

大连沿海排污口及邻近水域细菌动态分析*

杨文新^{1,2} 樊景凤³ 周君¹ 王中华¹ 葛林科³
丁德文¹ 苏秀榕¹ 李太武⁴

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 辽宁师范大学生命科学学院 大连 116081;
3. 国家海洋环境监测中心 大连 116023; 4. 宁波城市职业技术学院 宁波 315110)

提要 于 2011 年 3 月、5 月、8 月和 10 月对大连沿海 10 个排污口及部分排污口的邻近水域分别采集水样,对样本进行细菌总数 3M 试纸计数、2216E 培养基和 TCBS 培养基培养并菌落计数,对不同菌株进行 16S rRNA 基因克隆测序,鉴定种属,对细菌时间、空间的动态分布与群落结构及细菌分布与生态因子的相关性进行了分析。结果表明,不同的排污口之间细菌总数差别很大,数量在 $(1.6—500.0) \times 10^4$ cfu/mL 之间;排污口与其邻近水域差异明显,排污口、邻近 5m、100m 和 500m 距离的细菌总数全年平均分别为 77.94×10^4 、 34.00×10^4 、 4.520×10^4 和 0.448×10^4 cfu/mL。不同季节之间,远距离水样季节性差异较大,而排污口间季节性差异相对较小。在群落构成上,假交替单胞菌属、肠杆菌科、假单胞菌属、弧菌属和希瓦氏菌属为优势菌属,检出率较高,数量较大。细菌分布与多种生态因子具有不同程度的相关。

关键词 排污口;细菌数量;动态分析;群落结构;相关性
中图分类号 X55

海洋是人类可持续发展的重要保障,而日益严重的海洋环境污染也是沿海国家和地区不得不面对的迫切问题。排污口是人类将工业废水、生活废水排入海洋的一个主要途径,是近岸海域复杂生态系统的一个重要组成部分,是人类活动影响海洋环境,尤其是近岸海域生态环境的一个主要窗口。排污口依污水来源分为市政排污口和工业排污口,依排污口所处海洋功能区分为旅游区排污口、养殖区排污口、港口排污口(航道排污口)和排污区排污口,其中旅游区排污口、养殖区排污口对人类的生产和健康具有直接的影响。

每年大量的工农业废水、生活废水经排污口排入海洋,且多数排污口存在超标排放现象,《中国海洋环境质量公报》显示,2007 年监测的全国范围内入海排污口有 67% 超标排放,2010 年有 54% 超标排放,

2009 年对大连地区所监测的 40 个排污口中有 20 个超标排放。陆源入海排污口将大量的重金属、无机化合物、有机污染物等排入海洋的同时,也携带了大量的微生物,包括多种细菌、病毒等进入海洋,对近岸海域环境造成不可避免的影响。虽然国内外对海洋微生物的鉴定、分布及致病性等有了较多的研究(张晓华等,1997; Son *et al.*, 1998; Ryang *et al.*, 1999; 彭安国等,2003),但针对排污口的细菌学研究非常有限,未见对大连沿海排污口的研究报道。而目前我国对排污口的设置和管理,如排污口的选址、排污方案和混合区划分等还缺乏科学的、统一的技术论证,对污染源的分布特征还不甚明确。因此,开展排污口及邻近水域细菌学研究,有利于了解排污口细菌的迁移行为对近岸海域细菌尤其是致病菌生态分布的影响,了解细菌种类,为排污口的合理选址、优化排污方案及

* 海洋公益性行业专项经费资助项目,201105007-4 号;浙江省重大科技攻关项目,2006C13089 号;宁波市科技局资助项目,2008C50027 号;国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室资助项目,201103 号。杨文新,博士研究生,高级实验师, E-mail: ywxin168@163.com

通讯作者: 丁德文,中国工程院院士, E-mail: 13941164513@139.com

收稿日期: 2013-04-26, 收修改稿日期: 2013-06-13

致病菌的检测等提供一定的技术参考。

细菌 16S rRNA 基因被称为细菌的活化石, 适于作细菌分类的依据, 从 20 世纪 70 年代起, 已成为细菌分子鉴定的准绳(Delong, 1982; 洪义国等, 2002), 在国内外已得到广泛的应用(戴欣等, 2002; Elke *et al.*, 2004; 樊景凤等, 2008; 刘兵等, 2009)。

大连滨临黄海和渤海。本文选择其沿海的典型排污口, 利用分子生物学技术, 结合传统分离培养, 对排污口及邻近水域细菌进行 16S rRNA 基因测序和种属鉴定, 了解群落组成和致病菌的种类, 分析排污口及邻近水域细菌时空动态分布特征, 探讨排污口对近岸海域细菌分布的影响, 并对细菌分布与生态因

