



文章栏目：水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.201812182

中图分类号 X703.1

文献标识码 A

潘傲, 张智, 孙磊, 等. 种植不同植物的表面流人工湿地净化效果和微生物群落差异分析[J]. 环境工程学报, 2019, 13(8): 1918-1929.

PAN Ao, ZHANG Zhi, SUN Lei, et al. Purification effects and microbial community differences of the surface-flow constructed wetlands with different vegetation plantation[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2019, 13(8): 1918-1929.

种植不同植物的表面流人工湿地净化效果和微生物群落差异分析

潘傲^{1,2}, 张智^{1,*}, 孙磊¹, 余里洁¹, 李余杰¹

1. 重庆大学城市建设与环境工程学院, 重庆 400045

2. 重庆大学, 三峡库区环境与生态部重点实验室, 重庆 400045

第一作者: 潘傲(1994—), 男, 硕士研究生。研究方向: 人工湿地。E-mail: 2682248665@qq.com

*通信作者: 张智(1960—), 男, 博士, 教授。研究方向: 水处理技术等。E-mail: zhangzhicq@126.com

摘要 为了解植物种类对表面流人工湿地的净化效果的影响及其与微生物群落的关系, 研究了 4 种植物条件下表面流人工湿地的氮磷平衡以及微生物群落结构。结果表明, 各组人工湿地对氨氮(45.53%~80.95%)、总氮(53.67%~80.30%)和总磷(32.97%~55.77%)都有较好的处理效果, 种植植物的人工湿地比未种植的人工湿地具有更高的氨氮、总氮和总磷去除效果, 其中黄菖蒲组对氮的去除效果最好, 美人蕉组对磷的去除效果最好。在表面流人工湿地中, 微生物作用(34.84%~45.44%)是人工湿地氮去除的主要途径, 基质吸附(20.90%~23.91%)是人工湿地磷去除的主要途径, 但是种植植物的人工湿地的氮磷通过微生物去除的量更高。高通量测序分析表明, 相较于未种植植物的人工湿地, 种植植物的人工湿地显示出更高的微生物丰富度、多样性和更高的脱氮除磷功能微生物的丰度。假单胞菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属和硝化螺菌属是人工湿地中主要的脱氮菌属, 也是种植植物的人工湿地高生物脱氮的原因。假单胞菌属和不动杆菌属丰度增加是种植植物的人工湿地高生物除磷的原因。

关键词 表面流人工湿地; 脱氮除磷; 氮磷平衡; 微生物群落

人工湿地 (constructed wetlands, CWs) 被认为是处理废水的低成本技术, 其较低建设和运营成本、便利的管理和高效的去除氮磷效率适合低浓度水平污染物的去除, 能够较好地削减水体的污染物负荷, 同时还具有良好的生态效应^[1-2], 已经广泛应用于污水处理。在人工湿地中, 氮磷平衡是分析氮磷去除途径和评估各自去除贡献的常用方法^[3]。人工湿地氮磷的去除途径主要是通过植物、基质和微生物的物理、化学和生物作用完成的^[4]。WU 等^[5]发现, 表面流人工湿地中植物同化吸收氮、磷的能力分别为 8.46%~30.98% 和 0.46%~2.13%。LU 等^[6]指出, 表面流人工湿地基质填料的吸附、截留、交换等作用去除水中磷的比例大约为 26%。ZHANG 等^[7]发现, 微生物的硝化反硝化作用是人工湿地去除废水中 TN(66.9%~80.5%) 的主要途径。

人工湿地植物不仅具有美学价值, 还显示出对污染物的去除作用, 它通过提供理想的附着位

收稿日期: 2018-12-27; 录用日期: 2019-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51778082)

点来调节微生物群落，且根系分泌物可加速异养反硝化细菌的生长，增加微生物群落丰富度和多样性^[8]，有利于水中氮磷去除。DU 等^[9]发现，植物的种植增加了微生物的丰富度和生物多样性；同时，相关的反硝化属假单胞菌、不动杆菌、根瘤菌、芽孢杆菌和红假单胞菌丰度的增加，增强了微生物对氮的去除作用。HE 等^[10]发现， γ -变形菌、 α -变形菌和 β -变形菌是人工湿地基质中的主要细菌，并在减少硝酸盐和亚硝酸盐的功能上发挥了重要作用。DU 等^[11]发现，植物的种植改变了垂直流人工湿地微生物的组成，并指出假单胞菌属可能是微生物除磷吸附的主要参与者。但是，现有的研究缺少了人工湿地污染物去除途径和微生物群落相结合的分析，以及植物的种植对微生物群落以及微生物氮磷净化作用的影响分析。因此，为了系统地研究人工湿地净化机制和人工湿地处理效果与微生物群落之间的关系，采用 5 种人工湿地系统种植不同植被用于处理低浓度污水，通过人工湿地的氮磷平衡和高通量测序相结合的手段，研究种植不同植物的人工湿地系统氮磷净化效果差异、污染物的去除途径以及微生物群落的变化，并探讨了植物的种植对微生物群落和微生物氮磷净化作用的影响，以期为提高人工湿地对污水的净化效果提供参考。

1 材料与方法

1.1 人工湿地装置与运行

人工湿地装置位于重庆大学校内，采用 100 L 的 LLDPE 桶（上口直径 520 mm，下口直径 430 mm，高度 610 mm），湿地填料为沸石（粒径为 2~5 mm），铺设高度为 30 cm，湿地水深为 20 cm。设置 5 组人工湿地实验，分别为无植物组（I 组）、黄菖蒲组（II 组）、水生美人蕉组（III 组）、梭鱼草组（IV 组）和风车草组（V 组），植物的种植密度为 30 株·m²，每组设置 3 个平行实验。

正式实验日期为 2018-07-03—2018-09-30，水温维持在 23.4~32.2 ℃。实验分为 2 个阶段：第 1 阶段（2018-07-03—2018-09-14），为低负荷阶段（COD=(45±5) mg·L⁻¹、NH₄⁺-N=(3.56±0.48) mg·L⁻¹、TN=(5.18±0.30) mg·L⁻¹、TP=(0.425±0.044) mg·L⁻¹）；第 2 阶段（2018-09-14—2018-09-30），为高负荷阶段（COD=(45±5) mg·L⁻¹、NH₄⁺-N=(6.06±0.16) mg·L⁻¹、TN=(8.15±0.18) mg·L⁻¹、TP=(0.806±0.035) mg·L⁻¹）。采用间歇性进水的方式，水力停留时间 3 d 后，收集水样用于后续的分析并排出湿地的污水，通入新配制的污水。实验中及时对实验植物进行维护，对死亡的植物用生长良好的备用植物替换。

