量为10%时菌活性电子传递体系(ETS)最高。

关键词 兼性厌氧菌群 有机污染物 湖滨带

Biodegradation of organic contaminants in sediment of littoral zone by facultative anaerobic bacteria ZHANG Rui^{1,2}, CAO Rong¹, YE Chun², LI Chunhua². (1. College of Urban Construction, Hebei University of Engineering, Handan Hebei 056038; 2. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012)

Abstract: A facultative anaerobic bacteria was inoculated to the sediment sample of littoral zone in Taihu Lake. The inoculation size of facultative anaerobic bacteria was 1% (volume ratio, similarly hereafter), 5%, 10%, 20% and 50%, respectively. The effect of inoculation size on organic contaminants biodegradation and microbial community structure was investigated. Compared with the control group, inoculating facultative anaerobic bacteria (test groups) could greatly increase the TOC and TN removal rate. While TP removal rate presented relative larger fluctuation. There was large amount of organic carbon and nitrogen containing in inoculum, so the inoculum should be washed three times with sterile water before inoculated in sediment samples. Comprehensively considering the biodegradation of TOC, TN and TP, the optimum inoculation size of facultative anaerobic bacteria was 10%. The facultative anaerobic bacteria population sizes and bacteria activity ETS value in the test groups were higher than those in the control group. However, aerobic bacteria and anaerobic bacteria population sizes did not change significantly. The highest ETS value was found in group with 10% of inoculation size on day 0.

Keywords: facultative anaerobic bacteria; organic contaminants; littoral zone

湖滨带是生态系统之间的过渡与缓冲区域,是水陆生态系统间的一个重要的生态交错带,也是湖泊的一道保护屏障^[1]。由于易受岸上周边地区各种人类活动和自然过程的影响,湖滨带也是湖泊系统中对人类活动影响最敏感的部分。湖滨带底泥有机污染物是湖泊内源污染的重要指标,在湖泊环境化学及污染化学中有着十分重要的作用^[2],其主要来源于污染工业密集地区大量有机污染物随废/污水入湖,部分沉于底泥;入湖河流、湖滨带大型水生植物及浮游生物的腐解^[3];富营养化严重的水域中藻类大爆发后其残体沉于水底^[4]。底泥中所含的有机污染物是不稳定的,在适当的条件下,会被

氧化为CO₂或还原为CH₄,矿化后可以向水体释放营养盐,成为湖泊氮、磷的内源,加剧湖泊的富营养化。

有机污染物的降解,以生物降解为主,而微生物在降解有机污染物时以其经济、有效、安全,且阈值低、残留少的优势受到极大的关注^[5-6]。微生物中的兼性厌氧菌既能存活于无氧条件,又能存活于有氧条件,对环境氧化还原电位(Eh)有着更广泛的适应范围^[7],是溶解氧变化范围大且以无氧区为主的湖滨带底泥有机污染物降解的首选菌种。朱琼芳等^[8]研究显示,接种兼性厌氧菌能明显提高总有机质(TOM)和BOD₅的去除率。但是关于兼性厌氧菌

第一作者:张蕊,女,1986年生,硕士研究生,研究方向为环境应用微生物。*通讯作者。

* 国家水体污染控制与治理科技重大专项(No. 2009ZX07101-009)。

对有机污染物降解的研究还远远不足,如兼性厌氧菌降解有机污染物的过程、机制及对微生物群落结构等的影响均鲜有报道。

本实验以在太湖湖滨带底泥中筛选出的高效降解有机污染物的兼性厌氧菌群为研究对象,研究其对太湖湖滨带底泥有机污染物的降解效果及菌群数量的影响,为兼性厌氧菌对有机污染物降解的实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品和菌种

1.1.1 样品采集

2011年夏季,用全球定位系统GPS导航,在太湖重污染区湖滨带(120°01'38.55"E,31°27'31.74"N)采集上覆水及以下0~10 cm厚度的沉积物。

