

方知库
Eco-Environmental
Knowledge Web

环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心

■ 出版 科学出版社



2019

Vol.40 No.11

第40卷 第11期

目次

2018年中国长江三角洲地区气溶胶的垂直分布特征	沈吉, 曹念文(4743)
2018年石家庄市秋冬季典型霾污染特征	宿文康, 鲍晓磊, 倪爽英, 赵卫凤(4755)
武汉市PM _{2.5} 化学组分时空分布及聚类分析	张会涛, 田瑛泽, 刘保双, 杨佳美, 郁佳, 官攀, 吴建会, 张裕芬(4764)
郑州市某生活区大气PM _{2.5} 中重金属污染特征及生态、健康风险评估	何瑞东, 张轶舜, 陈永阳, 靳孟洁, 韩士杰, 赵金帅, 张瑞芹, 燕启社(4774)
厦门市降水中金属元素含量分布特征及来源解析	王珊珊, 程奕枫, 颜金培, 胡恭任(4783)
2015~2017年上海郊区大气新粒子生成特征	霍俊涛, 王新宁, 段玉森, 伏晴艳, 陈冰怡(4791)
太原市秋冬季大气污染特征和输送路径及潜在源区分析	闫世明, 王雁, 郭伟, 李莹, 张逢生(4801)
东北区域空气质量时空分布特征及重度污染成因分析	陈卫卫, 刘阳, 吴雪伟, 鲍秋阳, 高枳亭, 张学磊, 赵红梅, 张世春, 修艾军, 程天海(4810)
艾比湖流域气溶胶光学厚度时空演变及影响因素	陈香月, 丁建丽, 王敬哲, 葛翔宇, 梁静(4824)
中国住宅室内BTEX浓度水平及其影响因素	侯贝贝, 尹奕卉, 裴晶晶, 刘俊杰(4833)
石家庄地区芳香族化合物的污染特征及来源分析	杨阳, 李杏茹, 刘永桥, 杨玉磊, 赵清, 陈曦, 徐静(4841)
郑州市碳素行业无组织VOCs排放特征分析及健康风险评估	张轶舜, 王佳, 韩士杰, 何瑞东, 陈永阳, 靳孟洁, 赵庆炎, 张瑞芹, 燕启社(4847)
典型化工行业有害VOCs排放清单及长三角地区应用	鲁君, 黄奕玮, 黄成(4856)
2013~2017年江苏省人为源氨排放清单的建立及特征	侯新红, 于兴娜, 沈丽, 赵睿东, 王国祯, 张毓秀(4862)
焦化厂建构筑物和生产设施表面PAHs的赋存特征及健康风险	赵一澍, 廖晓勇, 李尤, 罗俊鹏, 龚雪刚, 侯艺璇(4870)
中国南海流沙湾中雄激素、糖皮质激素和孕激素的污染特征及其生态风险评价	杨雷, 张晋娜, 徐敏, 彭涛, 史文俊, 石义静, 应光国(4879)
岩溶流域洪水过程水化学动态变化及影响因素	原雅琼, 孙平安, 苏钊, 于爽, 钟丽华, 何师意, 徐茜(4889)
长江水体常量和微量元素的来源、分布与向海输送	吴文涛, 冉祥滨, 李景喜, 王昊, 李梦露, 刘军, 臧家业(4900)
望虞河西岸河网重金属污染特征及生态风险评价	徐晨, 王沛芳, 陈娟, 袁秋生, 胡斌(4914)
不同雨强对太湖河网河道入湖营养盐负荷影响	陈洁, 朱广伟, 许海, 詹旭, 朱梦圆, 宣文怡, 黄亚文(4924)
合肥市十八联圩湿地表层沉积物营养盐与重金属分布及污染评价	陈娜, 许凡, 谢三桃, 郭天星, 彭久赞, 雷琦, 张玮, 王丽卿(4932)
三峡库区不同河段支流丰水期叶绿素a和营养盐的空间分布特征	杨凡, 杨正健, 纪道斌, 苏青青, 龙良红, 刘心愿, 王耀耀, 赵冲(4944)
丹江口水库氮磷内源释放对比	王志齐, 刘新星, 姚志宏, 姚伦广, 常跃, 刘卓初, 曹连海(4953)
不同沉水植物净水能力与植株体细菌群落组成相关性	李琳, 岳春雷, 张华, 李贺鹏, 杨乐, 王琄(4962)
纳米氧化锌粒径对人工湿地性能及微生物群落的影响	王森, 任伶, 刘琳琳, 李颖, 张振, 孔范龙(4971)
水生植物生物炭去除水体中氮磷性能	刘舒蕾, 彭慧君, 杨佳怡, 肖琳(4980)
MgO改性莲蓬壳生物炭的制备及其磷吸附特性	王盛华, 朱丹晨, 邵敬爱, 向家涛, 杨海平, 易娟, 张世红, 陈汉平(4987)
微塑料对短流程膜工艺中膜污染的影响	王博东, 薛文静, 吕永涛, 苗瑞, 马百文(4996)
基于铁锰泥的除硝颗粒吸附剂制备及其比较	曾辉平, 于亚萍, 吕赛赛, 李冬, 张杰(5002)
氯氧铁非均相催化过氧化氢降解罗丹明B	张少朋, 陈瑞, 白淑琴, 刘锐平(5009)
天津市规模化奶牛养殖场废水中典型抗生素处理效果及生态风险评估	陈乾, 赵润, 牟美睿, 白鸽, 史宏伟, 刘海学, 吴惠惠(5015)
废水处理系统中抗生素抗性基因分布特征	姚鹏城, 陈嘉瑜, 张永明, 温东辉, 陈吕军(5024)
全程自养脱氮耦合反硝化除磷的启动及稳定运行	印雯, 陈亚, 张钰, 徐乐中, 吴鹏, 刘文如(5032)
FeCl ₃ -生化耦合技术调控未知诱因的污泥膨胀	魏东洋, 肖才林, 周雯, 李睿华, 曹茜(5040)
污泥龄对除磷亚硝化颗粒系统的影响	李冬, 刘博, 王文琪, 曹美忠, 李帅, 张杰(5048)
厌氧氨氧化耦合反硝化工艺的启动及微生物群落变化特征	宋壮壮, 吕爽, 刘哲, 时兴东, 潘傲, 张智(5057)
基质暴露水平对ANAMMOX微生物活性及生物量的影响	陈方敏, 高佳琦, 黄勇, 胡羽婷, 李祥, 顾澄伟, 谈新伟, 殷记强, 方文辉, 倪敏(5066)
太浦河流域农田土壤重金属污染特征与来源解析	李伟迪, 崔云霞, 曾撑撑, 朱永青, 彭月, 王凯, 李士俊(5073)
土壤重金属污染风险筛选值划分方法:以Cd为例	王锐, 张凤雷, 徐姝姝, 张永文(5082)
半壁山金矿矿业活动区砷赋存的矿物特征及其对农田土壤砷累积的影响	温其谦, 阎秀兰, 申俊峰, 李鸣凤(5090)
土壤调理剂对镉污染稻田修复效果	周利军, 武琳, 林小兵, 王惠明, 刘晖, 张鸿燕, 胡敏, 石利萍, 张云, 黄欠如(5098)
改性蒙脱土对稻田土壤甲基汞的阻控修复	韩怡新, 何天容, 王祖波(5107)
铈锰改性生物炭对土壤As的固定效应	梁婷, 李莲芳, 朱昌雄, 叶婧(5114)
温和预氧化提高后续生物修复石油污染土壤	徐金兰, 王慧芳, 王荣, 章秋菊, 王杰(5124)
重金属污染农田生菜根际重金属固定细菌群落组成及其阻控效应	王铁军, 苏楠楠, 雷鹏, 邱明洋, 陈兆进, 姚伦广, 韩辉(5133)
双氰胺和3,4-二甲吡唑磷酸盐对蔬菜种植土壤氨氧化细菌和古菌的影响	郭俊丽, 刘毅, 魏文学, 葛体达, 王光军(5142)
不同再生水灌溉方式对土壤-辣椒系统中细菌群落多样性及病原菌丰度的影响	崔丙健, 高峰, 胡超, 李中阳, 樊向阳, 崔二革(5151)
黄土高原地区两种土地利用方式CO ₂ 和N ₂ O排放特征	韩佳乐, 郝珊, 刘振杰, 张曼, 张阿凤(5164)
生物炭对华北平原4种典型土壤N ₂ O排放的影响	张秀玲, 孙贇, 张水清, 岳克, 曹红亮, 林杉(5173)
优化施肥模式对我国热带地区水稻-豇豆轮作系统N ₂ O和CH ₄ 排放的影响	胡玉麟, 汤水荣, 陶凯, 何秋香, 田伟, 秦兴华, 伍延正, 孟磊(5182)
《环境科学》征订启事(4995)	《环境科学》征稿简则(5039)
信息(4782, 4979, 5056)	

不同再生水灌溉方式对土壤-辣椒系统中细菌群落多样性及病原菌丰度的影响

崔丙健^{1,2}, 高峰^{1,2*}, 胡超^{1,2}, 李中阳^{1,2}, 樊向阳^{1,2}, 崔二苹^{1,2}

(1. 中国农业科学院农田灌溉研究所, 新乡 453002; 2. 中国农业科学院农业水资源高效安全利用重点开放实验室, 新乡 453002)

摘要: 再生水是改善水资源布局和缓解传统水源短缺问题的一种合理且可持续的替代水源, 但用于灌溉会引起土壤和作物中微生物群落结构和条件致病菌丰度变化, 目前这方面的研究报道较少. 本研究以辣椒为对象, 设置再生水灌溉(DI)、清水和再生水混灌(MI, 清水: 再生水 = 1: 1)、清水和再生水轮灌(RI)处理, 以清水灌溉(PI)为对照, 通过温室盆栽试验研究不同灌溉方式对土壤性质的影响, 并基于高通量测序技术结合定量 PCR 方法探讨再生水灌溉下辣椒果实与根际细菌群落组成和病原菌分布丰度特征. 结果表明, 与清水灌溉相比, 再生水直接灌溉增加了土壤 EC 值, 而降低了 pH 值. 16S rDNA 高通量测序结果显示, 在门分类水平上, Proteobacteria、Bacteroidetes、Actinobacteria 和 Firmicutes 是辣椒果实和根际共有的主要类群, 其优势菌属 *Pantoea*、*Pseudomonas*、*Sphingomonas*、*Sphingopyxis*、*Luteimonas* 和 *Mariniflexile* 的相对丰度受再生水灌溉方式的影响较大. 再生水灌溉分别使辣椒果实和根际中 *Legionella* spp. 和 *Pseudomonas syringae* 丰度显著增加, 并且对病原菌丰度的影响差异较大. 综上所述, 再生水适宜作为农业灌溉用水, 但不同灌溉方式可能不同程度上引入微生物污染问题, 其中特定条件致病菌和植物病原菌值得关注.