1.2 水质指标分析方法

在实验期间，每 3 d 对人工湿地的进、出水进行取样分析。其中，温度、pH、DO 通过溶解氧仪（520M-01A, Thermo, USA）和 pH 计（8107UWMMD, Thermo, USA）测量。NH₄⁺-N 采用纳氏试剂分光光度法测定，TN 采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法测定，TP 采用钼酸铵分光光度法测定。

1.3 基质和植物相关指标分析方法

在实验开始和结束阶段，采用梅花取样法分 3 层采样，然后将收集的各层基质混匀，采用 H₂SO₄-H₂O₂ 溶液消解，采用半微量凯氏法测定全氮，用钼锑抗比色法测定全磷。在低负荷实验结束阶段，收集植物根系附近的基质样品，并置于无菌密封袋中，基质样品用于分析微生物群落结构，并储存在 -80 ℃，直至 DNA 提取。在实验的开始和结束时测定湿地中植物的湿重，挑选代表性的植株样品在 105 ℃ 下干燥 10 min，以灭活植物中酶的活性，然后在 70 ℃ 下干燥 12 h，测定干重。将植物粉碎成粉末，混合均匀并密封保存，采用 H₂SO₄-H₂O₂ 溶液消解，采用半微量凯氏法测定全氮，用钼锑抗比色法测定全磷。

1.4 高通量测序分析方法

通过 OMEGA Soil DNA 试剂盒提取根系基质样品中微生物 DNA。使用通用细菌引物 16S rRNA 的 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 和 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (V₃~V₄ 区)

对提取的 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件：98 °C (3 min) 初始变性，然后进行 25 个循环，98 °C 变性 30 s，50 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，最后 5 min 延伸至 72 °C。将所有序列读数聚类到操作分类单位 (OTU) (相似性阈值为 97%)。高通量测序服务由上海美吉生物平台提供 (上海，中国)。

1.5 人工湿地氮磷平衡计算方法

氮的去除是由植物吸收、基质吸附、微生物硝化-反硝化作用和 NH_3 的挥发决定的，因为进水中氨氮相对较低并且 pH 为中性， NH_3 的挥发可忽略不计^[12]。磷的去除由植物吸收、基质吸附和微生物作用决定。

基质总氮和总磷积累速率的计算见式 (1)。

$$\eta_{\text{SR}} = (C_{\text{SC1}} - C_{\text{SC0}}) M_{\text{S}} A^{-1} t^{-1} \quad (1)$$

式中： η_{SR} 为基质的总氮和总磷积累速率， $\text{mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$ ； C_{SC0} 和 C_{SC1} 为实验开始和结束时基质的总氮和总磷含量， $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ； M_{S} 为基质的质量，kg； A 为湿地面积， m^2 ； t 为实验总运行时间，d。

植物总氮和总磷吸收速率的计算见式 (2)。

$$\eta_{\text{PR}} = (C_{\text{PC1}} M_{\text{1,1}} - C_{\text{PC0}} M_{\text{1,0}}) A^{-1} t^{-1} \quad (2)$$

式中： η_{PR} 为植物的总氮和总磷吸收速率， $\text{mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$ ； C_{PC0} 和 C_{PC1} 为实验开始和结束时植物的总氮和总磷含量， $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ； $M_{\text{1,0}}$ 和 $M_{\text{1,1}}$ 为实验开始和结束时植物的干重，kg； A 为湿地面积， m^2 ； t 为实验总运行时间，d。

微生物总氮和总磷去除速率的计算见式 (3)。

$$\eta_{\text{MR}} = \sum_{i=1}^n (C_{\text{i,0}} V - C_{\text{i,1}} V) A^{-1} t^{-1} - \eta_{\text{SR}} - \eta_{\text{PR}} \quad (3)$$

式中： η_{MR} 、 η_{SR} 和 η_{PR} 为微生物、基质和植物的总氮和总磷去除速率， $\text{mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$ ； $C_{\text{i,0}}$ 和 $C_{\text{i,1}}$ 为每次进水和出水总氮和总磷浓度， $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ； V 为每次进水的量，L； A 为湿地面积， m^2 ； t 为实验总运行时间，d。

1.6 统计分析

用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行差异性分析，检验数据间的差异性。用 Pearson 检验方法进行相关性分析，检验数据间的相关水平。所有统计分析均使用 SPSS 22.0 版软件进行，并且在 $P < 0.05$ 水平时被认为是显著的。

2 结果与讨论

2.1 人工湿地对污水中氮磷的净化效果

氮的去除率随取样时间的变化情况如图 1 所示。5 组人工湿地系统都能有效地去除水中氨氮和总氮。在低负荷测试期间， $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除率为 50%~94%，II 组 (黄菖蒲) 的去除率最高。如图 2 所示，I 组、II 组、III 组、IV 组和 V 组的平均去除率分别为 62.16%、86.31%、83.28%、76.38% 和 72.51%。在低负荷测试期间，TN 的去除率为 59%~85%，II 组 (黄菖蒲) 表现出最高的去除性能。如图 2 所示，I 组、II 组、III 组、IV 组和 V 组的平均去除率分别为 66.29%、80.30%、77.71%、73.68% 和 70.89%。夏季的人工湿地有高 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TN 去除率，这与 ZHANG 等^[13] 的研究结论相似。在高负荷期间，各组 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率均降低了 9%~11%，TN 去除率均降低了 3%~8%，说明随着氮浓度的升高，氮的去除率会降低。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TN 表现出相似的去趋势，这是因为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 是进水中氮的主要来源， $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 经过硝化-反硝化作用去除，说明人工湿地有较强的反硝化作用。通过种植植物组与 I 组比较发现，对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TN 去除有显著差异 ($P < 0.05$)。这是因为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 容易被植物吸收和利用^[14] 以及植物的种植改变了基质微生物群落。

