

再生水灌溉对草坪根际可培养细菌组成影响

郭逍宇, 官辉力, 赵文吉*

(首都师范大学资源环境与旅游学院, 资源环境与地理信息系统北京市重点实验室, 北京 100037)

摘要:【目的】为了了解再生水灌溉对草坪根际可培养细菌群落组成的影响,【方法】采用稀释平板法,对北京市陶然亭公园内再生水灌区及其对照自来水灌区草坪根际细菌进行了分离,并对其 16S rDNA 序列进行了分析。【结果】16S rDNA 序列分析表明自来水样品分离得到的菌落分属于 15 个属的 20 个种,而再生水样品分离得到的菌落分属于 18 个属的 24 个种。自来水和再生水灌区草坪根际细菌主要包括变形菌门 α 亚群 (Alphaproteobacteria, 分别为 9.7% 和 13.4%)、变形菌门 β 亚群 (Betaproteobacteria, 分别为 8.1% 和 12.3%)、变形菌门 γ 亚群 (Gammaproteobacteria, 分别为 17.9% 和 42.0%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes, 分别为 13.0% 和 2.9%)、厚壁菌门 (Firmicutes, 分别为 23.6% 和 10.1%) 和放线菌门 (Actinobacteria, 分别为 27.6% 和 19.6%) 其中,芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 是自来水灌区草坪根际优势菌属 (23.6%), 而不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) 是再生水灌区根际优势菌属 (17.4%)。从不同类群优势菌属看,除变形菌门 γ 亚群受再生水影响优势菌属在两灌区表现出一定的差异外,其余各亚群优势菌属均未受再生水影响,其中,不动杆菌属是再生水灌区变形菌门 γ 亚群的优势菌属 (41.3%), 肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.) 是自来水灌区变形菌门 γ 亚群的优势菌属 (45.4%)。【结论】这表明,再生水灌溉未改变细菌群落组成类型,但改变了不同类型多度分布状况。具体表现为优势种多度值增加及部分非优势种有无。再生水灌区特有机会性致病菌、植物致病菌和重金属抗性细菌的出现表明再生水灌溉中病原微生物及重金属的控制工作还有待于进一步严格。

关键词: 再生水; 根际细菌; 扩增 rDNA 限制性分析 (ARDRA); 序列分析

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1519-06

微生物群落多样性及其结构与功能特征是客观存在的。许多研究已经证实,无论是环境条件的整体变化,还是某一环境因子的急剧变化都会改变微生物群落结构与功能特性。另外,与动物、植物相比较,微生物对环境的变化更具有敏感性。因而,微生物监测也是环境质量评价不可缺少的生物学指标之一。近年来,为实现城市再生污水资源可持续利用,同时确保污水灌溉过程中的负面效应降到最小,再生水已逐渐取代二级处理水^[1-2]。但到目前为止再

生水灌溉一般仅限于局部绿地利用或处理厂内部绿地利用,再生水在草坪业中的应用研究也多集中于再生水灌溉的元素累积效应^[3-5],关于再生水灌溉对土壤微生物群落影响鲜有研究。

本文以北京市陶然亭公园内市政再生水草坪灌区为研究对象,以自来水草坪灌区为对照,调查了以再生水和自来水两种水源灌溉下草坪根际微生物的数量,并依据 16S rDNA 序列特征对分离得到 261 个菌株进行了鉴定和系统发育分析,初步获得了两种

基金项目:国家自然科学基金(40901281)

* 通信作者。Tel: +86-10-68903052; E-mail: zhwenji1215@163.com

作者简介:郭逍宇(1977-),女,山西文水人,博士,副教授,主要从事生态研究。E-mail: xiaoyucnu@126.com

收稿日期:2010-04-13;修回日期:2010-06-07

灌溉水源下草坪根际可培养细菌群落结构信息,在此基础上探讨再生水灌溉对草坪根际可培养细菌组成的影响,为利用微生物多样性来评价再生水灌溉生态环境效应及再生水草坪灌溉可行性奠定了基础。

