

北京翠湖表流和潜流湿地对细菌多样性的影响

王晓丹¹, 翟振华¹, 赵爽¹, 李荣旗², 马文林³, 李艳红^{1*}

(1. 首都师范大学生命科学院, 北京 100048; 2. 北京锦绣大地农业股份有限公司, 北京 100049; 3. 北京建筑工程学院环境工程系, 北京 100044)

摘要:以北京翠湖湿地污水塘、表流湿地和潜流湿地3个单元为研究对象,在了解其水质的基础上,利用流式细胞仪和培养法分别测定微生物细胞总数目和可培养细菌的菌落数目,并采用PCR-DGGE和16S rDNA文库技术对样品的细菌多样性和优势群落结构进行分析.结果表明,翠湖表流和潜流湿地处理对化学需氧量、总氮和总磷的去除率分别达到42.33%、52.92%和41.4%;随湿地的逐级处理,总的微生物数量呈逐渐上升的趋势;而可培养的细菌数则表现为先降低后升高;污水塘的水流经表流湿地后,细菌的多样性指数 H 由3.0819提高到3.2850,随潜流湿地的进一步处理又降为3.0181;污水塘细菌的主要类群为Actinobacteria、Cyanobacteria、 α -Proteobacteria,分别占38%、18%和18%;表流和潜流湿地处理后最主要的细菌类群变为 β -Proteobacteria,分别占32%和44%,*Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides*(CFB)类群也明显增加,达24%.因此,北京翠湖表流和潜流湿地在去除有机物、氮和磷的同时,微生物数量、细菌多样性及优势群落都发生了明显变化,对水质可能造成危害的某些类群如Actinobacteria、Cyanobacteria比例减少,而 β -Proteobacteria和CFB类群的细菌增加.

关键词:北京翠湖湿地;细菌;细菌多样性

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2009)01-0280-09

Effect of Free Surface Flow Wetland and Subsurface Flow Wetland on Bacterial Diversity in Beijing Cuihu Wetland Park

WANG Xiao-dan¹, ZHAI Zhen-hua¹, ZHAO Shuang¹, LI Rong-qi², MA Wen-lin³, LI Yan-hong¹

(1. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Glorious Land Agricultural Co. Ltd., Beijing 100049, China; 3. Department of Environmental Engineering, University of Beijing Architecture Engineering, Beijing 100044, China)

Abstract: To achieve the effects of artificial wetland on the bacterial diversity, the culturable bacteria and total cell counts of three wetland cells, including sewage pond (SP), free surface wetland (SF) and subsurface flow wetland (SSF), were investigated using the traditional culture-dependent approach and flow cytometry method, based on the detecting the water quality. The bacterial diversity and dominant groups were also compared by PCR-DGGE profiles and 16S rDNA library technique based on its V3 region. Results show that SF and SSF cells can remove the nutrients effectively, the highest removal ratio of COD, total nitrogen, and total phosphorus reach to 42.33%, 52.92% and 41.4%, respectively; The total microbes are increased continuously with the treatment by SF and SSF, and the culturable bacteria clones are decreased after treatment by SF, and increased after further train by SSF. The Shannon-Weaver index is increased to 3.2850 from 3.0819 while the water flowing through SF, but decreased to 3.0181 after flowing through SSF; The dominant groups in SP include Actinobacteria, Cyanobacteria and α -Proteobacteria, reach to 38%, 18% and 18%, respectively; but the most dominant bacteria is changed to β -Proteobacteria with the ratio of 32% and 44%, after treatment by SF and SSF, respectively. *Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides* (CFB) phylum is also increased to 24% finally. Therefore, while the Cuihu Wetland removing the nutrients, the bacterial counts, diversity and dominant groups are also changed, some beneficial bacteria in β -Proteobacteria and CFB phylum increased, and part of those deleterious bacteria in Actinobacteria and Cyanobacteria decreased.

Key words: Beijing Cuihu Wetland; bacterial counts; diversity

随着经济的飞速发展,城市人口迅速增多,水污染问题日益严峻.如何有效地进行水体修复成为人们研究的重中之重.近30年来,活性污泥法和生物膜法已成功用于生物除氮,但其费用相对较高.当前人们开始注意开发那些建设和运行费用低廉,而且对于点源污染和非点源污染均有显著净化效果的技术.人工湿地污水处理系统在这些方面有一定的优势,近些年来得到广泛关注和应用.据报道,人工湿地污水处理系统可以去除地表水体中的悬浮物、氮

和磷^[1~6],实现出水水质达到地面三级水的标准.利用湿地去除污水中有机质、氮和磷时,主要依靠水体和植物根际周围微生物的降解及植物根系的吸收作用.但是对于不同的湿地处理系统与水体微生物群落及其多样性的变化关系并没有明确的定论^[7~13].