磷的去除率随取样时间的变化情况如图 3 所示。5 组人工湿地系统都能有效地去除水中总磷。

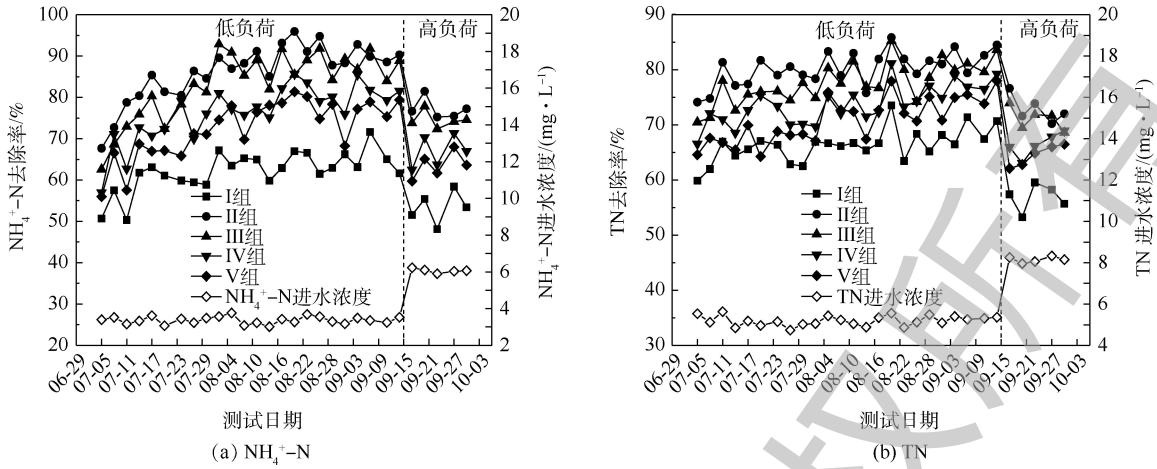


图 1 人工湿地中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TN 的去除率
Fig. 1 Removal rate of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and TN in CWs

在低负荷测试期间，TP 的去除率为 28%~73%，种植 III 组 (美人蕉) 表现出最高的去除性能。如图 2 所示，I 组、II 组、III 组、IV 组和 V 组的平均去除率分别为 37.09%、46.12%、55.77%、54.07% 和 50.45%。在高负荷期间，各组 TP 去除率均降低了 3%~12%，说明随着 TP 浓度的升高，TP 的去除率降低。通过种植植物组与 I 组比较发现，TP 的去除率显著提高 ($P < 0.05$)。这是因为植物生长过程中能吸收和利用磷酸盐，提高了 TP 的去除率^[15]。

实验期间，进水和出水的 pH、DO 和水温 T 的平均值如表 1 所示。与进水 DO 相比，各组出水 DO 浓度都下降了 1.80~2.64 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这是因为微生物去除 COD 和氨氧化过程中消耗了水体中的 DO。另外，种植植物组比 I 组 DO 要高，这是由于植物根系有泌氧功能，从而导致水体中 DO 浓度的增加。Pearson 检验表明，DO 与 pH 呈显著正相关 (相关系数为 0.923, $P < 0.05$)。这是因为植物的光合作用会影响水体的碳酸电离平衡，导致氢氧根离子的浓度增加^[16]。DO 与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率不存在相关性 ($P > 0.05$)。这可能与各组植物吸收作用和根系富集微生物群落不同有关。

2.2 人工湿地氮磷平衡分析

2.2.1 基质和植物的氮磷去除速率

基质的氮磷平均积累速率如图 4 所示。由图 4 可知，II 组 ($84.46 \text{ mg}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{d})^{-1}$)、III 组 ($80.11 \text{ mg}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{d})^{-1}$)、IV 组 ($85.53 \text{ mg}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{d})^{-1}$) 和 V 组 ($83.04 \text{ mg}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{d})^{-1}$) 平均 TN 积累速率显著低于 I 组 ($96.52 \text{ mg}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{d})^{-1}$)

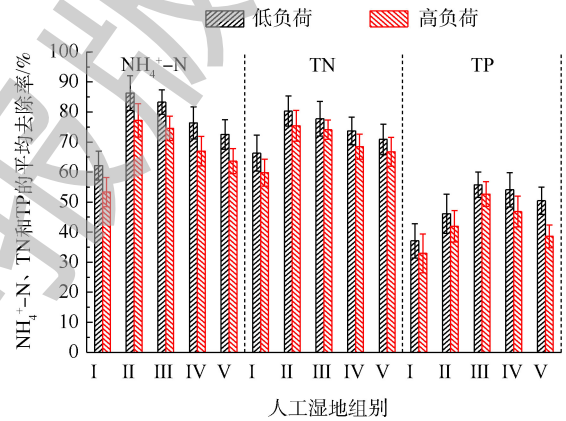


图 2 人工湿地中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN 和 TP 的平均去除率
Fig. 2 Average removal rate of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, TN and TP in CWs

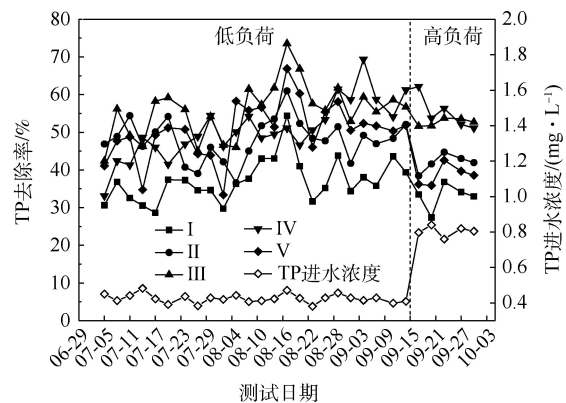


图 3 人工湿地中 TP 的去除率
Fig. 3 Removal rate of TP in CWs

($P < 0.05$)。II组 ($6.10 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$)、III组 ($6.21 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$)、IV组 ($5.95 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$)和V组 ($6.42 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$)平均TP积累速率低于I组 ($6.81 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$) ($P < 0.05$)。这说明人工湿地中种植植物会降低基质中氮磷的积累速率,并与植物吸收和基质吸附2个氮磷积累过程存在竞争关系有关。种植植物组间的基质氮磷积累效果差异,与不同的植物具有不同生长状况有关^[8]。

植物的氮磷平均吸收速率如图4所示。可以看出,平均氮吸收速率III组 ($32.41 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$) > II组 ($24.87 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$) > IV组 ($22.24 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$) > V组 ($17.73 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$), 平均磷吸收速率IV组 ($4.77 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$) > III组 ($4.55 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$) > V组 ($3.25 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$) > II组 ($2.75 \text{ mg} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{d})^{-1}$)。结果表明,水生美人蕉的氮吸收速率最高,梭鱼草的磷吸收速率最高。植物的氮磷平均吸收速率不同,与植物干重增加量、植物体内氮磷含量不同有关。