1 材料和土样采集方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: *Hinf* I 等内切酶均购自 TaKaRa 公司;引物和序列结果均由上海生工合成和测定;水质由北京市普尼理化测试中心测定;PCR 仪 (Biometra, 德国)。

1.1.2 实验材料与取样方法: 供试土壤采自北京市陶然亭公园再生水草坪灌区及其对照自来水草坪灌区,该区再生水灌溉时间约 2 年,再生水水源系北京市高碑店污水处理厂二级处理水,再经水源六厂深度处理后,通过地下管网输往陶然亭公园进行草坪灌溉,灌溉水质见表 1。2005 年 7 月 11 日,在两灌区按照五点混合取样的原则,分别取草坪草根际(距根面 2 mm)土壤样品,再生水灌区土样命名为 RW,自来水灌区土样为 DW。

表 1 再生水化学性质

Table 1 Chemical properties of irrigation water

Item	RW	DW
pH	7.4	7.5
<i>c</i> (EC)/(ds/m)	1.44	0.866
<i>c</i> (TDS)/(mg/L)	836	574
<i>c</i> (Cl ⁻)/(mg/L)	192.6	67.1
<i>c</i> (NO ²⁻)/(mg/L)	41.1	n. a.
<i>c</i> (NO ³⁻)/(mg/L)	81.4	53.5
<i>c</i> (SO ₄ ²⁻)/(mg/L)	94.8	102.7
<i>c</i> (PO ₄ ³⁻)/(mg/L)	0.341	n. a.
<i>c</i> (B)/(mg/L)	0.099	0.073
<i>c</i> (Fe ²⁺ , Fe ³⁺)/(mg/L)	0.0179	0.0031
<i>c</i> (Cu ²⁺)/(mg/L)	0.0042	0.0046
<i>c</i> (Zn ²⁺)/(mg/L)	0.1017	0.3051
<i>c</i> (Na ⁺)/(mg/L)	128.2	49.23
<i>c</i> (Ca ²⁺)/(mg/L)	93.15	105.1
<i>c</i> (Mg ²⁺)/(mg/L)	36.98	42.07
<i>c</i> (K ⁺)/(mg/L)	18.94	2.586
<i>c</i> (Cd)/(mg/L)	0.0007	n. a.
<i>c</i> (As)/(mg/L)	0.007	n. a.
<i>c</i> (Hg)/(mg/L)	n. a.	n. a.
<i>c</i> (Ag)/(mg/L)	0.0074	0.0077

n. a. means not detected.

1.2 细菌的培养与纯化

细菌培养采用 LB 培养基^[6]。准确称取新鲜土壤样品 5 g, 用灭菌水倍比稀释, 制备 10⁻¹ - 10⁻⁵ 的

稀释样品, 取不同浓度等级的稀释液各 0.1 mL 涂布于 LB 培养基平板上, 每个样品重复 3 个培养皿。28℃ 倒置恒温培养、计数。选择培养基上菌落数在 30 - 300 范围的稀释平板, 将所有单菌落分别转接划线在 LB 培养基平板上, 分离纯化。纯化后的菌种制备甘油管冻存。

1.3 PCR 模板的制备

用无菌牙签挑取少量菌体重悬于 20 μL 无菌蒸馏水中, 沸水浴 10 min, 立即置于冰上 5 min, 离心后 4℃ 保存, 使用时取 2 μL 上清作模板。

1.4 16S rDNA 扩增

细菌通用引物序列: 765f : 5'-GGAGCAAAC AGGATTTGATA-3', 1492r: 5'-GGTTACCTTGTTACGA CTT-3'^[7]。采用 25 μL 反应体系, 扩增反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 48℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.5 ARDRA 分型

PCR 产物分别用 *Hinf* I、*Hae* III、*Alu* I 进行酶切分型; 20 μL 酶切体系中含有 4U 内切酶, 1 × Buffer, PCR 产物为 400 ng。37℃ 恒温水浴 4 h。2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。酶切图谱采用 SPSS13.0 聚类方法进行分析。

1.6 16S rDNA 测序和相似性分析

根据 SPSS 聚类结果, 将酶切图谱相似性大于 95% 的菌株并为一类, 并从其中随机挑选一株将其扩增 PCR 产物纯化后送上海生工进行 DNA 序列测定。获得的序列采用 Clustal X 程序进行序列比对, 相似性低于 97% 的序列登录 GeneBank 数据库。

