

湿热地区 O₃/BAC 工艺的微生物多样性解析

周 常¹, 蔡广强^{2,3,4}, 张金松^{1,2,3,4}, 黄河洵²

(1. 广州大学 土木工程学院, 广东 广州 510006; 2. 深圳市水务<集团>有限公司, 广东 深圳 518031; 3. 哈尔滨工业大学<深圳> 土木与环境工程学院, 广东 深圳 518055; 4. 深圳市水资源利用与环境污染控制重点实验室, 广东 深圳 518055)

摘 要: 利用 Illumina HiSeq 高通量测序技术, 对我国南方湿热地区某 O₃/BAC 饮用水处理过程中各工艺出水及滤料中微生物多样性及其变化规律进行研究。结果表明, 测序共获得 385 499 条有效数据 (Effective Tags), 归类为 45 个门、86 个纲、165 个目、308 个科、567 个属。微生物多样性随工艺流程整体呈下降趋势, 尤其是消毒工艺能大幅削减水体中的微生物, 消毒效果较好, 但生物活性炭池出水中微生物多样性较 V 型滤池出水 (FB) 不降反增, 且滤砂 (FS) 和活性炭上均有大量微生物附着, 其中活性炭上附着的微生物多样性高于原水。此外, 所有样品中变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和浮霉菌门含量较高, 分别为 68.47%、10.64%、6.15%、4.63% 和 1.51%; 鞘氨醇单胞菌属在 FB、FS 和 BAC 样品中大量滋生, 且与假单胞菌属在出厂水中均有微量存在, 二者可引起管网腐蚀, 是饮用水安全的一大隐患, 应予以重视。

关键词: 饮用水; 臭氧/生物活性炭工艺; 微生物多样性; Illumina HiSeq 高通量测序
中图分类号: TU991.2 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2018)11-0045-06

Analysis of Microbial Diversity in O₃/BAC Drinking Water Advanced Process in Southern Humid Heat Area

ZHOU Chang¹, CAI Guang-qiang^{2,3,4}, ZHANG Jin-song^{1,2,3,4}, HUANG He-xun²

(1. School of Civil Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 2. Shenzhen Water Affairs <Group> Co. Ltd., Shenzhen 518031, China; 3. School of Civil and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology <Shenzhen>, Shenzhen 518055, China; 4. Key Laboratory of Water Resource Utilization and Environmental Pollution Control in Shenzhen, Shenzhen 518055, China)

Abstract: The Illumina HiSeq high-throughput sequencing technology was used to study the microbial diversity and variation in the effluent from each unit and in the filter media of an O₃/BAC drinking water treatment process, located in a southern humid heat area of China. A total of 385 499 effective tags were sequenced, which were classified as 45 phylum, 86 class, 165 order, 308 family, and 567 genera. The microbial diversity decreased with the whole process. Especially, the microbial diversity was reduced greatly in the disinfection process, which indicated high disinfection efficiency. However, the

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2015ZX07406-004); 深圳市水务(集团)有限公司内部课题 (2016YT12)

通信作者: 张金松 E-mail: zhangjinsong@waterchina.com

microbial diversity in the effluent of biological activated carbon filter was larger than that of the V-shaped sand filter. In addition, the filtration sand and the activated carbon were attached by a large amount of microorganisms, and the microbial diversity in the activated carbon was larger than that of raw water. Moreover, the contents of *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Planctomycetes* were relatively high in all samples, accounting for 68.47%, 10.64%, 6.15%, 4.63% and 1.51%, respectively. A large number of *Sphingomonas* were detected in the sample of FB, FS and BAC, and were found together with *Pseudomonas* in finished water, both of which could cause corrosion of the pipe network and were great potential risks to the drinking water.

