

污水灌溉后土壤中病原菌的传输特性研究

王鹏飞¹, 周利霞², 刘俊良^{2*}

(1. 哈尔滨工业大学环境科学与工程博士后科研流动站, 黑龙江哈尔滨 150090; 2. 河北农业大学城乡建设学院, 河北保定 071001)

摘要 通过全面研究污水灌溉后病原菌的传输过程, 提出了定量划分吸附后的病原菌的方法, 分析了污水灌溉后土壤吸附作用的去除效果, 旨在为污水病原菌的健康风险评估提供理论基础, 同时也为采取人工措施防控污水中病原菌的数量提供依据。

关键词 污水灌溉; 病原菌; 传输特性

中图分类号 X53 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2010)14-07460-02

Study on Transmission Characteristics of the Pathogenic Bacteria after Sewage Irrigation

WANG Peng-fei et al (Environment Science and Engineering Post-doctoral Research Station, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090)

Abstract Through the comprehensive study on the adsorption process of the pathogenic bacteria after the sewage irrigation, the quantitative division of the bacteria adsorbed in the soil was completed by a designing experiment. The quantitative division supplied a theoretical foundation for the bacteria health risks at the same time provided the basis for the bacteria control policy of the waster.

Key words Sewage irrigation; Pathogenic bacteria; Transmission characteristic

鉴于水资源紧缺的现状, 污水灌溉已势在必行^[1]。然而, 污水所含病原菌的量却成为实施污水灌溉的最大隐患。经调查, 污水在处理前病原菌含量大, 总大肠杆菌数一般为 $10^5 \sim 10^8$ 个/ml, 经处理后数量虽明显下降, 但剩余菌量基本为 $10^4 \sim 10^6$ 个/ml, 仍有很大危险性^[2-3]。目前, 关于污水灌溉后土壤的安全性研究主要集中于重金属^[4]、无机盐^[5]和有机物污染方面^[6-7], 而对土壤病原菌污染及其危害方面的研究却鲜见。各国污水灌溉微生物的质量标准也存在很大差别, 缺乏统一的标准和控制依据^[8]。

试验表明, 土壤的吸附性对于病原菌的去除效果明显, 污水中的病原菌进入土壤后被划分为3部分菌量(未与土壤发生吸附作用而游离于土壤孔隙内的病原菌; 与土壤发生吸附作用但吸附力较弱且容易发生解吸的病原菌; 吸附作用力较强, 但失去代谢能力的病原菌)。因此, 污水灌溉后能否发生吸附反应, 吸附后能否解吸, 吸附的紧密程度等因素直接影响病原菌在土壤中的危害性。因此, 笔者对污水灌溉后病原菌的传输过程进行了全面研究, 提出通过设计试验对与土壤发生吸附作用后的病原菌量进行定量划分, 这能够借助划分结果对污水灌溉后病原菌的威胁性进行初级预测, 以便在灌溉前提出灌溉措施, 从而降低污水灌溉后病原菌的健康风险。

1 材料与试验方法

1.1 试验材料 液体培养基: 牛肉浸膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 蒸馏水 15 L。该培养基的适宜 pH 值为 7.4, 用 HCl 和 NaOH 调节 pH 值。煮沸后, 于 1.013×10^5 Pa 121 °C 灭菌 20 min。大肠埃希氏菌^[9] 从生活污水中分离、纯化该菌, 再将纯化后的菌种经液体培养基培养后过滤, 提取出高浓度细菌悬液^[10], 于 4 °C 保存。试验模型: 有机玻璃柱长度 26 cm, 直径 7 cm。底部为进水端, 并含闸阀用以控制水流, 顶部为出水端, 收集流出液(图 1)。传输介质: 采用未经过污水灌溉的自然土壤, 过 1.2 mm 筛, 孔隙率 49.5%, 容重为 2.07

g/cm³。初始含水率为 11.21%, 大肠菌数小于 3 个/g。用蒸馏水冲洗后再用过氧化氢冲洗, 以除去有机质, 最后用蒸馏水洗净烘干。试验前, 土壤于 1.013×10^5 Pa 121 °C 高温灭菌 20 min。磷酸盐缓冲液: KH₂PO₄ 0.20 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, NaCl 8.00 g, KCl 0.2 g, 蒸馏水 1 L。于 115 °C 高压灭菌 15 min, 目的是过滤时去除菌液的营养成分。

