



## 研究报告

## 湿地法处理生活污水对仙桃湿地地表水微生物群落结构的影响

宋淑芬<sup>1,2</sup> 杨帆<sup>3</sup> 高绣纺<sup>\*2,4</sup> 马立安<sup>\*1</sup>

1 长江大学生命科学学院 湖北 荆州 434025

2 湿地生态与农业利用教育部工程研究中心 湖北 荆州 434025

3 武汉天一辉远生物科技有限公司 湖北 武汉 430000

4 长江大学地球环境与水资源学院 湖北 武汉 430000

**摘要:**【背景】随着中小城市经济的高速发展和人们生活水平的提高,生活污水排放量也日益增大,致使水源水质污染呈恶化趋势。【目的】了解湿地法处理生活污水对湿地地表水微生物群落多样性变化的影响。【方法】对人工湿地(仙桃)参照点(-2 000)、200、400、600、3 000、5 000 m 水平方向 6 点地表水进行理化检测,再通过高通量测序对微生物群落结构进行解析,并探讨微生物群落结构变化与生活污水的污染效应。【结果】当湿地法处理的生活污水到达 5 000 m 时,化学需氧量、氨态氮、总氮和总磷均达《城镇污水处理厂污染物排放标准》一级标准,且理化指标之间均呈极显著正相关。样品在门水平上的优势物种分别为变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)。变形菌门(*Proteobacteria*)可用来作为排放生活污水污染物的指示性微生物,放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)可用来作为排放生活污水净化的指示性微生物。【结论】首次比较分析了湿地法处理仙桃生活污水地表水环境中微生物群落多样性变化的情况,可使人们从微生物层面更加明确地了解人工湿地运作机理及地表水环境的污染情况。

关键词: 湿地法, 生活污水处理, 地表水, 微生物, 分洪道

## Effects of sewage treatment on microbial community structure of surface water in Xiantao wetland

SONG Shu-Fen<sup>1,2</sup> YANG Fan<sup>3</sup> GAO Xiu-Fang<sup>\*2,4</sup> MA Li-An<sup>\*1</sup>

1 College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China

2 Engineering Research Center of Ecology and Agricultural Use of Wetland, Ministry of Education, Jingzhou, Hubei 434025, China

3 Wuhan TianYi HuiYuan Biotechnology Co. Ltd., Wuhan, Hubei 430000, China

4 School of Earth Environment and Water Resources, Yangtze University, Wuhan, Hubei 430000, China

**Abstract:** [Background] With the rapid development of economy in middle and small cities and the improvement of people's living standard, Which the discharge of domestic sewage is also magnify,

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (41371464); Study Abroad Fund of Yangtze University

**\*Corresponding authors:** E-mail: GAO Xiu-Fang: gxf2017@yangtzeu.edu.cn; MA Li-An: malian@yangtzeu.edu.cn

**Received:** 21-03-2018; **Accepted:** 11-05-2018; **Published online:** 06-06-2018

**基金项目:** 国家自然科学基金(41371464); 长江大学留学基金

**\*通信作者:** E-mail: 高绣纺: gxf2017@yangtzeu.edu.cn; 马立安: malian@yangtzeu.edu.cn

**收稿日期:** 2018-03-21; **接受日期:** 2018-05-11; **网络首发日期:** 2018-06-06

resulting in a worsening trend of water quality pollution. **[Objective]** To understand the effect of domestic sewage treatment on changes of microbial community diversity in wetland surface water. **[Methods]** Physical and chemical tests were conducted on 6 points of surface water in reference points (-2 000), 200, 400, 600, 3 000 and 5 000 m in constructed wetlands (Xiantao), Then the microbial community structure was analyzed by high-throughput sequencing, and the effects of microbial community structure change and domestic sewage pollution were also discussed. **[Results]** When the sewage treated by wetland method reached 5 000 m, Chemical oxygen demand (COD),  $\text{NH}_4^+\text{N}$ , Total nitrogen (TN) and Total phosphorus (TP) reached the first grade standard of pollutant discharge standard for urban sewage treatment plant, and there was a very significant positive correlation between the physical and chemical indexes. The dominant phyla in the studied surface water were *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* and *Chloroflexi*. *Proteobacteria* can be used as an indicator microorganism for the discharge of pollutants from domestic sewage. *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia* and *Chloroflexi* can be used as an indicator microorganism for the purification of domestic sewage. **[Conclusion]** The changes of microbial community diversity in the surface water environment of Xiantao domestic sewage treatment were compared for the first time, which can make people understand the operation mechanism of constructed wetland and the pollution of surface water environment more clearly from the microbiological level.