1.1.2 菌种

实验中使用的兼性厌氧菌群是实验室前期筛选得到对太湖湖滨带底泥有机污染物具有高效降解作用的9株兼性厌氧菌种FA1、FA3、FA4、FA7、FA10、FA12、FA13、FA14、FA17。9株兼性厌氧菌种(优势菌)都为革兰氏阴性菌,16S rDNA鉴定结果显示优势菌FA1、FA3、FA4、FA7、FA13和FA17属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),优势菌FA12属于陶厄氏菌属(*Thauera* sp.),优势菌FA14属于红细菌属(*Rhodobacter* sp.),优势菌FA10属于黄杆菌属(*Flavobacteriaceae bacterium*)。

1.2 有机污染物降解实验

在好氧振荡条件下,采用兼性厌氧菌群不同接种量进行湖滨带底泥有机污染物的降解实验,由在微生物代谢下有机污染物浓度所发生的变化来判断生物降解的程度。

将9株兼性厌氧菌种依次接种至营养肉汤培养基中活化至OD₆₀₀为1.0左右,离心分离菌体,用无菌水冲洗1次,悬于同体积无菌水中,按1%(体积分数,下同)、5%、10%、20%、50%的接种量分别接入上覆水和沉积物的混合物中(泥水体积比1:1),另设不加接种菌液的样品(泥水混合物)为对照组。于25℃、180 r/min振荡培养,分别在第0、1、3、5、7、9天取样,测定每一取样时间点的总有机碳(TOC)浓度(指泥水混合物经超纯水振荡提取4.0 h离心过滤后水样的TOC浓度)以及泥水混合物中TN、TP、菌群(严格好氧菌、严格厌氧菌、兼性厌氧菌)数量和菌活性电子传递体系(ETS)的变化。实验中设3个平行样。

1.3 测定方法

1.3.1 理化因子的测定

TOC采用直接法测定,使用仪器为总有机碳分析仪(SHIMADZU公司,TOC-V CPH);TN采用凯氏消煮法测定,使用仪器为凯氏定氮仪(VELP公司,UDK 152);TP采用SMT法测定^[9],使用仪器为紫外-可见分光光度计(Hach公司,DR5000)。

1.3.2 微生物学特性的测定

菌群数量的测定采用最大概率可能数量(MPN)法^[10],以营养琼脂为培养基,培养基倒成平板后,每个平板用4条平行线和3条垂直线分成20个区域。将1 mL泥水混合物加至9 mL已灭菌的生理盐水中,作为10⁻¹稀释液,并做一系列倍比稀释,制成10⁻²~10⁻⁸稀释液。每个稀释度取20 μL至平板上的一个小区域,做5个平行样。严格好氧菌在25℃好氧条件下培养1周,严格厌氧菌在30℃厌氧条件下培养2周,兼性厌氧菌在好氧(25℃)和厌氧条件(30℃)下各培养1周,分别计数。

微生物活性采用ETS值法^[11-13],取1 mL样品,依次加入1.5 mL Tris buffer (1 mol/L, pH 7.0),1 mL 4 mmol/L 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchloride溶液,0.1 mL 0.88 mmol/L NADH溶液和0.25 mL 0.4 mol/L琥珀酸溶液,于37℃、150 r/min避光振荡2.0 h。加入1 mL 37%(质量分数)甲醛溶液,10 mL提取液(N,N-二甲酰胺:乙醇(体积比)为1:1),于37℃、150 r/min避光振荡0.5 h。过滤后,于分光光度计480 nm处比色测定其吸光度,根据INTF的标线得出其浓度。

1.4 统计分析

对实验中菌群数进行单因素方差分析($P \leq 0.05$),以判断接种不同接种量的兼性厌氧菌群是否会对重污染湖滨带底泥中微生物群落结构产生统计学上的差异。所有的统计分析使用软件为SPSS 17.0。

2 结果与讨论

2.1 兼性厌氧菌群不同接种量对有机污染物的降解

2.1.1 兼性厌氧菌群对TOC的降解

图1为兼性厌氧菌群不同接种量下泥水混合物中TOC的降解状况。由图1可知,各实验组TOC降解率明显高于对照组,且随接种量的增大降解率升高(实验初期除外)。实验初期,实验组和对照组TOC的降解率上升都很迅速,但达到最高降解率的时间不同,接种量为1%、5%、10%、20%的实验组