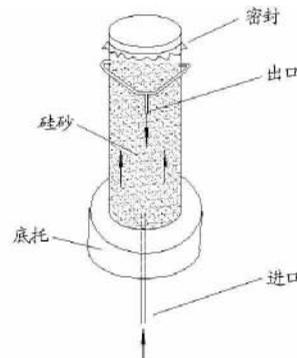


图 1 试验模型

Fig.1 Experimental model

1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液的制备 将已纯化的大肠埃希氏菌在营养琼脂斜面上隔夜培养, 置于液体培养基中, 于 37 °C 振荡培养, 待其生长稳定时收集细菌。菌液通过真空过滤器, 用 0.45 μm 的过滤膜过滤营养液, 并用等量的磷酸盐缓冲液冲洗 2 遍, 保证滤膜不含营养成分, 使细菌在传输过程中不具备生长的营养条件, 忽略试验过程中细菌的繁殖因素。将含菌滤膜置于定量的灭菌蒸馏水中, 配成浓度为 2.3×10^8 个/ml 的菌悬液。

1.2.2 标准曲线的建立 根据微生物细胞浓度与透光度成反比, 与光密度成正比的原理, 建立光密度与菌浓度标准曲线(图 2)。目的是通过测定光密度(由分光光度计精确测出)从该标准曲线中得出菌量大小。

由图 2 可见, 菌量与吸光度值之间的相关性稳定。用吸光度测量菌量, 以便于菌量与光密度值的转换。将所得曲线进行多项式拟合, 所得多项式为: $y = 22.423 0x^4 - 10.256 0x^3 + 4.454 1x^2 + 25.542 0x + 0.001 8$ $R = 0.999 5$ 。其中 y 为菌

作者简介 王鹏飞(1966-)男, 安徽阜阳人, 博士, 从事环境科学与工程研究。* 通讯作者。

收稿日期 2010-02-08

量值 x 为光密度值。

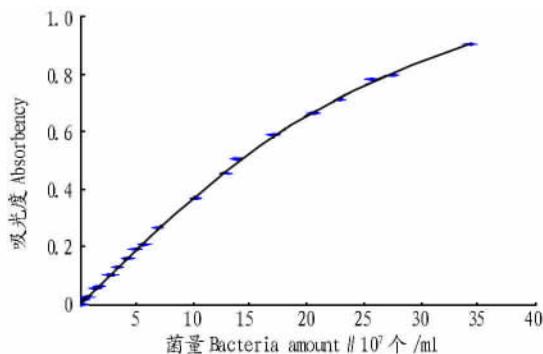


图2 细菌与吸光度关系模拟标准曲线

Fig.2 The standard curve of simulation about the relationship between bacteria and absorbance

1.2.3 细菌吸附曲线的制作。借助蠕动泵将灭过菌的蒸馏水 500 ml 以 10.38 ml/min 的流速流入柱内,使柱达到饱和状态,然后将菌悬液以同样的流速灌入泵。当菌悬液流入 24 min 后开始收集,收集液通过分光光度计配套小管收集,每 3 min 收集 1 管,每管收集 30 s。直至流出液中无细菌为止。每管收集后贴上标签,于 4 °C 保存。试验完成后,测其吸光值。并根据标准曲线计算出所对应的菌量,建立吸附曲线(图 3)。根据实测吸附曲线,通过多项式拟合得到方程: $y = 0.008 4x^6 - 0.327 1x^5 + 1.957 9x^4 - 4.105 4x^3 + 2.593 3x^2 + 0.524 3x + 0.026 6$, $R = 0.990 0$ 。

