ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第36卷 第9期

Vol.36 No.9

2015

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第36卷 第9期
2015年9月15日

目 次

农村污水膜生物反应器系统中微生物群落解析

孔晓[1,2], 崔丙健[1,3], 金德才[1*], 吴尚华[1], 杨波[2], 邓晔[1*], 庄国强[1], 庄绪亮[1]

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 中国科学院环境生物技术重点实验室, 北京 100085; 2. 青岛科技大学环境与安全工程学院, 青岛 266042; 3. 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049)

摘要: 农村污水的随意排放和未加限制的灌溉回用可能会导致水源地环境污染加剧, 并且其中潜在的病原微生物对周边淡水资源安全和农村居民的身心健康造成潜在的威胁. 为了解农村污水的微生物群落组成, 为后续污水灌溉的病原微生物风险评价提供理论依据, 采用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)和16S rDNA 基因克隆文库技术研究农村污水膜生物反应器(MBR)系统中的微生物群落多样性, 并结合实时荧光定量 PCR 方法监测处理前后典型病原菌——弓形菌(*Arcobacter* spp.)以及总细菌数量的变化. 从未处理的农村污水中获取的 73 个阳性克隆测序结果表明, 其主要细菌类群为变形菌门(91.8%)、厚壁菌门(2.70%)、拟杆菌门(1.40%), 以及部分不可培养细菌(4.10%). 其中弓形菌属是 ε-变形菌门的优势菌, 也是农村污水中的优势菌株, 占克隆总数的 68.5%. T-RFLP 的结果表明, 不同处理工艺阶段的主要细菌类群及丰度明显不同, 调节池的物种丰度(S)、Shannon-Wiener(H)和物种均匀度(E)最高, 分别为 43.0、3.56 和 0.95. 定量 PCR 结果显示未处理的农村污水中弓形菌数量高达 $(1.09 \pm 0.0640) \times 10^{11}$ copies·L^{-1}, 该结果与克隆文库结果均表明弓形菌在污水中确实占较高比例. 与未处理的农村污水相比, 处理后的出水中所监测的弓形菌及细菌总拷贝数分别减少了 2~3 个数量级, 说明 MBR 处理系统在一定程度上能够去除微生物. 处理后的再生水理化指标及指示菌卫生指标均符合农田灌溉用水标准, 但其中残留病原微生物引发的健康风险仍需进一步评价.

关键词: 农村污水; 病原菌; T-RFLP; 16S rDNA 基因克隆文库; 荧光定量 PCR

中图分类号: X172; X703.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2015)09-3329-10 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.2015.09.027

Analysis of Microbial Community in the Membrane Bio-Reactor (MBR) Rural Sewage Treatment System

KONG Xiao[1,2], CUI Bing-jian[1,3], JIN De-cai[1*], WU Shang-hua[1], YANG Bo[2], DENG Ye[1*], ZHUANG Guo-qiang[1], ZHUANG Xu-liang[1]

(1. Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. College of Environment and Safety Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China; 3. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Uncontrolled release and arbitrary irrigation reuse of rural wastewater may lead to water pollution, and the microbial pathogens could threaten the safety of freshwater resources and public health. To understand the microbial community structure of rural wastewater and provide the theory for microbial risk assessment of wastewater irrigation, microbial community diversities in the Membrane Bio-Reactor (MBR) process for rural wastewater treatment was studied by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and 16S rDNA gene clone library. Meanwhile, changes of *Arcobacter* spp. and total bacteria before and after treatment were detected through real-time quantitative PCR. The clone library results showed that there were 73 positive clones included Proteobacteria (91.80%), Firmicutes (2.70%), Bacteroidetes (1.40%), and uncultured bacteria (4.10%) in the untreated wastewater. The typical pathogenic genus *Arcobacter* belonging to ε-Proteobacteria was the dominant component of the library, accounting for 68.5% of all clones. The main groups and their abundance in different treatments were significantly distinct. The highest values of species abundance (S), Shannon-Wiener (H) and Evenness (E) were observed in the adjusting tank, which were 43.0, 3.56 and 0.95, respectively. The real-time quantitative PCR results showed that the copy number of *Arcobacter* spp. was $(1.09 \pm 0.0640) \times 10^{11}$ copies·L^{-1} in the untreated sewage, which was consistent with the result of 16S rDNA gene clone library. Compared to untreated wastewater, bacterial copy number in the treated effluent decreased 100 to 1 000 times, respectively, suggesting that MBR treatment system could remove the microbial quantity in such scale. In the recycled water, the physicochemical parameters and indicator bacteria met the water quality standard of farmland irrigation. However, further research is needed to estimate the potential health risks caused by residual pathogenic microorganisms in future.

Key words: rural sewage; pathogenic bacteria; T-RFLP; 16S rDNA gene clone library; real-time quantitative PCR

收稿日期: 2015-01-09; **修订日期**: 2015-04-15

基金项目: 中国科学院重点部署项目(KZZD-EW-09); 全国科学院联盟建设专项项目(2012-1)

作者简介: 孔晓(1988~), 女, 硕士, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: kongxiaozaikeda@163.com

* 通讯联系人, E-mail: dcjin@rcees.ac.cn; yedeng@rcees.ac.cn

我国水资源的空间分布极不均匀,水资源供需矛盾突出,经济社会的发展对用水需求已大大超过了现有水资源的承载能力. 我国总用水量中,农业灌溉用水占 70%,水资源危机已成为农业发展的重要制约因素[1]. 另一方面,随着经济的发展,人口的增加和用水量的增大,导致污水排放量急剧上升,特别是未经过处理的废污水大量排放致使水污染加剧[2,3]. 污水资源化利用是减轻污水排放二次污染和缓解农业用水紧张的发展趋势[4]. 我国农村人口众多,农村污水排放量大,污染程度低且能够最大限度实现回用. 但由于缺乏有效的处理设施,导致任意排放. 一方面,造成周边水体的富营养化,严重污染了农村的生态环境; 另一方面,农村污水直接用于农田灌溉,会造成作物品质和农田土壤性能降低,也成为疾病传染扩散的源头,容易导致水源性人畜共患疾病的发生与流行[5],直接威胁广大农民群众的身体健康并阻碍农村的经济发展. 鉴于水资源紧缺现象的不断加剧,为了确保农业生产,再生水应用已成为国内外缓解农业用水压力的重要措施之一[6]. 但是由于经济条件和处理技术原因,再生水中的污染物质去除并不彻底,主要包括氮磷元素和病原体等. 从再生水作为自然水体替代水源的角度出发,了解农村污水处理工艺过程中优势菌群和致病菌的分布情况,进而为改进处理技术和预防疾病的发生提供理论依据和保障措施.

