# 修复受污染水体的潜流人工湿地微生物多样性研究\*

蒋 玲燕 般 峻 闻 岳 姚枝良 周 琪 (同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室,上海 200092)

摘要 进行了潜流人工湿地修复受污染水体试验研究,并比较单一植物与单一填料系统与多种植物系统与多种填料系统的处理效果。运用 PCR DGGE 技术研究 3 种不同类型的潜流人工湿地中微生物种群结构,结合多样性分析和聚类分析方法,分析了人工湿地微生物种群结构特征。

关键词 人工湿地 PCR DGGE Shannon 指数 聚类分析

Analysis of microbial community structure of subsurface flow constructed wetland treating polluted surface water Jiang Lingyan, Yin Jun, Wen Yue, Yao Zhiliang, Zhou Qi. (State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuses, Tongji University, Shang hai 200092)

**Abstract:** Subsurface flow constructed wetland was constructed to treat polluted surface water. Three types of constructed wetlands, which were single macrophyte and single media, multi-macrophytes and single media, single macrophyte and multi-media, were compared. Microbial community structure was conducted with the technology of PCR DGGE. The result was analyzed with diversity index analysis and cluster analysis.

Keywords: Constructed wetland PCR DGGE Shannon index Cluster analysis

2004 年环境状况公报显示,我国绝大部分地表 水体的水质不能满足水体功能要求,且有明显恶化 趋势。对受污染水体进行治理修复,已成为社会经 济发展及生态环境建设亟待解决的问题。目前,欧 美国家大多采用湿地修复技术,净化受污染水 体<sup>[1-5]</sup>。人工湿地净化受污染水体技术具有美学价 值、基建投资和运行费用低、维护管理方便及耐冲击 负荷强等优点<sup>[6]</sup>。

人工湿地基质中的微生物在湿地净化污水的过程中起到极其重要的作用<sup>[79]</sup>。但目前国内外的研究大多集中在人工湿地对有机物和营养元素去除效 果方面,而对于其中微生物种群结构组成的研究报 道则相对较少<sup>[10],[11]1361,[12]</sup>。

本文通过聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR) 和变性梯度凝胶电泳(Denature Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)技术研究了 净化受污染水体的潜流人工湿地中微生物种群结 构,通过比较不同类型的潜流人工湿地微生物的 16S rDNA 基因信息了解微生物的多样性,以期揭 示潜流人工湿地中微生物群落结构。

1 材料与方法

1.1 试验装置

潜流人工湿地 3 套试验装置, 依次编号为 W1、

第一作者:蔣玲燕,女,1981年生,硕士研究生,主要研究方向为水污染控制工程。 \* 上海市科委重大科技项目(04dz12029)。

W2、W3。装置材料为 PVC, 尺寸均为长×宽×深 = 1.2m×0.4m×0.6m。填料填充高度 0.50m, 有效水深 0.45m,植物栽种的密度为 16株/m<sup>2</sup>。进 水采用穿孔管布水,经过粒径 30~50mm 砾石布水 区进入湿地填料床,填料粒径 8~15mm,出水经粒 径 30~50mm 砾石收水区进入底部穿孔管,流出湿 地系统。试验装置见图 1,3 套湿地系统类型见表 1。 小试装置构建于 2005年5月,间歇运行,进水取自 同济大学三好坞湖水,水质为劣 类,启动期日均换 水 25 L。7月开始按不同工况连续运行。本文数据 取自 2005年10月至11月,停留时间为4d时的湿 地系统稳定运行时期。



1.2 常规指标测定方法

分别测定小试装置进出水 COD、NH3-N 和 TN,测定方法参考文献[13]。

	表 1 小试装	置类型
编号	填料	植物
W1	砾石	芦苇
W2	砾石	芦苇; 香蒲; 水葱; 芦苇(沿水流方向)
W3	砾石; 沸石; 页岩; 砾石( 沿水流方向)	芦苇