2.2.2 人工湿地氮磷平衡

人工湿地水体氮磷的去除主要通过基质、植物、微生物和排水4种途径,各组人工湿地的基质、植物、微生物和排水的氮磷去除率占比如图5所示。在5个不同的实验组中,系统排水中的氮含量占总负荷的23.87%~35.99%,植物吸收的氮约占5.36%~9.79%,基质吸附氮约占

表1 人工湿地进出水的参数

Table 1 Characteristics of the influent and effluent in CWs

组别	pH	DO/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	水温/ $^{\circ}\text{C}$
进水	7.73±0.25	5.12±1.22	27.63±2.31
I组出水	7.11±0.31	2.48±0.32	27.42±2.68
II组出水	7.22±0.13	2.74±0.45	27.11±2.12
III组出水	7.29±0.23	2.93±0.34	26.66±2.78
IV组出水	7.36±0.18	3.32±0.51	26.87±2.43
V组出水	7.33±0.29	3.12±0.41	27.23±2.92

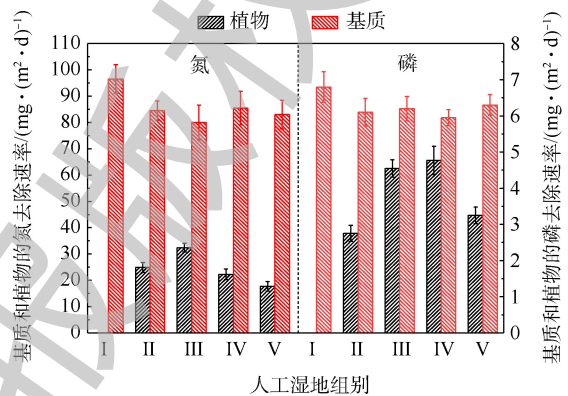


图4 基质和植物氮磷去除速率

Fig. 4 Nitrogen and phosphorus removal speed by substrate and plants

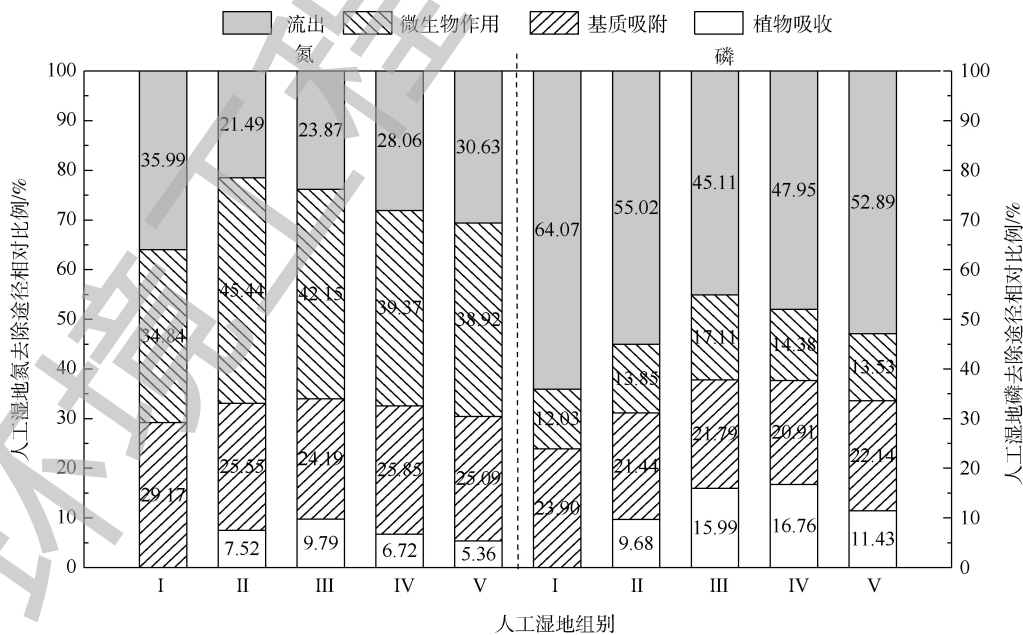


图5 人工湿地氮磷去除途径相对比例

Fig. 5 Relative proportion of nitrogen and phosphorus removal pathways in CWs

24.19%~29.17%，系统微生物去除氮约占 34.84%~45.44%。在氮的去除方面，微生物去除>基质吸附>植物吸收的作用。植物吸收氮仅占 5.36%~9.79%，说明植物对水中氮直接吸收作用很小。郑于聪^[17]研究了中试规模的人工湿地处理污水发现，植物对水中氮的去除贡献仅占 5.80%~13.90%，即植物对污水中氮的去除贡献很小，与本实验的结果相似。微生物去除氮约占 34.84%~45.44%，说明微生物作用是人工湿地氮去除的最主要的途径。通过与 I 组比较，发现种植植物组微生物氮去除率明显增加 ($P<0.05$)。这可能与植物根系分泌物能改善微生物生长环境，有利于反硝化微生物的附着生长有关。植物的种植不仅对氮有吸收作用 (5.36%~9.79%)，还增强了微生物对氮的去除作用 (增加了 4.08%~10.60%)。

在 5 个不同的实验组中，系统排水中的磷含量占总负荷的 45.10%~64.07%，植物吸收的磷约占 9.68%~16.76%，基质吸附磷约占 20.91%~23.90%，系统微生物去除磷约占 12.73%~17.11%。在磷的去除方面，排水中的磷含量达到 45.10%~64.07%，说明人工湿地对总磷去除效果较差。这可能与 TP 浓度低和运行条件不利于人工湿地对其去除有关。基质吸附比植物吸收和微生物作用对磷去除作用强，说明了基质吸附是人工湿地中磷去除的主要途径。植物吸收磷仅占 9.68%~16.76%，说明植物对水中磷直接吸收作用很小。吴海明^[18]研究中试湿地处理污水发现，植物吸收的磷仅占湿地中磷总去除量的 4.81%~22.23%。沈莹等^[19]研究中试潜流湿地处理污染河水发现，植物的磷吸收量占湿地磷去除量的 8.80%。以上研究均发现，植物对湿地中磷去除的贡献较小，与本实验有相似的结论。通过与 I 组比较，种植植物组微生物磷去除率出现增加现象，III 组与各组有显著差异。这是因为植物根系分泌物的不同影响了基质中微生物群落分布^[20]。植物的种植不仅对磷 (9.68%~16.76%) 有吸收作用，还增强了微生物对磷 (增加了 1.82%~5.08%) 的去除作用。