目前农村污水的研究主要集中于污水处理技术的优化及污灌对土壤理化性质与作物品质的评价,针对整体工艺流程中微生物的多样性及相关病原菌的研究报道甚少. 基于 16S rDNA 基因的非培养技术为揭示自然环境中微生物种类和遗传多样性开辟了一条全新的途径,摆脱了传统的分离培养方法不能完整反映微生态系统全部信息的束缚[7,8]. 因此本实验采用末端限制性片段长度多态(T-RFLP)和 16S rDNA 基因文库分析技术,对 MBR 工艺处理农村污水各阶段的细菌群落多样性进行研究,并通过荧光定量 PCR 方法对其中的弓形菌进行定量分析[9,10],评价农村污水处理系统的有效性以及再生水资源化利用的可行性,以期为再生水灌溉的合理实施提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

本研究中的污水处理厂位于北京市怀柔区桥梓镇北宅村,采用膜-生物反应器处理工艺(MBR,图1),主要收纳处理当地居民的生活污水,日处理量 600 m^3. 整个处理工艺流程由原水集水井、调节池、好氧池、膜生物反应池和出水组成. 水样按照《生活饮用水标准检验方法水样的采集与保存》(GB/T 5750.2-2006)和《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918-2002)每个处理阶段采集 1 ~5 L. 采样容器材质为聚乙烯和硼硅玻璃,测定水质一般理化指标的采集容器经过 10% 硝酸或盐酸浸泡,取出用自来水反复冲洗,并用蒸馏水洗净放置烘箱烘干; 微生物指标采样容器用自来水冲洗数次,10% 盐酸溶液浸泡过夜,依次用自来水和蒸馏水冲洗,之后容器经过高压蒸汽灭菌备用. 取样方式为深层水采样,利用上海雷磁 DZB-718 便携式多参数水质分析仪实时测定部分水质参数: 温度、pH、溶解氧(DO)、电导率等,同时足量采集水样保存于 4℃,24 h 内送至谱尼公司(北京)测定其他水质参数和一些卫生指标(总大肠菌群和粪大肠菌群),检测方法参照国家标准,检测结果如表 1 所示.

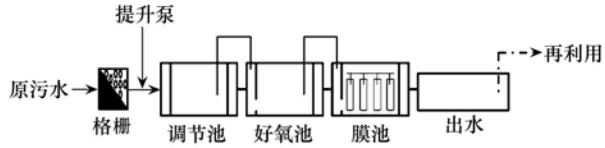


图1 膜-生物反应器处理工艺流程示意

Fig. 1 Process flow diagram of MBR

采集的水样保存于 4℃ 冰盒,实验室于 8 h 内预处理. 原污水与再生水分别取 100 mL 和 2 L 用真空抽滤装置以 0.22 μm 微孔滤膜(Millipore, 美国)过滤,其他水样各取 5 mL 低速离心收集沉淀,将滤膜与收集的沉淀立即放入 -20℃ 冰箱保存用于微生物分析.

1.2 实验仪器

上海雷磁 DZB-718 便携式多参数水质分析仪; 湖南湘仪 H165-W 高速离心机; 北京东胜创新生物科技有限公司生产的东胜龙黑金刚 EDC-810PCR 仪; 美国安培公司生产的快速 Fastprep-24 核酸提取仪; 英国 Syngene G: BOX 凝胶成像系统; 美国 Thermo Fisher 公司 ND-2000 核酸蛋白测定仪; 北京百晶生物技术有限公司 BG-Power 600i 电泳仪; 美国 Agilent 公司生产的 Strata gene Mx3005P 实时荧光定量 PCR 仪. 江苏太仓市科教器材厂 HZ-9211KB 恒温振荡器; 上海一恒科学仪器有限公司 LRH-70 生化培养箱; 郑州长城科工贸有限公司 SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵; 瑞士梅特勒-托利多国际股份有限公司电子天平 AL104; 海门市其林贝

尔仪器制造有限公司 LX-200 迷你离心机; 海门市其林贝尔仪器制造有限公司 GL-88B 漩涡混合器; 宁波新芝生物科技股份有限公司 SB5200DT 超声波清洗机.

表 1 MBR 处理工艺流程水质特征1)

Table 1 Water quality characteristics in MBR treatment process

指标	进水(集水井)	调节池	好氧池	膜生物反应池	出水
pH	6.85	6.82	6.93	6.97	7.09
电导率/$\mu S \cdot cm^{-1}$	714	576	473	525	494
温度	15.3	13.8	13.2	13.4	9.60
SS/$mg \cdot L^{-1}$	139.0	4 656	4 930	4 160	58.00
DO/$mg \cdot L^{-1}$	1.83	2.02	2.63	1.92	2.02
COD/$mg \cdot L^{-1}$	117.60	9 360.0	10 530	7176.0	39.000
TN/$mg \cdot L^{-1}$	36.40	105.8	103.9	91.70	28.80
TP/$mg \cdot L^{-1}$	0.320	1.25	1.19	2.01	0.250
硝态氮/$mg \cdot L^{-1}$	347.0	404.0	394.2	348.1	365.1
亚硝态氮/$mg \cdot L^{-1}$	未检出*	未检出	未检出	未检出	未检出
铵态氮/$mg \cdot L^{-1}$	11.1	1.05	0.722	0.636	0.274
铜/$mg \cdot L^{-1}$	未检出	0.569	0.625	0.526	未检出
锌/$mg \cdot L^{-1}$	0.049 9	2.15	2.25	2.22	0.029 0
铅/$mg \cdot L^{-1}$	0.598 $\mu g \cdot L^{-1}$	0.140	0.155	0.155	8.20 $\mu g \cdot L^{-1}$
镉/$\mu g \cdot L^{-1}$	0.1990	19.09	22.85	23.41	0.089 00
氯离子/$mg \cdot L^{-1}$	52.48	52.48	52.48	54.98	54.98
总大肠菌群/$CFU \cdot mL^{-1}$	$(6.05 \pm 1.75) \times 10^5$	$(3.05 \pm 0.50) \times 10^3$	$(2.35 \pm 0.150) \times 10^3$	$(5.70 \pm 0.350) \times 10^3$	—
粪大肠菌群/$CFU \cdot L^{-1}$	4 600	290	11 000	11 000	≤3
细菌总数/$CFU \cdot mL^{-1}$	$(1.24 \pm 0.045 0) \times 10^6$	$(3.34 \pm 1.00) \times 10^6$	$(1.65 \pm 0.250) \times 10^5$	$(2.60 \pm 0.400) \times 10^5$	$(2.80 \pm 0.200) \times 10^3$
蛔虫卵/个$\cdot L^{-1}$	34	52	110	60	—

