

DOI:10.16030/j.cnki.issn.1000-3665.201909056

地下水人工回灌含水介质微生物堵塞试验研究

高宗军, 徐海龙, 夏 璐

(山东科技大学地球科学与工程学院, 山东 青岛 266590)

摘要: 地下水人工回灌过程中, 含水介质的堵塞除机械颗粒沉积和化学沉淀外, 微生物起重要的作用。然而, 目前探究回灌堵塞过程中以生物量为主要研究内容反映生物堵塞的发生, 对其堵塞过程中微生物菌群组成结构的研究较少。采用室内一维渗流试验, 开展含水介质微生物堵塞过程研究。分析含水介质渗透性、营养盐指标及胞外聚合物含量时空动态变化, 利用 16SrRNA 高通量测序技术, 深入分析微生物群落多样性和结构特征, 从分子水平上揭示含水介质回灌堵塞过程中微生物群落特征及其演替规律。研究结果表明, 随着回灌持续, 含水介质渗透性呈现非线性降低趋势; 空间上, 堵塞主要发生在介质表层; 时间上, 各层介质渗透性依次经历稳定波动—快速下降—缓慢下降—趋于稳定 4 个阶段。含水介质附着细菌主要分布于 26 个门, 65 个纲, 162 个目, 258 个科, 425 个属, 767 个种。随着回灌的进行, 细菌群落丰度、多样性及均匀度均呈现降低趋势。含水介质上附着细菌群落结构发生明显演替。菌群以变形菌门为优势菌门, 拟杆菌门为次优势菌门; 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 为主要优势菌属。

关键词: 地下水人工回灌; 微生物堵塞; 渗透系数; 高通量测序; 细菌群落

中图分类号: P641.25

文献标识码: A

文章编号: 1000-3665(2020)03-0008-09

An experimental study of bioclogging of aquifer media during artificial reinjection of groundwater

GAO Zongjun, XU Hailong, XIA Lu

(College of Earth Science and Engineering, Shandong University of Science and Technology,
Qingdao, Shandong 266590, China)

Abstract: In the process of artificial recharge of groundwater, microorganisms play an important role in the blockage of aquifer media besides mechanical particle deposition and chemical precipitation. At present, however, biomass is the main research content to reflect the occurrence of bio-clogging in the process of recharge blockage, and there are few researches on the composition of microbial flora in the process of blockage. One-dimensional seepage test is carried out to examine the microbial blockage process in aquifer media. The temporal and spatial dynamic changes in permeability, index of nutrition salts and extracellular polymeric substances (EPS) of aquifer medium are analyzed. The high-throughput sequencing technique based on 16SrRNA is used to deeply analyze the diversity and structural characteristics of microbial community, and to reveal the characteristics and succession law of microbial community in the process of recharge blockage at the level of molecular. The results show that in the process of recharge, the permeability of aquifer media shows an obvious non-linear decreasing trend. In space, blockage mainly occurs on the surface of medium. In time, the permeability of each layer goes through four stages: stable fluctuation, rapid decrease, slow declines and smooth. The bacteria attached to aquifer media are mainly distributed in 28 phyla, 65 classes, 162 orders, 258 families, 425 genera and 767 species. The abundance, diversity and evenness of bacterial

收稿日期: 2019-09-18; 修订日期: 2019-11-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(41902250;41641020)

第一作者: 高宗军(1964-), 男, 教授, 主要从事水文地质研究工作。E-mail: gaozongjun@126.com

community are decreased. In terms of the structure and composition of flora, proteobacteria is the dominant phylum, followed by actinobacteria, and pseudomonas is the main dominant genus. There is an obvious succession of bacterial community structure attached to the medium.

Keywords: artificial reinjection of groundwater; bioclogging; coefficient of permeability; high-throughput sequencing; bacterial community

随着社会经济的发展和人民生活水平的提高,淡水资源利用范围及规模逐年扩大,消耗量日益增加,地下水水位衰减、地面沉降等很多环境地质问题^[1-3]相继出现,生态资源的可持续发展和人民生命财产安全受到严重威胁,合理开发利用水资源势在必行。实施人工回灌地下水是解决这些问题的有效措施之一^[4-7]。

人工回灌是将回灌水经相应处理后重新回注到含水层,促进地下水的良性循环。然而,大量工程实践表明^[4-7],回灌过程中极易发生含水层堵塞,严重影响回灌工程的顺利实施,甚至迫使回灌井报废。因此,深入开展地下水回灌堵塞研究,对延长回灌井使用寿命、科学可持续的开发利用水资源具有重要的理论价值和实际意义。人工回灌过程中含水层堵塞可分为物理、化学和微生物堵塞3种。国外相关研究者 Dillon 等^[7]对40例回灌井调查统计,其80%回灌井发生堵塞,物理堵塞占70%,化学堵塞占10%,生物堵塞占15%。物理堵塞中最典型的是悬浮物堵塞,在惯性和水力作用下悬浮物被沉淀和截留在表层含水介质中,渗流阻力增大,回灌率降低;硅酸盐垢、碳酸盐垢在化学堵塞现象中普遍存在。Rosnes 等^[8]将美国 North Sea 地热回灌工程的失败归于硫酸盐还原菌的生长及其胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)的积累。Ripley 等^[6]研究认为,回灌系统的生物堵塞主要发生在含水介质表层,具体入渗范围受含水介质自身岩性特征、生物菌群、回灌水质、外界环境等因素不尽相同,介质渗透性初始迅速降低,随后缓慢下降。Albrechtsen 等^[9]认为,细菌是生物堵塞发生的主要原因,堵塞发生在微生物自身生命体及代谢产物形成的生物膜,附着和堆积在含水介质上。姜桂华等^[10]发现,回灌前期主要是由于生物膜的产生促使含水介质渗透性降低;回灌后期主要是微生物产气造成的生物堵塞。夏璐等^[11]在微生物堵塞过程及机理研究过程中发现含水介质呈现非均质性,渗流距离越长生物堵塞程度越低。路莹等^[12]建立了生物生长量模型与含水介质渗透性变化的定量关系,可以对生物堵塞进行预测。常见回灌水源中的微生物(主要为细菌)通常具有较强的环境适应力,在回灌过程中菌体自身及其