2.3 人工湿地微生物群落分析

2.3.1 微生物序列和多样性分析

微生物多样性和丰富度如表 2 所示。各组湿地微生物测序中样本文库覆盖率 (coverage) 均大于 0.98，说明测序结果可以很好地代表样本的真实情况^[21]。I 组、II 组、III 组、IV 组和 V 组检测到的 OTU 数目分别为 1 441、1 736、1 594、1 464 和 1 478，Ace 分别为 1 770.18、2 004.13、1 747.37、1 754.82 和 1 672.91，Chao 分别为 1 754.28、2 063.44、1 772.99、1 806.11 和 1 705.38，发现了 II 组与其他组有明显差异 ($P<0.05$)，说明黄菖蒲的种植改善了微生物丰富度。I 组、II 组、III 组、IV 组和 V 组的 Shannon 指数为 4.99、6.38、6.01、5.79 和 5.59，Simpson 指数为 0.024 5、0.003 3、0.006 7、0.011 0 和 0.020 8，植物组与 I 组有明显差异 ($P<0.05$)。其中 II 组和 III 组的多样性最高，说明种植植物能有效地改善群落多样性。植物种植改善了微生物群落多样性和丰富度，这与植物根系泌氧和根系分泌的碳源有利于微生物富集生长有关^[22]。另外，通过逐步线性回归分析发现，Shannon 和 Sobs 决定系数分别为 0.828 和 0.208 ($P<0.05$)。说明微生物丰富度和多样性的改善有利于微生物对氮

表 2 人工湿地微生物多样性和丰富度

Table 2 Microbial diversity and richness in samples of CWs

组别	测序数量/个	多样性指数			丰富度指数		覆盖率
		Shannon	Simpson	Sobs	Ace	Chao	
I	37 707	4.99	0.024 5	1 441	1 770.18	1 754.28	0.985
II	42 513	6.38	0.003 3	1 736	2 004.13	2 063.44	0.986
III	74 434	6.00	0.006 7	1 594	1 747.37	1 772.99	0.994
IV	38 033	5.79	0.011 0	1 464	1 754.82	1 806.11	0.982
V	49 548	5.59	0.020 8	1 478	1 672.91	1 705.38	0.991

的去除作用。

2.3.2 微生物门、纲分类水平组成差异分析

图6展示了人工湿地各组微生物独有和共有的 OTU 数目。5组中共有的 OTU 数目为 696, 分别占 I 组、II 组、III 组、IV 组和 V 组检测到的 OTU 数目的 48.33%、40.09%、43.66%、47.54% 和 47.09%, 说明人工湿地基质微生物群落出现了显著的变化。这是因为植物根系改变了微生物生长的环境, 使得微生物群落出现差异。

人工湿地各组微生物门水平组成如图7所示。可将微生物检测频率>1%的菌门做为主要的菌门^[23]。共发现8个菌门, 分别为变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)和芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)。其中5大优势菌门分别为变形菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、放线菌门和硝化螺旋菌门。ZHANG等^[24]研究三亚河红树林湿地发现, 湿地基质的优势菌门为变形菌、拟杆菌、放线菌和厚壁菌。LI等^[25]研究发现, 多级表面流湿地基质的优势菌门为变形菌、厚壁菌、绿弯菌和放线菌, 其中变形菌为最主要的菌门。以上研究中人工湿地的优势菌门, 与本实验的优势菌门相似, 说明了人工湿地基质有相似的优势菌门。变形菌为最主要菌门, I组、II组、III组、IV组和V组的相对丰度为 60.23%、52.15%、45.80%、43.19%和 48.70%, 其次是厚壁菌门(分别为 7.39%、16.08%、16.42%、18.06%和 10.64%), 绿弯菌门(分别为 6.39%、4.64%、9.91%、14.72%和 13.46%), 放线菌门(分别为 9.88%、8.84%、8.53%、7.06%和 6.59%)和硝化螺旋菌门(分别为 3.94%、5.89%、7.31%、6.09%和 4.74%)。相对于I组, 植物组变形菌门的相对丰度降低, 这是因为植物的种植改善了微生物多样性。据相关研究, 变形菌门和厚壁菌门对反硝化有至关重要的作用^[26], 硝化螺旋菌门含有丰富的硝化功能的菌属^[27]。相对于I组, 植物组的厚壁菌门和硝化螺旋菌门相对丰度增加, 这可能是植物组微生物有较高的氮去除率的原因。

变形菌为最主要菌门。据相关研究, 变形菌在人工湿地微生物氮磷去除中起到主要作用^[28]。人工湿地各组变形菌的纲水平组成如图8所示。可将微生物检测频率>1%的菌纲做为主要的菌纲。共发现4个菌纲, 分别为 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)、 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)和 δ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*), 其中 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲

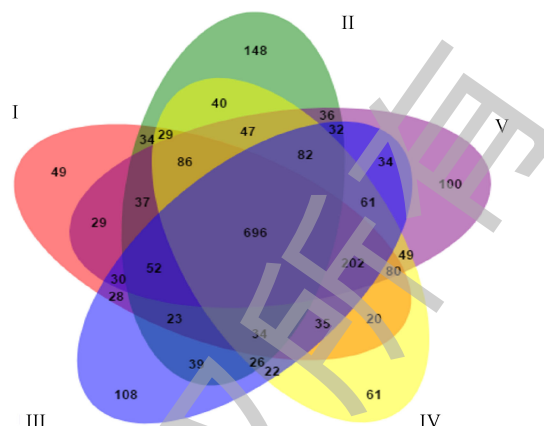


图6 人工湿地共有和独有 OTU 数量的 Venn 图
Fig. 6 Venn diagrams showing the unique and shared OTUs for CWs

