

三格式化粪池出水水质特征及对周边土壤环境的影响

蒯伟, 李厚禹, 高艺, 杨波, 张春雪, 徐艳, 郑向群

引用本文:

蒯伟, 李厚禹, 高艺, 等. 三格式化粪池出水水质特征及对周边土壤环境的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2021, 40(5): 1051-1061.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1231>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

天津市家庭养殖环境中抗生素污染特征与风险评估

阮蓉, 张克强, 杜连柱, 丁工尧, 王素英, 支苏丽

农业环境科学学报. 2021, 40(1): 202-210 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0694>

土壤镉污染北方小麦生产阈值及产区划分初探

管伟豆, 肖然, 李荣华, 刘翔宇, 潘君庭, 黄永春, 张增强, 郭堤

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 969-977 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1151>

畜禽粪便中铜和锌污染现状及风险分析

袁凯, 熊苏雅, 梁静, 李彦明, 乔玉辉, 李花粉, 陈清

农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1837-1842 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0142>

活性铁铝矿物对农田土壤有机碳固定的研究

龙娟, 廖宇琴, 文首鑫, 木志坚, 杨志敏

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 1133-1140 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1247>

不同地区农田土壤多环芳烃污染特征与来源解析

刘月仙, 解小凡, 杜志伟, 邱慧, 张瑞丽, 张萌, 王伟

农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2539-2547 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0448>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

蒯伟, 李厚禹, 高艺, 等. 三格式化粪池出水水质特征及对周边土壤环境的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(5): 1051–1061.

KUAI Wei, LI Hou-yu, GAO Yi, et al. Environmental risk and influencing factors of effluent from three-compartment septic tanks [J].

Journal of Agro-Environment Science, 2021, 40(5): 1051–1061.



开放科学 OSID

三格式化粪池出水水质特征及对周边土壤环境的影响

蒯伟^{1,2}, 李厚禹¹, 高艺¹, 杨波¹, 张春雪¹, 徐艳^{1*}, 郑向群¹

(1. 农业农村部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2. 华中农业大学资源与环境学院, 武汉 430070)

摘要:为进一步摸清三格式化粪池对粪污的处理效果及其对周边环境的影响, 本文选择了广西壮族自治区典型村, 对三格式化粪池第二、三格出水水质特征进行分析, 同时采集三格式化粪池周边横向及纵向土壤, 探究其理化指标与微生物群落结构的变化规律, 从而阐述三格式化粪池产生的环境风险, 明确三格式化粪池周边横向土壤与纵向土壤中潜在致病菌变化的关键影响因素。研究发现, 三格式化粪池对粪污中的有机质(TOC)、总氮(TN)、总磷(TP)的平均去除率分别为66.77%、61.82%和26.64%, 然而, 三格式化粪池第三格出水中TOC、TP、TN含量仍高达219.0、32.9、226.0 mg·L⁻¹, TOC含量超过《农田灌溉水质标准》(GB 5084—2005)要求。三格式化粪池周边土壤中的TOC、TN、TP的含量随化粪池距离和深度的增加而下降。距离化粪池10 m处表层土壤TOC、TN、TP分别为23.2 g·kg⁻¹、131.0 g·kg⁻¹、72.3 mg·kg⁻¹; 而40 cm深度土壤TOC、TN、TP值分别为22.9 g·kg⁻¹、89.0 g·kg⁻¹、80.3 mg·kg⁻¹。距离化粪池10 m处表层土壤TOC、TP、TN含量均高于背景土壤中TOC(22.3 g·kg⁻¹)、TN(79.9 g·kg⁻¹)和TP(71.3 mg·kg⁻¹)的含量。PLS-DA分析表明, 化粪池出水能够影响周边土壤环境微生物结构与分布, 且三格式化粪池出水与周边土壤均检出潜在致病菌。通过Spearman与RDA分析可得, 横向土壤的TP是影响潜在致病菌分布的关键环境因素($P < 0.01$); 纵向土壤中, TOC与梭状芽孢杆菌(*Clostridiales*)、拟杆菌(*Bacteroidales*)等个别潜在致病菌之间呈正相关关系($P < 0.05$)。结果表明: 三格式化粪池可影响周边土壤的理化性质和微生物群落结构, 可能是由于三格式化粪池存在溢漏、渗漏或者在粪污转运过程中的滴漏等, 而污染了周边土壤。

关键词:三格式化粪池; 环境风险; 微生物群落; 潜在致病菌; 土壤

中图分类号: X703 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2021)05-1051-11 doi:10.11654/jaes.2020-1231

Environmental risk and influencing factors of effluent from three-compartment septic tanks

KUAI Wei^{1,2}, LI Hou-yu¹, GAO Yi¹, YANG Bo¹, ZHANG Chun-xue¹, XU Yan^{1*}, ZHENG Xiang-qun¹

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China; 2. College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to understand the effects of three-compartment septic tanks on feces disposal and their influence on the surrounding environment, a study was conducted to investigate the effluent quality characteristics from the second and third tanks of three-compartment septic tanks in the typical rural area of Guangxi, China. Horizontal and vertical soil samples around three-compartment septic tanks were collected to explore the changes in their physical and chemical indicators and the microbial community's structure to determine the environmental risks arising from three-compartment septic tanks. The study also sought to clarify the key factors influencing potential pathogenic bacteria changes in the horizontal and vertical soil around the three-compartment septic tanks. The results indicated that the average removal rates of organic matter (TOC), total nitrogen (TN), and total phosphorus (TP) in three-compartment septic tanks were

收稿日期: 2020-10-26 录用日期: 2021-01-08

作者简介: 蒯伟(1996—), 男, 四川成都人, 硕士研究生, 主要研究方向为农业废弃物的处置利用。E-mail: 18281533346@163.com

*通信作者: 徐艳 E-mail: xuyan@aepi.org.cn

基金项目: 创新工程所级重点《农村厕所粪污监测与处置利用关键技术模式研究》(2020-cxgcdrw-zxq)

Project supported: Research on Key Technology Model for Monitoring and Disposal of Rural Toilet Decontamination at the Level of Innovation Engineering (2020-cxgcdrw-zxq)

66.77%、61.82% and 26.64%, respectively. However, the TOC, TP, and TN contents in the third tank were as high as 219.0, 32.9 mg·L⁻¹, and 226.0 mg·L⁻¹, respectively, with the TOC content exceeding the irrigation standard requirements of GB5084—2005 *Farmland Irrigation Water Quality Standard*. The concentrations of TOC, TN, and TP in the soils surrounding the three-compartment septic tanks decreased with an increase in septic tank distance and profile depth. The concentrations of TOC, TN, and TP of the soil at a 10 m distance from the septic tank were 23.2 g·kg⁻¹, 131.0 g·kg⁻¹, and 72.3 mg·kg⁻¹, respectively, while at 40 cm vertically, they were 22.9 g·kg⁻¹, 89.0 g·kg⁻¹, and 80.3 mg·kg⁻¹, respectively. The TOC, TP, and TN content of surface soil at a 10 m distance from the septic tank was higher than that of TOC (22.3 g·kg⁻¹), TN (79.9 g·kg⁻¹), and TP (71.3 mg·kg⁻¹) in the background soil. PLS-DA analysis indicated that effluent from the septic tank could affect the surrounding soil environment's microbial structure. Potential pathogenic bacteria were detected in the effluent and the soil surrounding the three-compartment septic tank. Spearman and RDA analysis indicated that TP in the horizontal soil was a key factor affecting pathogenic bacteria distribution ($P<0.01$). In the vertical soil, TOC was positively correlated with individual bacteria, such as *Clostridiales* and *Bacteroidales* ($P<0.05$). These findings showed that the three-compartment septic tanks could affect the surrounding soil's physical and chemical properties and microbial community structure, which might be due to leakage or dripping during feces transport, thereby polluting the surrounding soil.