## 1.3 PCR-DGGE 材料与方法

1.3.1 样品

潜流湿地小试装置样品:稳定运行 1 个月后沿 反应器水流方向设 4 个取样点,距离填料表层 10~ 15 cm 处取样,所得悬浊液离心后置于-70 ℃冰箱 用于 DNA 提取。原水样品:取三好坞湖水 500 mL, 用 0.22 <sup>µ</sup>m 滤膜过滤,滤膜用无菌水冲洗,离心后沉 淀物置于-70 ℃冰箱用于 DNA 提取。

1.3.2 DNA 提取

采用 3S 柱环境样品 DNA 回收试剂盒提取样品 DNA。DNA 提取物用 0.8% (质量分数,下同)琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 PCR 扩增

以提取得到 DNA 作为模板,采用对大多数细菌的 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F357和 R518<sup>[14]</sup>进行扩增。扩增产物片段长约 250 bp,用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

50 µL 反应体系: 5 µL 10× buffer, 3 µL Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L), 1 µL dNTP(25 mmol/L each), 0. 2 µmol/L 每种引物, 2. 5 U T aq 酶, 适量的双蒸 H<sub>2</sub>O 补足 50 µL 反应体系。

PCR 反应程序: 94 ℃ 10 min; 35 个循环包括 94 ℃ 45 s, 60 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 72 ℃ 10 min。 1. 3. 4 DGGE 分析 PCR 产物

采用 Bio-Rad 公司 Dcode<sup>™</sup>Universal Mutation Detection System 制备变性剂质量分数从 35% 到 60%(100% 的变性剂含 7 mol/L 尿素和质量分数为 40% 的去离子甲酰胺)的 8%(质量分数)聚丙稀酰 胺凝胶。电泳条件为 150 V、60 ℃,电泳缓冲液为 1 ×TAE,电泳时间 5 h。电泳完成后,将凝胶进行EB 染色,在紫外灯下拍摄 DGGE 电泳结果,用 Smart Viewer 凝胶成像系统分析 DNA 指纹图谱。

1.3.5 DGGE 结果分析

(1) Shannorr Wiener 指数分析。Shannorr 月

Wiener(下文简写为 Shannon) 是一种重要的物种多 样性指数分析方法,多用于生态系统分析。近年来, 逐渐应用于分子生物学领域,分析微生物种群结构 多样性。

Shannon 指数公式如下:

$$H = -\sum_{i=1}^{S} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$
(1)

式中: H`为 Shannon 指数; S 为每个样品的条带数 目;  $n_i$  为第 i 个种的个体数; N 为种群中总的个体数。在此, 个体数用峰面积表示。

(2) 相似性聚类分析(Cluster Analysis)。聚类 分析是研究"物以类聚"的多元统计分析方法。将 分类对象置于多维空间中,按照它们空间关系的亲 疏程度进行分类。采用 SPSS 13.0 统计分析软件 对 DGGE 指纹图谱进行相似聚类分析,计算样品 距离方法为欧式距离平方,类间距离方法为平均链 锁法。

2 结果与讨论

2.1 工艺实验结果与讨论

潜流人工湿地系统各装置进出水水质指标见表 2。 由表 2 可知、潜流人工湿地对各项水质指标有 较大程度的净化作用,其出水水质达到《她表水环境 质量标准》(GB 3838-2002)中 类水质。比较而 言.COD 去除率 W2> W3> W1.表现出多种植物系 统对有机物降解方面的优势。湿地系统对有机物的 降解主要依靠微生物,植物能够传导氧气进入根系, 部分氧气散失到根区周围,使根区周围形成好氧、缺 氧、厌氧区<sup>[15]</sup>, 附着在根区周围的细菌通过好氧和 厌氧的途径降解有机物,因此潜流人工湿地有机物 去除率较高。W2的优势在于种植多种植物,植物 根部分泌物能够刺激细菌和真菌在植物根区增 长<sup>[16]</sup>,植物根部分泌物和根区的不同会影响根区微 生物结构和功能多样性[17]。本研究表明,菖蒲、水 葱与芦苇根系不同,其根区富集生长的微生物也存 在差异,多种植物系统中微生物种类更丰富,从而表 现出湿地系统对有机物降解率更高。NH3-N和TN 的去除效果均是 W3> W2> W1。装置 W3 第 2 级 填料为沸石,沸石对 NH3-N 具有优先选择性吸附作 用,加强了 W3 系统去除 NH3-H 的能力。人工湿地 表 2 潜流人工湿地进出水水质指标