2 结果

2.1 ARDRA 多态性分析

再生水草坪根际样品中获得 138 株分离物, 自来水对照样品中获得 123 株分离物。菌株 PCR 产物分别用 *Hinf* I、*Hae* III、*Alu* I 进行酶切分型, 酶切分型得到的操作分类单元 (OTU) 进行 Dice 相关系数分析, 以获得的不同 OTU 相关系数为原始数据, 构建不同单元间相似性系数矩阵, 再通过欧氏距离法对所获得的相似性系数矩阵进行 SPSS 分层聚类分析, 根据聚类结果将两灌区 261 株菌株进一步合并为 26 个不同 OTU, 其中 20 个为 OTU 两灌区共有, 其余为各自特有的 OTU。

根据不同样品的 OTU 菌株分离数 (isolate number, IN) 在该样品总菌株分离数 (all isolate numbers, AIN) 中的比例,对菌株的分布情况进行了统计(图 1)。再生水样品分离菌株中数量占优势的 3 个主要微生物类群依次为 RW-OTU14、RW-OTU25、RW-OTU21。自来水样品分离菌株中数量占优势的 3 个主要微生物类群依次为 DW-OTU21、DW-OTU15、DW-OTU11/23。两灌区优势微生物类群均在共有的 20 个 OTU 之列,其中,OTU21 为两灌

区共有的优势 OTU,其余为两灌区所特有的优势 OTU。其次,与自来水灌区相比较,再生水灌区对再生水较为敏感的优势类群如 RW-OTU23 消失,同时另外一些非优势类群如 RW-OTU6、RW-OTU9、RW-OTU13 及 RW-OTU19 出现在群落中。再生水灌溉改变灌区土壤微生物类群结构,这种变化主要表现在优势微生物类群多度的变化以及部分非优势类群的有无上。本研究多酶切分析结果与前期单一酶切分析结果相吻合^[8]。

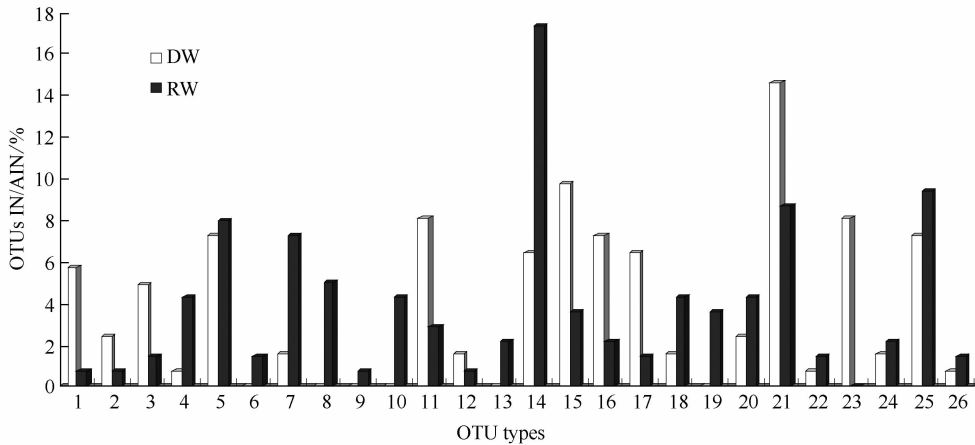


图 1 RW 和 DW 样品的 ARDRA 分析结果

Fig. 1 The analysis results by ARDRA of RW and DW samples.

