

# 环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第37卷 第2期

Vol.37 No.2

**2016**

中国科学院生态环境研究中心 主办  
科学出版社 出版



目次

编者按 ..... (403)

我国化学品的风险评价及风险管理 ..... 王铁宇,周云桥,李奇锋,吕永龙 (404)

土地利用回归模型在大气污染时空分异研究中的应用 ..... 吴健生,谢舞丹,李嘉诚 (413)

中国2000~2010年生态足迹变化特征及影响因素 ..... 黄宝荣,崔书红,李颖明 (420)

关中地区冬季PM<sub>2.5</sub>中碳气溶胶的污染特征及来源解析 ..... 田鹏山,曹军骥,韩永明,张宁宁,张蓉,刘随心 (427)

利用SPAMS研究南宁市冬季单颗粒气溶胶化学成分 ..... 刘慧琳,宋红军,陈志明,黄炯丽,杨俊超,毛敬英,李宏姣,梁桂云,莫招育 (434)

南京夏季市区VOCs特征及O<sub>3</sub>生成潜势的相关性分析 ..... 杨笑笑,汤莉莉,张运江,母应峰,王鸣,陈文泰,周宏仓,花艳,江蓉馨 (443)

北京城区气传花粉季节特征及与气象条件关系 ..... 孟龄,王效科,欧阳志云,任玉芬,王巧环 (452)

重庆垃圾焚烧厂汞的分布特征与大气汞排放因子研究 ..... 段振亚,苏海涛,王凤阳,张磊,王书肖,余斌 (459)

三峡库区腹地大气微量金属干湿沉降特征 ..... 张六一,刘源,乔保清,付川,王欢博,黄怡民,杨复沫 (466)

长沙近地面水汽中稳定同位素的监测与分析 ..... 谢宇龙,章新平,姚天次,黄煌 (475)

青藏高原内陆典型冰川区“冰川-径流”汞传输过程 ..... 孙学军,王康,郭军明,康世昌,张国帅,黄杰,丛志远,张强弓 (482)

西藏湖泊沉积物重金属元素特征及生态风险评估 ..... 郭泌汐,刘勇勤,张凡,侯居峙,张宏波 (490)

坦噶尼喀湖东北部入湖河流沉积物重金属分布特征与生态风险评价 ..... 余成,陈爽,张路 (499)

近百年来新疆博斯腾湖多环芳烃的组成及变化特征 ..... 沈贝贝,吴敬禄,赵中华,曾海鳌,金苗 (507)

舟山青浜岛不同环境介质中PAHs的分布特征 ..... 郑煌,邢新丽,顾延生,桂福坤,祁士华,黄煊芳 (513)

模拟排水沟渠非点源溶质氮迁移实验研究 ..... 李强坤,宋常吉,胡亚伟,彭聪,马强,姜正曦,琚艺萌 (520)

中田河流域景观异质性对水体总氮浓度影响研究 ..... 王晶萍,李兆富,刘红玉,王刚,辛强 (527)

江西香溪流域干湿季交替下底泥氮释放机制及其对流域氮输出的贡献 ..... 韩宁,郝卓,徐亚娟,高扬,于贵瑞 (534)

巢湖水体氮磷营养盐时空分布特征 ..... 奚姗姗,周春财,刘桂建,吴蕾,王培华 (542)

合肥城郊典型农田溪流系统沉积物磷形态及释放风险分析 ..... 裴婷婷,李如忠,高苏蒂,罗月颖 (548)

桑沟湾表层沉积物性质及对磷的吸附特征 ..... 朱佳美,曹晓燕,刘素美,王丽莎,杨桂朋,葛成凤,路敏 (558)

苏州市古城区降雨径流颗粒物粒径分布及污染物赋存形态 ..... 李淮,吴玮,田永静,黄天寅 (565)

洪泽湖有毒和无毒微囊藻丰度及其与环境因子之间的相关分析 ..... 李大命,张彤晴,唐晟凯,段翠兰,杨俊虎,穆欢,刘小维 (573)

三峡库区消落带水体CDOM中电荷转移配合物对其紫外-可见吸收光谱的影响 ..... 江韬,梁俭,张慕雪,王定勇,魏世强,卢松 (580)

pH对高锰酸钾氧化降解苯胺类化合物动力学的影响 ..... 王辉,孙波,关小红 (588)

EDTA对Pd/Fe体系还原脱氯2,4-D的影响 ..... 周红艺,聂亚中,陈勇,雷双健 (595)

镍铝层状氧化物薄膜电极的制备及其除盐性能 ..... 王婷,朱春山,胡承志 (602)

微生物对砷的氧化还原竞争 ..... 杨婷婷,柏耀辉,梁金松,霍旻,王明星,袁林江 (609)

处理水产养殖污水潜流湿地中的厌氧氨氧化菌群特征 ..... 曾宪磊,刘兴国,吴宗凡,时旭,陆诗敏 (615)

污水回用中主要病原菌解析及其紫外消毒效应 ..... 景明,王磊 (622)

异养硝化-好氧反硝化菌 *Burkholderia* sp. YX02 强化连续流反应器中微生物群落结构解析 ..... 邵基伦,曹刚,李紫惠,黄郑郑,罗恺,莫渊辉 (630)

基于新一代测序技术的A<sup>2</sup>O与BIOLAK活性污泥宏基因组比较分析 ..... 田美,刘汉湖,申欣 (638)

1株海洋异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性 ..... 孙庆花,于德爽,张培玉,林学政,李津 (647)

纳米Ni/Fe用于去除染料生产废水二级生物处理出水中AOX和色度的研究 ..... 舒小铭,徐灿灿,刘锐,赵远,陈吕军 (655)

3BER-S工艺用于再生水深度脱氮同步去除PAEs的可行性 ..... 徐鹏程,郝瑞霞,张娅,王冬月,钟丽燕,徐浩丹 (662)

合成时间对钛酸盐纳米材料的影响及其吸附水中铅的性能研究 ..... 范功端,陈丽茹,林茹晶,林茜,苏昭越,林修咏 (668)

芦苇秸秆生物炭对水中菲和1,1-二氯乙烯的吸附特性 ..... 吴晴雯,孟梁,张志豪,罗启仕,杨洁 (680)

芦苇基和污泥基生物炭对水体中诺氟沙星的吸附性能 ..... 张涵瑜,王兆炜,高俊红,朱俊民,谢超然,谢晓芸 (689)

季节性温度升高对落干期消落带土壤氮矿化影响 ..... 林俊杰,张帅,刘丹,周斌,肖晓君,马慧燕,于志国 (697)

增温及秸秆施用对冬小麦田土壤呼吸和酶活性的影响 ..... 陈书涛,桑琳,张旭,胡正华 (703)

基于GIS的银川市不同功能区土壤重金属污染评价及分布特征 ..... 王幼奇,白一茹,王建宇 (710)

不同产地硅藻土原位控制土壤镉污染差异效应与机制 ..... 朱健,王平,林艳,雷明婧,陈仰 (717)

紫色土对邻苯二甲酸二甲酯的淋溶吸持特征及影响因素 ..... 王强,宋娇艳,曾微,王法 (726)

几种修复措施对Cd淋失及土壤剖面运移影响 ..... 刘孝利,曾昭霞,铁柏清,陈求稳,魏祥东 (734)

河北邯郸钢铁冶炼区周边麦田土和小麦籽粒的多环芳烃含量及其组分谱特征 ..... 吴迪,汪宜龙,刘伟健,陈源琛,付晓芳,陶澍,刘文新 (740)

湿生环境中丛枝菌根(AM)对香蒲耐Cd胁迫的影响 ..... 罗鹏程,李航,王曙光 (750)

溴酸盐对水生生物的急性毒性效应 ..... 王执伟,刘冬梅,张文娟,崔福义 (756)