代谢产物附着、堆积于含水介质表面及孔喉处,降低介质有效孔隙度,进而引起含水层堵塞^[13]。微生物堵塞作为地下水回灌中重要的堵塞类型之一,研究含水层微生物堵塞现象及机理,解决生物堵塞问题是值得深入探讨的科学问题。

传统的微生物培养技术对模拟微生物生存的空间环境和营养条件存在不足,且大量微生物具有不可培养性,该技术在地下水微生物研究方面受到局限^[14]。现代分子生物学技术的诞生推动了环境微生物领域的发展,该技术不依赖传统的实验室培养方法,可以从分子水平上揭示种群的群落特征信息。高通量测序技术(high-throughput sequencing technology)是目前应用广泛、提供较全面种群生物学信息的现代分子生物学技术,主要包括扩增子、宏基因组、宏病毒组、宏转录组等测序研究^[15]。目前,高通量测序技术在地下水污染调查和预测方面得到广泛应用,但用于探究回灌堵塞过程中造成堵塞的微生物菌群组成结构的研究较少。相关研究如崔丙健等^[16]基于高通量测序技术并结合定量PCR方法探讨再生水灌溉辣椒果实与根际细菌群落组成和病原菌分布丰度特征。Kavitha 等^[17]运用高通量测序技术发现 *Brevundimonas* 菌属在硝酸盐还原过程中起重要作用,为地下水中硝酸盐污染提供指示作用。高远等^[18]采用高通量测序技术发现再生水回灌后的土壤细菌群落多样性降低,细菌数量和种群结构变化较大,但回灌过程中,是哪些微生物的繁殖造成了含水层的堵塞,其组成与结构如何,需要进一步研究。

为此,本研究选取山东省青岛市大沽河流域下游地下水为研究对象,采用室内一维回灌试验,进行地下水回灌过程中微生物堵塞试验。基于16SrRNA的高通量测序技术,深入分析微生物群落多样性和结构特征,从分子水平上揭示含水层回灌堵塞过程中微生物群落特征及其演替规律,以期对浅层含水层回灌生物堵塞的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验装置与材料

采用一维柱试验装置(图1),包括渗流柱、供水

箱、出水箱、定水头装置和测压板 5 部分。渗流柱由 2 mm 有机玻璃制成,高 37 cm,内径 6 cm,有效填充高度为 18 cm。柱体底部设置布水区,以便均匀出水,布水板与砂样之间铺设细纱布,防止砂样流出堵塞布

水板。渗流柱侧壁设置 5 个测压管,分别距离顶部溢流口 10,12,14,16,26 cm,与测压板相连。测压管与柱体连接处铺设细纱布,防止柱内砂样流失堵塞测压管。

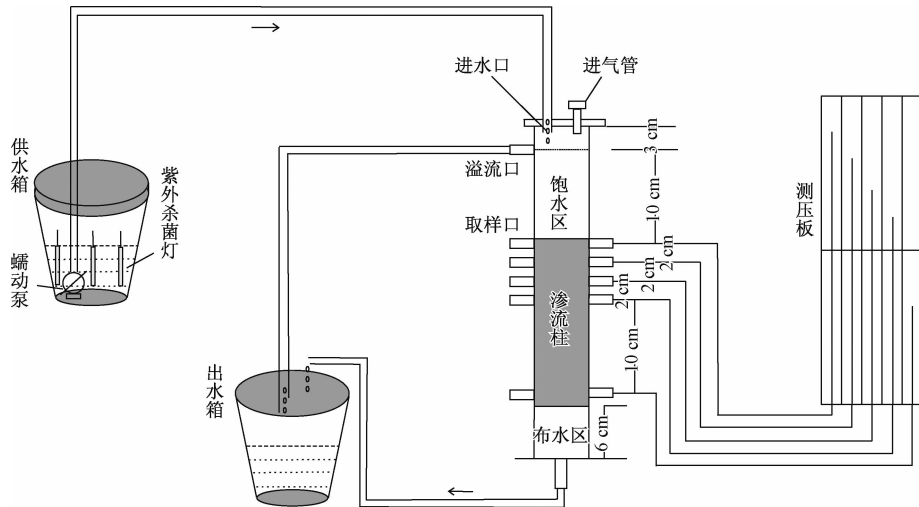


图 1 回灌试验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the injection test

天然含水介质存在较大非均质性,但局部为均质介质层^[13],本研究不探讨非均质因素,同时为排除含水介质化学组分引起的化学堵塞,采用 100 目石英砂(SiO_2 含量在 99% 以上)作为供试含水介质砂样。

接种液选用青岛大沽河流域下游的周臣屯水塔处地下水井水源。

渗流试验回灌水在实验室配制,依据地下水营养盐浓度配制,回灌水包括两部分:水源为蒸馏水;营养盐为葡萄糖、氯化铵、磷酸氢二钾,见表 1。

表 1 现场地下水及回灌水营养盐指标

Table 1 Water quality parameters of in suit groundwater and simulated recharge water

水样	pH	COD/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\text{NH}_4^+ - \text{N}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\text{PO}_4^{3-} /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
接种液	7.18 ± 0.11	6.60 ± 0.36	1.40 ± 0.10	0.15 ± 0.02
回灌水	7.48 ± 0.01	6.10 ± 0.04	1.42 ± 0.04	0.16 ± 0.01