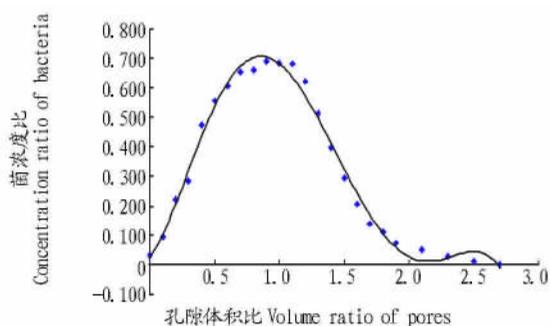


图3 模拟吸附曲线

Fig.3 Simulation of adsorption curves

2 结果与分析

2.1 污水灌溉后土壤中病原菌的吸附过程 以污水中水流为例,介绍污水灌溉后病原菌的吸附过程。由于重力作用,污水中的病原菌随着污水进入土壤孔隙,当土壤颗粒对病原菌的吸引力大于水流动力时,病原菌便会脱离水流被吸附在土壤颗粒表面。土壤的吸附作用力较弱,远小于水流动力,病原菌随着水流继续向前流动,进入下一个孔隙。被土壤颗粒表面吸附的病原菌,一部分由于距离土壤颗粒表面较近,吸附作用较强,使病原菌失去了代谢活性而消亡;一部分则是因为距离稍远,病原菌的代谢活性未受到吸附力的影响,当再有水流通过时,可能由于流速较大,摩擦力较强等原因而被另一股水流带走,并随着该水流进行下一个吸附过程。

从试验角度分析,图 3 的纵坐标表示流出液体的细菌浓度与流入前菌悬液浓度的比值,横坐标表示流出液体的体积与柱的总孔隙体积的比值。横坐标原点表示理论计算的菌悬液的流出点,由图 3 可见,坐标原点左侧已经有菌量检出,

表示由于毛细管作用,使菌液提前流出了柱体;孔隙体积比为 1.0 时,理论上表示菌悬液全部流出的点,这时留在柱内的菌量是与介质发生吸附的菌量,流出柱体的细菌量为不受吸附力影响而随水流运动的菌量;孔隙体积比大于 2.4 时,检测流出的液体不含细菌,这时流出的细菌总量与流入的细菌总量之间的差值是由于介质的吸附性而使病原菌失活的一部分细菌。

2.2 土壤中病原菌量的定量划分

2.2.1 游离的菌量。游离的病原菌是指由于距离土壤颗粒表面较远,而未与其发生吸附作用的病原菌量,该部分细菌可能随水分被植物吸收,从而对植物或人类健康造成直接危害,也可能经土壤传输到达地下水层直接污染地下水。从试验角度分析,游离的菌量理论上是菌悬液全部从柱内流出时,从柱体流出的菌量,菌量值为模拟曲线方程 $-0.1 \sim 1.0$ 的积分值,结果为 0.466 4,即占输入菌量总值的 46.64%。

2.2.2 具有解吸能力的吸附菌量。具有解吸能力的病原菌是指在污水灌溉后与土壤颗粒表面发生吸附作用,但由于吸附作用较弱,仍具有代谢能力的病原菌。该部分菌量的密度很大,如吸附在硅砂介质表面的具有解吸能力的病原菌(图 4),这部分菌量吸附在土壤颗粒表层,当有水流过或土壤成分变更的情况下,会重新变成游离态,对地下水或人类健康构成威胁,因此这部分细菌量具有潜在的危害性,应尽量避免或减少。从试验角度分析,具有解吸能力的吸附菌量是当菌悬液全部流出后,继续被蒸馏水冲洗下来的菌量,对多项式 $1.0 \sim 2.4$ 积分,结果为 0.347 3,即占输入菌量总值的 34.73%。