Key words: drinking water; O_3 /BAC process; microbial diversity; Illumina HiSeq high-throughput sequencing

臭氧/生物活性炭(O_3 /BAC)工艺是我国广泛采用的一种饮用水深度处理技术^[1]。颗粒活性炭作为微生物载体和吸附介质对水中有机物的去除起着至关重要的作用^[2,3],其微生物安全问题也一直被人们所关注。祝玲^[4]对饮用水处理中 O_3 /BAC工艺的微生物安全性研究发现,生物活性炭滤池出水中异养菌数量较常规工艺单元出水增加10~100倍,脱附后水样中异养菌数量增加3~4倍。由于饮用水为贫营养环境,饮用水处理过程中的微生物也以贫养微生物为主,这类微生物大多不能通过传统的平板培养方式进行培养^[5]。随着分子生物学技术的快速发展,16S rDNA扩增子测序技术已成为研究环境样品中微生物群落组成结构的重要手段^[6,7],该技术常被国内外学者用来研究给水工艺中微生物的多样性变化^[8,9]。

以我国南方湿热地区某臭氧/生物活性炭深度处理工艺水厂为研究对象,采用16S rDNA扩增子测序技术,通过Illumina HiSeq高通量测序平台对该水厂原水、混凝沉淀出水、V型砂滤池出水、活性炭滤池出水、出厂水、滤砂以及生物活性炭滤料中微生物多样性进行解析,并明确其变化规律,以期为我国饮用水处理中微生物安全性保障提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品采集与保存

样品采自我国南方湿热地区某 O_3 /BAC深度处理工艺水厂,该厂供水规模为 $52 \times 10^4 \text{ m}^3/\text{d}$ 。于2017年3月13日采用无菌容器采集各工艺单元出水25 L及V型砂滤池的滤砂和生物活性炭各500 g。原水标记为样品RW、混凝沉淀后水标记为样品SB、V型砂滤后水标记为样品FB、滤砂标记为样品

FS、生物活性炭滤后水标记为样品BACF,生物活性炭标记为样品BAC、出厂水标记为样品FW。样品采集后应立即进行试验,如若不能立即处理,应保存在4℃冰箱中,且保存时间不超过24 h。

1.1.2 主要仪器与耗材

PCR仪:Veriti 96 Well;二代高通量测序仪:Illumina HiSeq2500 PE250;台式高速冷冻离心机:TL20M;恒温金属浴:Thermo Scientific;生物控制柜:BCC-1000。

1.1.3 试验材料

引物:515f (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) - 806r (GGACTACHVGGGTWTCTAAT);341f (CCTAYGGGRBGCASCAH) - 806r (GGACTACHVGGGTWTC-TAAT);515f (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) - 907r (CCGTCAATTCCTTTGAGTTT)。

酶和缓冲液:Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer。

试剂盒:TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒。

1.2 试验方法

1.2.1 微生物提取

RW、SB、FB、BACF、FW中微生物的样品提取:水样通过0.22 μm的滤膜过滤,截留了微生物的滤膜存放至已灭菌的50 mL离心管内并于-80℃下保存。样品FS、BAC中微生物的提取:取滤砂和生物活性炭各5 g,分别置于两个250 mL的锥形瓶中,各加入100 mL纯水。轻微摇动混合,然后置于超声清洗器中超声60 s,随后置于25℃恒温摇床(150 r/min)上振动30 min,使微生物从活性炭表面脱离下来^[10]。沉淀后的上清液用0.22 μm滤膜过滤,截留了微生物的滤膜存放至已灭菌的50 mL离心管内并

于 -80 ℃ 条件下保存。

1.2.2 基因组提取

采用 CTAB 方法对 1.2.1 节中样品的基因组 DNA 进行提取,同时采用琼脂糖凝胶电泳对 DNA 的浓度和纯度进行检测,查看电泳图结果中样品的片段大小、浓度、清晰度是否满足要求,对 DNA 提取量不能满足后续试验需求的样品进行二次提取,若仍然不能满足则放弃该样品。

1.2.3 PCR 扩增

以提取后的基因组为模板,对模板中 16S rDNA 的 V4、V3 + V4、V4 + V5 区域进行扩增,将同一样品的 PCR 产物进行混合,并采用 2% 琼脂糖凝胶电泳予以检测,查看电泳图结果中样品的片段大小、浓度、清晰度是否满足要求,对 DNA 提取量不能满足后续试验需求的样品进行二次扩增,若仍然不能满足则放弃该样品。

1.2.4 Illumina HiSeq PE250 测序

采用 TruSeq® 建库试剂盒对检验合格后的 PCR 产物进行文库构建,并对构建好的文库进行 Qubit 和 Q-PCR 定量分析,检验合格后,委托北京诺禾致源科技股份有限公司使用 HiSeq2500 PE250 上机检