1) 亚硝态氮检测限 $< 0.006\ mg \cdot L^{-1}$; 铜检测限 $< 0.001 4\ mg \cdot L^{-1}$

1.3 基因组 DNA 提取

滤膜样品先用无菌剪刀剪碎,然后和其他样品一同用 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒(MP Biomedicals, 美国)提取总基因组 DNA,具体步骤参照试剂盒说明书. 取 5 μL 基因组 DNA 溶液用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取效果, 采用 NanoDrop2000(Thermo Scientific, 美国)测定浓度, 然后保存于 −20℃ 冰箱备用.

1.4 16S rDNA 基因克隆文库构建

1.4.1 基因组 DNA 的 PCR 扩增

以基因组 DNA 为模板,利用细菌 16S rDNA 基因的通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增. 50 μL PCR 反应体系: 5 μL 10 × PCR buffer (含 20 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$), 4 μL dNTP(10 $mmol \cdot L^{-1}$), 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 1 μL DNA 模板, 灭菌的 ddH_2O 补至 50 μL.

PCR 反应条件: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 45 s, 循环 35 次; 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保持. PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

1.4.2 16S rDNA 基因克隆、转化和文库构建

将得到的 PCR 扩增产物用 E. Z. N. A™ Gel Extraction Kit(OMEGA Biotek, 美国) 进行纯化, 回收后的 DNA 片段与 pGEM-T Easy Vector(Promega, 美国)在 4℃ 条件下连接 16 h. 连接产物导入感受态大肠杆菌 DH5α, 加入液体 LB 培养基于 37℃ 200 $r \cdot min^{-1}$ 培养 3 h, 取 100 μL 涂布于 LB(含 Amp/IPTG/X-Gal)平板上, 37℃ 条件下培养 18 h 后进行蓝白斑筛选. 用无菌牙签随机挑取白色单菌落进行转板培养, 以载体引物 SP6/T7 进行 PCR 扩增. PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 筛选阳性克隆子, 构建 16S rDNA 基因克隆文库. 原污水中细菌数量较多, 随机挑取 118 个阳性克隆子进行 PCR, PCR 产物用 DNA 限制性内切酶 *HhaI*(Promega, 美国)按照说明书条件酶切分型, 酶切产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 电压 60 V, 时间 2 h. 电泳结束后 EB 染色, 再用蒸馏水漂洗. 用 Stratagene G:BOX 凝胶成像系统检测并保存结果. 图像用 Quantity

ONE 4.3.0 软件进行分析. 确定 ARDRA 类型数目,每个 ARDRA 分型结果作为一个 OTU,从每个 OTU 中选取 1 个克隆送北京睿博兴科生物技术有限公司进行测序.

1.4.3 16S rDNA 基因克隆文库多样性分析

测序结果在 Bellerophon 网站分析可能存在的嵌合体并去除,在核酸相似性≥97% 水平上划分操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU). 基因文库的多样性覆盖率(coverage)通过公式 $c = 1 - n_1/N$[11] 计算,式中,N 代表基因文库的克隆数,n_1 为仅有一个克隆的 OTU 数目. 百分率越高表明文库多样性覆盖率越高. 对基因文库的序列做多样性指数分析,Shannon-Wiener 指数(H)和 Simpson 指数(D)计算公式为[12, 13]:

$$H = -\sum P_i \ln P_i$$

$$D = 1 - \sum P_i^2$$

式中,P_i 代表每个物种样本数量占总样本数量的比例.

$$均匀度\ E = H/H_{max},\ H_{max} = \ln S$$

式中,S 为丰富度,表示样本中的物种数量,等于单个文库中 OTU 个数.

1.4.4 构建系统发育树

通过将测序成功的阳性克隆序列与 NCBI 数据库进行 Blast 同源性检索后,下载同源性最高的序列和部分已知种属的同源性最高的序列作为参考,使用 Mega 5.0 软件包,以邻接法(Neighbor Joining Analysis)进行系统发育树的构建. 发育树的稳定性 Bootstraps 来分析评估,树的节点通过非参数支持率计算(1 000次重复运算).

1.5 T-RFLP 分析

利用具有荧光标记的细菌通用引物 27F/926R(引物 27F 的 5′端用 FAM 标记)扩增水样基因组 DNA. PCR 反应条件:95℃预变性 5 min; 95℃变性 45 s,50℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,30 个循环; 最后 72℃延伸 10 min,4℃保持. 两次 PCR 产物进行混合,以减少扩增带来的误差. PCR 产物用 E. Z. N. A™ Gel Extraction Kit 试剂盒进行纯化.

纯化后的 PCR 产物用 *RsaI*(Takara, Japan)进行酶切. 10 μL 酶切体系:RE 10 × buffer 1 μL, Acetylated BSA (10 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$) 0.1 μL, DNA ~ 100 ng,混匀后加入 *RsaI*(10 $U \cdot \mu L^{-1}$) 0.25 μL,然后加 ddH_2O 补齐至 10 μL. 酶切条件:37℃酶切 3 h.

T-RFLP 图谱用 GeneMarker(Version 1.71)软件进行分析,选择的内标为 GS1200liz. 对于细菌,由于相对数量过小的限制性末端片段不会对群落的特性产生明显的影响[9,10, 14],故在分析中舍去了相对数量<1% 的 T-RFs. 根据 T-RFLP 图谱计算微生物群落结构多样性 Shannon 香农指数(H)、Simpson 辛普森指数(D)、物种均度(E)及丰度(S). T-RFLP 图谱上的峰面积大小和数量反映了微生物群落结构和多样性,每个峰可以作为一个 OTU 来进行分析.