子的相关性进行分析, 探讨对细菌分布的影响因素。

1 材料与方法

1.1 样品采集

1.1.1 排污口的选择 根据大连地区沿海排污口的地理分布和排污口类型, 选择了凌水河排污口、星海公园游艇港排污口、营城子工业园区排污口、大连开发区污水处理一厂排污口、大连开发区污水处理二厂排污口、泊石湾浴场东排污口、凉水湾排污口、庙上村排污口、龙山村排污口、红旗河入海口十个排污口作为研究对象, 排污口分别以 A—J 大写英文字母表示(表 1)。

表 1 排污口位置和类型
Tab.1 Location and type of sewage outlets

排污口代号	排污口名称	地理方位(经纬度)	排污口类型	排污类型	海洋功能区类型	排污口位置
A	龙山村	121°58'39"E 39°04'40"N	明渠	市政	风景旅游区	开发区
B	凉水湾	122°01'43"E 39°04'30"N	暗管	市政	风景旅游区	开发区
C	开发区污水处理一厂	121°44'48"E 39°02'36"N	明渠	市政	港口区	开发区
D	泊石湾浴场东	121°47'16"E 39°1'18"N	暗管	市政	风景旅游区	开发区
E	庙上村	122°02'39"E 39°04'59"N	暗管	市政	养殖区	开发区
F	红旗河入海口	121°41'11"E 39°06'22"N	明渠	排污河	养殖区	金州区
G	星海公园游艇港	121°34'09"E 38°52'43"N	明渠	市政	风景旅游区	沙河口区
H	凌水河	121°32'7"E 38°51'57"N	明渠	市政	风景旅游区	沙河口区
I	营城子工业园区	121°20'44"E 38°59'20"N	明渠	工业	养殖区	甘井子区
J	开发区污水处理二厂	121°49'59"E 39°03'17"N	明渠	市政	港口区	开发区

1.1.2 采集方法 于 2011 年 3、5、8、10 月进行样本采集, 分别采集排污口和排污口入海口约 5m 处的水样, 对距离星海公园游艇港排污口和大连开发区污水处理一厂排污口约 100m 和 500m 的水样也分别进行了采集。100m 和 500m 水样采取表层水, 呈扇形采取, 再混合水样。排污口不同位点同时采集, 不同排污口也尽量集中采集。水样采集后立即运回实验室处理, 水样的命名和编号与排污口和位点及采样季节相对应, 如 3 月份龙山村排污口、附近 5m 及 100m、500m 的水样分别表示为 3A₀、3A₅、3A₁ 和 3A₂。

1.2 细菌培养和计数

1.2.1 细菌总数计数 采集的水样运回实验室, 立即用灭菌海水适度稀释, 取 0.5mL 接种于 3M 菌落总数测试片, 28℃, 培养 3d, 进行计数, 并换算成每 mL 总菌数。

1.2.2 异养菌培养和计数 采用平板计数方法, 将水样适度梯度稀释, 分别接种于 2216E 培养基(0.5%牛肉膏, 1.0%胰蛋白胨, 1.8%琼脂, 过滤灭菌海水, pH 7.5, 121℃, 灭菌 20min)和 TCBS 弧菌选择性培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司产品), 28℃, 培养 24—48h。将具有不同颜色、形态、光泽的菌落分别计数。

1.3 细菌鉴定

对不同特征的菌株进行 16S rRNA 基因克隆测序, 经 BLAST 比对确定种属。

1.3.1 菌株 DNA 制备 以灭菌牙签分别挑取少量上述具有不同颜色、形态、光泽的菌落, 加入 100μL 双蒸水, 煮沸 15min, 快速制备细菌 DNA。

1.3.2 16S rRNA 基因 PCR 扩增 选择 16S rDNA 保守序列的通用引物: 16S-27F: 5'-AGAGTTTGATC-

CTGGCTCAG-3'; 16S-1492R: 5'-GGTTACCTTGTT-ACGACTT-3', 优化反应条件, 进行 PCR 反应, 对菌落 DNA 进行 16S rDNA PCR 扩增。PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 4min; 94℃ 变性 45s, 55℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 1min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。25μL 反应体系: 10 × buffer 2.5μL, 模板 DNA 1μL, 2.5mmol/L dNTPs 2μL, 10μmol/L 引物各 1μL, 0.25μL *Taq* polymerase, ddH₂O 补足至 25μL。

1.3.3 16S rDNA 测序及细菌鉴定 将上述 PCR 扩增产物用 1.3% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将条带清晰的产物送上海英骏公司测序, 测序结果与 GenBank 中的 16S rDNA 基因库用 Blastn 程序进行比对鉴定。

1.4 数据统计分析

对细菌的数量分布和与生态因子的相关性以 Microsoft Office Excel 软件和 SPSS16.0 统计软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 细菌数量变化

样本经 3M 菌落总数测试片计数, 获得了各个排污口及邻近水域在不同季节的细菌总数, 如表 2 所示, 其中个别站点水样由于断流等原因未采集。可以看出, 细菌数量在时间上、空间上都存在着较大的变化。