1.2 试验方法

1.2.1 试验运行

取样后将待接种的地下水进行连续曝气 3 h,静置 30 min,上清液备用接种。渗流柱内装入一定体积的灭菌自来水,每次称取等量灭菌石英砂,单次装砂厚度 2 cm 并将其压实处理,重复装砂至有效高度,持续饱水 72 h,以保证柱内没有气泡。待水头稳定后计算初始渗透系数,将接种液以 20 mL/min 的流速连续回灌

流柱 4 h 后,关闭进、出水阀,进行微生物静置附着培养 12 h,完成细菌的接种过程。采用蠕动泵抽取回灌水进行定流量、定水头回灌试验;试验过程中,记录不同时刻各测压管水头读数,并通过秒表和量筒测量出流流量,计算渗透系数;采集含水介质在相对渗透系数为 1(接种柱),0.85,0.65,0.35,0.15,0.01 时的表层砂样进行微生物代谢产物 EPS 的测试与分析;采集相对渗透系数为 1,0.85,0.65,0.5,0.35,0.15,0.01 时渗流柱的饱水区进水和出水孔出水水质进行 DO、ORP、COD、 $\text{NH}_4 - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3 - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2 - \text{N}$ 、 PO_4^{3-} 指标分析。试验结束后,拆除砂柱;称取 1 g 相对渗透系数为 1 和 0.01 介质的表层砂样用以提取生物 DNA 序列进行高通量测序分析。

渗透系数(K)是含水介质渗透性能的直观表现,以达西定律为理论依据,计算含水介质绝对渗透系数:

$$K = \frac{QL}{A\Delta H} \quad (1)$$

式中: Q ——出水流量/ $(\text{mL} \cdot \text{s}^{-1})$;

L ——任意两测压管高差/cm;

ΔH ——对应渗流途径的水头损失/cm;

A ——过水断面/ cm^2 。

根据实测的各层绝对渗透系数与初始渗透系数计算相对渗透系数(K'_s):

$$K'_s = \frac{K_s}{K_0} \quad (2)$$

式中: K_0 ——初始渗透系数/($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$);

K_s ——任意时刻渗透系数/($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)。

相对渗透系数值越小表明堵塞程度越低,相对渗透系数值越大表明堵塞程度越高。

1.2.2 营养盐指标测定

DO、ORP 采用哈希 HQ40 d 便携式双通道输入多参数数字化分析仪及相应 DO、ORP 电极法进行现场测定。利用哈希 DR/2800 型便携式分光光度计分别采用消解比色法、水杨酸法、镉还原法、重氮化法和抗坏血酸法测定 COD、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 PO_4^{3-} 离子浓度。

1.2.3 胞外聚合物(EPS)测定

本试验采用甲醛-氢氧化钠法进行砂样中细菌代谢产物 EPS 提取。EPS 的化学成分复杂,包括磷脂、核酸、多糖、蛋白质、腐殖质、糖醛酸以及无机成分,其中多糖、蛋白质为 EPS 主要成分,占总量的 70% ~ 80%^[19]。本次试验 EPS 总量定义为多糖和蛋白质总和。多糖含量测定使用苯酚-硫酸法^[20],以 50 mg/L 葡萄糖作为标准液;蛋白质测定使用考马斯亮蓝法^[21],以 50 mg/L 牛血清白蛋白作为标准液。

1.2.4 MiSeq 高通量测序

相对渗透系数为 1 和 0.01 的介质砂样进行高通量测序。依次进行 DNA 抽提、PCR 扩增、荧光定量、MiSeq 高通量测序等分析。

根据 MP 的 FastDNA SPINTM kit for soil 试剂盒进行 DNA 抽提,DNA 浓度和纯度利用 NanoDrop2000 进行检测,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。

采用带有 barcode 的特异性引物(338F/806R:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'和 5'-GGACTACHVG GGTWTCTAAT-3')对细菌 16SrRNAV3-V4 区进行 PCR 扩增^[14]。PCR 扩增条件:变性(95 °C, 3 min),扩增循环(变性 95 °C, 30 s;退火 53 °C, 30 s;延伸 72 °C, 45 s),延伸(72 °C, 10 min);PCR 反应体系:5 × FastPfu 缓冲液(FastPfu Buffer)4 μL,2.5 mmol/LdNTP 混合物 2 μL,正向引物(Forward Primer)5 μmol/L 0.8 μL,反向引物(Reverse Primer)5 μmol/L 0.8 μL,FastPfu 聚合酶(FastPfu Polymerase)0.4 μL,牛血清白蛋白(BSA)0.2 μL,双蒸馏水(ddH₂O)11.8 μL。

参照初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST(Promega, USA)进行检测定量。

测序工作由上海美吉生物公司利用 IlluminaMiSeq 测序仪的 MiseqPE300 平台完成测序。

2 结果与讨论

2.1 含水介质相对渗透系数变化特征

历时 85 h 的室内实验室模拟回灌,分别计算含水介质整体(0 ~ 16 cm)、表层(0 ~ 2 cm)、中上层(2 ~ 4 cm)、中下层(4 ~ 6 cm)和底层(6 ~ 16 cm)介质的相对渗透系数(K'_s),分析渗流柱堵塞的时空变化规律。