关键词: 再生水灌溉; 定量 PCR; 高通量测序; 病原菌; 细菌多样性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2019)11-5151-13 DOI: 10.13227/j.hjxx.201904269

Effect of Different Reclaimed Water Irrigation Methods on Bacterial Community Diversity and Pathogen Abundance in the Soil-Pepper Ecosystem

CUI Bing-jian^{1,2}, GAO Feng^{1,2*}, HU Chao^{1,2}, LI Zhong-yang^{1,2}, FAN Xiang-yang^{1,2}, CUI Er-ping^{1,2}

(1. Farmland Irrigation Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xinxiang 453002, China; 2. Key Laboratory of High-efficient and Safe Utilization of Agriculture Water Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xinxiang 453002, China)

Abstract: Reclaimed water is considered to be a reasonable and sustainable alternative water resource to improve water resource layout and mitigate the shortage of traditional water resources. Its use in irrigation will cause changes in the microbial community structure and opportunistic pathogen abundance in soils and crops, but few studies have been conducted on this subject. Peppers were used as the research subjects, and the treatments were direct irrigation of reclaimed water, mixed irrigation with freshwater and reclaimed water, rotated irrigation with freshwater and reclaimed water, with potable water irrigation as the control. The effects of different irrigation methods of reclaimed water on the soil physicochemical properties were analyzed through a pot experiment. Furthermore, changes in bacterial community and opportunistic pathogen abundance in pepper fruit and the rhizosphere under reclaimed water irrigation conditions were investigated based on high-throughput sequencing technology and quantitative PCR methods. The results showed that direct irrigation with reclaimed water increased soil EC and decreased soil pH. 16S rDNA high-throughput sequencing showed that Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Firmicutes were present in both pepper fruit and the rhizosphere at phylum level, and the most dominant genera (*Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Luteimonas*, and *Mariniflexile*) were greatly affected by reclaimed water irrigation methods. Quantitative PCR results indicated that the influence of reclaimed water irrigation on the distribution and abundance of pathogenic bacteria in the soil-pepper system was different, and the abundance of *Legionella* spp. in pepper fruit and *Pseudomonas syringae* in the rhizosphere increased with reclaimed water irrigation. Our results indicated that the reclaimed water was suitable for agricultural irrigation, but different reclaimed water irrigation methods may introduce different degrees of microbial contamination. In addition, attention must be given to some opportunistic pathogens and phytopathogens.

Key words: reclaimed water irrigation; real-time quantitative PCR; high-throughput sequencing; pathogens; bacterial diversity

随着淡水资源消耗量的逐年增加, 地表水受污染、旱季缺水 and 环境恶化等问题的出现, 越来越多的人开始关心从哪里汲取可利用的二次水源. 在水资源短缺不断加剧和农业用水利用率低的情况下, 迫切需要寻找替代水源并提出可行的解决方案, 再生水的开发和农业利用成为必然选择和重要途径之

一. 城镇污水处理及再生利用设施是城镇发展不可

收稿日期: 2019-04-30; 修订日期: 2019-05-31

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC0403503-2); 中央级科研院所基本科研业务费专项(FIR2018-02); 国家自然科学基金项目(51479201)

作者简介: 崔丙健(1985~), 男, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为再生水安全利用, E-mail: ayangchj@126.com

* 通信作者, E-mail: gfyx@sina.com

或缺的基础设施,是经济、居民安全健康生活的重要保障,大量稳定的城镇再生水将是我国农业用水的重要补充水源^[1]. 污水再生回用技术从 20 世纪 20 年代开始实践,已在许多国家得到广泛应用,由处理排放型向资源化处置型的转变成为污水处理行业发展的必然趋势.

农田灌溉作为污水再生回用的主要途径,既能给农业生产提供稳定的水源,又可达到节水减排和省肥的目的. 由于再生水灌溉具有潜在的经济效益和环境效益,其风险可以通过适当地田间管理加以控制,因此应鼓励和促进再生水农业灌溉回用^[2]. 盐分、重金属和病原菌是再生水灌溉的主要风险来源. 其中,再生水中的病原菌在自然状态下可以存活很长时间,会随灌溉附着于作物或果实表面甚至内生于植物组织,从而对人与作物健康产生潜在威胁^[3]. 韩洋等^[4]的研究发现,合理控制再生水灌水水平可以有效阻控土壤耐热大肠菌群的数量. Lonigro 等^[5]的研究结果表明采用再生水滴灌或采收前一周停灌,土壤和蔬菜不会受到粪指示菌污染. 土壤微生物群落是由土壤类型和灌溉水质决定的,再生水灌溉对微生物区系的影响可能超过土壤或植物类型的影响^[6]. 与叶际生境类似,果实表面作为植物地上部分也是微生物的主要栖息场所,其微生物群落受温度、紫外线辐射、植物表面养分利用率和叶片湿度等的影响呈现无规律变化,与根际同样是诸多病原菌的环境储库^[7,8].

目前对再生水微生物质量的评价主要集中在大肠杆菌和肠球菌等指示菌. 然而,这些指示生物大多是非致病性的,它们的存在与实际的条件致病菌如气单胞菌、军团菌和分枝杆菌等的存在没有明显的相关性^[9]. 关于再生水灌溉对辣椒果实表面和根际微生物群落多样性和条件致病菌的研究报道较少. 本研究通过高通量测序技术和定量 PCR 方法对不同灌溉方式条件下辣椒果实表面与根际细菌群落多样性及条件致病菌丰度变化进行比较分析,探究再生水灌溉对土壤和作物细菌群落及病原菌污染状况的影响,以期对再生水水质及其农业利用的生物安全性评价提供参考.

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

pGEM-T Easy 载体(Promega 公司,美国); 2 × PCR PreMix(睿博兴科生物科技有限公司,北京); TB GreenTM Premix Ex TaqTM (Tli RNaseH Plus, TaKaRa 公司,大连); LB 固体和液体培养基(生工生物工程股份有限公司,上海); FastDNA Spin Kit for Soil

试剂盒(MP Biomedicals, 美国); E. Z. N. ATM Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek 公司, 美国); E. Z. N. A.® Plasmid Mini Kit I Spin Kit (Omega Bio-tek 公司, 美国); 化学发光凝胶成像系统 JS-1075 (培清科技公司, 上海); 核酸蛋白测定仪 ND-2000 (Thermo Fisher 公司, 美国); CFX96 TouchTM 荧光定量 PCR 检测系统 (Bio-Rad 公司, 美国); FastPrep-24 instrument with the QuickPrepTM Adapter (MP Biomedicals, 美国).

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计及样品采集

本试验用再生水取自新乡市骆驼湾生活污水处理厂,其采用 A/O 处理工艺,日处理能力 15 万 m³. 经处理后的污水水质符合国家《城市污水再生利用 农田灌溉用水水质 GB 20922-2007》和《农田灌溉水质标准 GB 5084-2005》. 灌溉水源水质指标见表 1.

表 1 灌溉水源水质指标		
Table 1 Water quality index of irrigation water sources		
理化指标	清水	再生水
pH	7.08 ~ 7.35	7.88 ~ 8.31
EC/ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	786 ~ 815	1 884 ~ 2 510
COD/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	< 15	15 ~ 93
$\text{NH}_4^+-\text{N}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.02 ~ 0.03	0.12 ~ 0.20
TP/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.04 ~ 0.09	0.33 ~ 0.67
Cu/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	< 0.009	< 0.009
Zn/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	< 0.001	0.008 ~ 0.013
Pb/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	< 0.001	< 0.001
Cd/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	< 0.0001	< 0.0001

盆栽试验于中国农业科学院新乡农业水土环境野外科学观测试验站进行,种植茄果类蔬菜辣椒. 花盆盛土 30 kg,播种前一次性施入底肥(尿素 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 过磷酸钙 120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 氯化钾 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),所有处理施肥量相同. 试验处理设置如下:再生水灌溉(DI)、清水和再生水混灌(MI)、清水和再生水轮灌(RI),以清水灌溉(PI)为对照,并对样品类型进行编号, C 表示辣椒果实表面, R 表示根际土壤,每个处理组 4 个重复. 试验期间每隔两天以浇灌方式灌水,每次灌水量为 1 L,灌水周期 2 个月.

辣椒成熟期利用无菌刀片分别采集地上和地下两部分样品,每个处理随机剪取果实材料于无菌密封袋中,并采用抖落法收集根际土壤样品. 果实样品称重,按 1:10(g:mL)加入 PBS(磷酸盐缓冲液, pH 7.2),室温 150 r·min⁻¹振荡 30 min, 40 kHz 超声处理 10 min,重复两次,合并洗脱液,利用 0.45 μm 微孔滤膜真空抽滤收集果实表面微生物颗粒.

上述预处理样品保存于 -20°C 用于核酸提取,另外利用无菌密封袋取根际土壤样品用于理化测试分析。

1.2.2 土壤理化测定方法

土壤与蒸馏水按质量与体积比 1:5 混匀后静置过夜利用电极法测定 pH 和 EC,有机质(OM)测定采用低温外热重铬酸钾氧化-比色法,总氮和总磷分别利用碱性过硫酸钾-消解紫外分光光度法和钼锑抗分光光度法测定,土壤重金属全量(铅、镉、铜和锌)用微波消解-原子吸收分光光度法测定,利用土壤脲酶(S-UE)活性检测试剂盒和土壤碱性磷酸酶(S-AKP/ALP)活性检测试剂盒(索莱宝,北京)检测土壤酶活性。

1.2.3 基因组 DNA 提取

辣椒果实和根际土壤细菌基因组 DNA 采用 FastDNA Spin Kit for Soil 试剂盒(MP Biomedicals, 美国)进行提取,具体步骤参照试剂盒说明书。取 5 μL 基因组 DNA 溶液用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳(电压 120 V, 时间 20 min)检测提取效果,利用 NanoDrop2000(Thermo Scientific, 美国)测定 DNA 浓度及纯度,然后保存于 -80°C 冰箱备用。

1.2.4 16S rRNA 基因高通量测序

利用 16S rRNA 基因 V3-V4 区引物 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) 和 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) 对各样本基因组 DNA 进行 PCR 扩增^[10]。PCR 试验采用 TransGen AP221-02;TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 20 μL 反应体系;5 $\times$ FastPfu Buffer 4 μL , 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs 2 μL , 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正反向引物各 0.8 μL , FastPfu Polymerase 0.4 μL , 模板 DNA 10 ng, ddH₂O 补足至 20 μL 。PCR 反应于 ABI GeneAmp[®] 9700 型上进行,扩增参数如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 30 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保持。将同一样本的 PCR 产物进行均一化混匀后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,选择目的条带使用 AxyPrepDNA 试剂盒(Axygen, 美国)进行切胶回收。利用 TruSeq[™] DNA Sample Prep Kit 构建 PE 文库,使用 Illumina MiSeq PE300 平台进行测序。

物种注释与评估:利用 FLASH 和 Trimmomatic 软件对原始数据进行拼接和过滤得到有效序列。利用 Usearch(vsession 7.0 <http://drive5.com/uparse/>)划分 97% 以上相似性的 OTU 进行 α 多样性分析。采用 RDP classifier 贝叶斯算法和 QIIME 平台(http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html)

对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行不同的分类学分析,使用 Silva (Release128 <http://www.arb-silva.de>) 比对数据库分析各样本的群落组成。利用 Mothur 计算不同随机抽样下的 α 多样性指数,并利用 R 语言工具绘制稀疏曲线图。

物种组成分析:Venn 图可以比较直观地反映环境样本的 OTU 组成相似性及重叠情况,利用 R 语言工具作图;利用 R 语言 vegan 包绘制群落 Heatmap 图。

样本比较分析:利用 R 语言绘制样本距离 Heatmap 图;PCoA(Principal co-ordinates analysis)即主坐标分析用来研究样本群落组成的相似性或差异性,利用 R 语言 PCoA 统计分析和作图。