2.1.1 细菌数量的空间变化 细菌数量在不同排污口间存在差异, 有的相差悬殊, 排污口与邻近水域细菌数量变化明显, 表 3 为排污口、5m、100m 和 500m 水样的细菌数量平均值, 这一变化通过柱形图可以更直观地表示出来(图 1), 可以看出, 距离排污口由近到远细菌数量呈明显递减趋势。

利用 SPSS16.0 统计分析软件对邻近水域与排污口细菌平均数量的相关分析表明, 邻近水域细菌数量与排污口存在正相关, 500m 水域与排污口相关系数为 0.986 ($P < 0.05$), 显著正相关; 排污口 G、C 不同位点相关分析同样表明邻近水域细菌数量与排污口存在正相关, 其中 5m 位点与排污口相关系数为 0.941 ($P < 0.01$), 极显著正相关(表 4)。

2.1.2 细菌数量的季节性变化 排污口和邻近水域的细菌数量在不同季节之间存在差异(表 3), 排污口和 5m 水样 5 月份和 8 月份数值较高, 100m、500m 水样 8 月份、5 月份数值较高。相关分析表明, 各排污口的细菌数量在不同季节之间基本呈正相关, 邻近水域各季节细菌总数的相关分析显示季节之间多呈显著正相关或极显著正相关(表 5)。

表 2 排污口及邻近水域不同季节细菌总数

Tab.2 Total bacterial numbers in sewages and adjacent waters in different seasons

排污口代号	位点(水样)	采集月份及细菌总数($\times 10^4$ cfu/mL)			
		3 月	5 月	8 月	10 月
A	A ₀	120.0	18.0	22.0	20.0
	A ₅	9.2	6.6	7.0	6.0
	A ₁	0.28	—	—	—
	A ₂	0.24	—	—	—
B	B ₀	24.0	25.0	*	*
	B ₅	6.5	4.0	*	*
C	C ₀	10.0	48.0	86.0	18.0
	C ₅	10.0	16.0	40.0	13.0
	C ₁	0.04	0.50	0.50	0.24
	C ₂	0.08	1.80	0.12	0.12
D	D ₀	19.0	100.0	*	*
	D ₅	1.10	9.0	*	*
E	E ₀	200.0	500.0	242.0	70.0
	E ₅	30.0	380.0	66.0	60.2
F	F ₀	50.0	62.0	100.0	30.0
	F ₅	20.0	18.0	96.0	90.0
G	G ₀	20.0	18.0	96.0	90.0
	G ₅	1.8	12.0	40.0	50.6
	G ₁	0.30	8.0	26.0	0.52
	G ₂	0.03	0.70	0.60	0.01
H	H ₀	40.0	110.0	64.0	68.0
	H ₅	24.0	300.0	40.0	90.0
I	I ₀	24.0	300.0	40.0	90.0
	I ₅	7.0	50.0	6.0	36.0
J	J ₀	6.80	10.0	1.6	8.0
	J ₅	4.30	0.8	—	—

* 表示断流, “—” 表示未采

表 3 排污口及邻近水域不同位点细菌平均数量

Tab.3 Average bacterial numbers in sewages and adjacent waters in different sites

位点	不同季节细菌平均数量($\times 10^4$ cfu/mL)				
	3 月	5 月	8 月	10 月	全年
排污口	51.38	129.70	81.45	49.25	77.94
5m	7.950	68.11	31.80	28.17	34.00
100m	0.210	4.250	13.25	0.380	4.520
500m	0.117	1.250	0.360	0.065	0.448

2.2 细菌的鉴定结果和群落分析

2.2.1 鉴定结果 将挑取的单菌落进行 16S rRNA 基因克隆, PCR 扩增产物用 1.3% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将大约 1500bp 条带清晰的产物测序, 所得序列进行 BLAST 比对, 鉴定出多种细菌近似种: *Escherichia fergusonii* (费格森埃希氏菌)、*Vibrio tas-*

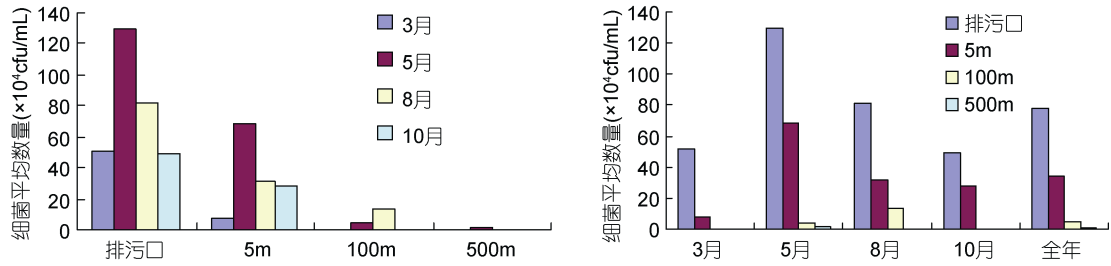


图 1 各排污口不同位点不同季节细菌平均数量分布图

Fig.1 Distribution of average bacterial numbers in sewages and adjacent waters in different sites and seasons