Keywords: three-compartment septic tank; environmental risk; microbial community; potential pathogens; soil

随着我国农村经济的不断发展,农村污水的排放量日益增大。各种生活污水的来源中,由厕所产生的污水成为农村生活用水的主要污染源^[1]。针对厕所改造及粪污资源化利用,中共中央国务院在2018年发布了一号文件《关于实施乡村振兴战略的意见》,提出要坚持不懈推进农村“厕所革命”,大力开展农村用户卫生厕所建设和改造,同步实施粪污处理^[2]。同年,中共中央办公厅、国务院办公厅印发了《农村人居环境整治三年行动方案》,将“厕所粪污治理”作为重点任务之一,并且鼓励各地结合实际,将厕所粪污、畜禽养殖废弃物一并处理并资源化利用^[3]。因此,农村改厕工作得以在全国快速推进,并取得了一定成效。目前,厕所粪污通常作为液肥进行农田利用,根据浙江省2017年农村环境卫生监测结果显示,超过62.62%的农户将粪污作为肥料直接使用^[4]。然而,基于笔者课题组前期调研发现,我国农村厕所仍存在建设不规范、清掏不及时等实际问题,直接导致了粪污无害化程度低,处理后的粪污中仍存在大量蚊蝇蛆虫,如长期应用于农业生产,将极大地增加潜在致病菌传播扩散的风险,从而引发环境污染和人体健康问题。值得注意的是,2020年2月武汉大学人民医院与中国科学院武汉病毒研究所研究发现^[5],部分新型冠状病毒肺炎患者的粪便中存在病毒核酸,新冠病毒的传播途径除飞沫传播与接触传播外,还存在粪口传播的可能性。因此,农村厕所粪污无害化问题已成为当下社会热点话题。

三格式化粪池厕所作为目前农村卫生厕所改造的主要技术模式之一,其具有价格低廉、操作简便与易于维护的特点^[6]。三格式化粪池利用粪便中寄生

虫卵密度大、易沉淀的特性去除寄生虫卵和潜在致病菌,同时在密闭条件下对粪污进行厌氧发酵、液化、氨化等处理,从而达到粪污无害化的目的^[7]。然而,我国在三格式化粪池方面的研究起步较晚,在设计施工、质量验收及粪污后处理等方面没有统一的标准规范,导致我国各地区在三格式化粪池的建设、验收、管护上存在较大的差异,普遍存在质量不达标的问题。侯英龙等^[8]对北京地区部分三格式化粪池的研究发现,化粪池建设不规范会影响粪污的处理效果。此外,微生物在生态环境中占据重要的地位,其代谢活动与周围环境显著相关。而对于微生物区系的研究能揭示微生物群落结构与功能,进而可以评估环境介质质量^[9]。对三格式化粪池污水与周围土壤中微生物群落的研究,能够为探究化粪池处理效果及粪污对周围土壤环境的影响提供有效的帮助。因此,对三格式化粪池的出水水质和周边土壤中微生物群落结构变化的研究极具现实指导意义。

未经处理或未完全处理的粪污会滋生蚊蝇,传播肠道疾病,将其直接排入环境可能会造成水体的富营养化等环境问题。金小林等^[10]对江苏省130座三格式化粪池的出水卫生学指标和环境学指标进行研究,结果表明,三格式化粪池对于COD、BOD₅的去除效果较好,而对NH₃-N的去除效果不显著。此外,处理后粪污中大肠杆菌、寄生虫卵等卫生学指标基本能达到无害化卫生要求。寿申岚等^[11]对三格式化粪池的研究也表明其能去除多数寄生虫卵和病原微生物,但对NH₃-N等理化指标的去除达不到理想效果。截至目前,国内外多数学者对于三格式化粪池效果的研究主

要集中在化粪池粪污理化指标或粪大肠菌群、蛔虫卵等无害化指标,且均为原位调研分析,而对于三格式化粪池出水水质中潜在致病菌及其对周边土壤理化指标和微生物群落结构影响的研究较少。

本研究选择广西壮族自治区典型村的三格式化粪池为研究对象,调查三格式化粪池出水水质特征,探究化粪池对周边土壤性质的影响,阐明化粪池影响周边土壤中微生物群落结构、潜在致病菌变化的关键因素,旨在明确三格式化粪池厕所使用和粪污清运过程的环境风险,为三格式化粪池工艺优化和运维提供支撑。

1 材料与方法

1.1 实验设计及样品采集

本研究选择广西壮族自治区桂林市临桂区中庸镇典型村为研究对象进行采样,采用随机取样的方法选取了10户农户,对其进行基本情况的调研,包括家庭人口组成、供水情况、化粪池使用情况及生活习惯等信息。根据调研结果,选择的农户较为独立,且10 m范围内无污水排放、垃圾堆置等其他外界污染源的影响。最终选取其中6个正常运行且建设安装时间相同、运行时间均为6个月13 d的三格式化粪池为研究对象。分别采集其第二、三格的出水和化粪池周边横向(0、5、10 m)的土样及对应纵向土壤(0~10、10~20、20~30、30~40 cm),具体采样时间为2020年5月12日。去除各样品中的杂质,样品均分为两份:一份4℃保存运输,用于理化性质的测定,另一份于-80℃下储存,用于测定微生物群落结构。

1.2 理化指标的测定

测定出水样品中的有机质(TOC)、总氮(TN)、总磷(TP)和pH,依据第四版《水和废水监测分析方法》进行检测^[12],测定均设3次平行,并取3次平行结果的平均值作为最终结果。土壤样品的pH测定按照《土壤中pH的测定》(NY/T 1377—2007)的方法(水:土=2.5:1);TOC参考鲍士旦《土壤农化分析》^[13]中的重铬酸钾容量法—外加热法测定;TN含量采用《土壤质量全氮的测定 凯氏法》(HJ 717—2014);TP含量测定采用《土壤 总磷的测定 碱熔-钼锑抗分光光度法》(HJ 632—2011)。

1.3 微生物群落结构的测定

采用DNeasy® PowerSoil® Kit试剂盒测定,从0.5 g土壤样品中提取DNA,具体的实验操作步骤按照试剂盒操作手册进行。DNA浓度和纯度利用Nano-

Drop2000进行检测,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的提取质量;利用QuantiFluor™-ST(Promega, USA)进行检测定量。并根据Illumina MiSeq平台(Illumina, San Diego, USA)标准操作规程将纯化后的扩增片段构建PE文库。

1.4 数据处理

采用Alpha多样性指数评估样本本身的多样性程度,Beta多样性指数评估样本之间的微生物群落结构差异性^[14]。应用SPSS 24对各理化指标变化情况进行单因素方差分析。应用R软件包“mixOmics”制作偏最小二乘判别(PLS-DA)分析图,用于揭示微生物群落与样品类别之间的关系模型来实现对样品类别的预测^[15]。运用R语言软件生成冗余分析(Redundancy analysis, RDA),揭示微生物群落与环境因子之间的关联^[16]。采用SPSS 24基于斯皮尔曼分析对优势微生物群落与环境因子(pH、TOC、TP、TN)的相关性进行分析,并运行R语言环境制作Heatmap表达相关性的强弱。此外,应用PICRUST1软件预测微生物群体可能的功能组成^[17]。