环境因子关联分析:RDA 主要用来反映菌群与环境因子之间关系,利用 R 语言 vegan 包中 RDA 和作图;相关性 Heatmap 分析通过计算环境因子与所选物种之间的相关性系数,利用 R (pheatmap package)语言作图。

1.2.5 细菌群落组成和典型病原菌 qPCR 检测

利用门水平细菌菌群引物^[11]和病原菌特异性引物对样品基因组 DNA 进行常规 PCR 扩增,所用引物如表 2 所示。扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳验证目的条带大小,并进行切胶回收纯化。纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接后导入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 平板涂布进行蓝白斑筛选。经 PCR 鉴定为阳性的菌落转入 LB 液体培养基扩大培养,取 1.5 mL 培养菌液送测序公司对插入基因片段进行鉴定,测序结果通过 NCBI 的 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)进行序列同源性检索比对。利用 E. Z. N. A.® Plasmid Mini Kit I Spin Kit 试剂盒提取质粒 DNA,并测定其浓度和纯度。根据质粒 DNA 浓度计算基因拷贝数,将已知拷贝数的质粒 DNA 10 倍梯度稀释作为标准模板,进行荧光定量 PCR 扩增。

定量 PCR 反应采用 CFX96 Touch[™] 荧光定量 PCR 检测系统进行,20 μL 反应体系:10 μL TB Green[™] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus), 上下游引物各 0.4 μL , 模板 1 μL , 加无菌 ddH₂O 补齐至 20 μL , 反应于 0.1 mL 八联排管(GeneBrick, 上海)中进行。荧光定量 PCR 程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 55 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。溶解曲线条件:以 0.5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 温度递增速率从 65 $^{\circ}\text{C}$ $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$, 所有反应均设置 3 个重复,起始模板浓度由 Ct 值确定。每轮反应均以无菌 ddH₂O 代替模板 DNA 作为阴性对照。

表 2 用于定量 PCR 检测的病原菌引物
Table 2 Primers for quantitative PCR detection of pathogenic bacteria

项目	目的基因	序列(5'-3')	产物长度/bp	文献
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cytolytic enterotoxin	GAGAAGGTGACCACCAAGAACA AACTGACATCGGCCCTTGAATC	232	[12]
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>rpo</i>	ATACTTTCTTGGTCTTGTGGTGTA CCACAAAGACACTCATAATCTTTTAC	132	[13]
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	23S	TGCTGGAGCGGATAGAAGTA AACAACCTACGTCCTTCGAC	257	[13]
<i>Bacillus cereus</i>	Hemolysin	CTGTAGCGAATCGTACGTATC TACTGCTCCAGCCACATTAC	185	[14]
<i>Escherichia coli</i>	<i>uidA</i>	CTGCTGCTGTCGGCTTTA CCTTGCGGACGGGTAT	205	[15]
<i>Enterococcus faecium</i>	23S	AGAAATTCCAAACGAACTTG CAGTGCTCTACCTCCATCATT	92	[16]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>phoE</i>	TGCCCAGACCGATAACTTTA CTGTTTCTTCGCTTCACGG	142	[17]
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>oprF</i>	AACTGAAAAACACCTTGGGC CCTGGGTGTGTGAAGTGTA	304	[18]
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT CAAGCCTTGACGAACATAAGC	276	[19]
<i>Legionella</i> spp.	16S	GAGGGTTGATAGGTTAAGAGC GTCAACTATCGCGTTTGCT	430	[20]
<i>Mycobacterium</i> spp.	16S	ATGCCACCTGCACACAGG GGTGGTTGTGCGCTTGTTC	470	[21]
大肠菌群	<i>lacZ</i>	ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC GGTTATGCAGCAACGACGCTCA	264	[22]
细菌总数	16S	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCG GCTGCTCG	200	[23]
真菌总数	18S	GTAGTCATATGCTTGTCTC ATTCCCGTTACCCGTTG	350	[24]

1.3 数据分析

利用 Excel 2007 和 Origin 8.0 进行数据分析和作图,利用 Hem I 热图软件分析病原菌的丰度差异. 样品测序数据利用 I-Sanger 生信云平台分析(上海桑格信息技术有限公司).

2 结果与分析

2.1 土壤理化指标分析

不同灌溉处理土壤理化性质见表3. 与清水灌

溉相比,采用再生水直接灌溉(DI)和混灌(MI)处理能显著降低土壤 pH 值,增加 EC 值($P\leq 0.05$). 再生水与清水混灌(MI)处理显著增加土壤有机质和总磷含量($P\leq 0.05$). 各灌溉处理之间土壤的总氮、重金属(Cd、Pb、Zn)以及酶活性无显著差异. 在试验期间内各灌溉水质处理未引起土壤重金属污染,均低于《土壤环境质量 农用地土壤污染风险管控标准(试行)》(GB 15618-2018)的风险筛选值,其中清水与再生水轮灌土壤中的Cu含量显著增加

表 3 不同处理根际土壤样品的理化特性¹⁾
Table 3 Physicochemical properties of different rhizosphere soil samples

项目	PI	DI	MI	RI	GB 15618-2018
pH	8.35 ± 0.03	8.09 ± 0.02 *	8.27 ± 0.04 *	8.33 ± 0.05	—
EC/μS·cm ⁻¹	996 ± 110	1 624 ± 181 **	1 100 ± 87 *	1 335 ± 207	—
OM/%	1.72 ± 0.05	1.78 ± 0.03	1.86 ± 0.04 *	1.69 ± 0.08	—
TN/g·kg ⁻¹	1.12 ± 0.08	1.28 ± 0.05	1.10 ± 0.22	1.06 ± 0.04	—
TP/g·kg ⁻¹	1.05 ± 0.09	1.16 ± 0.03	1.34 ± 0.06 *	1.14 ± 0.02	—
Cd/mg·kg ⁻¹	0.36 ± 0.21	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.04	0.47 ± 0.06	0.3 ~ 0.8
Pb/mg·kg ⁻¹	15.40 ± 2.86	16.40 ± 5.09	12.21 ± 0.64	14.43 ± 2.39	70 ~ 240
Cu/mg·kg ⁻¹	10.46 ± 0.78	11.07 ± 1.02	12.70 ± 0.24 *	13.86 ± 0.51 **	50 ~ 200
Zn/mg·kg ⁻¹	56.96 ± 1.72	57.06 ± 3.69	61.63 ± 1.87	54.70 ± 1.36	200 ~ 300
脲酶/U·g ⁻¹	564 ± 68	627 ± 138	669 ± 117	548 ± 36	—
碱性磷酸酶/U·g ⁻¹	62 ± 9	59 ± 10	54 ± 13	59 ± 12	—

1) * 表示存在显著差异 $P\leq 0.05$; ** 表示存在极显著差异 $P\leq 0.01$

($P \leq 0.01$). 与其他指标相比, 再生水不同灌溉方式均有增加土壤盐分的风险.

2.2 细菌群落多样性与组成分析

2.2.1 细菌多样性分析

利用 Usearch 软件平台对辣椒果实表面和根际土壤样本测得序列进行抽平, 并对 OTU 表进行物种筛选, 两类样本单个样品分别保留 32 775 条和 43 387 条有效序列. 统计各样本 OTU 聚类情况 and 对应物种分类, 辣椒果实表面样本细菌 OTU 总数为 1 003, 包括 22 个门、49 个纲、112 个目、218 个科和 434 个属; 根际土壤细菌 OTU 总数为 2 874, 包括 39 个门、91 个纲、188 个目、358 个科和 681 个属. 采用对序列进行随机抽样的方法, 以抽到的序列数与其对应的物种 (OTU) 数目或多样性构建稀疏曲线. 从图 1 可以看出, 每个样本观测到的物种数量均随着测序数据量增加而增加, 当曲线趋向平坦时, 说明测序数据量合理, 更多的数据量只会产生少量新的物种, 表明该测序结果可以客观反映各样本中绝大多数的细菌群落多样性信息.

辣椒果实表面和根际土壤样本的 α 多样性指数见表 4, 通过比较可以看出根际土壤 Sobs、Ace 和 Chao1 指数高于辣椒果实表面, 表明根际土壤物种丰富度更高. 物种覆盖度接近于 1, 表明测序结果可以很好地反映微生物多样性. 辣椒果实表面 DI

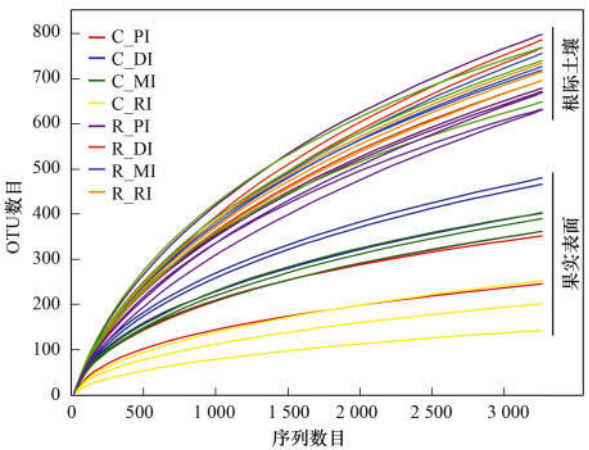


图 1 不同样本细菌群落的稀疏曲线
Fig. 1 Rarefaction curves of bacterial communities in different samples

处理的 Chao1 指数显著高于其他处理, 而 RI 处理的 Shannon 指数低于其他处理, 表明再生水直接灌溉增加了细菌群落的丰富度, 而清水与再生水轮灌方式则可降低细菌群落的多样性. 不同灌溉方式处理间辣椒果实表面的 Sobs、Ace 和 Simpson 指数无显著差异. 不同灌溉方式处理间根际土壤的 Sobs、Ace、Chao1 和 Shannon 指数无显著差异, 仅 DI 和 RI 处理的 Simpson 指数显著高于其他处理, 表明细菌群落多样性受再生水灌溉影响而降低.