表 4 不同位点间细菌数量的相关性

Tab.4 Correlation of bacterial numbers between different sites

位点	相关系数	排污口	5m	100m	500m
排污口 (n=8)	Pearson Correlation	1.000	0.941**	0.436	0.028
	Sig. (2-tailed)		0.000	0.281	0.948
5m (n=8)	Pearson Correlation	0.941**	1.000	0.323	-0.136
	Sig. (2-tailed)	0.000		0.435	0.748
100m (n=8)	Pearson Correlation	0.436	0.323	1.000	0.169
	Sig. (2-tailed)	0.281	0.435		0.689
500m (n=8)	Pearson Correlation	0.028	-0.136	0.169	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.948	0.748	0.689	
排污口 (n=4)	Pearson Correlation	1.000	0.929	0.364	0.986*
	Sig. (2-tailed)		0.071	0.636	0.014
5m (n=4)	Pearson Correlation	0.929	1.000	0.235	0.930
	Sig. (2-tailed)	0.071		0.765	0.070
100m (n=4)	Pearson Correlation	0.364	0.235	1.000	0.201
	Sig. (2-tailed)	0.636	0.765		0.799
500m (n=4)	Pearson Correlation	0.986*	0.930	0.201	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.014	0.070	0.799	

n=8, 排污口 C、G 位点间细菌总数相关分析样本数; n=4, 排污口与邻近水域细菌平均总数位点间相关分析样本数; *. 显著相关 (P<0.05); **. 极显著相关 (P<0.01)

表 5 季节间细菌数量相关性

Tab.5 Correlation of bacterial numbers between different seasons

季节	相关系数	3月	5月	8月	10月
3月 (n=7)	Pearson Correlation	1.000	0.629	0.644	-0.063
	Sig. (2-tailed)		0.130	0.118	0.894
5月 (n=7)	Pearson Correlation	0.629	1.000	0.692	0.459
	Sig. (2-tailed)	0.130		0.085	0.301
8月 (n=7)	Pearson Correlation	0.644	0.692	1.000	0.195
	Sig. (2-tailed)	0.118	0.085		0.675
10月 (n=7)	Pearson Correlation	-0.063	0.459	0.195	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.894	0.301	0.675	
3月 (n=4)	Pearson Correlation	1.000	0.998**	0.983*	0.903
	Sig. (2-tailed)		0.002	0.017	0.097
5月 (n=4)	Pearson Correlation	0.998**	1.000	0.984*	0.880
	Sig. (2-tailed)	0.002		0.016	0.120
8月 (n=4)	Pearson Correlation	0.983*	0.984*	1.000	0.902
	Sig. (2-tailed)	0.017	0.016		0.098
10月 (n=4)	Pearson Correlation	0.903	0.880	0.902	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.097	0.120	0.098	

n=7, 排污口细菌总数季节间相关分析样本数; n=4, 邻近水域细菌总数季节间相关分析样本数; *. 显著相关 (P<0.05); **. 极显著相关 (P<0.01)

maniensis (塔氏弧菌)、*V. natriegens* (需钠弧菌)、*V. parahaemolyticus* (副溶血弧菌)、*V. metschnikovii* (麦氏弧菌)、*V. harveyi* (哈维氏弧菌)、*V. furnisii* (费氏弧菌)、*V. splehdidus* (灿烂弧菌)、*Enterobacter asbuuriae* (阿斯布肠杆菌)、*E. aerogenes* (产气肠杆菌)、*Proteus mirabilis* (奇异变形杆菌)、*Buttiauxella brennerae*、*Alcaligenes faecalis* (粪产碱菌)、*Listonella anguillarum* (鳎利斯顿氏菌)、*Staphylococcus equorum* (马胃葡萄球菌)、*Pantoea agglomerans* (成团泛生菌)、*Sejorgia jeonii*、*Cronobacter muytjensis* (莫金斯克洛诺斯氏菌)、*Shigella flexneri* (费氏志贺氏菌)、*Arthrobacter protophormiae* (原生节杆菌)、*Serratia nematodiphila*、*S. marcescens* (粘质沙雷氏菌)、*Shewanella decoloratiponis* (脱色希瓦氏菌)、*Shewanella putrefaciens* (腐败希瓦氏菌)、*Marinomonas* (海单胞菌)、*Pseudoalteromonas citrea* (柠檬假交替单胞菌属)、*Pseudomonas stutzeri* (斯氏假单胞菌)、*P. xanthomarina* (黄单胞菌)、*Pseudomonas alcaliphila* (嗜钙假单胞菌)、*P. pseudoalcaligenes* (假产碱假单胞菌)、*Chromohalobacter israelensis* (苏云金色盐杆菌)、*Polaribacter dokdonensis*、*Alteromonas addita*、*Alteromonas macleodii* (麦氏交替单胞菌)、*Salinicoccus halodurans*、*Nesterenkonia aethiopica* (埃修匹加涅斯捷连科氏菌)、*Raoultella terrigena* (土生拉乌尔菌)、*Erwinia tasmaniensis* (塔氏欧文斯氏菌)、*Halomonas variabilis* (可变盐单胞菌)、*Paracoccus zeaxanthinifaciens*、*Psychrobacter maritimus* (近海生嗜冷杆菌)等, 共 30 个属。

