

垃圾处理场环境下生物气溶胶的种群分布特性

郑 丰 缪 巍 麻继臻 杨 博

中国城市建设研究院有限公司 北京 100120

摘要: 随着对生物气溶胶认识的提高,其产生、来源、扩散及风险研究获得了越来越多的关注。垃圾处理场是人为源生物气溶胶的重要产生源之一。本文以某垃圾处理场作为研究对象,采集了垃圾处理场内部不同功能区域大气中生物气溶胶的样本,并通过生物质谱技术研究了不同区域生物气溶胶的种群组成与分布特性,初步解析了这些生物气溶胶的潜在的来源及影响。该研究拓展了以往针对垃圾处理场生物气溶胶主要以粒径分布、数浓度分布为研究目标的不足,从生物气溶胶的种属构成进行了研究,为垃圾处理场微生物气溶胶的控制与削减提供了科学依据和参考。

关键词: 垃圾处理场;生物气溶胶;微生物;种群结构

引言

生物气溶胶是指悬浮在空气中的细菌、真菌、病毒、尘螨、花粉、孢子和动植物的残骸颗粒。生物气溶胶除了具有一般气溶胶特性之外,还具有传染性、致病性等特点,新冠疫情的爆发让生物气溶胶成为一项热门研究。

城市垃圾处理过程涉及垃圾的转运、填埋、焚烧等多个过程,是人为源生物气溶胶产生的一个重要来源。生物垃圾车的装载、运输过程都会产生大量的生物气溶胶。张俊超等研究表明城市固废处理厂不同功能区生物细菌和真菌大都存在不同程度的生物气溶胶污染^[1]。许鸿飞等研究了垃圾填埋场的生物气溶胶浓度和分布特性,表明封场填埋区和渗滤液处理区可吸入的生物气溶胶所占比例较高^[2]。张婧等利用安德森生物采样器详细研究了垃圾填埋场生物气溶胶的粒径分布情况,表明生物气溶胶的中值粒径介于3.7~5.7 μm之间^[3]。这些研究为了解垃圾处理生物气溶胶的特性提供了一定的研究基础,对于控制垃圾处理过程生物气溶胶的产生以及后续治理提供了依据。然而,大部分研究近局限于生物气溶胶的粒径分布、浓度分布,针对生物气溶胶种属的研究仍比较缺乏。



图1 生物气溶胶采样器与采样地点

Fig. 1 bioaerosol sampler and the three sampling place

本项目选取中山市垃圾综合处理基地调节池、填埋场、炉渣场为研究案例,这些场所都有可能产生大量的生物气溶胶释放,特别是当高致病性的细菌和真菌释放到空气中,随

空气扩散会对垃圾处理场的作业人员以及周边居民产生健康威胁。研究了不同场所的生物气溶胶组成分布特性,并定性研究所排放生物气溶胶的细菌群落种类。对于垃圾处理工艺的改进、封场场地的再利用以及环境健康评估等工作的开展具有重要的指导及决策意义。

1 采样及实验方法

1.1 采样时间与地点

大气生物气溶胶采样时间为2021/11/06 14:00-17:00,采样点位于中心组团垃圾综合处理基地内部。采样当日记录采样时温湿度的变化如表1所示,由表可知,采样时间点的温度均保持在27℃至31℃,相对湿度保持在58%至67%。空气相对湿度湿度为60%-70%时,细菌存活率最高,该环境下适合采集空气中的活菌。

表1 采集期环境温度条件

Table 1 Ambient temperature during sampling

	调节池	填埋场	炉渣场
温度	31℃	29℃	27℃
相对湿度	58%	61%	67%

1.2 采样与细菌培养

实验使用了北京鼎蓝科技有限公司的固体撞击式大流量生物气溶胶采样器(P-100)进行空气采样。为了配合质谱仪以及测序仪器的检测需要,采用了两种采样方法。一种是用于细菌的培养,采样时将配置好的LB固体培养基(常德比克曼生物科技有限公司)放置在抽气装置下方,采样流量设置为1 m³/min,采集时间为1 min,以免采集样品过多而导致培养基过载。另一种是用于测序采样,将甘油均匀涂抹在锡箔纸上进行采样,采样时间设定为30 min。