表 4 不同样本的细菌多样性指数
Table 4 Bacterial community diversity indices in different samples

项目	处理	Sobs 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Ace 指数	Chao1 指数	覆盖度
果实表面	C_PI	322 ± 60	4.23 ± 0.51	0.046 1 ± 0.034 4	645 ± 104	537 ± 78	0.956 9 ± 0.008 3
	C_DI	452 ± 36	4.91 ± 0.12	0.0172 ± 0.0019	823 ± 46	703 ± 25 *	0.939 8 ± 0.003 7
	C_MI	381 ± 14	4.53 ± 0.06	0.033 3 ± 0.002 8	713 ± 95	592 ± 42	0.949 6 ± 0.003 4
	C_RI	200 ± 40	2.84 ± 0.46 *	0.196 9 ± 0.073 1	465 ± 102	351 ± 96	0.970 9 ± 0.006 4
根际土壤	R_PI	1 694 ± 133	5.83 ± 0.18	0.009 1 ± 0.001 9	2 101 ± 145	2 140 ± 136	0.985 4 ± 0.000 7
	R_DI	1 761 ± 54	5.66 ± 0.05	0.016 2 ± 0.002 9 *	2 132 ± 53	2 173 ± 63	0.985 6 ± 0.000 3
	R_MI	1 703 ± 50	5.80 ± 0.07	0.010 6 ± 0.002 5	2 080 ± 65	2 099 ± 58	0.986 0 ± 0.000 6
	R_RI	1 669 ± 76	5.67 ± 0.05	0.015 3 ± 0.001 2 *	2 058 ± 75	2 065 ± 76	0.986 0 ± 0.000 4

1) * 表示存在显著差异 $P \leq 0.05$

2.2.2 物种组成与丰度分析

不同灌溉方式下辣椒果实表面和根际土壤中细菌群落结构在门和属水平上的相对丰度如图 2 所示, 可以看出各处理细菌群落组成相似, 但同一菌群的相对丰度比例存在较大差异. 门水平上, 各处理辣椒果实表面和根际土壤样品的优势菌群主要包括变形菌门 (Proteobacteria, 43.42% ~ 69.30%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes, 2.12% ~ 29.50%)、放线菌门 (Actinobacteria, 4.07% ~ 14.01%)、厚壁菌门 (Firmicutes, 0.18% ~ 22.61%)、绿弯菌门 (Chloroflexi, 0.31% ~ 5.84%)、芽单胞菌门

(Gemmatimonadetes, 0.15% ~ 6.76%)、酸杆菌门 (Acidobacteria, 0.18% ~ 4.01%)、Saccharibacteria (0.05% ~ 3.54%)、疣微菌门 (Verrucomicrobia, 0.02% ~ 2.49%) 和 Parcubacteria (0 ~ 2.37%), 其中变形菌门在所有样品中所占比例最高, 并且果实表面 (62.97% ~ 69.30%) 相对丰度高于根际 (43.42% ~ 55.72%). 与其他灌溉方式相比, 果实样品 RI 处理的 α -变形菌纲 (α -Proteobacteria) 和 β -变形菌纲 (β -Proteobacteria) 相对丰度最低, 而 γ -变形菌纲 (γ -Proteobacteria) 相对丰度最高. 与 PI 处理相比, DI 和 MI 处理增加了根际土壤拟杆菌门

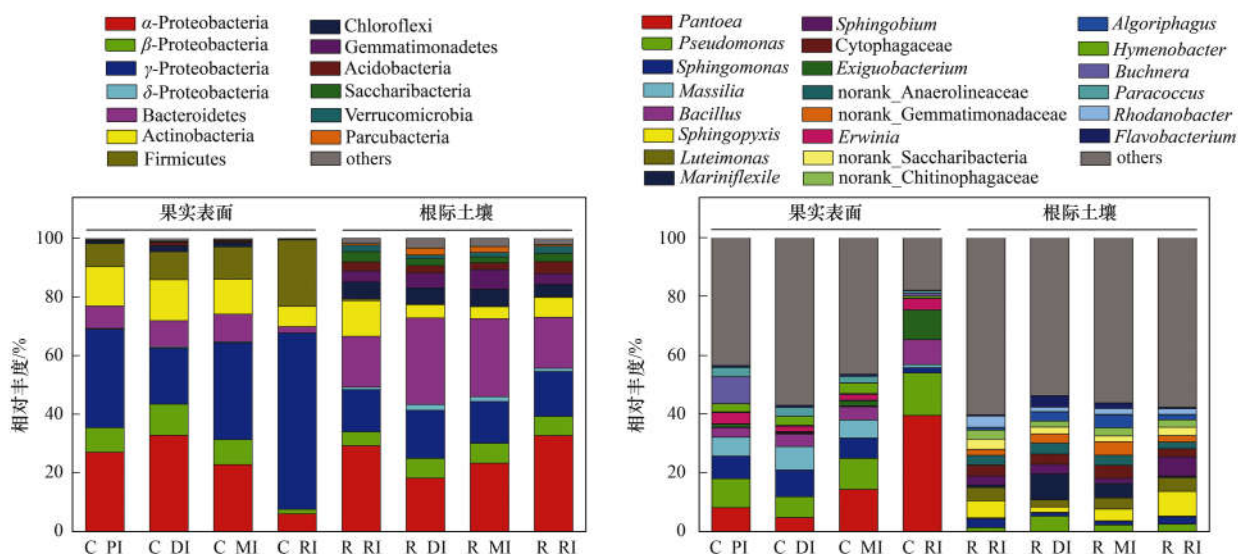


图2 门水平和属水平辣椒果实表面和根际土壤细菌群落相对丰度柱状图

Fig. 2 Histograms of relative abundances of bacterial communities on the pepper fruit surface and in the rhizosphere soil at the phylum and genus levels

(Bacteroidetes) 的相对丰度, 而降低了放线菌门 (Actinobacteria) 的相对丰度。

属水平上, 辣椒果实和根际细菌属组成和相对丰度存在较大差异, 并且根际土壤的种属多样性较高。辣椒果实各处理中菌属主要包括: 泛菌属 (*Pantoea*, 4.77% ~ 39.55%), 假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 7.10% ~ 14.48%), 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*, 1.74% ~ 9.09%), 马赛菌属 (*Massilia*, 1.08% ~ 8.01%), 芽孢杆菌属 (*Bacillus*, 3.25% ~ 8.53%), 微小杆菌属 (*Exiguobacterium*, 0.30% ~ 10.06%), 欧文氏菌属 (*Erwinia*, 1.80% ~ 3.94%), 其中 RI 处理的泛菌属 (*Pantoea*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和微小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 相对丰度最高, 而 DI 处理降低了泛菌属 (*Pantoea*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 相对丰度。根际土壤中主要的菌属包括: 假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 1.33% ~ 5.24%), 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*, 1.24% ~ 3.01%), 鞘氨醇盒菌属 (*Sphingopyxis*, 1.81% ~ 8.46%), 藤黄色单胞菌属 (*Luteimonas*, 2.41% ~ 4.62%), *Mariniflexile* (0.56% ~ 8.82%), 鞘脂菌属 (*Sphingobium*, 1.79% ~ 6.57%), 噬纤维细菌科 (Cytophagaceae, 2.72% ~ 4.41%) 以及未分类的厌氧绳菌科 (Anaerolineaceae, 2.26% ~ 3.73%) 和芽单胞菌科 (Gemmatimonadaceae, 2.02% ~ 4.59%), 其中 DI 处理增加了假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和 *Mariniflexile* 的相对丰度, 而降低了鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、鞘氨醇盒菌属 (*Sphingopyxis*) 和藤黄色单胞菌属 (*Luteimonas*)。微

小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 和欧文氏菌属 (*Erwinia*) 仅在果实样品中检出, 而 *Mariniflexile* 和藤黄色单胞菌属 (*Luteimonas*) 仅在根际样品中检出。

不同处理组样品所共有和独有的 OTU 数目如图 3 所示。果实样品 PI、DI、MI 和 RI 这 4 个处理组中独有的核心 OTU 数目分别为 78、177、116 和 21 个, 所有样品共有的核心 OTU 数目为 228 个, 其中不同处理之间共有的核心 OTU 排序为 DI&MI (467) > PI&DI (428) > PI&MI (377) > DI&RI (298) > MI&RI (278) > PI&RI (263)。根际样品 PI、DI、MI 和 RI 这 4 个处理组中独有的核心 OTU 数目分别为 87、85、62 和 104 个, 所有样品共有的核心 OTU 数目为 1531 个, 其中不同处理之间共有的核心 OTU 排序为 DI&MI (1972) > PI&RI (1936) > PI&DI (1909) > PI&MI (1866) > DI&RI (1815) > MI&RI (1773)。通过 Venn 图分析各处理样品中物种组成相似性及重叠情况, 表明 DI 和 MI 样品具有相似的微生物组成。

2.2.3 样本比较分析

基于 unweighted UniFrac 距离的 PCoA 研究清水与再生水灌溉辣椒果实表面和根际土壤的细菌群落组成的相似性与差异性, PC1 轴和 PC2 轴对结果的解释度分别为 68.11% 和 6.34% (图 4)。辣椒果实样品中 PI 与 MI 处理组间距离较小, 并存在一定的重叠, 表明两者的物种组成相似, DI 处理与其他处理的细菌群落组成差异较大。而根际土壤样品中 DI 与 RI 处理具有类似的细菌群落组成, MI 处理与其他处理的细菌群落组成差异较大。结果表明不同灌溉方式的细菌群落组成存在明显差异。

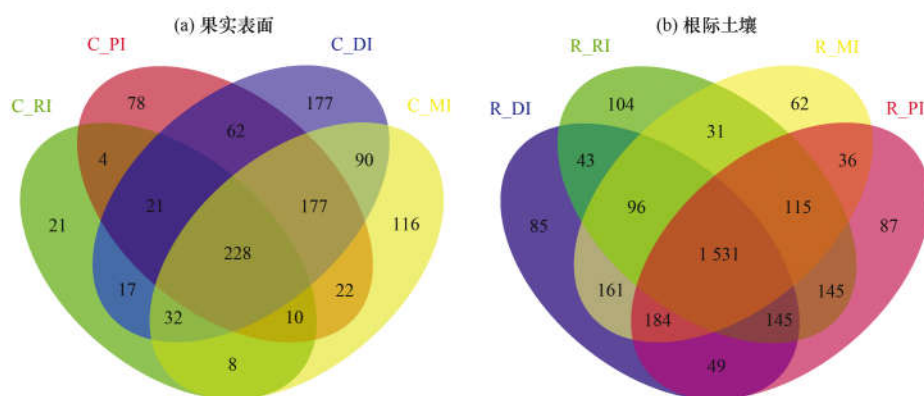


图3 不同处理辣椒果实表面和根际土壤样品核心 OTUs Venn 图

Fig. 3 Venn diagram of core OTUs between the pepper fruit surface and rhizosphere soil in different treatments

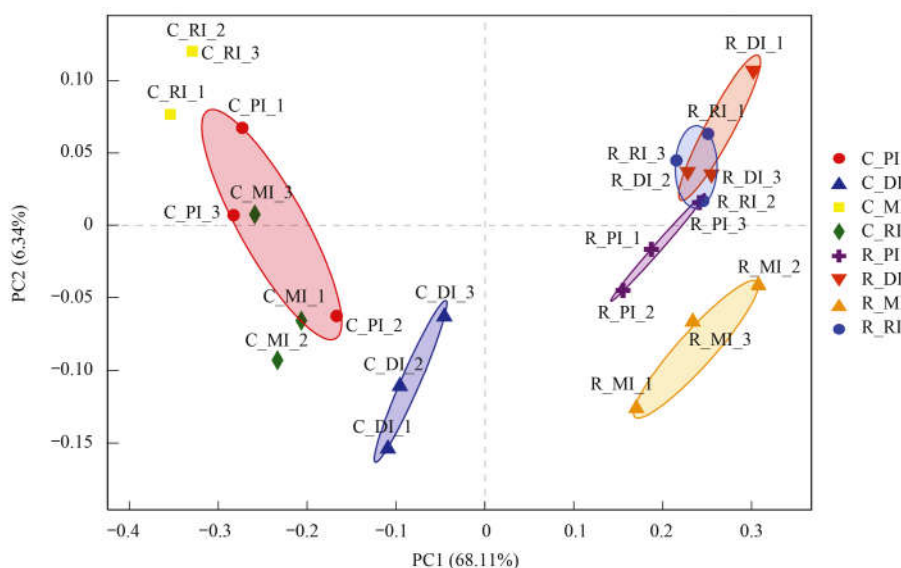


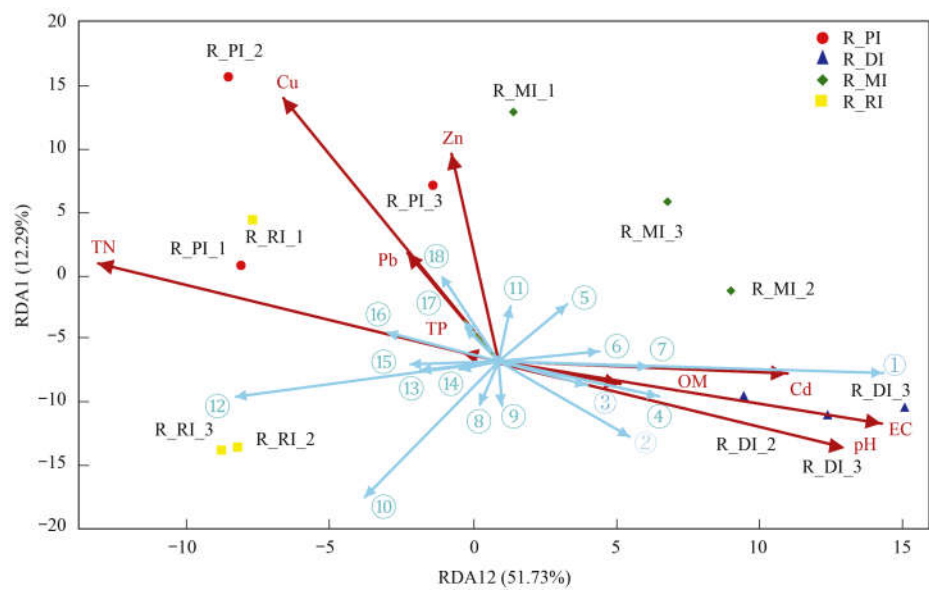
图4 不同样品的 PCoA

Fig. 4 Principal coordinate analysis (PCoA) of the carposphere and rhizosphere in different samples

