

农村生活污水贝类净化区细菌群落结构解析

高娜, 梁阳, 李静, 杨坤, 方婷, 赵秀侠, 崔凯, 卢文轩*

(安徽省农业科学院水产研究所水产增殖安徽省重点实验室, 安徽合肥 230000)

摘要 [目的]研究农村生活污水贝类净化区的细菌群落结构。[方法]采用 Illumina-MiSeq 高通量测序技术对贝类处理单元水体及贝类样品进行细菌多样性分析。[结果]贝类样品中的细菌群落多样性和丰度均显著高于处理单元水体。4 组样品中均有大量序列不能被归入已知的属, 在门的分类水平上, 优势菌门是蓝细菌门(Cyanobacteria)和放线菌门(Actinobacteriota); 在属水平上, 优势细菌属主要为 *Cyanobium_PCC_6307* 和 *hgc_1* clade。菌群分析发现贝类处理单元水体可能处于富营养化进程中。水质检测分析发现贝类通过滤食作用对氨氮、总磷和 COD 的去除率分别达到 39.75%、37.21%、59.52%。[结论]该研究为贝类净水技术提供基础数据, 对贝类处理农村生活污水系统的构建具有指导意义。

关键词 农村生活污水; 淡水贝类; 净化区; 高通量测序; 群落结构; 细菌多样性

中图分类号 X 703 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)09-0083-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.09.020



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Analysis of Bacterial Community Structure in Shellfish Purification Area of Rural Domestic Sewage

GAO Na, LIANG Yang-yang, LI Jing et al (Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Freshwater Aquaculture and Enhancement of Anhui Province, Hefei, Anhui 230000)

Abstract [Objective] To study the microbial community composition in shellfish purification area of rural domestic sewage. [Method] The Illumina-MiSeq high-throughput sequencing technology was used to analyze bacterial diversity in shellfish treatment unit water and shellfish samples. [Result] The diversity and abundance of bacterial community in the shellfish samples were significantly higher than those in the water of the treatment unit. There were a large number of sequences in the four samples that cannot be classified into known genera. The dominant bacteria were Cyanobacteria and Actinobacteriota at phylum level. At the genus level, the mainly bacteria are *Cyanobium_PCC_6307* and *hgc_1* clade. Microbiota analysis showed that the water of the shellfish treatment unit may be in the process of eutrophication. Water quality detection and analysis showed that the removal rates of ammonia nitrogen, total phosphorus and COD by shellfish filter-feeding were 39.75%, 37.21% and 59.52%, respectively. [Conclusion] The research provides a theoretical basis for shellfish water purification technology, and it has guiding significance to the construction of shellfish treatment rural sewage system.

Key words Rural domestic sewage; Freshwater shellfish; Purification area; High-throughput sequencing; Community structure; Bacteria diversity

随着我国农村工业化和城市化进程的加快, 环境污染已从城市迅速扩散到农村地区, 其中水体污染在农村环境污染中尤为突出^[1]。安徽省第二次全国污染源普查结果显示, 2017 年农村生活污水 COD、NH₃-N、TP、TN 排放量分别占生活源排放总量的 44.4%、38.1%、39.6%、33.5%; 然而生活污水中各污染物有效治理率均在 6% 以下, 排放后造成地表水与地下水的严重污染^[2]。由于地域和经济水平差异的原因, 农村生活污水的处理模式也多种多样。目前较常规的处理技术主要有人工工艺处理系统(如生物滤池、化粪池、氧化沟等生态组合工艺)、自然生态处理工艺系统(如生物稳定塘、人工湿地、土地渗滤等)^[3]。然而现有处理设施的处理能力及管网建设仍然存在着一些不足, 因此有必要寻找一种建设成本较低且易于维护的工艺来改善农村水污染的现状。

芜湖水韵环保公司发明了一种以淡水贝类为主导的农村生活污水资源化利用处理模式, 包括依次连接的收集池、厌氧预处理池和生产型湿地, 湿地中以淡水贝类(蚌和螺)为

主要物种, 通过搭建支架结构平台, 形成贝床的立体空间结构, 有效保证贝类在空间上的数量、密度、存活量, 实现上中下层水体的同步净化。同时搭配鱼类和植物, 形成共生体系, 共同利用水体中的氮磷等营养物质, 达到水质净化及资源利用的目的。已有研究表明, 贝类通过过滤水体, 在一定程度上能有效控制水体富营养化, 达到改善水质的目的^[4]。笔者以芜湖市湾沚区陶辛镇水系连通及农业面源污染治理示范工程为对象, 研究贝类净化区的运行效能以及各级贝床系统中的细菌群落结构特征。