**Keywords:** Wetland method, Treatment of sanitary sewage, Surface water, Microbe, By-pass of flood

湿地技术是 20 世纪 70 年代兴起的一种新型环保的生态污水处理工程技术<sup>[1]</sup>, 因管理简单、运行费用低、生态景观相容性好等优点已被成功应用于暴雨洪水、生活污水以及富营养化水体水质净化<sup>[2-4]</sup>等方面。人工湿地系统中微生物不仅是吸附和降解污染物的主要生物群体, 还是评价污染物净化能力的重要指标<sup>[5]</sup>。近年来分子生物学方法得到快速发展, 尤其是低成本、自动化的高通量测序技术<sup>[6-7]</sup>不仅可以同时检测样品中的优势物种、稀有物种及一些未知的物种, 还能快速准确地获得样品中的微生物群落组成, 在河流<sup>[8]</sup>、湖泊水库<sup>[9]</sup>等水体细菌群落结构研究中得到广泛应用。

目前关于湿地法处理污染物去除问题、湿地植物的选型、基质材料的开发与组合、湿地的构造等深入的研究较多, 例如 Zurita 等<sup>[10]</sup>、Valipour 等<sup>[11]</sup>、吕晓建等<sup>[12]</sup>的研究主要集中在如何提高人工湿地法污水处理效果方面, 但湿地法污水处理对地表水的微生物群落影响研究较少, 特别是在不影响特殊时期分洪条件下的闲置分洪道内天然半人工湿地来处理城市生活污水, 分洪道、湿地及其利用、

微生物、生活污水处理、地表水这几项完全组合所开展的研究, 即分洪道内的微生物在处理区域的生活污水及地表水水体的种群和数量变化几乎是空白。本课题着重于研究湿地法处理生活污水沿水流纵向(断面)水平位置地表水中微生物群落的结构和变化。利用分子生物学及高通量测序方法研究微生物多样性, 从微观水平上探讨湿地地表水环境中微生物种群的变化情况, 了解湿地地表水微生物种群和相对含量在不同水平面上的变化情况, 从而了解湿地法运行过程中对湿地地表水微生物群落的影响, 为后续工作提供相应的理论实践支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

地表水取样是从 G318 国道(湿地系统入口)开始向下游的中心路处 200、400、600、3 000、5 000 m, 以及在湿地生活污水处理厂的上游 2 000 m 的地方选取取样参考点, 具体地理位置见图 1。水样的采集是直接将采样器放入水面下 0.10-0.30 m, 收集水样 1 L 储存在填充了足够冰块的保温箱内,

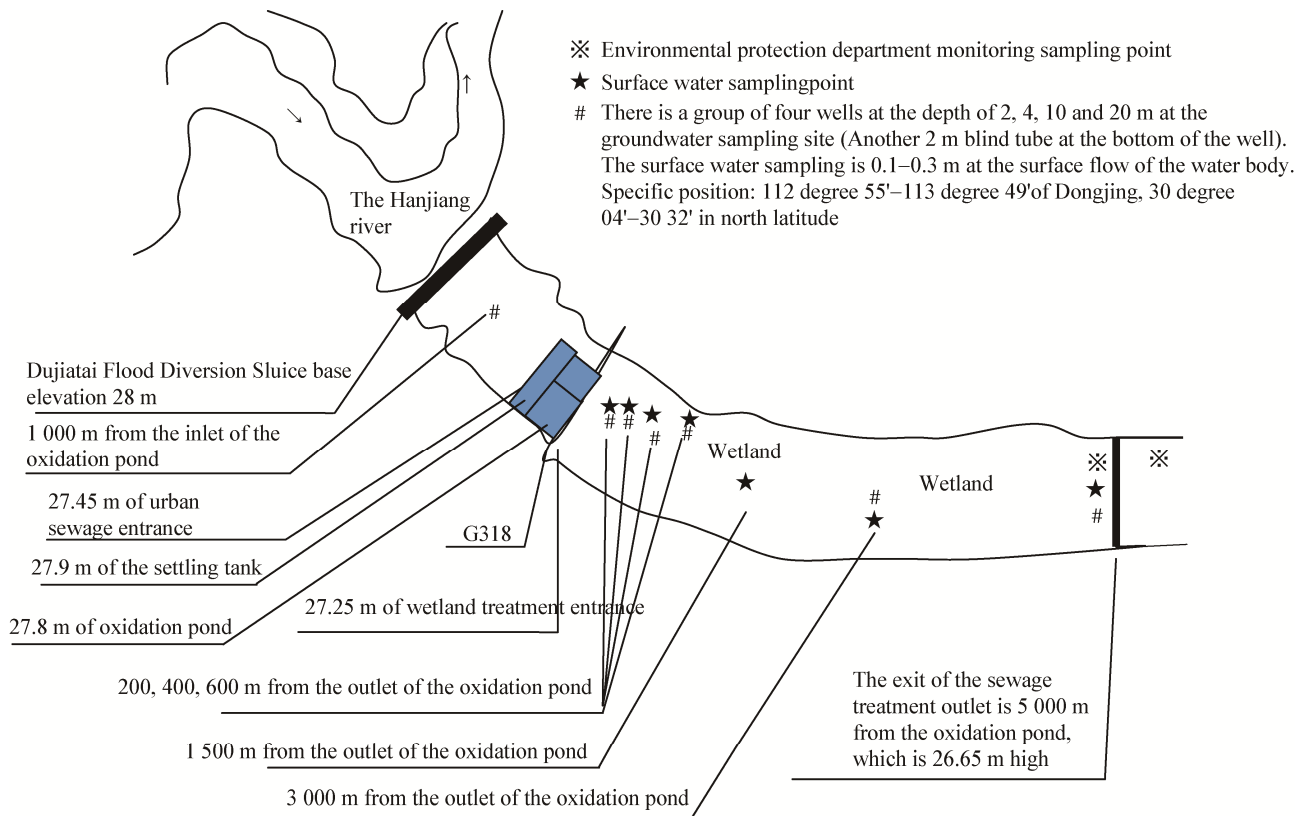


图 1 仙桃市人工湿地方位图

Figure 1 Xiantao wetland azimuth map

使运输过程中所取样品的温度保持在 4 °C 以下。到达实验室后, 使用微孔滤膜(0.22 μm)过滤收集微生物菌体于滤膜上, 将附集有微生物菌体的滤膜放入-80 °C 保存备用。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