2 结果与讨论

2.1 三格式化粪池出水水质及周边土壤理化特征

2.1.1 三格式化粪池处理过程中的水质变化规律

典型村三格式化粪池水质理化特征如图1所示。三格式化粪池第二格粪污中,TOC、TN、TP的含量均值分别高达659.0、592.0、44.8 mg·L⁻¹,而化粪池经过第二格的兼性发酵处理后,第三格中粪污的TOC、TN和TP的含量呈现不同程度的下降,去除率分别为66.77%、61.82%和26.64%。该结果说明,三格式化粪池能够有效地降低粪污中的TOC和TN。根据资料显示,采样点所在地主要农作物为水稻、蔬菜和玉米等。化粪池第三格出水中TOC检出量均值为219.0 mg·L⁻¹,高于《农田灌溉水质标准》(GB 5084—2005)中水作(150 mg·L⁻¹)和旱作(200 mg·L⁻¹)作物对TOC的灌溉要求。因此,对三格式化粪池的出水进行直接农业利用,存在一定的环境风险。张悦^[18]对农村生活污水尾水回田利用研究中发现,当尾水中TN浓度高于实验组浓度72.17 mg·L⁻¹时,可能会对农田造成污染。而本研究中三格式化粪池第三格出水中TN的含量为226 mg·L⁻¹,远超72.17 mg·L⁻¹,若长期对其进行农田利用,可能会增加农业土壤环境负荷。此外,汪浩等^[19]研究表明,不规范运行与维护会使化粪池去除污染物的效能为负值,而本文规范运行的化粪池对污

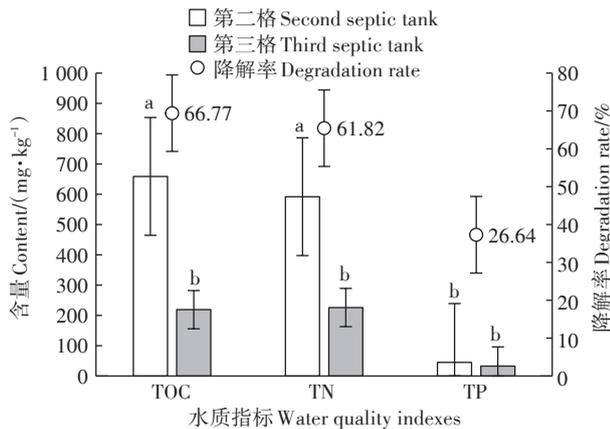
染物有明显的去除效果,但因受多方面因素的影响,仍会对周围土壤环境造成一定污染。综上,建设规范、运行稳定的三格式化粪池出水中污染物消减效果良好,具有回田利用的潜力。在未来的研究中,应优化三格式化粪池处理工艺,提高处理效能,加强粪污的无害化处理效果,同时应当严格把控粪污的农业安全利用。

2.1.2 三格式化粪池周边土壤 pH、TOC、TN、TP 的变化规律

土壤的理化性质是反映土壤质量和健康状态的重要指标。为探究三格式化粪池周围土壤的健康状态,分别从横向和纵向对化粪池周围土壤的 pH、TOC、TN、TP 变化规律进行研究。图 2 为以三格式化粪池为起点,横向(0、5、10 m)土壤理化性质的变化规律。土壤 pH 值随距起点距离的增加而增加,由 7.81

(0 m)增加至 8.09(10 m)。而土壤中的 TOC、TN、TP 的含量则随着与化粪池距离的增加整体呈下降趋势,分别由 46.7 g·kg⁻¹、161.0 g·kg⁻¹、120.4 mg·kg⁻¹(0 m)降至 23.2 g·kg⁻¹、131.0 g·kg⁻¹、72.3 mg·kg⁻¹(10 m)。该现象可能是由于三格式化粪池出现溢漏、渗漏或者在粪污清运过程中出现滴漏等问题,导致粪污中污染物扩散迁移到周边土壤环境。张增伟等^[20]的研究也证实了污水的长期施加会降低土壤的缓冲能力,从而使其 pH、TOC 含量等发生明显的变化,与本文结论一致。

图 3 为纵向土壤(0~10、10~20、20~30、30~40 cm)理化性质的变化规律。由图 3a 可见,0、5、10 m 处的土壤 pH 随着深度的增加呈上升趋势,且三格式化粪池周边的土壤 pH 均高于所在地区的平均水平(6.5),三格式化粪池对周边土壤的 pH 产生影响,使其呈碱性。此外,TOC、TN、TP 在距离化粪池 0 m 处的含量分别由 46.7 g·kg⁻¹、161.0 g·kg⁻¹和 120.4 mg·kg⁻¹(0~10 cm)降低至 38.8 g·kg⁻¹、86.0 g·kg⁻¹和 67.2 mg·kg⁻¹(30~40 cm);5 m 处的含量分别由 48.2 g·kg⁻¹、89.0 g·kg⁻¹和 103.7 mg·kg⁻¹(0~10 cm)降低至 27.2 g·kg⁻¹、49.0 g·kg⁻¹和 32.7 mg·kg⁻¹(30~40 cm);10 m 处的含量分别由 23.2 g·kg⁻¹、131.0 g·kg⁻¹和 82.6 mg·kg⁻¹(0~10 cm)降低至 22.9 g·kg⁻¹、89.0 g·kg⁻¹和 80.3 mg·kg⁻¹(30~40 cm)。以上结果可能是由于三格式化粪池长期运行,池中的污水渗入周边土壤,有机质和盐类被带入土壤后在表层土壤中堆积,使得表层土壤中的 TOC、TP、TN 含量较高,该结论与 Siebe 等^[21]的研究结果一致,污水会将盐类物质和部分固体悬浮物带入土壤,提高土壤中 TOC、TN 等含量。此外,随着土壤深度的增加,依靠土壤本身对污染物的降解作用从而使 TOC、TP、TN 的含量逐渐下降。综上所述,三格式化粪池能够显著影响周边土壤环境的理化特征。然而,除土壤



图中不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。下同
Different lowercase letters represent significant differences between groups($P<0.05$). The same below

图 1 化粪池第二格与第三格水质指标及降解率

Figure 1 Water quality indexes and degradation rate of second and third lattices of septic tank

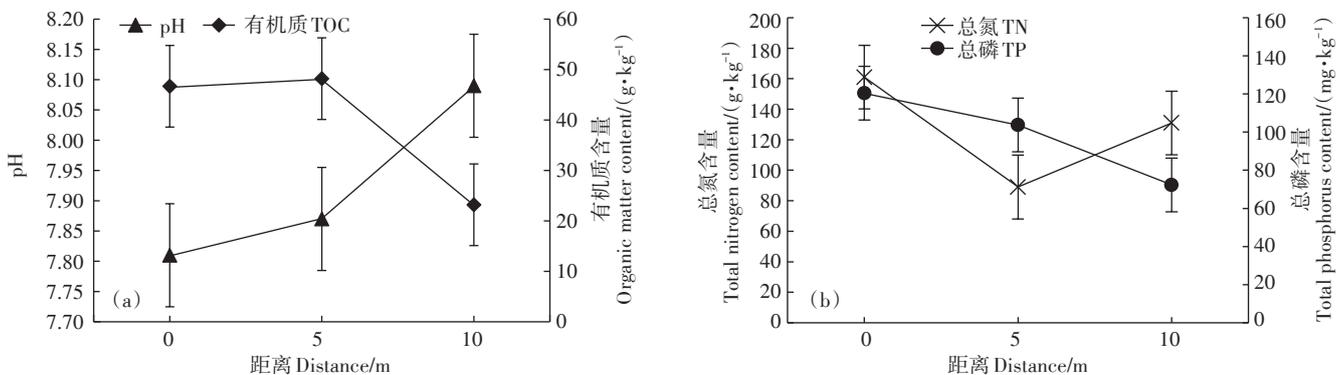


图 2 横向土壤理化性质的变化

Figure 2 Changes of physical and chemical properties of horizontal soil

理化性质外,土壤微生物群落结构的变化与土壤健康状况亦密切相关^[22]。Sutton等^[23]的研究表明,高浓度有机物的引入会改变土壤中微生物的种类、组成和生态功能。因此,应进一步探究三格式化粪池周边土壤环境微生物群落。