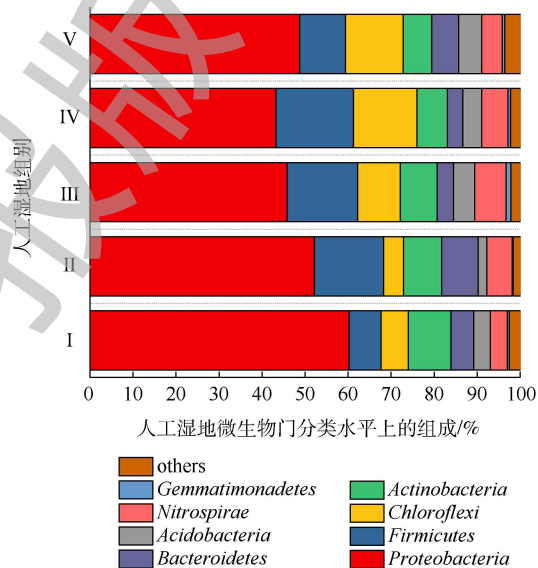


图7 人工湿地基质微生物门分类水平上细菌菌落组成

Fig. 7 Percent of community abundance on phylum level in substrate of CWs

和 β -变形菌纲是主要的菌纲。4 个菌纲都属于革兰氏阴性菌，说明了人工湿地基质富集革兰氏阴性菌。这有利于污染物的生物降解。LI 等^[29-30]发现 β -变形菌和 γ -变形菌在去除硝酸盐和亚硝酸盐的生态功能方面发挥重要作用。ZHONG 等^[31]发现人工湿地中大多数可能的异养反硝化菌属于 β -变形菌。LIU 等^[32]发现 γ -变形菌纲中高丰度的假单胞菌属和动杆菌属细菌包含能发生高效聚磷的细菌。如图 8 所示，相比于 I 组，植物组的 β -变形菌和 γ -变形菌的丰度均高于 I 组，说明了植物根系富集 β -变形菌和 γ -变形菌。这可能是植物组微生物氮磷去除率高于 I 组的原因。

2.3.3 功能微生物差异分析

据有关研究，不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、脱氮单胞菌属 (*Dechloromonas*)、罗思河小杆菌属 (*Rhodanobacter*)、热单胞菌属 (*Thermomonas*) 和索氏菌属 (*Thauera*) 等具有反硝化的作用，参与氮的转化^[33-35]。另据有关研究，硝化杆菌属 (*Nitrobacter*) 和硝化螺菌属 (*Nitrospira*) 具有硝化功能^[36]，氨基杆菌属 (*Aminobacterium*)、亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属 (*Nitrosospira*) 和亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*) 具有氨氧化功能^[23,37]。另外，YAO 等^[38]发现不动杆菌可以通过异养来转化氮硝化和好氧反硝化。DU 等^[11]认为不动杆菌或假单胞菌可能是主要的在人工湿地中负责 TP 去除的属。STREICHAN 等^[39]发现假单胞菌具有高磷的 PAO 清除能力。

如图 9 所示，在人工湿地中检测出相对丰度大于 0.5% 的 9 种脱氮除磷功能菌属，分别是不动杆菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、硫杆菌属、脱氮单胞菌属、红杆菌属、热单胞菌属、硝化螺菌属和亚硝化单胞菌属，发现了具有氨氧化细菌亚硝化单胞菌属丰度 (0.68%~1.27%) 远低于硝化作

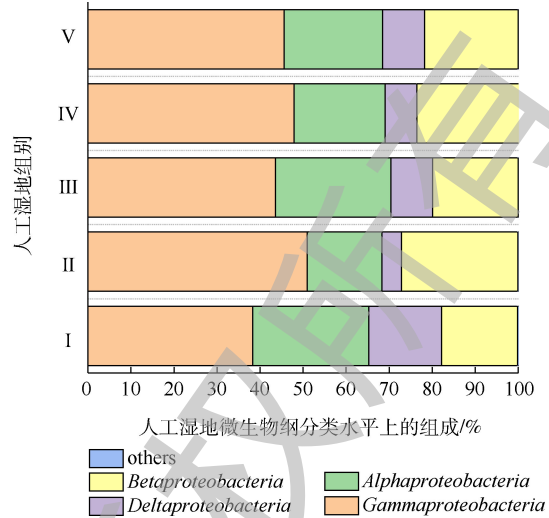


图 8 人工湿地基质微生物纲分类水平上细菌菌落组成

Fig. 8 Percent of community abundance of on class level in substrate of CWs

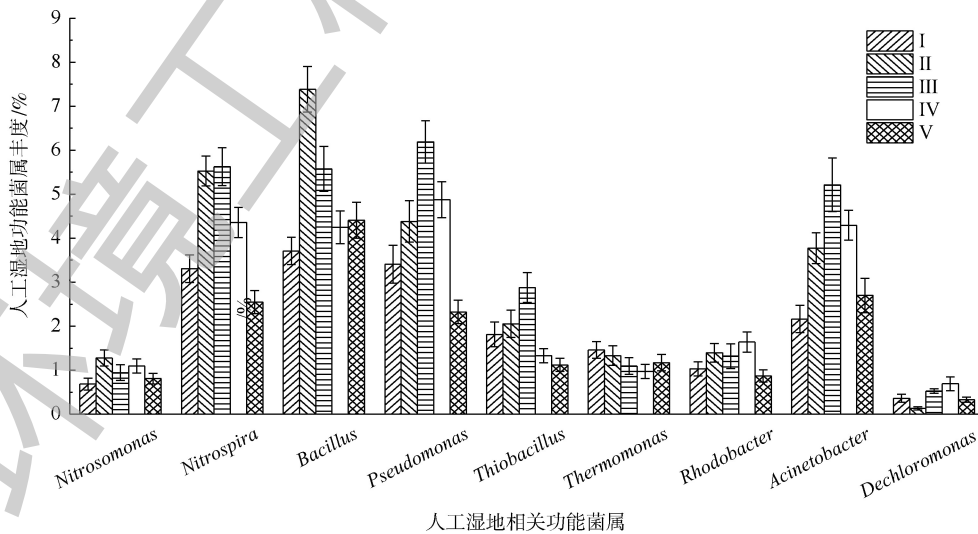


图 9 人工湿地中氮磷相关功能属丰度

Fig. 9 Relative abundance of functional genera related with nitrogen and phosphorus in CWs

用硝化螺菌属 (2.54%~5.62%)。据相关研究, 某些硝化螺菌属能将 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 完全氧化成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ^[40], 这可能是人工湿地各组均有较好氨氮去除效果的原因。自养反硝化的硫杆菌的丰度 (1.12%~2.87%) 明显低于异养反硝化的不动杆菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、热单胞菌属、红杆菌属和脱氮单胞菌属的总丰度 (12.13%~19.91%), 说明人工湿地易于富集异养反硝化菌。这是因为实验有较高的 C/N(7.8~10.2), 同时植物根系分泌碳源, 可加速异养反硝化细菌的生长。