Water DNA Kit, Omega 公司; DNA 纯化回收试剂盒, 北京康为世纪生物科技有限公司; 核糖核酸酶 RNase A, Sigma 公司。PCR 仪, Bio-Rad 公司; 超微量分光光度计, Quawell 公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 DNA 的提取及 Illumina MiSeq 测序

采用 Water DNA Kit 提取水样中 DNA。DNA 提取的具体步骤: 用剪刀将附集有微生物菌体的滤膜剪成若干小份, 放入 50 mL 的离心管中。加入 3 mL

SLX buffer 和 500 mg 玻璃珠。在漩涡混合仪上混匀样品, 70–90 °C (难降解的细菌) 水浴 10 min, 在水浴过程中悬混 2–3 次。加入 1 mL SP2 buffer 混匀 30 s, 冰浴 5 min, 然后再按照试剂盒上的步骤提取水样中 DNA。DNA 的扩增使用的是 16S rRNA 基因 V4 区的 515F 和 909R 引物, 引物序列为 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 909R (5'-CCCGYCAATTCMTTTRAGT-3')。PCR 反应体系 (25 μL): DNA 样品 10.0 μL, 1×PCR buffer 2.5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 4.0 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 40 s, 56 °C 60 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。最后将纯化产物送至中国科学院成都生物研究所 Illumina MiSeq 平

台进行高通量测序。

### 1.2.2 水样环境因子指标的测定

水样理化指标的测定: 地表水(COD<sub>Cr</sub>)按 GB 11914-1989<sup>[13]</sup>测定, TN 按 HJ 636-2012<sup>[14]</sup>测定, TP 按 GB 11893-1989<sup>[15]</sup>测定, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 按 GB 7479-1987<sup>[16]</sup>测定。

### 1.2.3 序列及统计分析

测序得到的原始数据需先用 Flash 软件进行双末端序列融合, 然后通过添加的 Barcode 将序列拆分回归到相应样品。先对序列质量进行质控和过滤, 之后进行 OTU 聚类分析。计算各文库的文库覆盖率、多样性指数。再用 PAST 对数据进行主坐标分析, 用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行相关性分析的计算。高通量测序得到的原序列数据储存于 NCBI, 登录号为 SRS3045895。

## 2 结果与分析

### 2.1 地表水样品的理化指标分析

仙桃市人工湿地污水生态处理系统位于汉江杜台分洪道内, 该体系包括 2 个 95 m×50 m×5 m 沉淀池和 2 个 450 m×130 m×4 m 氧化塘, 以及用中间 3 m 宽道路分隔左右两端的 350 m×6 000 m 生态土壤渗滤床, 其中人工栽植芦苇 10 万株、香蒲 5 万株、水生苦草种植 7.5×10<sup>4</sup> m<sup>2</sup>。生物多样性调查表明, 共记录鸟类 34 种, 隶属 10 目 20 科。其中鸚鵡目、鸚形目、鸚形目、雁形目、鹤形目 9 科 18 种, 现有鱼类 13 种。自 2004 年 5 月投入运行以来, 运行状况良好, 周围生态环境也保持了原有的

一定秩序, 仙桃市环保部门每月定期对进出水口及接纳水体的水质进行监测, 监测结果显示均可达标排放。本研究在湿地生活污水处理厂的上游 2 000 m 的地方选取取样参考点, 记为 JC (-2 000 m), 在前处理完后进入湿地的 200 m 处设立取样点 1, 记为 J1 (200 m), 以此类推设立取样点, 分别记为 J2 (400 m)、J3 (600 m)、J4 (3 000 m)、J5 (5 000 m), 各点的理化指标结果如表 1 所示。

由表 1 可见, 生活污水经湿地法处理后湿地地表水化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD)的范围为 31.50–203.52 mg/L。J5 经湿地法处理后的 COD 浓度为 38.59 mg/L 达到 GB 18918-2002《城镇污水处理厂污染物排放标准》<sup>[17]</sup>一级标准(COD<50 mg/L); 类似地, J5 经处理后总磷(Total phosphorus, TP)浓度 0.15 mg/L 达到《城镇污水处理厂污染物排放标准》一级标准(TP<0.5 mg/L), J5 经处理后氨态氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)浓度 0.8 mg/L 达到《城镇污水处理厂污染物排放标准》一级标准[c(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)<5 mg/L], J5 经处理后总氮(Total nitrogen, TN)浓度 2.28 mg/L, 达到《城镇污水处理厂污染物排放标准》一级标准(TN<15 mg/L)。

### 2.2 地表水样品的 α 多样性分析

由表 2 可知, 6 个地表水样的高通量测序共获得了 7 777–24 785 条序列, 80 524 条高品质的序列(平均 13 421), 单个水样的 OTU 数量为 730.8–966.7(平均 868)。Shannon-Wiener 是反映样品中微生物多样性的指数, 香农值越大, 说明群落多样性越高。6 个样品香农值的平均值为 8.5, J1 到 J3 香农值相