如图 2 所示,含水介质整体(0 ~ 16 cm)渗透系数呈下降趋势,试验结束后,绝对渗透系数降至初始值的 0.05,降幅 95%,说明回灌过程中出现严重堵塞现象。与此同时不同层位的渗透系数也存在不同程度的降低。其中,表层(0 ~ 2 cm)含水介质堵塞最为严重, K'_s 降至 0.01,降幅为 99%;中上层(2 ~ 4 cm)介质 K'_s 降至 0.89,降幅为 11%;中下层(4 ~ 6 cm)介质 K'_s 降至 0.94,降幅为 6%;底层(6 ~ 16 cm) K'_s 降至 0.80,降幅为 20%。由此可知,回灌过程中,含水介质渗透性呈非线性下降趋势,含水介质表层堵塞最为严重,该现象与夏璐等^[11]人研究结果一致,说明含水介质渗透性降低主要因为发生表层介质堵塞。本试验采用蒸馏水配制营养盐,没有添加悬浮颗粒物质,以石英砂减弱水岩作用等化学反应,消除了物理及化学堵塞发生因素,渗透性能降低的原因应当为发生生物堵塞。张晓婉等^[5]在人工回灌微生物堵塞过程中发现细菌数量的增加会降低介质的渗透性能;Knowles 等^[22]提出生物膜的产生会加速介质堵塞的发生;Thullner 等^[23]研究发现细菌代谢分泌产生胞外聚合物是致使渗透性降低的主要原因。通过以上相关研究可知,本试验生物堵塞发生原因为附着于介质表层的微生物数量、体积、质量的增加,代谢产物的分泌,生物膜的形成及增厚等。

在时间上,含水介质表层(0 ~ 2 cm)及介质整体渗透性依次经历稳定波动—快速下降—缓慢下降—趋于稳定 4 个阶段;中上层(2 ~ 4 cm)、中下层(4 ~ 6 cm)和底层(6 ~ 16 cm)渗透性呈现稳定波动,小幅度下降直至趋于稳定的趋势。以渗透性能降低的主要发生段表层(0 ~ 2 cm)介质为例,初始稳定波动期(0 ~ 7 h)含水介质 K'_s 降至 0.94,降幅为 6%;快速下降期(7 ~ 12.5 h)介质 K'_s 降至 0.23,降幅为 71%;缓慢下降期(12.5 ~ 35 h)介质 K'_s 降至 0.03,降幅为 20%;趋于稳定期(35 ~ 85 h)介质 K'_s 降至 0.01,降幅为 2%。研究表明,生物堵塞在回灌后几天开始出现,渗透性在开始的 10 天内下降最为迅速,其后下降缓慢^[6],与本试验渗透性衰减趋势相符。黄修东等^[24]研究发现含水介质粒径越小越易堵塞。因本试验采用 100 目石英

砂,较容易发生堵塞现象,促使堵塞周期缩短,含水介质渗透性在 24 h 内快速降低。

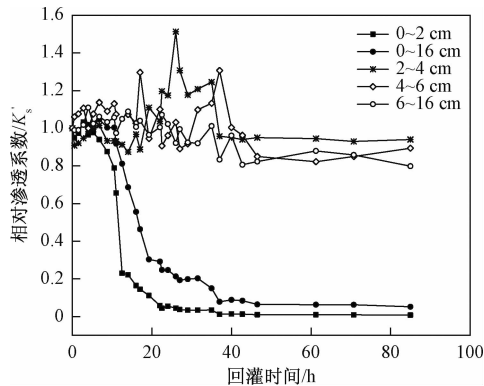


图2 相对渗透系数时空变化图

Fig. 2 Spatial and temporal variation in relative coefficient of permeability

2.2 营养盐指标分析

图3为含水介质在相对渗透系数(K_s')为1(接种柱),0.85,0.65,0.5,0.35,0.15,0.01时,饱水区水质及出水孔出水水质的 DO、ORP、COD、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 PO_4^{3-} 营养盐指标变化趋势图。

实验数据显示,饱水区 DO 浓度高于出水,且饱水区及前期出水 DO 下降幅度较小, K_s' 降至 0.15 时出水 DO 出现明显下降现象。当 K_s' 降至 0.15 后,砂样表层及介质内部微生物数量增多耗氧量增大,出水溶解氧浓度降低。饱水区 ORP 高于出水,且 $K_s' = 0.85$ 时 ORP 值最高, $K_s' = 0.15$ 时降到最低。 $K_s' = 0.85$ 时 ORP 升高,可能是回灌开始后,新配制的回灌液渗入到介质内改变了附着于砂样表层的微生物;在静置培养时,微生物进行生命活动,形成了氧化还原环境,微生物生长过程中以氧为电子受体,氧化还原电位降低。 K_s' 降至 0.15 后因渗流柱内生命体增多,营养源不足,生命体进入内源呼吸阶段而导致 ORP 略有升高。饱水区 COD 高于出水,前期饱水区、出水 COD 均呈下降趋势,当 K_s' 降至 0.15 后 COD 升高。 K_s' 降至 0.85 时, COD 下降最快,可知此时细菌进入对数生长期,葡萄糖等营养物消耗最快; K_s' 降至 0.5 后,微生物生长速率下降 COD 出现回升现象。回灌过程中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 PO_4^{3-} 值变化幅度较小,饱水区略高于出水处;当 K_s' 降至 0.5 前均出现小幅度下降,降至 0.5 后均出现小幅度升高现象。