自组装哑铃状Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>微/纳米材料对十溴联苯的热催化降解 ..... 黄鑫辰,宗刚,刘焯焯,芦会杰,李倩倩,李宾克,赵彦辉,苏贵金 (765)

盐度对准好氧矿化垃圾生物反应器渗滤液处理及N<sub>2</sub>O产生的影响 ..... 李卫华,孙英杰,刘子梁,马强,杨强 (775)

污泥直接干化尾气中恶臭污染物重要性评价:以指标权重评分法为例 ..... 丁文杰,陈文和,邓明佳,罗辉,李琳,刘俊新 (782)

《环境科学》征订启事(557) 《环境科学》征稿简则(594) 信息(419,442,781)

# 污水回用中主要病原菌解析及其紫外消毒效应

景明<sup>1,2</sup>, 王磊<sup>2\*</sup>

(1. 苏州市环境监测中心, 苏州 215004; 2. 同济大学环境科学与工程学院, 上海 200092)

**摘要:** 本研究以污水处理厂二级出水中的微生物为研究对象, 通过 454 焦磷酸测序技术分析其群落结构组成, 揭示了主要病原菌的种类和比例; 通过培养法、qPCR、Q-RT-PCR 这 3 种方法分析紫外剂量为  $60 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$  时对指示菌大肠杆菌和典型病原菌沙门氏菌及分枝杆菌的去除特性. 结果表明, 二级出水中共有 11 种病原菌, 主要为梭菌属 (2.96%)、弓形杆菌属 (0.82%) 和分枝杆菌 (0.36%).  $60 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$  剂量的紫外消毒可以有效去除 99.9% 可培养的大肠杆菌和沙门氏菌, 对可培养分枝杆菌的去除率不足 90%. 但是, 该剂量紫外消毒对活性大肠杆菌、沙门氏菌和分枝杆菌的去除率较低, Q-RT-PCR 检测方法可以较准确评价微生物的存活状态.  $60 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$  紫外剂量会导致大量病原菌进入具有活性但不可培养 (VBNC) 状态, 需结合其他深度处理工艺进一步去除活性病原菌以保障污水回用的安全利用.

**关键词:** 454 焦磷酸测序; qPCR; Q-RT-PCR; 污水回用; 病原菌; 沙门氏菌; 分枝杆菌

中图分类号: X172; X835 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2016)02-0622-08 DOI: 10.13227/j.hjkk.2016.02.030

## Analysis of Pathogenic Bacteria in Reclaimed Water and Impact of UV Disinfection on the Removal of Pathogenic Bacteria

JING Ming<sup>1,2</sup>, WANG Lei<sup>2\*</sup>

(1. Suzhou Environmental Monitoring Center, Suzhou 215004, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

**Abstract:** In the study, 454-pyrosequencing technology was employed to investigate the species of pathogenic bacteria and the proportion of each pathogen in secondary effluent. Culture-based, qPCR and Q-RT-PCR methods were employed to analyze the removal of indicator (*E. coli*) and pathogen (*Salmonella* and *Mycobacterium*) by ultraviolet (UV) disinfection at a dose of  $60 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ . The results showed that 11 kinds of pathogenic bacteria were found and the most abundant potentially pathogenic bacteria in the secondary effluent were affiliated with the genera of *Clostridium* (2.96%), *Arcobacter* (0.82%) and *Mycobacterium* (0.36%). 99.9% of culturable *E. coli* and *Salmonella* were removed by UV disinfection ( $60 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), however, less than 90% of culturable *Mycobacterium* were removed. The removal efficiencies of viable *E. coli*, *Salmonella* and *Mycobacterium* were low. Q-RT-PCR seemed to be a promising method for evaluating viable microorganisms in samples. Besides, pathogenic bacteria entered into VBNC state at a UV dose of  $60 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Other advanced treatment processes were needed to ensure safe utilization of reclaimed water.

**Key words:** 454 pyrosequencing; qPCR; Q-RT-PCR; wastewater reclamation; pathogen; *Salmonella*; *Mycobacterium*

污水回用是解决我国水资源短缺的主要途径, 消毒是保证污水回用卫生学安全的主要工艺, 紫外消毒具有广谱的杀菌作用, 且较少形成消毒副产物<sup>[1,2]</sup>, 生态风险小, 已经成为污水回用的常用消毒方法. 紫外消毒的作用机理是在波长为 200 ~ 300 nm 的紫外线照射下, 微生物 DNA 分子上的胸腺嘧啶形成嘧啶二聚体, 抑制了基因的转录和翻译过程<sup>[3]</sup>, 从而杀死细胞. 目前, 污水回用紫外消毒的研究主要集中在水质对消毒效果的影响<sup>[4]</sup>, 而紫外消毒对微生物的作用主要集中在饮用水处理方面<sup>[5,6]</sup>. 污水中微生物浓度相对较高, 含有多种病原菌包括沙门氏菌、分枝杆菌、军团菌等<sup>[7]</sup>, 此外二级出水中化学污染物的浓度相对较高, 成分相对复杂<sup>[4]</sup>, 因此紫外消毒对水中微生物的影响与饮用水不同. 目前, 水环境细菌的检测仍以培养法为主.

无法较好地指示活性菌的存在, qPCR 技术能够较好地指示细菌的存在, 但无法区分活性菌与非活性菌, 高估了样品中活性病原菌的浓度进而无法很好地评估污水回用的风险<sup>[8]</sup>. RNA 半衰期较短, 在非活性菌内会快速降解而在活性体内稳定存在, 可以很好地指示活性菌的存在. 有学者建立的基于 RNA 的 Q-RT-PCR 技术能快速、灵敏地检测活性菌<sup>[9]</sup>. 已有研究中, 通过揭示二级出水中微生物 (特别是病原菌) 群落结构, 进而考察紫外消毒对污水回用

收稿日期: 2015-03-31; 修订日期: 2015-09-22

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2011ZX07506-003-005); 国家自然科学基金项目 (21177093); 生物多样性与生态工程教育部重点实验室开放基金项目

作者简介: 景明 (1986 ~), 男, 硕士研究生, 工程师, 主要研究方向为基于分子生物学的水环境中微生物的检测, E-mail: jing\_m2012@sina.cn

\* 通讯联系人, E-mail: celwang@tongji.edu.cn

中主要活性病原菌存在情况的研究较少。

鉴于此,本研究首先采用 454 焦磷酸测序技术,分析二级出水中微生物(特别是病原菌)群落结构特性,揭示二级出水中常见的几种病原菌;然后采用培养法、qPCR 及 Q-RT-PCR 方法考察了紫外消毒对该污水厂二级除水中指示菌(大肠杆菌)和病原菌(沙门氏菌、分枝杆菌)的去除特性,以期为污水回用中病原菌的去除工艺提供一些参考,保障污水回用的卫生学安全。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集及实验设置

本研究样品采自南方某生活污水处理厂二级出水,该厂采用传统活性污泥法,二级处理采用空气曝气活性污泥法,该厂进水与出水的水质参数情况如表 1 所示。二级出水的取样体积为 5 L。样品取好后放置于采样箱(内置冰块)中,于 2 h 内运回实验室,1 L 水样用于群落结构分析。共采样 5 次。

表 1 本实验用再生水的水质参数

Table 1 Water quality parameters of reclaimed waters used in this study

项目	进水	出水
pH	7.34	6.97
氨氮/mg·L <sup>-1</sup>	14.4	0.15
化学需氧量/mg·L <sup>-1</sup>	264	17.9
生化需氧量/mg·L <sup>-1</sup>	259	0.9
悬浮物/mg·L <sup>-1</sup>	172	5
总氮/mg·L <sup>-1</sup>	15.6	5.02
总磷/mg·L <sup>-1</sup>	3.52	0.13