表 1 湿地系统内地表水样品的监测数据

Table 1 Monitoring data of surface water samples in wetland system

Samples	Location (m)	COD (mg/L)	TP (mg/L)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	TN (mg/L)
Contrast JC	-2 000	31.50	0.08	0.50	1.85
J1	200	203.52	5.22	9.10	21.11
J2	400	182.53	5.14	8.81	19.17
J3	600	151.66	4.98	8.43	16.51
J4	3 000	111.16	3.45	6.55	14.21
J5	5 000	38.59	0.15	0.80	2.28

表 2 湿地法处理后地表水的  $\alpha$  多样性

Table 2 Alpha diversity of surface water after wetland treatment

Samples	Total reads	Observed OTUs	Shannon Wiener	PD_whole tree	Good's coverage	Chao1
J1	8 910	912.8	8.4	58.4	0.62	3 092.1
J2	8 237	966.7	8.7	59.3	0.61	3 055.5
J3	11 839	937.0	8.7	60.8	0.63	2 638.8
J4	24 785	730.8	7.6	57.6	0.70	2 535.6
J5	18 976	802.6	8.7	53.5	0.70	2 393.2
JC	7 777	860.7	8.7	53.8	0.65	2 985.9

差较小,说明微生物群落结构多样性相差较小。到 J4 时处于较低水平,说明原始状态下的一些微生物因无法适应新的环境而逐渐被抑制、淘汰,群落多样性降低。但是到 J5 处时,细菌群落多样性却出现了增长趋势,可能是水体环境达到标准后产生了某些新的微生物,因而与对照组地表水中微生物群落的多样性相似。类似地,Chao1 指数的平均值为 2 793.5,Chao1 越大,群落种类的数量越高,最大值出现在 J1,最小值出现在 J5,说明 200 m 处微生物种类的数量高于 5 000 m,可能是前期监测取样处的污染物总氮、总磷浓度太高而呈现富营养化状态,因此微生物数量多,后期理化指标值降低,营养物质少而造成微生物数量较少。各样本文库的覆盖率(Coverage)范围均在 61%以上,基本能够代表湿地法处理生活污水中地表水细菌群落的真实情况。

### 2.3 地表水样品在门水平的分析

由图 2 得知,湿地法处理后地表水环境中占主导地位的门(某一样品相对丰度>1%均列出)包括变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)。其中变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)是样品中最丰富的门。5 000 m 样品与前 3 000 m 样品及对照组相比优势门有 4 类,包括放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)。由

此说明,经湿地法处理后的湿地地表水达标区微生物的多样性要高于理化指标值较高的区域。

### 2.4 地表水样品在属水平的分析

某一样品相对丰度>2%在表 3 中均列出,由表 3 得出,在前 600 m 地表水中优势菌属共有 6 个,包括 *Methylotenera*、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、弓形杆菌属(*Arcobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、*Methylophaga* 和 *Malikia*,因前期理化指标值浓度较高,这些优势菌的出现可能与污水富营养程度有关。类似地,5 000 m 地表水中优势菌属共有 7 个,包括 *Albidiferax*、*Candidatus Planktophila*、*Marine metagenome*、*Phalacroma mitra*、*HgCl clade*、

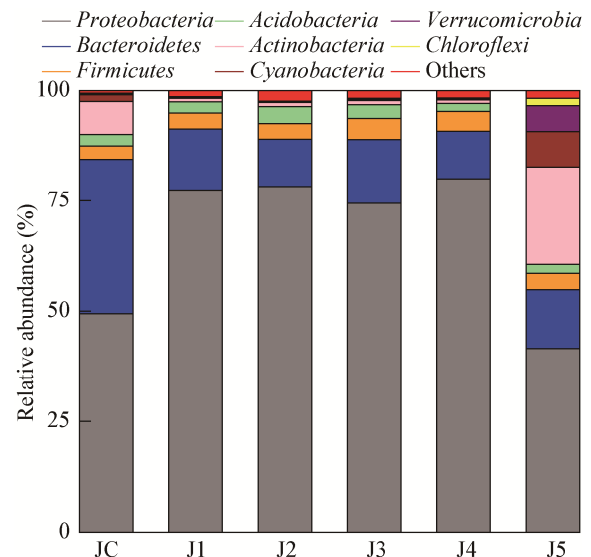


图 2 样品在不同门水平的相对丰度

Figure 2 Relative abundance of abundant within different phyla across the studied samples

表 3 样品在不同属水平上的相对丰度

Table 3 Relative abundance of abundant within different family across the studied samples