比对结果相似性绝大多数在 99% 以上, 少数为 97% 以上, 有学者认为相似性达到 99% 可以认为是同一种菌, 达到 97% 可认为是同一属(Drancourt *et al.*, 2000, 2004), 依此观点, 本次结果能够满足鉴定到属的要求。

检出菌大多数菌为 G⁻ 菌, 占 86.67%, 只有葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、盐水球菌属(*Salinicoccus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)和涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)为 G⁺ 菌, 占细菌的 13.33%, 其中大多数属于变形菌门(Proteobacteria)的 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)。肠杆菌科(Enterobacteriaceae)共有 9 个属: 埃希氏菌属(*Escherichia*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、变形杆菌属(*Proteus*)、布丘氏菌属(*Buttiauxella*)、泛生菌属(*Pantoea*)、志贺菌属(*Shigella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、欧文斯氏菌属(*Erwinia*)、拉乌尔菌属(*Raoultella*), 占全部检出菌属的 30.00%。

2.2.2 菌群结构分析 通过细菌数量统计, 排污口和邻近水域全年优势菌为假交替单胞菌属、肠杆菌科菌、假单胞菌属、弧菌属和希瓦氏菌属。假交替单胞菌出现频率较高, 在排污口和 5m 水样中数量占比最高, 占 44.97%。弧菌属在排污口和邻近水域均有检出, 四个季节均有分布, 数量占比没有假交替单胞菌属、假单胞菌属和肠杆菌科高。排污口之间优势菌群存在差异, 排污口 G、H、I 肠杆菌科菌占优势明显, 高于其它的排污口, 四个采样季节均较高。

2.3 细菌分布与生态因子相关性分析

排污口(A、C、E、F、G、H 和 I)的细菌总数与温度、盐度、pH、氨氮、COD、BOD₅、活性磷酸盐进行了相关性分析(BOD₅、活性磷酸盐只针对 F、H); 排污口 C 邻近水域的细菌总数与 pH、COD、SS (Suspended Substance, 悬浮物)、无机氮、活性磷酸盐进行了相关性分析(表 6)。

3 讨论

3.1 细菌数量的动态变化

细菌数量是海洋污染的一个重要指标, 异养菌的生长增殖主要依赖有机物, 因此异养菌数量常被认为能更好地反映海洋有机物污染程度, 国内外有

表 6 细菌数量与环境因子相关性
Tab.6 Correlation between bacterial numbers and environmental factors

细菌总数	相关系数	温度	盐度	pH	COD	氨氮	BOD ₅	磷酸盐	SS	无机氮
排污口	Pearson-Correlation	-0.067	0.227	-0.508**	0.171	0.002	-0.274	-0.258		
细菌总数	Sig. (2-tailed)	0.734	0.245	0.006	0.383	0.994	0.726	0.622		
	N	28	28	28	28	28	4	6		
邻近水域	Pearson-Correlation			-0.663	0.630	0.686		0.654	-0.686	-0.656
细菌总数	Sig. (2-tailed)			0.073	0.094	0.060		0.079	0.060	0.078
	N			8	8	8		8	4	4

N. 样本数; **, 极显著相关($P < 0.01$)

许多学者进行了海洋异养菌方面的研究和探讨(史君贤等, 1984; 赵三军等, 2003; Harriague *et al.*, 2008)。我国《海水增殖区监测技术规程》(国家海洋局, 2002)也将细菌总数和异养菌总数作为海水污染的一个监测指标。

本次研究所选大连沿海排污口覆盖范围较广, 包括大连市区、开发区和金州区, 有黄海入海排污口和渤海入海排污口, 排污口类型有明渠和暗管, 排污类型以市政排污为主, 所处海洋功能区以风景旅游区和养殖区为主, 具有代表性和典型性, 基本反映了大连沿海排污口及邻近水域细菌的动态变化。

本次调查排污口和排污口邻近 5m 混合水样细菌总数全年平均分别为 77.94×10^4 、 34.00×10^4 cfu/mL, 而 100m 和 500m 距离的水样细菌总数为 4.520×10^4 和 0.448×10^4 cfu/mL, 显示了细菌数量空间分布的明显变化, 邻近水域与排污口之间存在正相关, 有的为显著正相关或极显著正相关, 说明排污口对其邻近水域细菌数量有直接的影响。离排污口越远, 细菌数量越少, 100m 处降低一个数量级, 而 500m 处降低两个数量级。这主要是污水排入海洋后, 受到海水的稀释作用, 另外海水的盐度增高, 不适于某些陆源细菌的生存, 使海水中细菌浓度变小, 而异养菌所需有机营养物质减少, 可能是一主要原因。这一结果提示我们海水浴场、滩涂贝类养殖等应远离排污口, 在排污口的设置上, 需考虑排污口对邻近水域的细菌污染。