紫外消毒对病原菌的影响在实验室进行。紫外辐射采用超净台中的紫外灯管(苏信净化设备生产厂,产品型号:YJ 1320)进行。经紫外辐射计测定,本研究采用的紫外灯管对实验中水样放置区域的紫外照射强度均匀。实验中采用校准的紫外辐射计对玻璃杯处的紫外强度为 0.1 mW·cm<sup>-2</sup>。将 1.5 L 水样倒入 2L 烧杯中,放入磁性转子,将烧杯放在磁力搅拌器上,打开超净台的紫外灯,使得水样接受紫外照射。实验所需的紫外线剂量(mJ·cm<sup>-2</sup>)=紫外线强度(mW·cm<sup>-2</sup>)×照射时间(s)。

《城镇给排水紫外线消毒设备》标准(GB/T 19857-2005)规定:城镇生活饮用水的技术标准为 40 mJ·cm<sup>-2</sup>,中水回用的技术标准 80 mJ·cm<sup>-2</sup>,城镇污水的技术标准为 15 mJ·cm<sup>-2</sup>(一级 B 标准),城镇污水的技术标准为 20 mJ·cm<sup>-2</sup>(一级 A 标准)。紫外线消毒设备应用于城市杂用水、景观环境用水

时,应分别达到 GB-T 18920 和 GB-T 50335 中的卫生学指标要求。再生水作为景观环境用水时粪大肠菌群要求小于 200 CFU·L<sup>-1</sup>。本研究中,设定紫外线剂量 20、40、60、80 mJ·cm<sup>-2</sup>时,分别用培养法检测粪大肠菌群的浓度水平,考察不同紫外剂量对本样品中微生物的去除水平,以选择合适的紫外剂量。

经选择,考虑经济成本,最终设定紫外线剂量为 60 mJ·cm<sup>-2</sup>,即照射时间为 10 min。照射后在黑暗条件下放置 12 h。本实验在室温环境下进行,反应终止后采用培养法和 qPCR 及 Q-RT-PCR 检测消毒前后大肠杆菌、沙门氏菌及分枝杆菌的浓度。

### 1.2 二级出水中微生物多样性分析

#### 1.2.1 DNA 的提取

将 1L 水样经醋酸纤维素滤膜过滤,将过滤下的物质于滤膜一同转入 15 mL 无菌离心管中,加入 10 mL 灭菌后的 PBS 在漩涡振荡器上洗脱过滤截留的颗粒物。将滤膜取出,离心管置于 4℃ 离心 10 min,转速设为 10 000 r·min<sup>-1</sup>(日立,型号:CF16RN)。弃去上清液,将底部物质转移到 2 mL 离心管中,于 4℃ 离心 5 min,转速为 12 000 r·min<sup>-1</sup>。弃去上清液,管内留 500 μL 液体进行 DNA 的提取。DNA 提取采用 FastDNA® Spin Kit for Soil(MP Biomedicals,产品编号:6560200)试剂盒,具体操作过程按说明书进行。最后得到 DNA 体积为 50 μL。对得到的 DNA 进行纯化,采用 Universal DNA 纯化回收试剂盒(天根,产品编号:DP214)。提取后的 DNA 用于 454 焦磷酸测序。

#### 1.2.2 PCR 扩增

PCR 扩增区域为细菌 16S rRNA 的 V1 ~ V3 区,扩增长度为 500 bp。上游引物为:27F:5'-融合 A-标签-CA 接头-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3',下游引物为:533R:5'-融合 B-TC 接头-TTACCGCGG CTGCTGGCAC-3'。为了区分同一体系中的不同样品,在引物前端加入一个 10 bp 的标签。PCR 反应体系为 50 μL:5 × FastPfu Buffer 10 μL; 2.5 μmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 5 μL; 5 μmol·L<sup>-1</sup> 上下游引物 2 μL; FastPfu Polymerase 1 μL; DNA 模板 100 ~ 200 ng; 其余用双蒸水补足 50 μL。PCR 扩增反应程序为:先 95℃ 2 min; 然后进行 30 个循环(95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s),最后 72℃ 10 min。将 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳在 500 bp 位置处检测到条带,将 PCR 产物用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction 凝胶回收试剂盒(TaKaRa,产品号:9762)回收 PCR 产物。采用分光光度计测定 DNA

的浓度及质量(Nanodrop-2000c).

### 1.2.3 454 文库构建和测序

应用高通量测序平台 GS 454 FLX Titanium(美国 Roche 公司)对标记的 PCR 产物进行测序. 测序完成后对所得序列进行处理,处理原则如下:①检测标签的完整性,弃去标签不完整的序列(即使只有一个碱基对发生错误);②弃去片段长度低于 200 bp 的序列;③去除尾部质量数低于 20 的末端序列;④保证每个样品系列中 80% 以上碱基的序列质量数大于 20<sup>[10]</sup>.

### 1.2.4 测序结果分析及分类学分析

对 1.2.3 节得到的有效序列比对至 SILVA 数据库([http://www.mothur.org/w/images/9/98/Silva\\_bacteria.zip](http://www.mothur.org/w/images/9/98/Silva_bacteria.zip))的 16S rRNA 序列上,去除目标区域以外的序列. 利用 mothur 软件(<http://www.mothur.org>),根据每组中的重复序列,去除嵌合体(chimera)序列,通过对 RDP 数据库中([http://www.mothur.org/w/images/5/59/Trainset9\\_032012.pds.zip](http://www.mothur.org/w/images/5/59/Trainset9_032012.pds.zip))的 PDS 序列进行比对,排除叶绿体、线粒体、古细菌、真核序列的干扰. 根据序列的相似性,将之归为多个 OUT. 选择相似水平为 0.03 的进行后续分析,构建稀疏曲线. 利用 mothur 软件计算样本的 Chao 丰度指数(<http://www.mothur.org/wiki/Chao>), Shannon 多样性指数

(<http://www.mothur.org/wiki/Shannon>), Simpson 多样性指数(<http://www.mothur.org/wiki/Simpson>),覆盖度指数(<http://www.mothur.org/wiki/Coverage>)及 Pielou 均匀度指数([http://en.wikipedia.org/wiki/Species\\_evenness](http://en.wikipedia.org/wiki/Species_evenness)).

### 1.3 细菌的检测

本研究中选择常用的指示菌大肠杆菌作为目标指示菌. 对测序结果进行分析,最终选择沙门氏菌和分枝杆菌作为待检测的病原菌. 分别采用培养法、qPCR 及 Q-RT-PCR 方法检测水样中细菌的浓度水平.

#### 1.3.1 培养法

大肠杆菌、沙门氏菌及分枝杆菌的培养法检测参考文献[11]进行.

#### 1.3.2 DNA 提取

消毒前病原菌的分析采用 1.2.1 节提取得到的 DNA. 消毒后浓缩 1L 待测样品,提取过程按照 1.2.1 节进行.

#### 1.3.3 qPCR

##### (1)qPCR 引物及探针的选择

本研究中大肠杆菌和分枝杆菌的 qPCR 检测采用 SYBR<sup>®</sup> Green qPCR. 采用 Taqman<sup>®</sup> qPCR 定量检测沙门氏菌. 所采用的目的基因和相应引物序列见表 2.