属 Genus	J1	J2	J3	J4	J5	JC	P 值 P value
<i>Methylotenera</i>	37.71	34.53	33.23	37.82	1.73	3.91	0.016
<i>Flavobacterium</i>	8.04	5.57	6.89	4.81	0.93	30.42	0.080
<i>Albidiferax</i>	3.45	4.32	3.11	1.52	14.12	5.90	0.032
<i>Arcobacter</i>	4.82	3.58	4.21	10.07	0.06	0.00	0.055
<i>Candidatus Planktophila</i>	0.14	0.17	0.27	0.05	8.52	0.25	0.311
<i>Polynucleobacter</i>	0.37	0.62	0.43	0.42	0.89	4.72	0.136
<i>Marine metagenome</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	4.61	0.00	0.363
<i>Phalacroma mitra</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	4.15	0.00	0.363
<i>Hydrogenophaga</i>	1.10	1.02	0.80	0.97	0.76	3.91	0.036
<i>HgcI clade</i>	0.09	0.17	0.07	0.05	3.42	0.00	0.308
<i>Sulfurimonas</i>	0.87	0.68	1.10	3.25	0.00	0.00	0.101
<i>Pseudomonas</i>	3.17	2.44	2.41	0.85	0.47	0.62	0.017
<i>Methylophaga</i>	2.11	1.87	2.84	0.46	0.00	0.00	0.058
<i>Pseudarcicella</i>	0.09	0.00	0.00	0.00	2.61	1.74	0.174
<i>Fluviicola</i>	0.00	0.00	0.00	0.04	2.49	0.62	0.252
<i>Malikia</i>	2.16	1.36	1.00	0.70	0.61	2.30	0.006
<i>Sulfuricurvum</i>	0.32	0.45	0.57	2.03	0.06	0.12	0.104

*Pseudarcicella* 和 *Fluviicola*。后期理化指标均达到排放标准,而这些菌属的出现可能是因为污水的净化达到标准。

## 2.5 地表水样品间 $\beta$ 多样性分析

主坐标分析(Principal coordinate analysis, PCoA)是直接 将样品的群落构成差异反映在二维坐标图上,横、纵坐标表示最大程度反映群落构成

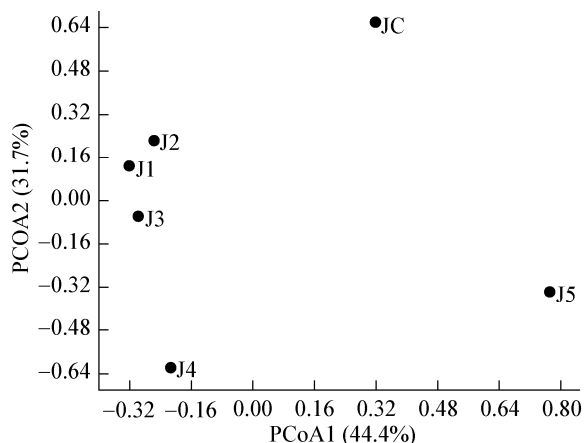


图 3 样品的主坐标分析

Figure 3 Principal coordinate analysis of samples

差异的 2 个特征值,即第一、二主成分。由图 3 可知,主坐标分析水体污染程度较高的 J1 (200 m)、J2 (400 m)和 J3 (600 m) 3 个地表水样品的距离很近,说明这 3 点的微生物群落结构比较相似。J5 (5 000) 和 JC (-2 000 m)不与任何一个样品靠近,说明与其他样品的群落构成具有一定差异,而且样品根据处理状况(高浓度或达标)有聚类的趋势。

## 2.6 地表水样品的相关性分析

COD 是衡量水体中好氧有机物多少的一个重要指标,可直接反映水体的受污染程度<sup>[18]</sup>。为了分析湿地法处理生活污水对湿地地表水各污染物削减效应之间的关系,采用 SPSS 20.0 计算了湿地法处理生活污水对湿地地表水各污染物削减效应之间的相关系数。由表 4 可知,湿地法处理后的生活污水各理化指标之间存在一定的相关性,COD 与 TP、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 均呈极显著正相关( $P < 0.01$ ),TP 与  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 均呈极显著正相关( $P < 0.01$ ), $\text{NH}_4^+\text{-N}$  与 TN 呈极显著正相关( $P < 0.01$ )。

表 4 各理化指标之间的相关性

Table 4 Correlation between physical and chemical indexes

Index	COD (mg/L)	TP (mg/L)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	TN (mg/L)
COD (mg/L)	1.000	0.974**	0.971**	0.986**
TP (mg/L)		1.000	0.998**	0.989**
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)			1.000	0.993**
TN (mg/L)				1.000

注: \*\*: 极显著相关( $P < 0.01$ ).

Note: \*\*: Significant level for  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

截止目前对仙桃分洪道湿地环境方面已有的研究报道仅发现 2 篇, 他们主要以水文地质概况、生活污水处理效果为研究对象, 而对该水域微生物多样性和菌群结构组成方面的研究基本还是空白<sup>[19-20]</sup>。本研究采用分子生物学及高通量测序方法对湿地法处理生活污水后的地表水环境中的微生物群落进行了研究, 首次比较分析了微生物群落在生境修复过程中的变化, 分析结果显示变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)是菌群中最大的门, 这与窦娜莎<sup>[21]</sup>、李思敏<sup>[22]</sup>研究结果相一致。

在原核生物多样性研究中, 相关研究表明<sup>[23-24]</sup>, 原核微生物的 16S rRNA 基因具有多拷贝, 致使 16S rRNA 基因菌群的多样性分析会引起一定程度的高估。Sun 等<sup>[23]</sup>研究表明 16S rRNA 基因 V4-V5 区域在 0.03 水平上显示最低的高估程度约为 3.0%。本文研究针对 16S rRNA 基因 V4 区序列进行测序, V4 区序列多样性的高估程度相对于其他区域是最小的, 因而减少了高估误差, 增强了结论的可靠性。