不动杆菌属、假单胞菌属和芽孢杆菌属是丰度最高的异养反硝化菌属, 占异养反硝化菌属总丰度的 66.5%~75.9%, 故认为这 3 个菌属在 TN 去除过程中起主要作用。植物组的不动杆菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属和硝化螺菌属丰度明显高于 I 组, 在 II 组和 III 组 (最高微生物氮去除率的 2 组) 丰度最高, 表明不动杆菌、假单胞菌和芽孢杆菌丰度与人工湿地微生物氮去除率有关, 其丰度的增加是植物组微生物氮去除率较高的原因。不动杆菌属、假单胞菌属具有高效聚磷作用和分泌有机酸和磷酸酶将难溶性磷转化可以被植物吸收利用的 H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-} 形态^[41]。通过植物组与 I 组比较发现, 植物的种植提高了除磷功能菌属 (不动杆菌属和假单胞菌属) 的丰度, 增强了微生物磷去除率, 其中 III 组 (最高微生物磷去除率的组) 丰度最高, 表明不动杆菌和假单胞菌的丰度与人工湿地微生物磷去除率有关, 其丰度的增加是植物组微生物磷去除率较高的原因。

3 结论

1) 夏季人工湿地各组可有效地去除污水中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN 和 TP 污染物。低负荷下, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN 和 TP 的平均去除率为 51.48%~80.95%、62.43%~80.30% 和 37.09%~55.77%。高负荷下, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN 和 TP 的平均去除率为 45.53%~75.14%、53.67%~71.11% 和 32.97%~52.69%。种植植物的人工湿地比未种植人工湿地, 在去除 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN 和 TP 污染物方面具有更好的性能。其中 II 组 (黄菖蒲) 对氮的去除效果最好, III 组 (美人蕉) 对磷的去除效果最好。

2) 微生物作用 (34.84%~45.44%) 是人工湿地氮去除的主要途径, 基质吸附 (20.90%~23.91%) 是人工湿地磷去除的主要途径。植物的种植不仅对氮 (5.36%~9.79%) 和磷 (9.68%~16.76%) 有吸收作用, 还增强了微生物对氮 (4.08%~10.60%) 和磷 (1.82%~5.08%) 的去除作用。

3) 植物的种植改善了基质微生物的丰富度和生物多样性, 并发现微生物丰富度和多样性的改善有利于微生物对氮的去除作用。植物的种植提高了脱氮除磷功能微生物的丰度, 增强了微生物对氮磷去除作用。人工湿地富集了假单胞菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属和硝化螺菌属等优势硝化和反硝化菌属, 其中假单胞菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属和硝化螺菌属是人工湿地中主要的脱氮菌属, 其丰度的增加是种植植物的人工湿地实验组微生物氮去除率较高的原因。人工湿地富集了优势聚磷菌属 (不动杆菌和假单胞菌), 不动杆菌和假单胞菌丰度增加是植物组微生物磷去除率较高的原因。

参考文献

- [1] FAULWETTER J L, GAGNON V, SUNDBERG C, et al. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review[J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35(6): 987-1004.
- [2] 曾毅夫, 邱敬贤, 刘君, 等. 人工湿地水处理技术研究进展[J]. *湿地科学与管理*, 2018, 14(3): 62-65.
- [3] WU H L, WANG X Z, HE X J, et al. Effects of root exudates on denitrifier gene abundance, community structure and activity in a micro-polluted constructed wetland[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 598: 697-703.
- [4] THOMAS R, GOUGH R, FREEMAN C. Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) removal in constructed wetlands: The role of plants in the treatment of a typical pharmaceutical and personal care product[J]. *Ecological Engineering*, 2017, 106: 415-422.

- [5] WU H M, ZHANG J A, LI P Z, et al. Nutrient removal in constructed microcosm wetlands for treating polluted river water in northern China[J]. *Ecological Engineering*, 2011, 37(4): 560-568.
- [6] LU S Y, WU F C, LU Y, et al. Phosphorus removal from agricultural runoff by constructed wetland[J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35(3): 402-409.
- [7] ZHANG S N, XIAO R L, LIU F, et al. Effect of vegetation on nitrogen removal and ammonia volatilization from wetland microcosms[J]. *Ecological Engineering*, 2016, 97: 363-369.
- [8] CHUNG A K C, WU Y, TAM N F Y, et al. Nitrogen and phosphate mass balance in a sub-surface flow constructed wetland for treating municipal wastewater[J]. *Ecological Engineering*, 2008, 32(1): 81-89.
- [9] DU L, TRINH X T, CHEN Q R, et al. Enhancement of microbial nitrogen removal pathway by vegetation in integrated vertical-flow constructed wetlands (IVCWs) for treating reclaimed water[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 249: 644-651.
- [10] HE Q L, ZHOU J, WANG H Y, et al. Microbial population dynamics during sludge granulation in an A/O/A sequencing batch reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 214: 1-8.
- [11] DU L, CHEN Q R, LIU P P, et al. Phosphorus removal performance and biological dephosphorization process in treating reclaimed water by integrated vertical-flow constructed wetlands (IVCWs)[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 204-211.
- [12] GARCÍA-GONZÁLEZ M C, VANOTTI M B, SZOGI A A. Recovery of ammonia from swine manure using gas-permeable membranes: Effect of aeration[J]. *Journal of Environmental Management*, 2015, 152: 19-26.
- [13] ZHANG J, SUN H M, WANG W G, et al. Enhancement of surface flow constructed wetlands performance at low temperature through seasonal plant collocation[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 224: 222-228.
- [14] REWALD B, KUNZE M E, GODBOLD D L. $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ nutrition influence on biomass productivity and root respiration of poplar and willow clones[J]. *Global Change Biology Bioenergy*, 2016, 8(1): 51-58.
- [15] 李伟斯, 李长虹, 徐斌, 等. 人工湿地植被净化水质效果及其氮磷累积研究[J]. *水土保持研究*, 2018, 25(3): 250-257.
- [16] 殷晓乐. 季节性植物搭配强化人工湿地净化污水效果及其作用机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [17] 郑于聪. 污染河水的人工湿地净化特性及植物作用原理研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2016.
- [18] 吴海明. 表面流人工湿地处理北方污染河水的长期净化效果及相关机理研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [19] 沈莹, 郑于聪, 王晓昌, 等. 不同尺度潜流人工湿地对污染河水的净化机制[J]. *环境工程学报*, 2018, 12(6): 1667-1675.
- [20] SRIVASTAVA J K, CHANDRA H, KALRA S J S, et al. Plant-microbe interaction in aquatic system and their role in the management of water quality: A review[J]. *Applied Water Science*, 2016, 7: 1-12.
- [21] 李玲丽. 复合人工湿地脱氮途径及微生物多样性研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2015.
- [22] URAKAWA H, DETTMAR D L, THOMAS S. The uniqueness and biogeochemical cycling of plant root microbial communities in a floating treatment wetland[J]. *Ecological Engineering*, 2017, 108: 573-580.
- [23] WU Y H, HAN R, YANG X N, et al. Correlating microbial community with physicochemical indices and structures of a full-scale integrated constructed wetland system[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(15): 6917-6926.
- [24] ZHANG Y Y, DONG J D, YANG B, et al. Bacterial community structure of mangrove sediments in relation to environmental variables accessed by 16S rRNA gene-denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting[J]. *Scientia Marina*, 2009, 73(3): 487-498.