表 2 定量 PCR 采用的目的基因和相应引物序列  
Table 2 Gene targets and primers used for qPCR detection

引物名称	目的基因	序列(5'-3')	产物长度/bp	文献
<i>E. coli</i>				
<i>uidA</i> -F	<i>uidA</i>	ATGGAATTTTCGCCGATTTTGC	167	[12]
<i>uidA</i> -R		ATTGTTGCCTCCCTGCTGC		
<i>Mycobacterium</i> spp.				
Tb11	<i>hsp65</i>	ACCAACGATGGTGTGTCCAT	441	[13]
Tb12		CTTGTCGAACCGCATAACCT		
<i>Salmonella</i> spp.				
<i>invA</i> -156f	<i>invA</i>	CATTTCTATGTTTCGTCATFCCATTACC	132	[14]
<i>invA</i> -288r		AGGAAACGTTGAAAACTGAGGATFCT		
<i>invA</i> -189p		6FAM-TCTGGTTGATTTCTGATCGCGCTGAATATC-TAMRA		

##### (2)qPCR 标准品的制备

标准品采用质粒标准品,制作方法参见文献[15],制备含有 *uidA*、*invA* 和 *hsp65* 基因的质粒 DNA.

大肠杆菌标准品构建过程中采用大肠杆菌和与 *uidA* 基因相应的引物,沙门氏菌和与 *invA* 基因相应的引物,分枝杆菌标准品的构建采用分枝杆菌和 *hsp65* 基因相应的引物,目标基因经 PCR 扩增之后

将特异性产物连接入 pCR 2.1-TOPO 载体(Invitrogen)中,经过酶切鉴定测序分析和质粒提取等步骤获得大肠杆菌 DNA 标准品. 采用核酸蛋白仪测量 DNA 的浓度. 将得到的质粒 DNA 按 10 倍梯度稀释,制得 qPCR 标准品.

##### (3)qPCR 测定

大肠杆菌及分枝杆菌 qPCR (TaKaRa, Code: DRR041A)反应体系为(20  $\mu$ L);SYBR<sup>®</sup> Premix Ex

Taq<sup>TM</sup> 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$  (终浓度 0.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), DNA (标准品或样品) 5  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 4  $\mu\text{L}$ . 沙门细菌 qPCR (TaKaRa, Code: DRR039A) 反应体系为 (25  $\mu\text{L}$ ): Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 12.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 2.5  $\mu\text{L}$  (终浓度 1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Taqman<sup>®</sup> 荧光探针 1  $\mu\text{L}$  (终浓度 0.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), DNA (标准品或样品) 5  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 1.5  $\mu\text{L}$  补足体积至 25  $\mu\text{L}$ .

大肠杆菌反应程序如下: 1 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min; 40 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ , 15 s (收集荧光); 熔解曲线的过程: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min, 从 60 $^{\circ}\text{C}$  开始每 30 s 温度升高 0.5 $^{\circ}\text{C}$ , 总共进行 71 个循环, 结束温度为 95 $^{\circ}\text{C}$ , 反应结束之后 4 $^{\circ}\text{C}$  保存.

沙门氏菌反应程序如下: 1 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 10 min; 40 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ , 25 s (收集荧光); 不设置熔解曲线, 反应结束之后 4 $^{\circ}\text{C}$  保存.

分枝杆菌反应程序如下: 1 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ , 1 min; 40 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ , 60 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ , 60 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ , 60 s (收集荧光); 熔解曲线过程为同大肠杆菌.

每次定量 PCR 反应都设空白对照 (以相同体积的双蒸水取代 DNA), 每次测定设 2 个平行样.

### 1.3.4 Q-RT-PCR

Q-RT-PCR 标准品的制备参考文献[7].

样品的浓缩参照 1.2.1. RNA 的提取采用 Fast RNA<sup>®</sup> Pro Soil - Direct Kit (MP Biomedical, 产品编号: 116070050).

## 2 结果与讨论

### 2.1 二级出水中微生物群落结构组成

#### 2.1.1 微生物多样性分析

通过对 5 个批次样品 16S rRNA 基因文库进行焦磷酸测序, 经修剪去杂后, 共获得 1 128、1 299、1 292、1 019 和 1 462 条优化序列, 序列平均长度为 545 bp. 将优化序列截齐后与 SILVA 比对后进行聚类, 在 97% 相似性下分别获得 252、264、375、315 和 554 OTUs, 稀疏曲线如图 1 所示. 从中可知, 当测序数量超过 1 000 时, 仍有新的 OUT 可被测出. 稀疏曲线随测序序列增加趋向平坦, 表明本研究样本取样量合理. 表 3 列出了  $\alpha$  多样性分析各样品的多样性指数.

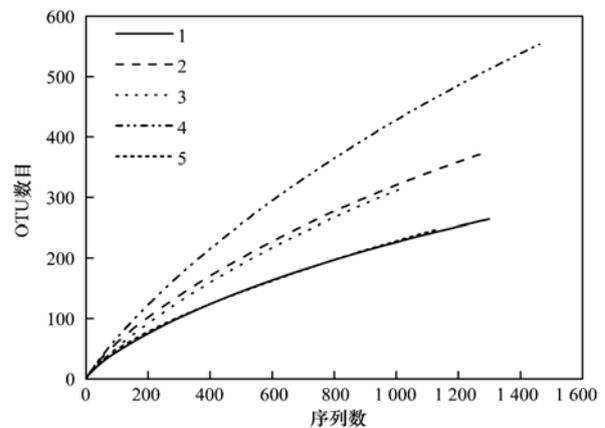


图 1 二级出水样品的稀疏曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of secondary effluent samples

表 3 二级出水中微生物物种丰富度和多样性评价

Table 3 Richness and diversity estimators of bacteria in secondary effluent samples

样品批次	OTU	覆盖度指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Pielou 均匀度
1	252	0.859 0	578	4.184 3	0.037 5	0.759 5
2	264	0.883 8	473	3.814 5	0.089 4	0.684 1
3	375	0.825 9	716	4.669 9	0.038 8	0.787 9
4	315	0.791 0	726	3.959 3	0.135 5	0.688 3
5	554	0.752 4	1 170	5.061 1	0.049 5	0.801 2

对测序结果进行门的组成进行分析 (对 5 个样品的测得结果进行累计, 当细菌门比例小于 1% 时, 划入其他类别), 分析结果如图 2 所示. 相似性为 97% 时, 样品中共检测到 21 个门, 包括酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、(Armatimonadetes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)、Deinococcus-Thermus、厚壁菌门 (Firmicutes)、梭杆菌门 (Fusobacteria)、Gemmatimonadete、硝化螺旋菌门 (Nitrospira)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、变形菌

门 (Proteobacteria)、螺旋菌门 (Spirochaetes)、互养菌门 (Synergistetes) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia). 样品中有 794 条序列不能被分入已知菌门, 这些细菌可能是未知菌种.

由图 2 可知, 样品中包括蓝细菌门 (Cyanobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria) 这 4 个主要门及未定菌 (OD1) 和其它未分类菌. Ye 等<sup>[16]</sup> 在研究香港一座采用活性污泥法的污水厂微生物群落结构中发现, 污水厂二级出水中变形菌门

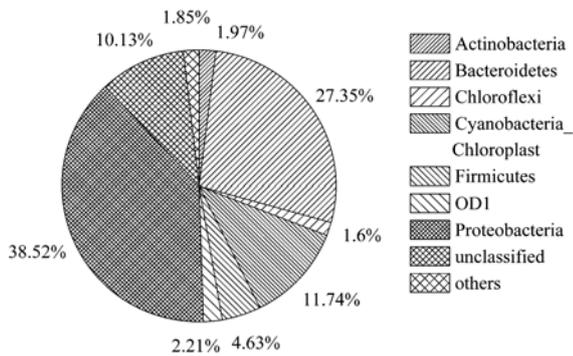


图2 样品中细菌群落结构门比例组成

Fig. 2 Proportion of bacterial community structure in the sample

(Proteobacteria) 是最主要的细菌群。Lee 等<sup>[17]</sup> 在研究首尔不同污水厂进水及活性污泥的微生物群落结构中同样也发现, 变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 及厚壁菌门 (Firmicutes) 是依次最主要的 3 个细菌群。Shu 等<sup>[18]</sup> 在研究陕西 6 座污水处理厂 (包括工业污水处理厂及市政污水处