国内针对排污口细菌的调查研究非常少, 黄备等(2000)于 1997 年 6—9 月份对舟山市定海排污口和沈家门排污口研究结果表明, 排污口内细菌数量平均为 94.0×10^4 cfu/mL, 与本文排污口细菌数量接近; 其邻近海水中数量为 3.7×10^4 cfu/mL, 文中未明确邻近海水离排污口的距离, 与本文 100m 处的数量相当。李阳和等(2011)对深圳海域研究得出, 海水可培养细菌总数 2008 年 4 月为 2.135×10^4 cfu/mL, 9 月为 2.549×10^4 cfu/mL; 史君贤等(1996)于 1990 年春、秋两季对浙江省海岛沿岸研究结果得出异养菌数量为 2.04×10^4 — 8.36×10^6 个/L, 平均为 7.52×10^6 个/L(折合 0.752×10^4 cfu/mL), 与本研究 500m 水样的数量相当; 肖慧(2005)¹⁾对天津渤海湾近岸海域异养菌数量平均为 5.55×10^3 cfu/mL, 与 500m 水样的数量接近。

在细菌污染程度界定上, 日本学者吉田阳一(1973)认为, 可培养菌数量在 10^2 cfu/mL 以下的水域

为贫营养区, 10^2 — 10^4 cfu/mL 为富营养区, 10^3 — 10^5 cfu/mL 为过营养区, 数量在 10^5 cfu/mL 以上为污水区。依此观点, 本次排污口邻近约 5m 范围均为污水区, 而 100m、500m 范围海水主要处于富营养区, 而 500m 水域接近或达到贫营养区, 如 $3C_1$ 、 $3C_2$ 、 $3G_1$ 、 $3G_2$ 、 $10G_2$ 。而依据我国国家海洋局制定的《海水增殖区监测技术规程》(国家海洋局, 2002)所规定的异养菌总数评价等级, 整体看, 5m 海水处于严重污染状态, 100m 水域处于重污染, 而 500m 水域处于中度和轻度污染, 说明排污口附近水域细菌污染有直接的影响, 邻近排污口的区域不适于水产养殖, 尤其不适于滩涂贝类养殖, 但随着距离的增加, 影响逐渐变小, 通过与文献和污染标准的比较, 500m 水域已接近或达到清洁海水的标准。当然在不同的排污口之间存在差异, 这主要与排污口类型和位置有关。本次所选择的排污口中, C 和 J 为污水处理厂排污口, 水相对清洁, 含菌量相对较少, 而 G、H、F 这几个排污口均邻近生活区, 居民密集, 排污量大, 污水基本上未经处理直接排污, 细菌数量相对较高。细菌数量同时也受其它人为因素的影响, 如在 3 月份温度相对低时, A(龙山村排污口)数量却最高, 当时大量污染严重的废水直接排入海洋, 而 5 月份邻近旅游季节, 当地有关部门采取了环境整治措施, 排污减少, 排污河进行了清淤处理和生石灰处理, 水质明显变清, 细菌数量相应变小, 5 月、8 月、10 月均低于 3 月。G(星海排污口)8 月份采样时, 附近海域正修建游艇码头, 致使 100m 距离海水的细菌数量明显增大, 这与施工带入污染物较多、海底沉积物被搅起重悬有关。

细菌数量随季节发生变化, 季节之间存在正相关, 表明不同排污口细菌数量的季节性变化趋势基本一致, 邻近水域季节相关性高于排污口。各排污口的平均数值 5 月、8 月较高, 而 100m 和 500m 的水样的数量在 8 月、5 月较高, 在 10 月、3 月相对较低。表明远处海水受季节的影响较明显, 而排污口和 5m 水样季节性差异相对较小, 可能更多地受污水来源影响。

3.2 菌群结构组成及变化

从菌群结构上看, 革兰氏阴性菌占 86.67%, 这一比例与舟山市排污口附近废水阴性菌细菌占 96.4% 的比例相近(黄备等, 2000); 肖慧(2005)¹⁾对渤海湾近岸海域调查阴性菌为 14 属, 阴性菌占 8 属(阴性菌占 63.64%)。从 4 个采样季节看, 排污口和邻近

1) 肖慧, 2005. 渤海湾近岸海域的细菌学研究及其在海岸带环境质量评价中的应用. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 115—123