收稿日期:2008-01-02; 修订日期:2008-03-21

基金项目:北京市自然科学基金项目(5062003);2006年北京市人事局留学回国优先项目

作者简介:王晓丹(1982~),女,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物, E-mail: wangxiaodan0335@163.com
* 通讯联系人, E-mail: liyh@mail.cnu.edu.cn

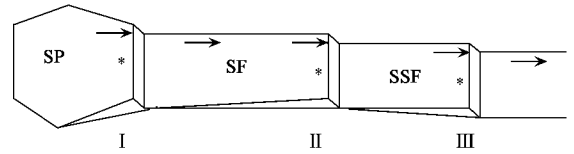
因此,加强湿地处理后,水体中微生物群落的变化研究对于深入了解利用湿地净化水质的机制具有重要意义.

微生物多样性及群落结构的研究过去一直沿用传统的分离、培养和鉴定的方法.但研究证实,自然界中有 85%~99.9%^[14]的微生物还不可以培养,传统培养方法也不能对分离物进行精确地鉴定,不能反映分离物间的系统发育关系.自 1993 年 Muyzer 等^[15]首次在微生物生态学研究领域,应用变性梯度凝胶电泳技术(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)分析环境中微生物区系的变化以来,该技术在微生物分子生态学研究中得到广泛应用^[16~24].本试验在调查北京翠湖湿地地表水体自净化处理系统污水塘、表流湿地和潜流湿地 3 个不同单元细菌群落数目的基础上,采用 PCR-DGGE 技术比较不同单元水体中细菌群落的多样性,又通过构建 16S rDNA 克隆文库,揭示了各自的优势菌属,该研究有助于分析不同的处理系统与细菌多样性及其分布之间的关系,丰富湿地系统净化水质的机制,以期为进一步提高其净水能力提供参考.

1 材料与方法

1.1 试验对象及水质分析

北京翠湖湿地公园位于北京市海淀区西北角的上庄镇,2004 年建成的翠湖湿地地表水体自净化处理系统包括污水塘(swage pond, SP)、表流湿地(surface flow wetland, SF)、潜流湿地(subsurface flow wetland, SSF)、水草湿地和综合生物塘 5 个单元.此系统的主要功能是对翠湖湿地地表水体进行自净化处理.按照设计该系统每天可处理 40 t 的生活污水.污水塘的水主要来自周围地区居民的生活污水,有机质丰富,水体为黑绿色、有臭味;表流湿地包括 *Phragmites australis* (Cav.) Trin, *Scirpus tabernaemontani* Gmel. 和 *Typha angustifolia* L. 3 种植物种植单元;潜流湿地是由芦苇、香蒲等植物和不同孔径的填充物组成.本研究以 SP、SF 和 SSF 3 个湿地单元为目标,2006-10-10 分别在 3 个单元的出口截面中部区域各设 1 个取样点,于表层取样,各取 500 mL 样品,分别标记为 I、II、III(图 1).将部分样品在实验室内沉淀后,取上清液进行水体营养成分的分析:采用 COD 分析仪(DRB200, DR890, HACH, USA)进行化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)的检测;按照常规方法进行总氮(total nitrogen, TN)和总磷(total phosphorus, TP)的分析测定^[25](3 次重



*: 各样品的取样位置; I、II 和 III: 分别为取自污水塘(SP)、表流湿地(SF)和潜流湿地(SSF)出口的产品代号;
箭头: 代表水流的方向

图 1 取样位点示意

Fig.1 Schematic view of the sampling site

复);另一部分在试验室内经 2000 目筛网过滤后用于细菌群落数目测定及 DNA 提取.

1.2 流式细胞仪测定样品中微生物细胞数目

取 100 μ L 待测样品加入核酸染料 Syto16 (Molecular Probes) 0.2 μ L, 黑暗条件下于室温放置 20 min 后加入到绝对计数管(TruCount tube, BD, USA), 然后流入经无菌水校准的流式细胞仪(FACSAria, 美国 BD)计数.记录的参数包括获取的细胞总数和 Beads 的获取数,最后计算出样品中微生物细胞的数目.样品中微生物细胞数目的计算公式:

细胞数目(个/ mL) = 获取细胞数 $\times$ Beads 总量/ (Beads 获取数 $\times$ 样本量)

式中绝对计数管的 Beads 总量为 49 348.

1.3 可培养细菌菌落数目测定

细菌的培养采用 LB 固体培养基,并加入放线菌酮(25 μ g/mL)(Merck)来抑制真菌的生长.各样品被稀释为不同浓度梯度,包括原液、稀释 10 倍、稀释 100 倍和稀释 1 000 倍.取每个梯度样品 50 μ L 涂于平板上,37 $^{\circ}$ C 倒置培养 48 h 后,记录菌落的数目,计算各样品可培养细菌的平均数目.