在第1天达到最高值,降解率分别为77.36%、77.37%、80.70%、80.40%;而对照组和接种量为50%的实验组在第3天达到最高值,降解率分别为60.32%和78.97%。实验初期,环境中有机污染物浓度高,利于微生物利用其中的天然有机物(如腐殖酸、多糖聚合物和氨基酸等)、小分子有机物(如羧酸、单糖等)合成自身并提供能量;随着环境中有机污染物浓度的降低,微生物开始利用一些不易降解的有机污染物进行代谢,但微生物对这类有机污染物的分解利用能力有限^[14]。实验后期,由于微生物的衰亡和增生,胞内物质的溶出会引起TOC浓度升高^[15]。

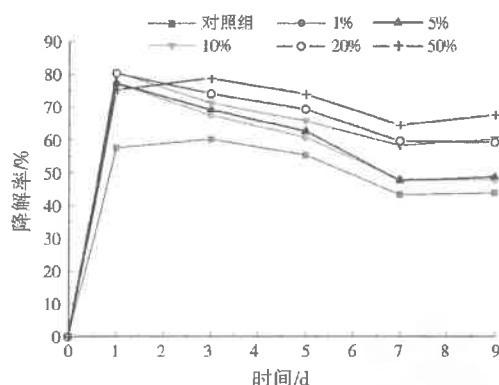


图1 兼性厌氧菌群不同接种量下泥水混合物中TOC的降解
Fig. 1 Effect of inoculum size of facultative anaerobic bacteria on TOC degradation

兼性厌氧菌群的接入可以显著提高TOC的降解率,且随接种量的增大降解率升高,当接种量大于10%时TOC降解率没有明显增幅,且接种量为10%时达到最高降解率时间最短,仅1d。因此,确定10%为最佳接种量。

2.1.2 兼性厌氧菌群对TN的降解

图2为兼性厌氧菌群不同接种量下泥水混合物中TN的降解状况。由图2可知,对照组和接种量为50%的实验组TN降解率明显低于其他4个实验组,且接种量为10%时TN降解率最高。实验初期,实验组和对照组TN的降解率上升迅速,接种量为10%和20%的实验组均在第5天达到最高降解率,其降解率分别为48.54%、44.74%;而对照组和接种量为1%、5%、50%的实验组均在第9天达到最高降解率,其降解率分别为36.96%、47.55%、47.84%、43.83%。经测定,实验初期,兼性厌氧菌大量繁殖,相应地TN显著下降。由于TN测定中包含了微生物同化的氮,因此TN的减少主要源于微生物反硝化作用。实验过程中,TN降解率没有明显的下降,说明尽管有少量菌体因为进入衰退期

而死亡甚至是自溶,但大多数微生物仍保持在平稳期,它们的生理代谢正常,因此整体上仍具有相当的反硝化能力。

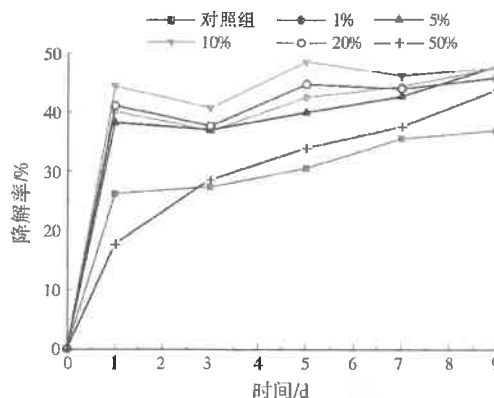


图2 兼性厌氧菌群不同接种量下泥水混合物中TN的降解
Fig. 2 Effect of inoculum size of facultative anaerobic bacteria on TN degradation