2.3 胞外聚合物

胞外聚合物 EPS 是微生物在代谢过程中产生的黏附在细胞壁外对外界不良环境具有抵抗力,且在饥

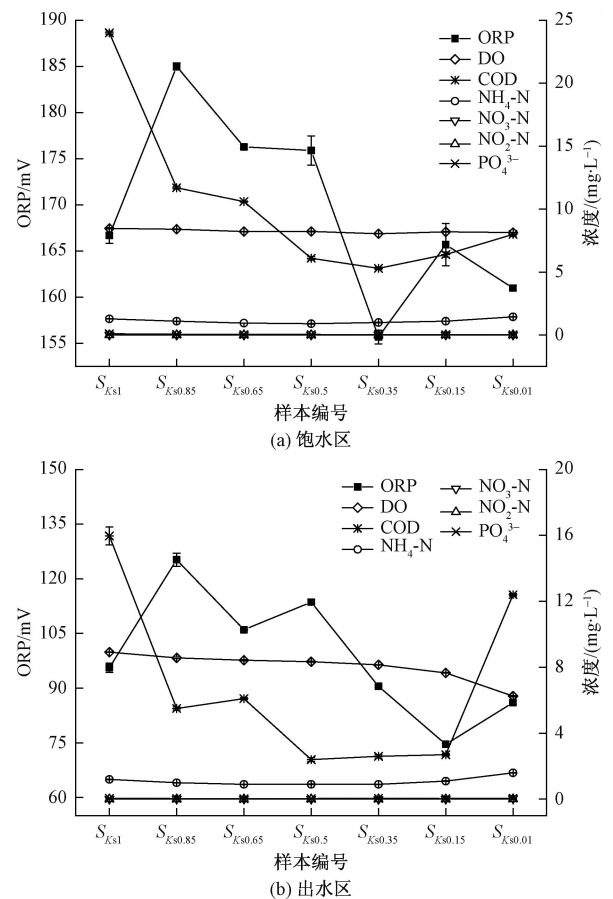


图3 饱水区和出水区营养盐随含水介质堵塞程度变化趋势图

Fig. 3 Trend diagram of nutrient salts change in inlet and effluent with the degree of blockage in aquifer media

饿环境下可以为自身供给能源和碳源的一种有机高分子聚合物^[19]。

图4为相对渗透系数为1(接种柱),0.85,0.65,0.35,0.15,0.01时含水介质表层砂样 EPS 含量变化趋势图。由图可知,6个样本中多糖含量均高于蛋白质含量; K_s' 降至 0.15 时,EPS 含量降低,且多糖减少量高于蛋白质减少量。回灌开始营养源增多,微生物进入快速增长阶段后代谢产物增多 EPS 升高;回灌后期因生物量增多,营养物相对缺乏,细菌进入衰减期内源呼吸阶段致使 EPS 降解消耗,其 EPS 中的多糖作为主要碳源被生物自身消耗利用;回灌末期,部分细菌自溶死亡,胞内聚合物溶出变成胞外聚合物导致 EPS 升高。

2.4 MiSeq 高通量测序结果分析

2.4.1 测序结果及 Alpha 多样性分析

回灌始、末(含水介质 $K_s' = 1$ 和 $K_s' = 0.01$)两样本共得有效序列 82 467 条,平均长度 417.41 bp;测序深度均一化,按最小样本序列数抽平,每样本有效序列均 32 044 条;采用 RDPclassifier 贝叶斯算法对 97% 相似

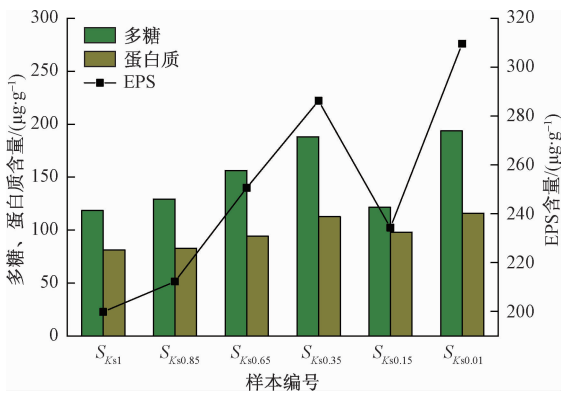


图 4 EPS 含量随含水介质堵塞程度变化趋势图

Fig. 4 Trend diagram of EPS change with the degree of blockage in aquifer medium

水平的 OTU 代表序列聚类分析^[25], 共得 1 404 个 OTUs, 丰度最高的 OTU 占总序列的 7.25%。

表 2 Alpha 多样性指数表
Table 2 Alpha diversity index

样本名称	丰富度 (Richness)			多样性 (Diversity)		均匀度 (Evenness)		覆盖度 (Coverage) / %
	Chao	Sobs	Ace	Shannon	Simpson	Shannoneven	Simpsoneven	
S _{Ks1}	1 304.632 8	1 300	1 313.2	5.996 1	0.006 0	0.836 3	0.129 0	0.998 7
S _{Ks0.01}	259.473 7	235	256.4	3.613 5	0.054 1	0.661 9	0.078 7	0.999 0

2.4.2 物种组成与丰度分析

图 5 为 $K'_s = 1$ 和 0.01 时两样本中微生物在门、属水平上的群落组成及相对丰度图。样本共包括 26 个细菌门类, 65 个菌纲类, 162 个菌目类, 258 个菌科类, 425 个菌属类, 767 个菌种类, 相对丰度小于 0.01 合并为其他 (Others)。

在门分类水平上, 两样本均以变形菌门 (Proteobacteria) 为优势菌门。图 5(a) 显示, 回灌结束后 ($K'_s = 0.01$) 变性菌门 (Proteobacteria), 浮霉菌门 (Planctomycetes), 蓝细菌门 (Cyanobacteria), 拟杆菌门 (Bacteroidetes), 衣原体 (Chlamydiae) 丰度增加; 放线菌门 (Actinobacteria), 酸杆菌门 (Acidobacteria), 疣微菌门 (Verrucomicrobia), 厚壁菌门 (Firmicutes) 丰度降低; 芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、己科河菌门 (Rokubacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 基本消失。研究发现, 变形菌门在好氧和厌氧环境下均可存活, 且在碳、氮、磷循环中起重要作用^[26]; 浮霉菌门有专性厌氧菌和专性好氧菌^[27], 随着回灌进行, 含水介质表层生物膜厚度增加, 介质表层处于缺氧状态, 利于厌氧菌存活; 蓝细菌门属厌氧菌易于培养, 具有较高耐受性和生长率^[28], 比其他菌种更具竞争力; 放线菌门^[29]需氧代