项目	$COD/(mg \cdot L^{-1})$	COD 去除率/%	$\rm NH_{3}\text{-}N/(mg\bulletL^{-1})$	NH3-N <b>去除率</b> /%	$T N/(m g \cdot L^{-1})$	TN去除率/%	
原水	71±19	-	5.9±1.3	-	8.9±0.7	-	
W1	20±4	$70 \pm 8$	1.6±1.1	$69 \pm 26$	$2.3 \pm 1.2$	$74 \pm 13$	
W2	17±3	$75 \pm 7$	$0.5 \pm 0.4$	$90 \pm 9$	1.3±0.6	86±6	
W3	19±3	72±7	$0.3 \pm 0.1$	$94\pm 2$	$0.9 \pm 0.5$	89±5	

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

去除 NH<sub>3</sub>-N 的另一主要途径是硝化反应, 植物根 区周围存在的好氧条件, 能够富集生长硝化细菌, 发 生硝化反应, 把 NH<sub>3</sub>-N 转化为 NO<sub>3</sub>-N。但是, 氨 氧化细菌对氧气的竞争能力低于异养菌, 限制其正 常代谢活动。本研究表明, 多种植物系统根系根区 供氧能力高于芦苇系统, 使氨氧化细菌能够富集生 长, 硝化反应能够进行, 从而使 W2 对 NH<sub>3</sub>-N 去除 率较高。

2.2 PCR DGGE 结果分析

2.2.1 DNA 提取结果

采用试剂盒提取的 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶 电泳检测后,证实其分子量大小为 23 kbp 左右,与 细菌基因组 DNA 大小相同。

2.2.2 PCR 扩增结果

PCR 结果经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后显示, 扩增片段大小为 240 bp 左右, 证实为 16S rDNA V3 区特异性片段。

2.2.3 DGGE 结果

潜流人工湿地各样品 DGGE 结果如图 2 所示。



## 图 2 各样品 DGGE 图谱

图 2 中 1,1-2,1-3,14 表示 W1 沿水流方向 4 个样品,21,22,23,24表示 W2 沿水流方向 4 个样 品,31,32,33,34 表示 W3 沿水流方向 4 个样品。

由图 2 可见, 原水 DGGE 条带最少, 其中标记 为 1、2、3 的条带为原水样品中所特有的条带, 代表 原水中微生物的特征种属。而在潜流人工湿地中这 3 个特征型条带均消失, 说明微生物种群发生了更 替。图中标记为 4、5、6、7、8 的条带, 在潜流人工湿 地中均存在, 表明这些条带代表的微生物是小试装 置共同存在的种属, 在微生物群落的物质和能量代 谢中发挥着作用。但它们的光强度又存在差异, 表 明这些微生物在数量上存在差异。标记为 9、10、11 的条带分别为 W1、W2、W3 中的特征条带, 其代表 的优势种群是特定生态条件下微生物群落的特征种 属。W1 装置 4 个取样位置条带数目与位置显示没 有太大差异, 这与其装置类型有关, 微生物在相同的 环境条件下生长, 种群结构也较相似。W2、W3 显 示出条带数目、位置和光强度的变化, 表明种群结构 有很大的变化,说明植物和填料对人工湿地中微生物群落结构有较大的影响。Vacca等<sup>[11]1364</sup>研究了人工湿地中植物以及填料对微生物去除的影响,构建6个中试规模人工湿地,两个垂直流砂土填料,两个垂直流页岩填料,两个水平流砂土填料(分别为种植芦苇和空白对照)。采用 PCR-SSCP 方法,结果表明植物能够刺激一些特殊菌种生长,植物根区能够富集生长微生物,而不同的微生物群落依赖于不同的填料而存在。这一结论与本研究相符。