2.2 群落组成分析

2.2.1 细菌类群分布分析:16S rDNA 序列分析表明,自来水样品分离得到的细菌则至少分属于 6 大类群 15 个属的 20 个种,而再生水灌区分离得到的 138 株细菌至少分属于 6 大类群 18 个属的 24 个种(表 2,图 1)。主要包括变形菌门 α 亚群 (Alphaproteobacteria,分别为 9.7% 和 13.4%)、变形菌门 β 亚群 (Betaproteobacteria,分别为 8.1% 和 12.3%)、变形菌门 γ 亚群 (Gammaproteobacteria,分别为 17.9% 和 42.0%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes,分别为 13.0% 和 2.9%)、厚壁菌门 (Firmicutes,分别为 23.6% 和 10.1%) 和放线菌门 (Actinobacteria,分别为 27.6% 和 19.6%)。其中,变形菌门 γ 亚群在再生水灌区细菌中所占的比例最高,而放线菌门在自来水灌区细菌中所占的比例最高。进一步表明,再生水灌溉未改变微生物主要类群,但改变了各类群在群落中的多度分布状况。

2.2.2 细菌属的分布分析:从细菌属的分布情况看,芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 是自来水灌区草坪根际优势菌属 (23.6%),而不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) 是再生水灌区根际优势菌属 (17.4%)。进一

步分析不同类群优势菌属,变形菌门 α 亚群中,27 株系统学上均与农杆菌属 (*Agrobacterium* sp.) 关系密切,在两灌区均成为该类群优势菌属,在再生水及自来水灌区中分别占该类群总数 88.9%、91.7%。变形菌门 β 亚群中,20 株系统学上均与贪噬菌属 (*Variovorax* sp.) 关系密切,成为两灌区变形菌门 β 亚群中的优势菌属,在再生水及自来水灌区中分别占该类群总数的 64.7%、90.0%。拟杆菌门中,9 株在系统学上与黄杆菌属 (*Chryseobacterium* sp.) 关系密切,成为两灌区拟杆菌门中的优势菌属,在再生水及自来水灌区中分别占该类群总数的 75%、56.3%。厚壁菌门中,30 株系统学上均与芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 关系密切,成为两灌区厚壁菌门中的优势菌属,在再生水及自来水灌区中分别占该类群总数的 85.7%、62.1%。放线菌门中,17 株在系统学上与 *Streptomyces* 属关系密切,是自来水灌区优势菌属,再生水灌区第二优势菌属,在自来水及再生水灌区中分别占到该类群总数的 35.3%、18.5%。变形菌门 γ 亚群分离得到的 80 株细菌,在再生水样品中的菌株在系统学上均与气单胞菌属 (*Aeromonas* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、

肠杆菌属 (*Enterobacte* sp.)、黄单胞菌属 (*Xanthomonas* sp.)、不动杆菌属 (*Acinetobacte* sp.) 关系密切,其中不动杆菌属占该类群的 41.3%,是再生水灌区变形菌门 γ 亚群优势属;自来水样品中 58 株细菌在系统学上与气单胞菌属、肠杆菌属、单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)、不动杆菌属关系密切,其中气单胞菌属占该类群 20.1%,是自来水灌区变形菌门 γ 亚群优势属。总的来看,再生水灌溉对细菌属的分布影响主要表现在再生水灌溉改变了变形菌门 γ 亚群及放线菌门的属的组成成分,同时也改变了变形菌门 γ 亚群占优势地位的属类型。

2.2.3 细菌种的分布分析:从种的层次上看,再生水灌溉对细菌种的分布影响主要表现为 3 种形式。第一:再生水灌区部分共有属内敏感种消失,如系统学上与海黄芽胞杆菌 (*Bacillus marisflavi*) 关系密切的菌株;第二:再生水灌区出现部分共有属内特有物种,如系统学上与维罗纳气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 关系密切的菌株;第三:再生水灌区出现部分特有属内物

种,如系统学上食树脂假单胞菌 (*Pseudomonas resinovorans*)、产碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaligenes*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、甘蓝黑腐黄单胞 (*Xanthomonas campestris*)、*Kocuria palustris* 关系密切的菌株。

从种的多度分布看,再生水灌区特有的产碱假单胞菌、铜绿假单胞菌、*Kocuria palustris*、甘蓝黑腐黄单胞、维罗纳气单胞菌分别占到了再生水灌区总分离菌株的 5.1%、4.3%、3.6%、2.2%、1.4%。从种的生态特性看,再生水灌区特有的产碱假单胞菌属机会致病菌,可引起心内膜炎、新生儿败血症、脓胸及眼部感染、脓肿等。铜绿色假单胞菌属于条件致病菌,在人体抵抗力下降时,可引起全身相应部位的感染,*Kocuria palustris* 属重金属抗性细菌。甘蓝黑腐黄单胞则属于植物性致病菌,对十字花科植物危害严重。维罗纳气单胞菌属于肠道致病菌,能引起人类腹泻症状,表明再生水水质中病原微生物及重金属的控制工作还有待于进一步严格。