1.6 实时荧光定量 PCR

利用病原菌特异性引物对水样基因组 DNA 进行常规 PCR 扩增,纯化回收 PCR 产物. 产物与 pGEM-T Easy 载体连接后导入感受态细胞 DH5α,涂板筛选. 经 PCR 鉴定为阳性的菌落转入 LB 液体培养基扩大培养,用 E. Z. N. A.® Plasmid Mini Kit I Spin Kit (Omega Bio-tek)试剂盒提取质粒. 利用 NanoDrop2000(Thermo Scientific, 美国) 测定质粒浓度,将已知拷贝数的质粒 10 倍梯度稀释作为标准模板,利用 GoTaq® qPCR Master Mix with SYBR Green® dye(Promega, 美国)对上述菌的目的基因进行定量检测,所用引物如表 2 所示.

反应体系:12.5 μL Go Taq qPCR Master Mix (Promega, 美国),上下游引物各 0.5 μL,模板 1 μL,加无菌 ddH_2O 补齐至 25 μL,反应于八联排管(Axygen, 美国)中进行. 荧光定量 PCR 程序为:95℃ 2 min; 94℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s,40 个循环; 72℃ 10 min. 熔解曲线条件:95℃ 1 min,55℃ 30 s,95℃ 30 s,所有反应均设置 3 个重复.

表 2 实验所用引物及基因片段大小

Table 2 Primers used in the experiment and amplicon size

菌种	目标基因	引物序列	片段大小/bp	文献
细菌	16S rDNA	27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1492R: TACGGCTACCTTGTTACG ACTT	1 500	[15]
		27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 926R: CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	900	[16]
弓形菌(*Arcobacter* spp.)	23S rDNA	ARCO1: GTCGTGCCAAGAAAAGCCA ARCO2: TTCGCTTGCGCTGACAT	331	[17]
细菌总数	16S rDNA	tot-F:GCAGGCCTAACACATGCAAGTC tot-R:CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	315	[18]

2　结果与讨论

2.1　污水处理工艺水质指标及处理效果分析

MBR 处理工艺各阶段水质参数如表 1 所示. 进水与出水相比,COD、总氮、氨氮及总磷去除率分别达到 91.7%、20.9%、97.5% 和 21.9%. 各处理阶段中亚硝态氮均未检出,硝态氮、溶解氧、电导率有些波动但相对稳定. 出水中的指示菌总大肠菌群和蛔虫卵均未检出,粪大肠菌群≤3 个·L^{-1}. 出水各项指标均达到《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918-2002)一级标准和《农田灌溉水质标准》(GB 5084-2005).

2.2　16S rDNA 基因克隆文库建立

实验共挑取 118 个阳性克隆,酶切分型后分为 14 个 OTU 用于测序, 其中 10 个 OTU 测序成功,即有 73 个阳性克隆测序成功.

16S rDNA 基因克隆文库细菌 Shannon-Wiener 多样性指数为 1.85,物种均匀度 0.80,表明未处理的农村污水中某类优势菌种存在比例较高. 本研究中 $N=73$, $n_1=1$,克隆文库的覆盖度为 0.986,表明克隆文库中包含的微生物种类占样品中全部微生物的种类比例已相当高,能较全面反映原污水中细菌群落多样性.

10 个 OTU 序列的 BLAST 比对结果见表 3,下载同源性最高的序列作为参考. OTU 序列与 GenBank 数据库中已知细菌的 16S rDNA 基因序列相似性最高为 99%,最低为 93%; 其中有 8 个 OTU (80%)相似性高于 97%,2 个 OTU(20%)相似性低于 94%. 在序列同源性研究中,一般认为细菌 16S rDNA 基因序列同源性低于 97% 即属于不同的种.

表 3　GenBank 中与克隆子序列最相似菌株

Table 3　Similar strains with the subsequence of cloning in GenBank

编号(登录号)	最相似菌株 (登录号)	相似度/%	所属类群
OTU1(KM668166)	*Arcobacter cryaerophilus*(U25805)	99	ε-Proteobacteria
OTU2(KM668167)	*Arcobacter suis*(FJ573216)	99	ε-Proteobacteria
OTU3(KM668168)	*Macromonas bipunctata*(NR_040903)	99	β-Proteobacteria
OTU4(KM668169)	*Bacteroides fragilis*(AB542764)	99	Bacteroides
OTU5(KM668170)	*Arcobacter cryaerophilus*(NR_025905)	99	ε-Proteobacteria
OTU6(KM668172)	*Sulfurospirillum deleyianum* (NR_074378)	98	ε-Proteobacteria
OTU7(KM668174)	*Sedimentibacter* sp. (DQ168650)	99	Firmicutes
OTU8(KM668175)	*Comamonas* sp. (AB277848)	93	β-Proteobacteria
OTU9(KM668177)	Uncultured bacterium (HM445940)	93	Uncultured bacterium
OTU10(KM668179)	*Arcobacter skirrowii*(DQ464344)	99	ε-Proteobacteria

将农村污水中细菌 16S rDNA 基因文库菌株进行系统分类,可分为 3 门、4 纲、4 目、4 科、6 属. 在 73 个克隆中,有 67 个克隆子属于变形菌门、2 个属于厚壁菌门、1 个属于拟杆菌门,还有 3 个为未培养细菌. 变形菌门占总数的 91.8%,是克隆文库中的第一大类群. 其中 ε-变形菌纲为 71.2%,β-变形菌纲为 20.5%. 该样品中优势菌属是 ε-变形菌纲的弓形菌属,占克隆总数的 68.5%,与吴春笃等[19]、王峰等[20]的研究结果相符. 拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)等类别的细菌一般比例也在 5% ~ 20%[21~24]. 本文的研究对象农村污水中含有大量的厕所粪便黑水,弓形菌作为导致肠道疾病的病原菌生长适应性强,目前已知的 3 种致病性弓形菌分别分离自粪便及血液中. 由此推断农村污水的来源及成分营造的生境利于共性的生长繁殖导致数量较高. 除了变形菌门,厚壁菌门占 2.70%,拟杆菌门占 1.40%,未培养细菌为 4.10%. 表明所研究的农村污水内的细菌有极丰富的生理多样性,并潜藏着特有的微生物资源,有待于进一步深入研究.