1 材料与方法

1.1 贝床处理技术 水系连通及农业面源污染治理贝类净化区示意图如图 1 所示, 根据进水水质和水质目标, 核算贝床面积, 结合现场用地, 设计了 6 级串联贝床处理单元以构建贝床处理系统, 同时搭配螺类、鱼类和草类, 逐级净化污水。

1.2 样品采集 2021 年 5 月中旬进行样品采集, 分别在 1 级(L1)、3 级(L3)、6 级(L6) 处理单元中各采集 3 个重复样品。每个点取 500 mL 污水装入无菌 PV 瓶, 低温条件下保存运输至实验室。用孔径为 0.22 μm 的硝酸纤维素滤膜过滤收集水体中的细菌, 将过滤好的滤膜保存在灭菌的 1.5 mL 离心管中, -20 °C 保存用于细菌基因组 DNA 的提取。由于贝类在滤食饵料生物的同时会在体内富集一定的细菌, 而且贝类的外壳也可以作为细菌生物膜的附着基质。因此该研

基金项目 安徽省农业科学院科技创新团队项目(2021YL055); 安徽省中央引导地方科技发展专项(201907d06020003); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 安徽省水产产业技术体系(皖农科函[2021]711号)。

作者简介 高娜(1989—), 女, 安徽阜阳人, 助理研究员, 博士, 从事分子微生物学与生物技术研究。* 通信作者, 研究员, 硕士, 从事养殖尾水处理研究。

收稿日期 2021-08-09

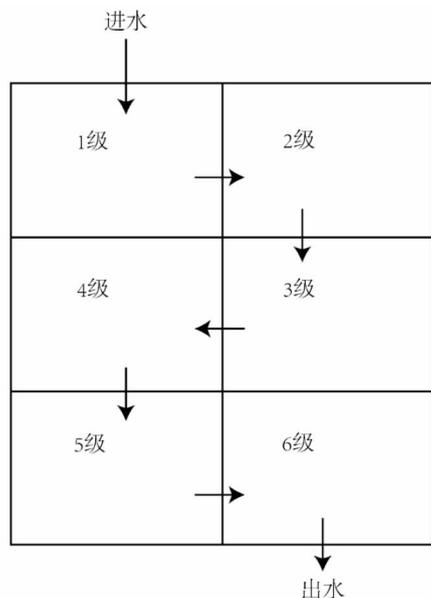


图1 贝类净化区示意图

Fig. 1 Schematic diagram of shellfish purification area

究也对贝类附着的细菌进行了分析,分别从各级处理系统中采集一定的贝类样品,加入无菌水,超声波洗脱贝类富集的细菌,命名为BM。

1.3 水质检测 为考察双壳贝类的净化作用,分别测定1级、3级、6级处理单元的水质参数,包括总氮(TN)、化学需氧量(COD)、氨氮(NH_4^+-N)、硝态氮(NO_3^--N)和亚硝态氮

(NO_2^--N)。TN采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法(GB 11894—89)测定,COD采用快速消解分光光度法(HJ/T 399—2007)测定,氨氮采用《水质氨氮的测定纳氏试剂分光光度法》(HJ 535—2009)测定,硝态氮采用紫外分光光度法(HZ-HJ-SZ-0138)测定,亚硝态氮采用盐酸萘乙二胺分光光度法测定。

1.4 细菌菌群分析 将采集的样品送至上海美吉生物医药有限公司进行DNA提取,PCR扩增采用细菌16S rDNA V3-V4区的通用引物338F/806R^[5]。测序得到的原始序列通过拼接、过滤、去除非特异性扩增序列及嵌合体后得到有效序列^[6]。利用QIIME软件将相似度>97%的序列定义为一个操作分类单元(OTU),利用SILVA数据库对OTUs进行注释^[7]。利用Mothur软件计算Alpha多样性指数,多样性分析中Chao 1指数和ACE指数用来估计菌群丰度,香农指数(Shannon index)和辛普森指数(Simpson index)显示菌群的多样性,覆盖率用来表征测序深度。

2 结果与分析

2.1 贝类净化区的运行效能分析 1级、3级、6级贝类处理单元的水质参数如表1所示,与前人的研究结果一致^[4,8],贝类通过其强大的滤水滤食功能,可以有效地去除水体中的氮磷。生活污水经过贝类净化后,氨氮、总磷、COD的去除率分别达到39.75%、37.21%、59.52%,且净化后水体水质达到《地表水环境质量标准》(GB 3838—2002)中的IV类水标准及以上。