将采集后的样品培养基放入37℃培养箱中培养48小时,然后分别挑选培养基上形状、大小、颜色不同的菌落进行编号,挑选出来的菌落在LB固体培养基上进行分纯培养,培养完成的细菌如图2所示。然后再3个培养基上挑选形状、大小、颜色不同的单菌落进行编号,并将挑选出来的单菌落在LB固体培养基上进行划线分离,每个菌落划两个平

板。在调节池进行采集的培养基中共分离出15株细菌（编号为A-1、A-2、A-3、A-4、A-5、A-6、A-7、A-8、A-9、A-10、A-11、A-12、A-13、A-14、A-15）；在填埋场进行采集的培养基中共分离出6株细菌（编号为B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、B-6）；在炉渣场进行采集的培养基中共分离出13株细菌（编号为C-1、C-2、C-3、C-4、C-5、C-6、C-7、C-8、C-9、C-10、C-11、C-12、C-13）。将分离出的34株细菌在置于37℃恒温培养箱中培养24h，分离培养后的细菌如图2所示。

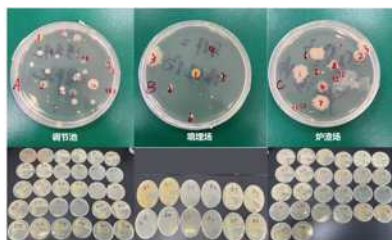


图2 培养基上细菌生长情况
Fig.2 Culture of bacterial growth

1.3 细菌处理与鉴定

经过培养之后的细菌单菌落利用暨南大学质谱实验室的MALDI-TOF MS进行了检测^[4]。细菌基本处理过程如下，向1.5mL离心管中加入300uL蒸馏水，从固体培养基上挑选1~2个单菌落到装有蒸馏水的离心管中，涡旋混匀，向离心管中加入900uL色谱级无水乙醇，涡旋混匀，室温静置5min，12000rpm离心2min，然后用微量移液器吸去其中上清。向离心管中加入50uL新鲜配置的70%甲酸，涡旋混匀，室温静置5min，然后加入等量50uL乙腈，涡旋混匀，12000rpm离心2min。取1uL提取蛋白（上清液）均匀点入对应靶孔，3个重复，室温自然干燥。每个样品覆盖1.25uLCHCA基质，室温自然干燥，上机检测。

MALDI-TOF MS基本参数设置，激光能量设定为36，质量范围2000-20000，延时引出500ns，加速电压22kV，聚焦电压5kV，探测器电压1.6kV。每个样品谱图累积256个激光脉冲信号。使用大肠杆菌标准质控菌株ATCC 8739为标准校准品。所得的细菌谱图与该系统谱库中的标准菌株谱图进行匹配，根据匹配的分值即可确认鉴定的结果，分值为10-9.2分，即匹配结果高度可信；分值为9.2-8分，匹配结果可信；分值为8-6分，匹配结果可作为参考；分值为6分以下，匹配错误或无结果。

2 结果与讨论

2.1 MALDI-TOF MS鉴定结果的影响

将经24h分离培养后的34株细菌采用提蛋白法进行鉴定，34株细菌的鉴定结果如表二所示。其中菌株A-11经过48h培育后仍未能生长繁殖，因此在这里舍弃不做数据统计。从表二可以清晰地看出，调节池和炉渣场采样的培养皿培养出来的细菌种数要明显高于填埋场，这与当时的采样条件相吻合。调节池的采样口位于调节池取样口，调节池内部