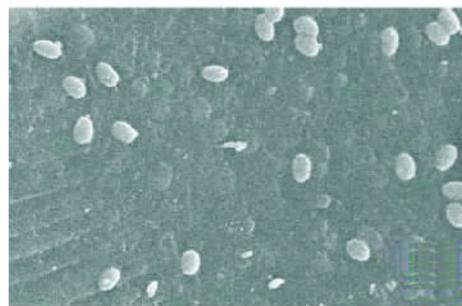


图4 硅砂介质表面具有解吸能力的病原菌

Fig.4 The pathogenic bacteria with desorption ability on the surface of silica sand

2.2.3 不能解吸的吸附菌量。不能解吸的病原菌是指与土壤颗粒表面的吸附作用较强,从而失去代谢活性的病原菌,这部分细菌由于土壤的吸附作用而消亡,对植物、土壤、地下水不构成威胁,因此这部分细菌不具有危害性,应尽可能提高这部分菌量的比率,增强土壤的吸附性。已有试验证明,可以利用不同的物质(如多聚体)来改善土壤的吸附性^[8]。从试验的角度分析,不能解吸的菌量是指柱体内流出的菌量与流入菌量的差值,即 $1.000 0 - 0.466 4 - 0.347 3 = 0.186 3$,即占输入菌量总值的 18.63%。

3 结论

土壤是生态系统的重要组成部分,其对病原菌具有吸附作用,使其又成为污水中病原菌的天然过滤器。笔者对吸附后的病原菌进行了定量划分,得出土壤吸附作用发生后的

(下转第 7521 页)

为指标 选用 $L_9(3^3)$ 正交设计表 对杏鲍菇添加量、淀粉用量和大豆分离蛋白用量这 3 个因素进行正交试验。各因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 The factors and levels of the orthogonal test

水平 Level	因素 Factors		
	A 杏鲍菇 用量//% Dosage of <i>Pleurotus eryngii</i>	B 淀粉用 量//% Dosage of starch	C 大豆分离蛋 白用量//% Dosage of soybean protein isolate
1	5	5	1
2	10	10	2
3	15	15	3

2 结果与分析

由表 2 中极差分析结果可知 各因子对杏鲍菇灌肠工艺影响的主次顺序为: B > C > A 即淀粉用量的影响最大 大豆

表 2 杏鲍菇灌肠生产工艺的正交试验结果

Table 2 The results of the orthogonal test for the production process of *Pleurotus eryngii* enema

试验号 Test No.	A	B	C	D	感官评价得分			
					Sensory evaluation score			
					I	II	III	Tt
1	1	1	1	1	46	53	50	149
2	1	2	2	2	51	64	60	175
3	1	3	3	3	53	38	59	150
4	2	1	2	3	65	47	52	164
5	2	2	3	1	66	49	71	186
6	2	3	1	2	50	35	56	141
7	3	1	3	2	47	62	57	166
8	3	2	1	3	49	58	48	155
9	3	3	2	1	36	41	53	130
k_1	50.0	54.0	51.3	51.7				
k_2	57.0	57.0	55.0	54.0				
k_3	48.6	38.0	62.3	52.3				
R	8.4	19.0	11.0	2.33				

(上接第 7461 页)

部分菌量。依据试验中不能解吸的吸附菌量 可以对土壤去除病原菌的能力进行初级预测 不可逆的吸附菌量所占百分比越大 去除能力则越强。同时通过相同土壤、相同菌悬液、不同高度的试验柱 或相同土壤、相同高度的试验柱、不同菌量密度的菌悬液进行试验 得到了 3 种吸附菌量所占的百分比 从而得出污水灌溉病原菌去除的最适宜深度和污水的最适宜菌量密度 这不但可以为污水灌溉病原菌的质量标准提供控制依据 而且可以采取实际措施控制病原菌的健康风险。

参考文献

[1] 宰松梅, 王朝辉, 庞鸿宾. 污水灌溉的现状与展望 [J]. 土壤, 2006, 38(6): 805-813.