由 OTU 代表克隆序列和 BLAST 中相似菌株的 16S rDNA 基因序列绘制的系统进化树见图 2.

由图 2 可知, 10 个 OTU 分别与属于 Proteobacterium 类群、Firmicutes 类群、Bacteroidetes 类群的已知细菌聚类在一起. 测得的未知类群 OTU9 聚类在拟杆菌门,与 *Bacteroides fragilis* 相距较近.

2.3　T-RFLP 结果分析

MBR 处理工艺各阶段细菌群落的 T-RFLP 图谱如图 3 所示(取 DNA 片段长度处于 50 ~ 1 000 bp,并且荧光强度 >50RFU 的峰). 通过对不同处理阶段的图谱比较分析,可以看出调节池、好氧池和膜生物反应池 3 个系统中的 T-RFs 片段数量较多,并且群落结构在一定程度上保持相对稳定,反映该处理系统本身具有一定的缓冲能力.

利用目前公认的数据库 MiCA (http://mica.

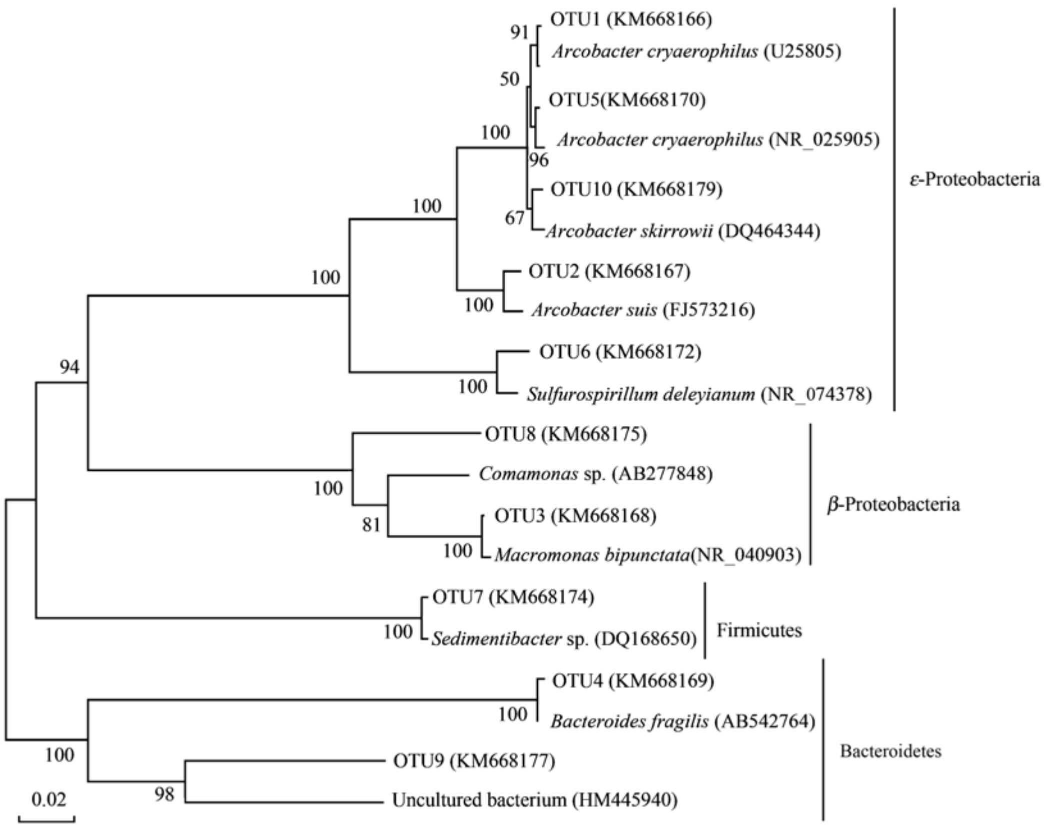


图 2　农村污水微生物系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of microorganisms in rural sewage

ibest. uidaho. edu/)在线比对,得出部分 T-RFs 片段代表的类群及其在 MBR 不同处理过程中的存在情况,如表 4 所示. 结合 T-RFLP 图谱和表 4 可以看出,调节池中微生物种类最多,然后是出水、好氧池、膜池、进水,与 T-RFLP 图谱有一定差别,这是因为部分不同物种片段大小重叠无法确定其类别. 出水中虽然微生物种类较多,但结合 T-RFLP 图谱看,可知其所占比例较小. 对已确定的菌株,T-RF(89、90、98、209、211、585 bp)仅存在于进水中,说明其在后续处理过程中被除去. 在进水中所占比例较高的 T-RF-95bp 鉴定为 *Terriglobus* sp.. T-RF-205 bp 在各阶段均存在且在调节池、好氧池中所占比例较高,经鉴定为 *Clostridium* sp.. 另外一个在调节池、好氧池中占较高比例的 T-RF-55 bp 鉴定为 *Streptococcus* sp.. 膜池中占较高比例的 T-RF-57 bp、T-RF-605 bp 分别为 *Mitsuokella* sp. 和 *Kineococcus* sp.,而 T-RF-358 bp 和 T-RF-765 bp 未能鉴定出物种类型. 出水中占较高比例的 T-RF-605 bp 和 T-RF-765 bp 都未能鉴定出物种类型.

根据 T-RFLP 数据计算得到的多样性指数如图 4 所示. 不同阶段水体细菌的多样性指数不同,其中调节池的 Shannon-Wiener 多样性指数、物种丰度、均匀度最高,分别为 3.56、43.0 和 0.95,表明调节池系统内的细菌种类多样性最高且物种分配最均匀,原因是因为调节池作为整个处理流程的前段工艺,主要作用是调节水量和水质,为微生物生长提供了繁殖条件,能够在污水处理过程中起到良好的调节缓冲作用; 好氧池和膜池在取样期间有轻微的污泥膨胀现象,污泥活性的高低可能对不利用某些类群微生物的生长. 所有指数在调节池阶段之后均随处理流程呈现出递减趋势,出水系统的多样性指数及物种丰度低于其他处理阶段,表明 MBR 处理工艺对农村污水中微生物的去除效果较好.