理厂) 厌氧消化污泥的微生物群落结构中, 也得到了同样的结论, 变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 及厚壁菌门 (Firmicutes) 是依次主要的 4 个细菌群。本研究得到的结论与这些研究结果相一致。

对两个主要门变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 进行进一步分析, 结果如图 3 所示。

由图 3 (a) 可知, 变形菌门 (Proteobacteria) 主要由  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -Proteobacteria 这 3 个主要亚纲组成, 分别为 23.9%、43.5% 和 12.9%。值得注意的是  $\beta$ -Proteobacteria 亚纲包含许多种类的致病菌, 在本研究中也检测到。由图 3 (b) 可知, 拟杆菌门 (Bacteroidetes) 主要由 Flavobacteria、Sphingobacteria 和 Bacteroidia 这 3 个主要纲组成, 分别为 79.5%、11.6% 和 2.5%。上述研究结果与 Hu 等<sup>[10]</sup> 的研究结果相一致。

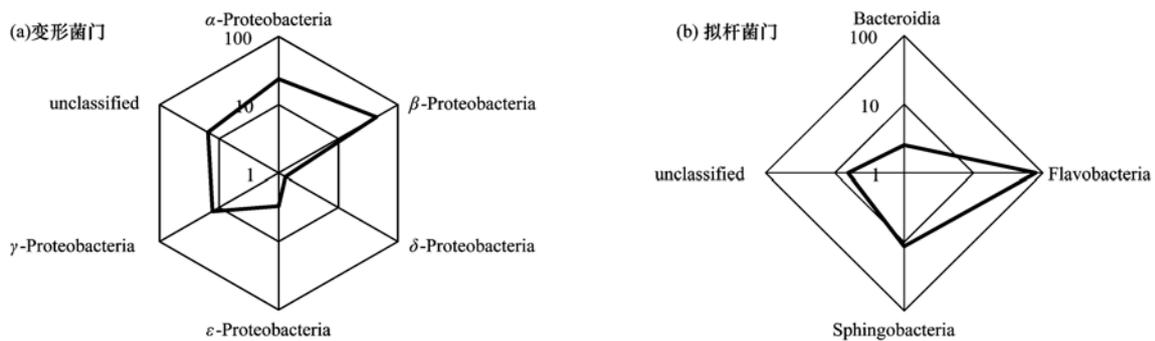


图3 样品中细菌群落结构纲水平比例组成

Fig. 3 Proportion of bacterial community structure at class level in the sample

### 2.1.2 主要病原菌解析

病原菌的去除是保障污水回用卫生学安全的重要组成部分。综合国内外研究病原菌分类<sup>[19, 20]</sup>, 本研究共发现 11 种病原菌 (表 4), 其中梭菌属 (*Clostridium*)、弓形杆菌属 (*Arcobacter*) 和分支杆菌 (*Mycobacterium*) 的含量较高, 此外常见的病原菌埃希氏菌和志贺氏菌 (*Escherichia* 和 *Shigella*) 和军团菌 (*Legionella*) 也均检测到。弓形杆菌属 (*Arcobacter*) 是革兰氏阴性螺旋形微生物, 属于弯曲杆菌科<sup>[21]</sup>, 会引起腹泻、腹痛等症状。对一些消毒剂 (如紫外消毒) 的耐受性较强, 在深度处理过程中较难去除<sup>[22]</sup>。分支杆菌属 (*Mycobacterium*) 大部分种类是机会致病菌, 可能会引起系列人类感染疾病 (如支原体肺炎)<sup>[23]</sup>。分支杆菌是革兰氏阳性菌, 其特殊的生理性能 (包括生长缓慢、细胞膜较厚、疏

水性的细胞膜) 使得其对各种消毒剂具有较好的抗性<sup>[24]</sup>。此外, 该细菌可以寄生于阿米巴虫身上, 进一步增强了他们的耐消毒性<sup>[25]</sup>。在污水回用中需采用别的处理方法 (如膜处理等) 进行去除。梭菌属 (*Clostridium*) 是革兰氏阳性菌, 在污水处理厂中普遍存在<sup>[19]</sup>, 会引起破伤风等各类疾病。梭菌属为专性厌氧微生物, 能形成孢子, 使其对氧化性消毒剂具有极强的耐受性<sup>[26]</sup>。但是, 梭菌属对紫外消毒则较为敏感<sup>[27, 28]</sup>, 这主要由于紫外消毒并不是通过氧化作用破坏细胞结构, 而是直接导致核酸突变, 阻碍其复制和转录, 封锁及阻碍蛋白质的合成同时产生的自由基可引起光电离, 最终导致微生物死亡<sup>[29, 30]</sup>。不同病原菌的生理特性不同, 在深度处理过程中应结合不同病原菌的生理特性设置处理来去除污水中的病原菌。

表 4 样品中各病原菌比例

Table 4 Proportion of pathogenic bacteria in the sample

病原菌	序列数目	占总序列百分比/%	占病原菌百分比/%
<i>Arcobacter</i>	50	16.13	0.82
<i>Clostridium</i>	181	58.39	2.96
<i>Escherichia</i> 和 <i>Shigella</i>	44	14.19	0.72
<i>Legionella</i>	7	2.26	0.11
<i>Leptospira</i>	1	0.32	0.02
<i>Pseudomonas</i>	1	0.32	0.02
<i>Streptococcus</i>	2	0.65	0.03
<i>Treponema</i>	0	0.00	0.00
<i>Mycobacterium</i>	22	7.10	0.36
<i>Bacillus</i>	2	0.65	0.03

## 2.2 紫外消毒对指示菌与病原菌的杀灭特性细菌的影响

不同紫外剂量下,大肠杆菌的去除效果如图 4 所示. 从中可知,当紫外剂量为  $60 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$  时,对大肠杆菌的去除率达到 3.2 个数量级,出水浓度为  $113 \text{ CFU} \cdot \text{L}^{-1}$  能够满足再生水用作景观用水时的卫生学要求. 因此,本研究考察紫外剂量为  $60 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$  对不同病原菌的去除效果.

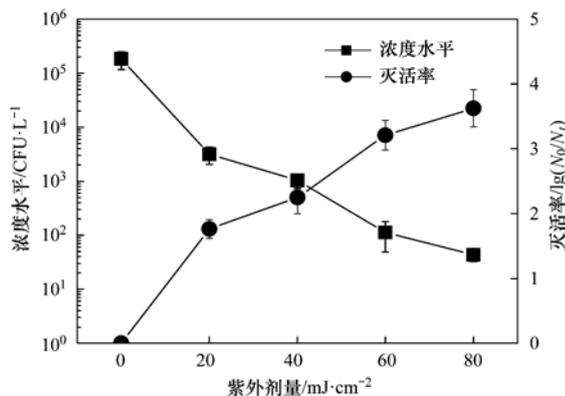


图 4 大肠杆菌的紫外消毒曲线

Fig. 4 UV inactivation curves of *E. coli*

本研究中 qPCR 的线性检测区间如下:大肠杆菌为  $3 \times 10^2 \sim 3 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{reaction}^{-1}$ ; 沙门氏菌为  $6 \times 10^2 \sim 6 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{reaction}^{-1}$ ; 分枝杆菌为  $8 \times 10^1 \sim 8 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{reaction}^{-1}$ . 大肠杆菌、沙门氏菌与分枝杆菌的线性相关系数均  $> 0.99$ , PCR 扩增效率在 95% ~ 110% 之间. 大肠杆菌及分枝杆菌的溶解曲线呈现单一的熔点峰,峰值为  $87^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ . 表明本研究所采用的 qPCR 标准曲线线性相关性较好,扩增效率较高,对细菌的特异性较强.