通过 RDA 揭示不同灌溉处理根际土壤在属水平细菌群落与土壤理化性质之间的相关性(图 5). 结果表明, 细菌群落结构与环境因子之间存在明显的相关性. 图中不同颜色或形状的点表示不同处理的样本组, 环境因子对微生物群落结构影响的强弱通过其箭头长度来反映. 土壤 pH、EC、TN 和 Cu 含量对细菌群落结构的影响显著($P < 0.01$), 说明这些环境因子是影响微生物群落的关键因素. *Mariniflexile*、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和欧文氏菌属(*Erwinia*)与 pH、EC、OM 呈正相关, 与 TN、TP 等呈负相关. 罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)、藤黄色单胞菌属(*Luteimonas*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、鞘氨醇盒菌属(*Sphingopyxis*)和鞘脂菌属(*Sphingobium*)与 pH、EC、OM 呈负相关, 而与 TN、TP 和 Cu 含量呈正相关. 不同灌溉方式处理样品与环境因子相关性分析表明, DI 和 MI 处理与 pH、EC、OM 含量呈正相关, 而其他处理与这 3 个环境

因子呈负相关, PI 和 RI 处理与 TN、TP 和 Cu 含量呈正相关.

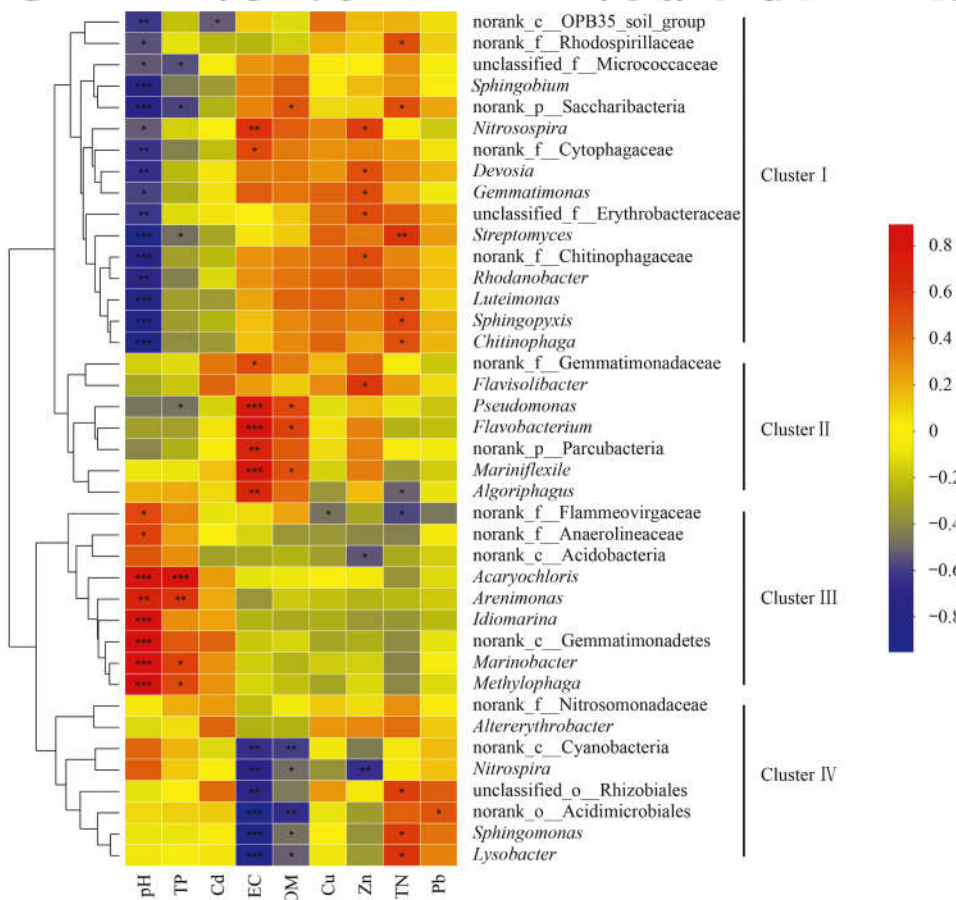
通过 Spearman's 相关性 Heatmap 图分析不同环境因子与根际土壤属水平细菌群落丰度的关系, 结果见图 6. 从中可以看出, 属水平上, 根际土壤的细菌群落与环境因子的相关性根据高低共分为 4 簇集合. Cluster I 中所有物种与 pH 呈显著或极显著负相关($P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$), 部分菌属(*Nitrospira*、*Devosia*、*Gemmatimonas*、*Streptomyces*、*Luteimonas*、*Sphingopyxis*和 *Chitinophaga*)与 EC、Zn 和 TN 呈显著正相关($P \leq 0.05$). Cluster II 中除了 *Flavisolibacter* 外, 其他菌属(*Pseudomonas*、*Flavobacterium*、*Mariniflexile*和 *Algoriphagus*)均与 EC 呈正显著相关($P \leq 0.01$). Cluster III 中 *Acaryochloris*、*Arenimonas*、*Marinobacter*、*Methylophaga*与 pH 呈极显著正相关($P \leq 0.01$), 与 TP 呈显著正相关($P \leq 0.05$). Cluster IV 中 *Nitrospira*、*Sphingomonas*、*Lysobacter*与 EC 和 OM 呈



①Mariniflexile; ②Pseudomonas; ③Algoriphagus; ④norank_Anaerolineaceae; ⑤Nitrospira; ⑥Cytophagaceae; ⑦Flavobacterium; ⑧Erwinia; ⑨Bacillus; ⑩Sphingobium; ⑪Devosia; ⑫Sphingopyxis; ⑬Pantoea; ⑭Sphingomonas; ⑮Rhizomicrobium; ⑯Luteimonas; ⑰unclassified_Erythrobacteraceae; ⑱Rhodanobacter

图 5 不同处理菌群与环境因子的 RDA

Fig. 5 Redundancy analysis of bacterial communities and environmental parameters in different treatments



* 表示 $0.01 < P \leq 0.05$, ** 表示 $0.001 < P \leq 0.01$, *** 表示 $P \leq 0.001$

图 6 环境因子与细菌群落组成 Spearman 相关性 Heatmap 图

Fig. 6 Spearman correlation Heatmap to illustrate the environmental factors and bacterial community compositions

显著或极显著负相关($P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$). Cluster I 和 Cluster III 中的菌属与 pH 的相关性结果相反, Cluster II 和 Cluster IV 中的菌属与 EC 和 OM 的结果相反. 分析结果表明根际细菌群落受不同土壤性质

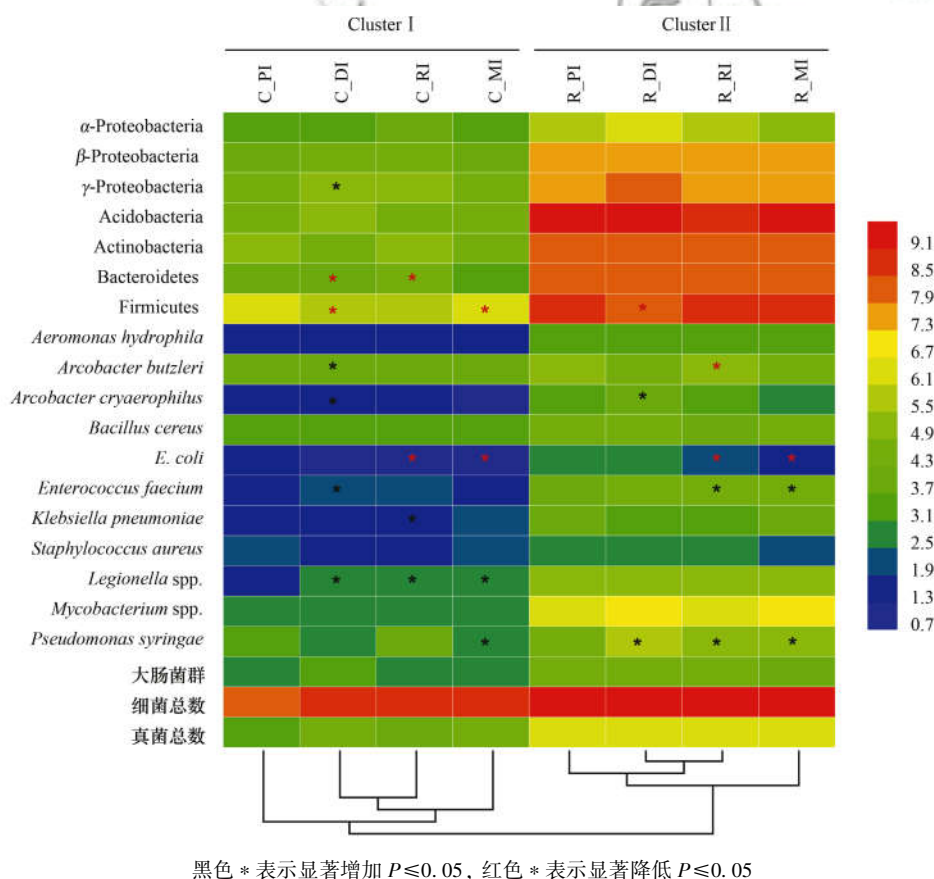
的影响,不同细菌菌属受影响的程度存在差异。

2.3 定量 PCR 结果

为了检验实时荧光定量 PCR 反应的线性关系和动态范围,利用 10 倍梯度稀释构建的已知病原菌质粒以建立标准曲线。在 6 或 8 个稀释倍数确定的标准曲线中,可以得出 Ct 值和 lg(基因拷贝数)之间具有良好的线性关系。扩增效率范围为 87.7%~103.0%,相关系数 R^2 为 0.9894~0.999,斜率在 -3.652~-3.065 之间。