表 2 基于 16S rDNA 序列同源性的细菌系统发育分析

Table 2 Phylogenetic analysis of the strains isolated from turfgrass rhizosphere based on 16S rDNA sequences

Strains	Nearest type strain (Accession No.)	Representative isolate	DW	RW	Total
Bacteroidetes	<i>Dyadobacter fermentans</i>	A54 (DQ335125)	6	1	7
	<i>Flavobacterium degerlachei</i>	A58 (DQ335110)	3	1	4
	<i>Chryseobacterium taeanense</i>	A111 (DQ335111)	7	2	9
Betaproteobacteria	<i>Cupriavidus basilensis</i>	B75 (DQ335123)	1	6	7
	<i>Variovorax paradoxus</i>	B80 (DQ335122)	9	11	20
Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas veronii</i>	B57 (DQ335116)	0	2	2
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	B130 (DQ335117)	2	10	12
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	B53 (DQ335101)	0	7	7
	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	B47 (DQ335100)	0	1	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B84 (DQ335102)	0	6	6
	<i>Enterobacter ludwigii</i>	B8 (DQ335108)	10	4	14
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	B67 (DQ335099)	2	1	3
	<i>Xanthomonas campestris</i>	B65 (DQ335098)	0	3	3
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	A98 (DQ335114)	8	24	32
	Actinobacteria	<i>Streptomyces spororaveus</i>	B126 (DQ335115)	12	5
<i>Microbacterium trichotecenolyticum</i>		B45 (DQ335103)	9	3	12
<i>Microbacterium oxydans</i>		B1 (DQ335105)	8	2	10
<i>Microbacterium kitamiense</i>		B14 (DQ335104)	2	6	8
<i>Kocuria palustris</i>		B77 (DQ335109)	0	5	5
<i>Micrococcus luteus</i>		B24 (DQ335124)	3	6	9
Firmicutes		<i>Bacillus drentensis</i>	B9 (DQ335119)	18	12
	<i>Bacillus megaterium</i>	B150 (DQ335118)	1	2	3
	<i>Bacillus marisflavi</i>	A70 (DQ335120)	10	0	10
Alphaproteobacteria	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	A94 (DQ335113)	2	3	5
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	B111 (DQ335112)	9	13	22
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	B69 (DQ335106)	1	2	3

3 讨论

可培养细菌群落研究结果表明基于 ARDRA 的微生物鉴定方法在区分不同的 16S rDNA 片段的精确性方面有赖于所选用的限制性内切酶的种类和数量。单一酶切结果虽与综合酶切结果得出基本一致结论,但多酶切分型效果明显优于单一酶切结果^[8],后者能提供更为详细、精确的信息。

再生水中丰富的营养成分及其盐分含量是影响细菌系统进化的主要原因。再生水中丰富的营养元素有利于根际微生物的生长繁殖,进而根系层营养元素循环速率和能量流动增强,土壤微生态环境变得更有利于微生物繁殖和草坪生长。另一方面再生水中高浓度的盐分累积也影响微生物类群结构变化。营养成分与盐分综合作用最终导致草坪草根际细菌群落组成及其结构发生变化。土壤细菌群落结构对再生水的响应变化不仅基于个别细菌对再生水敏感性的反应,同时也基于细菌种群间群体反应。

再生水消毒后,虽可有效降低水中病原微生物,但再生水水质监测中只用大肠菌群或粪大肠菌群作为再生水的生物学指标,尚不能反映再生水中所有病原微生物存在情况。污水灌溉土壤中重金属富集是限制再生水进一步推广使用重要因素,我国再生水利用仍处于起步阶段,再生水灌区特有机会性致病菌、植物致病菌和重金属耐性细菌的出现表明再生水灌溉中病原微生物及重金属的控制工作还有待于进一步严格,同时应继续加强对再生水安全性的基础研究和跟踪研究,提出再生水的生物学指标、标准和检测方法。