测。

2 结果与分析

2.1 基因组提取及 PCR 扩增和测序结果分析

基因组提取后,采用 PCR-Free 建库并用琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明:RW、FB、FS、BACF、BAC 样品的 PCR 产物目的条带大小正确、浓度合适、清晰可见,可以进行后续分析;而 SB、FW 样品的 PCR 产物目的条带不够清晰,需要进行二次提取,二次提取后,这两组样品同样满足后续建库要求。

2.2 微生物多样性及丰度分析

对 Illumina HiSeq 测序平台得到的下机数据进行拆分、拼接、过滤、质控等处理后得到最终的有效数据 (Effective Tags)^[10~14]。7 样本共获得 385 499 条有效数据,共 97 986 718 个 Base,序列平均长度 Avglent 为 254. 18。使用 Qiime 软件 (Version 1. 7. 0) 计算 Observed_species、Chao1、Shannon、Simpson、ACE、Goods_coverage、PD_whole_tree 指数,测序结果如表 1 所示,使用 R 软件 (Version 2. 15. 3) 绘制稀释曲线,如图 1 所示 (横坐标为从某个样品中随机抽取的测序条数,纵坐标为基于该测序条数能构建的 OTUs 数量,用来反映测序深度情况)。

表 1 Illumina HiSeq PE250 测序结果

Tab. 1 Sequencing results of Illumina HiSeq PE250

项目	Effective Tags	Base	Avglent	α 多样性						
				Goods_coverage	Observed_species	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	PD_whole_tree
RW	56 137	14 201 010	253	0. 993	1 608	7. 284	0. 981	1 814. 564	1 828. 866	122. 488
SB	60 595	15 443 830	255	0. 993	1 578	6. 681	0. 950	1 770. 119	1 808. 983	113. 702
FB	64 276	16 346 443	254	0. 993	1 287	3. 525	0. 646	1 469. 952	1 545. 458	112. 696
BACF	49 598	12 545 098	253	0. 993	1 176	4. 269	0. 793	1 377. 769	1 418. 668	94. 367
FW	53 049	13 416 134	255	0. 995	935	3. 263	0. 625	990. 295	985. 718	87. 856
FS	50 833	13 038 427	256	0. 994	1 595	6. 621	0. 940	1 770. 607	1 794. 715	126. 211
BAC	51 011	12 995 776	253	0. 998	1 968	8. 607	0. 981	2 077. 153	2 075. 315	132. 306

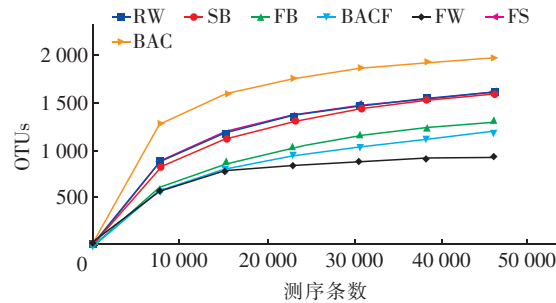


图 1 稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curves

由表 1 分析可知,测序 Goods_coverage 值接近 1,表明此次测序对样品中细菌的覆盖率很高,证明测序选择深度合适,可以满足样品中细菌多样性分析的需要。Shannon 和 Simpson 是菌群多样性指数,Chao1 和 ACE 为菌群丰度指数,数值越高,表明多样性或丰度越高。沿工艺流程菌群多样性指数和丰度指数逐渐降低,表明 O₃/BAC 工艺对微生物有较好的削减作用。此外,通过比较样品 FB 与 FS 以及 BACF 与 BAC 可以发现,滤砂和生物活性炭上的生物多样性及丰度均明显高于滤后水和炭池出水,滤

砂上的微生物多样性及丰度与原水相近,而生物活性炭上的微生物多样性及丰度高于原水,为7个样品中最高,可以推断滤砂和生物活性炭上附着了大量的微生物,在过滤过程中微生物容易受到水流剪切作用而进入下个处理单元,从而影响处理效果,是威胁饮用水安全的一大隐患。