分离蛋白用量次之, 杏鲍菇用量的影响最小, 各因素的优选组合为 $A_2B_2C_3$, 即杏鲍菇用量为 10% 淀粉用量为 10% 大豆分离蛋白用量为 3%。方差分析结果表明 杏鲍菇用量和淀粉用量对杏鲍菇灌肠工艺的影响在 0.10 水平下显著 ($F_A = 4.3162 > F_{0.10}$, $F_B = 7.6341 > F_{0.10}$) 即二者是影响杏鲍菇灌肠工艺配方的关键因子 杏鲍菇用量和淀粉用量的高低均决定着杏鲍菇灌肠的风味和品质。

3 结论与讨论

试验研究表明 杏鲍菇灌肠的最佳工艺配方为 10% 的杏鲍菇, 10% 的淀粉, 3% 的大豆分离蛋白; 杏鲍菇和淀粉用量是影响杏鲍菇灌肠工艺配方的关键因子 杏鲍菇和淀粉用量的高低均决定着杏鲍菇灌肠的风味和品质 这与孙敏等人在香菇火腿加工研究中得到的结论基本一致 [1]; 在灌肠的颜色和口感上杏鲍菇应优于香菇 这是菌类自身风味决定的。

在该研究中 笔者使用玉米普通淀粉 而王玉田等认为在灌肠工艺中使用玉米改性淀粉 所得产品在弹性、滋味和气味、组织状态及贮藏性方面明显优于使用玉米普通淀粉 并具有较高的成品率和经济效益 [4] 这一观点值得笔者在后续试验中借鉴。

杏鲍菇所含各种微量元素可与肉类中的高蛋白及多种必需氨基酸发生功能上的互补 因而该研究所得杏鲍菇灌肠具有菌类和肉类的双重营养。该研究不但提高了肠类的营养价值、保健功能 满足人体多种营养成分的需要 而且丰富了香肠的花色品种 为菌类灌肠研究提供了参考。

参考文献

[1] 孙敏, 丁明石. 香菇火腿加工工艺的研究 [J]. 现代农业科技, 2006(8): 134-135.
 [2] 危贵茂, 钟卫民, 袁士成. 金针菇火腿肠的研制 [J]. 肉类工业, 2005(1): 16-18.
 [3] 邵伟, 鲁林, 能泽. 发酵平菇香肠的研制 [J]. 肉类工业, 2003(6): 20-22.
 [4] 王玉田, 靳胜福, 薛剑. 改性淀粉在灌肠制品中的应用效果研究 [J]. 食品工业科技, 2004, 25(9): 79.
 [5] 仇付国. 城市污水再生利用健康风险评估理论与方法研究 [D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2004.
 [6] 仇付国, 王晓昌. 污水再生工艺去除病原体效果的评价 [J]. 中国给水排水, 2005, 21(7): 52-54.
 [7] 张炜炜. 土壤的污染与防治 [J]. 福建农业, 2003(6): 16.
 [8] 徐明岗, 李菊梅, 李志杰. 利用耐盐植物改善盐土区农业环境 [J]. 中国土壤与肥料, 2006(3): 6-10.
 [9] 李志萍, 陈肖刚, 陈爱玖, 等. 环境中的多环芳烃及其生物恢复技术 [J]. 世界地质, 2002, 21(4): 358-363.
 [10] 钟秀明, 武雪萍. 我国农田污染与农产品质量安全现状、问题及对策 [J]. 中国农业资源与区划, 2007, 28(5): 27-32.
 [11] 何星海, 马世豪. 再生水的卫生安全问题探讨 [J]. 城市给排水, 2004, 30(3): 1-4.
 [12] 蒋静艳, 汤伟, 朱秋兰, 等. 不同水分条件下不同土壤微生物类群产 N_2O 量的初步研究 [J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(6): 1535-1540.
 [13] WEINBERG Z G, CHEN Y, PINTO R, et al. Fate of inoculated *Escherichia coli* in hay [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102: 1537-1543.