表1 各处理单元水质指标分析

Table 1 Analysis of water quality indicators in each treatment unit

处理单元 Treatment unit	总氮 TN	总磷 TP	氨氮 NH_4^+-N	硝态氮 NO_3^--N	亚硝态氮 NO_2^--N	化学需氧量 COD
1级 L1	2.88	0.43	2.39	0.204	0.018	42
3级 L3	2.12	0.35	1.93	0.179	0.014	28
6级 L6	1.48	0.27	1.44	0.128	0.009	17
地表水环境质量标准中IV类水 Class IV water in the surface water environment quality standards	1.5	0.3	1.5	—	—	30

2.2 高通量序列丰度及 OTU 分析 对测序所得的序列进行拼接、质控、去除低质量序列和嵌合体,12个样本共获得504 846条合格的16S rDNA序列,每个样本的有效序列数目在37 624~48 125条。通过对97%相似度的OTU进行稀释性曲线分析,结果发现(图2),各个样本曲线均趋向平坦,说明测序数据量合理,更多的数据量只会产生少量新的OTU,因此测序所得序列能够完全展示样品细菌群落多样性。为进一步探究每个样本中细菌多样性的相互关系,通过维恩分析观察水体和贝类样本的OTU数目组成相似性及重叠情况^[9]。4组样品共有的OTU数目为286,不同样品中特有OTU表现为1级处理单元53个、3级处理单元25个、6级处理单元18个,贝类样本1 038个(图3)。

2.3 α 多样性分析 利用测序划分的OTU对不同样品的 α 多样性进行分析,结果如表2所示,从表2可以看出,4组样品的多样性测序结果覆盖度均高于99%,表明测序结果覆盖

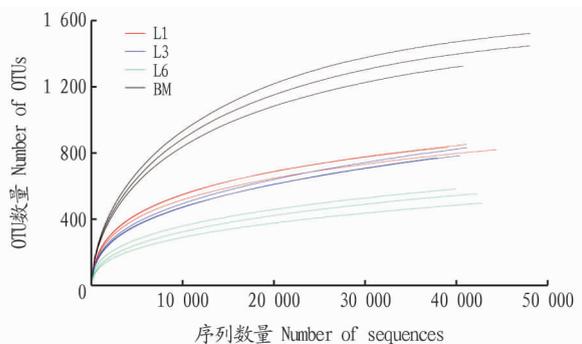


图2 样品的稀释曲线

Fig. 2 Rarefaction curve of samples

度较好且具有很高的可信度。Chao 1和ACE指数反映群落分布丰度,指数越大,丰度越高;Shannon指数和Simpson指数反映群落分布多样性,Shannon指数越大、Simpson指数越小,说明群落多样性越高。贝类样本(BM)的Shannon指数、

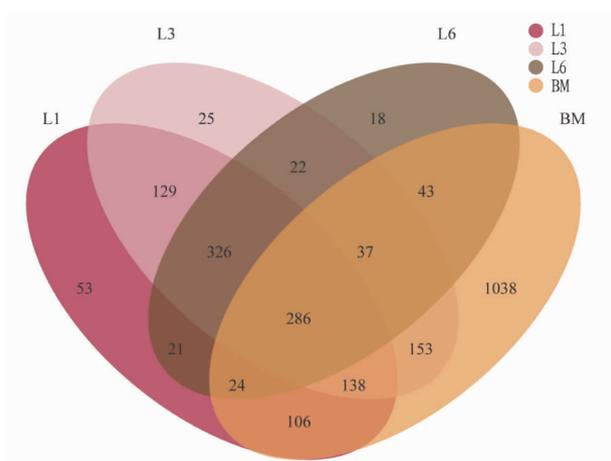


图 3 4 组样本 OTUs 的维恩图

Fig. 3 Venn diagram of 4 samples OTUs

Chao 1 指数和 ACE 指数都明显高于不同处理单元水体样本,说明贝类附着细菌的群落多样性和丰度均高于水体样本。有研究表明水体理化参数是影响污水处理系统中微生物群落结构的重要环境因子^[10],6 级(L6)处理单元中水质进一步改善,Chao 1 指数和 Shannon 指数均最小,表明其中的细菌丰度和群落多样性都处于最低水平。

表 2 细菌群落多样性指数

Table 2 Bacterial community diversity index

样品 Sample	OTU 数量 OTU number	Shannon 指数 Shannon diversity index	Simpson 指数 Simpson index	Chao 1 指数 Chao 1 index	ACE 指数 ACE index	覆盖度 Coverage/%
L1	1 083	4.61±0.09	0.03±0.00	1 052.97±25.85	1 065.83±23.00	99.4
L3	1 116	4.10±0.11	0.07±0.01	1 108.96±19.60	1 362.90±29.20	99.3
L6	777	2.95±0.53	0.23±0.09	768.99±30.10	893.08±31.42	99.5
BM	1 825	5.10±0.09	0.02±0.02	1 592.53±46.05	1 632.37±44.20	99.1