利用特异性引物对不同灌溉处理下辣椒果实和根际土壤中的门水平菌群和病原菌种属进行定量检测,结果如图 7 所示。从中可以看出,辣椒果实和根际土壤根据菌群和病菌的丰度高低分为两簇集合。与 Cluster I(辣椒果实)相比,Cluster II(根际土壤)的菌群丰度明显较高。辣椒果实中,再生水直接灌溉(DI)下 *Arcobacter butzleri*、*Arcobacter*

cryaerophilus、*Enterococcus faecium* 和 *Legionella* spp. 的丰度显著高于其他处理。再生水与清水混灌(MI)处理显著增加了 *Klebsiella pneumoniae* 和 *Legionella* spp. 丰度,再生水与清水轮灌(RI)处理显著增加了 *Pseudomonas syringae* 和 *Legionella* spp. 丰度,而 MI 与 RI 处理的 *E. coli* 丰度则显著降低。根际土壤中,DI 处理 *Arcobacter cryaerophilus* 的丰度显著增加,MI 与 RI 处理下 *Enterococcus faecium* 丰度均显著增加。不同再生水灌溉方式下 *Pseudomonas syringae* 的丰度显著增加,而 MI 和 RI 处理均降低了 *E. coli* 丰度,这与果实表面观察到的结果一致。从定量结果来看,两类样本中的细菌总数和真菌总数并未受灌溉方式的影响而产生显著变化。与果实表面相比,根际菌群的丰度并无显著差异,表明根际菌群的稳定性不易受再生水灌溉方式的扰动。



黑色 * 表示显著增加 $P \leq 0.05$, 红色 * 表示显著降低 $P \leq 0.05$

图 7 不同处理菌群和病原菌丰度定量热图分析

Fig. 7 Quantitative heatmap analysis of the abundances of bacterial communities and pathogens in different treatments

3 讨论

再生水中的 NH_4^+-N 和 TP 是改善土壤肥力、植物生长和作物产量的重要营养物质,并且重金属和有机污染物等毒理指标含量低,利用其灌溉农田既能实现污水资源化,又能通过土壤自身特性净化水

质减少农业环境的污染。然而,再生水具有低 pH,高盐分的特点,并且含有一定量的有机物、表面活性剂和微生物等,这些使再生水灌溉可能会导致土壤性质、作物品质及微生物种群结构发生变化。利用符合国家再生水回用标准的污水处理厂二级出水进行灌溉,发现再生水灌溉对土壤总氮、总磷以及

土壤脲酶和碱性磷酸酶含量无显著影响,并且土壤重金属含量也在风险筛选值范围内.而韩洋等^[25]的研究发现土壤酶活性受再生水灌水水平的影响,再生水充分灌溉使土壤蔗糖酶和过氧化氢酶活性显著增加.有研究表明再生水灌溉会使重金属在土壤表层累积,再生水与地下水轮灌方式则可以缓解重金属对土壤和作物的污染^[26].再生水灌溉和再生水、清水轮灌显著降低了土壤 pH,并增加了土壤 EC 值,这与 Al-Lahham 等^[27]的研究结果一致.已有研究表明高 EC 值的再生水灌溉会导致土壤盐分积聚,增加土壤发生次生盐碱化的风险^[28].

目前,大多数研究都集中于再生水灌溉对土壤理化特性的影响,而对果实表面和根际土壤细菌群落组成的影响没有明确或全面地认识.清水与再生水灌溉的辣椒果实表面和根际土壤细菌群落组成存在显著差异,再生水灌溉方式的不同也影响着细菌的群落组成和相对丰度动态变化.与本研究结果类似,龚雪等^[29]的研究也发现再生水灌溉降低了土壤微生物群落的均匀度,而群落的丰富度有所提高.清水与再生水水质以及再生水灌溉方式的不同对细菌群落相对丰度产生较大影响.辣椒果实表面的优势类群包括 Proteobacteria、Bacteroidetes、Actinobacteria 和 Firmicutes,其中 Proteobacteria 由 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria 组成,观察到的细菌门水平分类类群与已有报道一致^[30].辣椒果实细菌群落以 γ -Proteobacteria 为主,再生水直接灌溉增加了 α -Proteobacteria 和 β -Proteobacteria 的相对丰度,而降低了 γ -Proteobacteria 的相对丰度. γ -Proteobacteria 包含 *Pantoea*、*Salmonella*、*Vibrio*、*Pseudomonas*、*Shigella*、*Xanthomonas* 和 *Erwinia* 等多种病原菌,辣椒果实表面的主要优势菌属有 *Pantoea*、*Pseudomonas*、*Sphingomonas*、*Massilia*、*Bacillus* 和 *Erwinia*,其中多数为植物病原菌.再生水直接灌溉使果实 *Pantoea*、*Pseudomonas* 和 *Erwinia* 菌属的相对丰度显著降低,而混灌和轮灌方式则增加了这些病原菌的丰度.已有研究证实,属于肠杆菌科的 *Pantoea* 和 *Erwinia* 是果实表面常见的植物病原菌,并且易定植于果蔬类作物^[31].*Sphingomonas* 菌属与有机物的降解密切相关,再生水直接灌溉增加了其相对丰度,这可能与再生水水质及含有的菌群有关.果实表面作为植物与环境的直接接触界面,其微生物群落变化不仅与环境因素相关,农业实践也是主要的驱动因素.Ottesen 等^[32]的研究发现番茄果实表面观察到的细菌群落变化并未受不同水源的显著影响,认为与作物直接接触的空气可能是果实表面微生物的主要来

源.再生水具有传播人类和植物病原菌的潜力,本研究中仅观察到少数的人类病原菌属(*Pseudomonas* 和 *Flavobacterium*),可能是测序深度难以检测到低丰度的类群.

根际土壤 Proteobacteria 的相对丰度显著低于果实表面, δ -Proteobacteria 作为果实表面和根际土壤的共有类群,所占比例很小.再生水灌溉的根际土壤 γ -Proteobacteria 和 Bacteroidetes 相对丰度呈增加趋势,而 Actinobacteria 则呈下降趋势,这与 Frenk 等^[33]的研究结果一致.再生水与清水灌溉根际土壤的菌属组成相似,*Pseudomonas* 和 *Mariniflexile* 是再生水灌溉的优势菌属,相对丰度均显著增加.*Pseudomonas* 是常见的人类与植物病原菌,Sofo 等^[34]的研究发现再生水灌溉土壤中潜在人类致病菌 *Pseudomonas* 和 *Acinetobacter* 的丰度增加显著.属于 Bacteroidetes 未知功能的 *Mariniflexile* 通常分离于海水和淡水环境^[35].Li 等^[36]的研究发现,再生水长期灌溉对土壤微生物多样性和丰富度影响并不显著,认为尽管不同土壤区域微生物的种间聚类特征存在差异,但再生水仍可作为替代水源进行长期灌溉.与土壤有机质不同,再生水中的可溶性碳能更直接地输送到根区,从而影响根际微生物群落^[37].RDA 表明 pH、EC 和 OM 是影响再生水灌溉的主要因子,微生物群落丰度随土壤理化指标变化表现出空间差异特征,其中对 *Pseudomonas*、*Flavobacterium* 和 *Erwinia* 等人与植物的病原菌影响较大.Guo 等^[38]的研究结果也发现 pH 对微生物群落结构有显著影响.Spearman 相关性分析也表明 *Pseudomonas*、*Mariniflexile* 和 *Flavobacterium* 与 EC 值呈正相关,原因可能是再生水灌溉使盐分在土壤中积累,为这类微生物的生长营造了有利环境.再生水也可能含有许多与土壤功能相关的活跃细菌,以及一些潜在的病原菌.Ibekwe 等^[39]发现再生水与清水灌溉土壤的微生物多样性无显著差异,并且再生水灌溉土壤中硝化细菌、反硝化细菌、固氮细菌、有机物降解菌以及潜在病原菌的丰度更高.

再生水灌溉对病原菌在土壤与作物中存活和分布的影响一直是再生水安全利用关注的热点问题.本研究采用定量 PCR 方法检测再生水灌溉下辣椒果实表面和土壤中的条件致病菌丰度,发现再生水灌溉使辣椒果实表面 *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*E. faecium* 和 *Legionella* spp. 丰度显著增加,而根际 *A. cryaerophilus*、*E. faecium* 和 *P. syringae* 丰度也相应增加.*Arcobacter* 广泛分布于自然环境中,是专性需氧的条件致病菌,当人体免疫力下降时,可发生感染.*E. faecium* 是许多哺乳动物正常肠道菌

群的一部分, 目前主要被用作人类食物和饮用水中粪便污染的指标, 其在辣椒果实表面和根际土壤的增加说明再生水灌溉引入了一定程度的污染. Gatta 等^[40]的研究发现, 尽管番茄植株和果实中大肠杆菌、粪大肠菌群和细菌总数等卫生指示菌的变化未受灌溉水质的影响, 但灌溉水质的不同却影响着土壤中细菌种群的群落组成和动态. *P. syringae* 是一种引起植物细菌性斑点病的重要病原菌, 可以侵染茄科、豆科和十字花科等多种植物^[41]. *P. syringae* 丰度的增加与 16S 测序结果一致, 这表明再生水也是植物病原菌传播的重要来源和载体. *Legionella* spp. 和 *P. syringae* 不受再生水灌溉方式影响, 丰度均有所增加. 再生水会增加土壤中潜在病原菌的数量, 包括 *E. coli*、*Salmonella* spp.、*Listeria monocytogenes*、*Campylobacter* spp.、*Clostridium* spp.、*Shigella* spp.、*Mycobacterium* spp. 和 *Streptococcus* 等, 表明受污染的灌溉用水可能是果蔬食源性致病菌的来源之一^[42]. *A. hydrophila* 和 *E. coli* 在所有灌溉处理中丰度均很低, 可能原因是其在土壤和果实表面环境快速衰减造成的. Libutti 等^[43]的研究表明, 从再生水灌溉的土壤和作物中未分离出大肠杆菌, 此外, 在作物中发现低浓度的粪大肠菌群和异养细菌数量. 滴灌系统避免了再生水和植物之间的直接接触, 可能是造成这一现象的原因. Hamilton 等^[44]针对生食类蔬菜提出降低再生水灌溉风险的实践措施, 包括地表滴灌、地下滴灌和沟灌等灌溉方式以及采收后的清洗与消毒. 尽管这些病原菌不存在于自然宿主中, 但其某些种类能够在土壤和作物表面长期存活, 从而有可能污染农业环境和危害农产品质量安全.

4 结论

(1) 与清水灌溉相比, 再生水灌溉会降低土壤 pH, 增加土壤 EC 值, 尤其是再生水直接灌溉及再生水与清水混灌在一定程度上对土壤理化特性造成的影响较显著.

(2) 再生水的 pH 和 EC 是导致灌溉辣椒果实表面和根际细菌群落丰度变化的主要因子. 辣椒果实表面细菌群落主要由 Proteobacteria、Bacteroidetes、Actinobacteria 和 Firmicutes 组成, 其中优势菌属包括: *Pantoea*、*Pseudomonas*、*Sphingomonas*、*Massilia* 和 *Bacillus*. 根际细菌群落主要由 Proteobacteria、Bacteroidetes、Actinobacteria、Firmicutes、Chloroflexi 和 Gemmatimonadetes 组成, 其中优势菌属包括 *Pseudomonas*、*Sphingomonas*、*Sphingopyxis*、*Luteimonas*、*Mariniflexile*、*Sphingobium*

和 *Cytophagaceae* 等. 根际细菌多样性较果实表面更丰富, 优势菌属 *Pantoea*、*Pseudomonas*、*Sphingomonas*、*Sphingopyxis*、*Luteimonas* 和 *Mariniflexile* 受再生水灌溉影响显著.