本研究关于湿地法处理生活污水对地表水生物群的影响, 通过多样性指数、丰富度指数以及微生物类群的分布可以看出, 高浓度或达标地表水中均检测到复杂菌群, 但微生物群落构成有差异, 5 000 m 达标区样品明显表现出了更高的生物多样性(图 1)。

首先, 5 000 m 地表水中放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、

绿弯菌门(*Chloroflexi*)的微生物所占比例明显比前 3 000 m 要高。放线菌门(*Actinobacteria*)是一类原核生物, 绝大多数属于异养好氧型, 具有很强的分解能力, 在甾体转化、石油脱蜡和污水处理中具有重要应用<sup>[22]</sup>。该菌门在前 3 000 m 地表水中丰度(<0.97%)较低, 而在 5 000 m (22.07%)地表水中较高, 说明该菌门更易生存在净水区, 可作为生活污水净化的指示性微生物。蓝藻门(*Cyanobacteria*)可利用太阳光能将 CO<sub>2</sub> 还原成有机碳化合物, 并释放出自由氧, 广泛分布于河流、湖泊、海洋等各种水体中。该菌门在前 400 m 丰度为 0, 但在 5 000 m (8.09%)地表水中丰度最高, 说明可能是后期产生的新微生物, 可作为生活污水净化的指示性微生物。疣微菌门(*Verrucomicrobia*)是被新分类出不久的一类细菌, 可培养的种类少, 目前识别的种类主要发现于水体、土壤环境和人类粪便中, 其生态和代谢作用尚不清楚<sup>[25]</sup>。该菌门在前 3 000 m 地表水中丰度(<0.27%)较低, 但 5 000 m (5.82%)地表水中较高, 暗示其在地表水系统中的重要作用。绿弯菌门(*Chloroflexi*)常存在于污泥菌胶团絮状体内部, 并以絮体骨架的形式存在, 为好氧颗粒污泥的结构提供骨架支撑<sup>[26]</sup>。该菌门在前 3 000 m 地表水中丰度(<0.23%)较低, 但 5 000 m (1.66%)地表水中较高。Kragelund 等<sup>[27]</sup>在对活性污泥中绿弯菌门(*Chloroflexi*)的生态生理学研究发现, 绿弯菌门(*Chloroflexi*)具有较好的生物除磷作用。从 200 m 到 5 000 m, 绿弯菌门的丰度增加也揭示了这一阶段 TP 降低达标的原因是绿弯菌门发挥了作用。

其次,在属水平上,构成高浓度或达标地表水主要菌群丰度较高的属也有一定差异。值得注意的是部分菌属相对丰度与环境的互作相似。如湿地地表水环境中 *Albidiferax*、*Candidatus Planktophilia*、*Marine metagenome*、*Phalacrocoma mitra*、*HgcI clade*、*Pseudarcicella*、*Fluviicola* 等菌属随着水体污染程度的降低其相对丰度呈上升趋势,而且 6 个样品中 *Albidiferax* 的相对丰度具有显著差异( $P<0.05$ ),关于这些菌属的相关研究很少,可能是新发现的微生物体。*Methylotenera*、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、弓形杆菌属(*Arcobacter*)、噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、*Sulfurimonas*、*Methylophaga*、*Malikia* 等菌属随着水体污染程度的降低其相对丰度呈下降趋势。黄杆菌属(*Flavobacterium*)为严格好养菌,有机化能营养,可将有机物氧化成无机物,同时合成新的微生物体,对于某些难降解有机物具有分解能力<sup>[28-29]</sup>。有研究发现黄杆菌属擅长降解高分子物质、蛋白质、脂类、纤维素等大分子颗粒有机物,且具有一定的硝化作用和潜在的脱氮能力<sup>[30-31]</sup>,可能与污水中氮的去除有关。假单胞菌是一种广泛分布于自然界的常见病菌,是自然界中碳、氮循环的重要一环<sup>[32]</sup>,分解蛋白质和酯酶能力很强<sup>[33]</sup>。弓形杆菌属(*Arcobacter*)是一种人畜共患食源性和水源性病原菌<sup>[34]</sup>,大量存在于各种水体中,包括饮用水、地表水、地下水等。其引起胃肠炎的临床症状与弯曲杆菌病类似<sup>[35]</sup>。相关研究表明,弓形杆菌属(*Arcobacter*)是城市污水和城市污水化学生物絮凝池活性污泥的优势菌群,而且具有致病性<sup>[36-37]</sup>。噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)具有能够编码邻苯二酚 2,3-双加氧酶的功能基因<sup>[38]</sup>。6 个样品中 *Methylotenera* 和假单胞菌属(*Pseudomonas*)的相对丰度具有显著差异( $P<0.05$ ),而且 *Malikia* 的相对丰度具有极显著差异( $P<0.01$ )。