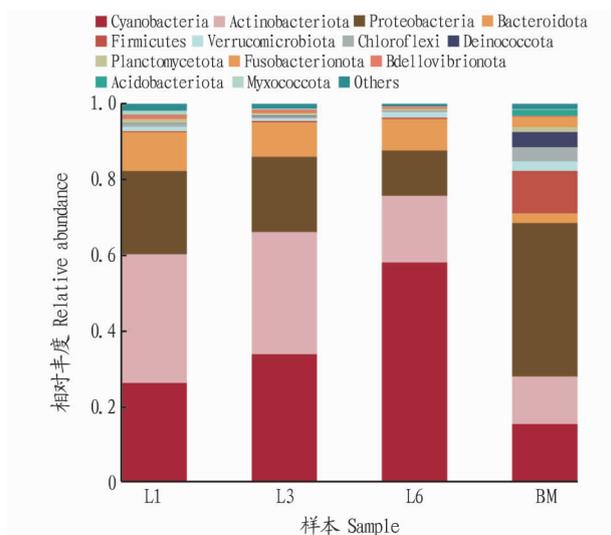


图 4 门水平各样本中细菌群落结构组成

Fig. 4 Composition of bacterial community in each sample at the phylum level

在属分类水平上,4 组样本中检测到的细菌覆盖了 778 个细菌属,如图 5 所示,所有样本中丰度占比小于 0.017 的物种归为 others,占比为 19.81%~46.92%。大量的序列不能

2.4 各样本细菌群落组成 所有样本序列分属 37 个门,丰度占比均小于 0.01 的物种归为 others。从各样本中细菌群落结构组成(图 4)可以看出,主要的门类为蓝细菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、厚壁菌门(Firmicutes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、绿弯菌门(Chloroflexi)等,这些均为典型淡水细菌门类,与其他水体微生物群落结构的研究结果相似^[11-12]。蓝细菌门为第一大门类,所占比例为 15.22%~57.99%。1 级(L1)和 3 级(L3)处理单元水体中细菌群落的组成和丰度基本相似。放线菌门(Actinobacteriota)是 1 级处理单元水体中的第一优势门,占比 34.11%,第二优势门为蓝细菌门,占比 26.09%。3 级处理单元水体中第一优势门为蓝细菌门(Cyanobacteria),占比 33.71%。蓝细菌门在 6 级(L6)处理单元水体中处于绝对优势地位,占比高达 57.99%。蓝细菌作为水生态环境的指示物种,其大量分布说明水体可能处在富营养化进程中^[13]。贝类样品(BM)中第一优势门为变形菌门(Proteobacteria),占比 40.63%,且贝类样品中厚壁菌门(Firmicutes)和 Deinococcota 的占比明显高于处理单元水体。

归入已知属(数据库分别以科的名称加-norank、-unclassified 来表示)。贝类样品的细菌多样性最高,其中丰度占比低于 0.017 的细菌属达到 46.92%。不同贝类处理单元水体中细菌群落组成相似,但是各属细菌的丰度占比存在差异。其中丰度占比前 10 的优势属为 *Cyanobium_PCC_6307*、*hgc_I_clade_norank_f_norank_o_Chloroplast*、*norank_f_Sporichthyaceae_CL500-29-marine-group*、*Limnohabitans*、*Exiguobacterium*、*norank_f_Rhizobiales_Incertae_Sedis*、*Rhodobacter*、*Mycobacterium*。其中放线菌门的 *hgc_I_clade* 和 *CL500-29-marine-group* 是贝类(BM)处理单元水体中的优势细菌属,而在贝类样品中很少检测到,研究表明它们是水体中可以有效利用多种碳水化合物化合物的有益菌属^[14-15]。 β 变形菌纲的 *Limnohabitans* 属在处理单元水体中也处于优势地位,有研究发现其是一类好氧不产氧光合细菌,可借助光合作用产生的 ATP 补充其生长所需的能量,减少了其对有机碳的消耗,同时增加了进入细胞的溶解有机碳的量^[16]。