由图1分析可知,7个样品的稀释曲线均趋于平缓,说明测序数据量渐进合理,测序深度合适,可以用于后续分析。此外,稀释曲线可间接反映物种的丰富程度,由此可知,7个样品中物种丰度最高的为BAC、最低的为FW,这与水处理过程中BAC上

滋生大量微生物、消毒剂的使用使得FW物种丰度大幅减少相一致。

2.3 基于分类水平的微生物群落组成分析

分析可知,水处理工艺过程中微生物可归类为45个门、86个纲、165个目、308个科、567个属。在各个水平上,微生物多样性随工艺流程整体呈下降趋势,但生物活性炭池出水中微生物多样性较V型滤池出水不降反增,且滤砂和活性炭上均有大量微生物附着,活性炭上附着微生物的多样性高于原水,这与表1得出的结论一致。

不同分类水平上各样品的微生物组成见图2。

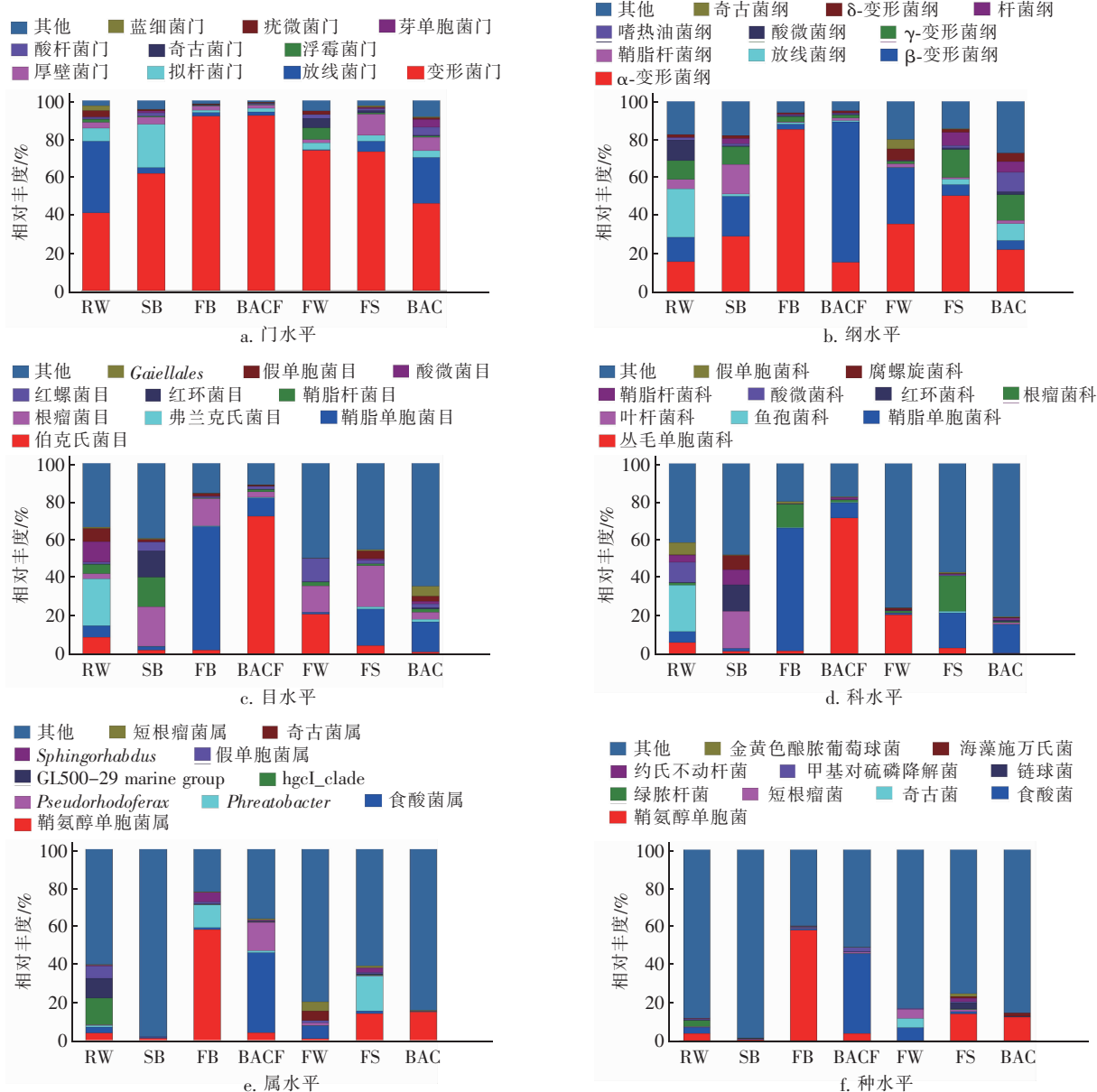


图2 不同分类水平上各样品的微生物组成

Fig. 2 Microbial composition of samples at different classification levels

由图 2 分析可知,整体而言,随着分类水平的细化,测序能够解释的微生物比例越来越低。在门分类水平上,大部分序列属于 5 个门,共占比 91.13%,分别为变形菌门(68.47%)、放线菌门(10.64%)、拟杆菌门(6.15%)、厚壁菌门(4.63%)和浮霉菌门(1.51%)。其中变形菌门占绝对优势,放线菌门在 RW(37.74%)和 BAC(24.11%)样品中占比均较高,但在 FW 样品中占比仅为 0.26%,为所有样品中最低,说明氯消毒对放线菌的杀灭效果较好。

在纲分类水平上, α -变形菌纲(36.52%)、 β -变形菌纲(21.42%)、 γ -变形菌纲(7.61%)、放线菌纲(5.70%)和鞘脂杆菌纲(3.79%)为占比最高的 5 个纲,总占比为 75.04%。其中 α -变形菌纲在整个净水工艺中均大量存在,这是因为 α -变形菌纲是典型的贫养细菌,适合在贫营养环境中生存^[15]。 β -变形菌纲生活在相对缺氧的环境,以小分子有机物为主要营养物质来源^[5],在 7 个样品中, β -变形菌纲主要存在于 BACF 和 FW 中,说明其在活性炭池去除有机物的过程中扮演重要角色。放线菌纲主要存在于原水中。