1.4 PCR-DGGE 法分析样品中细菌群落的多样性和相似性

1.4.1 基因组 DNA 的提取

取经 2000 目筛网过滤的样品各 300 mL,用真空抽滤泵(AP-9908S, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司)将微生物收集到 0.22 μ m 的微孔滤膜上.然后将滤膜剪碎置于 Matrix E Tube 中(Q-Biogene),再采用 Bio101 Fast DNA Spin Kit for Soil 试剂盒(Q-Biogene)提取样品的 DNA.

1.4.2 PCR 扩增

采用带有 GC 的细菌 16S rDNA V3 区特异性引物^[26] GC338F (CGCCGCGCGCGCCCCGCCCCGCCCCGCCGCCCCGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGC)和 530R (GTATTACGCGGCTGCTG)对样品 DNA 进行扩增.

50 μL PCR 反应体系: 5 μL 10 $\times$ PCR buffer, 5 mmol/L dNTP, 5 $\mu\text{mol/L}$ 引物 GC338F, 5 $\mu\text{mol/L}$ 引物 530R, DNA 提取物 50 ng, 2.5 U *Taq* 酶, 用超纯水补足至 50 μL 反应体系. PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 min. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 的效果.

1.4.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析细菌多样性

PCR 反应产物采用 Bio-Rad 公司 DcodeTM 的基因突变检测系统进行分析, 变性剂浓度范围为 30% ~ 60%. 电泳条件: 电压 130 V, 60 $^{\circ}\text{C}$, 电泳 7 h, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE(pH 约为 8.5). 电泳结束后将凝胶进行银染(Sigma)^[27], 染色后的凝胶用紫光 100 扫描仪扫描, Quantity One 4.31(Bio-Rad Company) 软件分析 DGGE 的指纹图谱. 最后分别计算样品细菌的多样性指数、均匀度指数和丰度, 并对群落相似性进行聚类分析. 上述指数的计算方法为: ① 多样性指数: $H = - \sum P_i \ln P_i$, 式中 P_i 为第 i 条带灰度占该样品总灰度的比率^[28]; ② 丰度(S)为 DGGE 胶中每个泳道的条带数; ③ 均匀度指数(E_H)为 $E_H = H/H_{\max} = H/\ln S$ ^[29]; ④ 细菌群落相似性分析主要根据 DGGE 图谱中每个样品不同条带的强度和迁移率, 按照 Unweighted Pair-Group Method using Arithmeric averages (UPGMA) 算法对不同样品细菌群落相似性进行聚类分析.

1.5 利用16S rDNA文库分析优势群落

将样品 DNA 采用引物 338F 和 530R 进行 PCR 扩增后, 进行目标产物的回收、连接和转化^[30]. 最终分别从每个样品随机选取 50 个阳性克隆进行测序 (Applied System)(由上海生物工程公司完成). 将测定的序列用 DNASTar 软件中的 EditSeq 编辑, 并人工校对后, 登录到 GenBank. 然后与 GenBank 数据库进行比对^[31], 采用 MEGA 3.1 软件中的邻接法 (neighbor joining, NJ), 根据 Kimura 遗传距离构建进化树^[32], *Thermoproteus tenax* 作为外类群, 重复计算 (Bootstrap) 1 000 次.

2 结果与分析

2.1 表流湿地和潜流湿地处理有效去除了部分营养物质

对水体中 COD、TN 和 TP 的测定表明, 污水塘水体的 COD、TN 和 TP 分别为 (34.11 ± 1.67) 、 (8.35 ± 2.33) 和 (0.88 ± 0.30) mg/L. 流经表流湿地后, 水体 COD 含量下降了 28.57%, TN 下降了 46.74%, TP 下

降了 29.93%; 进一步经潜流湿地处理后, COD、TN 和 TP 分别下降了 42.33%、52.92% 和 41.4% (图 2). 由此可见, 北京翠湖表流和潜流湿地在去除这些营养物质方面具有较好效果, 起到净化水质的作用.