2.2 化粪池出水及周边土壤微生物群落结构特征

粪污资源化利用后,土壤中微生物是影响土壤功能的重要角色,同时也是病原体传播的主要载体。因此,本研究通过探究三格式化粪池出水及周围土壤微生物群落结构特点,阐明粪污作为肥料施用的环境风险。

基于OTU水平对不同分组的微生物物种进行聚类分析,结果如图4a所示,三格式化粪池出水与横向土壤中的微生物菌群被分开并聚成4个类群,粪污与土壤菌群组成在OTU水平上具有一定的差异,同时,根据Bray-Curtis距离分析,发现随着与三格式化粪池距离的增加,土壤中微生物菌群的差异也逐渐增大。同时,土壤与三格式化粪池第三格污水中的微生物组成差异与横向距离呈正比。该结果暗示了三格式化粪池可能在使用过程中存在泄漏或溢出的情况,导致粪污扩散至周边土壤,致使土壤与粪污中微生物菌群

的差异程度随着与三格式化粪池距离的增加呈辐射状变化的趋势。因此,三格式化粪池的出水可能会导致周边土壤中微生物群落结构发生变化,这与杜妮妮^[24]的研究相似,污水灌溉后的土壤中微生物群落的物种丰度与多样性明显被改变。

图4b为在属分类水平下微生物菌群前20的相对丰度变化情况,经三格式化粪池处理后的第三格出水与周边土壤样品普遍检出丰度不同的潜在致病菌:梭状芽孢杆菌(*Clostridiales*)和拟杆菌(*Bacteroidales*),其中梭状芽孢杆菌在粪污中相对丰度最大(3.47),而随着与三格式化粪池距离的增加,梭状芽孢杆菌的丰度呈下降趋势,10 m处土壤中梭状芽孢杆菌的丰度(2.01)相较于0 m处(0.89)下降为原来的44.3%。梭状芽孢杆菌是一种潜在致病菌属,其可能产生强致病性的病菌毒素,从而使宿主患病,如坏疽性乳房炎就是梭状芽孢杆菌的感染引发的^[25]。拟杆菌作为一种潜在的条件致病菌,当宿主的微生态平衡被打破,且拟杆菌大量存在于宿主体内,其致病性就会被表达,使宿主患病^[26],其相对丰度的变化与梭状芽孢杆菌类似,在三格式化粪池中的丰度最大(3.27),随着与横向距离的增加,拟杆菌丰度呈下降趋势,10 m处拟杆

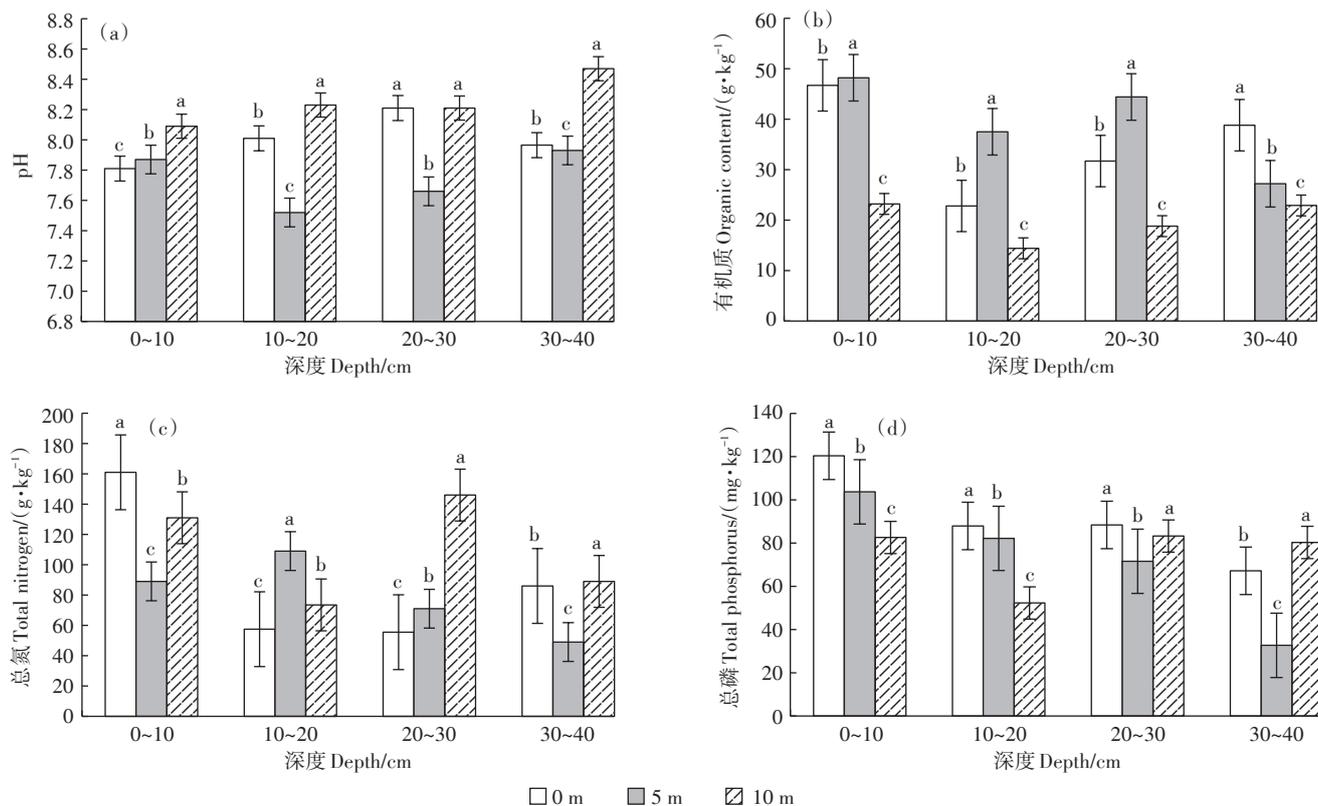
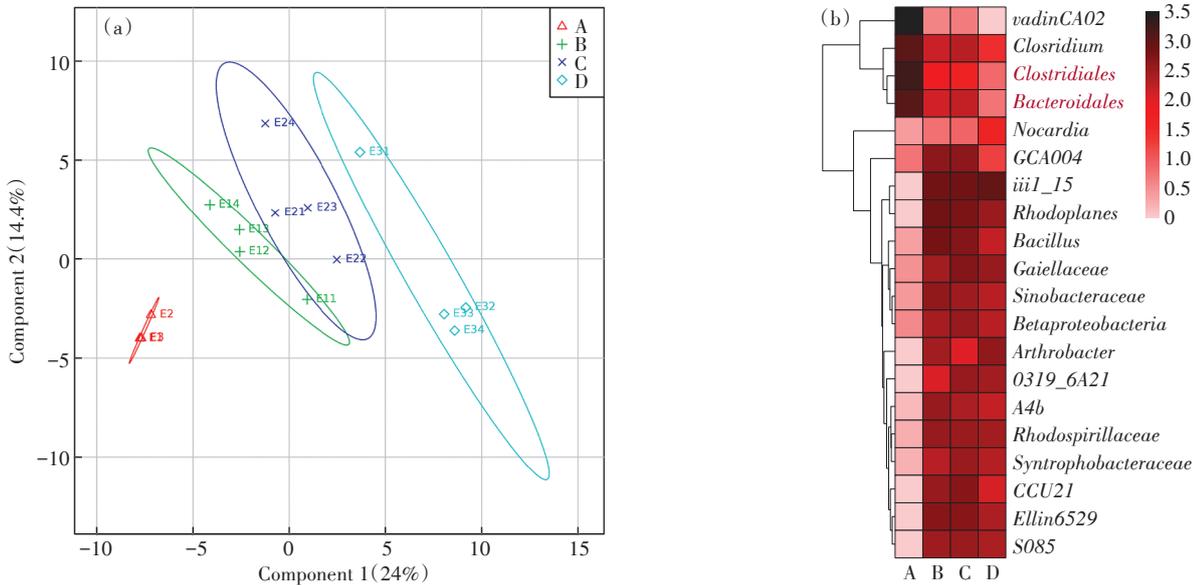