2.4　病原菌定量结果分析

根据 16S rDNA 基因克隆文库结果,原污水中弓形菌为优势菌属,因此对 MBR 处理系统中的弓形菌属和细菌总数进行荧光定量分析. 弓形菌属和总细菌的扩增产物片段大小分别为 331 bp、315 bp,凝胶图谱如图 5 所示. 定量结果显示,扩增效率接近 100%,相关系数(R^2)都在 99% 以上,符合定量要

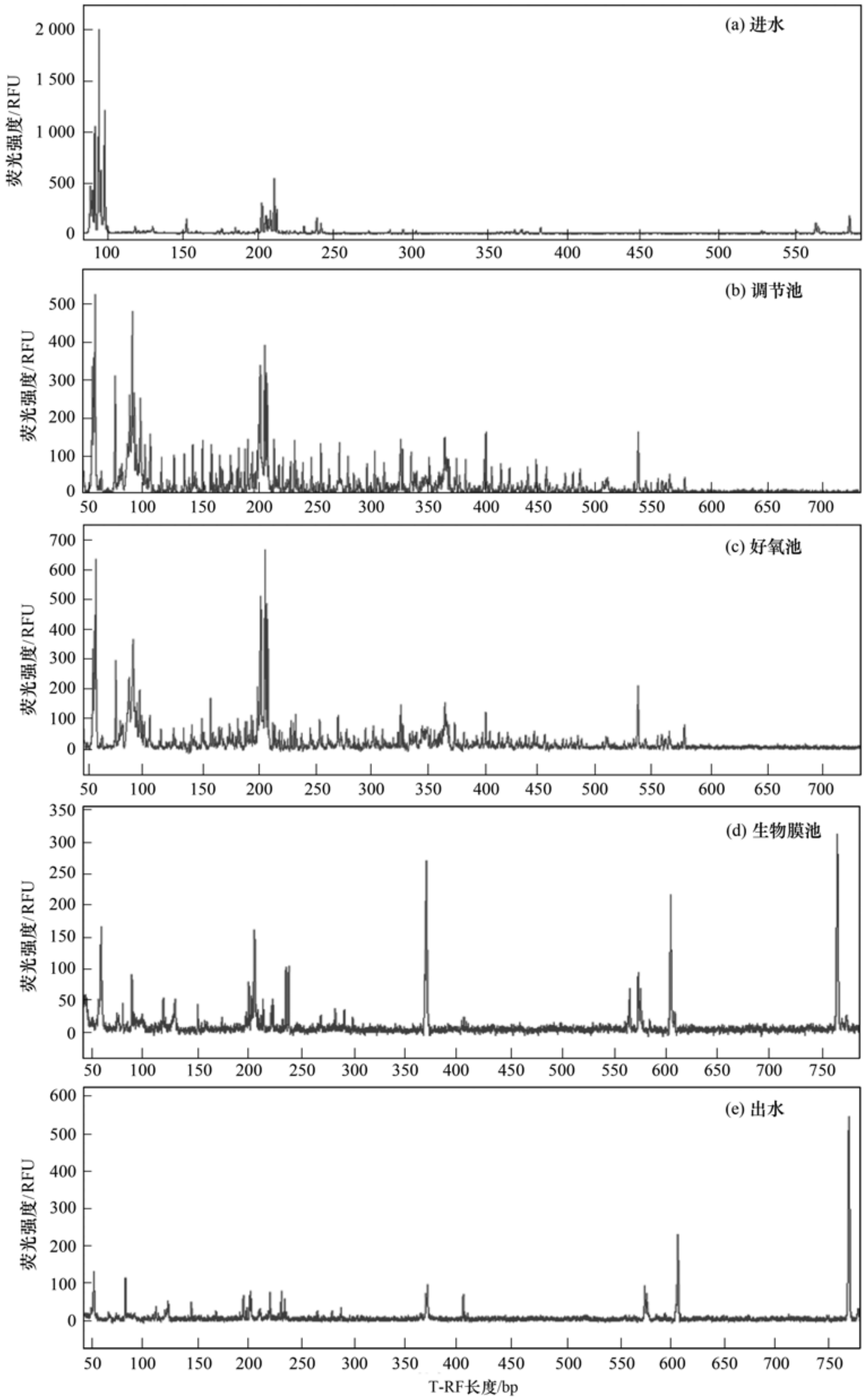


图 3　不同处理阶段农村污水细菌群落 T-RFLP 图谱

Fig. 3　T-RFLP maps in different treatment stages of rural wastewater

求. 根据标准曲线计算 MBR 处理系统进水与出水中细菌的基因拷贝数如表 5 所示.

微生物群落结构对 MBR 处理系统的稳定运行和有效去除理化污染物起着重要作用[25]，但定量结果显示出水中含有大量病原菌，说明 MBR 工艺对弓形菌去除效果不太理想，虽然膜组件可以拦截大部

分细菌、病毒,如果未经消毒处理,出水中仍有大量病原菌残留.

表 4 部分 T-RF 所代表的菌株[1)]

Table 4 Strains represented by T-RFs

T-RF 片段大小/bp	所代表菌株	进水	调节池	好氧池	膜池	出水
55	*Streptococcus* sp.		+	+		+
57	*Mitsuokella* sp.				+	
73	*Lactococcus* sp.		+	+		+
86	*Corynebacterium* sp.		+		+	+
88	*Capnocytophaga* sp.	+	+	+		+
89	*Salinibacter* sp.	+				
90	*Cytophaga* sp.	+				
95	*Terriglobus* sp.	+	+	+		+
98	*Algoriphagus* sp.	+				
104	*Mycoplasma* sp.		+	+		+
141	*Ehrlichia* sp.		+			+
158	*Xanthomonas* sp.		+			+
182	*Streptococcus* sp.		+			+
187	*Porphyromonas* sp.		+			+
190	*Desulfuromonas* sp.		+			+
194	*Planomicrobium* sp.		+			+
200	*Anaerofilum* sp.		+			+
203	*Bacillus* sp.	+			+	
205	*Clostridium* sp.	+	+	+	+	+
207	*Roseburia* sp.		+	+		
209	*Kocuria* sp.	+				
211	*Anaeromyxobacter* sp.	+				
232	*Tannerella* sp.		+	+		+
246	*Desulfobacter* sp.		+			+
327	*Caldicellulosiruptor* sp.		+	+		+
401	*Lysinibacillus* sp.		+	+		+
536	*Desulfotomaculum* sp.		+	+		
585	*Chlamydomonas* sp.	+				
605	*Kineococcus* sp.				+	