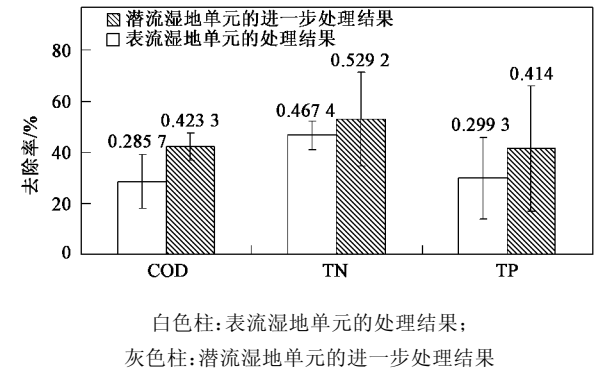


图 2 北京翠湖表流湿地和潜流湿地去除营养物质的比率
Fig.2 Removal ratio of nutrients by Beijing Cuihu SF and SSF

2.2 表流湿地和潜流湿地处理影响了总的微生物数目及可培养的细菌群落数目

每毫升样品中总微生物平均数目表明 (表 1), 污水塘样品中细胞总数最少, 仅为 1.2×10^4 个; 表流湿地处理的样品为 1.8×10^4 个; 潜流湿地处理样品中细胞数目最多达到 3.9×10^4 个. 因此, 笔者认为, 表流和潜流湿地的处理有利于增加水体中总的微生物数目.

综合不同梯度稀释的样品培养结果可发现 (如表 1): 每 mL 水样中, 污水塘出现 2.4×10^3 个菌落; 表流湿地处理后菌落数目减少为 1.8×10^3 CFU/mL; 经潜流湿地处理后可培养的细菌数目又有所增多, 达到 2.6×10^3 CFU/mL. 由此可见, 经过表流湿地和潜流湿地的处理, 水体中可培养细菌出现了先降低后增加的趋势.

表 1 样品中可培养及总的微生物数目分析 (平均值)		
Table 1 Average counts of culturable bacterial community and total microbes (on average)		
样品位置	总的微生物数目 /个 $\cdot\text{mL}^{-1}$	可培养的细菌数目 /CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$
污水塘出口 (I)	1.2×10^4	2.4×10^3
表流湿地出口 (II)	1.8×10^4	1.8×10^3
潜流湿地出口 (III)	3.9×10^4	2.6×10^3

因此, 北京翠湖湿地污水塘中的水经表流湿地和潜流湿地处理后, 微生物的总数目和可培养的细菌数均发生了变化. 在污水塘水体中, 微生物数目总体处于一个相对较低的状态, 估计与污水塘中存在大量的有机物、排泄物甚至有毒物质有关, 恶劣的水环境只能允许相对较少数量的菌类生长; 流经表流

和潜流湿地后,部分微生物在植物的根部或填料周围富集导致某些种群减少,部分有益微生物随着水体环境的改善新生出来,因此导致总的微生物数目增加;随潜流湿地的进一步处理,这种作用更加明显,导致某些细菌的大量繁殖,其结果造成微生物总数目的大量增加.对可培养微生物的检测只采用了 LB 培养基,由于其营养丰富,因此对样品中可培养微生物的检测主要适合高营养条件生长的细菌.表流湿地处理后,大量的有机质被植物吸附导致水体中营养物质下降,使高营养条件下生长的细菌数目减少;进一步经潜流湿地处理后,虽然水体中营养物继续减少,但水环境有所改善,导致新的可培养细菌产生或加快了那些适合高营养条件下生存的微生物的繁殖速度,因而又出现回升现象.