图3 纵向土壤理化性质的变化

Figure 3 Changes of physicochemical properties of longitudinal soil



a为横向土壤基于OTU水平上的PLS-DA分析图,图b为属分类水平下物种前20丰度热图。A、B、C、D为四个分组,其中A代表三格式化粪池污水, B、C、D分别代表距离三格式化粪池0、5、10 m处的土壤
The a is a PLS-DA analysis map of transverse soil based on the OTU level, and the b is a heat map of top20 species abundance at the genus classification level. The A、B、C、D is divided into four groups, in which the A represents the three-format septic tank sewage, and the B、C、D represents the soil 0、5、10 m from the three-format septic tank, respectively

图4 横向土壤微生物群落结构的相似性与多样性

Figure 4 Similarity and diversity of horizontal soil microbial community structure

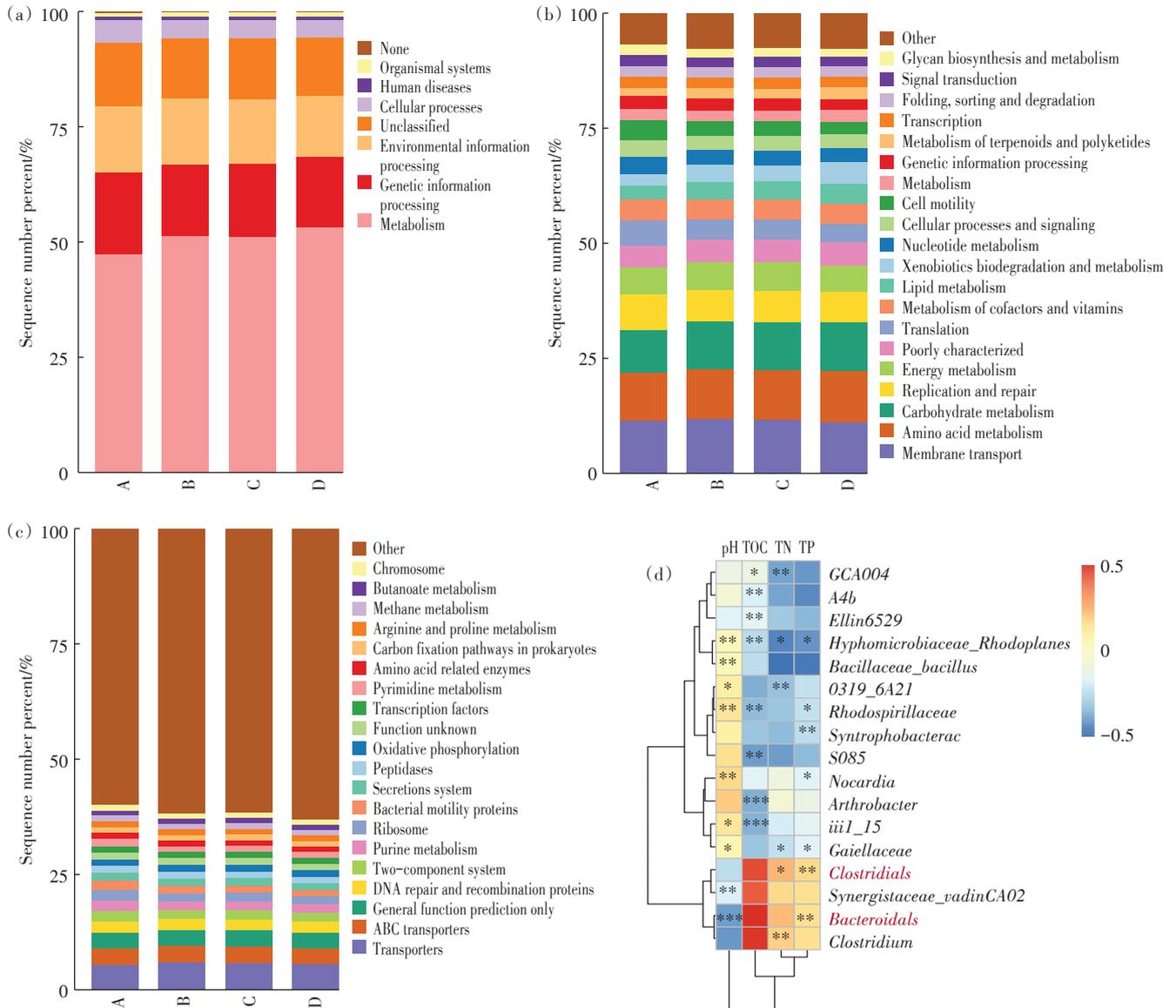
菌的相对丰度最小(0.82)。因此,三格式化粪池周边土壤中的微生物群落结构受到了不同程度的影响,同时还存在将潜在致病菌梭状芽孢杆菌和拟杆菌引入土壤,从而给土壤带来安全隐患的风险。

基于已测细菌基因组的16S rRNA序列,推断它们的共同祖先的基因功能谱,对Greengenes数据库中其他未测物种的基因功能谱进行推断,构建古菌和细菌域全谱系的基因功能预测谱,最后,将测序得到的菌群组成映射到数据库中,对菌群代谢功能进行预测^[17,27]。不同土壤样品细菌代谢功能预测共得到第一层级的代谢通路6类,如图5a所示,包括新陈代谢(Metabolism)、遗传信息处理(Genetic information)、环境信息处理(Environmental information processing)、细胞过程(Cellular processes)、人类疾病(Human diseases)、生物系统(Organismal systems)。其中新陈代谢、遗传信息处理、环境信息处理是功能基因的主要组成,占比超过80%。对功能预测的第二层级功能进行分析(图5b),共发现包括辅酶和维生素代谢(Metabolism of cofactors and vitamins)、细胞运动(Cell motility)、信号传导(Signal transduction)在内的21个子功能类群,其中膜运输(Membrane transport)、氨基酸代谢(Amino acid metabolism)、碳水化合物代谢(Carbo-

hydrate metabolism)占比均在10%左右。结果显示,与化粪池距离0、5、10 m处土壤间微生物群落各类群的功能相对丰度没有显著差异,污水与土壤间细菌代谢功能空间异质性较小。

如图5c所示,第三层级代谢通路下,样品细菌菌群代谢功能预测也无明显的差异,细菌优势功能类群主要为转运(Transporters)、ABC转运器(ABC transporters),组间无显著差异。但是,由于微生物群落的功能预测只能对已知微生物的已知功能进行预测,预测的结果会受到数据库局限的影响,超过50%的微生物代谢功能未能得出,因此还需要进一步的研究,为后续的实验设计提供指导。

此外,根据Spearman相关分析发现,横向土壤的pH、TOC、TN、TP与微生物群落间存在一定的相关性。其中,土壤中微生物*Arthrobacter*和*iii1_15*与TOC的含量相关性极高($P < 0.001$) (图5d)。特别发现潜在致病菌梭状芽孢杆菌与土壤中的TP、TN含量具有显著相关关系($P < 0.05$),潜在致病菌拟杆菌也与TP呈现极显著相关关系($P < 0.01$)。有研究表明,细菌的生长受到磷形式的制约^[28]。因此,梭状芽孢杆菌和拟杆菌可能可以利用多种形式的磷用于自身的生长。