- [25] LI X, LI Y Y, LI Y, et al. Diversity and distribution of bacteria in a multistage surface flow constructed wetland to treat swine wastewater in sediments[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(24): 10755-10765.
- [26] MIAO Y, LIAO R X, ZHANG X X, et al. Metagenomic insights into Cr(VI) effect on microbial communities and functional genes of an expanded granular sludge bed reactor treating high-nitrate wastewater[J]. *Water Research*, 2015, 76: 43-52.
- [27] 房昫昊, 彭剑峰, 宋永会, 等. 高通量测序法表征潜流人工湿地中不同植物根际细菌群落特征[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(3): 911-918.
- [28] ZHANG X M, HUA X F, YUE X P. Comparison of bacterial community characteristics between complete and shortcut denitrification systems for quinoline degradation[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 101(4): 1-11.
- [29] LI C, REN H Q, XU M, et al. Study on anaerobic ammonium oxidation process coupled with denitrification microbial fuel cells (MFCs) and its microbial community analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 175: 545-552.
- [30] LI L Z, HE C G, JI G D, et al. Nitrogen removal pathways in a tidal flow constructed wetland under flooded time constraints[J]. *Ecological Engineering*, 2015, 81: 266-271.
- [31] ZHONG F, WU J, DAI Y R, et al. Bacterial community analysis by PCR-DGGE and 454-pyrosequencing of horizontal subsurface flow constructed wetlands with front aeration[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(3): 1499-1512.
- [32] LIU H, LU Q, WANG Q, et al. Isolation of a bacterial strain, *Acinetobacter* sp. from centrate wastewater and study of its cooperation with algae in nutrients removal[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 235: 59-69.
- [33] MING X, LIU W J, LI C, et al. Evaluation of the treatment performance and microbial communities of a combined constructed wetland used to treat industrial park wastewater[J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2016, 23(11): 10990-11001.
- [34] BELLINI M I, GUTIÉRREZ L, TARLERA S, et al. Isolation and functional analysis of denitrifiers in an aquifer with high potential for denitrification[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2013, 36(7): 505-516.
- [35] KANG Y, ZHANG J, XIE H J, et al. Enhanced nutrient removal and mechanisms study in benthic fauna added surface-flow constructed wetlands: The role of *Tubifex tubifex*[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 157-165.
- [36] DALAHMEH S S, JÖNSSON H, HYLANDER L D, et al. Dynamics and functions of bacterial communities in bark, charcoal and sand filters treating greywater[J]. *Water Research*, 2014, 54(4): 21-32.
- [37] JIA F, LAI C, CHEN L, et al. Spatiotemporal and species variations in prokaryotic communities associated with sediments from surface-flow constructed wetlands for treating swine wastewater[J]. *Chemosphere*, 2017, 185: 1-10.
- [38] YAO S, NI J R, MA T, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 139(13): 80-86.
- [39] STREICHAN M, GOLECKI J R, SCHON G. Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorus removal[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, 73(2): 113-124.
- [40] DAIMS H, LEBEDEVA E V, PJEVAC P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. *Nature*, 2015, 528: 504-509.
- [41] 雷旭, 李冰, 李晓, 等. 复合垂直流人工湿地系统中不同植物根际微生物群落结构[J]. *生态学杂志*, 2015, 34(5): 1373-1381.
(本文编辑: 郑晓梅, 张利田)

Purification effects and microbial community differences of the surface-flow constructed wetlands with different vegetation plantation

PAN Ao^{1,2}, ZHANG Zhi^{1,*}, SUN Lei¹, YU Lijie¹, LI Yujie¹

1. School of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China

2. Key Laboratory of Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400045, China

*Corresponding author, E-mail: zhangzhicq@126.com

Abstract In order to investigate the effects of vegetation species on the purification performance of surface-flow constructed wetlands (CWs) and its relationship with microbial community in CWs, the balance of nitrogen and phosphorus, as well as the microbial community in CWs with four types of vegetation plantation were studied. The results revealed that each CW had a good performance on $\text{NH}_4\text{-N}$, TN and TP removal, and the corresponding removal rates were 45.53%~80.95%, 53.67%~80.30% and 32.97%~55.77%, respectively. Moreover, CWs with vegetation plantation generally presented a higher $\text{NH}_4\text{-N}$, TN and TP removal rate than CWs without vegetation plantation, of which *Iris pseudacorus* planted CWs achieved the best nitrogen removal, and *Canna glauca* planted CWs achieved the best phosphorus removal. In CWs, the main nitrogen removal was dependent on the microbial process with removal rate of 31.34%~45.44%, and the main phosphorus removal was ascribed to the substrate adsorption with removal rate of 20.90%~23.91%. However, CWs with vegetation plantation showed higher nitrogen and phosphorus removal rates through microbes than CWs without vegetation plantation. The high-throughput sequencing analysis indicated that CWs with vegetation plantation showed higher microbial abundant, biodiversity and higher microbial abundance of denitrification and dephosphorization than CWs without vegetation plantation. In addition, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* and *Nitrospira* were the main genus of denitrification and responsible for the high biological denitrification effect in CWs with vegetation plantation, and the increase in the abundance of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were responsible for the high biological dephosphorization effect.

Keywords surface-flow constructed wetlands; nitrogen and phosphorus removal; mass balance of nitrogen and phosphorus; microbial community