的气流通过采样口排入大气中，因此池内的生物气溶胶产生浓度较高。而滤渣场在采样过程中，有铲车挖运炉渣等操作，也容易造成生物气溶胶的产生。而填埋场表面覆盖有厚厚的防水膜，填埋场内部的生物气溶胶的泄漏量较小。从三个采样点测得的细菌种属组成来看，藤黄微球菌和溶血葡萄球菌是三个采样点都测得的两种细菌，藤黄微球菌是一种广泛分布于空气、土壤、水以及动植物体表的细菌类别，溶血葡萄球菌的来源并不明确，这两种可能是环境空气中的本底细菌。在调节池测得的细菌主要为藤黄微球菌、溶血葡萄球菌、松鼠葡萄球菌以及几种芽孢杆菌，以球菌为主，杆菌为辅。炉渣场也有为藤黄微球菌、溶血葡萄球菌、松鼠葡萄球菌，但更多的是芽孢杆菌，包括地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、坚固芽孢杆菌、解糖类芽孢杆菌、吃琼脂类芽孢杆菌。而填埋场的除了藤黄微球菌、溶血葡萄球菌外，其余四种菌均没有在另外两处场所测得。这一结果反映了垃圾填埋场内部不同工艺不仅对生物气溶胶产生的量具有显著的影响，岳冰等人的研究也证明了类似的结论^[5]。

表2 MALDI-TOF MS鉴定34株细菌结果

Table 2 Maldi-TOF MS identified 34 strains of bacteria

地点	编号	结果	可信度
调节池	A-1	越南芽孢杆菌	高度可信
	A-2	松鼠葡萄球菌	高度可信
	A-3	溶血葡萄球菌	可信
	A-4	溶血葡萄球菌	可信
	A-5	韩国芽孢杆菌	高度可信
	A-6	金黄微杆菌	可信
	A-7	藤黄微球菌	高度可信
	A-8	伯克霍尔德菌	参考
	A-9	威海鲜芽孢杆菌	可信
	A-10	巨大芽孢杆菌	高度可信
	A-11	无结果	\
	A-12	松鼠葡萄球菌	高度可信
	A-13	松鼠葡萄球菌	高度可信
	A-14	枯草芽孢杆菌	参考
	A-15	藤黄微球菌	高度可信
填埋场	B-1	印度芽孢杆菌	高度可信
	B-2	藤黄微球菌	可信
	B-3	溶血葡萄球菌	参考
	B-4	拟平滑假丝酵母	可信
	B-5	马红球菌	高度可信
	B-6	烟草谷氨酸杆菌	可信
炉渣场	C-1	地衣芽孢杆菌	可信
	C-2	巨大芽孢杆菌	高度可信
	C-3	蜡样芽孢杆菌	高度可信
	C-4	坚固芽孢杆菌	可信
	C-5	藤黄微球菌	可信
	C-6	菠萝泛菌	高度可信

续表:

地点	编号	结果	可信度
炉渣场	C-7	溶血葡萄球菌	可信
	C-8	解糖类芽孢杆菌	可信
	C-9	圆红球菌	参考
	C-10	松鼠葡萄球菌	高度可信
	C-11	解糖类芽孢杆菌	可信
	C-12	坚固芽孢杆菌	高度可信
	C-13	吃琼脂类芽孢杆菌	参考