兼性厌氧菌群的接入可以显著提高TN的降解率,但过大接种量反而会使降解效果变差,当接种量为10%时TN的降解效果最好。

2.1.3 兼性厌氧菌群对TP的降解

图3为兼性厌氧菌群不同接种量下泥水混合物中TP的降解状况。由图3可知,虽然各实验组TP降解率高于对照组,但它们对TP的降解率并不高,在15%左右波动。湿地环境中,磷的转化大部分是通过沉淀或吸附滞留在底泥中,微生物的转化主要是自身细胞合成或聚磷菌的过量摄取^[16],是由物理沉降和生物吸收降解共同作用而成的。实验中,一方面由于原本沉淀和吸附在底泥中的磷通过摇床的振荡作用释放到了上覆水与沉积物的混合物中,另一方面兼性厌氧菌群的接入提高了吸收降解能力,由于这两种作用的相互叠加造成了TP降解率呈波动趋势。

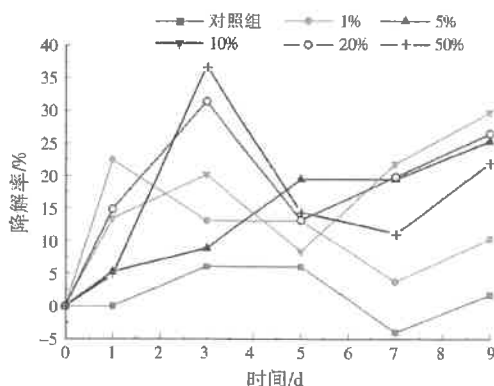


图3 兼性厌氧菌群不同接种量下泥水混合物中TP的降解
Fig. 3 Effect of inoculum size of facultative anaerobic bacteria on TP degradation

表1 第0天不同接种量的 TOC、TN 和 TP

Table 1 The content of TOC, TN and TP in inoculum with different inoculated size on day 0

接种量/%	0	1	5	10	20	50
TOC/(mg · L ⁻¹)	152.58	166.33	163.83	191.23	216.76	259.26
TN/(mg · g ⁻¹)	2.22	2.55	2.55	2.73	2.73	2.75
TP/(mg · g ⁻¹)	0.94	1.07	1.07	1.10	1.16	1.23

2.1.4 冲洗次数对接种菌液浓度的影响

表1显示了试验第0天不同接种量下 TOC 的变化状况。由表1可知,在实验第0天 TOC 基本随接种量的增大而升高,这可能与菌液的冲洗次数有关。对已经活化的菌液(接种量为5%)进行多次冲洗,测定其 TOC 的变化。结果显示,第1次冲洗后菌液 TOC 为 156.34 mg/L,第2次冲洗后为 50.71 mg/L,而第3、4次冲洗后的 TOC 基本达到稳定,为第1次冲洗后的 1/5 左右。一方面这可能是接种菌液中所残留的营养物质造成的,另一方面这可能与微生物体外产生的胞外聚合物有关。胞外聚合物是一种不溶于水的天然有机物,能够紧密附着在细胞壁上,其粘液对有机物有很强的吸附作用^[17]。微生物在适宜的营养条件下会产生胞外聚合物,其在对数期和稳定期产量最为丰富。接种菌液中的微生物处于对数期,微生物营养物质丰富,胞外聚合物含量高,因此微生物表面吸附大量的有机物。经过前两次的冲洗后,接种菌液中的营养物质和微生物表面的胞外聚合物被大量去除,TOC 明显下降,在冲洗第3、4次时基本达到稳定。

实验所采用的接种菌液只经过一次冲洗,TOC 含量较高,所以第0天接种菌液浓度对实验组 TOC 影响很大。与 TOC 相似,TN 和 TP 初始浓度较高,也是由接种菌液中较高的浓度引起的。今后,在兼性厌氧菌群降解湖滨带底泥有机污染物的实际应用中,为了避免菌液本身过高的营养物质所带来的负面影响,在接种菌液前要冲洗至少3次。

2.2 接种兼性厌氧菌群对湖滨带沉积物微生物群落结构的影响

图4为兼性厌氧菌群不同接种量下泥水混合物中菌群数量的变化。由图4(a)、图4(b)可知,在接种后对照组和各实验组严格好氧菌和严格厌氧菌没有发生明显的变化,其数量(以 lg(MPN/mL) 来表征)在 0.2 左右波动,对各实验组和对照组中严格好氧菌的数量进行单因素方差分析,其 F 为 0.781, P 为 0.573,对各实验组和对照组中严格厌氧菌的数量进行单因素方差分析,其 F 为 0.830, P 为 0.538,说明接种兼性厌氧菌群对泥水混合物中的严格好氧