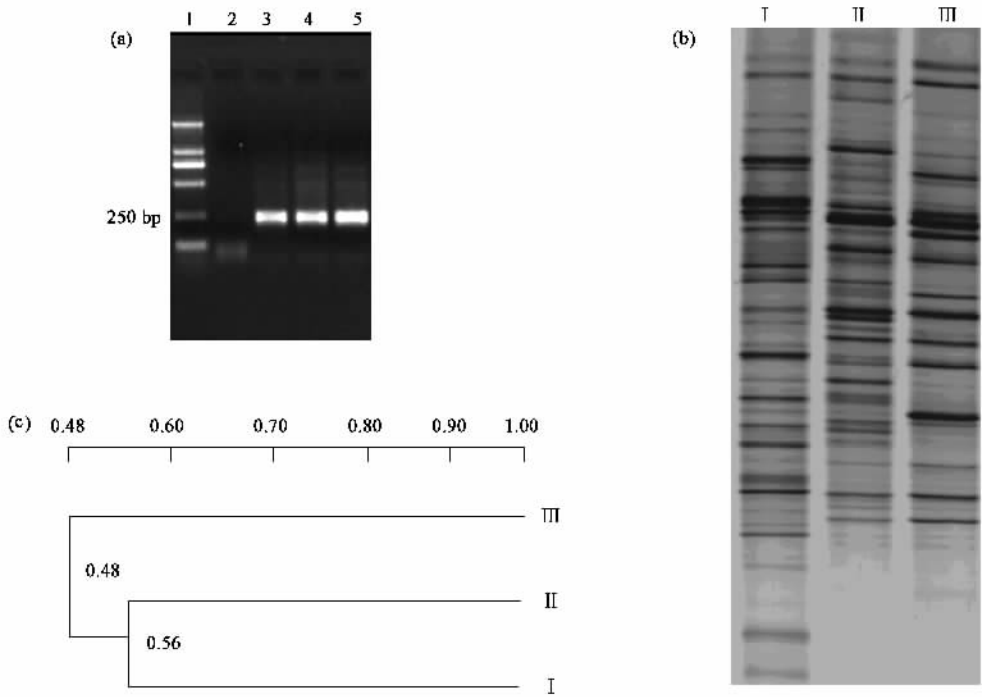
2.3 表流湿地和潜流湿地处理影响了细菌群落的多样性和相似性

将提取的 3 个样品基因组 DNA 进行 16S rDNA 的 V3 区片段扩增,琼脂糖凝胶电泳[图 3(a)]所示扩增产物的片段长约 250 bp,与预期片段大小一致.

将上述 PCR 产物利用变性梯度凝胶电泳分析其指纹图谱发现,每个样品均呈现出了复杂的条带[图 3(b)].3 个泳道上条带分布的位置不同,部分条带同时出现在 3 个泳道相同的位置,说明这些细菌种属是在所测样品中共同存在的;有些条带只出现

在污水塘的样品中,表流湿地或潜流湿地处理后的样品中却没有,说明经表流和潜流湿地的处理,细菌群落结构发生了变化;比较表流湿地和潜流湿地处理后的样品谱带,发现也存在明显差异,这表明伴随不同类型的湿地处理,细菌群落结构也有明显变化.另外,不同泳道相同位置的条带及相同泳道的不同条带的强度均存在差异,表明不同样品中细菌类型、数量和比例上有所不同.

表 2 显示,本实验系统中 Shannon-Weaver 多样性指数的变化不是太大,但基本上沿水流方向,由污水塘($H = 3.0819$)流出,表流湿地($H = 3.2850$)和潜流湿地($H = 3.0181$)处理后 Shannon-Weaver 多样性指数呈现先增大后减小的趋势,细菌群落分布的均匀度和丰富度变化规律与多样性指数变化一致(表 2).这可能是由于污染物进入水体后,污水塘内的有机负荷相对较高,恶劣的环境条件不利于微生物的生存,因而微生物的生长受到抑制,生长速度减慢,多样性减少,Shannon-Weaver 指数较低.在表流湿地中,经过植物根系对一些污染物或微生物的吸附,水体中污染物减少,新的环境有利于一些新的细菌滋生,导致表流湿地中 Shannon-Weaver 指数升高.但当水流至潜流湿地时,由于植物和介质的作用,污染物更多地被降解,一方面有利于水环境的改善,适合新的细菌滋生,而且适合某些类型细菌的大量繁殖;另



(a)基因组 DNA PCR 扩增结果(1.DL2000 Marker; 2. 模板为去离子水的负对照; 3、4 和 5. 分别为样品 I、II 和 III 的总 DNA PCR 的结果);
(b)16S rDNA 的 DGGE 图谱; (c)样品间群落的相似性分析(水平坐标轴代表相似度)

图 3 样品 PCR-DGGE 结果
Fig.3 PCR-DGGE results of samples

Cyanobacteria 和 α -Proteobacteria 类群各占总克隆数的 18%; CFB 类群和 β -Proteobacteria 各占 12%; 另有 2% 的克隆与光氧的真核细胞的叶绿体 16S rDNA 具有较高的同源性(表 3); 表流湿地处理后, 样品中 16S rDNA 克隆文库显示与 10 个类群的细菌(图 5)具有较高的同源性, 分别为 $\alpha \sim \epsilon$ 5 个亚类的 Proteobacteria、Cyanobacteria、CFB 类细菌、High G + C gram positive bacteria、Chlorobi 和 Chloroflexi 等. 其中 β -Proteobacteria 类群的细菌最多, 占总克隆的 32%; 其次为 ϵ -Proteobacteria 类群, 占 12%; Cyanobacteria 占 10%; High G + C gram Positive bacteria 和 α -Proteobacteria 各占 8% 和 6%; 但还有 14% 的克

表 3 不同样品中优势类群所占比例/%

优势类群	I	II	III
High GC gram positive bacteria	38.0	8.0	14.0
Cyanobacteria	18.0	10.0	2.0
α -Proteobacteria	18.0	6.0	10.0
β -Proteobacteria	12.0	32.0	44.0
CFB	12.0	8.0	24.0
γ -Proteobacteria	—	2.0	—
δ -Proteobacteria	—	2.0	—
ϵ -Proteobacteria	—	12.0	—
Phototrophic eukaryote	2.0	14.0	—
Chloroflexi	—	2.0	—
Chlorobi	—	2.0	—
Firmicutes	—	—	6.0
Uncultured unknown bacteria	—	2.0	—