本研究中 Q-RT-PCR 的线性监测区间如下:大肠杆菌、沙门氏菌和分枝杆菌均为  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \text{reaction}^{-1}$ . 大肠杆菌与分枝杆菌的线性相关

系数均  $> 0.99$ , PCR 扩增效率在 95% ~ 115% 之间.

采用培养法、qPCR 及 Q-RT-PCR 方法检测水源水样消毒前后大肠杆菌、沙门氏菌与分枝杆菌的浓度水平,检测结果如图 5 所示. 从中可知,  $60 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$  剂量紫外消毒对可培养大肠杆菌及沙门氏菌的去除率约为 99.9%. 靳慧霞等人在研究紫外消毒对大肠杆菌灭活效率的研究中发现,当消毒剂量为  $60 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$  时,大肠杆菌的去除率为 99.99%<sup>[31]</sup>. 本研究相同剂量下,可培养大肠杆菌的去除率较低,这可能是由于紫外消毒会受到水体浊度、有机物等的影响<sup>[32]</sup>. 但是,相同剂量的紫外消毒对可培养分枝杆菌的去除率不足 90%,这与分枝杆菌特殊的细胞结构有关. 分枝杆菌的细胞膜富含脂类,细胞膜厚,具有疏水性,使得分枝杆菌对外界环境的抵抗性较强<sup>[33, 34]</sup>.

qPCR 检测消毒前后大肠杆菌、沙门氏菌及分枝杆菌的浓度水平的变化并不显著. 这表明紫外消毒对细菌基因片段的破坏速率远小于其对细菌可培养性的破坏速率. qPCR 检测的是目标菌的目的基因片段而不是整个基因组,由于检测的目的基因的片段较短,无法很好地指示整个基因组的受损情况. Q-RT-PCR 检测结果显示,经  $60 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$  剂量紫外消毒后,活性大肠杆菌、沙门氏菌及分枝杆菌的浓度水平下降不显著. 结合培养法的结果,细菌虽然无法在培养基上形成菌落,但是仍具有逆转录活性,这表明细菌仍具有一定活性. 这可能是由于经过紫外照射后细菌可能进入 VBNC (viable but nonculturable) 状态,无法在培养基上生长,但仍具有细胞活性,可在一定条件下恢复其可培养性<sup>[35, 34]</sup>. 值得注意的是,分枝杆菌 qPCR 及 Q-RT-PCR 的检测结果显示较培养法的检测结果高 2 个数量级. 有学者指出,由于分枝杆菌种类较多,生长条件不同,一种培养基可能无法检测到所有的分枝杆菌,采用 qPCR 的检测结果会比培养法高 1 个多数量级<sup>[36]</sup>. 此外, Q-RT-PCR 的检测较 qPCR 略低,这是由于 qPCR 检测到的是所有具有目的基因的 DNA 片段(包括非活性及活性菌),而 Q-RT-PCR 检测到的仅是具有逆转录活性的 RNA 片段,因此 Q-RT-PCR 比 qPCR 较好地指示污水中的活性病原菌的浓度水平.

上述研究结果表明,紫外消毒能够抑制大肠杆菌及沙门氏菌的可培养性,但这些细菌尚能保持逆转录活性. 与投加化学消毒剂的消毒工艺相比,紫外消毒工艺没有持久的消毒能力,一些仍具有活性的微生物在经受紫外照射灭活后能够再次复活,恢

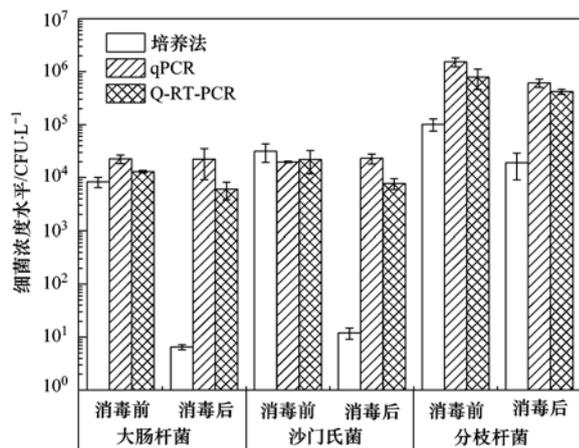


图5 培养法、qPCR及Q-RT-PCR对不同指示菌的检测结果

Fig. 5 Results of culture-based method, qPCR and Q-RT-PCR detection for different indicator bacterial strains

复其可培养性。已被证实能够产生复活现象的微生物有:大肠埃希氏菌、洋葱假单胞杆菌、粪链球菌、蓝藻等<sup>[37]</sup>。此外,紫外消毒对分枝杆菌的影响较小,降低了紫外消毒的效果,给污水回用带来了安全隐患,需结合其他工艺(如投加余氯等)来保障污水回用的卫生学安全。

### 3 结论

(1)454 焦磷酸测序研究污水厂二级出水中微生物群落结构,共发现 12 个门的细菌,其中拟杆菌门(Bacteroidetes)和变形菌门(Proteobacteria)是主要的门类,且拟杆菌门(Bacteroidetes)的主要组成部位为 Flavobacteria,变形菌门(Proteobacteria)的主要组成部位为  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -Proteobacteria。本研究共发现 11 种病原菌,其中梭菌属(*Clostridium*)和分支杆菌(*Mycobacterium*)是主要的属类,此外还有军团菌(*Legionella*)等常见的致病性较高的病原菌。

(2)研究比较  $60 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$  剂量紫外消毒对大肠杆菌、沙门氏菌及分支杆菌的去除效果。结果表明,该计量的紫外消毒能去除 3 个数量级可培养的大肠杆菌及沙门氏菌,对分支杆菌的去除效果不显著。Q-RT-PCR 结果表明,虽然经过紫外消毒后,大部分大肠杆菌及沙门氏菌失去了可培养性,但仍具有逆转录活性,需结合其他深度处理工艺进一步去除活性病原菌以保障污水回用的卫生学安全。

#### 参考文献:

[1] Liu W, Andrews S A, Bolton J R, et al. Comparison of disinfection byproduct (DBP) formation from different UV technologies at bench scale[J]. Water Supply, 2002, 2(5-6): 515-521.

[2] Craik S A, Weldon D, Finch G R, et al. Inactivation of *cryptosporidium parvum* oocysts using medium-and low-pressure ultraviolet radiation[J]. Water Research, 2001, 35(6): 1387-1398.

[3] Meulemans C C E. The basic principles of UV-disinfection of water[J]. 1987, 9(4): 299-313.

[4] 王秀娟,胡学香,胡春.水质对紫外消毒在两种典型再生水中应用的影响[J].环境工程学报,2012,6(12):4289-4293.

[5] 张永吉,刘文君.紫外线对自来水中微生物的灭活作用[J].中国给水排水,2005,21(9):1-4.

[6] 楼朝刚,夏东升,赵帆,等.微波无极紫外光对自来水中微生物的灭活作用[J].环境工程,2008,26(3):10-12.

[7] 林怡雯.再生水系统中VBNC病原菌复活特性与风险的研究[D].北京:清华大学,2013.

[8] Nocker A, Camper A K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 291(2): 137-142.

[9] Fey A, Eichler S, Flavier S, et al. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3618-3623.

[10] Hu M, Wang X H, Wen X H, et al. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis [J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 72-79.

[11] 全铁铮. PMA-qPCR 选择性检测水中活性菌方法的研究与应用[D].北京:清华大学,2010.

[12] Heijnen L, Medema G. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR[J]. Journal of Water and Health, 2006, 4(4): 487-498.