1)+表示存在,未标注表示不存在或不确定

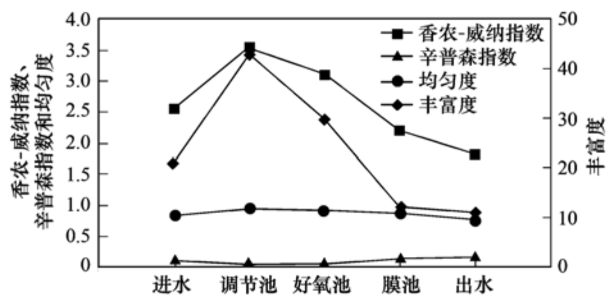
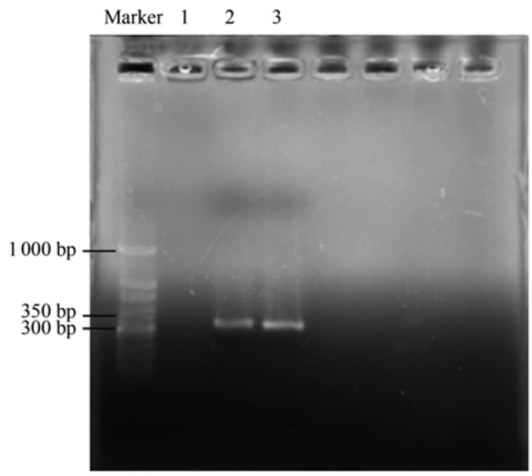


图 4 不同处理阶段污水多样性指数

Fig. 4 Diversity indices in different treatment stages of rural wastewater

弓形菌是近几十年发现的人畜共患致病菌,大小为 0.2~0.9 μm×0.5~3 μm,革兰氏阴性,无芽孢,无荚膜[26]. 弓形菌为变形菌门(Proteobacteria) ε-变形菌纲(ε-Proteobacteria)弯曲杆菌目



1. 空白对照; 2. 弓形菌属; 3. 细菌总数

图 5 病原菌扩增产物凝胶图谱

Fig. 5 Gel maps of pathogen amplification product

表 5 样品中病原菌基因拷贝数/copies·L^{-1}

Table 5 Copy numbers of pathogenic genes in the samples/copies·L^{-1}

细菌	进水	出水
弓形菌(*Arcobacter* spp.)	$(1.09\pm0.0640)\times10^{11}$	$(1.45\pm0.0120)\times10^{8}$
细菌总数	$(5.72\pm1.41)\times10^{11}$	$(3.64\pm0.770)\times10^{9}$

(Campylobacterales)弯曲杆菌科(Campylobacteraceae)的一个新属,其中有 3 个种具有致病性,分别为布氏弓形菌(*A. butzleri*)、嗜低温弓形菌(*A. cryaerophilus*)、斯氏弓形菌(*A. skirrowii*). 16S rDNA 基因克隆文库结果显示,弯曲杆菌科中共有 50 个弓形菌属,其中有 40 个为嗜低温弓形菌,1 个为斯氏弓形菌,为农村污水中第一优势种群. 在过去几十年里,弓形菌在污水、地表水、地下水及畜禽肉类产品中均有发现,腹泻病人的粪便中[27~29]、菌血症病人[28]、肝硬化病人[30]和急性坏疽性阑尾炎病人[31]的血液中等都发现有弓形菌的踪迹. 但目前国内外对弓形菌致病机制和潜在毒性因子鲜有报道,这可能是与弓形菌没有如沙门氏菌和弯曲杆菌列入临床常规检测项目有关[32].

3 结论

(1)通过对污水处理厂不同处理阶段水体微生物群落 T-RFLP 图谱的直观分析可知,农村污水中的微生物群落结构较为复杂,并且在一定程度上群落保持相对稳定. 其中调节池污水中微生物多样性和物种分配均匀度最高.

(2)对污水处理厂进水的克隆文库分析表明本研究农村污水内细菌具有较高的多样性,并潜藏着

特有的微生物资源. 变形菌门(Proteobacteria)是污水处理系统中数量最多、种类最丰富的细菌类群,在相关研究中其比例都在50%以上. 结合定量PCR结果可知,农村污水中存在着大量细菌,致病菌-弓形菌的比例较高. MBR处理系统的所有出水物化指标均接近一级A排放标准,病原指示菌的数量虽然明显减少,但弓形菌的去除效果还不够理想,其数量仍为10^8 copies·L^{-1}. 可见,MBR处理后的污水直接用于灌溉,也可能会对人体健康造成潜在危害. 因此,污水资源化安全利用需要污水处理技术和适宜的灌溉方式有机结合,从而降低再生水灌溉后病原菌所带来的健康风险,改善农村生态环境并保障粮食安全. 未经消毒处理的再生水灌溉后,病原菌在作物及土壤中的迁移转化及残留还需要进一步验证.

参考文献:

[1] 宰松梅, 王朝辉, 庞鸿宾. 污水灌溉的现状与展望[J]. 土壤, 2006, **38**(6): 805-813.

[2] 张建云, 贺瑞敏, 齐晶, 等. 关于中国北方水资源问题的再认识[J]. 水科学进展, 2013, **24**(3): 303-310.

[3] 刘喜峰, 徐红松, 宋文娟. 我国北方地区水资源问题及对策[J]. 河南水利与南水北调, 2007, (5): 21-22.

[4] 焦志华, 黄占斌, 李勇, 等. 再生水灌溉对土壤性能和土壤微生物的影响研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, **29**(2): 319-323.

[5] 邹翔, 刘菊萍, 张小生. 规模化养殖场面源污染问题调查及治理对策研究[J]. 南方农机, 2009, (5): 36, 47.

[6] 周新伟, 沈明星, 陆长婴, 等. 再生水灌溉对白菜产量、品质及土壤化学性状的影响[J]. 江西农业科学, 2014, **42**(1): 130-133.

[7] 徐成斌, 孟雪莲, 马溪平, 等. 16S rDNA克隆文库方法对制药废水处理系统中微生物多样性的研究[J]. 生态环境学报, 2009, **18**(4): 1236-1240.