* $0.01 \leq P < 0.05$, ** $0.001 \leq P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。a 为 KEGG L1 微生物群落功能预测柱形图, b 为 KEGG L2 微生物群落功能预测柱形图, c 为 KEGG L3 微生物群落功能预测柱形图, d 为微生物群落前 20 与环境因子相关性热图。A、B、C、D 为 4 个分组, 其中 A 为三格式化粪池污水, B、C、D 分别代表距离三格式化粪池 0、5、10 m 处的土壤

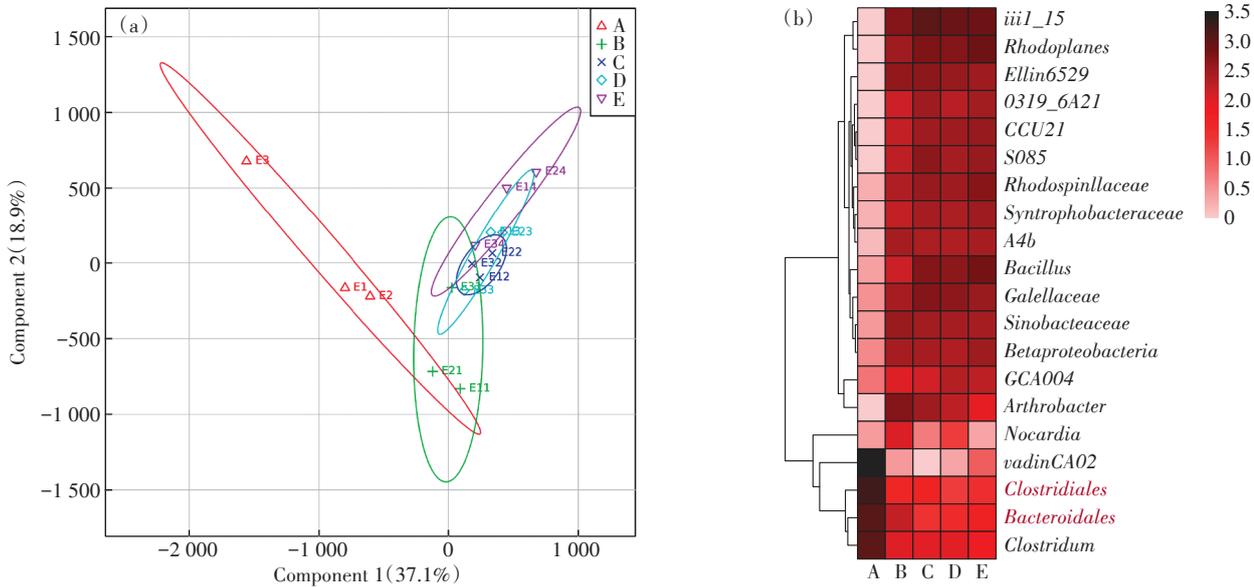
* $0.01 \leq P < 0.05$, ** $0.001 \leq P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。The a is a KEGG L1 microbial community function prediction column, b is a KEGG L2 microbial community function prediction column, c is a KEGG L3 microbial community function prediction column, d is a heat map of the correlation between microbial community top 20 and environmental factors. A, B, C, D in four groups, A indicates three-format septic tank sewage, B, C, D indicates the soil 0, 5, 10 m from the three-format septic tank, respectively.

图 5 微生物群落功能预测柱状图与相关性分析热图

Figure 5 Schematic diagram of microbial community function prediction and correlation analysis

基于 OTU 水平纵向土壤微生物菌群 PLS-DA 分析,三格式化粪池粪污与纵向土壤中微生物菌群聚类后未被明显分开(图 6a),暗示了粪污与表层土壤(0~10 cm)中微生物菌群相似性较高,然而,其与深层土壤(30~40 cm)的样品聚类后有明显的差别,表明了三格式化粪池中的污水可能对周边土壤中的微生物群落结构产生了影响,且影响程度可能与土壤深度紧密相关。图 6b 是纵向土壤在属分类水平下微生物前 20

的相对丰度变化情况,三格式化粪池出水中,梭状芽孢杆菌和拟杆菌是优势菌种。同时,在化粪池周围的土壤中潜在致病菌的丰度(1.3~2.3)明显低于化粪池出水中的潜在致病菌(3.2~3.4),且随着深度的增加,潜在致病菌的丰度有下降趋势。原因可能有以下几点:第一是农户对化粪池粪污清掏的过程中,粪污随吸污管道滴漏进土壤表面,粪污中的潜在致病菌随着雨水的稀释后渗入土壤深层,从而其丰度呈递减的趋



a 为纵向土壤基于 OTU 水平上的 PLS-DA 分析图, b 为属分类水平下各分组物种前 20 丰度热图。A、B、C、D、E 为 5 个分组, A 为三格式化粪池污水, B 为化粪池周围 0~10 cm 深度土壤, C 为 10~20 cm 深度土壤, D 为 20~30 cm 深度土壤, E 为 30~40 cm 深度土壤
 The a is a longitudinal profile soil PLS-DA analysis map based on the OTU level, b is heat map of the top 20 abundance of each grouped species at the classification level. A, B, C, D, E five groups, A indicates three - format septic tank sewage, B indicates 0~10 deep soil around septic tanks, C indicates 10~20 cm deep soil, D indicates 20~30 cm deep soil, E indicates 30~40 cm deep soil

图 6 纵向土壤微生物群落结构组成与差异分析

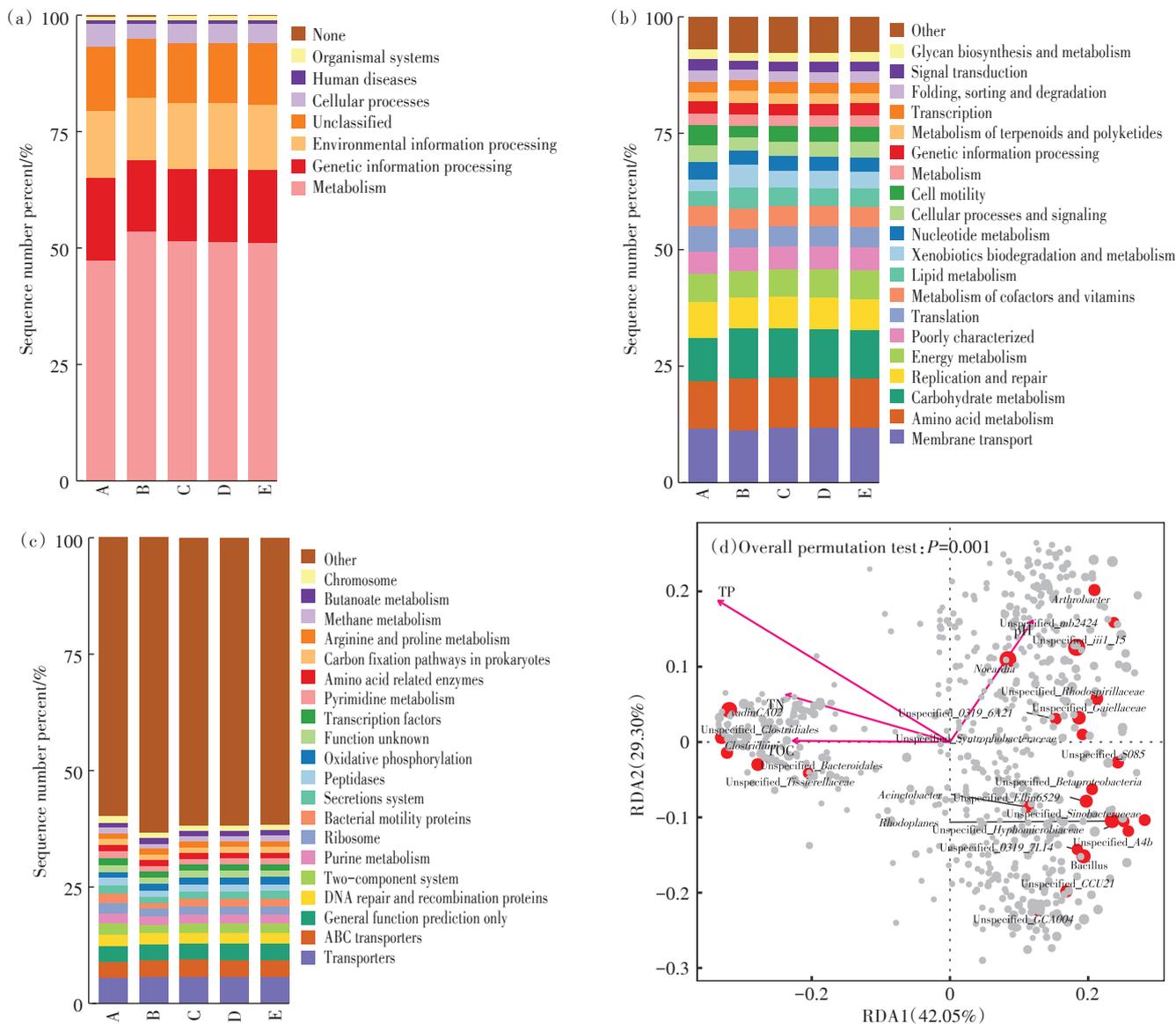
Figure 6 Composition and difference analysis of microbial community