[13] 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.

[14] Pusterla N, Byrne B A, Hodzic E, et al. Use of quantitative real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in fecal samples from horses at a veterinary teaching hospital [J]. The Veterinary Journal, 2010, 186(2): 252-255.

[15] 胡秀华,何苗,刘丽,等.水中轮状病毒实时定量 PCR 外标标准的构建[J].环境科学,2008,29(2):380-385.

[16] Ye L, Zhang T. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(6): 2681-2690.

[17] Lee S H, Kang H J, Park H D. Influence of influent wastewater communities on temporal variation of activated sludge communities[J]. Water Research, 2015, 73: 132-144.

[18] Shu D T, He Y L, Yue H, et al. Microbial structures and

- community functions of anaerobic sludge in six full-scale wastewater treatment plants as revealed by 454 high-throughput pyrosequencing[J]. *Bioresource Technology*, 2015, **186**: 163-172.
- [19] Ye L, Zhang T. Pathogenic bacteria in sewage treatment plants as revealed by 454 pyrosequencing[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**(17): 7173-7179.
- [20] Bibby K, Viau E, Peccia J. Pyrosequencing of the 16S rRNA gene to reveal bacterial pathogen diversity in biosolids[J]. *Water Research*, 2010, **44**(14): 4252-4260.
- [21] 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.
- [22] 许小红. 城市水体中新型病原细菌生态学特征及其溯源研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2008.
- [23] Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, **16**(2): 319-354.
- [24] Kim C J, Kim N H, Song K H, *et al.* Differentiating rapid- and slow-growing mycobacteria by difference in time to growth detection in liquid media[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013, **75**(1): 73-76.
- [25] Thomas V, Loret J F, Jousset M, *et al.* Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**(10): 2728-2745.
- [26] Tyrrell S A, Rippey S R, Watkins W D. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone[J]. *Water Research*, 1995, **29**(11): 2483-2490.
- [27] Gilboa Y, Friedler E. UV disinfection of RBC-treated light greywater effluent: Kinetics, survival and regrowth of selected microorganisms[J]. *Water Research*, 2008, **42**(4-5): 1043-1050.
- [28] Doan L, Forrest H, Fakis A, *et al.* Clinical and cost effectiveness of eight disinfection methods for terminal disinfection of hospital isolation rooms contaminated with *Clostridium difficile* 027[J]. *Journal of Hospital Infection*, 2012, **82**(2): 114-121.
- [29] Rajala-Mustonen R L, Toivola P S, Heinonen-Tanski H. Effects of peracetic acid and UV irradiation on the inactivation of coliphages in wastewater[J]. *Water Science and Technology*, 1997, **35**(11-12): 237-241.
- [30] Sanz E N, Dávila I S, Balao J A A, *et al.* Modelling of reactivation after UV disinfection: Effect of UV-C dose on subsequent photoreactivation and dark repair[J]. *Water Research*, 2007, **41**(14): 3141-3151.
- [31] 靳慧霞, 董滨, 孙颖, 等. 超声协同紫外灭活大肠杆菌实验研究[J]. *环境科学与技术*, 2010, **33**(11): 22-27, 42.
- [32] 赵琳, 王晓昌. 紫外与次氯酸钠消毒效果及影响因素研究[J]. *环境污染与防治*, 2014, **36**(7): 41-45.
- [33] Brennan P J, Nikaido H. The envelope of mycobacteria[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1995, **64**(1): 29-63.
- [34] Daffé M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1997, **39**: 131-203.
- [35] Gin K Y H, Goh S G. Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) *Enterococcus* [J]. *Water Research*, 2013, **47**(10): 3315-3328.
- [36] Zuccheri G, Asproulis N. Detection of pathogens in water using micro and nano-technology[M]. London: IWA publishing, 2012.
- [37] Liltved H, Landfald B. Influence of liquid holding recovery and photoreactivation on survival of ultraviolet-irradiated fish pathogenic bacteria[J]. *Water Research*, 1996, **30**(5): 1109-1114.