Alpha 多样性指数可反映地下水环境中微生物群落丰度和多样性, 包括反映群落丰富度 (Richness) 的 Chao、Sobs、Ace 指数; 多样性 (Diversity) 的 Shannon、Simpson 指数; 均匀度 (Evenness) 的 Shannoneven、Simpson even 指数和覆盖度 Coverage 指数。由表 2 可知, 本次测序样本的覆盖度 Coverage 指数均在 0.99 以上, 说明测序结果能较好地反映样本的真实情况。Richness 指数值越高, 群落丰度越高。Diversity 指数体现细菌群落多样性水平, Shannon 值越大, 群落多样性越高; Simpson 值越小, 群落多样性越高^[13]。随着回灌进行, 含水介质细菌的群落丰富度、多样性及均匀度均呈现降低现象。这可能是在回灌过程中, 回灌水的注入扰乱了原本含水介质环境, 致使一些自身敏感性较强环境适应性较差的微生物衰亡。

谢, 菌体的发育和扩张在缺氧状态受抑制; 异养菌所属的绿弯菌门在与其它菌体竞争的过程中处于劣势。

在属分类水平上, 回灌始末砂样表层细菌菌属存在较大差异。图 5(b) 显示, 回灌末期, 酸杆菌门下的 *RB41*, *norank_o_Subgroup_7*, *norank_c_Subgroup_6*, 疣微菌门下的 *Candidatus_Udaeobacter*, 放线菌门下的 *unclassified_f_Micromonosporaceae*, *norank_f_67-14*, 红色杆菌属 (*Rubrobacter*), *norank_o_Gaiellales*, *norank_o_IMCC26256*, *Gaiella*, 芽单胞菌门下的 *norank_f_Gemmatimonadaceae*, 厚壁菌门下的微小杆菌属 (*Exiguobacterium*), 绿弯菌门下的 *norank_c_KD4-96* 等菌属相对丰度均降至 0.001% 以下。红色杆菌属 (*Rubrobacter*), *Gaiella*, *Dongia* 均属于专性好氧菌属。变形菌门下的慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*), *norank_f_Diplorickettsiaceae*, 军团菌属 (*Legionella*), *Reyranelia*, 食酸菌属 (*Acidovorax*), *Sphingobium*, *Candidatus_Ovatusbacter*, 浮霉菌门下的 *Singulisphaera*, 蓝细菌门下的 *norank_o_Chloroplast* 以及拟杆菌门下的鞘脂菌属 *Ferruginibacter* 等菌属丰度均增加, 增长幅度达 90% 以上。慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 能够利用糖类和有机酸^[30]。侯志伟等^[31]人用可降解聚合物聚己内脂

(PCL)和聚羟基丁酸戊酸酯(PHBV)为有机碳源进行反硝化处理脱氮研究中发现食酸菌属为生物膜中优势菌属,可降解BDP及进行反硝化作用。根据WHO《饮用水水质准则》军团菌属(*Legionella*)被划定为致病性潜在人类病菌^[32]。

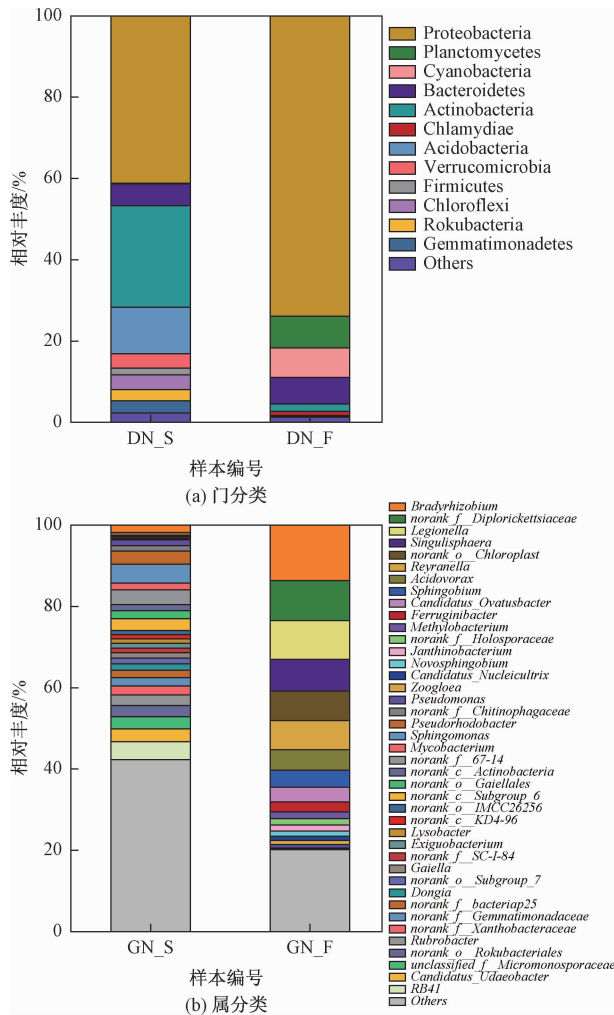


图5 样本在门分类和属分类水平上物种组成及丰度图

Fig. 5 Relative abundance of community structures at the phylum level and the genus level in different samples