势;第二是农民未及时对化粪池进行清掏,导致化粪池污水溢出到土壤中,随着时间的推移,表层土壤中的潜在致病菌渗透到土壤中深层;第三可能是化粪池本身质量问题,导致粪污泄露,从而潜在致病菌被带入周边土壤,经过土壤的渗滤作用使其呈现递减的趋势。有研究表明,位于人体肠道的拟杆菌具有致癌的作用,这些细菌可以通过产生致癌物质、辅致癌物质或者前致癌物质导致癌症的发生^[29-30]。

对纵向土壤进行功能预测分析发现与横向土壤功能类似,第一层级功能预测分析如图 7a 所示,纵向土壤功能基因的主要组成同样为新陈代谢、遗传信息处理、环境信息处理,占比同样超过 80%。其中,0~10 cm 土壤中微生物新陈代谢功能占比高于其他深度土壤微生物,说明三格式化粪池的污水仅对表层土壤中微生物功能有影响,对深层土壤的影响相对较小。对功能预测的第二层级功能进行分析,如图 7b,共发现包括辅酶和维生素代谢 (Metabolism of cofactors and vitamins)、细胞运动 (Cell motility)、信号传导 (Signal transduction) 在内的 21 个子功能类群,其中膜运输 (Membrane transport)、氨基酸代谢 (Amino acid metabolism)、碳水化合物代谢 (Carbohydrate metabolism) 占比无显著差异,各组间微生物功能无显著差异。如图 7c 所示,第三层级代谢通路下,各组间细菌菌群未表

现明显的差异,出水与纵向不同深度土壤中的细菌优势功能类群均为转运 (Transporters)、ABC 转运器 (ABC transporters)。综上,在 L1、L2、L3 3 个层级上,横向土壤与纵向土壤微生物菌群的功能基因组成基本相似,相对丰度也没有明显差异,该结果表明化粪池尽管会对周围土壤的理化性质、微生物群落结构组成造成影响,但是对于其功能方面几乎没有影响。但这并不表示土壤中细菌群落功能基因完全不受影响,受到影响的那一部分功能基因也可能存在于未被定义部分。因此,针对这方面还需要进一步的研究分析。

采用 RDA 评价环境因子与纵向土壤微生物群落之间的相关关系。由图 7 d 可知,环境因子在第一轴的解釋率为 42.05%,第二轴解釋率为 29.30%,对菌群的变化总解釋率为 71.35%。其中 TOC、TN、TP 与潜在致病菌梭状芽孢杆菌和拟杆菌的变化呈正相关 ($P < 0.05$),其中纵向土壤中 TOC 是细菌生长的主要环境因素,TOC 能够显著改变致病微生物群落的结构,可能是由于纵向土壤中的潜在致病菌梭状芽孢杆菌和拟杆菌对 TOC 的利用效率强于土壤中非致病菌^[31]。综上,TOC、TN、TP、pH 等土壤理化性质的改变会直接或间接地影响微生物群落的结构^[32],而在影响机制和原理方面还需要进一步的研究。



a为KEGG L1微生物群落功能预测柱形图,b为KEGG L2微生物群落功能预测柱形图,c为KEGG L3微生物群落功能预测柱形图,d为环境因子与微生物群落之间的相互关系(冗余分析)。A、B、C、D、E为5个分组,A为三格式化粪池污水,B为化粪池周围0~10 cm深度土壤,C为10~20 cm深度土壤,D为20~30 cm深度土壤,E为30~40 cm深度土壤

The a is a KEGG L1 longitudinal microbial community function prediction column,b is a longitudinal KEGG L2 microbial community function prediction column,c is a longitudinal KEGG L3 microbial community function prediction column,d is the relationship between environmental factors and microbial communities (redundancy analysis). A, B, C, D, E five groups, A indicates three - format septic tank sewage, B indicates 0~10 deep soil around septic tanks, C indicates 10~20 cm deep soil, D indicates 20~30 cm deep soil, E indicates 30~40 cm deep soil

图7 微生物群落功能预测与环境因子相关性分析

Figure 7 Correlation analysis of microbial community function prediction and environmental factors

3 结论

(1) 三格式化粪池降低了第二格化粪池中的TOC、TN、TN等营养物质的含量。但出水仍未达到《农田灌溉水质标准》(GB 5084—2005)中的排放限值,且出水检出潜在致病菌梭状芽孢杆菌和拟杆菌,其以三格式化粪池为中心,向横向、纵向周边土壤环

境扩散。因此,三格式化粪池出水直接农业利用仍存在安全风险。

(2) 三格式化粪池对周边土壤中的TOC、TN、TP等理化指标含量有显著的影响。可能由于三格化粪池运行期间发生溢漏、渗漏或者粪污清掏、转运过程中出现滴漏现象,应加强三格式化粪池的建设质量管控与运维管护,避免化粪池成为新污染源,影响周边

土壤环境质量。

(3)横向与纵向土壤的TOC、TP含量与微生物群落结构变化有明显的相关性。土壤TOC、TP含量变化时,为土壤微生物群落结构的变化和潜在致病菌的传播扩散创造了条件,增加了动物和人类被感染的风险。因此,应定期对农村人居环境进行监测,降低环境健康风险。

参考文献:

- [1] 李慧,付昆明,周厚田,等.农村厕所改造现状及存在问题探讨[J].中国给水排水,2017,33(22):13-18. LI Hui, FU Kun-ming, ZHOU Hou-tian, et al. Current situation and problems of rural dry toilet renovation in China[J]. *China Water & Wastewater*, 2017, 33(22): 13-18.
- [2] 李强.乡村振兴战略下农村地区推进“厕所革命”的路径分析[J].广西农业机械化,2020(3):96-98. LI Qiang. Path analysis of promoting toilet revolution in rural areas under rural revitalization strategy[J]. *Guang Xi Agricultural Mechanization*, 2020(3):96-98.
- [3] 中共中央办公厅,国务院办公厅.农村人居环境整治三年行动方案[R].北京:新华社,2018. General Office of the Communist Party of China, General Office of the State Council. Three-year programme of action for the improvement of rural human settlements[R]. Beijing: Xinhua News Agency, 2018.
- [4] 郑晶利,张同军,孟昭伟,等.2017年陕西省农村人居环境卫生监测结果分析[J].实用预防医学,2019,26(8):932-935. ZHENG Jing-li, ZHANG Tong-jun, MENG Zhao-wei, et al. Monitoring results of environmental sanitation in rural areas of Shaanxi Province, 2017[J]. *Practical Preventive Medicine*, 2019, 26(8):932-935.
- [5] 经济日报.新冠病毒存在粪口传播!什么是粪口传播?如何防范?[EB/OL].(2020-02-02)[2020-10-19].<http://ask.kedo.gov.cn/c/2020-02-02/1016104.shtml>. Economic Daily. The new crown virus exists in fecal mouth transmission! What is fecal oral transmission? How to prevent?[EB/OL].(2020-02-02)[2020-10-19].<http://ask.kedo.gov.cn/c/2020-02-02/1016104.shtml>
- [6] 张玉,吕明环,徐明杰,等.三格化粪池厕所的功能定位及在农村改厕中的应用误区[J].农业资源与环境学报,2021,38(2):215-222. ZHANG Yu, LÜ Ming-huan, XU Ming-jie, et al. Functional orientation of the three-chamber septic tank toilet and errors in its application in rural toilet reform[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2021, 38(2):215-222.
- [7] 朱萌,王强.农村三格化粪池卫生厕所建造技术与改进研究[J].安徽农业科学,2011,39(11):6704-6705,6708. ZHU Meng, WANG Qiang. Study of the construction technologies and improvement of 3-pool septic tank sanitary toilet using by countryside[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(11):6704-6705, 6708.
- [8] 侯英龙,张钰栋.北京市农村地区户厕改革及效果研究[J].建设科技,2020(6):80-82,89. HOU Ying-long, ZHANG Yu-dong. Study on the reform and effect of household toilets in rural areas of Beijing[J]. *Construction Science and Technology*, 2020(6):80-82, 89.
- [9] 郭茹珍,谢春娅.微生物区系的功能基因组研究方法学[J].安徽农业科学,2009,37(16):7345-7347. GUO Ru-zhen, XIE Chun-ya. Functional genomics research method of microbial communities[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(16):7345-7347.
- [10] 金小林,李健,陈晓进,等.三格式化粪池粪便无害化处理的效果[J].中国血吸虫病防治杂志,2009,21(6):515-518. JIN Xiao-lin, LI Jian, CHEN Xiao-jin, et al. Evaluation of non-hazardous treatment efficiency of night soil in “three-grille mode” septic tanks[J]. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2009, 21(6):515-518.
- [11] 寿申岚,万圣,韩成星.常山县农村“三格式”卫生厕所无害化效果监测结果分析[J].中国卫生检验杂志,2014,24(4):562-563. SHOU Shen-lan, WAN Sheng, HAN Cheng-xing. Analysis of “three-pool” rural toilet harmless monitoring results in Changshan county[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2014, 24(4):562-563.
- [12] Stoll C, Sidhu J P S, Tiehm A, et al. Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia[J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(17):9716-9726.
- [13] 鲍士旦.土壤农化分析[M].三版.北京:中国农业出版社,2000:30-109. BAO Shi-dan. Agrochemical analysis of soil[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2000:30-109.
- [14] Yoshiki V B, Meg P, Antonio G, et al. Emperor: A tool for visualizing high-throughput microbial community data[J]. *GigaScience*, 2013, 2(1):16.
- [15] Rohart F, Gautier B, Singh A, et al. Mixomics: An package for ‘omics feature selection and multiple data integration[J]. *PLoS Computational Biology*, 2017, 13(11):e1005752.
- [16] Li H, Xu H, Song H L, et al. Antibiotic resistance genes, bacterial communities, and functions in constructed wetland-microbial fuel cells: Responses to the co-stresses of antibiotics and zinc[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 265:115084.
- [17] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9):814-821.
- [18] 张悦.江苏省农村生活污水处理设施运行及尾水稻田利用的安全性研究[D].南京:南京农业大学,2013. ZHANG Yue. Investigation on equipment running and safety of tail water utilized by paddy field in Jiangsu Province[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.
- [19] 汪浩,王俊能,陈尧,等.我国农村化粪池污染物去除效果及影响因素分析[EB/OL].环境工程学报,2021,15(2):727-736. WANG Hao, WANG Jun-neng, CHENG Yao, et al. Pollutant-removal performance of rural septic tank and its impacting factors[EB/OL]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2021, 15(2):727-736.
- [20] 张增伟,刘庆花,华雪洁,等.农村生活污水土地处理对土壤理化性质的影响[J].青岛农业大学学报(自然科学版),2012,29(1):26-30. ZHANG Zeng-wei, LIU Qing-hua, HUA Xue-jie, et al. Effect of rural sewage treatments on soil physicochemical properties[J]. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 2012, 29(1):26-30.

- [21] Siebe C, Cifuentes E. Environmental impact of wastewater irrigation in central Mexico: An overview[J]. *International Journal of Environmental Health Research*, 1995, 5(2):161-173.
- [22] Chodak M, Klimek B, Azarbad H, et al. Functional diversity of soil microbial communities under Scots pine, Norway spruce, silver birch and mixed boreal forests[J]. *Pedobiologia*, 2015, 58(2/3):81-88.
- [23] Sutton N B, Maphosa F, Morillo J A, et al. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(2):619-630.
- [24] 杜妮妮. 粪肥和污水还田对土壤微生物群落及抗生素抗性基因分布的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2019. DU Ni-ni. Effects of livestock manure or sewage on soil microbial community and antibiotic resistance genes in farms[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2019.
- [25] 张黎黎, 王红枫, 王刚, 等. 中西医结合治疗奶牛坏疽性乳房炎[J]. 吉林畜牧兽医, 2011, 32(2):37. ZHANG Li-li, WANG Hong-feng, WANG Gang, et al. Treatment of cow gangrene mastitis with integrated Chinese and western medicine[J]. *Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2011, 32(2):37.
- [26] 吴彦彬, 李亚丹, 李小俊, 等. 拟杆菌的研究及应用[J]. 生物技术通报, 2007(1):66-69. WU Yan-bin, LI Ya-dan, LI Xiao-jun, et al. The study and application on bacteroides[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2007(1):66-69.
- [27] Comeau A M, Douglas G M, Langille M G I. Microbiome helper: A custom and streamlined workflow for microbiome research[J]. *Msystems*, 2017, 2(1):e0012716.
- [28] 姜登岭, 倪国葳. 配水管网中总磷、微生物可利用磷对细菌再生长的影响[J]. 河北联合大学学报(自然科学版), 2014(4):108-112. JIANG Deng-ling, NI Guo-wei. Effects of total phosphorus and microbial available phosphorus on bacterial regrowth in distribution pipe network[J]. *Journal of North China University of Science and Technology(Natural Science Edition)*, 2014(4):108-112.
- [29] Tannock G W. Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem[J]. *British Journal of Nutrition*, 2002, 87(Suppl 2):199-201.
- [30] 郭世奎, 包维民, 龚昆梅, 等. 实时荧光定量PCR法研究结肠癌患者肠道拟杆菌属、梭杆菌属和梭菌属量的变化[J]. 中国微生物学杂志, 2010, 22(1):24-28. GUO Shi-kui, BAO Wei-min, GONG Kun-mei, et al. Real-time fluorescence quantitative-PCR analysis of the variation of *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Clostridium* in patients with colorectal cancer[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2010, 22(1):24-28.
- [31] 朱立月, 丁美月, 黄冠南, 等. 内蒙古通辽市砂质土壤中微生物群落结构及其与环境因子的关系[J]. 科学技术与工程, 2018, 18(20):347-352. ZHU Li-yue, DING Mei-yue, HUANG Guan-nan, et al. Microbial community structure and the correlation between environmental factors and community structure in sandy soil of Tongliao in Inner Mongolia[J]. *Science Technology and Engineering*, 2018, 18(20):347-352.
- [32] Ma J, Ibekwe A M, Yang C H, et al. Bacterial diversity and composition in major fresh produce growing soils affected by physiochemical properties and geographic locations[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 563:199-209.