## 2.2.4 指数分析结果

使用 Smart Viewer 凝胶成像系统分析 DGGE 图 谱,记录出现条带的位置,并计算其峰面积。运用式 (1)计算各样品的 Shannon 指数,计算结果见图 3。





微生物种类越多,分布越均匀,Shannon 指数就 越大。从图 3 可以看出, 原水 Shannon 指数均低于 潜流人工湿地样品的 Shannon 指数, 可见原水中微 生物多样性最低。湿地装置沿水流方向 Shannon 指数均呈现先增大后减小的趋势,说明潜流人工湿 地系统中微生物多样性沿水流方向呈先增加后减少 的规律。装置前段有机物负荷相对较高,水中多为 难降解大分子有机物和悬浮有机物,此处有机物去 除主要依靠填料的过滤作用, Shannon 指数较低。 装置中段,污染物可能发生水解等作用被分解为小 分子易降解物质,随着易降解有机物的增加,异养微 生物也随之增多,并将大部分可利用污染物降解去 除, 表现为取样点  $2 \times 3$  的 Shannon 指数升高的趋 势。装置后段,由于水中污染物基本耗尽,供微生物 生长的营养物缺乏,致使此处微生物数量减少,表现 为取样点4处的Shannon指数明显下降。

2.2.5 微生物多样性与有机物去除率的关系

通过测定湿地系统沿程 COD 变化,与沿程 Shannon 指数进行线性拟合,发现 W2、W3 沿程 COD 与 Shannon 指数存在显著的相关性,相关系数 均达到 0.96,沿程 COD 随着 Shannon 指数增加而 减少。Shannon 指数增加说明微生物种群结构多样 性增加,COD 与 Shannon 指数两者间呈现显著相关 性表明,微生物种群结构多样性对废水中 COD 的 降解有一定影响作用。另外,W2 随 Shannon 指数 的增加, COD 下降幅度要大于 W3, 说明湿地系统中存在不同种类的植物能够提高微生物的多样性, 从而使得系统处理能力增强, 因此植物对微生物的作用要优于填料。单一植物与填料的 W1 系统有机物去除效果不佳, 微生物群落多样性变化小, 其沿程COD 变化与 Shannon 指数无显著相关性, 植物与填料的单一性致使 W1 系统微生物种群结构趋于单一, 从而削弱了微生物系统的降解功能。

## 2.2.6 聚类分析

聚类分析结果见图 4。W1中两个取样点样品 F2和 F3距离几乎为 0,呈现出最大的相似聚类 性,W14个取样点整体相似性较 W2、W3高,体现 填料与植物的均一性使微生物种群结构较均一;W2 和 W34个取样点聚类距离较远,相似性较差,体现 不同植物与不同填料对微生物种群结构的影响;各 装置都显示出取样点1与其他各点聚类距离最远, 相似性最低。可见装置前段群落演替迅速,到装置 中后段群落演替进程缓慢,结构组成逐渐趋于稳定。



## 3 结 论

(1) 潜流人工湿地能够净化受污染水体,对各项水质指标均有不同程度的去除作用。本实验表明,潜流人工湿地修复技术是高效低耗的修复受污染水体技术。比较了3种不同类型的潜流人工湿地效率,说明多种植物系统与多种填料系统在有机物与营养元素去除方面均比单一植物单一填料系统有优势。

(2) 运用 PCR DGGE 技术, 能够真实地记录人 工湿地微生物种群结构及分布情况。DGGE 图谱 显示, 3 种不同类型的潜流人工湿地在微生物种群 结构上有很大差异,体现了植物与填料对微生物群 落结构的影响。