3 结论

(1)地下水回灌过程中,含水介质渗透性呈现明显的非线性降低趋势,除了物理及化学堵塞以外,可发生严重的微生物堵塞。空间上,渗流路径增加堵塞减缓,微生物堵塞主要发生于含水介质表层。时间上,各层介质渗透性依次经历稳定波动—快速下降—缓慢下降—趋于稳定四个阶段。

(2)饱水区营养盐指标均高于出水,且 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 PO_4^{3-} 浓度变幅较小; K'_s 降至0.15时,

出水DO出现明显下降现象; $K'_s=0.85$ 时,COD降低,ORP升高,随后COD、ORP均呈现下降趋势,当 K'_s 降至0.15后,COD、ORP有回升现象。

(3)随回灌进行,EPS含量增多,其中多糖含量高于蛋白质含量; $K'_s=0.15$ 时微生物进入内源呼吸阶段,EPS含量降低,且多糖减少量高于蛋白质减少量。

(4)含水介质附着细菌主要分布于26个门,65个纲,162个目,258个科,425个属,767个种;细菌群落丰度、多样性及均匀度均呈现下降现象。样本种群均以变形菌门(Proteobacteria)为优势菌门,假单胞菌属(*Pseudomonas*)为主要优势菌属;含水介质上附着细菌群落结构发生明显演替,兼性厌氧细菌增多,好氧细菌减少。

参考文献 (References):

- [1] 柳山,李洪伟,金晓文,等.疏干降水条件下矿渣回填对地下水环境的影响研究[J].水文地质工程地质,2018,45(6):56-62. [LIU S, LI H W, JIN X W, et al. Research on the environmental impact of backfilling under dewatering mine conditions [J]. Hydrogeology & Engineering Geology, 2018, 45(6): 56-62. (in Chinese)]
- [2] 李文鹏.地质灾害隐患和水文地质环境地质调查计划进展[J].水文地质工程地质,2019,46(2):1-4. [LI W P. Achievements of the program of geological investigation on geo-hazards and hydrogeology and environmental geology [J]. Hydrogeology & Engineering Geology, 2019, 46(2): 1-4. (in Chinese)]
- [3] 张亚军,刘超.地下水资源开发引起的生态与环境问题分析[J].黑龙江水利科技,2019,47(1):33-34. [ZHANG Y J, LIU C. Analysis of ecological and environmental issues caused by groundwater resources development [J]. Heilongjiang Hydraulic Science and Technology, 2019, 47(1):33-34. (in Chinese)]
- [4] 潘俊,宋佳蓉,王昭怡,等.硫酸盐还原菌和铁细菌对回灌堵塞影响的试验研究[J].水文地质工程地质,2018,45(4):31-36. [PAN J, SONG J R, WANG Z Y, et al. Test on the influence of sulfate reducing bacteria and iron bacteria on the clogging of recirculation [J]. Hydrogeology & Engineering Geology, 2018, 45(4): 31-36 (in Chinese)]
- [5] 张晓婉,冶雪艳,杜新强,等.人工回灌地下水过程中微生物堵塞对介质渗透性影响的试验[J].安全与环境学报,2014,14(3):146-150. [ZHANG

- X W, YE X Y, DU X Q, et al. Experimental study of the effect of the microbial clogging on the porous media permeability during the artificial recharge [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2014, 14 (3): 146 – 150. (in Chinese)]
- [6] 杜新强, 冶雪艳, 路莹, 等. 地下水人工回灌堵塞问题研究进展[J]. *地球科学进展*, 2009, 24(9): 973 – 980. [DU X Q, YE X Y, LU Y, et al. Advances in clogging research of artificial recharge[J]. *Advances in Earth Science*, 2009, 24 (9): 973 – 980. (in Chinese)]
- [7] 武晓峰, 唐杰. 地下水人工回灌与再利用[J]. *工程勘察*, 1998, 26(4): 37 – 39. [WU X F, TANG J. Artificial recharge and recycle [J]. *Geotechnical Investigation & Surveying*, 1998, 26(4): 37 – 39. (in Chinese)]
- [8] 赵季初. 鲁北砂岩热储地热尾水回灌试验研究[J]. *山东国土资源*, 2013, 29(9): 23 – 30. [ZHAO J C. Lubei geothermal tail water reinjection experiments in sandstone reservoir[J]. *Shandong Land and Resources*, 2013, 29(9): 23 – 30. (in Chinese)]
- [9] Albrechtsen H J, Winding A. Microbial biomass and activity in subsurface sediments from Vejen, Denmark [J]. *Microbial Ecology*, 1992, 23(3): 303 – 317.
- [10] 姜桂华, 廖资生. 人工微生物脱氮过程中含水层堵塞问题的实验研究[J]. *长春科技大学学报*, 1998, 28(2): 186 – 190. [JIANG G H, LIAO Z S. The experimental study on clogging of aquifer during the treatment of nitric pollution by synthetic microorganism [J]. *Journal of Changchun University of Science and Technology*, 1998, 28 (2): 186 – 190. (in Chinese)]
- [11] 夏璐, 郑西来, 段玉环, 等. 砂柱微生物堵塞过程及机理分析[J]. *水利学报*, 2014, 45(6): 749 – 755. [XIA L, ZHENG X L, DUAN Y H, et al. Analysis of process and mechanism of bioclogging in aqueous media [J]. *Hydrogeology Journal of Hydraulic Engineering*, 2014, 45(6): 749 – 755. (in Chinese)]
- [12] 路莹, 杜新强, 范伟, 等. 地下水人工回灌过程中微生物堵塞的预测[J]. *湖南大学学报(自然科学版)*, 2012, 39(1): 77 – 80. [LU Y, DU Y Q, FAN W, et al. Prediction of microbial clogging in groundwater artificial recharge[J]. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)*, 2012, 39(1): 77 – 80. (in Chinese)]
- [13] LI H, YE D, WANG X, et al. Soil bacterial communities of different natural forest types in Northeast China[J]. *Plant & Soil*, 2014, 383(1/2): 203 – 216.
- [14] ALAIN K, QUERELLOU J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges [J]. *Extremophiles*. 2009, 13(4): 583-594
- [15] MALVIYA S, SCALCO E, AUDIC S, et al. Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016, 113 (11): E1516 – E1525. DOI: 10.1073/pnas.1509523113.
- [16] 崔丙健, 高峰, 胡超, 等. 不同再生水灌溉方式对土壤-辣椒系统中细菌群落多样性及病原菌丰度的影响[J]. *环境科学*, 2019, 40(11): 5151 – 5163. [CUI B J, GAO F, HU C, et al. Effect of different reclaimed water irrigation methods on bacterial community diversity and pathogen abundance in the soil-pepper ecosystem [J]. *Environmental Science*, 2019, 40(11): 5151 – 5163. (in Chinese)]
- [17] KAVITHA S, SELVAKUMAR R, SATHISHKUMAR M, et al. Nitrate removal using *Brevundimonas diminuta* MTCC 8486 from ground water[J]. *Water Science and Technology*, 2009, 60 (2): 517 – 524. .
- [18] 高远, 林山杉, 李天宇, 等. 再生水回灌对土壤理化性质及土壤细菌的影响[J]. *西北师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 55(4): 100 – 106. [GAO M, LIN S S, LI T Y, et al. Effects of reclaimed water reuse on soil physicochemical properties and soil bacteria[J]. *Journal of Northwest Normal University (Natural Science)*, 2019, 55 (4): 100 – 106. (in Chinese)]
- [19] 杨敏, 胡学伟, 宁平, 等. 废水生物处理中胞外聚合物(EPS)的研究进展[J]. *工业水处理*, 2011, 31(7): 7 – 12. [YANG M, HU X W, NING P, et al. Research progress in extracellular polymeric substances applied to biological wastewater treatment [J]. *Industrial Water Treatment*, 2011, 31(7): 7 – 12. (in Chinese)]
- [20] FRØLUND B, PALMGREN R, KEIDING K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin [J]. *Water Research*, 1996, 30(8): 1749 – 1758.
- [21] SHARMA S K, BABITCH J A. Application of Bradford's protein assay to chick brain subcellular fractions[J]. *Journal of Biochemical & Biophysical*