在属分类水平上,鞘氨醇单胞菌属(13.92%)、食酸菌属(7.78%)、*Phreatobacter*(4.62%)、*Pseudorhodoferrax*(2.47%)和 *hgcl*_clade(2.09%)是已明确分类的属中占比最高的 5 个属。其中鞘氨醇单胞菌属在 FB、FS 和 BAC 样品中大量滋生,且在 FW 样品中亦有微量存在,而此菌属能在高贫营养环境及恶劣条件下生存且不易被消毒剂灭活,属于耐氯菌,是管壁生物膜形成的罪魁祸首^[16]。此外,假单胞菌属在 FW 样品中亦有微量存在,由于铜可在鞘氨醇单胞菌属和假单胞菌属细胞壁中累积,进入管网后可引发生物腐蚀的阳极反应,腐蚀供水管网^[17]。

2.4 样品中微生物主成分分析

主成分分析(PCA)是一种应用方差分解,对多维数据进行降维,从而提取出数据中最主要元素和结构的方法。样品的群落组成越相似,则它们在 PCA 图中的距离越接近。结果表明,RW、SB、FB、FS 和 BACF 等 5 个样品的距离相对较近,说明这些样品的微生物多样性相对趋于一致。而样品 BAC 和 FW 与其他样品相距较远,微生物群落组成与其他样品差异较大。结合表 1 可知,FW 的 Shannon 和 Simpson 指数最低,说明消毒对微生物的多样性与结构组成有明显影响;此外,BAC 和 RW 的 Shannon 和

Simpson 指数相近,但微生物组成差异较大,表明水质条件的改变影响了微生物的结构组成。

3 结论

① 微生物多样性与丰度随工艺流程整体呈下降趋势,但生物活性炭池出水的微生物多样性较高,且滤砂和活性炭上均有大量微生物附着,活性炭上附着微生物的多样性高于原水。

② 消毒工艺能大幅削减水体中的微生物,消毒效果较好。

③ 水处理过程中微生物共归为 45 个门、86 个纲、165 个目、308 个科、567 个属,其中变形菌门(主要为 α -变形菌纲)、放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和浮霉菌门的含量最高,占比分别为 68.47%、10.64%、6.15%、4.63% 和 1.51%;鞘氨醇单胞菌属在 FB、FS 和 BAC 样品中大量滋生,且与假单胞菌属在出厂水中均有微量存在,二者可引起管网腐蚀,应予以重视。