(3) 通过 Shannon 指数分析,发现潜流人工湿 地中微生物种群多样性随着水流方向呈现先增加, 到后段减少的趋势。相似聚类分析表明,填料与植 物的均一性使微生物种群结构较均一,而不同植物 与不同填料对微生物种群结构有很大影响。

(4) 通过湿地系统沿程 COD 与 Shannon 指数

相关性分析,发现多种植物系统与多种填料系统相 关性较好,微生物种群结构对 COD 降解有很大的 影响。而单一植物与填料的 W1 系统沿程 COD 变 化与 Shannon 指数无显著相关性,植物与填料的单 一性致使 W1 系统不能形成降解多种有机物的微生 物系统,从而削弱微生物系统降解功能。

本研究只是从 DGGE 图谱的差异上初步比较 了3种人工湿地中微生物种群结构的差异,随着处 理条件的改变还须考察微生物群落结构在湿地系统 中的变化,结合其他分子生物学方法,更系统地研究 人工湿地修复受污染水体的微生物作用机理。

#### 参考文献

- [1] Reinhard P, Johannes L, Guenter L, et al. Constructed wetlands for rehabilitation and reuse of surface waters in tropical and subtropical areas first results from small scale plotsusing vertical flow beds[J]. Water Science and Technology, 1999, 40(3): 155-162.
- [2] Cheng S P, Grosse W, Karrenbrock F, et al. Efficiency of corr structed wetlands in decontamination of water polluted by heavy metals [J]. Ecological Engineering, 2002, 18: 317-325.
- [3] Mckinlay R G, Kasperek K. Observations on decontamination of herbicide polluted water by marsh plant systems [J]. Water Research, 1999, 33(2): 505 511.
- [4] Cheng S P, Vidak ovic Cifrek Z, Grosse W, et al. Xenobiotics removal from polluted water by a multifunctional constructed wetland [J]. Chem osphere, 2002, 48: 415-418.
- [5] Jing S R, Lin Y F, Lee D Y, et al. Nutrient removal from polluted river water by using constructed wetlands [J]. Bioresource Technology, 2001, 76: 131-135.
- [6] 高拯民,李宪法.城市污水土地处理利用设计手册[M].北京: 标准出版社,1991:225248.
- [7] 梁威, 吴振斌, 周巧红, 等. 构建湿地基质微生物与净化效果及 相关分析[J]. 中国环境科学, 2002, 22(3): 282-285.
- [8] Sirivedhim T, Gray K A. Factors affecting denitrification rates in experimental wetlands: field and laboratory studies[J]. Ecσ logical Engineering, 2006, 26(2): 167-181.
- [9] Hallberg K B, Johnson B D. Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine[J]. Science of the Total Environment, 2005, 338(1/2): 53-66.
- [10] Ibek we A M, Grieve C M, Lyon S R. Characterization of microbial communities and composition in constructed dairy wet land wastewater effluent[J]. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5060-5069.
- [11] Vacca G, Wand H, Nikolausz M, et al. Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilotscale constructed wetlands[J]. Water Research, 2005, 39.
- [12] Nicomrat D, Dick W A, Tuovinen O H. Assessment of the microbial community in a constructed wetland that receives acid coal mine drainage[J]. Microbial Ecology, 2006, 51:83-89.
- [13] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 第 3 版. 北京: 中 国环境科学出版社, 1998.
- [14] Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electror phoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied Environmental Microbiolσ gy, 1993, 59(3): 695-700.
- [15] Brix H. Functions of macrophytes in constructed wetlands [J]. Water Science and Technology, 1994, 29(4): 71-78.
- [16] Rovira A D. Interactions between plant roots and soil micro organ isms[J]. Annual Review of Microbiology, 1965, 19: 24 F 266.
- [17] Jaeger C H III, Lindow S E, Miller W, et al. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan[J]. Applied Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2685-2690.

责任编辑: 陈泽军 (修改稿收到日期: 2006 06-12)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net