- Methods, 1980, 2(4): 247–250.
- [22] KNOWLES P, DOTRO G, NIVALA J, et al. Clogging in subsurface-flow treatment wetlands: occurrence and contributing factors [J]. Ecological Engineering, 2011, 37(2): 99–112.
- [23] THULLNER M. Comparison of Bioclogging Effects in Saturated Porous Media within One-and Two-Dimensional Flow Systems [J]. Ecological Engineering, 2010, 36(2): 176–196.
- [24] 黄修东, 束龙仓, 刘佩贵, 等. 注水井回灌过程中堵塞问题的试验研究[J]. 水利学报, 2009, 40(4): 430–434. [HUANG X D, SHU L C, LIU P G, et al. Experimental study on clogging of recharge well[J]. Journal of Hydraulic Engineering, 2009, 40(4): 430–434. (in Chinese)]
- [25] SHENDURE J, BALASUBRAMANIAN S, CHURCH G M, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future[J]. Nature, 2017, 550(7676): 345–353.
- [26] SINKKO H, LUKKARI K, SIHVONEN L M, et al. Bacteria contribute to sediment nutrient release and reflect progressed eutrophication-driven hypoxia in an organic-rich continental sea[J]. PLoS ONE, 2013, 8(6): e67061. DOI:10.1371/journal.pone.0067061.
- [27] COSTA M C M S, CARVALHO L, LEAL C D, et al. Impact of inocula and operating conditions on the microbial community structure of two anammox reactors[J]. Environmental Technology, 2014, 35(14): 1811–1822.
- [28] PIEROBON S C, CHENG X, GRAHAM P J, et al. Emerging microalgae technology: a review [J]. Sustainable Energy & Fuels, 2018, 2(1): 13–38.
- [29] 王齐, 谭一凡, 孙吉雄, 等. 中水灌溉绿地对土壤微生物数量的影响[J]. 草原与草坪, 2010, 30(5): 25–29. [WANG Q, TAN Y F, SUN J X, et al. Effect of reclaimed water on soil microorganism community in greenbelt [J]. Grassland and Turf. 2010, 30(5): 25–29. (in Chinese)]
- [30] 蒲强. 根瘤菌分类的新进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 619–633. [PU Q. Advances in rhizobia taxonomy[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 619–633. (in Chinese)]
- [31] 侯志伟, 罗国芝, 谭洪新, 等. 可降解聚合物 PCL 和 PHBV 为碳源固相反硝化处理循环水养殖水脱氮效果研究[C]//2017 年中国水产学会学术年会论文摘要集. 2017. [HOU Z W, LUO G Z, TAN H X, et al. Nitrate removal from recirculating aquaculture system using poly (ϵ -caprolactone) and poly (3-hydroxyvaleric acid) as carbon source[C]// Abstract of paper of annual meeting of Chinese fishery society. 2017 (in Chinese)]
- [32] 杨浩, 张国珍, 杨晓妮, 等. 16S rRNA 高通量测序研究集雨窖水中微生物群落结构及多样性[J]. 环境科学, 2017, 38(4): 1704–1716. [YANG H, ZHANG G Z, YANG X N, et al. Microbial community structure and diversity in cellar water by 16S rRNA high-throughput sequencing [J]. Environmental Science, 2017, 38(4): 1704–1716. (in Chinese)]

编辑:张若琳