本文仅采用 LB 培养基分离草坪根际细菌,许多研究已经证实,通过传统的分离方法鉴定的微生

物只占环境微生物总数的 0.1% - 10%,尤其是限制了厌氧类群的研究,因而本研究还存在一定的局限性。但由于可培养的方法可以得到菌株实体,因此微生物资源的开发与利用还主要依赖传统的平板分离技术,在某种程度上分离培养的方法仍是研究细菌的主要方法之一,采用多种培养基对样品进行分离培养,将有助于了解再生水灌溉对草坪根际可培养细菌种群的完整信息。

参考文献

- [1] 周陆波,韩烈保. 再生水灌溉草坪绿地的研究进展. 节水灌溉 (*Water Saving Irrigation*), 2004, 5(1): 17-20.
- [2] 刘登义,王友保,张徐祥,司琴. 污灌对小麦幼苗生长及活性氧代谢的影响. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2002, 13(10): 1319-1322.
- [3] Claudio L, Riccardo G, Francesco P. N. Municipal-treated wastewater reuse for plant nurseries irrigation. *Water Research*, 2004, 38: 2939-2947.
- [4] 左海涛,武菊英,温海峰,宋薇. 再生水灌溉对草坪生长和土壤的影响. 核农学报 (*Acta Agriculture Nucleatae Sinica*), 2005, 19(1): 474-478.
- [5] 彭致功,杨培岭,王勇,任树梅. 再生水灌溉对草坪土壤速效养分及盐碱化的效应. 水土保持学报 (*Journal of Soil and Water Conservation*), 2006, 20(6): 84-88.
- [6] 李卓棣,喻子牛,何绍红. 农业微生物学实验技术. 北京:中国农业出版社,1996:1-60.
- [7] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:中国中医药出版社,2000.
- [8] 郭道宇,董志,宫辉力. 再生水灌溉对草坪土壤微生物群落的影响. 中国环境科学 (*China Environment Science*), 2006, 26(4): 482-485.

Effects of recycled water irrigation on bacterial community compositions in lawn soil

Xiaoyu Guo, Huili Gong, Wenji Zhao *

(Beijing Key Lab for Resources Environment and Geography Information System, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract: [**Objective**] In order to obtain the information about how irrigations with recycled water affecting the cultivable microbial population of the rhizosphere of turfgrasses. [**Methods**] We isolated strains from two irrigated areas with recycled water (RW) and drinking water (DW) in Taoranting Park in Beijing, China, by using diluting plate and counting method, and analyzing the 16S rDNA sequence of the isolates. [**Results**] We obtained 20 and 25 strains with different morphological character of colonies from the area irrigated with DW and area irrigated with RW, respectively. The sequence analysis of 16SrDNA showed that RW-irrigated system supported more complex communities of 18 genus and 24 species, whereas the DW-irrigated system only supported 15 genus and 20 species. Both samples had similar microbial population. There were 9.7% or 13.4% alphaproteobacteria, 8.1% or 12.3% betaproteobacteria, 17.9% or 42.0% gammaproteobacteria, 13.0% or 2.9% bacteroidetes, 23.6% or 10.1% firmicutes, and 27.6% or 19.6% actinobacteria at the rhizosphere of turfgrasses irrigated with DW or RW respectively. The dominant bacteria in DW area were the genera *Bacillus* whereas that of RW area was the genera *Acinetobacter*. Other than the gammaproteobacteria, the dominant genera in other groups of two areas were similar. [**Conclusion**] The result showed that the bacterial community composition of rhizosphere samples did not change, but the distribution of different types of bacteria does change after irrigation by reclaimed water, which were determined by the abundance increasing of the dominant species and the appearance or disappearance of non-dominant species. Finally, it is important that the control of the pathogen and metal should be enforced when using RW for irrigation.

Keywords: recycled water; rhizosphere bacteria; amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA); sequence analysis

(本文责编:王晋芳)