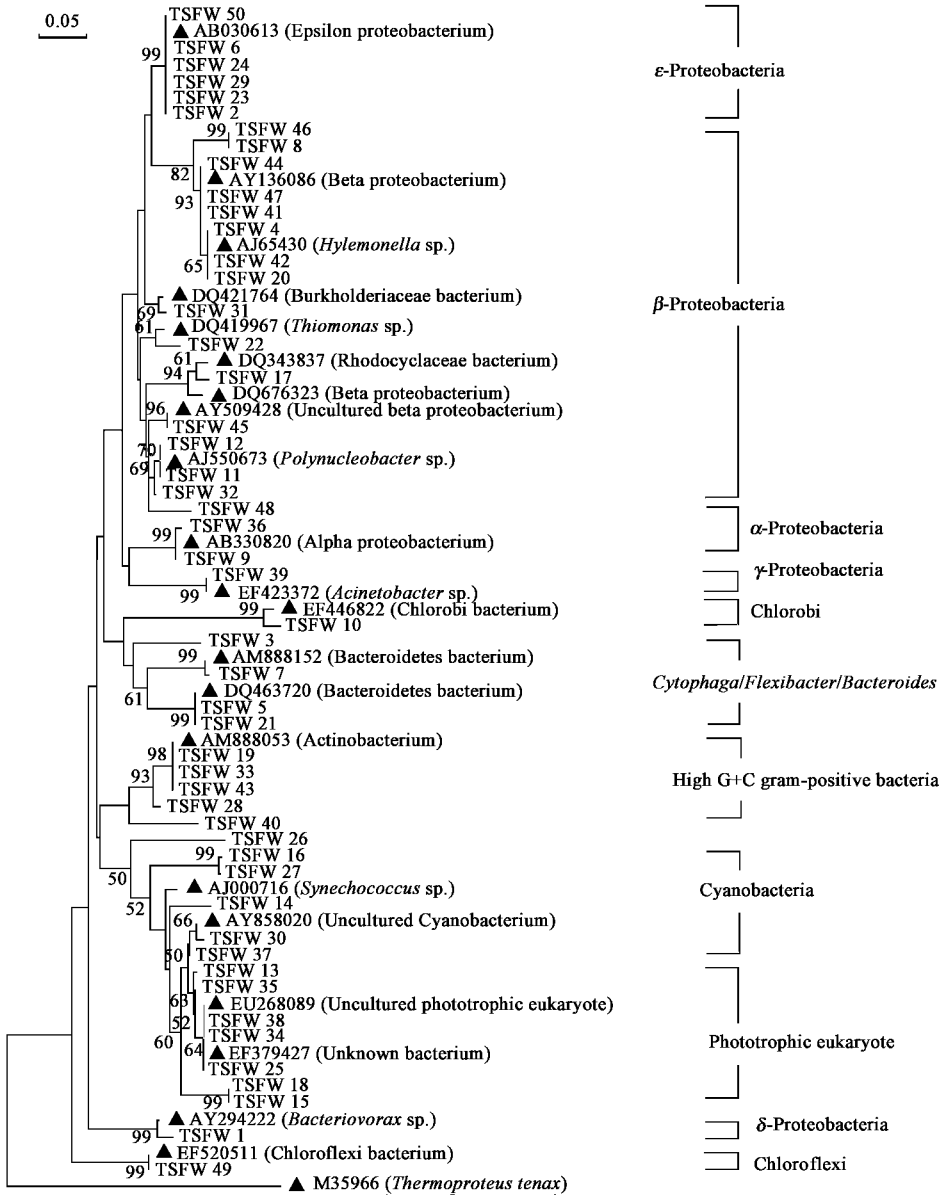


图 5 NJ 法构建的表流湿地处理后水体中细菌16S rRNA基因的系统发育树

Fig.5 Neighbor joining tree of 16S rDNA of bacteria derived from SF

隆与光氧的真核细胞的叶绿体16S rDNA具有较高的相似性(表 3). 而经潜流湿地进一步处理后, 细菌 16S rDNA 文库主要与 6 大类群的细菌具有较高的同源性(图 6), 包括 α 和 β 2 个亚类的 Proteobacteria、

CFB 类群以及 High G + C gram positive bacteria、Cyanobacteria 和 Firmicutes 等. 其中 β -Proteobacteria 比例继续增加, 占总克隆数的 44%; 其次是 CFB 类细菌, 达 24%; Cyanobacteria 的比例则降到 2% (表 3).