## CONTENTS

Editor's comment .....	( 403 )
Risk Assessment and Risk Management of Chemicals in China .....	WANG Tie-yu, ZHOU Yun-qiao, LI Qi-feng, <i>et al.</i> ( 404 )
Application of Land-use Regression Models in Spatial-temporal Differentiation of Air Pollution .....	WU Jian-sheng, XIE Wu-dan, LI Jia-cheng ( 413 )
Ecological Footprint Evolution Characteristics and Its Influencing Factors in China from 2000 to 2010 .....	HUANG Bao-rong, CUI Shu-hong, LI Ying-ming ( 420 )
Pollution Characteristics and Sources of Carbonaceous Aerosol in PM <sub>2.5</sub> During Winter in Guanzhong Area .....	TIAN Peng-shan, CAO Jun-ji, HAN Yong-ming, <i>et al.</i> ( 427 )
Chemical Composition of the Single Particle Aerosol in Winter in Nanning Using SPAMS .....	LIU Hui-lin, SONG Hong-jun, CHEN Zhi-ming, <i>et al.</i> ( 434 )
Correlation Analysis Between Characteristics of VOCs and Ozone Formation Potential in Summer in Nanjing Urban District .....	YANG Xiao-xiao, TANG Li-li, ZHANG Yun-jiang, <i>et al.</i> ( 443 )
Seasonal Dynamics of Airborne Pollens and Its Relationship with Meteorological Factors in Beijing Urban Area .....	MENG Ling, WANG Xiao-ke, OUYANG Zhi-yun, <i>et al.</i> ( 452 )
Mercury Distribution Characteristics and Atmospheric Mercury Emission Factors of Typical Waste Incineration Plants in Chongqing .....	DUAN Zhen-ya, SU Hai-tao, WANG Feng-yang, <i>et al.</i> ( 459 )
Characteristics of Atmospheric Dry and Wet Deposition of Trace Metals in the Hinterland of the Three Gorges Reservoir, China .....	ZHANG Liu-yi, LIU Yuan, QIAO Bao-qing, <i>et al.</i> ( 466 )
Monitoring and Analysis of Stable Isotopes of the Near Surface Water Vapor in Changsha .....	XIE Yu-long, ZHANG Xin-ping, YAO Tian-ci, <i>et al.</i> ( 475 )
Mercury Transport from Glacier to Runoff in Typical Inland Glacial Area in the Tibetan Plateau .....	SUN Xue-jun, WANG Kang, GUO Jun-ming, <i>et al.</i> ( 482 )
Characteristics and Risk Assessment of Heavy Metals in Core Sediments from Lakes of Tibet .....	GUO Bi-xi, LIU Yong-qin, ZHANG Fan, <i>et al.</i> ( 490 )
Distribution and Potential Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in Surface Sediments of Inflow Rivers to Northeastern Lake Tanganyika .....	YU Cheng, CHEN Shuang, ZHANG Lu ( 499 )
Over One Hundred Year Sediment Record of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Lake Bosten, Xinjiang .....	SHEN Bei-bei, WU Jing-lu, ZHAO Zhong-hua, <i>et al.</i> ( 507 )
Distribution Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Different Environmental Media from Qingbang Island, Zhoushan, China .....	ZHENG Huang, XING Xin-li, GU Yan-sheng, <i>et al.</i> ( 513 )
Transformation of Non-point Source Soluble Nitrogen in Simulated Drainage Ditch .....	LI Qiang-kun, SONG Chang-ji, HU Ya-wei, <i>et al.</i> ( 520 )
Influence of Landscape Heterogeneity on Total Nitrogen Concentration in Zhongtian River Watershed .....	WANG Jing-ping, LI Zhao-fu, LIU Hong-yu, <i>et al.</i> ( 527 )
Nitrogen Release from Sediment Under Dry and Rainy Season Alternation and Its Contribution to N Export from Xiangxi Watershed in Jiangxi Province .....	HAN Ning, HAO Zhuo, XU Ya-juan, <i>et al.</i> ( 534 )
Spatial and Temporal Distributions of Nitrogen and Phosphate in the Chaohu Lake .....	XI Shan-shan, ZHOU Chun-cai, LIU Gui-jian, <i>et al.</i> ( 542 )
Phosphorus Fractions and Release Risk in Surface Sediments of an Agricultural Headwater Stream System in Hefei Suburban, China .....	PEI Ting-ting, LI Ru-zhong, GAO Su-di, <i>et al.</i> ( 548 )
Surface Property and Sorption Characteristics of Phosphorus onto Surface Sediments in Sanggou Bay .....	ZHU Jia-mei, CAO Xiao-yan, LIU Su-mei, <i>et al.</i> ( 558 )
Particle Size Distribution and Pollutant Speciation Analyses of Stormwater Runoff in the Ancient Town of Suzhou .....	LI Huai, WU Wei, TIAN Yong-jing, <i>et al.</i> ( 565 )
Abundance of Toxic and Non-toxic <i>Microcystis</i> sp. in Lake Hongze and Its Correlation with Environmental Factors .....	LI Da-ming, ZHANG Tong-qing, TANG Sheng-kai, <i>et al.</i> ( 573 )
Effect of Charge-Transfer Complex on Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Absorption Property of Chromophoric Dissolved Organic Matter (CDOM) in Waters of Typical Water-Level Fluctuation Zones of the Three Gorges Reservoir Areas .....	JIANG Tao, LIANG Jian, ZHANG Mu-xue, <i>et al.</i> ( 580 )
Influence of pH on Kinetics of Anilines Oxidation by Permanganate .....	WANG Hui, SUN Bo, GUAN Xiao-hong ( 588 )
Effects of EDTA on the Reductive Dechlorination of 2,4-D by Pd/Fe .....	ZHOU Hong-yi, NIE Ya-zhong, CHEN Yong, <i>et al.</i> ( 595 )
Preparation of NiAl-MMO Films Electrode and Its Capacitive Deionization Property .....	WANG Ting, ZHU Chun-shan, HU Cheng-zhi ( 602 )
Competitive Microbial Oxidation and Reduction of Arsenic .....	YANG Ting-ting, BAI Yao-hui, LIANG Jin-song, <i>et al.</i> ( 609 )
Community Characteristics of ANAMMOX Bacteria in Subsurface Flow Constructed Wetland (SSFCW) for Processing of Aquaculture Waster Water .....	ZENG Xian-lei, LIU Xing-guo, WU Zong-fan, <i>et al.</i> ( 615 )
Analysis of Pathogenic Bacteria in Reclaimed Water and Impact of UV Disinfection on the Removal of Pathogenic Bacteria .....	JING Ming, WANG Lei ( 622 )
Analysis of the Microbial Community Structure in Continuous Flow Reactor Enhanced by Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification Bacterium <i>Burkholderia</i> sp. YX02 .....	SHAO Ji-lun, CAO Gang, LI Zi-hui, <i>et al.</i> ( 630 )
Comparative Metagenomics of BIOLAK and A <sup>2</sup> O Activated Sludge Based on Next-generation Sequencing Technology .....	TIAN Mei, LIU Han-hu, SHEN Xin ( 638 )
Identification and Nitrogen Removal Characteristics of a Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Strain Isolated from Marine Environment .....	SUN Qing-hua, YU De-shuang, ZHANG Pei-yu, <i>et al.</i> ( 647 )
Removal of AOX and Chroma in Biologically Treated Effluent of Chemical Dyestuff Wastewater with Nanoscale Ni/Fe .....	SHU Xiao-ming, XU Can-can, LIU Rui, <i>et al.</i> ( 655 )
Feasibility of 3BER-S Process for the Deep Denitrification in Synch with the Removal of PAEs from Reclaimed Water .....	XU Peng-cheng, HAO Rui-xia, ZHANG Ya, <i>et al.</i> ( 662 )
Influence of Reaction Time on Titanate Nanomaterials and Its Adsorption Capability for Lead in Aqueous Solutions .....	FAN Gong-duan, CHEN Li-ru, LIN Ru-jing, <i>et al.</i> ( 668 )
Sorption Characteristics of Phenanthrene and 1,1-Dichloroethene onto Reed Straw Biochar in Aquatic Solutions .....	WU Qing-wen, MENG Liang, ZHANG Zhi-hao, <i>et al.</i> ( 680 )
Adsorption Characteristics of Norfloxacin by Biochars Derived from Reed Straw and Municipal Sludge .....	ZHANG Han-yu, WANG Zhao-wei, GAO Jun-hong, <i>et al.</i> ( 689 )
Effect of Seasonal Temperature Increasing on Nitrogen Mineralization in Soil of the Water Level Fluctuating Zone of Three Gorge Tributary During the Dry Period .....	LIN Jun-jie, ZHANG Shuai, LIU Dan, <i>et al.</i> ( 697 )
Effects of Warming and Straw Application on Soil Respiration and Enzyme Activity in a Winter Wheat Cropland .....	CHEN Shu-tao, SANG Lin, ZHANG Xu, <i>et al.</i> ( 703 )
Distribution of Urban Soil Heavy Metal and Pollution Evaluation in Different Functional Zones of Yinchuan City .....	WANG You-qi, BAI Yi-ru, WANG Jian-yu ( 710 )
Differential Effect and Mechanism of <i>in situ</i> Immobilization of Cadmium Contamination in Soil Using Diatomite Produced from Different Areas .....	ZHU Jian, WANG Ping, LIN Yan, <i>et al.</i> ( 717 )
Characteristics of Adsorption Leaching and Influencing Factors of Dimethyl Phthalate in Purple Soil .....	WANG Qiang, SONG Jiao-yan, ZENG Wei, <i>et al.</i> ( 726 )
Cd Runoff Load and Soil Profile Movement After Implementation of Some Typical Contaminated Agricultural Soil Remediation Strategies .....	LIU Xiao-li, ZENG Zhao-xia, TIE Bai-qing, <i>et al.</i> ( 734 )
Concentrations and Component Profiles PAHs in Surface Soils and Wheat Grains from the Cornfields Close to the Steel Smelting Industry in Handan, Hebei Province .....	WU Di, WANG Yi-long, LIU Wei-jian, <i>et al.</i> ( 740 )
Effect of Arbuscular Mycorrhiza (AM) on Tolerance of Cattail to Cd Stress in Aquatic Environment .....	LUO Peng-cheng, LI Hang, WANG Shu-guang ( 750 )
Acute Toxic Effects of Bromate on Aquatic Organisms .....	WANG Zhi-wei, LIU Dong-mei, ZHANG Wen-juan, <i>et al.</i> ( 756 )
Development of Self-assembled Dumbbell-like Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Micro/nanomaterial for Application in Thermocatalytic Degradation of Polybrominated Biphenyls .....	HUANG Xin-chen, ZONG Gang, LIU Ye-xuan, <i>et al.</i> ( 765 )
Impact of Salinity on Leachate Treatment and N <sub>2</sub> O Releases from Semi-aerobic Aged-refuse Bioreactor .....	LI Wei-hua, SUN Ying-jie, LIU Zi-liang, <i>et al.</i> ( 775 )
Evaluating the Significance of Odor Gas Released During the Directly Drying Process of Sludge: Based on the Multi-index Integrated Assessment Method .....	DING Wen-jie, CHEN Wen-he, DENG Ming-jia, <i>et al.</i> ( 782 )

# 《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)

2016年2月15日 第37卷 第2期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 37 No. 2 Feb. 15, 2016

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
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	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
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	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
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	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