[8] 董萍, 孙寓姣, 王红旗, 等. 利用T-RFLP技术对温榆河微生物群落结构研究[J]. 中国环境科学, 2011, **31**(4): 631-636.

[9] 史青, 柏耀辉, 李宗逊, 等. 应用T-RFLP技术分析滇池污染水体的细菌群落[J]. 环境科学, 2011, **32**(6): 1786-1792.

[10] 滕齐辉, 曹慧, 崔中利, 等. 太湖地区典型菜地土壤微生物16S rDNA的PCR-RFLP分析[J]. 生物多样性, 2006, **14**(4): 345-351.

[11] Good I J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters [J]. Biometrika, 1953, **40**(3-4): 237-264.

[12] Elshahed M S, Senko J M, Najar F Z, *et al*. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(9): 5609-5621.

[13] 余素林, 吴晓磊, 钱易. 环境微生物群落分析的T-RFLP技术及其优化措施[J]. 应用与环境生物学报, 2006, **12**(6): 861-868.

[14] 王洪媛, 管华诗, 江晓路. 微生物生态学中分子生物学方法及T-RFLP技术研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004, **24**(8): 42-47.

[15] Galkiewicz J P, Kellogg C A. Cross-kingdom amplification using *Bacteria*-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, **74**(24): 7828-7831.

[16] Muyzer G, Teske A, Wirsen C O, *et al*. Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments [J]. Archives of Microbiology, 1995, **164**(3): 165-172.

[17] Kingombe C I B, Huys G, Tonolla M, *et al*. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(12): 5293-5302.

[18] Castillo M, Martín-Orúe S M, Manzanilla E G, *et al*. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR [J]. Veterinary Microbiology, 2006, **114**(1-2): 165-170.

[19] 吴春笃, 许小红, 宁德刚, 等. 城市污水细菌多样性及其生物安全性研究[J]. 中国安全科学学报, 2008, **18**(1): 119-122.

[20] 王峰, 傅以钢, 夏四清, 等. PCR-DGGE技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点[J]. 环境科学, 2004, **25**(6): 74-79.

[21] Chouari R, Le Paslier D, Daegelen P, *et al*. Molecular analyses of the microbial community composition of an anoxic basin of a municipal wastewater treatment plant reveal a novel lineage of proteobacteria [J]. Microbial Ecology, 2010, **60**(2): 272-281.

[22] Del Casale A, Flanagan P V, Larkin M J, *et al*. Analysis of transduction in wastewater bacterial populations by targeting the phage-derived 16S rRNA gene sequences [J]. FEMS Microbial Ecology, 2011, **76**(1): 100-108.

[23] Kwon S, Kim T S, Yu G H, *et al*. Bacterial community composition and diversity of a full-scale integrated fixed-film activated sludge system as investigated by pyrosequencing [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, **20**(12): 1717-1723.

[24] 宋洪宁, 杜秉海, 张明岩, 等. 环境因素对东平湖沉积物细菌群落结构的影响[J]. 微生物学报, 2010, **50**(8): 1065-1071.

[25] Hallin S, Lydmark P, Kokalj S, *et al*. Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, **99**(3): 629-640.

[26] 毕水莲, 孟赫诚. 致病性弓形杆菌属生物学特性及诊断研究进展[J]. 现代食品科技, 2013, **29**(1): 211-214.

[27] Lerner J, Brumberger V, Preac-Mursic V. Severe diarrhea

associated with *Arcobacter butzleri* [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 1994, **13**(8): 660-662.

[28] Hsueh P R, Teng L J, Yang P C, *et al*. Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, **35**(2): 489-491.

[29] Kiehlbauch J A, Brenner D J, Nicholson M A, *et al*. *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1991, **29**(2): 376-385.

[30] Yan J J, Ko W C, Huang A H, *et al*. *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis [J]. Journal of the Formosan Medical Association, 2000, **99**(2): 166-169.

[31] Lau S K P, Woo P C Y, Teng J L L, *et al*. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis [J]. Molecular Pathology, 2002, **55**(3): 182-185.

[32] Lehner A, Tasara T, Stephan R. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, **102**(2): 127-135.

HUANJING KEXUE Vol. 36 No. 9
Environmental Science (monthly) Sep. 15, 2015

CONTENTS

《环境科学》第 6 届编辑委员会

主　编：欧阳自远

副主编：赵景柱　郝吉明　田　刚

编　委：（按姓氏笔画排序）

万国江　王华聪　王凯军　王绪绪　田　刚　田　静　史培军
朱永官　刘志培　刘　毅　汤鸿霄　孟　伟　周宗灿　林金明
欧阳自远　赵景柱　姜　林　郝郑平　郝吉明　聂永丰　黄　霞
黄　耀　鲍　强　潘　纲　潘　涛　魏复盛

环境科学

（HUANJING KEXUE）

（月刊　1976 年 8 月创刊）

2015 年 9 月 15 日　第 36 卷　第 9 期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

（Monthly　Started in 1976）

Vol. 36　No. 9　Sep. 15, 2015

主　管	中国科学院
主　办	中国科学院生态环境研究中心
协　办	（以参加先后为序） 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院
主　编	欧阳自远
编　辑	《环境科学》编辑委员会 北京市 2871 信箱（海淀区双清路 18 号，邮政编码：100085） 电话：010-62941102，010-62849343 传真：010-62849343 E-mail：hjkx@ rcees. ac. cn http：//www. hjkx. ac. cn
出　版	科学出版社 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码：100717
印刷装订	北京北林印刷厂
发　行	科学出版社 电话：010-64017032 E-mail：journal@ mail. sciencep. com
订购处	全国各地邮电局
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 （北京 399 信箱）

Superintended by	Chinese Academy of Sciences
Sponsored by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
Co-Sponsored by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
Editor-in -Chief	OUYANG Zi-yuan
Edited by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel：010-62941102，010-62849343；Fax：010-62849343 E-mail：hjkx@ rcees. ac. cn http：//www. hjkx. ac. cn
Published by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing　100717, China
Printed by	Beijing Bei Lin Printing House
Distributed by	Science Press Tel：010-64017032 E-mail：journal@ mail. sciencep. com
Domestic	All Local Post Offices in China
Foreign	China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号：ISSN　0250-3301 / CN　11-1895/X　　**国内邮发代号**：2-821

国内定价：120.00 元　　**国外发行代号**：M 205

国 内 外 公 开 发 行