3 结论与讨论

针对农村生活污水的特点,芜湖市韵环保公司创造性地提出以淡水贝类为主导的治理方式,实现了农村生活污水的

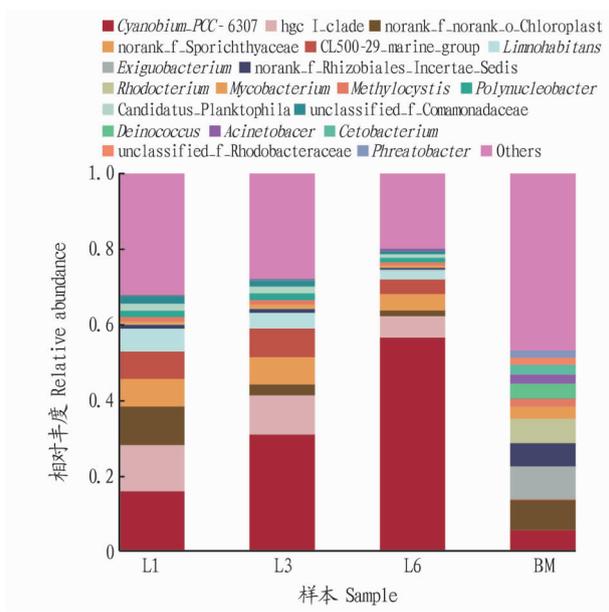


图5 属水平各样本中细菌群落结构组成

Fig.5 Composition of bacterial community in each sample at the genus level

资源化利用。水质检测分析发现贝类净化区可以有效去除水体中的氮磷,经过6级贝类处理单元净化后水体水质达到《地表水环境质量标准》(GB 3838—2002)中的Ⅳ类水标准及以上。采用高通量测序技术考察了贝类净化区的细菌群落结构,在门和属的细菌分类水平上,共筛选到37个细菌门、778个细菌属,包含了大量相对丰度小于0.01的菌群。1级、3级和6级贝类处理单元水体中的优势菌属主要为 *Cyanobium_PCC_6307* 和 *hgc_I_clade*。贝类样品中的细菌群落多样性最高,丰度占比低于0.017的细菌属达到46.92%。处理单元水体中大量分布的蓝细菌门提示水体可能处于富营养化进程中,贝类样品的细菌群落组成分析未检测到致病菌的存在,说明贝类通过滤食作用净化水质的同时自身也可以正常健康的生长。

参考文献

- [1] 王荣宏. 关于农村水污染问题的分析及建议[J]. 资源节约与环保, 2013(8): 115-116.
- [2] 孙亚敏. 安徽省农村生活污水污染特点研究[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(19): 55-59.
- [3] 王志强, 李黎, 罗海霞, 等. 农村生活污水处理技术研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2957-2959.
- [4] 廖日红, 胡秀琳, 吴晓辉, 等. 三角帆蚌对北京富营养化河湖水体的滤水效率和放养方式研究[J]. 环境工程学报, 2012, 6(5): 1425-1429.
- [5] 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.
- [6] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [7] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied environmental microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [8] 杜佳沐, 张饮江, 张磊, 等. 鱼贝植物组合对上海白莲泾生态修复效应研究[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(5): 6-11.
- [9] 王一亭, 李波, 王厚红, 等. 基于 Miseq 测序技术分析黄颡鱼不同养殖模式下池塘微生物群落结构多样性[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 781-789.
- [10] SELVARAJAN R, SIBANDA T, SEKAR S, et al. Industrial effluents harbor a unique diversity of fungal community structures as revealed by high-throughput sequencing analysis [J]. Polish journal of environmental studies, 2019, 28(4): 2353-2362.
- [11] 刘亚军, 刘欣, 牟晓真, 等. 大型浅水湖泊鄱阳湖湿地微生物的研究现状[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3453-3460.
- [12] PARFENOVA V V, GLADKIKH A S, BELYKH O I. Comparative analysis of biodiversity in the planktonic and biofilm bacterial communities in Lake Baikal [J]. Microbiology, 2013, 82(1): 91-101.
- [13] GAO Y, WANG C C, ZHANG W G, et al. Vertical and horizontal assemblage patterns of bacterial communities in a eutrophic river receiving domestic wastewater in southeast China [J]. Environmental pollution, 2017, 230: 469-478.
- [14] GHYLIN T W, GARCIA S L, MOYA F, et al. Comparative single-cell genomics reveals potential ecological niches for the freshwater actinobacteria lineage [J]. The ISME journal, 2014, 8(12): 2503-2516.
- [15] LINDH M V, RIEMANN L, BALTAR F, et al. Consequences of increased temperature and acidification on bacterioplankton community composition during a mesocosm spring bloom in the Baltic Sea [J]. Environmental microbiology reports, 2013, 5(2): 252-262.
- [16] BOEUF D, COTTRELL M T, KIRCHMAN D L, et al. Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean [J]. FEMS microbiology ecology, 2013, 85(3): 417-432.