再次,主坐标分析结果表明样本根据处理状况有聚类的趋势,说明可能存在某种群落构成模式与处理后浓度是否达标相关。

综上所述,湿地法处理生活污水对地表水的微生物群落多样性与微生物的量及种类有关,一些菌属的丰度变化可以间接地指示水体污染或净化程度。

#### 4 结论

(1) 通过对湿地系统的综合评价,发现前处理后的生活污水经人工湿地处理到达湿地 5 000 m 时,4 个理化指标值均达 GB 18918-2002《城镇污水处理厂污染物排放标准》的一级标准,而且 4 个理化指标之间的消减效应均呈极显著正相关。

(2) 水体的污染程度对微生物群落结构在比例组成上有较大影响,变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为仙桃湿地地表水微生物群落结构组成中的绝对优势菌群。变形菌门(*Proteobacteria*)可以作为排放生活污水污染物的指示性微生物,其结构比例可用来评价水体受污染程度。类似地,放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)可以作为排放生活污水净化的指示性微生物,其结构比例可用来评价水体的净化程度。

(3) 本文首次以分洪道的湿地来处理城市生活污水为研究对象,研究了该类水域微生物多样性和菌群结构组成方面的变化,为后续相关工作提供相应的理论实践支持。

#### REFERENCES

- [1] Hong ZX. Biologically enhanced flocculation/vertical subsurface-flow constructed wetland process for treatment of farmhouse sewage[J]. China Water & Wastewater, 2010, 26(20): 81-83,86 (in Chinese)  
洪祖喜. 生物强化絮凝/垂直潜流湿地法处理农家乐污水[J]. 中国给水排水, 2010, 26(20): 81-83,86
- [2] Iasur-Kruh L, Hadar Y, Milstein D, et al. Microbial population and activity in wetland microcosms constructed for improving treated municipal wastewater[J]. Microbial Ecology, 2010, 59(4): 700-709
- [3] Ariane LP, Jeffrey WM, Diana NF, et al. Environmental factors at dissimilar spatial scales influence plant and microbial communities in restored wetlands[J]. Wetlands, 2012, 32(6): 1125-1134
- [4] Sánchez-Carrillo S, Reddy KR, Inglett KS, et al.



- Biogeochemical indicators of nutrient enrichments in wetlands: the microbial response as a sensitive indicator of wetland eutrophication[A]//Ansari AA, Gill SS, eds. *Eutrophication: Causes, Consequences and Control*[M]. Dordrecht: Springer, 2014: 203-222
- [5] Pei XC, Xu YL, Wei W. A review on soil microorganisms in wetland ecosystem[J]. *Wetland Science*, 2009, 7(2): 181-186 (in Chinese)  
裴希超, 许艳丽, 魏巍. 湿地生态系统土壤微生物研究进展[J]. *湿地科学*, 2009, 7(2): 181-186
- [6] Liu W, Wang TJ, Tang HL, et al. The research progress of high-throughput bacterial species identification[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(12): 2501-2509 (in Chinese)  
刘伟, 王腾蛟, 唐海琳, 等. 高通量细菌鉴定方法研究进展[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(12): 2501-2509
- [7] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(S1): 4516-4522
- [8] Staley C, Johnson D, Gould YJ, et al. Frequencies of heavy metal resistance are associated with land cover type in the Upper Mississippi River[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 511: 461-468
- [9] Sun Z, Li GP, Wang CW, et al. Community dynamics of prokaryotic and eukaryotic microbes in an estuary reservoir[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 6966
- [10] Zurita F, de Anda J, Belmont MA. Treatment of domestic wastewater and production of commercial flowers in vertical and horizontal subsurface-flow constructed wetlands[J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35(5): 861-869
- [11] Valipour A, Raman VK, Ghole VS. A new approach in wetland systems for domestic wastewater treatment using *Phragmites* sp.[J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35(12): 1797-1803
- [12] Lü XJ, Wei WX, Zhou AH, et al. Experimental study on removal of landfill site ammonia nitrogen pollution to groundwater in combinationally constructed wetlands[J]. *Science Technology and Engineering*, 2015, 15(27): 210-214 (in Chinese)  
吕晓建, 魏文侠, 周爱红, 等. 组合式人工湿地系统去除垃圾填埋场地下水氨氮污染试验研究[J]. *科学技术与工程*, 2015, 15(27): 210-214
- [13] Environmental Protection Department of the People's Republic of China. GB 11914-1989 Water quality-Determination of the chemical oxygen demand-Dichromate method[S]. Beijing: Standards Press of China, 1989 (in Chinese)  
国家环境保护总局. GB 11914-1989 水质化学需氧量的测定重铬酸盐法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989
- [14] Environmental Protection Department of the People's Republic of China. HJ 636-2012 Water quality-Determination of total nitrogen-alkaline potassium persulfate digestion-UV spectrophotometric method[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2012 (in Chinese)  
中华人民共和国环境保护部. HJ 636-2012 水质总氮的测定碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012
- [15] Environmental Protection Department of the People's Republic of China. GB 11893-1989 Water quality-Determination of total phosphorus-ammonium molybdate spectrophotometric method[S]. Beijing: Standards Press of China, 1989 (in Chinese)  
国家环境保护总局. GB 11893-1989 水质总磷的测定钼酸铵分光光度法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989
- [16] Environmental Protection Department of the People's Republic of China. GB 7479-1987 Water quality-Determination of ammonium Nessler's reagent colorimetric method[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 1987 (in Chinese)  
国家环境保护局. GB 7479-1987 水质铵的测定纳氏试剂比色法[S]. 北京: 中国环境科学出版社出版, 1987
- [17] Environmental Protection Department of the People's Republic of China. GB 18918-2002 Discharge standard of pollutants for municipal wastewater treatment plant[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002 (in Chinese)  
国家环境保护总局. GB 18918-2002 城镇污水处理厂污染物排放标准[S]. 北京: 中国环境科学出版社出版, 2002
- [18] Chen F, Bao HJ. Assessment of pollution sources in Laoshan Reservoir and its countermeasures[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(4): 104-108 (in Chinese)  
陈芳, 包慧娟. 崂山水库污染源评价分析及治理对策[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(4): 104-108
- [19] Yang F, Fu Y, Liang HG, et al. Brief introduction to Jiangnan plain constructed wetland system hydrogeological[J]. *China Mining Magazine*, 2014, 23(z2): 110-113 (in Chinese)  
杨帆, 付艳, 梁和国, 等. 江汉平原地区人工湿地系统水文地质概况[J]. *中国矿业*, 2014, 23(z2): 110-113
- [20] Wang S, Gao XF, Li FM, et al. Brief introduction to Jiangnan plain constructed wetland system hydrogeological[A]//In 2015 the National Pollution Control and Ecological Restoration of Rivers and Lakes Forum[C]. Wuhan, 2015: 1-8 (in Chinese)  
王舒, 高绣纺, 李方敏, 等. 植物倒伏对生活污水处理效果的影响研究[A]//2015年全国河湖污染治理与生态修复论坛论文集[C]. 武汉, 2015: 1-8
- [21] Dou NS. Research on affecting performance and bacterial diversity of biological aerated filter for municipal wastewater treatment[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2010 (in Chinese)  
窦娜莎. 曝气生物滤池处理城市污水的主要影响因素及细菌多样性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2010
- [22] Li SM. Research on advanced treatment process and microflora structural characteristics of O<sub>3</sub>+MBSF for secondary effluent of the wwtp[D]. Taiyuan: Doctoral Dissertation of Taiyuan University of Technology, 2016 (in Chinese)  
李思敏. 污水厂二级出水深度处理 O<sub>3</sub>+MBSF 工艺及微生物群落结构特性研究[D]. 太原: 太原理工大学博士学位论文, 2016
- [23] Sun DL, Jiang X, Wu QLL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic

- diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969
- [24] Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, et al. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(1): 278-288
- [25] Ji ZS, Guan WB, Su SG, et al. The intestinal microflora in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* and bighead carp *Aristichthys nobilis*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2014, 29(1): 22-26 (in Chinese)  
祭仲石, 管卫兵, 苏孙国, 等. 鲢、鳊肠道微生物的研究[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(1): 22-26
- [26] Larsen P, Nielsen JL, Otzen D, et al. Amyloid-like adhesins produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1517-1526
- [27] Kragelund C, Levantesi C, Borger A. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 59(3): 671-682
- [28] Mizuki E, Maeda M, Tanaka R, et al. *Bacillus thuringiensis*: a common member of microflora in activated sludges of a sewage treatment plant[J]. Current Microbiology, 2001, 42(6): 422-425
- [29] Zhang T, Shao MF, Lin Y. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants[J]. The ISME Journal, 2012, 6(6): 1137-1147
- [30] Dong XL, Reddy GB. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4): 1175-1182
- [31] Zeng YH. Microbial diversity and environmental adaptation mechanisms in typical Marine environments[D]. Xiamen: Doctoral Dissertation of Xiamen University, 2008: 1-6 (in Chinese)  
曾永辉. 典型海洋环境中浮游细菌多样性及环境适应机制的研究[D]. 厦门: 厦门大学博士学位论文, 2008: 1-6
- [32] Ye RW, Thomas SM. Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications[J]. Current Opinion in Microbiology, 2001, 4(3): 307-312
- [33] Mahanta N, Gupta A, Khare SK. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1729-1735
- [34] Ho HTK, Lipman LJA, Gaastra W. *Arcobacter*, what is Known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 115(1/3): 1-13
- [35] Bi SL, Chen MR, Zhang ZG, et al. Detection and genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in food samples by *Fla*-DGGE[J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(10): 1148-1152 (in Chinese)  
毕水莲, 陈妙瑞, 张志刚, 等. *Fla*-DGGE 法对食品中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的检测和分型[J]. 现代食品科技, 2010, 26(10): 1148-1152
- [36] Wu CD, Xu XH, Ning DG, et al. Study on bacterial diversity and biological safety of municipal sewage[J]. China Safety Science Journal, 2008, 18(1): 119-122 (in Chinese)  
吴春笃, 许小红, 宁德刚, 等. 城市污水细菌多样性及其生物安全性研究[J]. 中国安全科学学报, 2008, 18(1): 119-122
- [37] Wang F, Fu YG, Xia SQ, et al. Characteristics of municipal sewage chem-bioflocculation treatment process by using PCR-DGGE technology[J]. Environmental Science, 2004, 25(6): 74-79 (in Chinese)  
王峰, 傅以钢, 夏四清, 等. PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点[J]. 环境科学, 2004, 25(6): 74-79
- [38] Tánicsics A, Szabó I, Baka E, et al. Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2010, 33(7): 398-406