水域全年优势菌为假交替单胞菌属、肠杆菌科菌属、假单胞菌属、弧菌属和希瓦氏菌属。肠杆菌科共检测出 9 个属, 占细菌总属的 30.00%, 在排污口和 5m 混合海水中的比例要高于远处的海水。排污口之间优势菌群存在差异, 排污口 G、H、I 肠杆菌科细菌数量占优势明显, 高于其它的排污口, 四个采样季节均较高, 这和所处位置有关, 这几个排污口附近人口密度大, 有的附近有医院, 显示肠杆菌有明显的陆源特征, 也说明排污口对邻近海域的细菌分布具有直接的影响。本次检出的芽胞杆菌很少, 这与史君贤等(1996)对浙江海岛沿岸的调查结果不同。

检测出的细菌大部分是致病菌和条件致病菌, 能够引起人类或鱼虾贝类疾病。假交替单胞菌具有较强的胞外酶活性, 有的能产生胞外毒素; 志贺氏菌是一种常见的原发性致病菌; 埃希氏菌、变形杆菌等多为条件致病菌, 可引起食物中毒; 多种弧菌、鳃裂杆菌为鱼类致病菌, 多有病害报道(李太武等, 1997; 邓先余等, 2006; 张晓君等, 2006)。

3.3 细菌分布与生态因子相关性

相关分析结果显示排污口细菌数量与温度相关性并不强, 未如预想那样正相关, 与盐度有一定的正相关, 但并不显著, 排污口与邻近水域海水的细菌总数与 pH 值均显著负相关。排污口细菌总数与 COD、BOD₅、氨氮、磷酸盐没有显著相关, 但邻近水域海水的细菌总数与 COD、SS、氨氮、磷酸盐、无机氮显示正相关, 且与 SS 显著正相关。

本次分析结果与已有的相关报道不尽相同。黄凌淳等(1994)对虾育苗池中异养细菌丰度和生长速率的研究中也发现温度并不是影响细菌丰度、生长速率的主要因素。肖慧(2005)¹⁾对渤海湾近岸海水分析中显示异养菌数与水温未体现明显的相关性。异养菌数与无机磷、TN 均为显著正相关, 与 pH 值呈极显著负相关。史君贤等(1991)对秦山核电站邻近海域异养细菌的调查研究, 结果表明在河口区细菌数量与盐度呈负相关, 与本次分析结果不同。李和阳等(2011)采用荧光显微镜直接计数法及 2216E 平板计数法对深圳海域水体细菌数量分布状况进行研究, 结果显示细菌总数的分布与水温、pH 值无显著的相关性, 与 COD_{Mn} 和 BOD₅ 具有显著或极显著正相关关系, 可培养细菌总数与 COD_{Mn} 和 BOD₅ 之间无显著的相关性, 认为可培养细菌的数量不能反映该水域有机物的浓度。

通常认为有机物污染是决定细菌数量的主要因素, 细菌总数(主要为异养菌)能反映环境中异养细菌的污染程度, 并反映一般营养性有机污染物的污染程度。但本次分析的结果和一些文献中细菌数量与 COD_{Mn} 和 BOD₅ 等反映有机物的指标并未表现为显著正相关, 这里存在着测定的误差和取样的影响, 也说明细菌数量受到多种生态因子的影响, 是各种因素相互作用的结果。本研究中排污口和邻近海水中细菌数量与理化因子的相关性有一定区别, 这可能与排污口受更多因素影响, 导致与 COD、BOD₅、氨氮、磷酸盐并未显示出明显的正相关。

海水中细菌数量与 SS 显著正相关, 这与本次研究中发现细菌数量与感官指标相一致是吻合的, 污水和海水中含悬浮物较多, 透明度较差, 细菌数量相应增多, 悬浮物主要为有机颗粒等, 增加了细菌附着的机会, 相关分析也显示 SS 与 COD、磷酸盐和无机氮呈极显著正相关。

4 结论

本文从大连地区排污口及邻近海域分离鉴定出多种致病菌和条件致病菌, 对细菌的空间分布、季节分布和污染规律进行了分析, 结果表明排污口对近岸海域的细菌分布具有直接的影响, 并分析了细菌分布与部分生态因子的相互关系, 为排污口的合理选址、优化排污方案、综合治理陆域污染源, 合理开展海岸带管理提供了技术参考和理论依据, 为致病菌的检测和疫病防治提供了参考, 为环境评价提供了一定依据。

致谢 国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室提供了水样理化数据, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 邓先余, 王智学, 孙成波等, 2006. 3 种水产病原弧菌(*Vibrio*)的 16S—23S rDNA 间区(IGSs)的克隆、测序与分析. 海洋与湖沼, 37(2): 162—170
- 史君贤, 陈忠元, 胡锡钢, 1996. 浙江省海岛沿岸水域微生物生态分布. 东海海洋, 14(2): 35—43
- 史君贤, 郑国兴, 陈忠元等, 1984. 长江口区海水及沉积物中异养细菌的生态分布. 海洋通报, 3(6): 59—63
- 史君贤, 胡锡钢, 陈忠元等, 1991. 秦山核电站邻近水域异养细菌的丰度及分布特征. 东海海洋, 9(2): 34—40

1) 肖 慧, 2005. 渤海湾近岸海域的细菌学研究及其在海岸带环境质量评价中的应用. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 115—123