2.2 环境影响分析

细菌以气溶胶形式漂浮在空气中, 如果有致病菌存在, 极易被吸入形成细菌感染, 特别是在污染场所产生的生物气溶胶威胁往往更大^[6]。对整个垃圾厂区采集到的33中生物气溶胶进行了属分类, 分布结果如图3所示。可以看出, 整体上芽孢杆菌属在垃圾处理场内部所占的类别最多。芽孢杆菌属广泛分布于各种自然环境, 如土壤和水中。尽管大部分芽孢杆菌不可致病, 但蜡状芽孢杆菌可引起食物中毒, 仍值得关注。葡萄球菌属也是空气中常见的属类, 多数为非致病菌, 少数可导致疾病。藤黄微球菌和溶血葡萄球菌均广泛分布于三个采样点, 这两种均为条件致病菌, 例如藤黄微球菌在某些条件下可引起伤口等局部组织感染, 也能引起如心内膜炎等疾病的严重感染。溶血葡萄球菌近年来在临床上感染案例也非常多见。微球菌属、伯克霍尔德菌也都是广泛存在于自然界的细菌属种, 无明显的污染来源。红球菌属中有些种是人和动物的致病菌, 垃圾填埋场中测得一种马红球菌, 就是动物常见的致病菌。近年来人体感染马红球菌的报道也逐渐增多。马红球菌具有持续性破坏肺泡巨噬细胞的能力, 还能引起人体神经系统、肝脏等部位感染。其他属类的菌多数为非致病菌, 可能来自于树林、土壤等来源。总体上, 垃圾处理场中采集到的细菌大多数为非致病菌, 不会对人体造成影响, 但仍有部分菌类具有致病性或者条件致病, 因此指示在垃圾处理作业过程中仍需要做好防护工作。

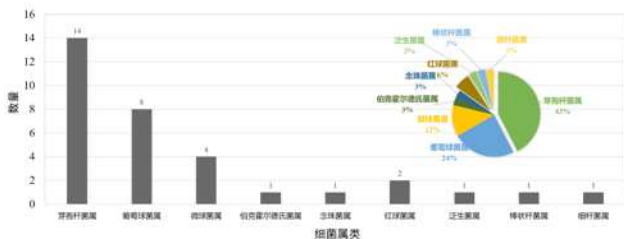


图3 垃圾处理场环境中空气中的细菌分布

Fig.3 Bacterial distribution in the air in the green garbage disposal environment

3 结论

利用MALDI-TOF MS技术手段对垃圾处理场环境空气中生物气溶胶的培养分纯细菌进行了属、种鉴定。研究结果表明, 垃圾处理场环境空气中细菌的整体分布为芽孢杆菌占比最高, 占比达到43%, 主要来自于炉渣场的贡献。葡萄球菌属比例次之, 占比达到24%, 主要来自于调节池。调节池、填埋场、炉渣场三处的细菌数量和种类存在着较大的差别, 这可能与不同采样点处的工艺特点有关。分析表明, 大部分测得的细菌属于自然界中常见的细菌种类, 为非致病菌, 这些菌在其他非垃圾处理环境中也同样存在。但也存在部分致病菌和条件致病菌。研究结果指示在垃圾处理过程中对于神农谷物气溶胶的防护仍值得重视。

参考文献:

[1]张俊超,刘建伟,马文林,等.城市固体废弃物综合处理厂微生物气溶胶污染特性[J].环境工程学报,2012,6(08):2825-2829.

[2]许鸿飞,刘婷,李露,等.封场后垃圾填埋场的生物气溶胶浓度及粒径分布[J].环境科学与技术,2016,39(12):124-127.

[3]张婧,夏立江,杜文利,等.垃圾填埋场微生物气溶胶粒径分布研究[J].环境工程学报,2009,3(09):1620-1624.

[4]喻佳俊,刘平,曾真,等.直线式基质辅助激光解吸电离质谱仪的研制与性能表征[J].分析化学,2018,46(4):463-470.Jia-Jun Y. U., Ping LIU, Zhen ZENG, 等. Development and Characterization of A Linear Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometer[J].Chinese J Anal Chem,2018,46(4):463-470.(in Chinese)

[5]岳冰,夏立江,杜文利,等.北京某垃圾填埋场空气微生物污染状况[J].中国环境科学,2006,(S1):102-105.

[6]郁庆福,郭奕芳,卢玲,等.污水微生物气溶胶吸入感染危险性探讨[J].中国卫生检验杂志,1992,(03):138-141.

基金项目: 中国建设科技集团青年科技基金 (Z2020Q12)。

第一作者: 郑丰 (1992—), 男, 工程师, 主要从事环境卫生规划和咨询设计。

通信作者: 缪巍 (1987—), 男, 高级工程师, 主要从事城市生活垃圾处理处置。