菌和严格厌氧菌的菌群数量均没有显著影响。

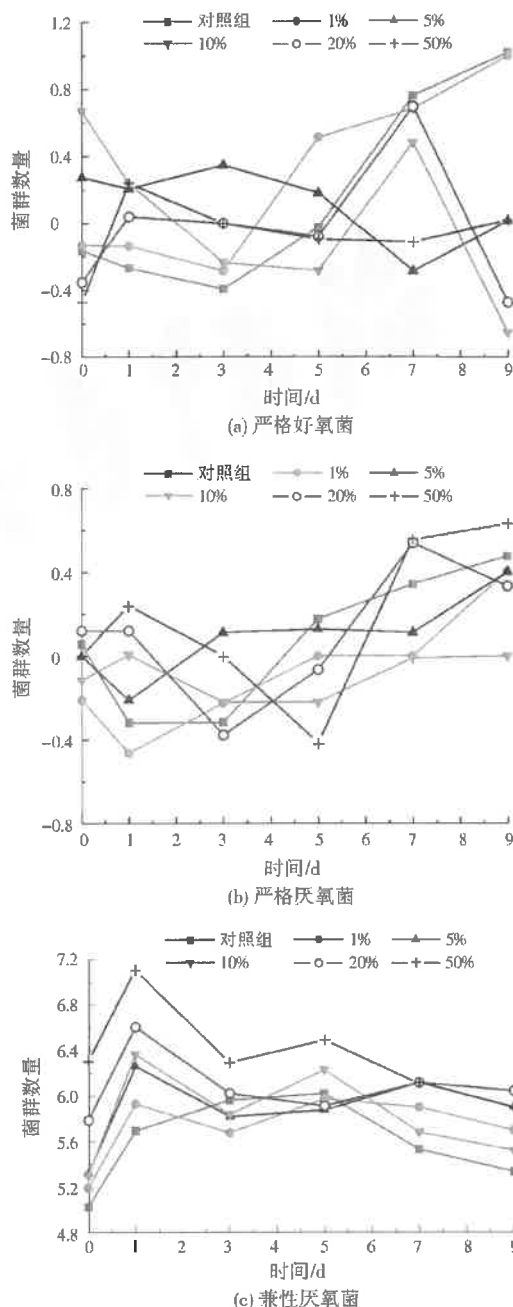


图4 兼性厌氧菌群不同接种量下泥水混合物中菌群数量的变化

Fig. 4 Effect of inoculum size of facultative anaerobic bacteria on bacterial population in sludge mixture

由图4(c)可知,在实验第0天,5个实验组的兼

表2 第0天菌活性 ETS
Table 2 The ETS of sediment on day 0 of inoculation

菌群	对照组	1%	5%	10%	20%	50%
ETS ¹⁾	39.59	32.92	70.32	202.09	83.86	90.53

注: ¹⁾表示每2 h每毫升的微克数。

性厌氧菌数量均大于对照组,并且随着接种量的增大而增大。对各实验组和对照组中兼性厌氧菌的数量进行单因素方差分析,结果显示不同接种量之间存在显著差异($F=10.893, P=0$),说明随着接种量的增大,菌群数量会显著增大。

在实验第1天,对照组和各实验组的兼性厌氧菌数量都有显著的增大,这可能与 TOC 和 TN 有关。NOAH 等^[18]发现随着土壤中可利用碳含量的增加土壤微生物数量升高,微生物群落结构改变;氮元素也是微生物合成蛋白质、核苷酸等生物大分子的基础。在实验第0天,TOC 和 TN 都很高(见表1),这为微生物提供了足够的营养物质,使其能够大量繁殖,在实验第0~1天微生物的数量表现出较大的增大趋势。而且 GRIFFITHS 等^[19]发现向土壤中施加含碳量高的物质能提高土壤中革兰氏阴性细菌的比例。组成兼性厌氧菌群的9株菌株都属于革兰氏阴性菌,较高的含碳量会使所接入的兼性厌氧菌群快速增大并成为优势菌。而对照组,其兼性厌氧菌的数量从第1天开始增大,这种增大趋势一直持续到第5天才结束,这可能是因为对照组兼性厌氧菌数量本底值较低,原有的营养物质足以供应它的生长繁殖,所以直到实验第5天数量才开始减少。