- 刘 兵, 李太武, 苏秀榕等, 2009. 宁波北仑港冬季浮游细菌多样性研究. 台湾海峡, 28(2): 218—222
- 李太武, 张 健, 丁明进等, 1997. 大连沿海皱纹盘鲍脓疱病的研究. 南海研究与开发, 4: 21—27
- 李和阳, 陈明霞, 李 刚等, 2011. 深圳海域细菌总数及可培养细菌总数的分布及其在环境评价中的应用研究. 海洋环境科学, 30(4): 487—491
- 张晓华, 徐怀恕, 1997. 中国对虾弧菌病的间接荧光抗体诊断技术. 海洋与湖沼, 28(6): 604—610
- 张晓君, 陈翠珍, 房 海等, 2006. 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)病原鳃利斯顿氏菌的鉴定. 海洋与湖沼, 37(5): 417—423
- 国家海洋局, 2002. 海水增殖区监测技术规程. 北京: 国家海洋局, 2—4
- 赵三军, 肖 天, 岳海东, 2003. 秋季东、黄海异养细菌(Heterotrophic Bacteria)的分布特点. 海洋与湖沼, 34(3): 295—305
- 洪义国, 孙 谧, 张云波等, 2002. 16S rRNA 在海洋微生物系统分子分类鉴定及分子检测中的应用. 海洋水产研究, 23(1): 58—63
- 黄 备, 唐静亮, 2000. 舟山市排污废水和附近海水的细菌学研究. 海洋环境科学, 19(1): 29—34
- 黄凌淳, 郑天凌, 1994. 对虾育苗池中异养细菌丰度和生长速率的研究. 厦门大学学报(自然科学版), 33: 66—70
- 彭安国, 黄奕普, 刘广山等, 2003. 大亚湾细菌生产力研究. 海洋学报, 25(4): 83—90
- 樊景凤, 张 兰, 明红霞等, 2008. 北戴河近岸沉积物中微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析. 海洋环境科学, 27(5): 410—413
- 戴 欣, 周 惠, 陈月琴等, 2002. 南海南沙海区沉积物中细菌 16S rDNA 多样性的初步研究. 自然科学进展, 12(5): 479—484
- 吉田阳一, 1973. 低次生产阶段二な(なる微生物生产的变化). 水圏の富营养と生产増殖. 东京: 恒星社厚生阁出版, 92—103
- Delong E F, 1982. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-base for the identification single cells. Science, 243: 1360—1363
- Drancourt M, Berger P, Raoult D, 2004. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. J Clin Microbiol, 42(5): 2197—2202
- Drancourt M, Bollet C, Carlizoz A *et al*, 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J Clin Microbiol, 38(10): 3623—3630
- Elke J, Jorg O, 2004. Ecological significance of micro diversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. Applied and Environmental Microbiology, 70(8): 4831—4839
- Harriague A C, Brino M D, Zampini M *et al*, 2008. Vibrios in association with sedimentary crustaceans in three beaches of the Northern Adriatic Sea (Italy). J Mar Pollut Bull, 56(3): 574—579
- Ryang D W, Koo S B, Skin M G *et al*, 1999. Molecular typing of *Vibrio vulnificus* isolated from clinical specimens by pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis. Jpn J Infect Dis, 52(2): 38—41
- Son R, Rusul G, Samuel L *et al*, 1998. Characterization of *Vibrio cholerae* O¹³⁹ Bengal isolated from water in Malaysia. J Appl Microbiol, 85(6): 1073—1077

A DYNAMIC ANALYSIS OF BACTERIA IN DALIAN COASTAL SEWAGE OUTLETS AND ADJACENT WATERS

YANG Wen-Xin^{1,2}, FAN Jing-Feng³, ZHOU Jun¹, WANG Zhong-Hua¹,
GE Lin-Ke³, DING De-Wen¹, SU Xiu-Rong¹, LI Tai-Wu⁴

(1. School of Marine Sciences, Ning bo University, Ningbo, 315211; 2. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, 116081; 3. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian, 116023; 4. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315110)

Abstract Water samples were respectively collected from 10 Dalian sewage outlets and partial adjacent waters in March, May, August and October of 2011. The total bacterial numbers of the samples were counted, bacteria were cultivated in the 2216E and TCBS culture media. Then 16S rRNA genes of the different bacterial strains were cloned and sequenced and bacterial strains were identified with BLAST alignment. The dynamic spatial and seasonal distribution, the community structure of the bacteria and the correlation between bacterial numbers and ecological factors were analyzed. The result indicates that the bacterial numbers in different sewage outlets are significantly different; that the sewage outlets are remarkably discrepant from the adjacent waters; and that *Pseudoalteromonas*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Vibrio* and *Shewanella* are the dominant bacteria in the communities. There are different correlations between bacterial numbers and different ecological factors.

Key words sewage outlet; bacteria number; dynamic analysis; community structure; correlation