参考文献:

- [1] 陈国强,王剑,张正德,等. 臭氧/生物活性炭工艺的微生物泄漏控制研究[J]. 中国给水排水,2017,33(15):36-41.
Chen Guoqiang, Wang Jian, Zhang Zhengde, et al. Control of microbial leakage from ozonation - biological activated carbon process[J]. China Water & Wastewater, 2017, 33(15):36-41 (in Chinese).
- [2] 张金松,赫俊国. 臭氧化—生物活性炭技术试验研究[J]. 给水排水,2002,28(3):29-31.
Zhang Jinsong, He Junguo. Laboratory study on ozonation - biological activated carbon process[J]. Water & Wastewater Engineering, 2002, 28(3):29-31 (in Chinese).
- [3] 孔令宇,张晓健,王占生. 臭氧—生物活性炭与单独活性炭工艺处理效果比较[J]. 中国给水排水,2006,22(11):49-51.
Kong Lingyu, Zhang Xiaojian, Wang Zhansheng. Comparison of performance between O₃ - BAC and GAC processes[J]. China Water & Wastewater, 2006, 22(11):49-51 (in Chinese).
- [4] 祝玲. 给水处理中臭氧—活性炭工艺微生物安全性研究[D]. 北京:清华大学,2010.
Zhu Ling. Investigation on the Microbiological Safety of O₃ - BAC Process in Drinking Water Treatment[D]. Beijing:Tsinghua University,2010(in Chinese).

- [5] Nübel U, Garcia Pichel F, Clavero E, *et al.* Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient [J]. *Environ Microbiol*, 2010, 2 (2): 217 – 226.
- [6] Youssef N, Sheik C S, Krumholz L R, *et al.* Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75 (16): 5227 – 5236.
- [7] Hess M, Sczyrba A, Egan R, *et al.* Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen [J]. *Science*, 2011, 331 (6016): 463 – 467.
- [8] 钦颖英, 李道棠, 杨虹. 给水生物预处理反应器的细菌种群多样性和群落结构 [J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13 (1): 104 – 107.
Qin Yingying, Li Daotang, Yang Hong. Population diversity and community structure of bacteria on biofilms in a potable water pretreating bioreactor [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2007, 13 (1): 104 – 107 (in Chinese).
- [9] Chen C L, Liu W T, Chong M L, *et al.* Community structure of microbial biofilms associated with membrane-based water purification processes as revealed using a polyphasic approach [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63 (4): 466 – 473.
- [10] 郭建宁. 陶瓷膜及其集成工艺处理微污染饮用水的研究 [D]. 北京: 清华大学, 2013.
Guo Jianning. Research on the Treatment of Micro-polluted Drinking Water Using a Hybrid Ceramic Membrane Process [D]. Beijing: Tsinghua University, 2013 (in Chinese).
- [11] Magoc T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27 (21): 2957 – 2963.
- [12] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing [J]. *Nature Methods*, 2013, 10 (1): 57 – 59.
- [13] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27 (16): 2194 – 2200.
- [14] Haas B J, Gevers D, Earl A M, *et al.* Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. *Genome Research*, 2011, 21 (3): 494 – 504.
- [15] 陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
Tao Tianshen, Yang Ruifu, Dong Xiuzhu. Systematics of Prokaryotes [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007 (in Chinese).
- [16] Arens P, Tuschewitzki G J, Wollmann M, *et al.* Indicators for microbiologically induced corrosion of copper pipes in a cold-water plumbing system [J]. *Materials and Corrosion*, 1996, 47 (2): 96 – 102.
- [17] 胡杰, 何晓红, 李大平, 等. 鞘氨醇单胞菌研究进展 [J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13 (3): 431 – 437.
Hu Jie, He Xiaohong, Li Daping, *et al.* Progress in research of *Sphingomonas* [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2007, 13 (3): 431 – 437 (in Chinese).



作者简介: 周常 (1994 –), 男, 江西宜春人, 硕士研究生, 研究方向为供水系统中微生物风险控制。

E-mail: 962918361@qq.com

收稿日期: 2017 – 12 – 12