(3) 再生水灌溉增加了辣椒果实表面 γ -Proteobacteria 的丰度, 而降低了 Bacteroidetes 和 Firmicutes 的丰度. 根际菌群丰度并未受再生水及灌溉方式的影响而发生改变. 病原菌在辣椒果实表面和根际土壤均有不同程度的检出, 再生水灌溉方式对 *A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*E. faecium*、*Legionella* spp. 和 *P. syringae* 丰度变化的影响较大.

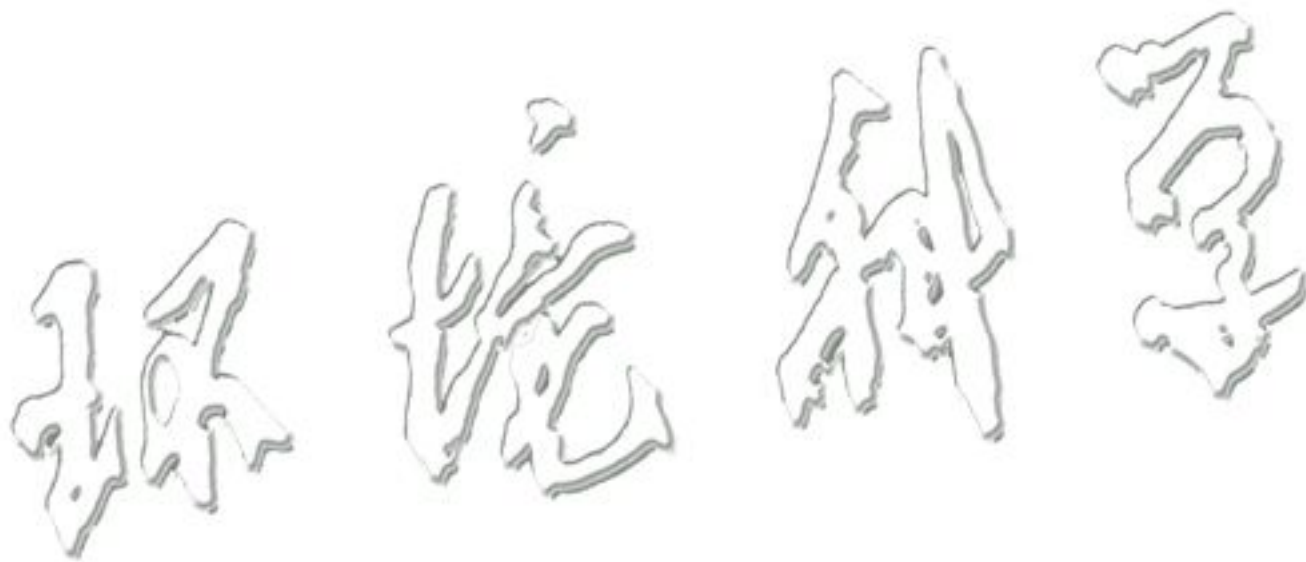
(4) 再生水灌溉对土壤和作物未产生不利影响, 但值得注意的是目前用于灌溉的再生水中仍含有一定量的各类病原菌. 再生水对农业环境微生物群落多样性和病原菌丰度的影响可能表现为从“源”到“汇”的迁移过程. 因此, 再生水引入的微生物污染问题需要重视, 尤其是针对再生水中新兴人类病原菌和植物病原菌的研究有待进一步监测评估.

参考文献:

- [1] 国家发展改革委, 住房城乡建设部. “十三五”全国城镇污水处理及再生利用设施建设规划[EB/OL]. (2016-12-31). http://www.ndrc.gov.cn/zcfb/zcfbghwb/201701/t20170122_836133.html.
- [2] Chen W P, Lu S D, Jiao W T, et al. Reclaimed water: A safe irrigation water source? [J]. Environmental Development, 2013, 8: 74-83.
- [3] Nirit B. Potential for contamination of crops by microbial human pathogens introduced into the soil by irrigation with treated effluent[J]. ISRAEL Journal of Plant Sciences, 2011, 59(2-4): 115-123.
- [4] 韩洋, 齐学斌, 李平, 等. 再生水和清水不同灌水平对土壤理化性质及病原菌分布的影响[J]. 灌溉排水学报, 2018, 37(8): 32-38.
- [5] Han Y, Qi X B, Li P, et al. Effects of the amount of irrigation with reclaimed wastewater on soil properties and distribution of pathogenic bacteria [J]. Journal of Irrigation and Drainage, 2018, 37(8): 32-38.
- [6] Lonigro A, Rubino P, Lacasella V, et al. Faecal pollution on vegetables and soil drip irrigated with treated municipal wastewaters[J]. Agricultural Water Management, 2016, 174: 66-73.
- [7] Zolti A, Green S J, Mordechai E B, et al. Root microbiome response to treated wastewater irrigation[J]. Science of the Total Environment, 2019, 655: 899-907.
- [8] Pascasio S, Crecchio C, Ricciuti P, et al. Phyllosphere and carposphere bacterial communities in olive plants subjected to different cultural practices [J]. International Journal of Plant Biology, 2015, 6(1): 15-19.
- [9] Berg G, Eberl L, Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria [J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(11): 1673-1685.
- [10] Jjemba P K, Weinrich L A, Cheng W, et al. Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water

- distribution systems [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, **76**(13): 4169-4178.
- [10] Xu N, Tan G C, Wang H Y, *et al.* Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure [J]. European Journal of Soil Biology, 2016, **74**: 1-8.
- [11] Fierer N, Jackson J A, Vilgalys R, *et al.* Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(7): 4117-4120.
- [12] Kingombe C I, 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.
- [13] Brightwell G, Mowat E, Clemens R, *et al.* Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, **68**(2): 318-325.
- [14] Wang R F, Cao W W, Cerniglia C E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods [J]. Journal of Applied Microbiology, 1997, **83**(6): 727-736.
- [15] Kaushik R, Balasubramanian R, De La Cruz A A. Influence of air quality on the composition of microbial pathogens in fresh rainwater [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, **78**(8): 2813-2818.
- [16] Scott T M, Jenkins T M, Lukasik J, *et al.* Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution [J]. Environmental Science & Technology, 2005, **39**(1): 283-287.
- [17] Sun F L, Wu D C, Qiu Z G, *et al.* Development of real-time PCR systems based on SYBR Green for the specific detection and quantification of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula [J]. Food Control, 2010, **21**(4): 487-491.
- [18] Brouwer M, Lievens B, Van Hemelrijck W, *et al.* Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, **228**(2): 241-248.
- [19] Brakstad O G, Aasbakk K, Maeland J A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1992, **30**(7): 1654-1660.
- [20] Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, *et al.* Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63**(7): 2489-2494.
- [21] Mendum T A, Chilima B Z, Hirsch P R. The PCR amplification of non-tuberculous mycobacterial 16S rRNA Sequences from soil [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, **185**(2): 189-192.
- [22] Maheux A F, Boudreau D K, Bisson M A, *et al.* Molecular method for detection of total coliforms in drinking water samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, **80**(14): 4074-4084.
- [23] Boon N, Top E M, Verstraete W, *et al.* Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(3): 1511-1520.
- [24] May L A, Smiley B, Schmidt M G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, **47**(9): 829-841.
- [25] 韩洋, 李平, 齐学斌, 等. 再生水不同灌水平对土壤酶活性及耐热大肠菌群分布的影响 [J]. 环境科学, 2018, **39**(9): 4366-4374.
- Han Y, Li P, Qi X B, *et al.* Effects of different levels of irrigation with reclaimed water on soil enzyme activity and distribution of thermotolerant Coliforms [J]. Environmental Science, 2018, **39**(9): 4366-4374.
- [26] 杜娟, 范瑜, 钱新. 再生水农灌过程中重金属迁移规律研究 [J]. 环境污染与防治, 2011, **33**(7): 74-77, 82.
- Du J, Fan Y, Qian X. Migration of heavy metals in the process of recycled water irrigation [J]. Environmental Pollution and Control, 2011, **33**(7): 74-77, 82.
- [27] Al-Lahham O, El Assi N M, Fayyad M. Impact of treated wastewater irrigation on quality attributes and contamination of tomato fruit [J]. Agricultural Water Management, 2003, **61**(1): 51-62.
- [28] 刘源, 崔二苹, 李中阳, 等. 再生水和养殖废水灌溉下土壤-植物系统养分和重金属迁移特征 [J]. 灌溉排水学报, 2018, **37**(2): 45-51.
- Liu Y, Cui E P, Li Z Y, *et al.* Differences of nutrient and heavy metals migration in soil-plant system irrigated by reclaimed water and livestock wastewater [J]. Journal of Irrigation and Drainage, 2018, **37**(2): 45-51.
- [29] 龚雪, 王继华, 关健飞, 等. 再生水灌溉对土壤化学性质及可培养微生物的影响 [J]. 环境科学, 2014, **35**(9): 3572-3579.
- Gong X, Wang J H, Guan J F, *et al.* Impact of reclaimed water irrigation on soil chemical properties and culturable microorganisms [J]. Environmental Science, 2014, **35**(9): 3572-3579.
- [30] Leff J W, Fierer N. Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables [J]. PLoS One, 2013, **8**(3): e59310.
- [31] Abadias M, Usall J, Anguera M, *et al.* Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, **123**(1-2): 121-129.
- [32] Ottesen A, Telias A, White J R, *et al.* Bacteria of tomatoes managed with well water and pond water: impact of agricultural water sources on carposphere microbiota [J]. International Journal of Environmental & Agriculture Research, 2016, **2**: 2454-1850.
- [33] Frenk S, Hadar Y, Minz D. Resilience of soil bacterial community to irrigation with water of different qualities under Mediterranean climate [J]. Environmental Microbiology, 2014, **16**(2): 559-569.
- [34] Sofo A, Mininni A N, Fausto C, *et al.* Evaluation of the possible persistence of potential human pathogenic bacteria in olive orchards irrigated with treated urban wastewater [J]. Science of the Total Environment, 2019, **658**: 763-767.
- [35] Park S, Jung Y T, Yoon J H. *Mariniflexile soesokkakense* sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae isolated from the junction between the North Pacific Ocean and a freshwater spring, and emended description of the genus *Mariniflexile* [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2013, **104**(5): 769-777.
- [36] Li B H, Cao Y T, Guan X Y, *et al.* Microbial assessments of soil with a 40-year history of reclaimed wastewater irrigation [J]. Science of the Total Environment, 2019, **651**: 696-705.
- [37] Becerra-Castro C, Lopes A R, Vaz-Moreira I, *et al.* Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications

- in soil fertility and human and environmental health [J]. *Environment International*, 2015, **75**: 117-135.
- [38] Guo H H, Nasir M, Lv J L, *et al.* Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, **144**: 300-306.
- [39] Ibekwe A M, Gonzalez-Rubio A, Suarez D L. Impact of treated wastewater for irrigation on soil microbial communities [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, **622-623**: 1603-1610.
- [40] Gatta G, Libutti A, Gagliardi A, *et al.* Treated agro-industrial wastewater irrigation of tomato crop: Effects on qualitative/quantitative characteristics of production and microbiological properties of the soil [J]. *Agricultural Water Management*, 2015, **149**: 33-43.
- [41] 管晶晶, 李克梅, 罗明, 等. 新疆加工型辣椒细菌性斑点病的发生和病原鉴定[J]. *植物病理学报*, 2015, **45**(3): 239-247.
- Guan J J, Li K M, Luo M, *et al.* The occurrence and pathogen identification of bacterial leaf spot of processing pepper in Xinjiang[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2015, **45**(3): 239-247.
- [42] Gerba C P, Smith J E Jr. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2005, **34**(1): 42-48.
- [43] Libutti A, Gatta G, Gagliardi A, *et al.* Agro-industrial wastewater reuse for irrigation of a vegetable crop succession under Mediterranean conditions [J]. *Agricultural Water Management*, 2018, **196**: 1-14.
- [44] Hamilton A J, Stagnitti F, Premier R, *et al.* Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(5): 3284-3290.