图 6 NJ 法构建的经潜流湿地处理后的水体中细菌16S rRNA基因的系统发育树
Fig.6 Neighbor joining tree of 16S rDNA of bacteria derived from SSF

由此可见, 表流湿地和潜流湿地处理后, 北京翠湖湿地污水塘水体主要的优势群落结构发生了明显变化. 在污水塘中最主要的类群为 Actinobacteria, 经表流湿地和潜流湿地处理后最主要的菌群均变为 β -Proteobacteria, Actinobacteria、 α -Proteobacteria 和 Cyanobacteria 类细菌的比例明显降低. 但是, 表流和潜流湿地 2 个系统处理后的细菌群落也略有差异,

在表流湿地处理后 Cyanobacteria 依然以相对较高的比例存在, 为第二主要类群, 而经进一步潜流湿地处理后, 其所占比例降到了最低; CFB 类的细菌则出现先减少, 后明显增多的现象, 经潜流湿地处理后成为第二大类群.

水体中优势细菌群落的变化与水体的自净化处理过程及水质的改善有关. 由于污水塘中污染物的

大量存在造成了有机物、氮和磷含量较高,容易产生大量放线菌属的细菌^[33]。图 3 证实该放线菌属中还包含一类能够合成如土臭味素的萜类化合物和吡嗪的放线菌,它可能使水体发臭,严重影响了水质^[34]。蓝细菌也可能产生蓝藻毒素对水体有潜在的威胁,因而它的大量存在受到广泛关注^[35]。所以降低并去除该类放线菌和蓝细菌在水体净化时是非常必要的。经表流湿地和潜流湿地处理后,放线菌和蓝细菌逐渐降到较低水平,另外有大量 β -Proteobacteria 和一些 CFB 类细菌出现。据报道 β -Proteobacteria 和 CFB 类细菌如 *Flavobacterium* sp. 可有效降低水体中氮的含量,并能够分解代谢水体中的有机物质^[36,37]。由此看来,在北京翠湖湿地污水处理系统中表流和潜流湿地的处理降低并去除了部分有毒有害的微生物菌属,同时产生大量能降解有机物和氮磷的细菌,在一定程度上达到了较好的净化水质的效果。但各类细菌在翠湖湿地净化过程中的功能仍需进一步研究。

3 结论

(1)北京翠湖表流和潜流湿地有效地去除了水体中营养物质的含量,对 COD、TN 和 TP 的最终去除率分别达到 42.33%、52.92% 和 41.4%。

(2)北京翠湖表流和潜流湿地改变了水体中总的微生物数目和可培养的细菌数目。随着湿地单元的逐级处理,总的微生物数目呈逐渐上升的趋势;污水塘中微生物的总数目为 1.2×10^4 个/mL,经表流和潜流湿地处理,微生物的总数目分别增加到 1.8×10^4 个/mL 和 3.9×10^4 个/mL;而可培养的细菌数目则表现为先降低后回升:在污水塘中有 2.4×10^3 CFU/mL,表流湿地处理后降为 1.8×10^3 CFU/mL,而经潜流湿地处理后又升至 2.6×10^3 CFU/mL。

(3)表流湿地处理后,水体中细菌的 Shannon-Weaver 多样性指数 H' 由 3.081 9 提高到 3.285 0,而随着潜流湿地的进一步处理又下降为 3.018 1。

(4)表流和潜流湿地处理改变了水体中细菌的优势群落结构。污水塘中细菌的主要类群为 Actinobacteria、Cyanobacteria、 α -Proteobacteria,分别占总克隆的 38%、18% 和 18%;表流和潜流湿地处理后,最主要的细菌类群均为 β -Proteobacteria,所占比例分别达 32% 和 44%;潜流湿地处理后, *Cytophaga*/*Flexibacter*/*Bacteroides* (CFB) 类群也明显增加,达 24%。

参考文献:

[1] 张海,张旭,钟毅,等.潜流人工湿地去除大庆地区湖泊水体中

石油类化合物的研究[J].环境科学,2007,28(7):1449-1454.