2.3 接种兼性厌氧菌对湖滨带沉积物菌活性的影响

表2为对照组和各实验组在第0天菌活性 ETS。菌活性 ETS 是一种用于表征微生物活性的数值。由表2可知,在第0天,除接种量为1%的实验组与对照组的菌活性 ETS 相近外,其他4个实验组均明显高于对照组,说明接入的兼性厌氧菌群使泥水混合物中的菌活性 ETS 显著增高。在各实验组中,接种量为10%的实验组菌活性 ETS 最高;1%和5%的实验组中微生物在进入新环境时,由于接入的菌群数量较少,微生物由原来的对数期重新进入调整期,从而其活性表现较低;20%和50%的实验组中较高的接种量会产生种间竞争的现象,从而降低菌活性。

3 结论

(1) 利用不同接种量的兼性厌氧菌群对湖滨带底泥有机污染物进行降解,当接种量为10%时

TOC、TN 降解效果最好,降解率最高可达80.7%、48.54%,其达到最高降解率的时间分别为第1、5天。实验初期降解效果明显,TOC、TN 第0~1天降解速率最大,后期降解速率相对较小,可能是由于添加的微生物数量增多,一些死亡的菌体进行分解引起 TOC、TN 的升高。该实验还表明,只有在一定范围内,接种量越大降解效果越好,过大接种量反而会使降解效果变差。与 TOC 和 TN 不同,虽然接种兼性厌氧菌群能够提高 TP 降解率,但是降解率并不高而且波动较大。

(2) 由于接种菌液中大量的有机碳、氮源,容易引起处理样品中的初始浓度升高,在兼性厌氧菌群降解湖滨带底泥有机污染物的实际应用中,建议在使用接种菌液前进行3次无菌水的冲洗。

(3) 接种兼性厌氧菌群可使湖滨带底泥兼性厌氧菌的菌群数量和菌活性 ETS 显著提高,而严格好氧菌、严格厌氧菌没有显著影响。第0天,微生物在接种量为10%时菌活性 ETS 最高。

参考文献:

- [1] 厉恩华,王学雷,蔡晓斌,等. 洱海湖滨带植被特征及其影响因素分析[J]. 湖泊科学,2011,23(5):738-746.
- [2] 卢少勇,金相灿,张烨,等. 滇池内湖滨带底泥的有机质分布规律[J]. 湿地科学,2009,7(2):135-140.
- [3] HAMANAKA J, TANOUE E, HAMA T, et al. Production and export of particulate fatty acids, carbohydrates and combined amino acids in the euphotic zone[J]. Mar. Chem., 2002, 77(1):55-69.
- [4] 厉恩华,刘贵华,李伟,等. 洪湖三种水生植物的分解速率及氮、磷动态[J]. 中国环境科学,2006,26(6):667-671.
- [5] 吴晓磊. 人工湿地废水处理机理[J]. 环境科学,1995,16(3):83-86.
- [6] 张鸿,陈光荣,吴振斌,等. 两种构建湿地中氮、磷净化率与细菌分布关系的初步研究[J]. 华中师范大学学报:自然科学版,1999,33(4):575-578.
- [7] GRISHCHENKOV V, TOWNSEND R, MCDONALD T, et al. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions [J]. Process Biochem., 2000,35(9):889-896.
- [8] 朱琼芳,叶春,李春华,等. 太湖湖滨带降解有机物兼性厌氧菌群的筛选及其降解效果[J]. 环境科学研究,2011,24(3):1129-1135.
- [9] 杨春霞,王圣瑞,金相灿,等. 轻组有机质对太湖沉积物氮、磷矿化的影响[J]. 环境科学研究,2009,22(9):1001-1007.

(下转第69页)