CONTENTS

Characteristics of Aerosol Vertical Distribution over the Yangtze River Delta Region of China in 2018	SHEN Ji, CAO Nian-wen (4743)
Characteristics of Haze Pollution Episodes During Autumn and Winter in 2018 in Shijiazhuang	SU Wen-kang, BAO Xiao-lei, NI Shuang-ying, <i>et al.</i> (4755)
Spatial Temporal Characteristics and Cluster Analysis of Chemical Components for Ambient PM _{2.5} in Wuhan	ZHANG Hui-tao, TIAN Ying-ze, LIU Bao-shuang, <i>et al.</i> (4764)
Heavy Metal Pollution Characteristics and Ecological and Health Risk Assessment of Atmospheric PM _{2.5} in a Living Area of Zhengzhou City	HE Rui-dong, ZHANG Yi-shun, CHEN Yong-yang, <i>et al.</i> (4774)
Distribution Characteristics and Sources of Metal Elements in Rainwater in Xiamen	WANG Shan-shan, CHENG Yi-feng, YAN Jin-pei, <i>et al.</i> (4783)
First Long-Term Study of Atmospheric New Particle Formation in the Suburb of Shanghai from 2015 to 2017	HUO Jun-tao, WANG Xin-ning, DUAN Yu-sen, <i>et al.</i> (4791)
Characteristics, Transportation, Pathways, and Potential Sources of Air Pollution During Autumn and Winter in Taiyuan	YAN Shi-ming, WANG Yan, GUO Wei, <i>et al.</i> (4801)
Spatial and Temporal Characteristics of Air Quality and Cause Analysis of Heavy Pollution in Northeast China	CHEN Wei-wei, LIU Yang, WU Xue-wei, <i>et al.</i> (4810)
Spatiotemporal Evolution and Driving Mechanism of Aerosol Optical Depth in the Ebinur Lake Basin	CHEN Xiang-yue, DING Jian-li, WANG Jing-zhe, <i>et al.</i> (4824)
Concentration Levels and Impact Factors of Benzene Series in Chinese Residential Building	HOU Bei-bei, YIN Yi-hui, PEI Jing-jing, <i>et al.</i> (4833)
Pollution Characteristics and Source Analysis of Aromatic Compounds in Shijiazhuang	YANG Yang, LI Xing-ru, LIU Shui-qiao, <i>et al.</i> (4841)
Emission Characteristics Analysis and Health Risk Assessment of Unorganized VOCs in the Carbon Industry, Zhengzhou	ZHANG Yi-shun, WANG Jia, HAN Shi-jie, <i>et al.</i> (4847)
Hazardous Volatile Organic Compound Emission Inventory Study and Its Application in a Typical Chemical Industry in the Yangtze River Delta	LU Jun, HUANG Yi-wei, HUANG Cheng (4856)
Establishment and Characteristics of an Artificial Ammonia Emissions Inventory in Jiangsu Province from 2013 to 2017	HOU Xin-hong, YU Xing-na, SHEN Li, <i>et al.</i> (4862)
Occurrence Characteristics and Health Risks of PAHs on the Surface of Buildings and Devices in the Coking Plant	ZHAO Yi-shu, LIAO Xiao-yong, LI You, <i>et al.</i> (4870)
Contamination Characteristics and Ecological Risk Assessment of Androgens, Glucocorticoids, and Progesterone in the Liusha Bay, South China Sea	YANG Lei, ZHANG Jin-na, XU Min, <i>et al.</i> (4879)
Dynamic Changes in Hydrochemical Characteristics and Influencing Factors in the Karst Watershed Flood Process	YUAN Ya-qiong, SUN Ping-an, SU Zhao, <i>et al.</i> (4889)
Sources, Distribution, and Fluxes of Major and Trace Elements in the Yangtze River	WU Wen-tao, RAN Xiang-bin, LI Jing-xi, <i>et al.</i> (4900)
Contaminant Characteristics and Ecological Risk Assessments of Heavy Metals from River Networks in the Western Area of the Wangyu River	XU Chen, WANG Pei-fang, CHEN Juan, <i>et al.</i> (4914)
Influence of Rainfall Intensity on the Nutrient Loading from an Inflowing River in the Plain River Network of the Taihu Catchment	CHEN Jie, ZHU Guang-wei, XU Hai, <i>et al.</i> (4924)
Distribution and Pollution Assessment of Nutrients and Heavy Metals in Surface Sediments from Shibalianwei Wetland in Hefei, Anhui Province, China	CHEN Shan, XU Fan, XIE San-tao, <i>et al.</i> (4932)
Spatial Distribution Characteristics of Chlorophyll-a and Nutrient Salts in Tributaries of Different River Sections in the Three Gorges Reservoir Area During the Flood Season	YANG Fan, YANG Zheng-jian, JI Dao-bin, <i>et al.</i> (4944)
Endogenous Release of Nitrogen and Phosphorus in the Danjiangkou Reservoir	WANG Zhi-qi, LIU Xin-xing, YAO Zhi-hong, <i>et al.</i> (4953)
Correlation Between Water Purification Capacity and Bacterial Community Composition of Different Submerged Macrophytes	LI Lin, YUE Chun-lei, ZHANG Hua, <i>et al.</i> (4962)
Size-dependent Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Performance and Microbial Community Structure of a Constructed Wetland	WANG Sen, REN Ling, LIU Lin-lin, <i>et al.</i> (4971)
Removal of Nitrogen and Phosphorus from Water by Biomass Carbon of Aquatic Plants	LIU Shu-lei, PENG Hui-jun, YANG Jia-yi, <i>et al.</i> (4980)
Preparation of MgO Modified Lotus Shell Biochar and Its Phosphorus Adsorption Characteristics	WANG Sheng-hua, ZHU Dan-chen, SHAO Jing-ai, <i>et al.</i> (4987)
Effects of Microplastics on Membrane Fouling During a Shortened Ultrafiltration Membrane Process	WANG Bo-dong, XUE Wen-jing, LÜ Yong-tao, <i>et al.</i> (4996)
Preparation and Comparison of Arsenic Removal Granular Adsorbent Based on Iron-Manganese Sludge	ZENG Hui-ping, YU Ya-ping, LÜ Sai-sai, <i>et al.</i> (5002)
Catalytic Degradation of Rhodamine B by FeOCl Activated Hydrogen Peroxide	ZHANG Shao-peng, CHEN Yu, BAI Shu-qin, <i>et al.</i> (5009)
Treatment Effect and Ecological Risk Assessment of Typical Antibiotics in Wastewater from Large-scale Dairy Farms in Tianjin	CHEN Qian, ZHAO Run, MOU Mei-rui, <i>et al.</i> (5015)
Distribution Characteristics of Antibiotic Resistance Genes in Wastewater Treatment Plants	YAO Peng-cheng, CHEN Jia-yu, ZHANG Yong-ming, <i>et al.</i> (5024)
Start-up and Stable Operation of CANON Coupled with Denitrifying Phosphorus Removal	YIN Wen, CHEN Ya, ZHANG Yu, <i>et al.</i> (5032)
Control of Sludge Bulking Caused by Unknown Reason Through FeCl ₃ Coupled with Biochemical Methods	WEI Dong-yang, XIAO Cai-lin, ZHOU Wen, <i>et al.</i> (5040)
Effects of Solid Retention Time on the Phosphorus Removal and Nitrosation Granules System	LI Dong, LIU Bo, WANG Wen-qi, <i>et al.</i> (5048)
Start-up of Simultaneous ANAMMOX and Denitrification Process and Changes in Microbial Community Characteristics	SONG Zhuang-zhuang, LÜ Shuang, LIU Zhe, <i>et al.</i> (5057)
Influence of Substrate Exposure Level on ANAMMOX Microbial Activity and Biomass	CHEN Fang-min, GAO Jia-qi, HUANG Yong, <i>et al.</i> (5066)
Pollution Characteristics and Source Analysis of Heavy Metals in Farmland Soils in the Taige Canal Valley	LI Wei-di, CUI Yun-xia, ZENG Cheng-cheng, <i>et al.</i> (5073)
Method of Dividing the Value of Soil Heavy Metal Pollution Risk Screening: Using Cd as an Example	WANG Rui, ZHANG Feng-lei, XU Shu-shu, <i>et al.</i> (5082)
Mineral Characteristics of Arsenic in the Active Area of the Banbishan Gold Mine and Its Effect on Arsenic Accumulation in Farmland Soil	WEN Qi-qian, YAN Xiu-lan, SHEN Jun-feng, <i>et al.</i> (5090)
Remediation of Cadmium Contaminated Paddy Fields Using Soil Conditioners	ZHOU Li-jun, WU Lin, LIN Xiao-bing, <i>et al.</i> (5098)
Inhibition and Remediation of Methylmercury Contaminated Soil by Use of Modified Montmorillonite	HAN Yi-xin, HE Tian-rong, WANG Zu-bo (5107)
Cerium-manganese Modified Biochar Immobilizes Arsenic in Farmland Soils	LIANG Ting, LI Lian-fang, ZHU Chang-xiong, <i>et al.</i> (5114)
Improving Bioremediation of Crude Oil-contaminated Soil by Mild Pre-oxidation	XU Jin-lan, WANG Hui-fang, WANG Rong, <i>et al.</i> (5124)
Community Structure of Heavy Metal Immobilized Bacteria in the Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> L.) Rhizosphere in Soil Polluted by Heavy Metals and Its Effects on Reducing Heavy Metal Accumulation in Lettuce	WANG Tie-jun, SU Nan-nan, LEI Peng, <i>et al.</i> (5133)
Impact of Dicyandiamide (DCD) and 3,4-Dimethylpyrazole Phosphate (DMPP) on Ammonia-oxidizing Bacteria and Archaea in a Vegetable Planting Soil	GUO Jun-li, LIU Yi, WEI Wen-xue, <i>et al.</i> (5142)
Effect of Different Reclaimed Water Irrigation Methods on Bacterial Community Diversity and Pathogen Abundance in the Soil-Pepper Ecosystem	CUI Bing-jian, GAO Feng, HU Chao, <i>et al.</i> (5151)
Characteristics of CO ₂ and N ₂ O Emissions Under Two Land Use Types in the Loess Plateau of China	HAN Jia-le, HAO Shan, LIU Zhen-jie, <i>et al.</i> (5164)
Effects of Biochar on N ₂ O Emission from Four Typical Soils in the North China Plain	ZHANG Xiu-ling, SUN Yun, ZHANG Shui-qing, <i>et al.</i> (5173)
Effects of Optimizing Fertilization on N ₂ O and CH ₄ Emissions in a Paddy-Cowpea Rotation System in the Tropical Region of China	HU Yu-lin, TANG Shui-rong, TAO Kai, <i>et al.</i> (5182)