- [2] Vymazal J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands [J]. Sci Total Environ, 2007, 380(1-3): 48-65.
- [3] Jin G, Kelley T, Freeman M, et al. Removal of N, P, BOD₅, and coliform in pilot-scale constructed wetland systems [J]. Int J Phytoremediation, 2002, 4(2): 127-141.
- [4] 籍国东,孙铁珩,李顺.人工湿地及其在工业废水处理中的应用[J].应用生态学报,2002,13(2):224-228.
- [5] Healy M, Cawley A M. Nutrient processing capacity of a constructed wetland in western Ireland [J]. J Environ Qual, 2002, 31(5): 1739-1747.
- [6] Belin J I, McCaskey T A, Black M C. Evaluating the efficiency of toxicity abatement in a constructed wetland with *Ceriodaphnia dubia* [J]. J Toxicol Environ Health A, 2000, 60(2): 137-151.
- [7] Zul D, Denzel S, Kotz A, et al. Effects of plant biomass, plant diversity and water content on bacterial communities in soil lysimeters: implications for the determinants of bacterial diversity [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73: 6916-6929.
- [8] Ziembinska A, Raszka A, Truu J, et al. Molecular analysis of temporal changes of a bacterial community structure in activated sludge using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) [J]. Pol J Microbiol, 2007, 56(2): 119-127.
- [9] Ren N, Xing D, Rittmann B E, et al. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production [J]. Environ Microbiol, 2007, 9(5): 1112-1125.
- [10] Bereschenko L A, Stams A J, Heilig G H, et al. Investigation of microbial communities on reverse osmosis membranes used for process water production [J]. Water Sci Technol, 2007, 55(8-9): 181-190.
- [11] Popko D A, Han S K, Lanoil B, et al. Molecular ecological analysis of planktonic bacterial communities in constructed wetlands invaded by *Culex* (Diptera: Culicidae) mosquitoes [J]. J Med Entomol, 2006, 43(6): 1153-1163.
- [12] Nicomrat D, Dick W A, Tuovinen O H. Microbial populations identified by fluorescence *in situ* hybridization in a constructed wetland treating acid coal mine drainage [J]. J Environ Qual, 2006, 35(4): 1329-1337.
- [13] 蒋玲燕,殷峻,闻岳,等.修复受污染水体的潜流人工湿地微生物多样性研究[J].环境污染与防治,2006,28(10):734-737.
- [14] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiol Rev, 1995, 59(1): 143-169.
- [15] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700.
- [16] Miletto M, Bodelier P L, Laanbroek H J. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments [J]. J Microbiol Methods, 2007, 70(1): 103-111.
- [17] Wu Q, Zhao X H, Zhao S Y. Application of PCR-DGGE in research of bacterial diversity in drinking water [J]. Biomed Environ Sci, 2006, 19

- (5): 371-374.
- [18] Hornek R, Pommerening-Roser A, Koops H P, *et al.* Primers containing universal bases reduce multiple *amoA* gene specific DGGE band patterns when analysing the diversity of beta-ammonia oxidizers in the environment [J]. *J Microbiol Methods*, 2006, **66**(1): 147-155.
- [19] Xia S, Shi Y, Fu Y, *et al.* DGGE analysis of 16S rDNA of ammonia-oxidizing bacteria in chemical-biological flocculation and chemical coagulation systems [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **69**(1): 99-105.
- [20] Tacao M, Moura A, Alves A, *et al.* Evaluation of 16S rDNA- and gyrB-DGGE for typing members of the genus *Aeromonas* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **246**(1): 11-18.
- [21] Lyautey E, Lacoste B, Ten-Hage L, *et al.* Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation [J]. *Water Res*, 2005, **39**(2-3): 380-388.
- [22] Bodelier P L, Meima-Franke M, Zwart G, *et al.* New DGGE strategies for the analyses of methanotrophic microbial communities using different combinations of existing 16S rRNA-based primers [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, **52**(2): 163-174.
- [23] Noda N, Yoshie S, Miyano T, *et al.* PCR-DGGE analysis of denitrifying bacteria in a metallurgic wastewater treatment process [J]. *Water Sci Technol*, 2002, **46**(1-2): 333-336.
- [24] Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, *et al.* The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2001, **24**(4): 610-617.
- [25] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [26] Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, *et al.* Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Curr Microbiol*, 2001, **42**(3): 199-202.
- [27] Sanguinetti C J, Dias Neto E, Simpson A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, 1994, **17**(5): 914-921.
- [28] Shannon C E, Weaver W. The mathematical theory of communication [M]. Urbana, Illinois, University of Illinois Press, 1949.
- [29] Pielou E C. An introduction to mathematical ecology[M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1969. 82-212.
- [30] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning: A laboratory Manual [M]. (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [31] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(22): 4673-4680.
- [32] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, **5**(2): 5150-5163.
- [33] Figueiredo D R, Pereira M J, Moura A, *et al.* Bacterial community composition over a dry winter in meso- and eutrophic Portuguese water bodies [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, **59**(3): 638-650.
- [34] Zaitlin B, Watson S B. Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: myths, tenets and truths [J]. *Water Res*, 2006, **40**: 1741-1753.
- [35] Mazur-Marzec H. Characterization of phycotoxins produced by cyanobacteria [J]. *Oceanol and Hydrobiol Stud*, 2006, **35**(1): 85-109.
- [36] Nijburg J W, Laanbroek H J. The influence of *Glyceria maxima* and nitrate input on the composition and nitrate metabolism of the dissimilatory nitrate-reducing bacterial community [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, **22**(1): 57-63.
- [37] Kisand V, Cuadros R, Wikner J. Phylogeny of Culturable Estuarine Bacteria Catabolizing Riverine Organic Matter in the Northern Baltic Sea [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(1): 379-388.